

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA TROPICAL**



**TESIS**

**IDENTIFICACION Y CONTROL DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICION  
PARDA DE LA MAZORCA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CON CEPAS DE  
*Trichoderma* spp., EN LA PROVINCIA DE LA CONVENCION - CUSCO**

**PRESENTADA POR:**

Br. ITALA AYBAR ROJAS

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL  
DE INGENIERO AGRÓNOMO TROPICAL**

**ASESORES:**

Mg. Sc. LUIS JUSTINO LIZÁRRAGA  
VALENCIA

PhD. FANNY ROSARIO MARQUEZ ROMERO

**CUSCO - PERÚ**

**2025**



# Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

## INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-321-2025-UNSAAC)

El que suscribe, el Asesor Mg Sc Luis Justino Lizárraga Valencia.....  
..... quien aplica el software de detección de similitud al  
trabajo de investigación/tesis titulada: .....

Identificación y control del agente causal de la pudrición parda de la  
mazorca de cacao (Theobroma cacao L.) con cepas de Trichoderma spp,  
en la provincia de La Convención - Cusco.....

Presentado por: Itala Aybar Rojas..... DNI N° 73418027.....;  
presentado por: ..... DNI N°: .....

Para optar el título Profesional/Grado Académico de .....  
Ingeniero Agrónomo Tropical.....

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 02 veces, mediante el  
Software de Similitud, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso del Sistema Detección de**  
**Similitud en la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 9.....%.

### Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.	<u>X</u>
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las subsanaciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto**  
las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, 04 de octubre..... de 2025.....

Fanny Rosario Marquez Romero

FANNY ROSARIO MARQUEZ ROMERO

DNI: 24990500

ORCID:0000-0002-0759-3318

Firma

Post firma Luis Justino Lizárraga Valencia

Nro. de DNI 23902170

ORCID del Asesor 0000-0001-5600-7998

### Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: **oid:** 27259:507995844.....

# TRABAJO DE TESIS-ITALA AYBAR ROJAS FINAL 2-10-2025.docx

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

## Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::27259:507995844

100 páginas

Fecha de entrega

4 oct 2025, 11:14 p.m. GMT-5

16.646 palabras

94.055 caracteres

Fecha de descarga

4 oct 2025, 11:49 p.m. GMT-5

Nombre del archivo

TRABAJO DE TESIS-ITALA AYBAR ROJAS FINAL 2-10-2025.docx

Tamaño del archivo

41.9 MB

## 9% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




### Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 8 palabras)

### Exclusiones

- N.º de fuentes excluidas
- N.º de coincidencias excluidas

### Fuentes principales

- 9%  Fuentes de Internet
- 3%  Publicaciones
- 6%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

### Marcas de integridad

#### N.º de alerta de integridad para revisión



#### Texto oculto

33 caracteres sospechosos en N.º de páginas

El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	ix
AGRADECIMIENTO .....	x
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN .....	3
1.1. Identificación del problema objeto de investigación.....	3
1.2. Formulación del problema .....	4
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	5
2.1. Objetivos .....	5
2.2. Justificación.....	5
III. HIPÓTESIS .....	7
3.1. Hipótesis general .....	7
3.2. Hipótesis específica.....	7
IV. MARCO TEÓRICO .....	8
4.1. Antecedentes .....	8
4.2. Bases teóricas .....	10
4.3. Marco conceptual .....	24
V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	28
5.1. Tipo de investigación .....	28
5.2. Ubicación espacial de la investigación.....	28

5.3.	Ubicación temporal .....	28
5.4.	Variables de la investigación.....	29
5.5.	Materiales y métodos .....	30
5.6.	Metodología .....	31
VI.	RESUTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
6.1.	Resultados .....	44
6.2.	Discusiones.....	60
VII.	CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS .....	66
IX.	BIBLIOGRAFÍA .....	68
X.	ANEXOS FOTOGRÁFICOS.....	78

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Listado de grupos genéticos de cacao y su distribución geográfica en América. ....	11
Figura 2. Morfología de <i>Phytophthora palmivora</i> . ....	15
Figura 3. Ciclo sexual y asexual de <i>Phytophthora palmivora</i> . ....	17
Figura 4. Síntomas por infección de <i>Phytophthora palmivora</i> en frutos y tallos de cacao. ....	18
Figura 5. Rasgos de <i>Trichoderma harzianum</i> . ....	21
Figura 6. Rasgos de <i>Trichoderma viride</i> . ....	21
Figura 7. Síntoma de la pudrición parda en mazorcas de cacao .....	32
Figura 8. Proceso para el aislamiento del agente causal de la pudrición parda. ....	34
Figura 9. Proceso de aislamiento del agente causal de la pudrición parda .....	35
Figura 10. Proceso de inoculación en mazorca sana del clon CCN51.....	36
Figura 11. Placa Petri marcada en evaluación con dos líneas perpendiculares que facilita las mediciones correspondientes. ....	38
Figura 12. Placa Petri marcada en evaluación con una línea recta que delimita el diámetro de 90 mm.....	40
Figura 13. Proceso de siembra de los inóculos respectivos en placas Petri dentro de la cabina de bioseguridad. ....	41
Figura 14. Uso del microscopio para observar el crecimiento y desarrollo de las cepas de <i>Trichoderma spp</i> empleadas en el experimento anterior e identificar micoparasitismo frente a <i>Phytophthora palmivora</i> .....	43
Figura 15. Recolección de muestras .....	44
Figura 16. Muestras de aislamiento del agente causal de la pudrición parda en la mazorca de cacao a cinco días de la siembra. ....	45

Figura 17. Muestras de aislamiento del agente causal de la pudrición parda en la mazorca de cacao a los ocho días de la siembra.....	46
Figura 18. Observación microscópica de la colonia aislada, teniendo presencia de estructuras llamadas esporangios. ....	47
Figura 19. Características morfológicas de <i>Phytophthora palmivora</i> , aislados a partir de mazorcas de cacao con pudrición parda.....	50
Figura 20. Velocidad de crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma spp</i> y <i>Phytophthora palmivora</i> hasta cubrir la placa de 90mm. ....	52
Figura 21. Capacidad de inhibición (antagonismo) de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Phytophthora palmivora</i> . ....	57
Figura 22. Confrontación de colonias.....	58
Figura 23. Vistas microscópicas de micoparasitismo. ....	59
Figura 24. Muestras de <i>Phytophthora palmivora</i> .....	61
Figura 25. Recolección de muestras en el sector Pan de azúcar del distrito de Echarati – La convención – Cusco.....	78
Figura 26. Muestras de mazorca de cacao con síntomas de pudrición parda en el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba, listos para el procedimiento del aislamiento del fitopatógeno. ....	78
Figura 27. Muestra de mazorca de cacao con síntomas de pudrición parda con presencia de signo de la enfermedad, luego de conservar en cámara húmeda.....	79
Figura 28. Placas Petri en evaluación: crecimiento micelial de <i>Phytophthora palmivora</i> a las 48 horas después de la siembra.....	80



Figura 29. Placas Petri en evaluación: crecimiento micelial de <i>Phytophthora palmivora</i> a las 96 horas después de la siembra. ....	81
Figura 30. Placas Petri en evaluación: del crecimiento micelial de <i>Phytophthora palmivora</i> a las 120 horas después de la siembra. ....	82
Figura 31. <i>Trichoderma viride</i> en evaluación. ....	83
Figura 32. <i>Trichoderma lignorum</i> en evaluación. ....	84
Figura 33. <i>Trichoderma harzianum</i> en evaluación. ....	84
Figura 34. Acompañamiento del asesor Mg Sc. Luis Justino Lizarraga Valencia durante el desarrollo de la presente investigación en el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba. ....	85
Figura 35. Acompañamiento de la asesora Ph.D. Fanny Rosario Márquez Romero durante la ejecución de la investigación en el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba. ....	85
Figura 36. Procedimientos preliminares a la instalación de un experimento. ....	86

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Descripción de operacionalización de variables.....	29
Tabla 2.	Descripción de los tratamientos empleados para determinar la velocidad de crecimiento micelial de <i>Phytophthora palmivora</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> y <i>Trichoderma lignorum</i> .....	39
Tabla 3.	Descripción de tratamientos empleados para determinar la inhibición de las cepas de <i>Trichoderma spp</i> sobre el fitopatógeno <i>Phytophthora palmivora</i> . ....	42
Tabla 4.	Aislamientos obtenidos de mazorcas con pudrición parda, procedente del sector Pan de azúcar Echarate – La convención. ....	47
Tabla 5.	Características morfológicas macroscópicas de <i>Phytophthora palmivora</i> . ....	48
Tabla 6.	Características morfológicas microscópicas de <i>Phytophthora palmivora</i> , del aislamiento obtenido de mazorcas con pudrición parda, procedente del sector de Pan de azúcar Echarate – La convención. ....	49
Tabla 7.	Velocidad de crecimiento (mm) de las cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> y <i>Trichoderma lignorum</i> y el aislado <i>Phytophthora palmivora</i> , a 28 °C en placas Petri de 90 mm de diámetro. ....	51
Tabla 8.	Análisis de varianza (ANOVA) para datos de 48 horas después de la siembra de velocidad de crecimiento (mm.) a 28 °C. en la prueba “in Vitro”.....	52
Tabla 9.	Prueba de Duncan para datos de la velocidad de crecimiento a las 48 horas después de la siembra a 28 °C en la prueba “in Vitro”. ....	53
Tabla 10.	Resultados de la inhibición del crecimiento micelial de <i>Phytophthora palmivora</i> , en cultivos duales incubados <i>in vitro</i> a 28 °C.....	55

Tabla 11. Resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Phytophthora palmivora</i> , en cultivos duales incubados <i>in vitro</i> a 28 °C. ....	56
Tabla 12. Análisis de variancia en D.C.A. para la inhibición del crecimiento micelial de <i>Phytophthora palmivora</i> , en cultivos duales incubados <i>in vitro</i> a 28°.....	56
Tabla 13. Prueba de Duncan al 5% de probabilidad para la inhibición del crecimiento micelial de <i>Phytophthora palmivora</i> , en cultivos duales incubados <i>in vitro</i> 28 °C. ....	57

## **DEDICATORIA**

A Dios todo poderoso por darme salud, por ser mi guía y mi fortaleza en los momentos más difíciles.

A mis padres María Rojas Umeres y Adolfo Aybar Miranda, por su inmenso amor y apoyo incondicional en todos los aspectos de la vida, por guiarme con sus consejos hacia el camino del éxito.

A mi hermana Paola Helen Aybar Rojas por apoyarme siempre durante toda mi formación académica.

## **AGRADECIMIENTO**

Expreso mis profundos agradecimientos a:

La Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco, Facultad de Agronomía y Zootécnia en especial a la escuela Profesional de Agronomía Tropical y a todos los docentes de esta casa de estudios por todos sus conocimientos impartidos y contribuir así con mi formación profesional.

Con profunda estima y reconocimiento a mis asesores de tesis al M. Sc. Luis Justino Lizárraga Valencia y a la Dra. Fanny Rosario Márquez Romero por su constante y desinteresada orientación, por su invalorable apoyo en todo momento en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Ing. Dilman Glicerio Paricoto Apaza, por sus enseñanzas e indicaciones en la ejecución de este trabajo.

La Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba, por las facilidades brindadas en el laboratorio de Fitopatología y Microbiología.

## RESUMEN

En el Perú, la provincia de La Convención considera al cacao (*Theobroma cacao L.*) uno de los cultivos industriales de mayor demanda, donde, el factor fitosanitario limita su producción. La presencia de la pudrición parda de la mazorca de cacao, es una de las enfermedades que llega a dañar hasta las semillas. Por ello, la investigación titulada **“IDENTIFICACION Y CONTROL DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICION PARDA DE LA MAZORCA DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) CON CEPAS DE *Trichoderma spp.*, EN LA PROVINCIA DE LA CONVENCION – CUSCO”** ha formulado como objetivo general: evaluar el control del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*) con cepas de *Trichoderma spp.*, en la provincia de La Convención – Cusco. Obteniendo muestras de mazorcas con síntomas en estudio, traídas del sector de Pan de Azúcar ubicada en el distrito de Echarati. El trabajo se realizó a nivel in vitro en el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba. Como resultado se tiene que *Trichoderma harzianum* tuvo mayor crecimiento micelial al cubrir la placa Petri de 90 mm de diámetro en 56 horas, en cambio el fitopatógeno *Phytophthora palmivora*, cubrió la placa Petri en 120 horas. Se evaluó la capacidad de micoparasitismo de las cepas de *Trichoderma*. En conclusión, estos resultados demuestran que el agente causal de la pudrición parda es *Phytophthora palmivora* y *Trichoderma viride* se recomienda para el uso del control del fitopatógeno.

Palabras clave: *Phytophthora*, Antagonismo, Inhibición, Micoparasitismo.

## ABSTRACT

In Peru, the province of La Convención considers cacao (*Theobroma cacao* L.) one of the most in-demand industrial crops, where phytosanitary factors limit its production. Brown pod rot is one of the diseases that can damage even the seeds. Therefore, the research project entitled “IDENTIFICATION AND CONTROL OF THE CAUSAL AGENT OF BROWN POD ROT IN CACAO (*Theobroma cacao* L.) WITH STRAINS OF *Trichoderma* spp., IN THE PROVINCE OF LA CONVENCION – CUSCO” has the general objective of evaluating the control of the causal agent of brown pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.) with strains of *Trichoderma* spp., in the province of La Convención – Cusco. Samples of pods with the symptoms under study were obtained from the Pan de Azúcar sector, located in the district of Echarati. The work was carried out in vitro at the phytopathology and microbiology laboratory of the National Intercultural University of Quillabamba. The results showed that *Trichoderma harzianum* exhibited the greatest mycelial growth, covering a 90 mm diameter Petri dish in 56 hours, while the phytopathogen *Phytophthora palmivora* took 120 hours to cover the same Petri dish. The mycoparasitic capacity of the *Trichoderma* strains was evaluated. In conclusion, these results demonstrate that the causal agent of brown rot is *Phytophthora palmivora*, and *Trichoderma viride* is recommended for controlling this phytopathogen.

Keywords: *Phytophthora*, Antagonism, Inhibition, Mycoparasitism.

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es una especie de la familia de las *Malvaceae*. Se cultiva en aproximadamente 50 países de África, América, Asia y Oceanía. Los países con la mayor participación en producción de cacao son: Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Brasil, Ecuador, Camerún, Nigeria, Perú, República Dominicana y Colombia generando una producción de alrededor de 5 millones de toneladas, del cual el 17.3% es aportado por Latinoamérica (FAO, 2021).

El Perú, de acuerdo al Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego para el año 2023, produjo 117,788.40 T a nivel nacional con una superficie agrícola de 192,747.40 ha; de las cuales, la región Cusco produjo en ese mismo año 1945.5 T. (MIDAGRI, 2024).

En la provincia de La Convención existe cerca de 18500 hectáreas de cultivo de cacao. Entre las principales variedades se encuentran los diversos ecotipos de cacao chuncho como: Chuncho, Común, Achoccha, Sábalo, Señorita, Pamuco, Chuncho de montaña e híbridos como CCN-51, IMC-67, VRAE-99, ICS-95, de las cuales el 70% es cacao nativo Chuncho (Rojas R. *et al* 2018). El cultivo de cacao está cobrando un valor importante siendo un producto industrial que genera ingresos económicos para los que son parte de toda la cadena productiva e industrialización, debido al elevado precio en el mercado internacional.

Sin embargo, las condiciones climáticas del valle convenciano son muy favorables para el desarrollo de fitopatógenos que afectan al cultivo de cacao, esto sumado a una falta de atención fitosanitaria generando pérdidas de cosecha.

Entre las enfermedades que más se registra es la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), seguida de moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la muerte a nivel de plantones, pudrición de frutos



y semillas que genera la pudrición parda en mazorcas de cacao, los cuales podrían ser generados por un complejo de microorganismos, siendo limitante para la producción potencial del cultivo.

Por otro lado, los métodos de control de enfermedades están basados en el uso de productos químicos como los fungicidas sistémicos o de contacto, ocasionando la pérdida de la diversidad biológica, dejando de lado la importancia del control cultural y biológico. El uso de *Trichoderma* en la agricultura es parte de un método de control fitosanitario sostenible, donde, el uso constante podría inducir la resistencia sistémica en la planta.

Esta investigación está basada en el control in vitro del agente causal de la pudrición parda en la mazorca de cacao con cepas de *Trichoderma spp*, en el que se realizó la identificación del agente causal de la enfermedad en estudio.

Este trabajo contribuye a tener referencias propias sobre la identificación del fitopatógeno a partir de muestras extraídas de la zona, así como demostrar que *Trichoderma* ejerce control en función de sus mecanismos de acción como: la competencia por espacio y nutrientes, inhibición y micoparasitismo.

La autora

## **I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN**

### **1.1. Identificación del problema objeto de investigación**

La Organización Internacional del Cacao (ICCO), el año 2017, Ecuador fue el primer productor de cacao de América Latina y el cuarto a nivel mundial, después de Costa de Marfil, Ghana e Indonesia. El rendimiento nacional de Ecuador es relativamente bajo (250 t/ha), como consecuencia de problemas de hongos fitopatógenos, entre los cuales son *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora spp.* *M. roreri* o "moniliasis" puede ocasionar pérdidas hasta del 90% de la producción. La "pudrición parda" o "mazorca negra" es otra enfermedad que limita la productividad del cacao causando perdidas hasta el 30%, convirtiendo una de las principales amenazas para la producción de cacao en el mundo (Anzules et al, 2022).

En Perú en la región San Martín se considera enfermedades con mayor incidencia en parcelas productoras de cacao a *Phytophthora spp*, *Lasiodiopodia theobromae*, *Moniliophthora roreri*, (Faustino, 2022). Existe un alto índice de presencia de insectos como hongos que generan pérdidas de cosechas (Parco et al, 2022).

En la provincia de La Convención se tiene la pudrición parda que daña fruto y semilla. Su proliferación se optimiza en épocas húmedas. A falta de la aplicación de un control, las cosechas se ven afectadas por las semillas enfermas disminuyendo la calidad del producto.

Existen microorganismos asociados a los síntomas observados de la pudrición parda de la mazorca de cacao, por la gran diversidad biológica del medio ambiente. Al determinar el agente causal, nos dio una correcta investigación.

A pesar que se conoce los beneficios de *Trichoderma sp* como control biológico existe escaso uso en campo como parte de un manejo integrado del cultivo.

Por lo tanto, se formulan los problemas de investigación.

## **1.2. Formulación del problema**

### ***1.2.1. Problema general***

¿Será posible el control del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L.) con cepas de *Trichoderma spp*, en la provincia de La Convención – Cusco?

### ***1.2.2. Problemas específicos***

- ¿Cuál es el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la provincia de La Convención – Cusco?
- ¿Cuánto será la velocidad de crecimiento de cepas de *Trichoderma spp* y del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) en la provincia de La Convención – Cusco?
- ¿Cuál es el porcentaje de inhibición del crecimiento del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) por efecto de las cepas de *Trichoderma spp* en la provincia de La Convención – Cusco?
- ¿Se mostrará la capacidad de Micoparasitismo sobre el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) por las cepas de *Trichoderma spp* en la provincia de La Convención – Cusco?

## II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

### 2.1. Objetivos

#### 2.1.1. *Objetivo general*

Evaluar el control del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L.) con cepas de *Trichoderma spp*, en la provincia de La Convención - Cusco

#### 2.1.2. *Objetivos específicos*

- Identificar el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la provincia de La Convención - Cusco.
- Evaluar la velocidad de crecimiento de cepas de *Trichoderma spp* y del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) en la provincia de La Convención – Cusco
- Evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) por efecto de las cepas de *Trichoderma spp*. en la provincia de La Convención – Cusco
- Mostrar la capacidad de micoparasitismo sobre el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) por las cepas de *Trichoderma spp* en la provincia de La Convención – Cusco

### 2.2. Justificación

La necesidad de conocer al agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao, mediante la identificación microscópica y a nivel de especie. Permite tener un aporte de investigación propia en la provincia de La Convención, en ausencia de antecedentes hechas en esta zona. Siendo una base de datos para la sociedad académica en beneficio de los agricultores. El uso de *Tichoderma* como parte de este trabajo, ayuda a verificar el control que ejerce frente a fitopatógenos.

**Económico:** La agricultura en la provincia de La Convención es una ocupación que muchas veces no resulta rentable para quienes lo practican, esto debido a un mal manejo del cultivo. Uno de los pormenores para una baja producción, es la incidencia de *Phythora sp* por lo que en consecuencia genera bajos ingresos económicos en los agricultores. En tal sentido, el presente estudio propone la identificación específica de la especie *Phythora sp* ello debido a que existe una confusión sintomatológica. Muchas veces se puede confundir con el marchitamiento de Cherelle o la moniliasis en sus primeras etapas de infección. (Vanegtern et al., 2015). El uso de cepas de *Trichoderma* como agente de control, permite mantener los niveles de costo de producción del cacao, considerando que su adquisición no es costosa.

**Social:** el uso de *Trichoderma sp*, es una medida razonable como un método de control que se emplean para la pudrición parda de la mazorca de cacao. Garantizando la rentabilidad del cultivo al mantener el costo de producción permitiendo brindar bienestar a las familias productoras; cubriendo las necesidades sociales como educación, salud, vivienda y una buena calidad de vida.

**Ambiental:** el empleo de hongos antagonistas como *Trichoderma spp* pertenece al control biológico contribuyendo a un manejo sostenible, amigable y conservando la diversidad del medio ambiente; a diferencia de la aplicación de productos químicos.

### III. HIPÓTESIS

#### 3.1. Hipótesis general

Las cepas de *Trichoderma spp* controlaran al agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*), en la provincia de La Convención - Cusco

#### 3.2. Hipótesis específica

- El agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*) es la *Phytophthora palmivora* en la provincia de La Convención - Cusco
- La velocidad de crecimiento de cepas de *Trichoderma spp* será superior al agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*) en la provincia de La Convención – Cusco
- Las cepas de *Trichoderma spp* inhibirán el porcentaje de crecimiento del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*) en la provincia de La Convención – Cusco
- Al menos una cepa de *Trichoderma spp* mostrará capacidad de micoparasitismo sobre el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*) en la provincia de La Convención – Cusco

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Antecedentes

En el estudio cuyo título es «Evaluación de diferentes cepas de *Trichoderma spp.* para el control de *Phytophthora palmivora* en el cultivo de *Theobroma cacao L.* bajo condiciones de laboratorio en el estado Miranda». Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Miranda, Venezuela. El objetivo fue evaluar la efectividad de *Trichoderma spp.* aisladas de compost para el control de *Phytophthora palmivora* en condiciones de in vitro. Se han realizado 7 compostas para capturar cepas de *Trichoderma* y otros organismos, después de ello, se realizó el control in vitro con cepas de *Trichoderma spp.* y otros organismos sobre *Phytophthora palmivora*. La confrontación se realizó con 7 cepas de microorganismos respecto a *P. palmivora* y queda de la siguiente manera: *Longibrachiatum* C1, *Pachybasium* C3, *Trichoderma* C9, *Hypocreanum* C10 *Longibrachiatum* C17, *Pachybasium* C18 y *Trichoderma* C25 contra *P. palmivora*. A nivel de resultados, se ha comprobado que la efectividad de control de las diferentes cepas de *Trichoderma spp.* sobre *Phytophthora palmivora* (Hernández *et al.*, 2012).

El estudio «Selección e identificación de microorganismos nativos del suelo de cacao (*Theobroma cacao L.*) con potencial antagónico contra *Phytophthora sp.* a nivel in vitro de la hacienda “La Dolorosa”, provincia de Esmeraldas» ubicado en Ecuador, tiene como objetivo evaluar la capacidad antagónica en condiciones in vitro de microorganismos nativos de la rizósfera de cacao sobre *Phytophthora palmivora* aislada e identificada mediante morfología macro y microscópica. Se logró obtener 10 microorganismos con potencial biocontrolador entre los géneros *Bacillus* y *Trichoderma*. Al realizar la prueba de cultivo dual, el mejor resultado a nivel de porcentaje de inhibición de crecimiento (PIRC), lo mostraron los aislados de *T. harzianum*, *T. asperellum* y *B*

*subtilis*. La PIRC se vio involucrado con los mecanismos de antibiosis y competencia por espacio y nutrientes (Vélez, 2021).

En la investigación titulada «Evaluación del potencial antagónico de microorganismos benéficos frente a dos patógenos aislados de cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en condiciones in vitro», Los ensayos se realizaron en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Cundinamarca sede Fusagasugá, Colombia. El objetivo fue evaluar el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma* sp. y *Clonostachys* sp. frente a *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* sp. En la metodología se empleó el diseño completamente al azar y se propuso seis tratamientos con 2 factores de 2x3 (*Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* sp X dos cepas de *Trichoderma* sp (Tocaima y Viotá), y una *Clonostachys* sp) por cinco repeticiones. A nivel de resultados, el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) del *Trichoderma* sp. del aislamiento Viotá contra el patógeno *Phytophthora* sp fue el que mayor porcentaje de inhibición mostró con 46% y un 95% contra *Moniliophthora roreri*. En es sentido, las cepas de *Trichoderma* son potenciales para controlar (López & Vega, 2022).

En el estudio titulado «Control biológico de la mazorca negra (*Phytophthora Palmivora* L.) en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.)» investigación realizada en la provincia de Guayas, Ecuador. Tuvo como objetivo determinar el mejor mecanismo de manejo fitosanitario del cultivo de cacao. El diseño empleado fue el diseño de bloques completos al azar de 7 tratamientos y 3 repeticiones. La unidad experimental estuvo distribuida en parcelas de 50 m<sup>2</sup>. Los tratamientos se compusieron de la siguiente manera: *Bacillus* sp., *Trichoderma* sp., extracto de algas, inductores de resistencia (fosfito de potasio) y fertilizante foliar a base de macro y micronutrientes. A nivel de resultados, se observó que el tratamiento con (*Bacillus* sp.+ extracto de algas+ fosfito de potasio



+ abono foliar) tuvo la mayor producción en kilos cosechados de cacao con una densidad de siembra de 1200 plantas/ha (Guaman *et al.*, 2022).

La investigación realizada en Perú titulada «Evaluación in vitro del potencial de biocontrol con cepas de (*Trichoderma spp.*) sobre (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao L.*) La Convención-Cusco», cuyo objetivo general fue Evaluar el potencial de biocontrol in vitro con cepas de *Trichoderma sp* sobre *Moniliophthora roreri* del cacao del distrito de Echarate- La Convención-Cusco. La investigación se desarrolló a nivel in vitro y se empleó un diseño experimental completamente al azar con 10 tratamientos y 7 repeticiones. Se realizó la identificación macro y microscópicamente de nueve cepas del hongo *Trichoderma spp.* Todos los *Trichoderma spp* tuvieron un crecimiento micelial superior a *Moniliophthora roreri*. Los aislados nativos Th-7 y Th-4 con 51.07%, y 48.57% respectivamente mostraron una alta capacidad de antagonismo, mediante la competencia por espacio, micoparasitismo e inhibición del crecimiento del patógeno de *Moniliophthora roreri*. Todas las cepas de *Trichoderma* presentaron un PICR superior al 20%, lo cual demuestra una inhibición potencial de biocontrol y agentes antagónicos eficientes contra el fitopatógeno (Huamani, 2023).

## **4.2. Bases teóricas**

### **4.2.1. Cultivo de cacao**

El cacao es una especie nativa de América del Sur especialmente de climas tropicales húmedos, su fruto es una baya o mazorca de forma ovoidea, y aguda hacia el ápice, de 25 a 30 cm de largo y de 10 a 15 cm de grosor, con un pedúnculo recio y recto, epicarpio grueso, sub leñoso; semillas ovoides y pardas en estado seco; la almendra mide dos cm de largo y de sabor muy amargo (Sánchez, 2017).

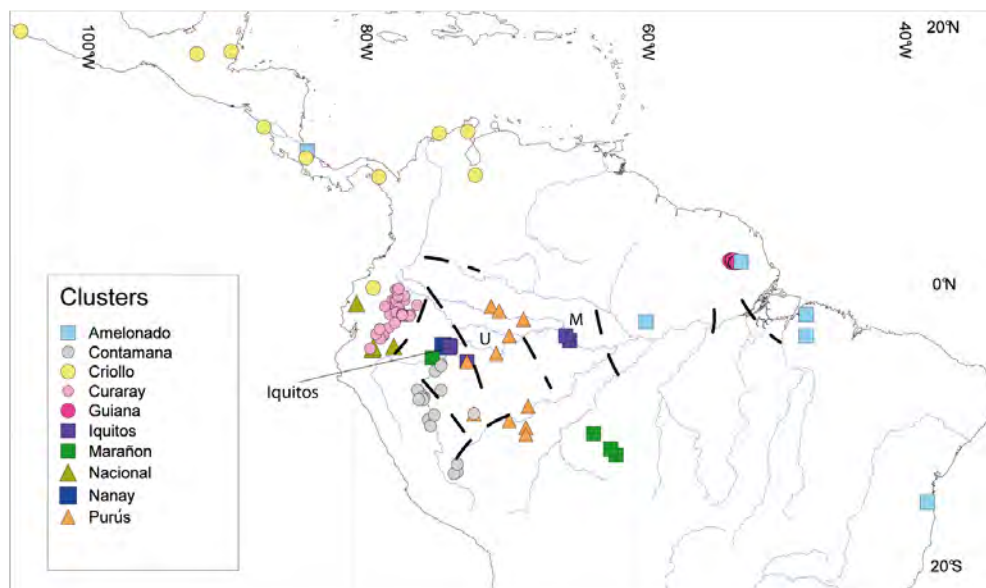
#### 4.2.2. Origen y distribución geográfica del cacao

El árbol de cacao se adapta en bosques tropicales húmedos, por lo que América del Sur presenta una amplia diversidad genética dentro del género *Theobroma*. Este género pertenece a la familia Malvaceae, comprendiendo 22 especies; 19 de ellas en América del Sur, 13 en la cuenca del Orinoco-Amazonas, de las cuales 10 son exclusivas de esta área (Leal et al., 2000).

A pesar de que su origen exacto no es del todo claro, dando lugar a diversas teorías, muchos autores coinciden que el centro de origen parece situarse al noreste de América del Sur, en la zona alta amazónica (Pérez *et al*, 2021).

Además, el origen del cacao, y en donde se encuentra mayor diversidad, es la zona del Alto Amazonas, en la frontera cercana a Perú, Ecuador, Colombia y Brasil. Considerando una nueva clasificación del cacao distribuidos en 10 grupos principales: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guayana. Reflejando una mayor precisión de la diversidad genética (Motamayor *et al*, 2008; Thomas *et al*, 2012).

**Figura 1. Listado de grupos genéticos de cacao y su distribución geográfica en América.**



Fuente: (Motamayor *et al*, 2008).

#### **4.2.3. Taxonomía del cacao**

Según Cronquist (1993) la taxonomía del cacao se clasifica en:

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malvales.

Familia: Malvaceae

Tribu: Theobromeae

Género: *Theobroma*

Especie: *Theobroma cacao* L.

#### **4.2.4. Descripción Botánica**

El cacao posee un sistema radicular pivotante de semillas, formándose hasta 2 m de profundidad, mientras que las plantas que provienen de esquejes tienen raíces fasciculadas, formándose horizontalmente alrededor del tronco de la planta a una intensidad de 20 a 25 cm. Consta de raíces mayores y secundarias en las que se forman pelos absorbentes, ubicados de 0 a 5 cm de profundidad dentro del suelo (Montaleza, 2020).

La planta de cacao tiene dos formas de tallos: los que crecen instantánea y verticalmente denominados ortotrópicos que provienen de plantas de semilla y los florales que pueden ser producidos por medio de injertos que se desarrollan horizontal y lateralmente denominados plagiotrópicos. La corteza del tallo es oscura (gris-marrón), puede alcanzar entre 1 - 2 m 5 de altura a una edad de 1 a por lo menos un año y medio, donde sus yemas apicales se adelantan para iniciar la formación de tres a cinco ramas laterales que pueden ser referidas como horquillas o verticilos (Montes, 2016).

Las hojas del cacao son perennes, alternas formando hileras una en cada cara de la rama, enormes con una longitud de 20 - 35 cm y 4 - 15 cm de ancho, de forma lanceolada a ovalada, de tipos fáciles de color inexperto oscuro en el haz y un tono más claro en el envés que sostienen de un pecíolo cada una de ellas (Barros, 2014).

Las flores están conformadas en cojinetes florales que puede contener de 1 a 40 flores que una vez abiertas tienen como máximo 48 horas de viabilidad para ser polinizadas por medio de insectos o manualmente. Las flores no poseen olor, son hermafroditas que nacen a la vez del tallo principal y de las ramas laterales, es decir, pueden ser caulifloras, cuando las situaciones de humedad y temperatura son óptimas puede haber floración todo el año, la vida vegetal puede alcanzar un promedio de uno a dos centímetros de diámetro sostenido por un pedicelo de uno a tres centímetros, tiene cinco pétalos y sépalos de color blanco o púrpura dependiendo de la especie (Leiva *et al* 2019).

El fruto o mazorca del cacao es una drupa grande, de forma, tamaño y color variable. La pared del fruto es generalmente gruesa y dura (a veces suave y de consistencia como de cuero), presentan surcos profundos y superficiales, tiene aproximadamente 25 centímetros de largo, 8 a 10 centímetros de diámetro y pesa 300 - 400 gramos. La cáscara carnosa de 2 centímetros de grosor cubre la pulpa gelatinosa y agri dulce con alto contenido de azúcar. La semilla (almendra o grano) está rodeada de una pulpa blanca, jugosa, cremosa y azucarada, denominada mucílago, que se organiza en 5 hileras o surcos dentro de la mazorca que contienen entre 20 y 40 almendras (Benito, 2010).

#### **4.2.5. *Phytophthora palmivora***

El género de *Phytophthora sp.* se encuentran clasificadas taxonómicamente de este modo:

Reino: Chromista

División: Oomycota

Subdivisión: Mastigomicotina

Clase: Phycomycetes

Subclase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

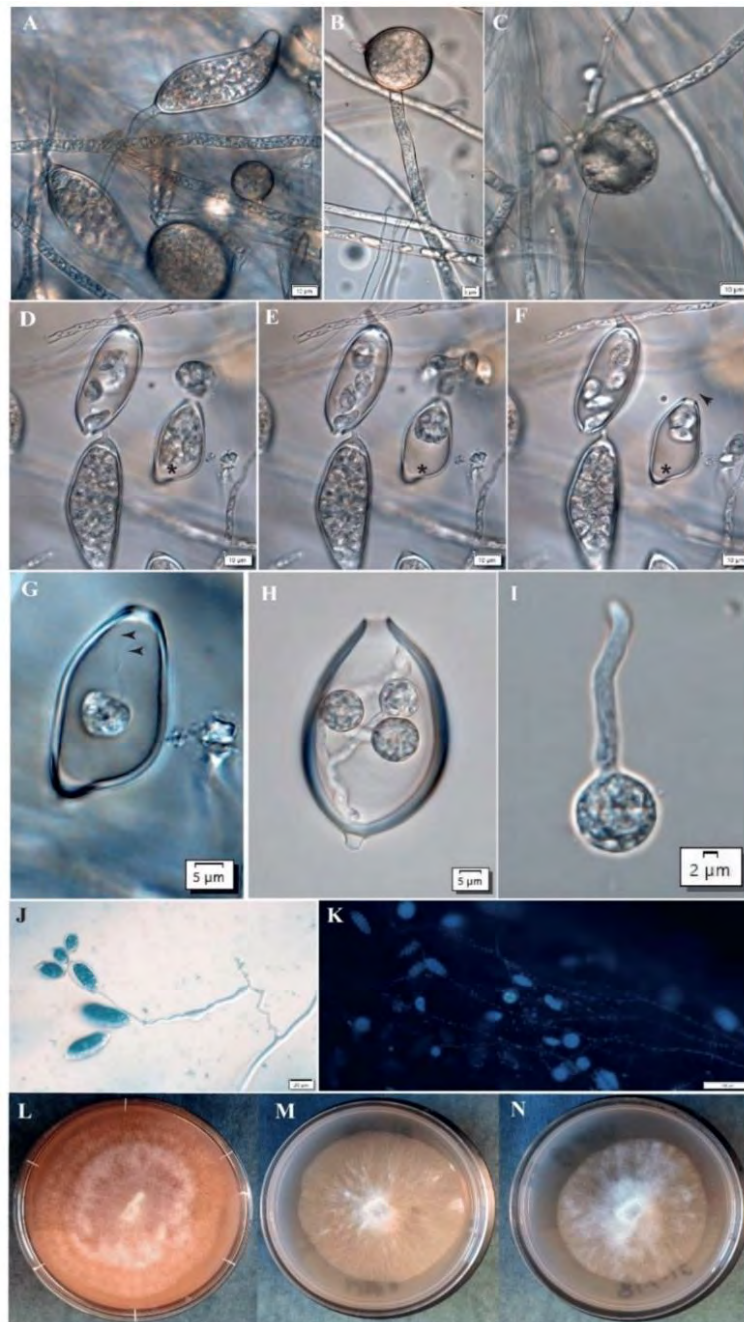
Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora* (Orellana 2022).

#### **4.2.6. *Morfología.***

Estos microorganismos morfológicamente presentan hifas multinucleadas y de micelio cenocítico, el núcleo celular es típicamente diploide y mitocondrias tubulares, la pared celular se compone principalmente de celulosa y glucanos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 y no de quitina; como típicamente se encuentra en los hongos, reino en el que previamente se encontraban clasificados. Muchas especies producen esporas acuáticas móviles (zoosporas) carentes de pared celular, biflageladas contenidas en estructuras llamadas esporangios y estructuras de resistencia llamadas clamidosporas (Clavaud *et al.*, 2009).

**Figura 2. Morfología de *Phytophthora palmivora*.**



Nota: tomado de (Perrine, 2020). (A) Esporangio papilado, (B) clamidospora terminal con una extensión nueva de hifas, (C) clamidospora intercalar (D–F ) liberación de zoosporas en un lapso de 1 minuto de un esporangio (asteriscos negros), (G) zoosporas atrapadas, (H) quistes atrapados que germinan en el interior de un esporangio, (I) quiste en germinación en un portaobjetos de vidrio, (J) ramificación simpodial del esporangióforo con esporangios papilados pintados con azul de lactofenol, (K) zoosporas en el interior de esporangios y clamidosporas. (L–N) tipos de colonias estrelladas/estriadas a radiantes.

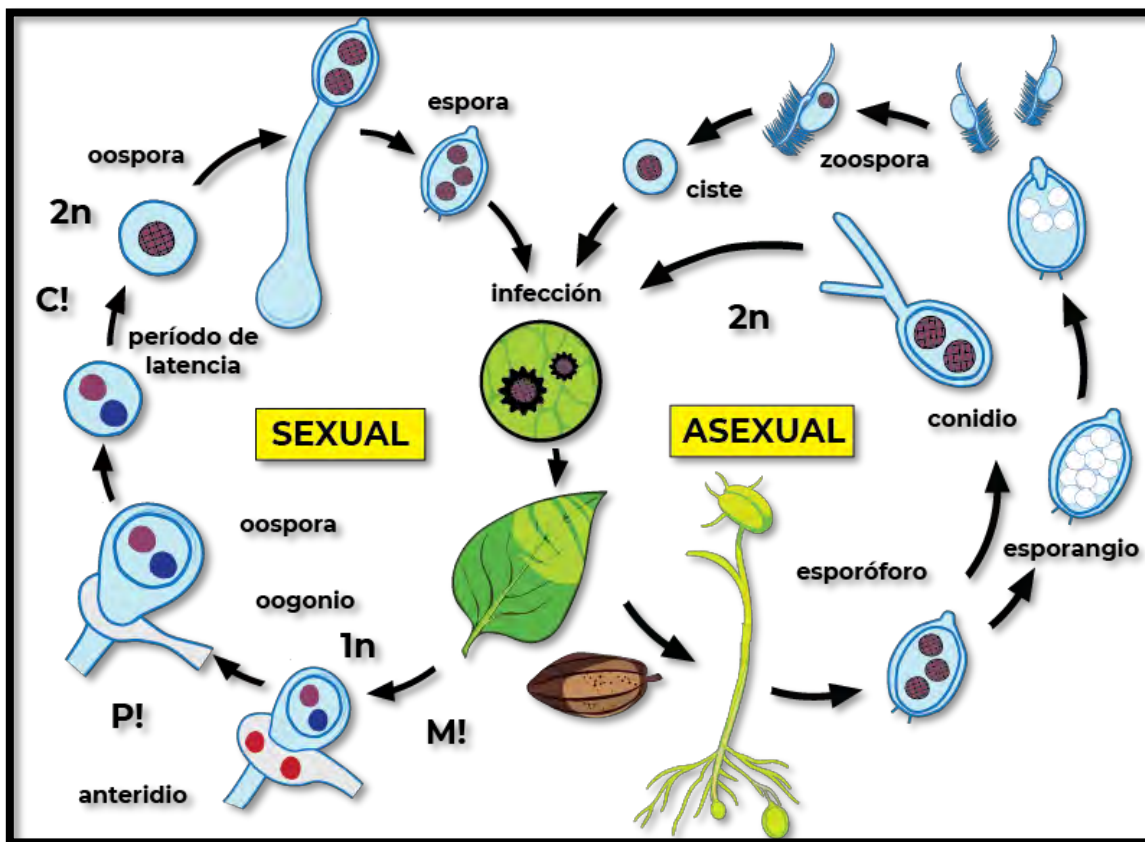
#### 4.2.7. *Ciclo biológico*

El ciclo de vida de *Phytophthora* puede involucrar hasta tres formas de esporas asexuales: esporangios, zoosporas y clamidosporas, además de las oosporas, la forma de esporas sexuales, el micelio vegetativo es diploide, cenocítico y, sin septos. *Phytophthora* en condiciones adecuadas se reproducirá asexualmente por medio de esporangios, que pueden germinar directamente o diferenciarse para producir entre 8 a 32 zoosporas, cada una de las cuales pasa a través de un ciclo de dispersión y enquistamiento antes de germinar (Randy, 2016)

La reproducción sexual genera la producción de oosporas, sin embargo, todos los tipos de esporas son potencialmente infecciosas, así mismo, las clamidosporas y oosporas también cumplen una función como estructuras de hibernación o de resistencia, algunas especies, también se dispersan por vía aérea, principalmente como esporangios caducos (caducifolios) que tienen la capacidad de diseminarse al interior del cultivo (Adeniyi, 2019).

Los oomycetes se reproducen sexualmente mediante la producción de oosporas a partir de eventos de fusión que involucran estructuras como: oogonio (femenino) y anteridio (masculino). En las especies heterotálicas, la gametangia se producen solo en presencia de ambos tipos de apareamiento (A1 y A2) debido al hecho de que un regulador de crecimiento producido por un talo estimula al otro (plasmogamia), finalmente, la meiosis ocurre en el anteridio y en el oogonio, un tubo de fertilización del anteridio rompe la pared oogonial y deposita el protoplasma anteridial, la única oospora que se forma dentro del oogonio es globosa y se caracteriza por desarrollar una pared interna gruesa (Surujdeo *et al.*, 2016)

Figura 3. Ciclo sexual y asexual de *Phytophthora palmivora*.



Fuente: INTAGRI (2015).

#### 4.2.8. Sintomatología

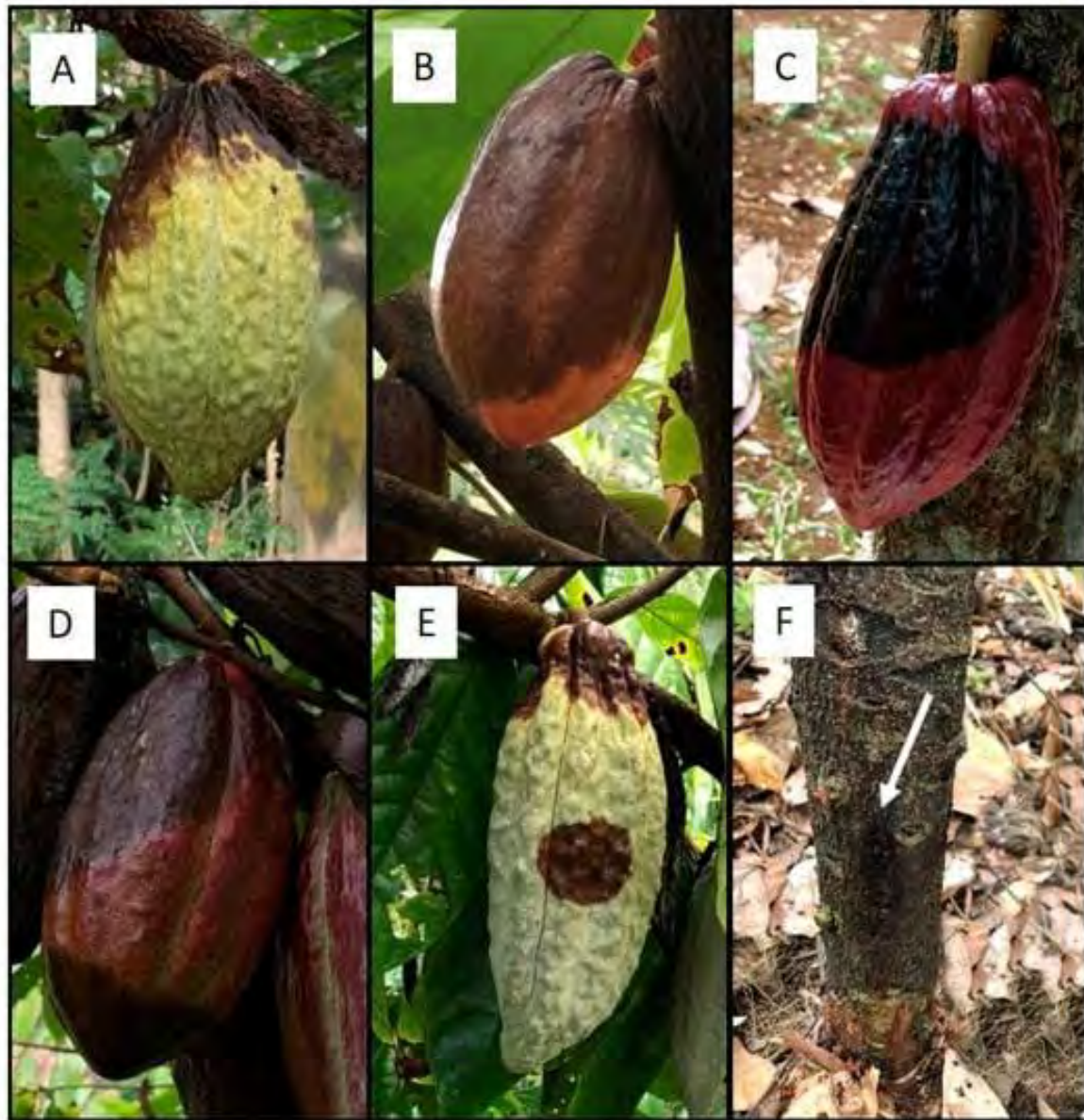
La *Phytophthora spp* es una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de cacao ya que tiene un efecto directo en los frutos. Puede ocasionar pérdidas que van desde el 10% hasta el 100%, ello va depender de las condiciones climáticas, la especie y el lugar (Mucherino et al., 2021).

En el punto de infección, aparece una mancha pequeña de color marrón. La infección puede iniciar en los extremos del fruto y coloniza de manera rápida por la superficie exterior del fruto y cubre la vaina por completo en pocos días. Las áreas infectadas cambian si las condiciones son favorables de marrón a negro y luego aparecen los esporangios de color blanco. A medida que los síntomas visibles progresan, el patógeno ingresa dentro de la mazorca y destruye los granos de cacao. a



medida que pasan los días, las mazorcas de cacao se secan y se momifican por completo. (Vanegtern et al., 2015).

**Figura 4.** Síntomas por infección de *Phytophthora palmivora* en frutos y tallos de cacao.



Nota: tomado de Puig et al. (2021). Lesiones necrosadas pueden tener origen en el pedúnculo (A, B) o la infección puede suceder en puntos no contiguos al árbol (C). En áreas agrícolas con mayor incidencia de la enfermedad, el daño puede desarrollarse en múltiples lugares del fruto (D, E). *P. palmivora* también ocasiona canchros en tallos (F).

#### 4.2.9. *Trichoderma spp.*

Se encuentra descrito taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Especies: *T. harzianum*, *T. Viride*, entre otros. (Camilo & Correa, 2017)

*Trichoderma* es un género de hongos ascomicetos cosmopolita y oportunista. Algunas especies son de mucho interés para la agricultura (Woo et al., 2023). *Trichoderma* se emplea de manera principal para controlar enfermedades transmitidos mediante el suelo y algunas enfermedades de panículas y hojas de diversas plantas. Al mismo tiempo, aparte de controlar enfermedades, promueve el crecimiento y la asimilación de nutrientes. En tal sentido, *Trichoderma spp.* es un agente de biocontrol seguro, eficaz, económico y ecológico para diferentes especies de cultivos agrícolas (Yao et al., 2023). Para controlar enfermedades, el *Trichoderma* emplea mecanismos como el antagonismo y la competencia directos en la rizosfera del suelo. Coloniza las raíces como también de manera endófito (Woo et al., 2023).

Las cepas de *Trichoderma* se pueden identificar por características morfológicas por ejemplo: el pigmento colonial es de color verde brillante, crecen rápido y están ramificadas (Zin & Badaluddin, 2020).

En la actualidad, se han realizado estudios en su caracterización molecular el cual ha permitido identificar especies como: *T. virens*, *T. atroviride*, *T. reesei*, *T. gamsii*, *T. aggressivum*, *T.*

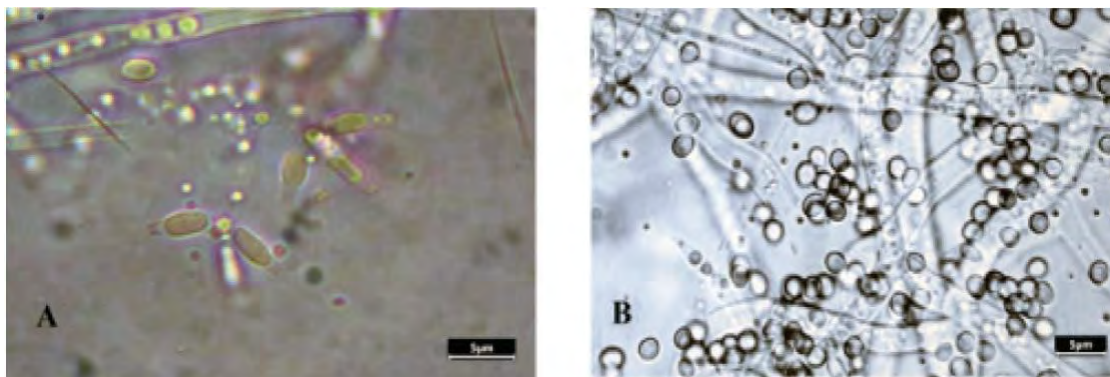
*citrinoviride* , *T. asperellum* , *T. ghanense*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. virens*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii*, *T. polysporum*, *T. atroviride*, *T. tomentosum*, *Trichoderma reesei*, *T. spirale*, *T. viridescens*, *T. koningii*, *T. viride* y *T. koningiopsis* que fueron encontrados en diferentes ecosistemas: suelos de bosque, áreas cultivadas, jardines, compostados, grano de cereales, madera deteriorada de diversas regiones a nivel mundial, incluye ambientes marinos (Guzmán *et al.*, 2023).

En síntesis, el uso de *Trichoderma spp* como agentes de biocontrol y sus metabolitos secundarios son enfoques potenciales y actuales para combatir hongos fitopatógenos (Khan *et al.*, 2020) y biofertilizante para las plantas (Sharma *et al.*, 2019).

#### **4.2.10. *Trichoderma harzianum***

El *Trichoderma harzianum* se utiliza para el manejo biológico de patógenos nocivos transmitidos por las semillas y el suelo (Fraceto *et al.*, 2018). Su distribución es en todo el mundo y produce esporas verdes aun en condiciones adversas. Una vez que se establece en el huésped, puede degradar sustratos y desarrollarse rápidamente o utilizar suministro de alimento de patógenos al cual se le denomina competencia por los nutrientes (Pani *et al.*, 2021). El hongo filamentoso *Trichoderma harzianum*, produce diversas enzimas que degradan la pared celular de diversos patógenos como la quitinasa, glucanasa, proteasa y otras proteínas extracelulares (Xiao *et al.*, 2023). Asimismo, los compuestos orgánicos de *T. harzianum* pueden emplearse como fungicida, antibacteriano, antineoplásico e incluso herbicida en la salud y la agricultura (Guo *et al.*, 2022).

**Figura 5. Rasgos de *Trichoderma harzianum*.**

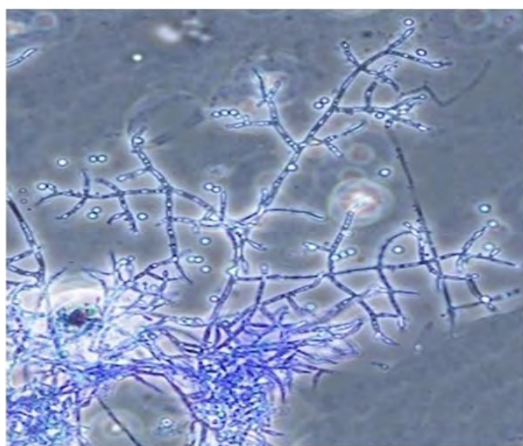


Nota: tomado de (Sánchez *et al.*, 2021). A) Fiálides en forma de botella. B) Conidios subglobosos a ligeramente oblongos.

#### **4.2.11. *Trichoderma viride***

*T. viride* crece de manera óptimo a 25 °C. Se puede aislar de suelos y materia orgánica. Algunas cepas emanan un olor leve a coco y se puede observar conidias a los 2 días. Es un agente biocontrol por su capacidad de micoparasitismo. Asimismo, al segregar este hongo la enzima quitinasa, puede degradar la quitina de insectos que podrían causar enfermedades en plantas. El mecanismo de biocontrol son las siguientes: Parasitismo, competencia (Guzmán *et al.*, 2023) y metabolitos secundarios (Khan *et al.*, 2020).

**Figura 6. Rasgos de *Trichoderma viride*.**



Nota: tomado de (Mukhopadhyay & Kumar, 2020). Fiálides se presentan en pares o en grupos de tres. Las conidias tienen forma globosa a elipsoidal, usualmente, la coloración es verdeazulada a verde oscuro.

#### **4.2.12. *Trichoderma lignorum***

*T. lignorum* en investigaciones recientes ha mostrado actividad antimicrobiana moderada contra *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Li *et al.*, 2019).

*T. lignorum* protege plantas de cítricos del patógeno *Rhizoctonia solani* mediante el mecanismo el micoparasitismo necrotrófico (Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

Asimismo, este hongo en conjunto con *B. bassiana* es eficaz para controlar poblaciones de hormigas cortadoras de hojas (*Atta cephalotes*) (Guzmán *et al.*, 2023).

#### **4.2.13. Mecanismos de acción *Trichoderma spp***

Hasta donde se conoce, los mecanismos de biocontrol involucra a micoparasitismo, competencia, antibiosis, enzimas, resistencia inducida y metabolitos secundarios (Prajapati *et al.*, 2020; Gangwar & Singh, 2018).

#### **Micoparasitismo**

El hongo *Trichoderma* se consideran como micoparásitos necrotróficos. Es decir, es un hongo que parasita otro hongo (Mukherjee *et al.*, 2022; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

Este mecanismo inhibe el crecimiento micelial de hongos patógenos mediante la actividad micoparasitaria, cuando matan a sus presas, se proporcionan de nutrientes (Guzmán *et al.*, 2023; Mukhopadhyay & Kumar, 2020).

El mismo consiste en una secuencia de pasos que abarca una etapa de localización del hospedante y crecimiento quimiotrópico hacia el mismo; adhesión y posterior enrollamiento de las hifas y penetración, en la que se diferencian estructuras especializadas tales como apresorios (Ezziyyani *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004)

### **Antibiosis**

Es un proceso donde implica producción y excreción de metabolitos secundarios denominados antibióticos con función citotóxica que inhibe el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Flores *et al.*, 2023).

Los metabolitos o enzimas secretadas por *Trichoderma* inhiben la germinación del patógeno. La diversa comunidad de *Trichoderma*, son una fábrica de metabolitos secundarios, hasta la actualidad, se lograron encontrar a más de 180 diferentes tipos de compuestos (Guzmán *et al.*, 2023; Mukhopadhyay & Kumar, 2020)..

### **Competencia**

En este aspecto, los bioagentes entran en competencia con los patógenos por nutrientes y espacio; por tanto, generan un efecto nocivo sobre otros hongos (Mukhopadhyay & Kumar, 2020). Las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de crecer rápido y colonizar los mejores espacios de la rizosfera; de esta manera, restringen el desarrollo de los microorganismos fitopatógenos y ayudan a crecer a las plantas (Flores *et al.*, 2023).

#### **4.2.14. Postulados de Koch**

Los postulados de Koch, establecido por Robert Koch, se postuló por primera vez para establecer la etiología de la tuberculosis. Desde ese entonces, se generalizó para todo tipo de enfermedades, cuyo protocolo rige de la siguiente manera (Escalante & Samper, 2023):

- i). El agente causal debe estar presente en cada caso de enfermedad en condiciones apropiadas y ausente en plantas sanas.
- ii). El patógeno no debe aparecer en otra enfermedad de forma aleatoria o saprofita.
- iii). El agente causal debe ser aislado del órgano vegetal en un cultivo puro.

iv). El patógeno debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en las plantas de experimentación.

### **4.3. Marco conceptual**

#### ***4.3.1. Control de enfermedades del cacao por métodos biológicos.***

El control biológico de enfermedades en cacao es una alternativa que desde los último quince años ha venido tomado auge. Algunos géneros de hongos y bacterias han sido investigados, a nivel in vitro e in vivo, con la finalidad de encontrar una herramienta efectiva para disminuir los índices de las principales enfermedades del cultivo. Las enfermedades que han recibido mayor atención en la búsqueda de organismos biocontroladores son: Escoba de bruja, Monilia y Mazorca negra o pudrición parda. Se tiene como principales antagonistas investigados pertenecen al género *Clonostachys spp* o *Trichoderma spp*. Estudios llevados demuestran resultados variables por condiciones propias de cada investigación (Guerrero, *et al* 2020)

Sin embargo, la eficacia del control dependerá de la biología de los agentes fitopatógenos a controlar. En primer lugar, los hongos fitopatógenos como *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* tienen paredes celulares constituidas principalmente por quitina, mientras que el oomiceto *Phytophthora spp* tiene paredes celulares constituidas principalmente por celulosa. Así, para un control simultáneo, los agentes de control biológico deben ser capaces de metabolizar tanto la quitina como la celulosa. En segundo lugar, *Moniliophthora spp* exhibe una fase biotrófica en la que germinan, después de llegar a la superficie de la mazorca de cacao, y posteriormente penetran el tejido hospedante. La fase biotrófica es seguida por una fase necrotrófica dentro de las escobas y/o mazorcas durante la cual estas se destruyen desde adentro hacia afuera. Contrariamente *Phytophthora spp.*, después de la entrada estomática o la penetración directa, comienzan directamente a necrosar los tejidos de la mazorca y la destruyen desde el

exterior hacia el interior. Además, al infectar los tejidos del cacao, desencadenan respuestas moleculares asociadas con el estrés y la defensa de las plantas (Vera *et al*, 2018)

En la actualidad, la mayoría de las publicaciones sobre el control biológico de las enfermedades de cacao están dirigidas hacia la búsqueda de hongos o bacterias endofíticas con la capacidad de colonizar los tejidos de las plantas para protegerlos de la posterior colonización de los fitopatógenos (Guerrero, *et al* 2020)

#### **4.3.2. Factores climáticos en el desarrollo de *Phytophthora palmivora***

La enfermedad por *Phytophthora palmivora* se encuentra adaptada en condiciones geográficas de alta humedad relativa, cuyo potencial de daño se intensifican en épocas de alta precipitación; siendo consideradas estas variables como la de mayor importancia en la diseminación de la enfermedad (Rodríguez *et al* 2015).

Existe una correlación positiva en zonas con alta humedad relativa y una baja temperatura, lo que favorece la presencia la pudrición en la mazorca de cacao (Ramírez *et al*, 2020).

Lessa *et al.* (2020) indica que una humedad relativa mayor del del 95% y una temperatura promedio entre 18 a 20°C son condiciones propicias en el desarrollo de la enfermedad (Lessa *et al*, 2020)

La precipitación considerada como un variable importante en el desarrollo y la dispersión de la pudrición en la mazorca de cacao, debido a la presencia de agua libre que favorece la esporulación, liberación y diseminación de los zoosporos; siendo estos los principales propágulos infectivos que son movilizados por el agua, diseminándoles fácilmente por el salpique de la gota de lluvia afectando los tejidos vegetativos como frutos y tallos en las plantas de cacao (Ramírez *et al.*, 2020)



#### **4.3.3. Agente causal**

Organismo vivo que posee la capacidad de poder producir una enfermedad en un organismo vivo (Peña & Paez, 2015).

#### **4.3.4. Micoparasitismo**

Es la eliminación de hongos fitopatógenos mediante la supresión, el cual consiste en el ataque a las células o estructuras del patógeno (Abdullah *et al.*, 2021). Es decir, es un hongo que parasita otro hongo (Mukherjee *et al.*, 2022) donde envuelve, penetra y destruye la estructura del patógeno (Magalhães & Pfenning, 2022).

#### **4.3.5. Cepas**

Es un grupo de microorganismos que son de la misma especie que comparten ciertas características genéticas, pero no se encuentra en otros miembros de la misma especie. Los microorganismos como virus, bacterias y hongos tienen muchas cepas dentro de la misma especie, y diferentes cepas de un organismo pueden tener diferentes propiedades biológicas, incluida la capacidad de causar enfermedades más graves. También llamado sistema biológico (INC, 2024).

#### **4.3.6. In vitro**

El cultivo in vitro es una técnica que consiste en aislar tejidos o microorganismos en condiciones asépticas a un medio con composición química adecuada para el desarrollo del organismo vivo en condiciones controladas (Balouiri *et al.*, 2016).

#### **4.3.7. Patogenicidad**

La patogenicidad es la capacidad que posee un microorganismo infeccioso para producir una enfermedad en un huésped. La patogenicidad del microorganismo va depender de muchos factores como por ejemplo la agresividad de la cepa, la zona donde este se encuentre, el ambiente donde se desenvuelva y la capacidad de vulnerabilidad del hospedero (Chin, 2001)

#### **4.3.8. Inhibición**

Es la capacidad de retener el crecimiento de un microorganismo, las cepas de *Trichoderma* crean metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, de los cuales algunos inhiben el desarrollo de microorganismos sin hacer contacto físico, considerados antifúngicos (Roberto *et al.* 2019).

#### **4.3.9. Purificación**

Se le denomina a un cultivo puro al que contiene un solo tipo de microorganismo. Éstos se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos cuenten con la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de las bacterias y para poder ser identificadas con seguridad (SENASICA, 2020)

## **V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **5.1. Tipo de investigación**

Experimental y explicativo.

### **5.2. Ubicación espacial de la investigación**

La investigación se realizó en el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba (UNIQ).

#### ***5.2.1. Ubicación política***

Región:	Cusco
Provincia:	La convención
Distrito:	Santa Ana
Lugar:	Quillabamba-Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba
Laboratorio	Fitopatología y microbiología

#### ***5.2.2. Ubicación geográfica***

Latitud:	12°51'48'' S
Longitud:	72°41'35'' W
Altitud:	1020 msnm

#### ***5.2.3. Ubicación hidrológica***

Cuenca:	Rio Vilcanota
---------	---------------

#### ***5.2.4. Ubicación ecológica***

Zona de vida:	Bosque húmedo subtropical
---------------	---------------------------

### **5.3. Ubicación temporal**

La investigación se realizó entre mayo y agosto del 2023.

## 5.4. Variables de la investigación

### 5.4.1. Variables independientes

- ✓ Cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride*, *T. lignorum*)

### 5.4.2. Variables dependientes

- ✓ Agente causal de la pudrición arda de la mazorca de cacao.

### 5.4.3. Operacionalización de variables

**Tabla 1. Descripción de operacionalización de variables**

Variable independiente	Variable dependiente	Indicadores
-Cepas del hongo <i>Trichoderma</i> ( <i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. lignorum</i> )	-Agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao.  -Velocidad de crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> y del agente causal ( <i>Phytophthora palmivora</i> ).  -Porcentaje de inhibición del crecimiento de agente causal ( <i>Phytophthora palmivora</i> ).  -Capacidad de micoparasitismo.	-Colecta de mazorcas infestadas.  -Diámetro del crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> y del agente causal ( <i>Phytophthora palmivora</i> ).  -Mediciones milimétricas (mm).  -Observación al microscopio-fotografías.

Fuente: elaboración propia.

## **5.5. Materiales y métodos**

### **5.5.1. Material biológico**

- Cepas de *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma lignorum* obtenidas de SENASA.
- Cepa aislada del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao.

### **5.5.2. Materiales de campo**

Libreta de campo, marcador, pinza punta fina, bolsas de polietileno, cámara fotográfica, tijera de podar de mano, tijera telescópica, navaja, machete, rótulo.

### **5.5.3. Materiales, equipos e insumos de laboratorio**

#### **Materiales:**

Vasos Erlenmeyer de 250 ml, 500 ml y 1000 ml, espátula, piseta, porta objeto, cubre objeto, papel toalla, cinta adhesiva, papel crack, papel aluminio, gradillas, algodón, hilo pabilo, mascarillas, guantes, marcador, bisturí, saca bocado de 5 mm.

#### **Equipos:**

Autoclave, cámara de bioseguridad, cocina eléctrica, microscopio, destilador de agua, microondas, balanza analítica cap. de 220g, placas Petri de 90mm de diámetro, mechero, bisturí, cuchillo, recipientes, materiales de limpieza.

#### **Insumos:**

Agar- agar, dextrosa, antibióticos (ampicilina - antibacteriano, gentamicina - antibacteriano, benomyl – fungicida), alcohol de 70° y 96°, hipoclorito de sodio (lejía), agua destilada, azul de lactofenol Lugol.

#### **5.5.4. Materiales de gabinete.**

Hojas de papel, calculadora, USB, equipo de cómputo, juego de reglas y útiles de escritorio.

### **5.6. Metodología**

#### **5.6.1. Identificar el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*) en La Provincia de la Convención - Cusco.**

Para la identificación del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*) se realizó el aislamiento del fitopatógeno que causa la sintomatología en estudio utilizando las 4 etapas en base a los postulados de Koch, según se detalla a continuación:

##### **5.6.1.1. Primera etapa: recolección de muestras de mazorcas con enfermedad.**

Esta actividad se hizo durante los meses de abril a mayo del 2022. Para este caso se utilizó el primer postulado de Koch, donde se recolectaron frutos de cacao del cultivar CCN-51 de la parcela del Sr. Marco Antonio Uscamayta Carlos, ubicada en el sector Pan de azúcar del distrito de Echarate- La Convención. se seleccionaron mazorcas afectadas con síntoma primario de necrosis del epicarpio, mazorcas con manchas pardas, mayormente estas muestras se encontraron en la parte media y baja del árbol, luego se cubrió con paño absorbente y se trasladaron en bolsas de polietileno previamente rotulados y cerrados hacia el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba. Como se observa en la (figura 7) las muestras encontradas presentan distintos grados de infección de avance de la enfermedad, tanto en frutos pequeños y grandes, aclarando que los síntomas pueden presentar en diferentes etapas del desarrollo del fruto.

**Figura 7. Síntoma de la pudrición parda en mazorcas de cacao**



Fuente: elaboración propia.

**Nota:** A) Infección generalizada del pericarpio. B) Frutos enfermos generando repercusión económica a nivel de cosecha.

#### **5.6.1.2. Segunda etapa: Primer aislamiento del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao.**

Esta etapa se basó en el segundo postulado de Koch. Se utilizó la metodología de (Plancarte, *et al* 2017), con algunas modificaciones que se mencionan a continuación:

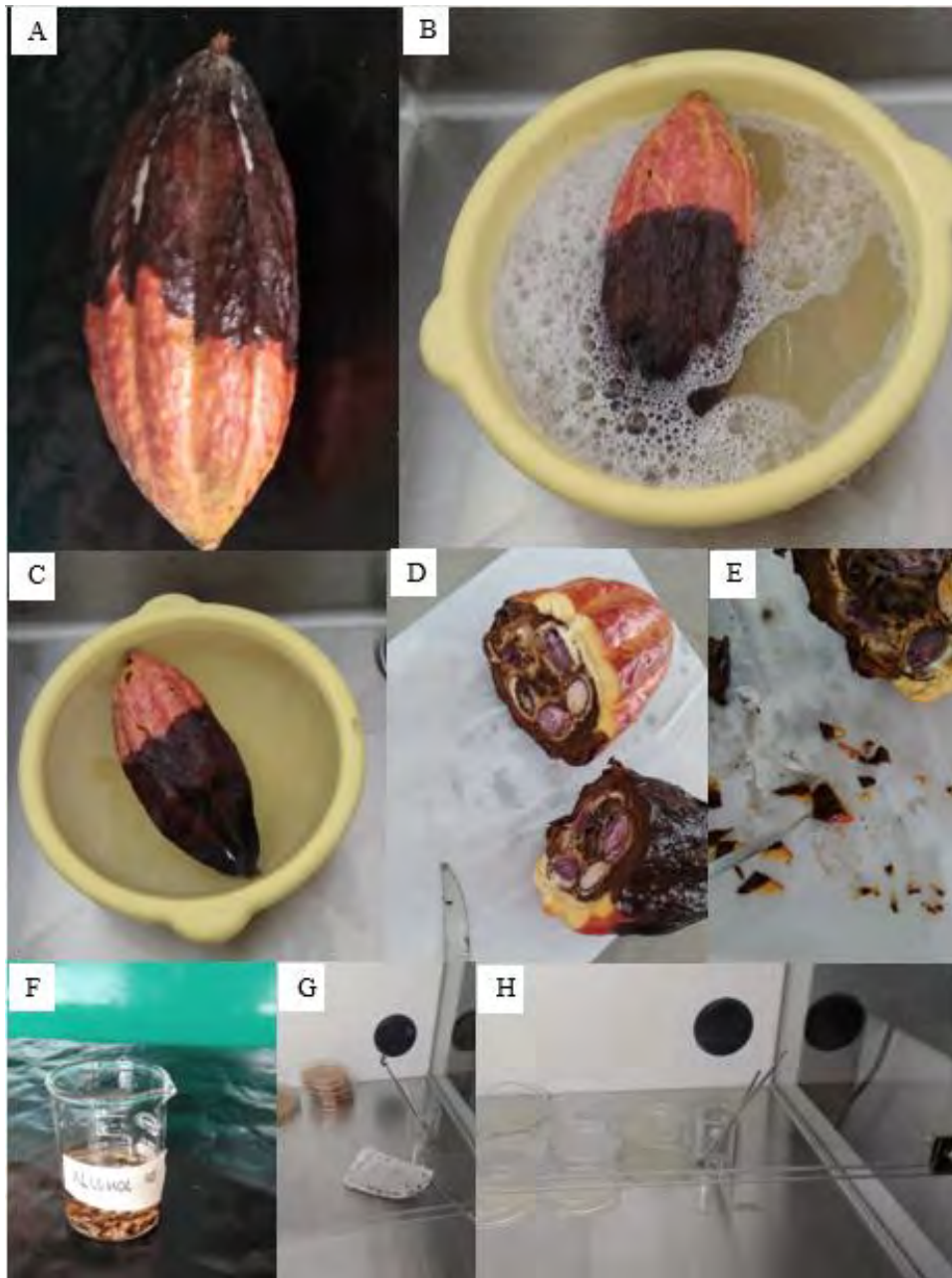
Se llevó al laboratorio la mazorca de cacao con presencia de síntoma primario de pudrición parda (figura 8. A); se lavó la mazorca con agua y detergente, para eliminar contaminantes (figura 8. B); se enjuagó en agua destilada (figura 8. C); se cortó la mazorca en la zona de avance de la necrosis, y con la ayuda de un bisturí para cortar trozos pequeños de 2 mm x 2 mm aproximadamente (figura 8. D y E); los trozos de tejido se desinfectaron en alcohol de 70° por un tiempo de 60 segundos, el cual se realizó 2 veces, y estos trozos al colar, se colocó dentro de la cámara de bioseguridad, sobre papel filtro y/o toalla estéril, para que pueda secar la muestra, por un tiempo de 40 minutos (figura 8. F y H).

Se preparó un medio de cultivo selectivo, que consistió primeramente en preparar el medio de cultivo CMA (Corn Meal  $250\text{ g.L}^{-1}$ ; Agar  $18\text{ g.L}^{-1}$ ), el cual se esterilizó por 30 minutos a una presión de 15 lb, seguidamente dentro de una cabina de flujo laminar, previamente antes del plaqueo se añadió Benomyl  $1\text{ g.L}^{-1}$ , Gentamicina  $1\text{ ml.L}^{-1}$  y ampicilina  $1\text{ g.L}^{-1}$  (figura 3. A y E), para ello el medio CMA deber estar a un punto de plaqueo o tibio, para no alterar las propiedades de los insumos, luego se procedió a verter en las placas Petri previamente esterilizados.

Posteriormente con la ayuda de una pinza esterilizada se colocó los trozos de epicarpio del fruto del cacao en las placas Petri con medio de cultivo, para luego sellar y rotular.



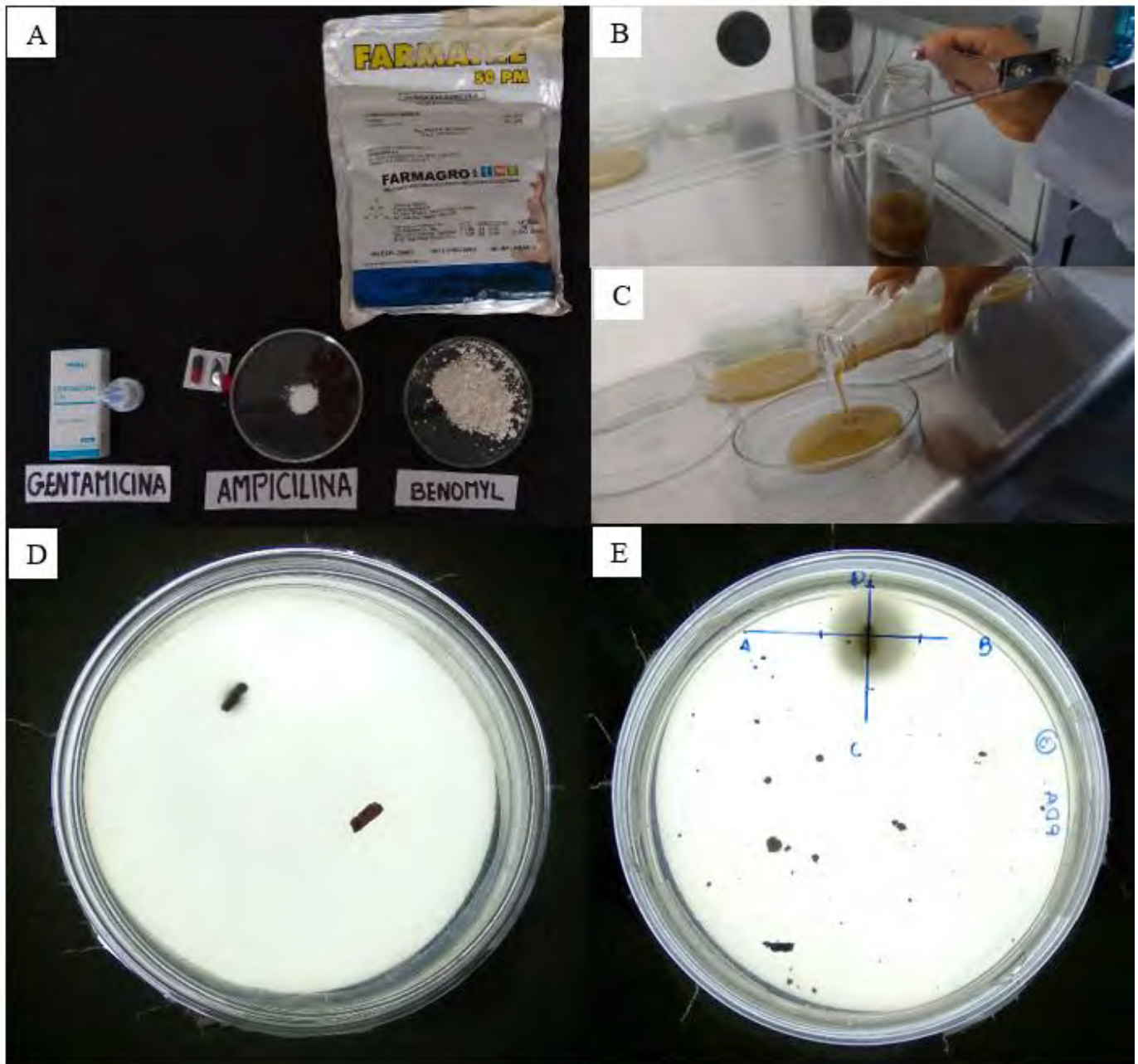
**Figura 8. Proceso para el aislamiento del agente causal de la pudrición parda.**



Fuente: elaboración propia.

**Nota:** A) Mazorca de cacao con síntomas de pudrición parda. B) Desinfestación con detergente. C) Enjuague con agua destilada. D y E) Disección de tejido enfermo; F, Desinfestación del tejido enfermo en alcohol de 70°; G, oreado de trozos de tejido dentro de la cámara de bioseguridad; H, placas Petri con medio de cultivo.

**Figura 9.      Proceso de aislamiento del agente causal de la pudrición parda**



Fuente: elaboración propia.

**Nota:** donde: A, antibióticos y fungicidas; B y C, Momento de añadir los reactivos y proceso del plaqueo; D, Sembrío del tejido enfermo; E, Crecimiento de colonia a 7 días después de la siembra

### 5.6.1.3. Tercera etapa: Inoculación del agente causal en mazorca sana.

Para cumplir el tercer postulado de Koch se realizó en la parcela de Pan de azúcar, en horas del atardecer para optimizar las condiciones ambientales, para la inoculación se utilizó rodajas de 5mm de diámetro de medio de cultivo con inóculo aislado y con la ayuda de una jeringa estéril se colocó sobre una herida hecha sobre el fruto o mazorca de 4 meses de edad de crecimiento en clon de CCN51, se dejó en cámara húmeda para mantener condiciones favorables para la infección del fitopatógeno y evitar la contaminación del fruto y el ambiente; los primeros síntomas se observaron a los 7 días después de la inoculación, presencia de mancha de color marrón con un diámetro de 5 cm, a los 15 días la mancha abarcó el 40% de la mazorca, por tanto se comprobó, que el agente causal aislado inicialmente presenta los mismos síntomas primarios que se observó en campo, fue trasladado a laboratorio para terminar el postulado de Koch.

**Figura 10. Proceso de inoculación en mazorca sana del clon CCN51.**



Fuente: elaboración propia.

**Nota:** A) Mazorca del clon CCN51 para inoculación; B) Inoculación del patógeno en estudio; C) Cámara Húmeda; D) Primer síntoma primario presente en la mazorca de cacao después de la inoculación.

#### **5.6.1.4. Segundo aislamiento del agente causal, de mazorca de cacao inoculado.**

Se considera la cuarta etapa, para este proceso se utilizó la mazorca inoculada para el re-aislamiento, siguiendo la metodología inicial, seguidamente se realizó la purificación del inóculo para su identificación morfológica a nivel macroscópico y microscópico.

#### **5.6.2. *Evaluar la velocidad de crecimiento de cepas de Trichoderma spp y del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (Theobroma cacao L) en la provincia de La Convención – Cusco.***

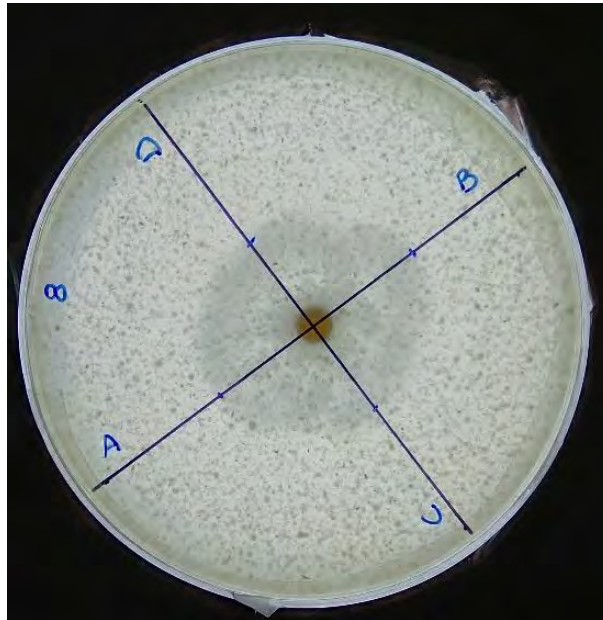
Se realizó a nivel de laboratorio, esta prueba se ejecutó para determinar la velocidad de crecimiento del micelio en condiciones de cultivo puro de las cepas de *Trichoderma spp* y el fitopatógeno.

Se usó las cepas de *Trichoderma spp* (*T. harzianum*, *T. viride* y *T. lignorum*) provenientes de SENASA, las cuales fueron purificadas para evitar alguna contaminación, y el aislamiento de *Phytophthora palmivora*, se obtuvieron una placa Petri para cada microorganismo, es decir, cuatro placas Petri conteniendo medio PDAO (papa-dextrosa-agar-oxitetraciclina) estéril, luego de hacer la siembra respectiva se incubó a 28 °C durante 5 días, de donde se extrajeron rodajas de micelio de 0.5 cm.

Para la instalación del experimento se prepararon cuatro Erlenmeyers conteniendo 200 ml de medio PDAO (papa-dextrosa-agar-oxitetraciclina) esterilizados en autoclave a una presión de 15 lb por 30 minutos, se procedió a verter en las placas Petri esterilizadas, una vez solidificados se procedió a realizar dos líneas perpendiculares por el envés de la placa dejando un punto medio donde se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro de cada microorganismo antes indicado. Se rotuló y selló con Parafilm, para incubar a temperatura de 28 °C.



**Figura 11. Placa Petri marcada en evaluación con dos líneas perpendiculares que facilita las mediciones correspondientes.**



Fuente: elaboración propia.

**Modo de evaluación:**

Diariamente, se midió el crecimiento radial del micelio, con la ayuda de una regla milimétrica, teniendo como puntos de medidas las líneas marcadas; la evaluación se realizó hasta que el micelio cubrió en su totalidad la placa Petri.

**Diseño del experimento:**

Este experimento tendrá un diseño completamente al azar (DCA), de cuatro tratamientos y 10 repeticiones, teniendo 40 unidades experimentales. Cada unidad experimental representa una placa Petri en evaluación.

Los valores de diámetro se procesaron utilizando el software SAS versión 8, mediante un análisis de varianza para diseño completo al azar (DCA) con 4 tratamientos y 10 repeticiones (placa Petri) y la comparación de medias por Duncan, con un nivel de confianza de 95% ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Descripción de los tratamientos empleados para determinar la velocidad de crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma lignorum*.

Tratamientos	Clave	Repeticiones
<i>Trichoderma harzianum</i>	Th	10
<i>Trichoderma viride</i>	Tv	10
<i>Trichoderma lignorum</i>	Tl	10
<i>Phytophthora palmivora</i>	Pp	10

Fuente: elaboración propia.

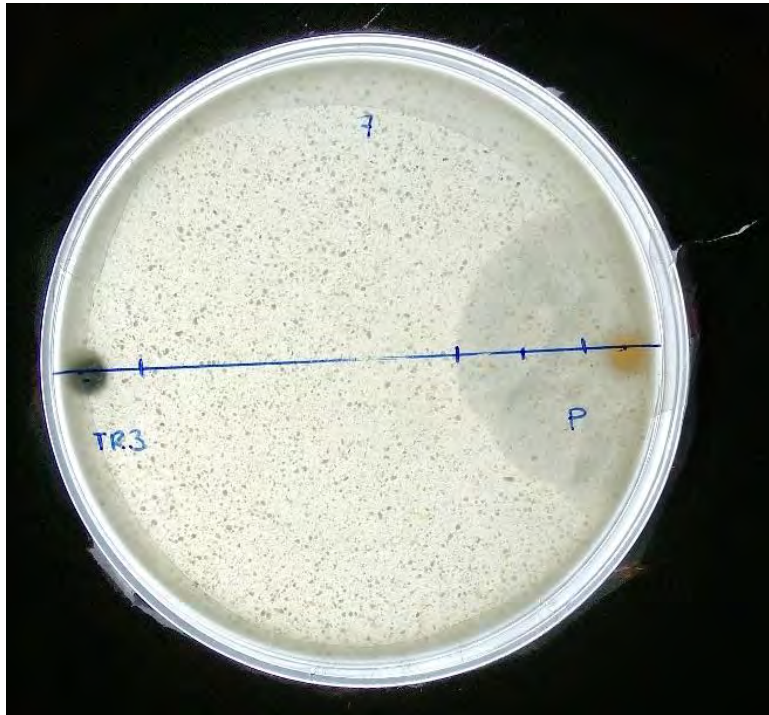
**5.6.3. Evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) por efecto de las cepas de *Trichoderma* spp, en la provincia de La convención.**

A fin de evaluar la actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp mediante la técnica dual de enfrentamiento en placas de Petri con medio PDAO (papa-dextrosa-agar-oxitetraciclina). Se preparó el medio PDAO (papa-dextrosa-agar-oxitetraciclina) para esterilizar en autoclave a 15 lb de presión por 30 minutos junto con placas Petri, pinzas y papel, luego de la esterilización el medio de cultivo se plaqueó dentro de la cabina de seguridad. Se tomaron placas Petri con el aislamiento del fitopatógeno (*Phytophthora palmivora*) y las cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* y *T. lignorum*) los cuales se colocaron dentro de una cabina de bioseguridad, así como las placas preparadas para la siembra. Se tomaron con sacabocado (previamente flameado en alcohol) rodajas de 0.5 cm de diámetro, y con ayuda de estiletes y pinzas se realizó la siembra de manera equidistante y en forma opuesta (Figura 12), fitopatógeno y fitopatógeno- *Trichoderma* spp.

Se sellaron las placas con parafilm y se incubaron a 28 °C para su crecimiento.

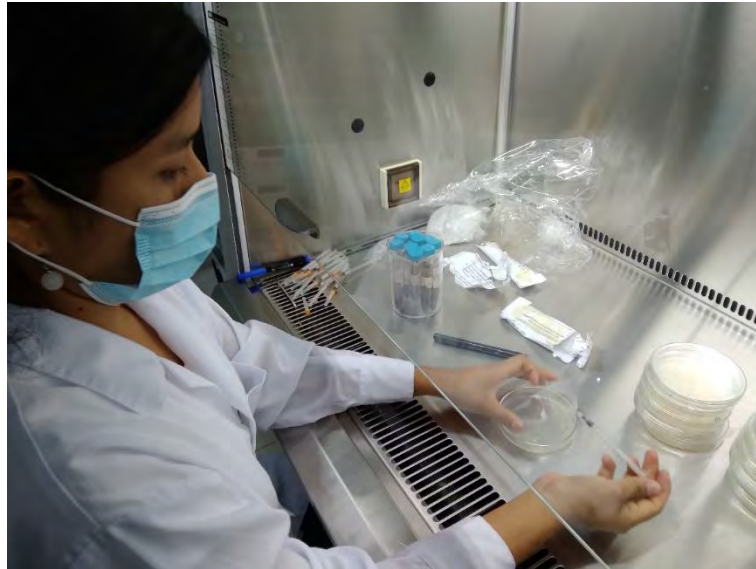
Las placas Petri en evaluación se marcaron de la siguiente manera para realizar las medidas correspondientes.

**Figura 12. Placa Petri marcada en evaluación con una línea recta que delimita el diámetro de 90 mm.**



Fuente: elaboración propia.

**Figura 13. Proceso de siembra de los inóculos respectivos en placas Petri dentro de la cabina de bioseguridad.**



Fuente: elaboración propia.

### **Modo de evaluación.**

La inhibición observada fue medida en milímetros y comparada con el crecimiento del testigo. Con los resultados obtenidos, se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (ICR) mediante la fórmula de Dennis y Webster (1971).

Donde:

R1 es la distancia más lejana recorrida por el patógeno y

R2 es la distancia recorrida por el patógeno hacia el antagonista.

$$\text{ICR (\%)} = (R1 - R2) 100 / R1$$

### **Diseño del experimento.**

Este experimento tendrá un diseño completamente al azar (DCA), de cuatro tratamientos y 10 repeticiones, teniendo 40 unidades experimentales. Cada unidad experimental representa una placa Petri en evaluación.



Los valores de la inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno se procesaron utilizando el software SAS versión 8, mediante un análisis de varianza para diseño completo al azar (DCA) con 4 tratamientos y 10 repeticiones (placa Petri) y la comparación de medias por Tukey, con un nivel de confianza de 95% ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.** Descripción de tratamientos empleados para determinar la inhibición de las cepas de *Trichoderma spp* sobre el fitopatógeno *Phytophthora palmivora*.

Tratamientos	Clave	Repeticiones
<i>Phytophthora palmivora</i> vs <i>Trichoderma harzianum</i>	Ss*Th	10
<i>Phytophthora palmivora</i> vs <i>Trichoderma viride</i>	Ss*Tv	10
<i>Phytophthora palmivora</i> vs <i>Trichoderma lignorum</i>	Ss*Ti	10
<i>Phytophthora palmivora</i> vs <i>Phytophthora palmivora</i>	Ss*Ss	10

Fuente: elaboración propia.

**5.6.4. Mostrar la capacidad de micoparasitismo sobre el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) por las cepas de *Trichoderma spp*, en la provincia de La convención.**

Esta evaluación se realizó después de cumplir con el objetivo anterior, se realizaron vistas microscópicas a partir del séptimo día después de la siembra, puesto que, se necesitan que los microorganismos en estudio tengan un crecimiento y desarrollo mayor para poder evidenciar la capacidad de micoparasitismo de las cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* y *T. lignorum*). Se utilizó muestras de las placas Petri en evaluación sobre portaobjetos con el uso de lactofenol que le da la coloración azul a las estructuras de los microorganismos y ayuda a tener mejor visión. Se colocó el portaobjetos en la base de vista del microscopio y se fue ubicando y acercando mejor con la ayuda de los lentes ópticos del equipo, hasta poder tener vistas a 100 X.

Las imágenes identificadas fueron capturadas para poder describirlas.

**Figura 14.** Uso del microscopio para observar el crecimiento y desarrollo de las cepas de *Trichoderma spp* empleadas en el experimento anterior e identificar micoparasitismo frente a *Phytophthora palmivora*



Fuente: elaboración propia.

## VI. RESUTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Resultados

#### *6.1.1. Resultados para el objetivo: Identificar el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (Theobroma cacao L.) en La Provincia de la Convención - Cusco.*

##### a. Recolección de muestras.

Se encontraron muestras de mazorcas de cacao con síntomas de la pudrición parda ubicadas en su mayoría en la parte baja y media de los árboles de cacao teniendo muestras de diferentes estados de desarrollo del fruto.

**Figura 15. Recolección de muestras**



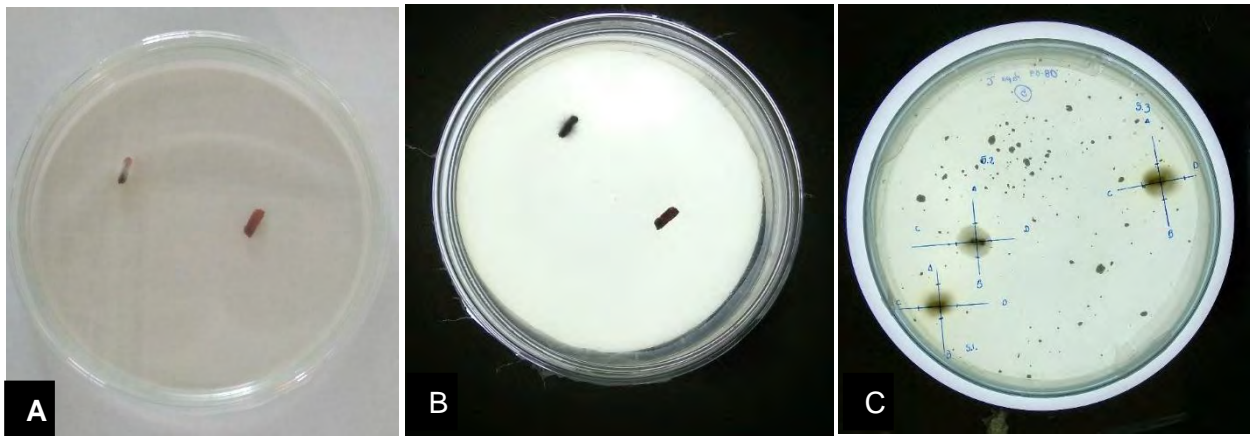
Fuente: elaboración propia.

**Nota:** A) Mazorca de cacao CCN51 con síntomas de mancha parda en la zona del pedúnculo. B) Muestras recolectadas en el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba.

#### **b. Aislamientos en medios de cultivo.**

A los cinco días realizada la siembra se observaron trozos de epidermis de la mazorca de cacao con presencia de micelios hialinos y muy pequeños, como también trozos sin manifestaciones de micelio.

**Figura 16. Muestras de aislamiento del agente causal de la pudrición parda en la mazorca de cacao a cinco días de la siembra.**



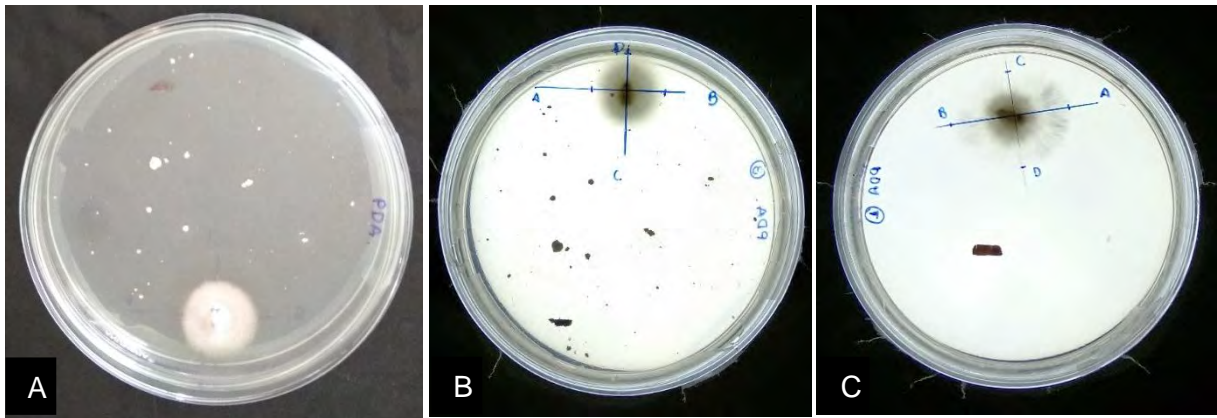
Fuente: elaboración propia.

**Nota:** A), B) y C) Placa Petri con crecimiento de micelios muy pequeños provenientes de los trozos de la epidermis de la mazorca de cacao con síntomas.

A los ocho días se observó micelios más definidos y con mayor desarrollo de aspecto blanquecino algodonoso que crecen de los trozos de epidermis de a mazorca de cacao sembrados.

Las observaciones visuales del crecimiento de las colonias en el medio de PDA (papa- dextrosa-agar), las colonias mostraron variaciones distintivas de forma, tienen las características de un micelio blanco, densamente compacto, similar al algodón. La observación microscópica también mostró la misma forma de los esporangios, como redondos y parecidos a una pera (esporangio elipsoide), las hifas que eran hialinas y ramificadas y clamidospora terminal. Con base en un análisis exhaustivo, el organismo fue identificado como *Phytophthora palmivora*.

**Figura 17. Muestras de aislamiento del agente causal de la pudrición parda en la mazorca de cacao a los ocho días de la siembra.**



Fuente: elaboración propia.

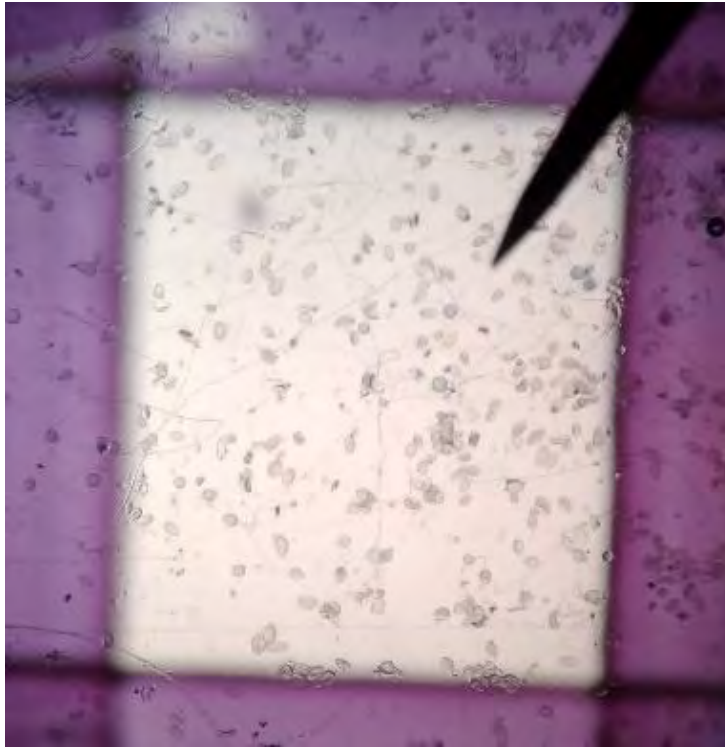
**Nota:** A) y B) Placa Petri con crecimiento de micelios de aspecto algodonoso y de color blanco.

C) Placa Petri con crecimiento de micelios de aspecto estrellado con micelios de color blanco.

Para la identificación se hizo la resiembra de la colonia aislada en una placa Petri con medio de cultivo PDAO, para garantizar el crecimiento del microorganismo y tener un cultivo puro.

Se hizo un montaje con la solución de lacto fenol sobre el portaobjetos para la visualización a 100x en microscopio.

**Figura 18.** Observación microscópica de la colonia aislada, teniendo presencia de estructuras llamadas esporangios.



Fuente: elaboración propia.

Para la identificación del aislamiento (Figura 19. A-D) se evaluó características macroscópicas y microscópicas utilizando la clave de especies de *Phytophthora* propuesta por Waterhouse (1963), teniendo como resultado el oomiceto que corresponde a *Phytophthora Palmivora*.

**Tabla 4.** Aislamientos obtenidos de mazorcas con pudrición parda, procedente del sector Pan de azúcar Echarate – La convención.

Órgano afectado	Método	Resultado
Mazorca con pudrición parda	Medio CMA+benomil+ampicilina+gentamicina	<i>Phytophthora palmivora</i>

Fuente: elaboración propia.



**Tabla 5. Características morfológicas macroscópicas de *Phytophthora palmivora*.**

Características	<i>Phytophthora palmivora</i>
<b>COLONIA</b>	Forma de crecimiento del micelio estrellada, con micelio semi aéreo, color blanco, de textura acuosa.

Fuente: elaboración propia.

Nota: descripción macroscópica del aislamiento obtenido de mazorcas con pudrición parda, procedente del sector de Pan de azúcar Echarate – La convención.

**Tabla 6. Características morfológicas microscópicas de *Phytophthora palmivora*, del aislamiento obtenido de mazorcas con pudrición parda, procedente del sector de Pan de azúcar Echarate – La convención.**

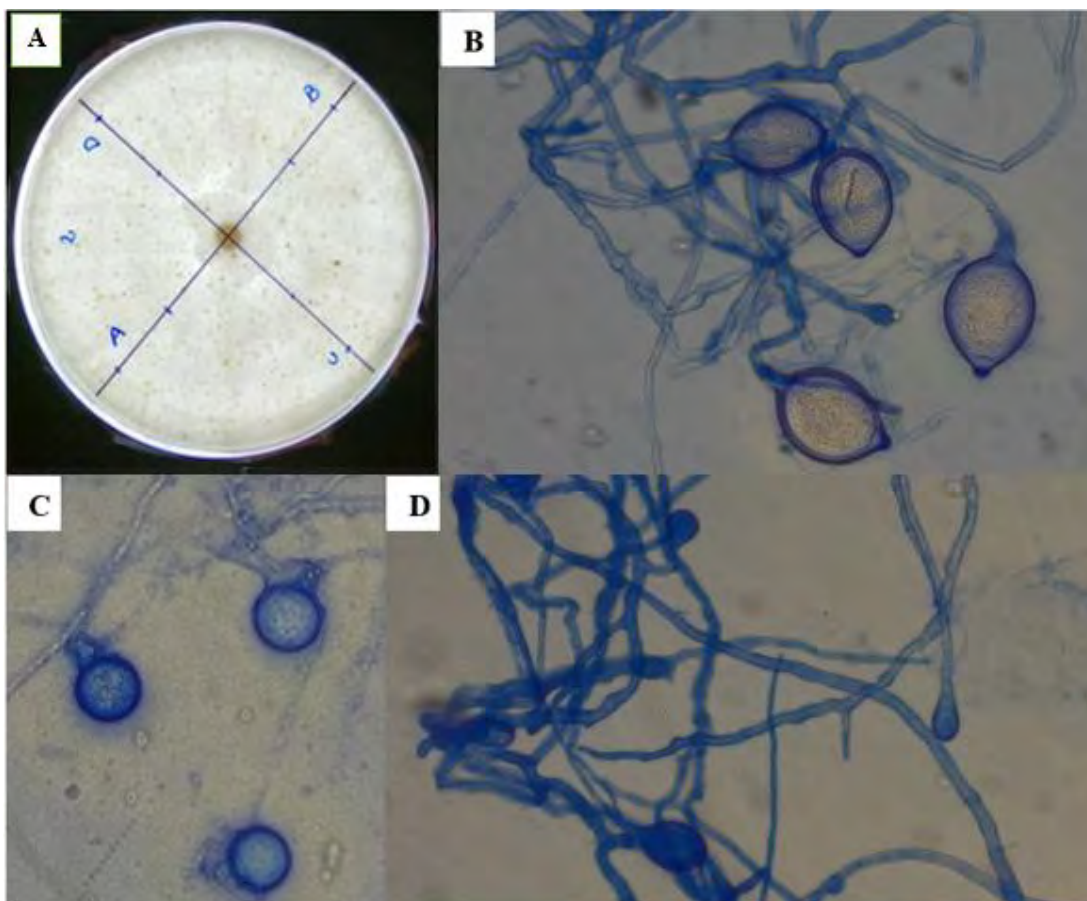
Características.	<i>Phytophthora palmivora</i>
<b>MICELIO</b>	<p>Cenocítico</p> <p>Hialino</p> <p>Inmerso en el tejido del hospedante</p> <p>A veces desarrolla hinchamientos</p>
<b>ESPORANGIO</b>	<p>Se desarrolla sobre un esporangióforo</p> <p>Forma ovoide</p> <p>Hialino</p> <p>Presenta papila</p>
<b>CLAMIDOSPORA</b>	<p>Se forma en la hifa</p> <p>Sin pigmentación</p> <p>Son de forma esférica</p> <p>Sin papilas</p> <p>Son terminales o intercalares</p>
<b>ANTERIDIO</b>	Presenta
<b>OOGONIO</b>	Presenta

Fuente: elaboración propia.

Nota: descripción microscópica del aislamiento obtenido de mazorcas con pudrición parda, procedente del sector de Pan de azúcar Echarate – La convención.



**Figura 19.** Características morfológicas de *Phytophthora palmivora*, aislados a partir de mazorcas de cacao con pudrición parda.



Fuente: elaboración propia.

**Nota:** A) Colonia de forma estrellada de *Phytophthora palmivora*. B) Presencia de esporangios estructuras reproducción asexual. C) Estructuras de reproducción sexual oospora y anteridio. D) Micelio de *Phytophthora palmivora*.

**6.1.2. Resultado para el objetivo: Evaluar la velocidad de crecimiento de cepas de *Trichoderma spp* y del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L*) en la provincia de La Convención – Cusco.**

En respuesta al objetivo planteado se procesaron los datos obtenidos de las mediciones del crecimiento del micelio de las cepas de *Trichoderma spp* (*T. harzianum*, *T. viride* y *T. lignorum*)

y el aislado *Phytophthora palmivora* en el medio de cultivo de PDAO (papa-dextrosa-agar-oxitetraciclina, dichos datos representan la velocidad de crecimiento del micelio de cada uno de los microorganismos indicando la capacidad de expansión que tienen respecto a *Phytophthora palmivora*.

**Tabla 7. Velocidad de crecimiento (mm) de las cepas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma lignorum* y el aislado *Phytophthora palmivora*, a 28 °C en placas Petri de 90 mm de diámetro.**

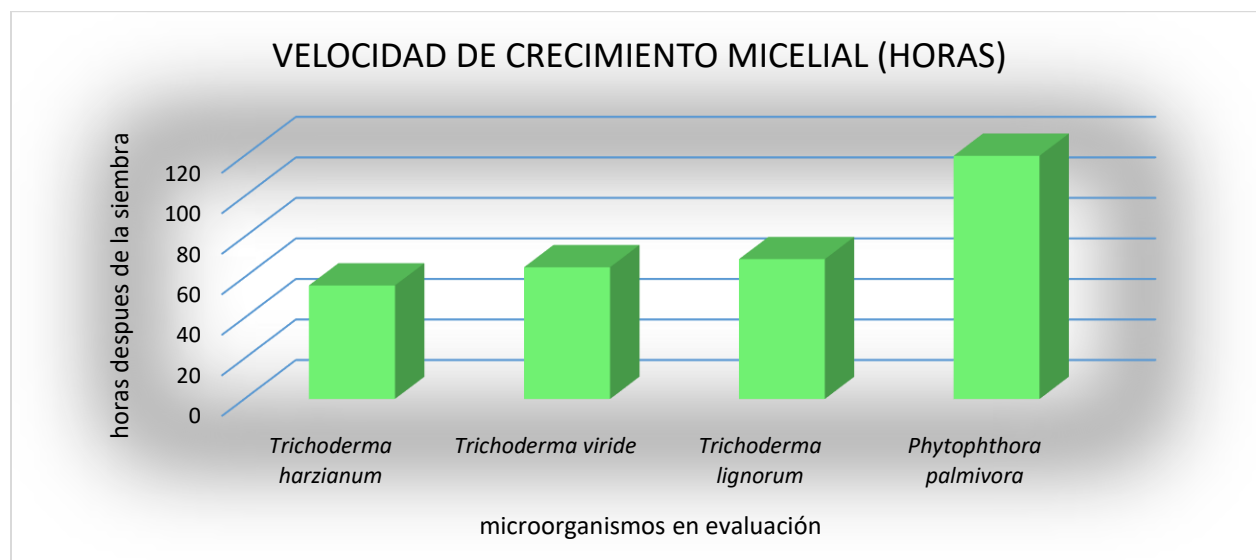
TRATAMIENTO		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO MICELIAL (mm)*								
		HORAS								
		24	48	56	62	65	69	72	96	120
Th	<i>Trichoderma harzianum</i>	17.7	67.8	90						
Ss	<i>Phytophthora palmivora</i>	3.8	18.3					58.6	70.8	90
Tv	<i>Trichoderma viride</i>	18.1	56.7	66.7		90				
Tl	<i>Trichoderma lignorum</i>	18.5	50.7	58.3			90			

Datos promedio de 10 repeticiones

Los resultados en la tabla 7, muestran datos promedios por tratamiento donde se evaluaron cada 24 horas hasta la segunda evaluación de forma homogénea, luego se registró la hora en que cubrieron por completo la placa Petri llegando a un crecimiento micelial de 90 mm según corresponda.

Se tuvo como resultado mayor velocidad de crecimiento micelial al tratamiento Th (*T. harzianum*), donde cubrió la placa Petri de 90 mm de diámetro a las 56 horas después de la siembra, seguido del tratamiento Tv (*T. viride*) teniendo el crecimiento micelial de 90 mm a las 65 horas, al tratamiento Tl (*T. lignorum*) con 69 horas de tener 90 mm de diámetro, por último, se tiene al tratamiento Ss (*Phytophthora palmivora*) con 90 mm de diámetro de micelio a las 120 horas.

**Figura 20. Velocidad de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp y *Phytophthora palmivora* hasta cubrir la placa de 90mm.**



En el gráfico se identifica que *Phytophthora palmivora* tuvo menor velocidad de crecimiento con 90 mm de diámetro de micelio a las 120 horas a diferencia de las cepas de *Trichoderma* spp donde claramente se observa mayor velocidad de crecimiento, es decir, el micelio toma menor tiempo en cubrir la placa Petri de 90mm de diámetro.

**Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) para datos de 48 horas después de la siembra de velocidad de crecimiento (mm) a 28 °C. en la prueba “in Vitro”.**

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	S.C.	C.M.	F CALCULADO	Pr > F
					5%
Tratamiento	3	13567.8187	4522.6062	950.0400	*
Error	36	171.3750	4.7604		
Total	39	13739.1937			
CV (%)	4.51				
Promedio	48.33				

Los resultados del análisis de varianza (Tabla 8) indican los resultados de la longitud de crecimiento del diámetro (mm).

El coeficiente de variación es CV= 4.51% y se encuentra en el rango permitido. Cumpliendo con los requisitos del diseño, del mismo modo los factores extrínsecos del experimento fueron controlados y en la toma de datos no hubo sesgo.

**Tabla 9. Prueba de Duncan para datos de la velocidad de crecimiento a las 48 horas después de la siembra a 28 °C en la prueba “in Vitro”.**

TRATAMIENTOS		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	REPETICIONES	DUNCAN (5%)
		PROMEDIO (mm)		
TH	<i>T. harzianum</i>	67.8	10	a
TV	<i>T. viride</i>	56.7	10	b
TL	<i>T. lignorum</i>	50.7	10	c
SS	<i>P. palmivora</i>	18.3	10	d

En el (tabla 9) contiene la comparación de medias de Duncan al 5% de probabilidad para tratamientos y muestra que existe diferencias significativas en la velocidad de crecimiento micelial entre los tratamientos planteados.

Dentro de los tratamientos del género *Trichoderma* se encontraron diferencias significativas entre Th, Tv, Tl, teniendo promedios de crecimiento micelial a las 48 horas de 67.8 mm, 56.7mm y 50.7mm respectivamente, esto indica que cada una de las especies de *Trichoderma* desarrollan capacidades de adaptación y grados de crecimiento que caracteriza a cada uno.

Del mismo modo se tuvo diferencias significativas mediante la prueba de Duncan al 5% de probabilidad entre los tratamientos con *Trichoderma* respecto al crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora*, quien solo tuvo 18.3 mm, indicando que las cepas de *Trichoderma* son superiores en cuanto a desarrollar por espacio y nutrientes.

*Trichoderma harzianum* es diferente estadísticamente frente a las demás especies con un nivel de seguridad del 5%; lo que determina que *Trichoderma harzianum* tuvo mayor velocidad de crecimiento micelial en comparación a *Phytophthora palmivora*.

**6.1.3. Resultado para el objetivo: Evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L*) por efecto de *Trichoderma spp*, en la provincia de La convención.**

La inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora*, enfrentados a las cepas de *Trichoderma spp* resulto significativa ( $p \leq 0.05$ ) con valores que fluctuaron entre 36.40, 37.30 y 41,40 mm con respecto al testigo 41,70 mm (Ss) de crecimiento radial de micelio alcanzado por el patógeno (*Phytophthora palmivora*) Tabla 10.

A los 5 días de incubación en cultivos duales, se obtuvo que el testigo de *Phytophthora palmivora* (Ss), logro un crecimiento radial promedio de 41.70 mm; al ser confrontado con *Trichoderma spp*; se logró inhibición de *Phytophthora palmivora* + *Trichoderma harzianum* (Th x Ss), 37.30 mm; *Trichoderma lignorum* (Tl x Ss), 41.40 mm; *Trichoderma viride* (Tv x Ss), 36.40 mm.

**Tabla 10.** Resultados de la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora*, en cultivos duales incubados *in vitro* a 28 °C.

Rep.	Ss	Inhibición micelial (mm.)		
		Ss		
		Th	Tl	Tv
1	42.00	39.00	41.00	36.50
2	41.00	39.00	42.00	35.50
3	42.00	36.00	41.00	36.70
4	42.00	36.00	42.00	36.80
5	42.00	39.00	42.00	36.00
6	41.00	36.00	41.00	36.60
7	42.00	36.00	42.00	36.50
8	41.00	37.00	41.00	36.60
9	42.00	36.00	41.00	36.50
10	42.00	39.00	41.00	36.30
Prom.	41.70	37.30	41.40	36.40

**Leyenda:**

Th: *Trichoderma harzianum*

Tl: *Trichoderma lignorum*

Tv: *Trichoderma viride*,

Ss: *Phytophthora palmivora*

*Trichoderma viride*, logro inhibir a *Phytophthora palmivora* en un 12.70%, en cambio *Trichoderma harzianum* (10.57 %) y *Trichoderma lignorum* (0.71 %), logrando detener el avance de *Phytophthora palmivora*. Tabla 10, Figura 21.

**Tabla 11. Resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora*, en cultivos duales incubados *in vitro* a 28 °C.**

Rep.	Ss	% de inhibición micelial		
		Ss		
		Th	Tl	Tv
1	42.00	7.14	2.38	13.10
2	41.00	4.88	-2.44	13.41
3	42.00	14.29	2.38	12.62
4	42.00	14.29	0.00	12.38
5	42.00	7.14	0.00	14.29
6	41.00	12.20	0.00	10.73
7	42.00	14.29	0.00	13.10
8	41.00	9.76	0.00	10.73
9	42.00	14.29	2.38	13.10
10	42.00	7.14	2.38	13.57
Prom.	41.70	10.55	0.72	12.71

La tabla 12, indica, que hubo inhibición de *Phytophthora palmivora* frente a *Trichoderma spp*; a un nivel de significancia de 5%. El coeficiente de variabilidad es 2.75 %, el cual garantiza los datos extraídos, también las condiciones del experimento fueron controladas (medios de cultivo esterilizados).

**Tabla 12. Análisis de variancia en D.C.A. para la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora*, en cultivos duales incubados *in vitro* a 28°.**

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	S.C.	C.M.	F CALCULADO	Pr > F
					5%
Tratamiento	3	12201.0000	4067.0000	5951.7100	*
Error	36	24.6000	0.6833		
Total	39	12225.6000			
CV (%)	2.75				
Promedio	30.10				

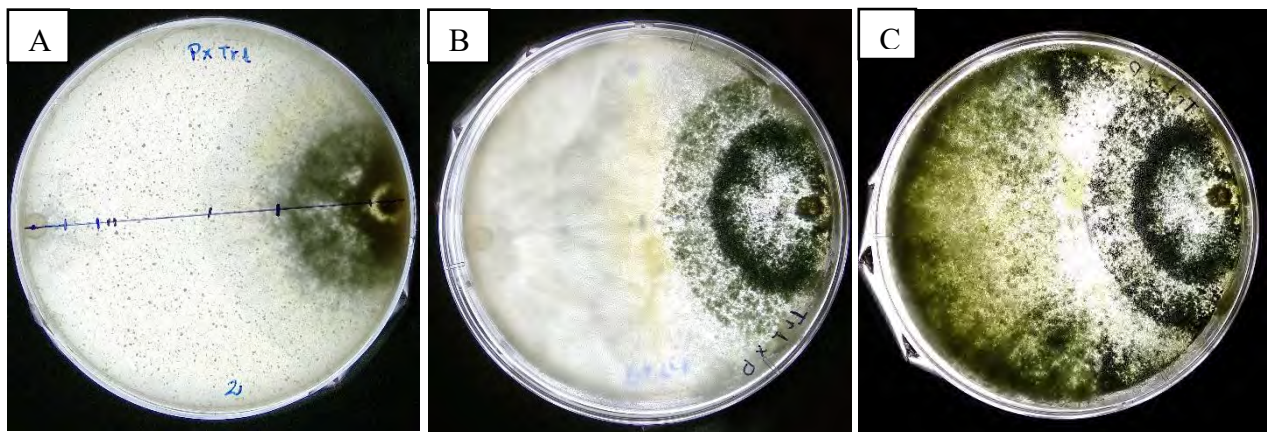
La tabla 13, nos muestra, que *Trichoderma viride* logro inhibir a *Phytophthora palmivora* permitiendo solo 36.40mm de micelio, por tanto, para el control de *Phytophthora palmivora* en

campo se recomienda el uso de *Trichoderma viride* por su alta capacidad antagónica frente a *Phytophthora palmivora*.

**Tabla 13.** Prueba de Duncan al 5% de probabilidad para la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora*, en cultivos duales incubados *in vitro* 28 °C.

TRATAMIENTOS		INHIBICIÓN MICELIAL	REPETICIONES	DUNCAN (5%)
		PROMEDIO (mm)		
Ss * TH	<i>P. palmivora</i> * <i>T. viride</i>	36.40	10	a
Ss * TV	<i>P. palmivora</i> * <i>T. harzianum</i>	37.30	10	b
Ss * TL	<i>P. palmivora</i> * <i>T. lignorum</i>	41.40	10	c
SS	<i>P. palmivora</i>	41.70	10	c

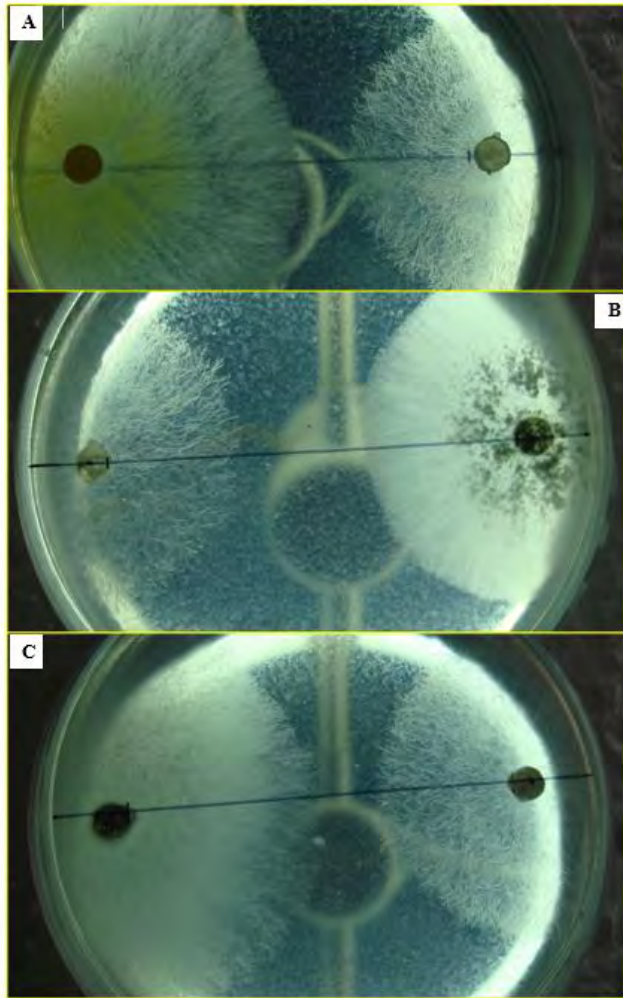
**Figura 21.** Capacidad de inhibición (antagonismo) de *Trichoderma* frente a *Phytophthora palmivora*.



**Nota:** A), B) y C) *Trichoderma viride* enfrentados a *Phytophthora palmivora* en diferentes grados de crecimiento de los microorganismos en estudio.



**Figura 22. Confrontación de colonias.**



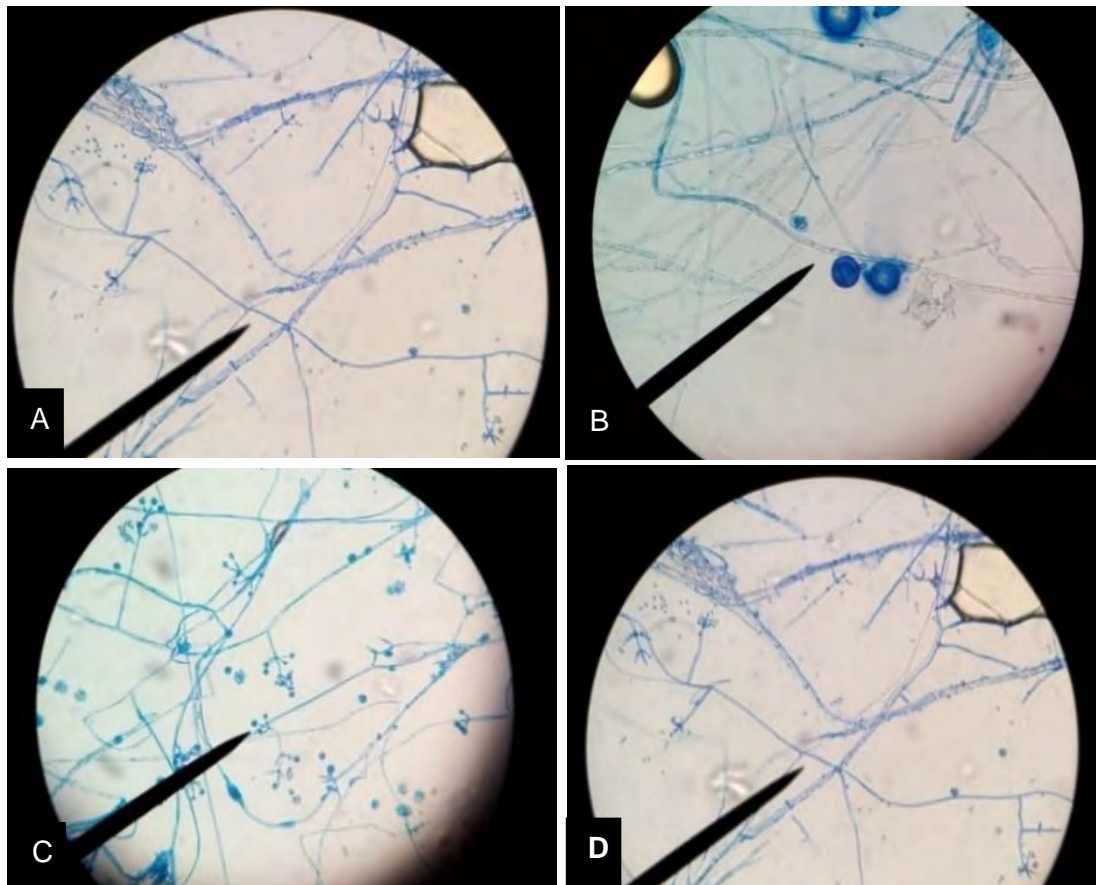
**Nota:** A) *Trichoderma viride* vs *Phytophthora palmivora*. B) *Trichoderma lignorum* vs *Phytophthora palmivora*. C) *Trichoderma harzianum* vs *Phytophthora palmivora*

**6.1.4. Resultado para el objetivo: Mostrar la capacidad de micoparasitismo sobre el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) las cepas de *Trichoderma* spp en la provincia de La convención.**

Como resultado al objetivo correspondiente se identificó a través de vistas microscópicas a 100X el crecimiento de micelio de *Trichoderma* e incluso esporas, sobre los micelios y estructuras de *Phytophthora palmivora*, los cuales son de mayor grosor permitiendo el crecimiento de micelios

de *Trichoderma* de forma óptima (figura 23 (A)). El crecimiento y formación de estructuras de las fiálides y esporulación de *Trichoderma* son mayor en otras zonas del enfrentamiento (figura 23 (C)). Las esporas de *Trichoderma* son circulares las mismas que se desprenden de fiálides el cual indica que no existe alteración en el crecimiento y desarrollo del hongo controlador.

**Figura 23. Vistas microscópicas de micoparasitismo.**



**Nota:** A) y D) Los micelios de *Trichoderma* se encuentran en el interior de los micelios de *Phytophthora palmivora* ya que son más anchas y existen presencia de esporas de *Trichoderma*. B) se presencia estructuras de clamidosporas. C) de los micelios que se encuentran en el interior de las hifas de *Phytophthora palmivora* se ve el crecimiento de estructuras reproductoras de *Trichoderma*.

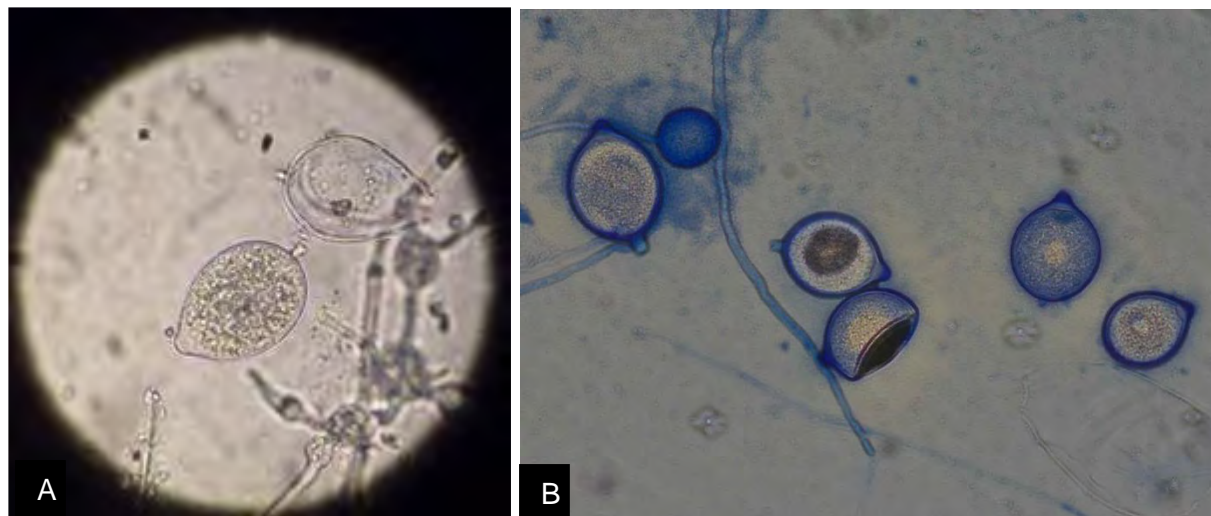
## 6.2. Discusiones

### 6.2.1. *Discusiones para el objetivo: identificar el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (Theobroma cacao L.) en La Provincia de la Convención - Cusco.*

Para la identificación del fitopatógeno en estudio se hizo el aislamiento considerando la parte crítica de la investigación, puesto que fue necesario utilizar antibióticos como Benomyl  $1g.L^{-1}$ , Gentamicina  $1ml.L^{-1}$  y ampicilina  $1g.L^{-1}$ , lo cual coincide con lo que menciona Soto et al., (2017) que existen medios selectivos para aislar *Phytophthora spp* como: PARPH y PVP P-pimaricina, A-ampicilina, R-rifampicina, P-pentacloronitrobenceno, H-himexazol, V-vancomicina) aclarando que son antibiótico costosos; sin embargo, el uso de antibióticos en esta investigación son de bajos costos y fácil obtención facilitando la investigación.

Los resultados a nivel microscópicas de la colonia aislada de *Phytophthora palmivora* describe presencia de esporangios de forma periforme a elipsoide algunos de forma alargada con papilas muy pronunciadas, el cual se verifica en la investigación de Aguilar et al (2020).

**Figura 24.** Muestras de *Phytophthora palmivora*



**Nota:** A) Esporangios del hongo *Phytophthora palmivora* de forma elipsoide, con presencia de pedicelo corto y papila en la investigación de (Aguilar et al., 2020). B) Esporangios de forma elipsoide, con pedicelo corto y papila identificada a nivel microscópica en el aislamiento del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao en la presente investigación.

Por otro lado, las características macroscópicas del aislado de *Phytophthora palmivora*, tiene micelio hialinos y blanquecinos con apariencia de algodón, de forma estrellada o en ocasiones sin patrón definido el cual es diferenciado de la misma manera por Rojas (2024) en su investigación, lo que asegura la correcta identificación y aislamiento.

Las características morfológicas de los aislamientos de *Phytophthora palmivora* respecto a forma y tamaño de esporangios, y longitud de pedicelos están dentro de los límites descritos por Waterhouse (1963).

Bidot, *et al* (2021), menciona que las cepas suelen tener un patrón de crecimiento en forma de pétalo, la presencia de esporangios es abundante, con forma oval y elipsoidal, el radio L/A (largo/ancho) varía de entre individuos a su vez, hay presencia de clamidosporas.

Appiah *et al* (2003). menciona que cuando el crecimiento del patógeno es de forma estrellada, se cree que son aislamientos posibles de *P. palmivora*, por la información conocida de esta especie.

**6.2.2. Discusiones para el objetivo: evaluar la velocidad de crecimiento micelial de cepas de *Trichoderma spp* y del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L*) en la provincia de La Convención – Cusco.**

Consecuentemente, los tratamientos en base a las 3 cepas de *Trichoderma* tuvieron un comportamiento superior en comparación con el crecimiento de *Phytophthora palmivora*. Demostrando que tienen mayor velocidad de crecimiento. Y esto viene a ser positivo para el control del agente fitopatógeno. A las 48 horas, el crecimiento micelial de *T harzianum* alcanzo los 67.8 mm y a las 56 horas logro cubrir la placa de 90 mm. durante su crecimiento se observó micelio blanco algodonoso con presencia de coloración verde claro, tuvo esporulación en el centro y bordes de la placa Petri (figura 33). A diferencia de *T viride* quien logro una esporulación general, con micelio algodonoso (figura 31). Sin embargo, cubrió la placa Petri de 90 mm en 65 horas. *T lignorium* presentó una esporulación de verde intenso y un crecimiento de 90 mm de diámetro en 69 horas (figura 32).

Lopez y Vega (2022) menciona que las diferentes especies de *Trichoderma* se caracterizan por tener un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas, que ayuda a la colonización de diversos sustratos y algunos otros hongos fitopatógenos, su principal mecanismo de acción es la competencia directa por nutrientes y por espacio utilizando sustratos como fuente de carbono y nitrógeno.

Orellana (2022) indica que el *Trichoderma* tiene potencial en la competencia por espacio y nutrientes y en la producción de metabolitos volátiles, siendo hongos antagonistas que colonizan rápidamente las partes afectadas por *Phytophthora sp*; estas referencias coinciden con la presente investigación en mencionar que *Trichoderma* tiene mayor crecimiento de micelio y esporulación frente a *Phytophthora palmivora*, resaltando que las especies utilizadas presentan diferentes capacidades de esporulación, marcando el nivel de virulencia de cada una de ellas, es decir, a mayor esporulación existe mayor virulencia y por consiguiente un control eficaz frente a fitopatógenos.

**6.2.3. Discusiones para el objetivo: evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L*) por efecto de las cepas de *Trichoderma spp*, en la provincia de La convención.**

Para este objetivo los ensayos realizados en condiciones in vitro se obtuvieron que las cepas de *Trichoderma sp*. mostraron tener influencia sobre el crecimiento radial de *Phytophthora palmivora* esto en comparación con los tratamientos control, donde se observa que entre los tratamientos de enfrentamiento no existen diferencias estadísticas significativas, pero que estos si son estadísticamente diferentes con respecto al tratamiento control que contenía únicamente la cepa de *Phytophthora palmivora*. Teniendo los resultados siguientes: *T. harzianum*, *T. viride* y *T. lignorum* tuvieron capacidad de inhibir el crecimiento de *Phytophthora palmivora* en un 12.71%, 10.55% y 0.72% respectivamente en condiciones in vitro, en una evaluación final a las 120 horas después de la siembra. La zona de inhibición producida por *T. viride*, frente al fitopatógeno, a partir del séptimo día de enfrentamiento aumenta a medida que transcurre el tiempo. Se observa crecimiento de micelios algodonosos de coloración verde lo que indica esporulación de *T. viride*

sobre la colonia de *Phytophthora palmivora*, lo que le da mayor capacidad de competencia por sustrato, resaltando la creación del halo de inhibición y disminución del crecimiento radial del fitopatógeno en cultivo dual.

López & Vega (2022) evaluaron el antagonismo de dos cepas de *Trichoderma* donde se tuvo registros de 43% y 46% de inhibición frente a *Phytophthora sp.* esto durante un periodo de 144 horas. Labrador (2011) tuvo los siguientes resultados del enfrentamiento entre *Phytophthora palmivora* y *B. subtilis*, como enfrentamiento con *T. crassum* donde se reportó un porcentaje de inhibición de 21,67% y 11,59% respectivamente.

Por otro lado Hernández *et al* (2012) menciona que en su investigación logró verificar que *Trichoderma sp* tuvo mayores diámetros de las colonias a las 96 horas donde el hongo patógeno dejó de crecer, mientras el antagonista continuaba creciendo hasta invadir totalmente la superficie de la colonia de *Phytophthora sp.* Se coincide que el género *Trichoderma* (*T. asperellum* y *Trichoderma sp*) fueron de rápido crecimiento León (2021).

Estas investigaciones coinciden con este trabajo en el sentido que *Trichoderma* es capaz de detener y generar control frente a *Phytophthora palmivora*. En lo que se difiere son en los porcentajes de inhibición considerando que estos datos varían por las condiciones propias de cada evaluación como los nutrientes de los medios de cultivo, genética de la cepa de cada microorganismo. Los mecanismos de acción utilizados por *Trichoderma* son complejos, variados y se complementan en forma sinérgica. Generando variación en la capacidad de control en cada caso.

**6.2.4. Discusiones para el objetivo: Mostrar la capacidad de micoparasitismo sobre el agente causal de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L) por las cepas de *Trichoderma* spp en la provincia de La convención.**

En este estudio se observó la capacidad de micoparasitismo, presentados en los enfrentamientos realizados con las tres cepas de *Trichoderma harzianun*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma lignorum* como resultado de la infección y esporulación de *Trichoderma* hacia los micelios de *Phytophthora palmivora*. Este resultado responde a la capacidad de control que tiene el género de *Trichoderma*. así como Labrador (2011), indica que en la interacción entre *T. crassum* y *P. palmivora* presentaba un enrollamiento anormal de las hifas, generando lisis en las estructuras de *P. palmivora*. Lo que coincide con este estudio. Este mecanismo sucede en tres fases: primero el hongo *Trichoderma* realiza un reconocimiento del huésped, en este caso el fitopatógeno, luego forma papilas o estructuras similares a apresorios; posteriormente *Trichoderma* enrolla las hifas del fitopatógeno e inicia a degradar mediante la producción de enzimas como celulasas y hemicelulasas, proteasas, quitinasas y -1,3-glucanasas, entre otros metabolitos secundarios (Guzmán et al., 2023). Los resultados de esta investigación reafirman la capacidad de biocontrol para fitopatógenos. Se recomienda el uso continuo para una mejor consistencia del control.



## VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

### 7.1. CONCLUSIONES

- ✓ Se tuvo como resultado a la especie *Phytophthora palmivora*, la identificación fue esencial ya que existen otros microorganismos que generan síntomas parecidos en frutos de cacao.
- ✓ Se tiene con mayor velocidad de crecimiento micelial a la cepa *Trichoderma harzianum* con 56 horas de cubrir la placa Petri de 90 mm a diferencia de la *Phytophthora palmivora* que cubrió la placa a las 120 horas después de la siembra. Por otro lado, las cepas de *Trichoderma viride* y *Trichoderma lignorum* también obtuvieron mayor velocidad de crecimiento frente *Phytophthora palmivora*, lo que indica que el género *Trichoderma* es un potencial biocontrol.
- ✓ Se tuvo como resultado a *Trichoderma viride* como la mejor cepa que tiene la capacidad de inhibir con 12.71 % seguido de *Trichoderma harzianum* con 10.57% y *Trichoderma lignorum* con 0.71% con respecto al crecimiento de *Phytophthora palmivora*.
- ✓ Se observaron infección sobre los micelios de *Phytophthora palmivora* por parte de las 3 cepas de *Trichoderma* empleados en esta investigación, donde ejercieron el mecanismo de micoparasitismo.

## 7.2. SUGERENCIAS

- ✓ Se recomienda hacer la identificación de más especies del género *Phytophthora*, que puedan estar causando enfermedades en el cultivo de cacao u otros para tener referencias propias de la zona agrícola de la provincia de La Convención.
- ✓ Se recomienda realizar el aislamiento de cepas de *Trichoderma spp* de los suelos de zonas productoras del cultivo de cacao en la provincia de La Convención y evaluar su capacidad de crecimiento micelial y control que puedan desarrollar frente a fitopatógenos.
- ✓ Se recomienda el uso de *Trichoderma viride* para el control de *Phytophthora palmivora* en zonas productoras de cacao dentro del área de la provincia de La Convención.
- ✓ Se recomienda la difusión de los beneficios que tiene el género *Trichoderma*, y otras especies de control biológico hacia los agricultores para que consideren el uso y aplicaciones en campo dentro de sus actividades culturales.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, N., Doni, F., Mispan, M., Saiman, Z., Yusuf, Y., Oke, M., & Suhaimi, N. (2021). Harnessing Trichoderma in Agriculture for Productivity and Sustainability. *Agronomy*, 11(12), 2559. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122559>
- Adeniyi, D. (2019). Diversity of Cacao Pathogens and Impact on Yield and Global Production. En *Theobroma cacao - Deploying Science for Sustainability of Global Cocoa Economy*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81993>
- Aguilar, A., Carrasco, C., Morales, A., Yovera, F., Maldonado, E. (2020). Etiology of regressive dieback by Phytophthora palmivora in the crop of cocoa (Theobroma cacao L.) Pag.190.
- Anzules, V., Pazmiño, E., Alvarado, L., Borjas, R., Julca, N., Castro, V., & Julca, A. (2022). Incidencia de "cherelle wilt" y enfermedades fungosas en mazorcas de cacao 'CCN-51' en Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. *Idesia (Arica)*, 40(1), 31-37
- Appiah, A., Flood, J., Bridge, P., & Archer, S. (2003). Inter- and intraspecific morphometric variation and characterization of Phytophthora isolates from cocoa. *Plant Pathology*, 52(2), 168-180.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barros, O. 2014. Morfología y clasificación botánica del cacao. ICA. 45 p.
- Benito, J.A. (2010). Investigación en cacao en el Perú. Informe especial N° 02 INIPCIPA XIII S.M. Tarapoto – Perú. 36 pp.
- Bidot, I., Fernández, Y., Bertin, P., Riera, M., Valdéz, M., Declerck, S., & Decock, C. (2021). Diversidad Morfológica, genética y fitopatología del cacao (Theobroma cacao L.) tradicional

- cubano. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/400/379>
- Camilo, J., & Correa, G. (2017). Desarrollo de modelos predictivos de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet) en banano para la región de Urabá, Antioquia-Colombia
- Clavaud, C., Aimanianda, V., & Latge, J. P. (2009). Organization of Fungal, Oomycete and Lichen (1,3)- $\beta$ -Glucans. Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides, 387-424. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373971-1.00011-X>
- Cronquist, A. (1993). *An integrated classification system for flowering plants*. Columbia University Press. Cambridge, Nueva York.
- Chin, J. (2001) El control de las enfermedades transmisibles. Décimo séptima edición. Organización Panamericana de la Salud.
- Escalante, Y., & Samper, L. (2023). Postulados de Koch con Patógeno Aislado de Necrosis Foliar de Musa paradisiaca L. *Foro de Estudios Sobre Guerrero*, 5(1), 642–646.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Sid, 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
- FAO. (2021). Cultivos y productos de ganadería. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Faustino Damián, E. (2022). Sistemas de Muestreo para la detección de enfermedades en una plantacion comercial de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el distrito de Uchiza Tocache 2021. [Tesis de Pregrado Universidad Nacional Emilio Baldizan Huánuco]. <https://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13080/7818/tag00956f28.pdf?sequence=1&isallowed=y>.
- Flores, M., Matas, M., Pérez, S., Rodríguez, M., Salas, N., Soto, M., & Sánchez-Chávez, E. (2023).

- Trichoderma fungi as an agricultural biological control in Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 29(3), 79–114. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2022.11.015>
- Fraceto, L., Maruyama, C., Guilger, M., Mishra, S., Keswani, C., Singh, H., & de Lima, R. (2018). *Trichoderma harzianum* -based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(8), 2056–2063. <https://doi.org/10.1002/jctb.5613>
- Gangwar, O., & Singh, A. (2018). Trichoderma as an efficacious bioagent for combating biotic and abiotic stresses of wheat-A review. *Agricultural Reviews*, 38(01). <https://doi.org/10.18805/ag.R-1770>
- Guaman, M., Jaramillo, E., & Bernal, J. (2022). Control biológico de la mazorca negra (*Phytophthora Palmivora* l.) en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 5(3), 149–154. <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/539/549>
- Guerrero, R., Cevallos, O., Eguez, E., & Peñaherrera, S. (2020). El potencial del uso de microorganismos endofíticos como agentes de control de enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Centrosur Agraria*, 1-18.
- Guo, R., Li, G., Zhang, Z., & Peng, X. (2022). Structures and Biological Activities of Secondary Metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Marine Drugs*, 20(11), 701. <https://doi.org/10.3390/md20110701>
- Guzmán, P., Kumar, A., de los Santos, S., Parra, F., Orozco, M. del C., Fadji, A., Hyder, S., Babalola, O., & Santoyo, G. (2023). Trichoderma Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review. *Plants*, 12(3), 432. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>

- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. 2004. Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(1):43–56.
- Microbiology, 2(1): 43-56
- Hernández, J., Parra, D., Fernández, A., Durand, J., & Camejo, C. (2012). Evaluación de diferentes cepas de *Trichoderma spp.* para el control de *Phytophthora palmivora* en el cultivo de *Theobroma cacao L.* bajo condiciones de laboratorio en el estado Miranda.
- Huamani, E.(2023). Evaluación in vitro del potencial de biocontrol con cepas de (*Trichoderma spp.*) sobre (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao L.*) La Convención-Cusco. UNSAAC.
- Instituto Nacional del Cáncer (INC). (2024). *Cepa de organismos*.  
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/cepa-de-organismos>
- INTAGRI. (2015). *Phytophthora infestans, un Patógeno Devastador para las Hortalizas*.
- Khan, R., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., & Li, Y. (2020). Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma spp.* against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*, 8(6), 817.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>
- Labrador, Y. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora in vitro e in vivo de *Trichoderma crassum* Bissett y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn sobre *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler causante de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*). Universidad Central de Venezuela.
- Leiva, E., Gutiérrez, E., Pardo, C., Ramírez, R. 2019 comportamiento vegetativo y reproductivo del cacao (*Theobroma cacao L.*) Por efecto de la poda. *Revista fitotecnia mexicana* 42(2): 137-146.



- jardín clonal de la UTMACH. Tesis Ing. Agr. Machala, Ecuador. UTM. 122 p.
- Montes, M. 2016. Efectos del fosforo y azufre sobre la variable rendimiento de mazorcas en una plantación de cacao (*Theobroma cacao L.*) CCN-51, en la zona de Babahoyo. Tesis Ing. Agr. Babahoyo, Ecuador. UTB. 114 p.
- Mucherino, J., de Melo, C., Santana Silva, R., Luz, E., & Corrêa, R. (2021). Structural and functional genomics of the resistance of cacao to *Phytophthora palmivora*. *Pathogens*, 10(8), 961. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080961>
- Mukherjee, P., Mendoza-Mendoza, A., Zeilinger, S., & Horwitz, B. (2022). Mycoparasitism as a mechanism of Trichoderma-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*, 39, 15–33. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.004>
- Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. (2020). Trichoderma: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>
- Orellana Riofrio, G. 2022. Evaluación de *Trichoderma sp.* en control de *Phytophthora sp.*, causante de la enfermedad Mazorca Negra en cacao, a nivel invitro. Disponible en <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/18484/1/TTUACA-24-2022-IA-DE00010.pdf>
- Pani, S., Kumar, A., & Sharma, A. (2021). *Trichoderma harzianum*: una descripción general. *Boletín de Medio Ambiente, Farmacología y Ciencias de La Vida*, 10(6), 32–39.
- Parco, M., Camacho, A., Oscco, I., Parco, J., Bobadilla, L., y Dionisio, F. (2022). Efecto de ácidos húmicos, biocidas y micronutrientes protectores en el control de plagas y enfermedades de cacao (*Theobroma cacao L.*) en Pichanaki. *Revista de Investigación. Agropecuaria* 54 Science and Biotechnology, 2(1), 39-47.



<https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/1949>.

Peña, R. R., & Paez, J. E. (2015). *Fitopatología*. UPTC.

Pérez, E., Guzmán, R., Álvarez, C., Lares, M., Martínez, K., Suniaga, G., Pavani, A. (2021) Cacao, cultura y patrimonio: un hábitat de aroma fino en Venezuela. *Revista RIVAR* Vol. 8, N° 22. Pag: 146-162

Perrine, F. (2020). *Phytophthora palmivora*–cocoa interaction. *Journal of Fungi*, 6(3), 167. <https://doi.org/10.3390/jof6030167>

Plancarte, A., Rodríguez, G., Fernandez, Y., Pedraza, M., Lopez, L., Diaz, M., & Fernández, S. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp . enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8, 1867-1880.

Prajapati, S., Kumar, N., Kumar, S., Lakharan, L., & Maurya, S. (2020). Biological control a sustainable approach for plant diseases management: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 1514–1523.

Puig, A., Quintanilla, W., Matsumoto, T., Keith, L., Gutierrez, O., & Marelli, J. (2021). *Phytophthora palmivora* causing disease on *Theobroma cacao* in Hawaii. *Agriculture*, 11(5), 396. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050396>

Randy, P. (2016). The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview. En S. I. P. Switzerland (Ed.), *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters* (pP. 33-59). Department of Plant Pathology, University of Florida. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>

Ramírez, L., Abaunza, C., Rodríguez, L., Varón, E., Barragán, E., & Rojas, J. (2020). Modelo productivo para el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) para el departamento del Huila. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Agrosavia. Disponible en:

<http://hdl.handle.net/20.500.12324/36479>

- Roberto, N., Silva, V., Steindorf, A., Viera, E., Ferreira, E., & Ulhoa, C. (2019). *Trichoderma/pathogen/plant interaction*
- Rodríguez-Polanco, E., & Vera, A. G. (2015). Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* sp.) en cacao. Corporación colombiana de investigación agropecuaria-AGROSAVIA. 60 p. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13138>
- Rojas, R., Rodríguez, C., Ruiz, C., Portales, R., Neyra, E., Patel, K., Mogrovejo, J., Salazar, G., Hurtado, J. (2018). Cacao Chuncho del Cusco. <https://www.researchgate.net/publication/322992031>
- Sánchez, A., Villarruel, J., & Maldonado, L. (2021). Mycoparasitic antagonism of a *Trichoderma harzianum* strain isolated from banana plants in Oaxaca, Mexico. *Biotechnia*, 23(1), 127–134. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v23i1.1310>
- Sanchez, E. (2017). Efecto de tipos de secado del cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51 en la preservación de polifenoles totales y antocianinas. En U. N. Martín., Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial. (pág. 71). Tarapoto, Perú.
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Ficha Técnica: Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad [Versión 1.0]. Autor
- Sharma, S., Kour, D., Rana, K., Dhiman, A., Thakur, S., Thakur, P., Thakur, S., Thakur, N., Sudheer, S., Yadav, N., Yadav, A., Rastegari, A., & Singh, K. (2019). *Trichoderma: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications* (pp. 85–120). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_3).
- Surujdeo, S., Sreenivasan, T., Motilal, L., & Umaharan, P. (2016). Cacao diseases: A history of

- old enemies and new encounters. En *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters* (pP. 1-633). Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>
- Thomas, E., van Zonneveld, M., Loo, J., Hodgkin, T., Galluzzi, G., & van Etten, J. (2012). Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the neotropics reflect genetic differentiation in pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. *PLoS ONE*, 7(10): e47676. doi: 10.1371/journal.pone.0047676
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszek, J. (2022). Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Vanegtern, B., Rogers, M., & Nelson, S. (2015). Podredumbre negra de la vaina del cacao causada por *Phytophthora palmivora*. *Enfermedad de Las Plantas*, 108, 1–5.
- Vélez, M. (2021). Selección e identificación de microorganismos nativos del suelo de cacao (*Theobroma cacao* L.) con potencial antagónico contra *Phytophthora* sp. a nivel in vitro de la hacienda “La Dolorosa”, provincia de Esmeraldas. Universidad de la Fuerzas Armadas.
- Vera, M., Bernal, A., Leiva, M., Vera, A., Vera, D., Peñaherrera, S., & Jiménez, V. (2018). Microorganismos endófitos asociados a *Theobroma cacao* como agentes de control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Centro Agrícola*, 45(3), 81-87.
- Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonw. Mycol Inst. Kew, UK. 92 p
- Woo, S., Hermosa, R., Lorito, M., & Monte, E. (2023). Trichoderma: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*,

21(5), 312–326. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>

- Xiao, Z., Zhao, Q., Li, W., Gao, L., & Liu, G. (2023). Strain improvement of *Trichoderma harzianum* for enhanced biocontrol capacity: Strategies and prospects. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1146210>
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1160551>
- Zin, N., & Badaluddin, N. (2020). Biological functions of *Trichoderma spp.* for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>

## **IX. ANEXOS FOTOGRÁFICOS**

**Figura 25. Recolección de muestras en el sector Pan de azúcar del distrito de Echarati – La convención – Cusco.**



**Figura 26. Muestras de mazorca de cacao con síntomas de pudrición parda en el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba, listos para el procedimiento del aislamiento del fitopatógeno.**

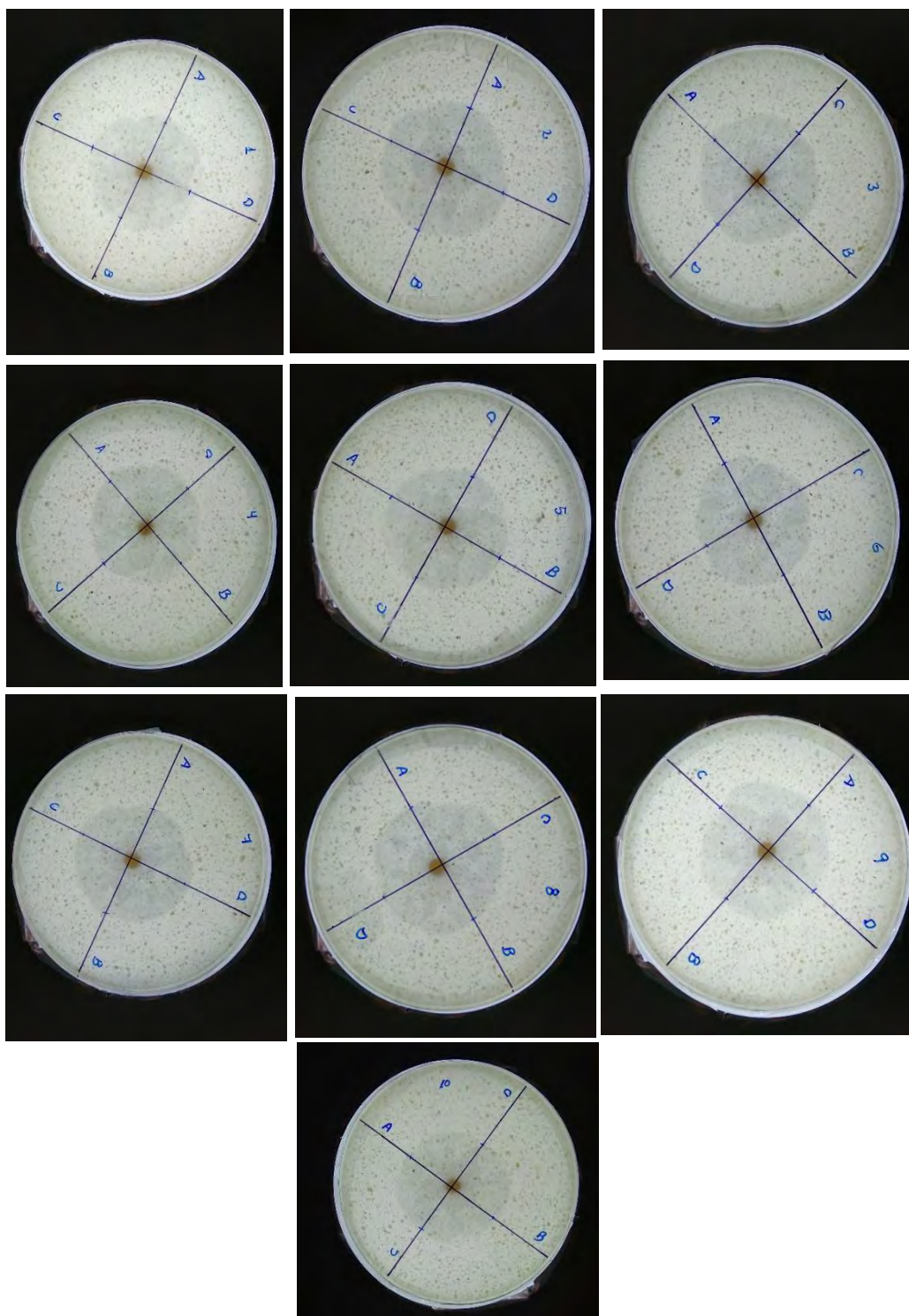


**Figura 27. Muestra de mazorca de cacao con síntomas de pudrición parda con presencia de signo de la enfermedad, luego de conservar en cámara húmeda.**

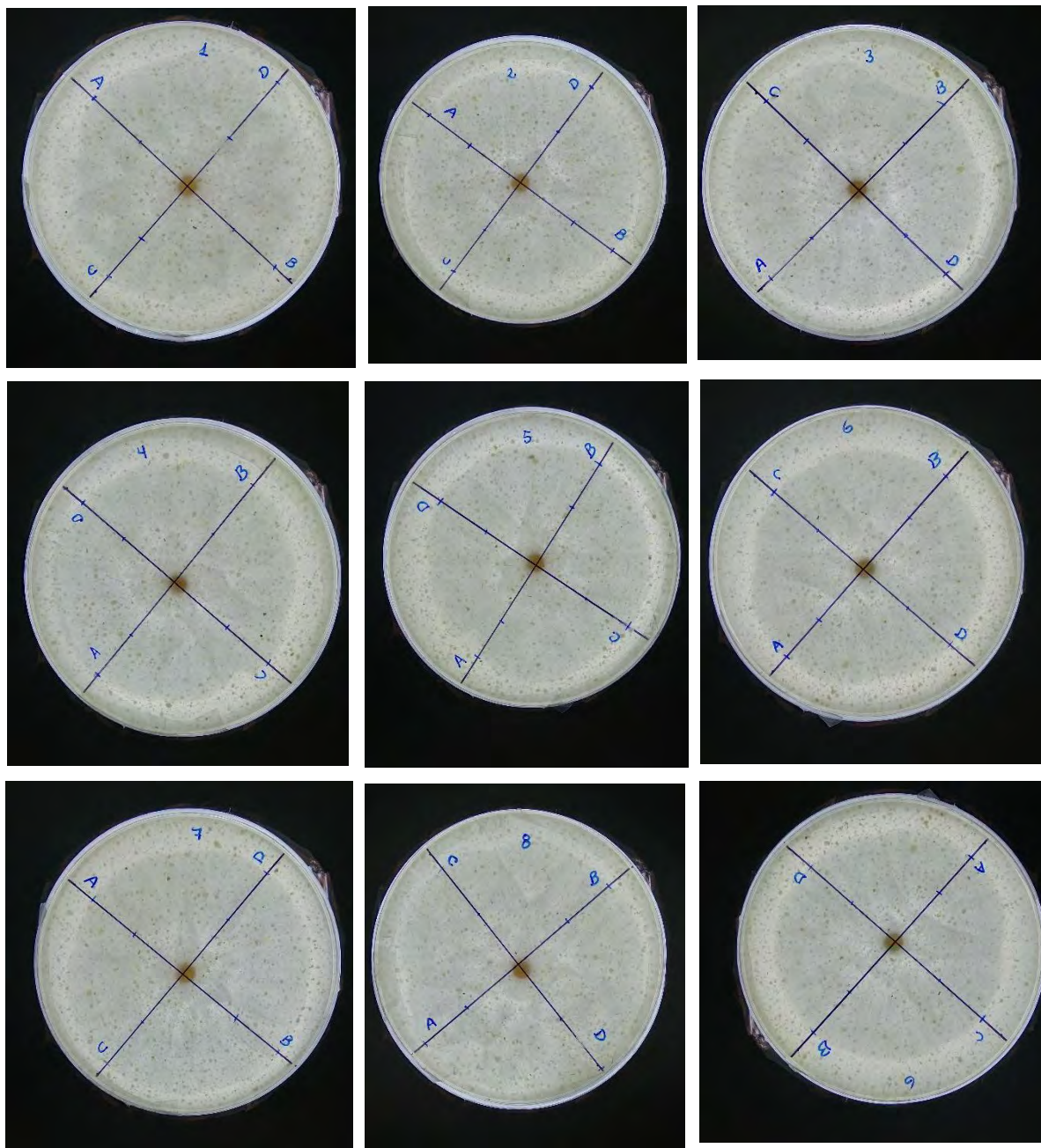




**Figura 28. Placas Petri en evaluación: crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora* a las 48 horas después de la siembra.**

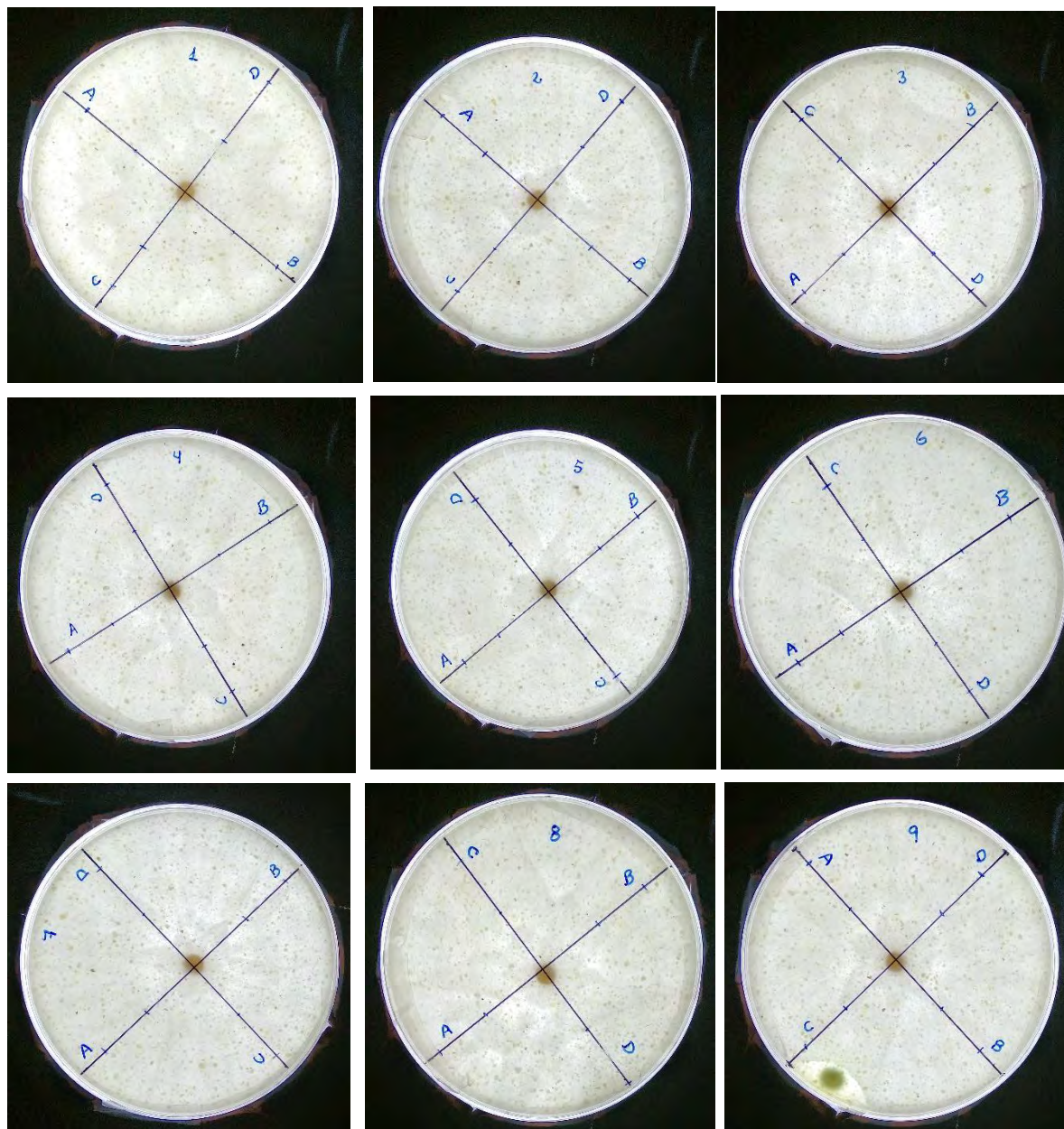


**Figura 29. Placas Petri en evaluación: crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora* a las 96 horas después de la siembra.**

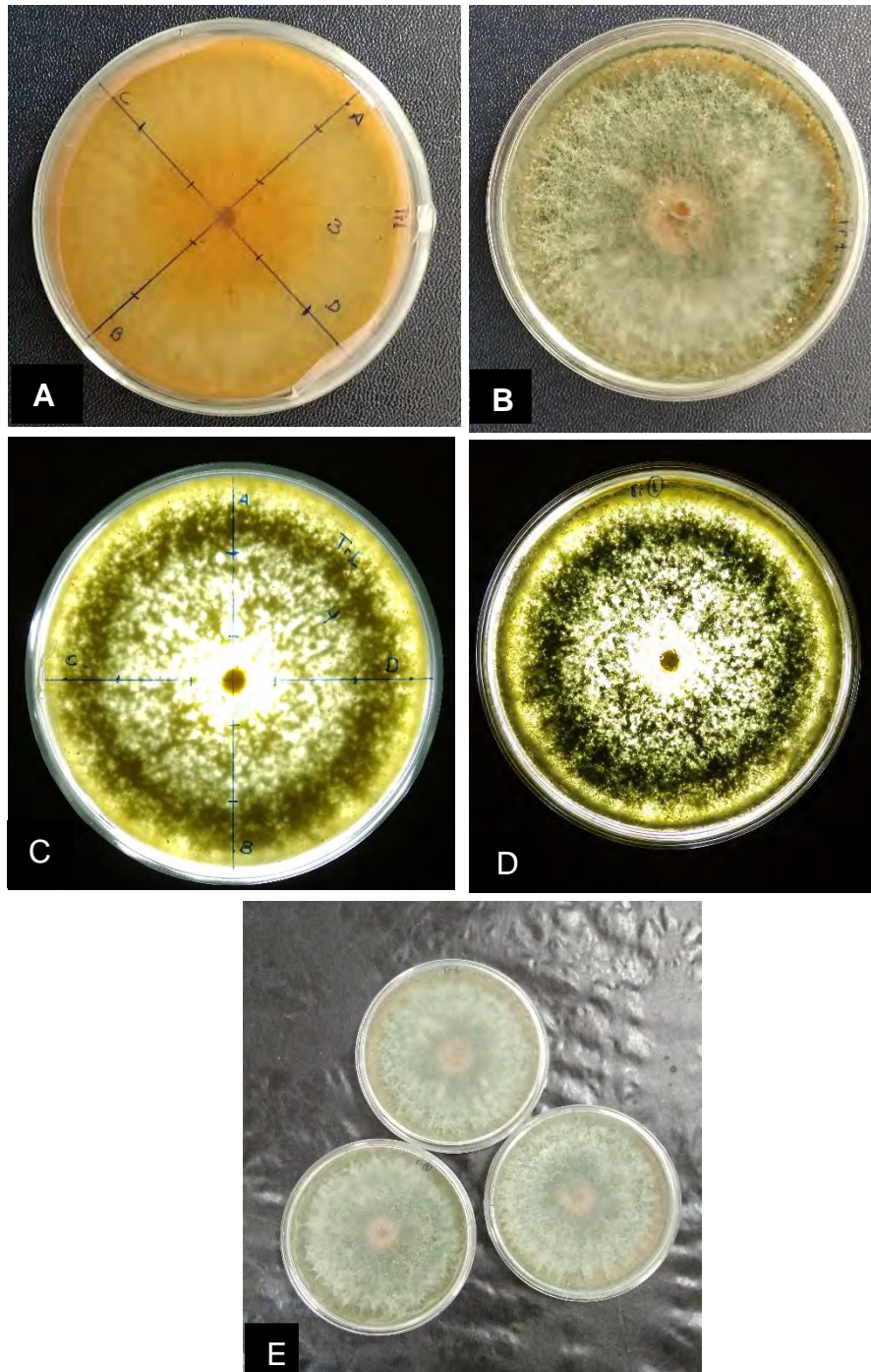




**Figura 30. Placas Petri en evaluación: crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora* a las 120 horas después de la siembra.**



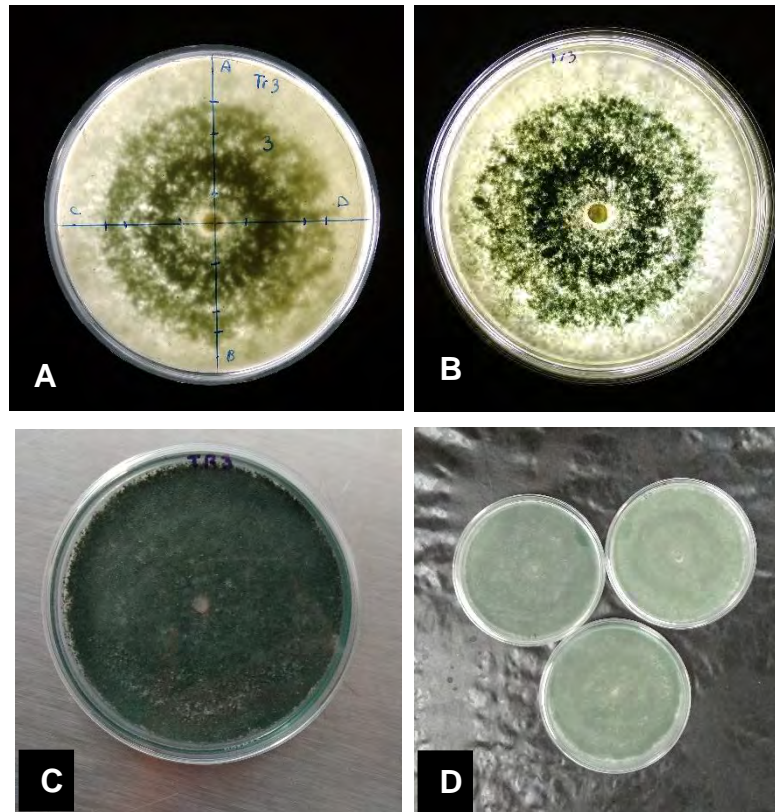
**Figura 31.** *Trichoderma viride* en evaluación.



Nota: A) reverso de la placa petri evaluada. B) anverso de la placa petri. C) reverso de la placa petri evaluada bajo luz. D) anverso de la placa petri evaluada bajo luz. E) *Trichoderma viride* en esporulación o fase de reproducción.

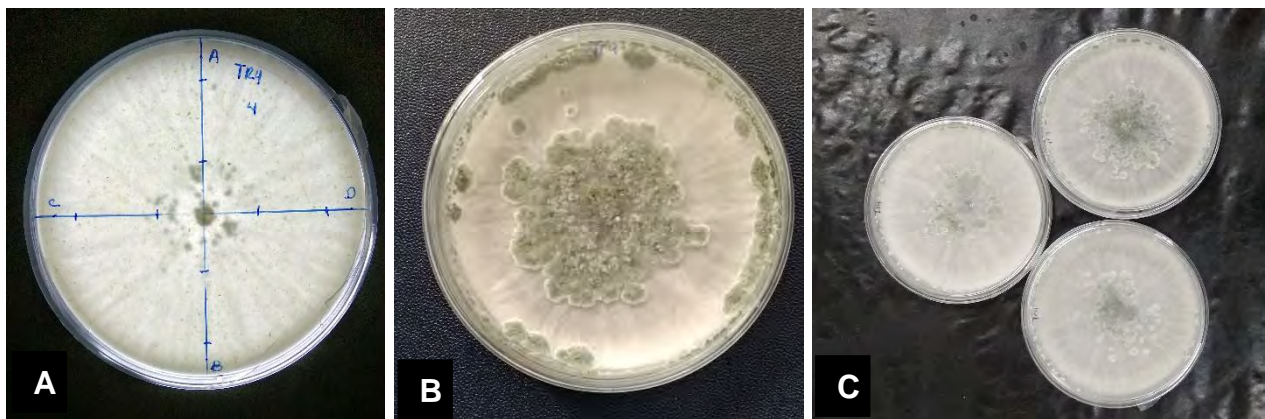


**Figura 32.** *Trichoderma lignorum* en evaluación.



Nota: A) reverso de la placa petri evaluada bajo luz. B) anverso de la placa petri bajo luz. C) y D) *Trichoderma lignorum* en esporulación o fase de reproducción.

**Figura 33.** *Trichoderma harzianum* en evaluación



Nota: A) reverso de la placa petri evaluada bajo luz. B) anverso de la placa petri. C) *Trichoderma harzianum* en esporulación o fase de reproducción

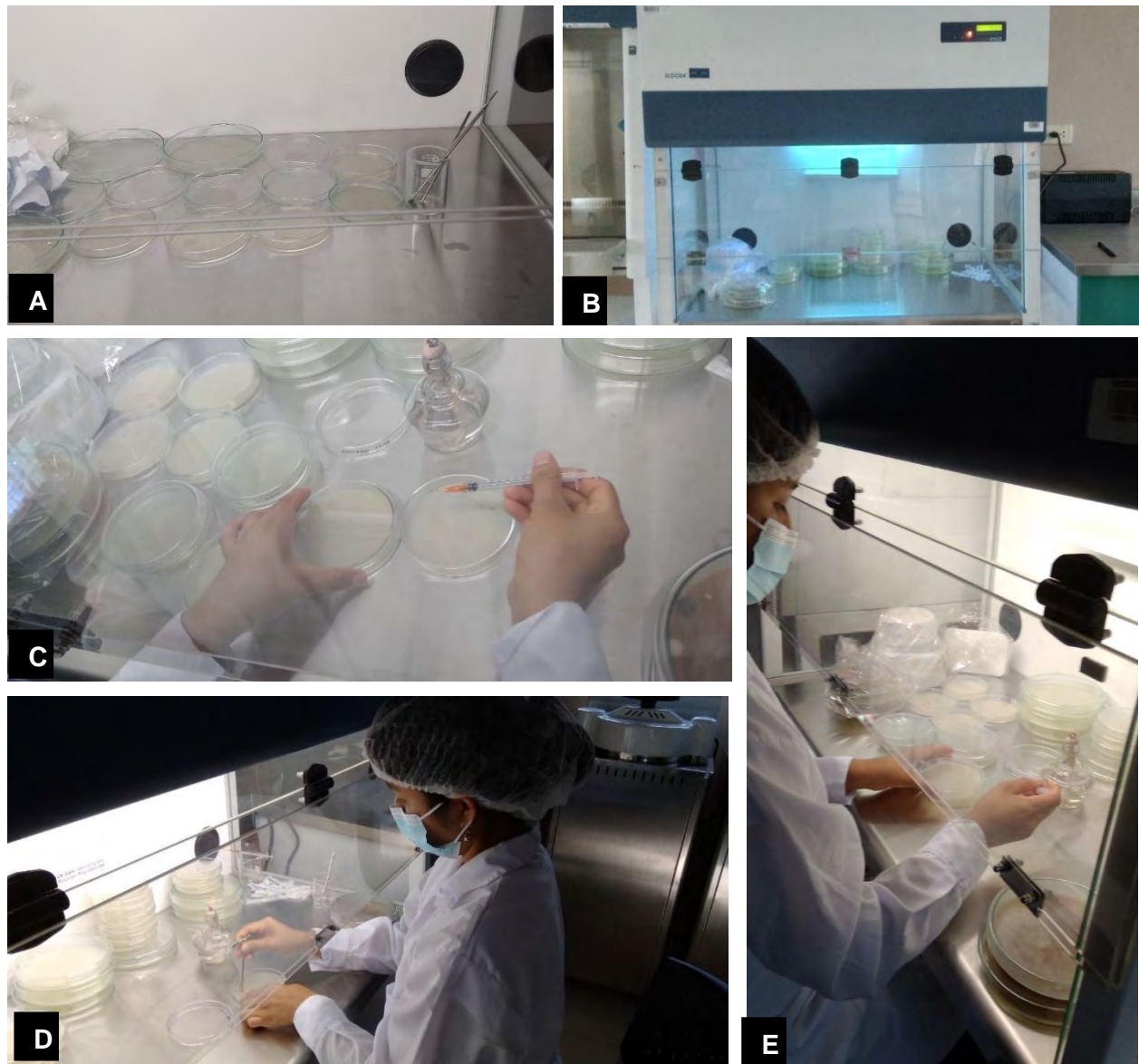
**Figura 34. Acompañamiento del asesor Mg Sc. Luis Justino Lizarraga Valencia durante el desarrollo de la presente investigación en el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba.**



**Figura 35. Acompañamiento de la asesora Ph.D. Fanny Rosario Márquez Romero durante la ejecución de la investigación en el laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba.**



**Figura 36. Procedimientos preliminares a la instalación de un experimento**



Nota: A) Organización de placas Petri y otras herramientas necesarias dentro de la cabina de seguridad previamente esterilizadas. B) Esterilización de la cabina de seguridad por 15 minutos con rayos UV. C), D) y E) Inicio de las actividades dentro de la cabina de seguridad, considerando el buen manejo de las herramientas, insumos y material biológico para una exitosa instalación del experimento.