



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Graduación

Evaluación *in vitro* de hongos nativos antagonistas de
Moniliophthora roreri (Cif. & Par., Evans *et al.*) en
el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.)

AUTORES:

Br. Francisca de los Ángeles Mejía Betancourt
Br. Rommel Ibrahim Alvarado Rodríguez

ASESORES:

Dra. María Carolina Vega Jarquín
Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Managua, Nicaragua
Junio, 2016



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

Trabajo de Graduación

Evaluación *in vitro* de hongos nativos antagonistas de
Moniliophthora roreri (Cif. & Par., Evans *et al.*,) en
el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.)

AUTORES:

Br. Francisca de los Ángeles Mejía Betancourt
Br. Rommel Ibrahim Alvarado Rodríguez

ASESORES:

Dra. María Carolina Vega Jarquín
Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Presentado al honorable tribunal examinador como requisito
parcial para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua
Junio, 2016

Universidad Nacional Agraria

Facultad de Agronomía

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el Honorable Tribunal Examinador, designado por la Decanatura de la Facultad de Agronomía, como requisito parcial para optar al título de

Ingeniero Agrónomo

Ing. MSc. Yanet Gutiérrez Gaitán

Presidente

Ing. MSc. Isabel Chavarría Gaitán

Secretaria

Dr. Víctor Aguilar Bustamante

Vocal

Managua, Nicaragua
7 de junio del año 2016

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1. Ubicación del estudio	4
3.2. Recolección de muestras	4
3.3. Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	5
3.4. Identificación de <i>M. roreri</i>	6
3.5. Aislamiento de hongos antagonistas de <i>M. roreri</i>	7
3.6. Identificación de hongos antagonistas	8
3.7. Pruebas de antagonismo “in vitro”	8
3.7.1. Cultivo dual <i>Trichoderma</i> – <i>Moniliophthora</i>	8
3.7.2. Cultivo dual <i>Paecilomyces</i> – <i>Moniliophthora</i>	9
3.7.3. Cultivo dual <i>Clonostachys</i> – <i>Moniliophthora</i>	9
3.8. Conservación de aislados de hongos	9
3.8.1. Conservación en tarjeta FTA [®]	9
3.8.2. Conservación en capa de glicerol	9
3.8.3. Conservación en medio de cultivo PDA	10
3.8.4. Conservación en disco de papel filtro	10
3.9. Variables evaluadas	10
3.9.1. Variables de crecimiento	10
3.9.1.1. Ritmo de crecimiento radial	10
3.9.1.2. Media de crecimiento radial	11
3.9.1.3. Tasa de crecimiento radial	11
3.9.2. Competencia por espacio y nutrientes	11
3.9.2.1. Tiempo de contacto antagonista-patógeno	11
3.9.2.2. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial	12
3.9.2.3. Competencia por sustrato	12
3.9.3. Micoparasitismo (MICMO)/ Hiperparasitismo	12
3.10. Análisis de datos	12
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1. Aislamiento de <i>M. roreri</i>	14
4.2. Identificación de <i>M. roreri</i>	15
4.2.1. Características macroscópicas de <i>M. roreri</i>	15
4.2.2. Características microscópicas de <i>M. roreri</i>	16

4.3.	Aislamiento de hongos antagonistas	16
4.4.	Identificación preliminar de hongos antagonistas	18
4.5.	VARIABLES DE CRECIMIENTO	18
4.5.1.	Ritmo de crecimiento radial	19
4.5.2.	Media de crecimiento radial	22
4.5.3.	Tasa de crecimiento radial	24
4.6.	Competencia por espacio y nutrientes	25
4.6.1.	Tiempo de contacto antagonista-patógeno	25
4.6.2.	Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR)	26
4.6.3.	Competencia por sustrato	29
4.7.	Micoparasitismo	33
4.8.	Caracterización morfológica de hongos con mayor potencial antagónico de <i>M. roleri</i>	35
4.9.	Conservación de hongos con mayor potencial antagónico	39
V.	CONCLUSIONES	40
VI.	RECOMENDACIONES	41
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
VIII.	ANEXOS	50

DEDICATORIA

A Dios....

A nuestros Padres Omar Alvarado Montoya, Rosa Amanda Rodríguez y Petrona Isabel Betancourt que nos dan todo el apoyo para que alcancemos nuestros sueños y metas.

A nuestros hermanos Cándida Nadiuska Alvarado Rodríguez, Omar Ibrahim Alvarado Rodríguez, Juana Cristina Rivera Betancourt, Flor de María Rivera Betancourt y Luis Alberto Rivera Betancourt.

A nuestros seres queridos Valeria Prudencia Mendoza, María Teresa Gutiérrez Balmaceda, Santos Ismael Betancourt, Gilberto Alvarado Montoya y Lic. MSc. Mauricio Alvarado Sequeira.

A nuestros asesores Dr. María Carolina Vega Jarquín y Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz.

A nuestros amigos que siempre nos animaron a seguir adelante, especialmente a Freddy Alfonso Loáisiga Jarquín, Douglas Danilo Andrades Chavarría, Francis Lorena Vallejos Treminio, Geysel Carolina Espinoza Ruíz, Johnston Zeledón Rodríguez y Jael Cruz.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios nuestro padre celestial que nos bendijo con mucha sabiduría, paciencia y dedicación para terminar nuestro estudio universitario.

Agradecemos a nuestras familias que nos han brindado su apoyo....

A nuestros asesores que dispusieron sus conocimientos y experiencias para conducirnos hacia el desempeño y finalización de nuestra investigación.

Agradecemos de manera especial el apoyo incondicional del MSc. Camilo Beltrán de CORPOICA-Colombia y MSc. Isaías Sánchez Gómez, que nos aportaron conocimiento y recomendaciones en técnicas de laboratorio que nos fueron importantes, mostrándose atentos y dispuestos para la culminación de nuestra investigación.

De igual manera agradecemos al proyecto EDUNABIO, mediante el cual fue posible desarrollar capacidades técnicas en esta área de investigación.

A la DIEP-UNA por el financiamiento de nuestro trabajo de investigación.

A RITTER SPORT por apoyarnos económica y logísticamente para la colecta de muestras en cacaotales de Rancho Grande, Matagalpa.

A los productores de cacao en Rancho Grande que nos facilitaron y apoyaron para la colecta de muestras en sus fincas.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Parámetro cualitativos tipo de esporulación, borde de la colonia, tipo de micelio, presencia de sectores y color de la colonia	6
2. Forma y proporción de las esporas de <i>M. roreri</i>	7
3. Grado de antagonismo de microorganismo biocontroladores respecto a la competencia por sustrato, propuesta por Bell <i>et al.</i> , (1982)	12
4. Características macroscópicas de las colonias de los diferentes aislados de <i>M. roreri</i> en medio de cultivo PDA. UNA, Managua, 2015.	15
5. Forma, longitud y porcentaje de esporas. UNA, Managua, 2015.	16
6. Localidad y procedencia de aislados de hongos antagonistas de <i>M. roreri</i> . UNA, Managua, 2015.	17
7. Tasa de crecimiento radial de once aislados de <i>Trichoderma</i> sp. UNA, Managua, 2015.	24
8. Tasa de crecimiento radial de un aislado de <i>Clonostachys</i> sp. UNA, Managua, 2015.	24
9. Tasa de crecimiento radial de cinco aislados de <i>Paecilomyces</i> sp. UNA, Managua, 2015.	25
10. Tasa de crecimiento radial de un aislado de <i>M. roreri</i> . UNA, Managua, 2015.	25
11. Grado de antagonismo competencia por sustrato de aislados de <i>Trichoderma</i> sp, <i>Paecilomyces</i> sp y <i>Clonostachys</i> sp frente a <i>M. roreri</i> de acuerdo a la escala de Bell <i>et al.</i> , (1982). UNA, Managua, 2015.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Mapa de ubicación de zonas y puntos de muestreo municipio Rancho Grande, Siuna y El Rama	4
2. Técnicas de conservación empleadas en estudio. En discos de papel filtro (a), en medio de cultivo PDA (b), en capa de glicerol (c), en tarjeta FTA [®] (d)	10
3. Medición del crecimiento radial para hongos, adaptado por French y Hebert (1982)	11
4. Colecta de frutos con Moniliasis. Síntomas iniciales con manchas y abultamientos (a), síntomas intermedio mancha generalizada (b), fruto con inicio de esporulación (c), fruto con esporulación completa (d). UNA, Managua, 2015.	14
5. Forma de las esporas de <i>M. roreri</i> . Elípticas (E), subglobosas (S), globosas (G). UNA, Managua, 2015.	16
6. Ritmo de crecimiento radial de once aislados de <i>Trichoderma</i> sp. UNA, Managua, 2015.	19
7. Ritmo de crecimiento radial de cinco aislados de <i>Paecilomyces</i> sp. UNA, Managua, 2015.	20
8. Ritmo de crecimiento radial de <i>Clonostachys</i> sp. UNA, Managua, 2015.	21
9. Ritmo de crecimiento radial de cuatro aislados de <i>Moniliophthora roreri</i> . UNA, Managua, 2015.	21
10. Medias de crecimiento radial acumulado para once aislados de <i>Trichoderma</i> sp, UNA, Managua, 2015.	22
11. Medias de crecimiento radial acumulado para cinco aislados de <i>Paecilomyces</i> sp UNA, Managua, 2015.	23
12. Medias de crecimiento radial acumulado para cuatro aislados de <i>Moniliophthora roreri</i> , Managua, 2015.	23
13. Actividad antagonica ejercida por <i>Trichoderma</i> sp sobre el crecimiento de <i>M. roreri</i> . UNA, Managua, 2015.	26
14. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial de cuatro aislados de <i>M. roreri</i> ejercida por <i>Trichoderma</i> sp. UNA, Managua, 2015.	27
15. Actividad antagonica ejercida por <i>Paecilomyces</i> sp sobre el crecimiento radial de <i>M. roreri</i> , UNA, Managua, 2015	28
16. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de cuatro aislados de <i>M. roreri</i> ejercida por <i>Paecilomyces</i> sp, UNA, Managua, 2015.	28
17. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de cuatro aislados de <i>M. roreri</i> ejercida por <i>Clonostachys</i> sp, UNA, Managua, 2015.	29
18. Grado de antagonismo competencia por sustrato de aislados de <i>Trichoderma</i> sp frente a <i>M. roreri</i> de acuerdo a la escala de Bell <i>et al.</i> , (1982). Enfrentamiento TSMF-MUF-29 12 grado 1 (a), enfrentamiento TERS-MLV grado 2 (b). UNA, Managua, 2015.	31
19. Grado 3 de antagonismo competencia por sustrato de aislados de <i>Paecilomyces</i> sp frente a <i>M. roreri</i> de acuerdo a la escala de Bell <i>et al.</i> ,	

(1982). Enfrentamientos: PaLV-MSM (a), PaSM-MLV (b), PaRe-MUF-29 2 (c), PaER-MLV (d), PaBA-MSM (e), PaBA-MLV (f). UNA, Managua, 2015.	32
20. Grado 3 de antagonismo competencia por sustrato de <i>Clonostachys</i> sp frente a <i>M. roreri</i> de acuerdo a la escala de Bell <i>et al.</i> , (1982). Enfrentamiento Clonost-MUF-29 12 (a), enfrentamiento Clonost-MSM (b), Clonost-MLV (c). UNA, Managua, 2015.	32
21. Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sp sobre <i>M. roreri</i> . Penetración (a y b), enrollamiento hifal (c y d), lisis (e y f). UNA, Managua, 2015.	33
22. Antibiosis mostrada en ensayos duales por aislados de <i>Paecilomyces</i> sp (a, b, c) y <i>Clonostachys</i> sp (d) frente a <i>M. roreri</i> . UNA, Managua, 2015.	34
23. Característica macroscópica y microscópica <i>Clonostachys</i> sp. Colonia de 4 días (a), colonia de 8 días (b), Conidióforo verticilado (c), conidióforo penicilado (d). UNA, Managua, 2015.	35
24. Característica macroscópica y microscópica aislado TRE3. Colonia de 8 días (a), conidióforo y conidio (b). UNA, Managua, 2015.	36
25. Característica macroscópica y microscópica aislado TSMF. Colonia de 8 días (a), conidióforo y conidio (b). UNA, Managua, 2015.	37
26. Característica macroscópica y microscópica aislado TBOS3. Colonia de 8 días (a), conidióforo y conidio (b). UNA, Managua, 2015.	37
27. Característica macroscópica y microscópica aislado TSMS. Colonia de 8 días (a), conidióforo y conidio (b). UNA, Managua, 2015.	38
28. Característica macroscópica y microscópica aislado PaLV. Colonia de 12 días (a), conidióforo y conidio (b). UNA, Managua, 2015.	39

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Zonas cacaoteras y georreferenciación de las fincas en estudio	50
2. Descripción de los tratamientos en cultivo dual antagonistas-patógeno. UNA, Managua, 2015.	50
3. Análisis de la varianza del Crecimiento Radial de <i>Trichoderma</i> sp en mm.hora ⁻¹	50
4. Separación de medias del crecimiento radial medio de aislados de <i>Trichoderma</i> sp en mm.día ⁻¹	51
5. Análisis de la Varianza del Crecimiento Radial de <i>Paecilomyces</i> sp en mm.día ⁻¹	51
6. Separación de medias del crecimiento radial medio de aislados de <i>Paecilomyces</i> sp en mm.día ⁻¹	51
7. Análisis de la Varianza del Crecimiento Radial de <i>Moniliophthora roreri</i> en mm.día ⁻¹	52
8. Separación de medias del crecimiento radial medio de aislados de <i>Moniliophthora roreri</i> en mm.día ⁻¹	52
9. Análisis de Varianza del PICR (<i>Trichoderma</i> - <i>Moniliophthora</i>)	52
10. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilks (modificado) del PICR (<i>Trichoderma</i> - <i>Moniliophthora</i>)	52
11. Prueba gráfica de normalidad con QQ-plot (<i>Trichoderma</i> - <i>Moniliophthora</i>)	53
12. Prueba de homogeneidad mediante un gráfico de dispersión (<i>Trichoderma</i> - <i>Moniliophthora</i>)	53
13. Análisis de Varianza del PICR (<i>Paecilomyces/Clonostachys</i> - <i>Moniliophthora</i>)	54
14. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilks (modificado) del PICR (<i>Paecilomyces/Clonostachys</i> - <i>Moniliophthora</i>)	54
15. Prueba gráfica de normalidad con QQ-plot (<i>Paecilomyces/Clonostachys</i> - <i>Moniliophthora</i>)	54
16. Prueba de homogeneidad mediante un gráfico de dispersión (<i>Paecilomyces/Clonostachys</i> - <i>Moniliophthora</i>)	55
17. Resultado de la prueba de Tukey (P<0.05) de la variable crecimiento radial (mm.h ⁻¹) para los once aislados de <i>Trichoderma</i> sp.	55
18. Resultado de la prueba de Tukey (P<0.05) de la variable crecimiento radial (mm.día ⁻¹) para los cinco aislados de <i>Paecilomyces</i> sp.	56
19. Resultado de la prueba de Tukey (P<0.05) de la variable crecimiento radial (mm.día ⁻¹) para los cinco aislados de <i>Moniliophthora roreri</i>	56
20. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (<i>Moniliophthora</i> * <i>Trichoderma</i>)	56
21. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (<i>Moniliophthora</i> * <i>Paecilomyces/Clonostachys</i>).	57

RESUMEN

El cacao es afectado por una diversidad de microorganismos patógenos, entre ellos el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par., Evans *et al.*) causante de la moniliasis, que es una de las enfermedades de mayor importancia de este cultivo. El uso irracional de plaguicidas sintéticos para el manejo de esta enfermedad ha generado problemas al agroecosistema y la salud humana, por lo que se está demandando el uso de alternativas agroecológicas. En este contexto, el objetivo principal de esta investigación fue generar información acerca de la capacidad antagonista *in vitro* mostrada por hongos nativos contra la moniliasis del cacao. Se recolectaron muestras de suelo, hojas, corteza, frutos sanos y enfermos en tres zonas cacaoteras de Nicaragua para la caracterización morfológica del patógeno y de los potenciales microorganismos antagonistas. Las pruebas de antagonismo “*in vitro*” se realizaron a través de la técnica del cultivo dual. Se evaluó el crecimiento radial del patógeno y de los antagonistas, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del patógeno y la capacidad de control biológico de los hongos antagonistas. Se probaron cuatro técnicas para la conservación de los hongos antagonistas. Se obtuvieron cuatro aislados del patógeno *M. roreri* y 17 aislados de hongos antagonistas. El PICR del patógeno ejercida por aislados del antagonista *Trichoderma* varió de 40.13% a 46.77%, en los aislados del antagonista *Paecilomyces* el PICR osciló entre 59.38% y 67.43%, en el único aislado del antagonista *Clonostachys* el PICR fue de 62.33%-67.22%. Los 17 aislados se ubicaron en las clases 1, 2 y 3 de la escala de valoración de antagonismo. La mejor técnica de conservación de hongos antagonistas y de *M. roreri* fue la de conservación con glicerol. Los resultados de este estudio indican que en el agroecosistema de cacao existen microorganismos nativos que tienen potencial para ser usados como agentes de control biológico del patógeno *M. roreri*.

Palabras claves: moniliasis, control biológico, cultivo dual, técnicas de conservación

ABSTRACT

Cocoa is affected by a variety of pathogens, including *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par., Evans *et al.*,) causal agent of moniliasis, which is one of the most important diseases of this crop. Irrational use of synthetic pesticides for the management of this disease has generated problems in agroecosystems and human health, which is demanding the use of agroecological alternatives. In this context, the main objective of this research was to generate information about the “*in vitro*” antagonistic capacity exhibited by native fungi against cocoa’s moniliasis. Soil samples, leaves, bark, diseased and healthy fruits were collected in three cocoa growing areas of Nicaragua for morphological characterization of the pathogen and its potential antagonistic microorganisms. The “*in vitro*” antagonism tests were performed by dual culture technique. The radial growth of the pathogen and its antagonists, the percent of radial growth inhibition (PRGI) of the pathogen and biocontrol ability of antagonistic fungi was evaluated. Four techniques for the conservation of antagonistic fungi were tested. Four isolates of *M. roreri* and 17 isolates of antagonistic fungi were obtained. The PRGI exerted by the *Trichoderma* antagonistic isolates ranged from 40.13% to 46.77%, the antagonistic isolates of *Paecilomyces* exerted a PRGI ranging from 59.38% to 67.43%, and the unique antagonistic isolate of *Clonostachys* exhibited a PRGI from 62.33% to 67.22%. The 17 antagonistic isolates were placed in classes 1, 2 and 3 of the rating scale of antagonism. The best preservation technique for antagonistic fungi and *M. roreri* was conservation with glycerol. The results of this study indicate that there are native microorganisms that have potential for use as biological control agents of the pathogen *M. roreri* in the cocoa agroecosystem.

Key words: moniliasis, biological control, dual culture, conservation techniques

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es un cultivo prioritario en Nicaragua por su importancia económica, social y ambiental. Para el 2015 las exportaciones alcanzaron 3,839.20 t con un valor FOB de US\$ 6,711,552.70 mostrando una variación de 0.83 % y 0.63 % respectivamente en comparación al 2014 (CETREX, 2016). Este rubro constituye una fuente de ingreso para 10,500 productores con un área destinada aproximada de 11,017 hectáreas (ha) ubicadas en los municipios de Río San Juan, Waslala, Rancho Grande, Tuma-La Dalia, Matiguás, Siuna, Bonanza, Rosita, El Rama, Muelle de los Bueyes, Nueva Guinea y La Cruz de Río Grande. Los rendimientos actuales de 724.48 kg ha⁻¹ indican que la productividad ha venido incrementando debido al mejoramiento de los métodos de producción y al uso de variedades más productivas, con esto se ha avanzado pero se necesita mejorar (MEFCCA, 2013), ya que en el 2010 aún los rendimientos oscilaban entre 181.8 y 318.15 kg ha⁻¹ (MAGFOR, 2010).

Según MAGFOR (2010), las causas de los bajos rendimientos en el cultivo del cacao radica en el mal manejo de las plantaciones, iniciando por las incorrectas distancias de siembra de 4 × 4 m (625 plantas.ha⁻¹), con poco manejo agronómico, poca fertilización, alta incidencia de enfermedades principalmente moniliasis. Los problemas fitosanitarios están entre los factores principales que han favorecido la caída en la producción de cacao y la baja en la calidad del producto final, entre ellos, las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Hebbar, 2007).

El cacao es afectado por una diversidad de microorganismos patógenos, entre ellos la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif. & Par., Evans *et al.*), que representa un serio problema para los productores por ser una de las enfermedades de mayor importancia de este cultivo. Según Miguel *et al.*, (2011) esta enfermedad ataca únicamente a los frutos (mazorcas) en cualquier momento de su crecimiento, su daño principal se produce en los granos, llegando a causar la pérdida de toda la producción. Su ataque es con frecuencia tan severo que se considera que la enfermedad constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de cacao; en Nicaragua hay plantaciones donde se pierde hasta la mitad de la cosecha por esta enfermedad (Ávila *et al.*, 2013).

Por otro lado existe evidencia de que el uso irracional de plaguicidas sintéticos ha generado problemas al agroecosistema y la salud humana (López *et al.*, 2006). Ramírez *et al.*, (2011) mencionan que el uso de fungicidas constituye una limitante para los agricultores por el alto costo y la problemática ambiental que ocasionan, considerando que la exigencia actual tanto nacional como internacional es garantizar la inocuidad de los alimentos, por lo que se está demandando en forma creciente el uso de alternativas agroecológicas o el uso de moléculas menos tóxicas en la producción agrícola.

Todo lo anterior enfatiza la necesidad de realizar investigaciones dirigidas a la búsqueda de métodos alternativos para el control de plagas (López *et al.*, 2006). Adicionalmente, la implementación de un manejo adecuado en los cacaotales es indispensable para contribuir con el incremento de la producción y simultáneamente mantener las condiciones de calidad del agroecosistema.

El sistema de manejo integrado para el control de la moniliasis incluye el control biológico, además de la siembra de material genético de alta productividad con tolerancia a enfermedades, las prácticas culturales y el control químico. El reto es desarrollar estrategias adaptadas a la realidad socioeconómica del productor, efectivas, de fácil aplicación y sostenibles a través del tiempo (CATIE, 2011).

La búsqueda de microorganismos antagonistas para el control biológico de patógenos en cultivos de importancia económica ha despertado especial interés debido a sus potencialidades y a la gravedad de los impactos ecológicos causados por la constante y creciente aplicación de agroquímicos en los agroecosistemas (Acebo *et al.*, 2012). Es momento de profundizar en la investigación sobre la biología y ecología de estos organismos antagonistas y en segundo lugar encontrar mecanismos para mejorar la difusión y adopción de esta tecnología (Salazar *et al.*, 2014).

En Nicaragua el control biológico de plagas fitopatógenas está definitivamente menos desarrollado que el control biológico de plagas insectiles (Salazar *et al.*, 2014). Esta iniciativa surge a partir de la necesidad de encontrar y sistematizar alternativas agroecológicas que contribuyan a superar los principales desafíos que afronta el sector cacaotero del país para reducir los daños ocasionados por la moniliasis.

Por lo tanto, resulta pertinente realizar estudios previos que permitan conocer e identificar agentes de control biológico. Por lo que se realizaron colectas y aislamiento de hongos antagonistas en cacaotales de El Rama, Rancho Grande y Siuna. En este sentido, la propuesta es dar organizadamente el primer paso para el aislamiento, identificación, multiplicación y el enfrentamiento *in vitro* del patógeno *M. roreri* con antagonistas. De esta manera se espera colocar las bases para futuras investigaciones en campo, que conduzcan a la obtención de formulaciones que puedan ser elaboradas y adoptadas por el productor, y que tal como recomiendan Villamil *et al.*, (2015), esta tecnología puede ser utilizada en combinación con otros métodos de control dentro de un programa de manejo integrado de plagas.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Generar información sobre la capacidad antagónica *in vitro* mostrada por hongos nativos contra *Moniliophthora roreri* agente causal de la moniliasis del cacao.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar mediante características morfológicas el hongo *M. roreri* y los aislados de hongos antagonistas provenientes de los sistemas agroforestales con cacao.
- Determinar el potencial de control biológico de hongos antagonistas de *M. roreri* bajo condiciones controladas.
- Seleccionar los mejores aislados de hongos nativos antagonistas que presenten mayor grado de control biológico para su conservación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del estudio

El estudio se realizó durante el mes de junio 2015 a febrero de 2016, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía en la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km 12.5 de la carretera norte en el municipio de Managua, departamento de Managua. Con coordenadas geográficas 12°08'51.24" latitud norte y 86°09'50.66" longitud oeste, a una altitud de 59 msnm.

Las muestras fueron colectadas en tres zonas cacaoteras de Nicaragua: Una finca en Siuna en la Región Autónoma de la Costa Caribe Norte (RACCN), una finca en El Rama en la Región Autónoma de la Costa Caribe Sur (RACCS) y cuatro fincas en Rancho Grande en el departamento de Matagalpa (Anexo 1), ubicadas en localidades distintas con distancias mínimas de 5 km entre sí (Figura 1).

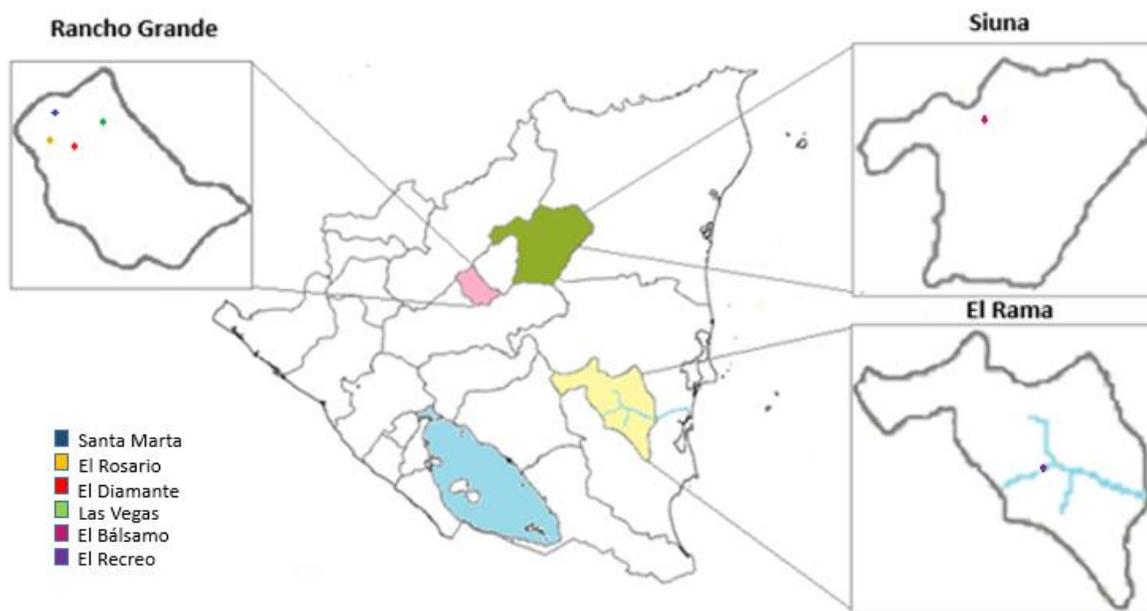


Figura 1. Mapa de ubicación de las zonas y localidades de puntos de muestreos, municipio Rancho Grande, Siuna y El Rama.

3.2. Recolección de muestras

En las cinco fincas de las zonas cacaoteras Rancho Grande y El Rama, se seleccionaron árboles colectando muestras de frutos de cacao con síntomas y signos evidentes de moniliasis. Cada fruto se envolvió en papel toalla y se introdujo por separado en bolsa kraft debidamente marcada e identificada con fecha, lugar, número de muestra y/o número de lote.

Para la obtención de hongos con potencial antagonista se procedió a localizar en cada finca al menos tres árboles visiblemente sanos, a partir de los cuales se obtuvieron muestras de hoja, corteza y fruto sin manifestación de enfermedades ni daños físicos. En el caso de estos últimos, se consideró frutos con al menos 3 meses de desarrollo. Además, se colectaron a una distancia de 1.5 m de la base del tallo 4 muestras de suelo por árbol en puntos equidistantes, a una profundidad entre 15 a 20 cm, retirando previamente la hojarasca.

Cada muestra de tejido vegetal se depositó en bolsa kraft por separado y las muestras de suelo en bolsas de polietileno con la identificación correspondiente a la finca, tipo de muestra, fecha y/o número de lote.

3.3. Aislamiento de *Moniliophthora roreri*

Para el aislado de *M. roreri* se aplicaron tres metodologías.

La primera utilizada por Suárez y Rangel (2014) con algunas modificaciones, la cual consiste en seleccionar frutos con síntomas característicos de la enfermedad y se realizaron cortes de aproximadamente 5×5 mm que incluyera tejido afectado y tejido aparentemente sano. Estos cortes se desinfectaron en etanol al 70% por 30 segundos y posteriormente se pasaron por una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 5 minutos, lavando tres veces en agua destilada estéril por 2 min entre cada desinfección y al final de la misma. Se procedió a secarlos en papel toalla estéril y se colocaron 5 explantes por plato Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), pH 5.5 y suplementado con 800 µL de Sulfato de Gentamicina, incubados a 25 °C durante 12 días en condiciones de laboratorio.

La segunda metodología descrita por González y Roble (2014) con algunas modificaciones, la que consiste en realizar un raspado de frutos esporulados en condiciones de laboratorio, dispersando esporas en medio de cultivo PDA reforzado con una solución de Sulfato de Gentamicina. En el presente estudio se aplicó directamente en campo, seleccionando frutos esporulados ubicados a una altura superior a 1.5 m del suelo, mostrando micelio con una coloración uniforme y con aspecto seco. Procediendo a dispersar esporas con ayuda de un pincel estéril, realizando de esta manera la siembra en platos Petri con medio de cultivo PDA, pH 5.5 y suplementado con Cicloheximida 3% y Cloranfenicol 3%, incubándose a 25°C durante 12 días en condiciones de laboratorio.

La tercera metodología aplicada por Villamil *et al.*, (2012) con mínimas modificaciones. Utilizando una aguja previamente esterilizada, se tomó micelio de la mazorca completamente esporulada en condiciones de laboratorio y se sembró en cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA, con un pH 5.5 y suplementado con 800 µL de Sulfato de Gentamicina, incubados a 25 °C durante 12 días en condiciones de laboratorio.

3.4. Identificación de *M. roreri*

La identificación se realizó utilizando la clave taxonómica de Barnett y Hunter (1999) y se dispuso a evaluar características macroscópicas descritas por Phillips *et al.*, (2006) como color de la colonia, borde de la colonia, tipo de micelio (textura), presencia o ausencia de sectores, tipo de esporulación (Cuadro 1). Estos parámetros se determinaron visualmente a los 13 días.

Cuadro 1. Parámetros cualitativos tipo de esporulación, borde de la colonia, tipo de micelio (textura), presencia de sectores y color de la colonia según Phillips *et al.*, (2006).

Parámetro	Categoría
Tipo de esporulación	Uniforme
	Anillos en toda la colonia
	Uniforme con anillos terminales
	Uniforme con anillos centrales
	Disperso
Borde de la colonia	Entero
	Ondulado
	Plumoso
Textura de la colonia	Afelpada
	Polvosa
	Estriada
	Algodonosa
	Aterciopelada
Sectores	Presencia
	Ausencia
Color	Café claro
	Café claro-blanco
	Café oscuro- café claro-blanco
	Crema-café oscuro-café claro-blanco
	Café oscuro-blanco
	Café oscuro-crema-blanco
Crema-café claro-blanco	

Con las esporas de formas globosas, subglobosas y elípticas descrito por Evans *et al.*, (1978), se determinaron como características microscópicas los parámetros longitud y porcentaje de esporas a los 10 días comparando resultados con estudios realizados por González y Roble (2014) y Arbeláez (2010) (Cuadro 2). Se preparó una suspensión de esporas por aislado, depositando 1 ml sobre un porta objeto, adicionando una gota de azul de lactofenol 25% y con ayuda del microscopio óptico (Carl Zeiss) con adaptación de un ocular micrométrico se

procedió a medir el largo de las esporas. Para cada preparado se realizaron 5 puntos de observación distribuidas en patrón de X, midiendo en cada punto 10 esporas al azar, para un total de 50 esporas.

El porcentaje de dichas esporas se realizó sobre las mismas 50 esporas observadas por aislado teniendo en cuenta la cantidad de esporas con determinada forma respecto a las demás.

Cuadro 2. Forma, longitud y porcentaje de esporas de *M. roreri*.

Forma	Longitud (μm)¹	Porcentaje²
Globosa	4-5	64.57
Subglobosa	7-8	
Elíptica	9-11	34.19

¹González y Roble (2014); ²Arbelaez (2010)

3.5. Aislamiento de hongos antagonistas de *M. roreri*

Se siguió la metodología de Arnold *et al.*, (2000) con algunas modificaciones, para la obtención de explantes de tejido vegetal de hoja, corteza y fruto.

De las muestras de corteza se realizaron cortes de 5×5 mm del parénquima del cilindro vascular. En las muestras de tejido foliar se realizaron cortes de 5×5 mm en el pecíolo, así como en la parte basal, media y apical con porción de nervadura central y lámina foliar. Para las muestras de frutos se retiró el epicarpio y se realizaron cortes de 5×5 mm de la parte apical, basal y media del fruto.

Obtenidos los explantes de cada tejido, se procedió a realizar la desinfección tratándolos por separado, iniciando con Etanol al 70 % durante 30 segundos e Hipoclorito de Sodio al 2% durante 5 minutos, enjuagando con agua destilada estéril de dos a tres veces al final de cada desinfección.

Los explantes se secaron en papel toalla estéril en cabina de flujo laminar. La siembra de los mismos se realizó colocando cinco explantes por plato Petri conteniendo PDA suplementado con 800 μL de Sulfato de Gentamicina e incubados a temperatura ambiente por 5 días.

Con las muestras de suelo obtenidas se siguió la metodología descrita por Suárez y Rangel (2014) con algunas modificaciones. Se pesó 10 g de suelo y se disolvió en 90 mL de agua destilada estéril, realizando diluciones seriadas hasta 10^{-4} . Depositando 100 μL de la dilución 10^{-3} y 10^{-4} , dispersando la alícuota con ayuda de un asa de Drigalsky sobre la superficie de medio de cultivo PDA, suplementado con 800 μL de Sulfato de Gentamicina, pH 5.5 y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días.

3.6. Identificación de hongos antagonistas

Un parámetro importante para seleccionar los hongos como posibles antagonistas de *M. royeri* fueron estudios realizados por diversos autores como Krauss y Soberanis (2003), CORPOICA (2006), Suárez y Cabrales (2008), Suarez y Rangel (2014), Jaimes *et al.*, (2008), Bailey *et al.*, (2008) y Villamil *et al.*, (2012) quienes demostraron en condiciones *in vitro* el gran potencial antagonístico de hongos pertenecientes a los géneros *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Lecanicillium*, y *Paecilomyces* para el control de *M. royeri*, de igual manera Krauss *et al.*, (2003), Ten *et al.*, (2003) y Mejía *et al.*, (2008) trabajaron con el género *Clonostachys*.

Se seleccionaron las colonias de hongos como posible antagonistas e identificaron según características morfológicas macroscópicas y microscópicas, utilizando improntas teñidas con azul de lactofenol 25 %, observadas bajo microscopio óptico con aumento de 40X, cotejando las características con claves taxonómicas especializadas de Barnett y Hunter (1999), Domsch, Gams y Anderson (1980) y Schroers *et al.*, (1999).

3.7. Pruebas de antagonismo “in vitro”

Se utilizó la técnica de enfrentamiento dual Meza *et al.*, (2008) y Howell (2003) con algunas modificaciones. Los tratamientos resultaron de la combinación de los aislados de hongos antagonistas y el fitopatógeno *M. royeri* (Anexo 2), con testigos absolutos para cada uno, utilizando un diseño completo al azar (DCA) con 6 réplicas para cada tratamiento.

La unidad experimental consistió en una caja Petri de 90 mm de diámetro, ajustado a pH 5.5 e incubados a 25 ± 1 °C, con períodos alternos de 12 horas luz y 12 oscuridad.

El modelo aditivo lineal del ensayo fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde,

Y_{ij} : es la variable de respuesta

i : representa al i -ésimo tratamiento

j : representa a la j -ésima repetición

μ : media general

τ_i : es el efecto de tratamiento

ε_{ij} : error experimental

3.7.1. Cultivo dual *Trichoderma* sp - *M. royeri*

En este enfrentamiento se usó un arreglo factorial $11 \times 4 + 1$ (11 aislados de *Trichoderma*, cuatro aislados de *M. royeri* y un testigo). Para cada interacción antagonista-patógeno se dispuso en un extremo del plato Petri un disco de 5 mm de diámetro con inóculo de

Trichoderma y en el extremo opuesto otro disco de 5 mm con inóculo de *M. roreri*, a una distancia de 6 cm entre ambos. Para ello, se le dio al hongo fitopatígeno ventaja competitiva de 6 días debido a que su dinámica de crecimiento es lento, tal como reporta Villamil *et al.*, (2012). La duración del ensayo fue de 21 días.

3.7.2. Cultivo dual *Paecilomyces* sp - *M. roreri*

En este enfrentamiento se usó un arreglo factorial $5 \times 4 + 1$ (5 aislados de *Paecilomyces*, cuatro aislados de *M. roreri* y un testigo). Para cada interacción antagonista-patógeno se dispuso en un extremo del plato Petri un disco de 5 mm de diámetro con inóculo de *Paecilomyces* y en el extremo opuesto otro disco de 5 mm con inóculo de *M. roreri*, a una distancia de 4 cm entre ambos debido a la dinámica de crecimiento lento del antagonista. La siembra se realizó al mismo tiempo, llevando las mediciones del ensayo hasta los 9 días.

3.7.3. Cultivo dual *Clonostachys* sp - *M. roreri*

En este enfrentamiento se usó un arreglo unifactorial (1 aislado de *Clonostachys*, cuatro aislados de *M. roreri* y un testigo). Para cada interacción antagonista-patógeno se dispuso en un extremo del plato Petri un disco de 5 mm de diámetro con inóculo de *Clonostachys* y en el extremo opuesto otro disco de 5 mm con inóculo de *M. roreri* a una distancia de 4 cm y sembrados al mismo tiempo por la dinámica de crecimiento de ambos. Las mediciones del ensayo se llevaron hasta los 9 días.

3.8. Conservación de aislados de hongos

Siguiendo lo descrito anteriormente, se realizaron cuatro técnicas de conservación de los mejores hongos con potencial antagónico y las cuatro cepas de *M. roreri* (Figura 2), que se describen a continuación:

3.8.1. Conservación en tarjeta FTA[®]

Se siguió la metodología utilizada por Solarte *et al.*, (2009) con algunas modificaciones, la cual consiste en embeber con suspensión de esporas del hongo sobre el disco Whatman[™] de 25 mm que contiene la micro tarjeta FTA[®] con dimensión de 3.8×3.8 cm. Se dejó secar en cabina de flujo laminar, sellando con cinta Parafilm y se depositó en viales con rosca a 5 °C.

3.8.2. Conservación en capa de Glicerol

Se siguió la metodología utilizada por Panizo *et al.*, (2005) con algunas modificaciones, la cual consiste en sembrar trozos de cultivos de hongos desarrollados en tubos que contienen PDA, cubriendo con una capa de 5 mm de espesor con glicerol estéril y se incubó a 5 °C.

3.8.3. Conservación en medio de cultivo

Esta es una técnica de conservación a corto plazo que consistió en dejar crecer el hongo en medio de cultivo PDA y se incubó a 25 °C.

3.8.4. Conservación en discos de papel filtro

Se hicieron círculos de 5 mm de diámetro de papel filtro Whatman® #41 y se dispusieron radialmente dentro de platos Petri alrededor del inóculo de hongo en crecimiento activo, e incubados a 25°C con períodos alternos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Cuando los hongos esporularon sobre el papel filtro, se retiraron con pinzas estéril y se colocaron en platos Petri estériles rotulados por aislado, colocados en horno a 25°C de 2 a 3 días con el fin que los discos fueran perdiendo la humedad. Transcurrido este período, los discos se colocaron en viales estériles y se almacenaron a 5 °C.

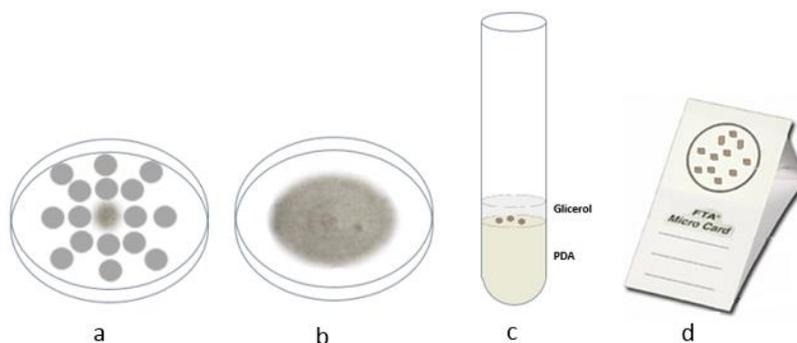


Figura 2. Técnicas de conservación empleadas en estudio. En discos de papel filtro (a), en medio de cultivo PDA (b), en capa de glicerol (c), en micro tarjeta FTA® (d).

3.9. Variables evaluadas

3.9.1. Variables de crecimiento

Estas variables fueron medidas simultáneamente en las pruebas de antagonismo *in vitro*.

3.9.1.1. Ritmo de Crecimiento Radial

Es el incremento radial promedio de la colonia del patógeno y antagonista expresado en mm.día⁻¹, a través de la metodología propuesta por French y Hebert (1982) con algunas modificaciones (Figura 3), marcando en el reverso de un plato Petri cuatro radios equidistantes a partir del centro, enumerando cada radio a favor de las manecillas del reloj y para cada replica se le asignó una letra.

Se dispuso un disco de 5 mm de diámetro con inóculo en el centro del plato Petri conteniendo medio de cultivo PDA y se incubó bajo las mismas condiciones de estudio, marcando y registrando el avance promedio diario hasta que la colonia llenara completamente el plato.

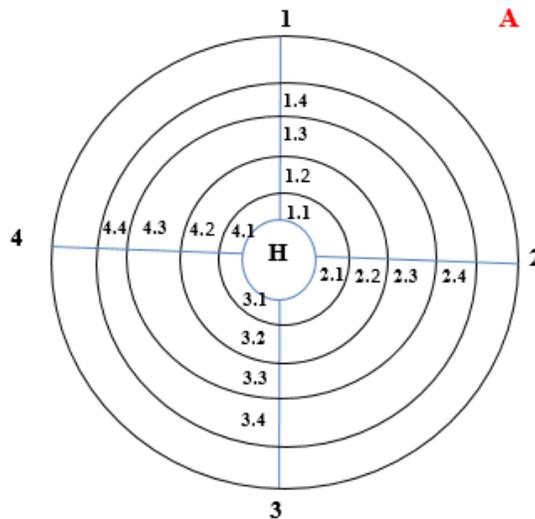


Figura 3. Medición del crecimiento radial para hongos, adaptado de French y Hebert (1982).

3.9.1.2. Media de Crecimiento Radial

Es el promedio del crecimiento radial acumulado de la colonia del hongo antagonístico o patógeno expresado en mm, procedente de un inóculo de 5 mm de diámetro.

3.9.1.3. Tasa de crecimiento radial

Es el valor promedio de crecimiento radial del patógeno y antagonista que aumenta cada día, expresado en mm.día^{-1} . Se calcula mediante la fórmula propuesta por Guigón *et al.*, (2010):

$$\text{TC} = (\text{Crecimiento radial final} - \text{Crecimiento radial inicial}) / \text{tiempo de incubación}$$

3.9.2. Competencia por espacio y nutrientes

3.9.2.1. Tiempo de Contacto Antagonista-Patógeno

Es el lapso de tiempo (número de días) en el cual la colonia del hongo antagonista y el hongo patógeno entran en contacto (Calvo *et al.*, 2012).

3.9.2.2. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial

Es la inhibición del crecimiento del patógeno por efecto del antagonista expresada en porcentaje. Se calcula por medio de la fórmula de Samaniego *et al.*, (1989):

$$\text{PICR} = (R1 - R2)/R1 \times 100$$

Donde,

PICR: Es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial

R1: Es el radio del patógeno testigo

R2: Es el radio del patógeno en enfrentamiento

3.9.2.3. Competencia por sustrato

De acuerdo a la escala de Bell *et al.*, (1982), es el espacio que ocupa en el sustrato el hongo antagonista y/o patógeno en enfrentamiento dual, incluyendo el medio de cultivo y la colonia del hongo adversario (Cuadro 3).

Cuadro 3. Grado de antagonismo de agentes de control biológico respecto a la competencia por sustrato, propuesta por Bell *et al.*, (1982).

Grado antagonico	Capacidad antagonica (antagonista-patógeno)
1	Antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno
2	Antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
3	Antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro
4	Patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando dos terceras partes de la caja Petri
5	Patógeno llega a cubrir totalmente el plato Petri

3.9.3. Micoparasitismo (MICMO) /Hiperparasitismo

Consiste en realizar observaciones microscópicas de los cultivos duales usando un microscopio binocular (Carl Zeiss) con aumento 40X, para observar las interacciones hifales entre los antagonistas con el patógeno, ya sea por enrollamiento, penetración, lisis y vacuolización, descrito por Wells (1986) y Chet (1987), citado por Bernal *et al.*, (2007).

3.10. Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo de la morfología de las colonias tanto del patógeno como de los hongos antagonistas. Para el patógeno *M. roreri* se realizó una medición de largo y

ancho en 50 esporas de cada aislado y se determinó la proporción de esporas con forma globosa, subglobosa y elíptica.

Para el crecimiento radial del patógeno y de los antagonistas se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) con medidas repetidas y se realizó la pruebas de separación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

En el caso del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del patógeno, la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas fueron verificadas mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado y la prueba de Levene respectivamente. Se realizó un ANDEVA y se comparó la diferencia de medias por la pruebas de Tukey ($\alpha=0.05$).

Con los datos del grado de antagonismo ejercido por los diferentes aislados de antagonistas, se elaboró una cuadro para clasificarlos de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, (1982). Asimismo, se graficó el porcentaje de aislados de los antagonistas que se ubicaban en cada una de las clases de la escala de Bell *et al.*, (1982).

Todos los análisis se realizaron con la ayuda del programa Excel para la creación de las bases de datos y del paquete estadístico Infostat (2008) para el análisis estadístico de los datos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento del patógeno *Moniliophthora roreri*

Fueron colectados 10 frutos con síntomas y signos visibles de la enfermedad para cada una de las fincas pertenecientes a los municipios de El Rama, Rancho Grande y Siuna, con un total de 54 frutos esporulados y 6 frutos con síntomas iniciales de la enfermedad.



Figura 4. Colecta de frutos con Moniliasis. Síntomas iniciales con manchas y abultamiento (a), síntomas intermedios mancha generalizada (b), fruto con inicio de esporulación (c), fruto con esporulación completa (d). UNA, Managua, 2015.

De las seis fincas muestreadas se lograron obtener un total de 12 aislados del patógeno *M. roreri*, siendo cinco de estos obtenidos a partir de la metodología descrita por Villamil *et al.*, (2012), cuatro a partir de la metodología González y Roble (2014) y tres aislados aplicando la metodología descrita por Suárez y Rangel (2014).

Al aplicar las tres metodologías de aislamiento mencionadas anteriormente, se comprobó que es posible aislar el patógeno *M. roreri* a partir de frutos esporulados y con síntomas iniciales.

Es importante resaltar que mediante las modificaciones efectuadas a la metodología descrita por González y Roble (2014), se logró disminuir notablemente la presencia de flora acompañante permitiendo el crecimiento de colonias con características macro y microscópicas propias del patógeno, características que según estos autores no les fue posible observar por la alta contaminación.

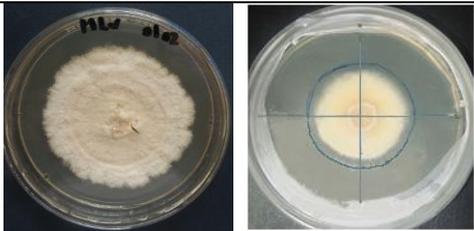
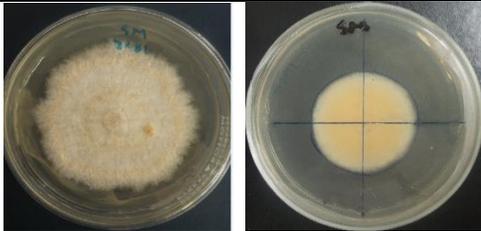
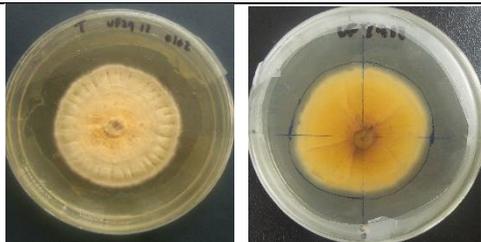
El aislamiento de *M. roreri* resultó difícil debido al crecimiento de flora acompañante, aun cuando el fruto de cacao presentó signos y síntomas de moniliasis, entre los cuales se encuentran *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp, *Geotrichum* sp y *Penicillium* sp, *Curvularia* sp, *Colletotrichum* sp, *Rhizopus* sp, *Phytophthora* sp, y *Pestalotia* sp.

4.2. Identificación del patógeno *Moniliophthora roreri*

4.2.1. Características macroscópicas de *M. roreri*

Los 12 aislados obtenidos se agruparon en 4 cepas, considerando parámetros de crecimiento, borde, textura y esporulación, los cuales crecieron en medio de cultivo PDA con períodos alternos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad a 25°C (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características macroscópicas de las colonias de aislados de *M. roreri* en medio de cultivo PDA. UNA, Managua, 2015.

Código de la cepa	Imagen de la colonia	Características
MLV <i>(Moniliophthora, Las Vegas)</i>		La colonia presentó coloración crema - café claro - blanco, esporulación uniforme en toda la colonia, borde entero, textura afelpada y con ausencia de sectores.
MSM <i>(Moniliophthora, Santa Martha)</i>		La colonia presentó coloración crema - café claro - blanco, esporulación con anillos en toda la colonia, borde plumoso, textura aterciopelada y con presencia de sectores.
MUF 29-12 <i>(Moniliophthora, Clon UF-29 fruto 12)</i>		La colonia presentó coloración crema - café oscuro - café claro - blanco, esporulación con anillos terminales, borde entero, textura estriada y con ausencia de sectores.
MUF 29-2 <i>(Moniliophthora, Clon UF-29 fruto 2)</i>		La colonia presentó coloración café oscuro - café claro - blanco, esporulación con anillo central, borde entero, textura algodonosa y con ausencia de sectores.

Evans *et al.*, (1978), clasifica a *M roreri* como única especie dentro del género *Moniliophthora*.

Castaño (1952) y Campuzano (1976), citado por Phillips (2003), observaron que colonias de este patógeno mostraban áreas de crecimiento concéntrico de diferentes colores y esporulación en el centro de la colonia. Estudio que es corroborado por Phillips (2003), quien menciona que *M. roreri* es capaz de exhibir variabilidad fenotípica en condiciones *in vitro* encontrando diferencias morfofisiológicas, siendo atribuido a posibles adaptaciones del hongo para crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, diversas altitudes y diversas zonas de aislado. Esto permite justificar las variantes en cuanto a las características macroscópicas mostradas por los 4 grupos de aislados encontrados para el presente estudio.

4.2.2. Características microscópicas de *M. roreri*

Las 4 cepas de *M. roreri* presentaron esporas hialinas de forma globosas, subglobosas y elípticas (Figura 5), hifas tabicadas tal como reporta Evans *et al.*, (1978).

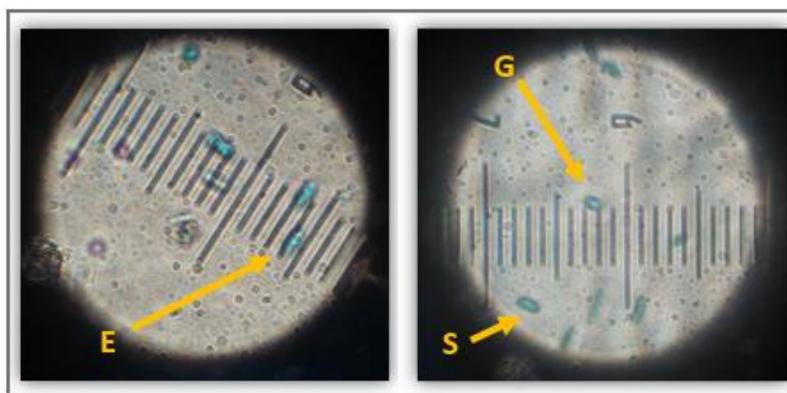


Figura 5. Forma de las esporas de *M. roreri*. Elípticas (E), Subglobosas (S), Globosas (G). UNA, Managua, 2015.

El porcentaje y longitud de las esporas globosas, subglobosas y elípticas (Cuadro 6) fueron similar a resultados obtenidos por Arbeláez (2010) y González y Roble (2014) respectivamente.

Cuadro 5. Forma, longitud y porcentaje de esporas de *M. roreri*. UNA, Managua, 2015.

Forma	Longitud (µm)	%
Globosa	4.91	68
Subglobosa	7.79	16
Elíptica	10.37	16

4.3. Aislamiento de hongos antagonistas de *M. roreri*

A partir de las muestras de suelo se obtuvieron 4 aislados de *Trichoderma* sp y 5 aislados de *Paecilomyces* sp, A partir de muestras de fruto sano se lograron obtener 5 aislados de *Trichoderma* sp y un aislado de *Clonostachys* sp. De las muestras de corteza sanas se

obtuvieron 2 aislados de *Trichoderma sp.*, (Cuadro 6) y a partir de hojas se obtuvieron bacterias sin identificar, por no estar contempladas en este estudio. Estos aislados se sembraron en medio de cultivo PDA en condiciones 12 horas luz y 12 horas oscuridad, incubados a 25 °C.

Cuadro 6. Localidad y procedencia de aislados de hongos antagonistas de *M. roreri*. UNA, Managua, 2015.

Género	Código	Localidad	Procedencia
<i>Trichoderma</i>	TLVC	Las Vegas	Corteza
	TLVS	Las Vegas	Suelo
	TERC	El Rosario	Corteza
	TERS	El Rosario	Suelo
	TSMF	Santa Marta	Fruto
	TSMS	Santa Marta	Suelo
	TRE3	El Recreo	Fruto
	TRE6	El Recreo	Fruto
	TRE9	El Recreo	Fruto
	TBA2	Buenos Aires	Suelo
TBOS3	Bosawás	Fruto	
<i>Paecilomyces</i>	PaRe	El Recreo	Suelo
	PaBA	Buenos Aires	Suelo
	PaER	El Rosario	Suelo
	PaLV	Las Vegas	Suelo
	PaSM	Santa Marta	Suelo
<i>Clonostachys</i>	Clonost	El Recreo	Fruto

Estos hongos han sido estudiados por Suárez y Rangel (2014), Villamil *et al.*, (2012) y Arnold *et al.*, (2000), en condiciones *in vitro* por su capacidad antagonica ante *M. roreri* y otros patógenos.

Alexander (1977), indica que en los suelos bajo el cultivo de cacao y bosques maderables existe una diversidad de hongos de suelo, debido a que en estos agro sistemas se encuentran capas de residuos orgánicos en descomposición, resultantes de la caída de la fitomasa de los árboles maderables nativos e introducidos que generalmente se utilizan para el sombrío permanente. *Trichoderma* suele encontrarse en madera en descomposición y en casi todo tipo de suelo (Benítez *et al.*, 2004; Druzhinina y Kubicek, 2005).

Por otra parte, Gutiérrez *et al.*, (2009) y Mejía *et al.*, (2008) mencionan que se encuentran hongos endófitos asociados al cultivo de cacao proveniente de hojas, frutos, ramas y troncos.

Muchos trabajos han demostrado que cepas de *C. rosea* son capaces de establecerse de forma epifita o endófitas asociados a raíces, tallos, hojas, frutos y semillas de plantas (Ten *et al.*, 2003; Morandi *et al.*, 2000; Schroers, 2001; Sutton *et al.*, 1997; Mejía *et al.*, 2008). Además, Samuels *et al.*, (2006) y Mejía *et al.*, (2008), reportaron la presencia de especies de *Trichoderma* creciendo endofíticamente en *T. cacao*.

Durante el aislamiento de los hongos antagonistas, también se evidenció la presencia de una gran diversidad de hongos y bacterias contaminantes, destacándose hongos como *Colletotrichum* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Rizhopus* sp, *Fusarium* sp, bacterias no identificadas y el Oomycete *Phytophthora* sp.

4.4. Identificación de hongos antagonistas de *M. roreri*

En general se encontraron 11 aislados pertenecientes al género *Trichoderma*, los cuales presentaron crecimiento inicial con colonias algodonosas de color blanco, que se tornó de verde pálido a verde oscuro, borde entero en su mayoría y color pálido a amarillento en el reverso del plato. Microscópicamente se observan hifas hialinas, septadas, ramificadas de las cuales se desarrollan conidióforos ramificados piramidales; fiálides en forma de botella, con conidios verdes a hialinas de forma redonda u ovoide lo que coincide con las claves Barnett y Hunter (1999) y descripciones de estudio realizado por Druzhinina *et al.*, (2006) y Samuels (2006).

Del género *Paecilomyces* se obtuvieron 5 aislados que cubrieron el plato Petri de 18 a 20 días después de la inoculación bajo las mismas condiciones antes descritas, los cuales presentaron colonia de color rosáceo a lila, con textura polvorienta a algodonosa, caracterizados por presentar conidióforos con ramas divergentes, conidios hialino, ovoide y dispuestos en forma de cadenas que corresponden a las claves Barnett y Hunter (1999), Domsch, Gams y Anderson (1980).

Del género *Clonostachys* se obtuvo un aislado partir de muestras de fruto. Este aislado cubrió totalmente el plato Petri en 10 días, con una colonia de aspecto amarillento a rosáceo. Microscópicamente se observa dimorfismo de conidióforos, uno de tipo verticilado con fiálides divergentes cilíndricas y otro de tipo penicilado con fiálides largas semi compactas, con masas de conidios hialinos, según clave de Schroers *et al.*, (1999) y descripciones en estudio realizado por Sutton *et al.*, (1997).

4.5. Variables de crecimiento

La velocidad de crecimiento es un carácter ventajoso en la disputa por colonizar el área, compitiendo por espacio y nutrientes; ésta es una manera de ejercer control biológico, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio del patógeno (Dennis y Webster, 1971).

4.5.1. Ritmo de crecimiento radial

La cinética de crecimiento radial acumulado para once aislados de *Trichoderma* sp mostró un comportamiento casi lineal con tres tendencias en el tiempo respecto al llenado del plato Petri de 45 mm de radio, con la formación de tres grupos de crecimiento, siendo el grupo 1 el mejor, donde se destacan los aislados TSMS, TRE3 y TRE6 llenando plato a las 48 horas, por otro lado, el grupo 2 conformado por los aislados TLVS, TBA2, TERC, TSMF y TRE9 llenaron plato a las 60 horas. Los aislados TBOS3, TERS y TLVC corresponden al grupo 3, quienes mostraron crecimiento lento al llenar plato a las 72 horas (Figura 6).

Resultado similar reportaron Valencia y Castro (2004) en cuanto al crecimiento radial de tres aislados de *Trichoderma* sp a 26°C, quienes llenaron el plato Petri de 45 mm de radio en 72 horas.

Cabe mencionar que desde un inicio se vio marcada la dominancia de los aislados TSMS y TRE3 sobre los demás aislados, quienes prácticamente no variaron en el tiempo.

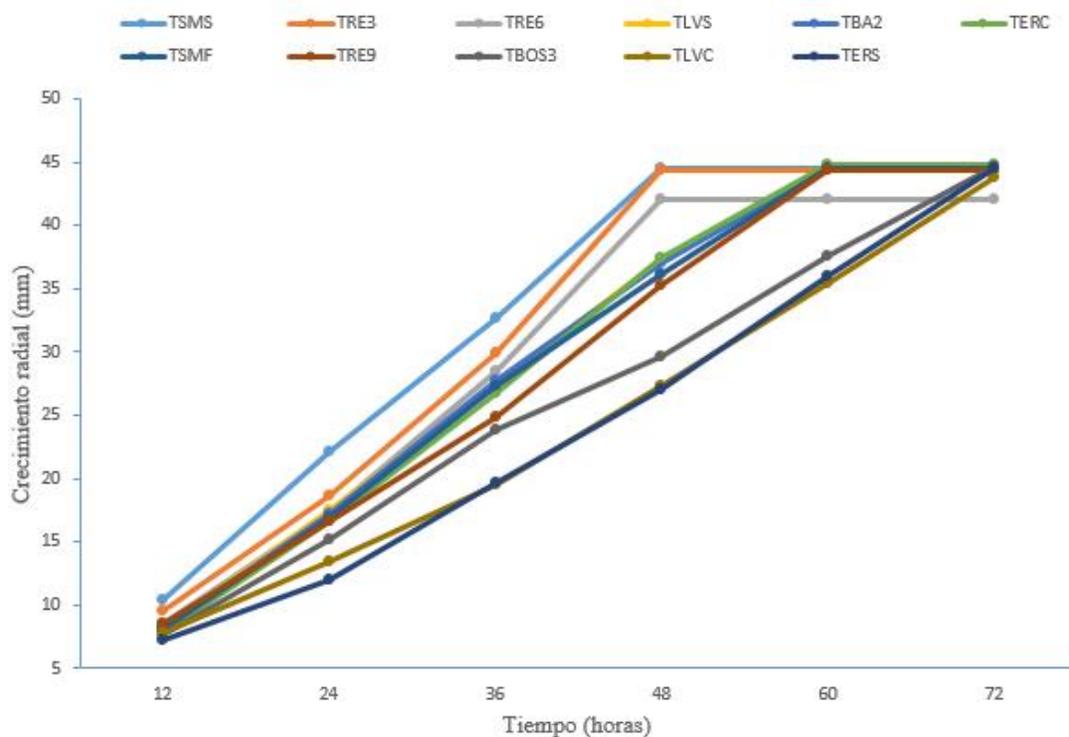


Figura 6. Ritmo de crecimiento radial de once aislados de *Trichoderma* sp. UNA, Managua, 2015.

El comportamiento del crecimiento radial acumulado de cinco aislados de *Paecilomyces* sp, demuestra que el aislado PaLV se destaca sobre los demás, con un crecimiento radial de 44.50 mm a los 18 días post inoculación. Los aislados con menor crecimiento radial son PaSM y PaBA, con un acumulado en el mismo tiempo de 31.83 mm y 30.08 mm

respectivamente, mientras que los aislados PaER y PaRe no muestran diferencias en su crecimiento acumulado siendo superados en 4.50 mm por PaLV (Figura 7).

Silva (2010), determinó el crecimiento radial acumulado de cuatro formulados de *P. fumosoroseus* a los 7 días alcanzando un promedio de 16.56 mm a 25 °C. Resultado similar al obtenido en este ensayo siendo de 15.60 mm como promedio bajo las mismas condiciones.

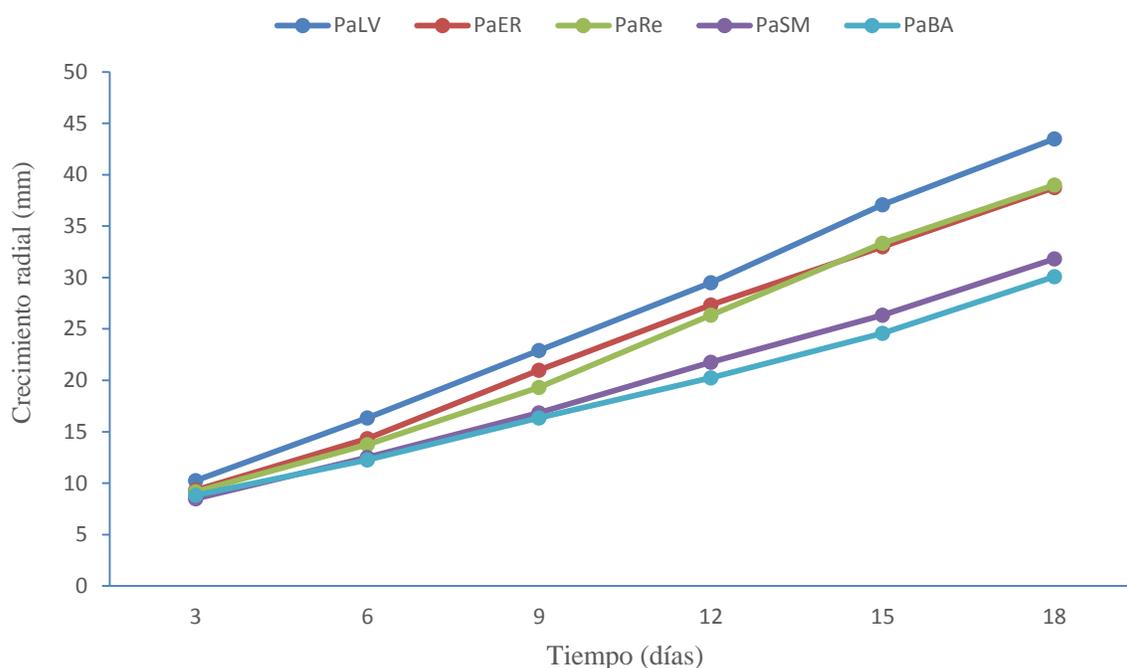


Figura 7. Ritmo de crecimiento radial de cinco aislados de *Paecilomyces* sp. UNA, Managua, 2015.

El aislado endófito Clonost procedente de fruto y clasificado como *Clonostachys* sp., mostró una tendencia sigmoideal, alcanzando un crecimiento radial acumulado de 45 mm al cabo de 10 días post inoculación (Figura 8), siendo este el tiempo en que ocurrió el llenado del plato Petri.

Resultado similar al obtenido por Flores *et al.*, (2015), quienes reportan un promedio de crecimiento radial de 39 mm a los 9 días, a partir de un inóculo de 3 mm de diámetro, mientras que en este estudio el inóculo fue a partir de un disco de 5 mm de diámetro, para un crecimiento radial de 41.15 mm en el mismo tiempo.

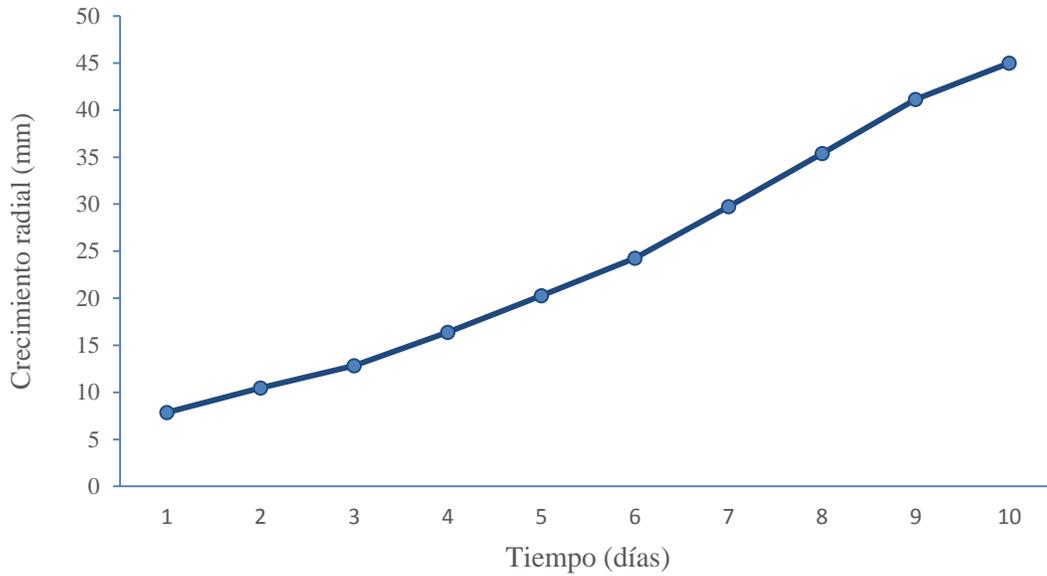


Figura 8. Ritmo de crecimiento radial *Clonostachys* sp. UNA, Managua, 2015.

El crecimiento radial acumulado de cinco aislados de *Moniliophthora roreri* presentó un comportamiento ascendente en el tiempo, llenando plato a los 15 días (Figura 9), similar a los resultados obtenidos por Mosquera (2014) y Villavicencio (2010), quienes encontraron que aislados de *M. roreri* llenaron plato de 45 mm de radio a los 15 días post inoculación.

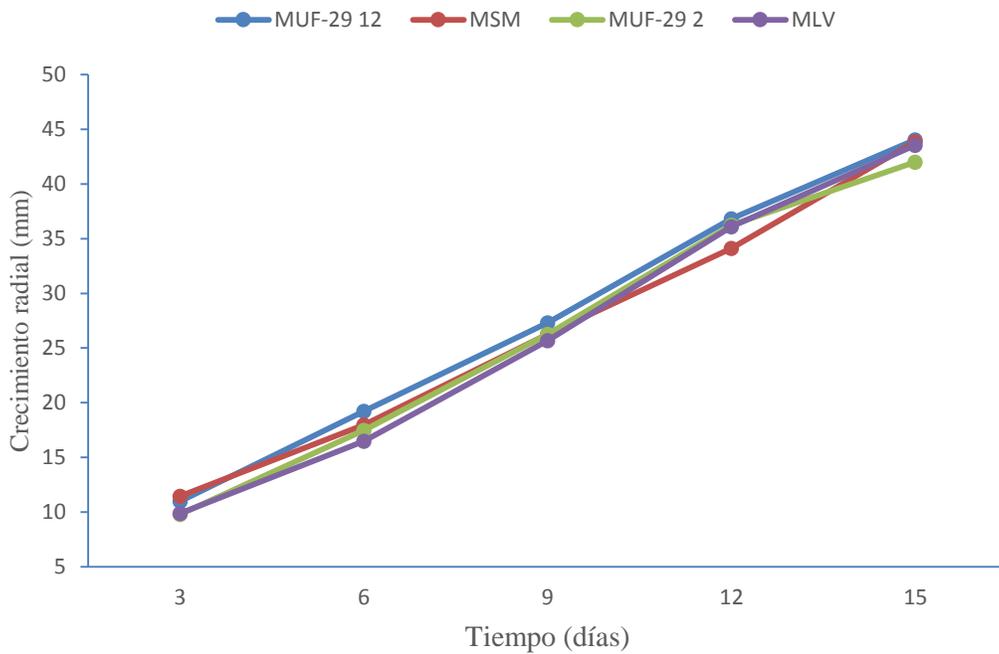


Figura 9. Ritmo de crecimiento radial de cuatro aislados de *Moniliophthora roreri*, UNA, Managua, 2015.

4.5.2. Media de crecimiento radial

Las medias de crecimiento radial de once aislados de *Trichoderma* sp, al realizar el análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de rangos múltiples Tukey=0.05 indica que existe diferencias significativas entre los aislados, los cuales se pueden establecer en dos grupos extremos, el primero con los aislados TSMS, TRE3 y TRE6, siendo los de mayor crecimiento radial con 27.43 mm, 25.61 mm y 24.06 mm respectivamente, por otro lado están los aislados que conforman el grupo con menor crecimiento radial TBOS3, TLVC y TERS, con 19.08 mm, 17.03 mm y 16.44 mm respectivamente (Figura 10).

Valencia y Castro (2004), reportan media de crecimiento radial de 28.98 mm a 26 °C, siendo superior a las encontradas en este estudio, posiblemente se atribuya a la temperatura. Schubert *et al.*, (2009), observaron una disminución en la tasa de crecimiento proporcional a la disminución de la temperatura, estableciendo un rango óptimo de 25 a 30 °C.

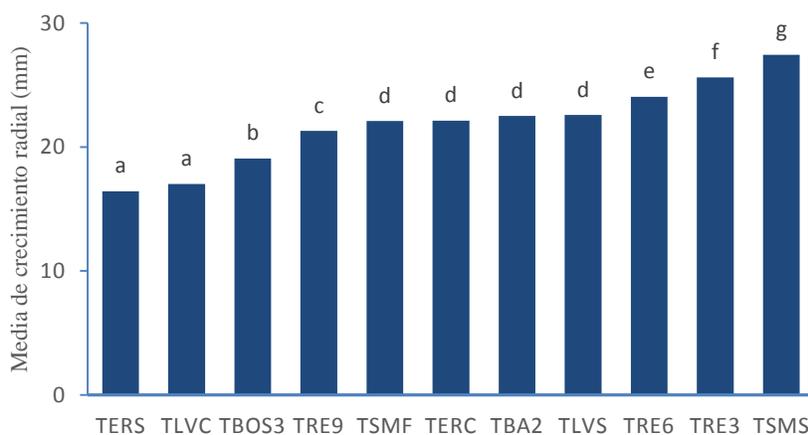


Figura 10. Medias de crecimiento radial acumulado para once aislados de *Trichoderma* sp, UNA, Managua, 2015. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.

Las medias de crecimiento radial para cinco aislados de *Paecilomyces* sp, efectuando el ANDEVA y la prueba de rangos múltiples Tukey=0.05 indica que existe diferencias significativas entre los aislados, siendo el aislado PaLV el que muestra mayor crecimiento radial con 26.63 mm, seguido de los aislados PaER y PaRe con 23.98 mm y 23.52 mm respectivamente, siendo estadísticamente iguales. Los aislados con menor crecimiento radial corresponden a PaSM con 19.64 mm y PaBA con 18.74 mm (Figura 11). Domsch, Gams y Anderson (1980) reportan media de crecimiento radial de *Paecilomyces* de 25 a 35 mm, correspondiendo al crecimiento obtenido en este estudio para el aislado PaLV a 25 °C, encontrándose en el rango óptimo de temperatura según Osborne *et al.*, (1992) quienes plantean que es de 23 a 25 °C.

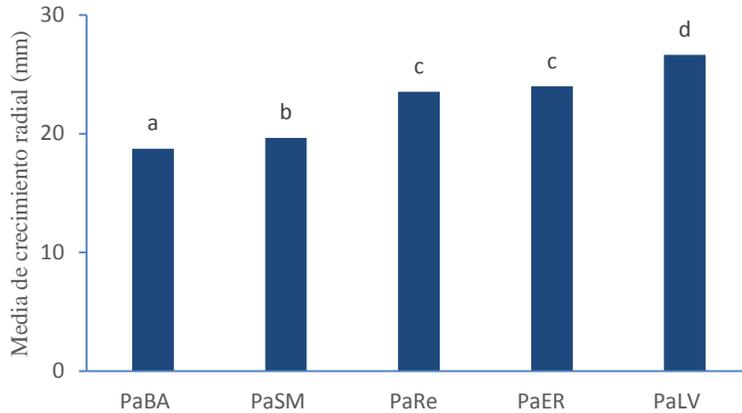


Figura 11. Medias de crecimiento radial acumulado para cinco aislados de *Paecilomyces* sp, UNA, Managua, 2015. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.

El análisis de varianza y los resultados de la prueba de rangos múltiples Tukey=0.05 para las medias de crecimiento radial de cuatro aislados de *M. roreri*, indican que existe diferencias significativas entre los aislados, mostrando mayor crecimiento radial el aislado MUF-29 12 con 27.69 mm respecto a los aislados MLV, MUF-29 2 y MSM con 26.34 mm, 26.37 mm y 26.73 mm respectivamente, los que no muestran diferencias en cuanto a su media de crecimiento por lo que se agrupan en una misma categoría estadística (Figura 12).

Se obtuvo una media de crecimiento radial de 26.78 mm para los cuatro aislados, siendo similar a resultado informado por Arbeláez (2010) para 12 aislados de *M. roreri* con una media de crecimiento radial de 28.39 mm.

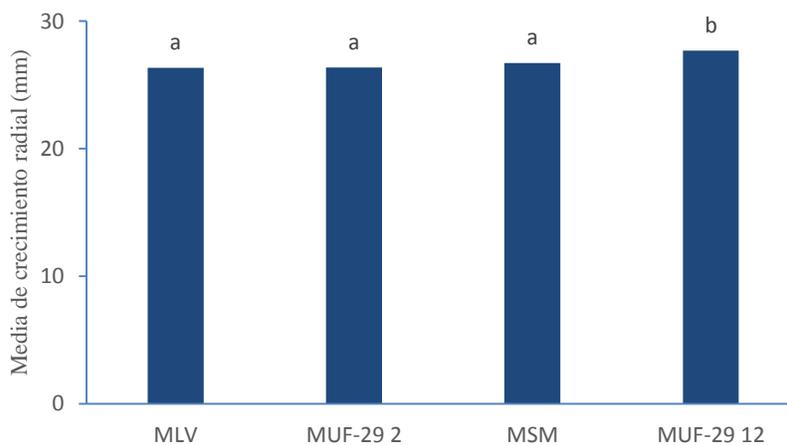


Figura 12. Medias de crecimiento radial para cuatro aislados de *M. roreri*. UNA, Managua, 2015. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.

4.5.3. Tasa de crecimiento radial

La tasa de crecimiento es una característica fisiológica útil para predecir la habilidad de control biológico de las cepas de *Trichoderma* (Uzunovic y Webber, 1998) por lo que es utilizada como una primera referencia al caracterizar cepas nuevas de este antagonista (Hermosa *et al.*, 2000).

La tasa de crecimiento radial por hora de *Trichoderma* sp, fue mayor en los aislados TRE3, TSMS y TRE6 respecto a los demás. Las menores tasas diarias se obtuvieron en los aislados TERS, TBOS3 y TLVC (Cuadro 7). La tasa promedio obtenida para este estudio resultó de 0.61 mm.h⁻¹, coincidiendo con lo encontrado por Guigón *et al.*, (2010) de 0.5 a 0.71 mm.h⁻¹. Estos resultados difieren al obtenido por Rodríguez *et al.*, (2011) quienes reportan una tasa de crecimiento muy lenta de 0.34 mm.h⁻¹.

Cuadro 7. Tasa de crecimiento radial de once aislados de *Trichoderma* sp. UNA, Managua, 2015.

Aislado	Crecimiento (mm.h ⁻¹)
TLVC	0.50
TBOS3	0.51
TERS	0.52
TER9	0.60
TERC	0.60
TSMF	0.61
TLVS	0.61
TBA2	0.61
TER6	0.70
TSMS	0.71
TRE3	0.73
Promedio	0.61

Para el aislado endófito *Clonostachys* sp, se obtuvo una tasa de crecimiento radial diaria de 3.72 mm.día⁻¹ (Cuadro 8), resultado similar al obtenido por Uquillas (2004) quien reportó una tasa diaria de 3.1 mm, los cuales difieren al obtenido por Rodríguez *et al.*, (2011) los que encontraron una tasa de crecimiento de 2.73 mm.día⁻¹.

Cuadro 8. Tasa de crecimiento radial del aislado *Clonostachys* sp. UNA, Managua, 2015.

Aislado	Crecimiento (mm.día ⁻¹)
Clonost	3.72
Promedio	3.72

En cuanto a la tasa diaria de crecimiento radial de *Paecilomyces* sp, solamente el aislado PaLV sobresale respecto a los demás, seguido de PaRe y PaER (Cuadro 9). Se obtuvo un promedio de 1.69 mm.día⁻¹, similar al encontrado por Chan *et al.*, (2010) quienes reportan una tasa de crecimiento para *P. fumosoroseus* de 1.5 mm.día⁻¹.

Cuadro 9. Tasa de crecimiento radial de cinco aislado de *Paecilomyces* sp. UNA, Managua, 2015.

Aislado	Crecimiento (mm.día ⁻¹)
PaBA	1.33
PaSM	1.43
PaER	1.81
PaRe	1.83
PaLV	2.06
Promedio	1.69

La tasa de crecimiento radial diaria para cuatro aislados de *M. roreri* fueron similares entre sí, con un promedio de 2.46 mm.día⁻¹ (Cuadro 10), similar al reportado por Mosquera (2014) con una tasa de crecimiento radial diario de 2.48 mm.

Cuadro 10. Tasa de crecimiento radial de un aislado de *M. roreri*. UNA, Managua, 2015.

Aislado	Crecimiento (mm.h ⁻¹)
MSM	2.49
MLV	2.49
MUF-29 12	2.47
MUF-29 2	2.40
Promedio	2.46

4.6. Competencia por espacio y nutrientes

4.6.1. Tiempo de contacto antagonista-patógeno

Michel (2001) refiere que un tiempo de contacto corto es una característica deseable en un antagonista, ya que entre menor sea éste, implicará una mayor agresividad, característica que fue evidente en el enfrentamiento *Trichoderma -Moniliophthora* en el cual ocurrió el contacto a los 2-3 días después de establecida la prueba de cultivo dual. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, quienes han determinado que *Trichoderma* sp y otros patógenos entran en contacto entre 1 a 3 días en dependencia de la distancia entre inóculos (Hernández, 2005). En general el crecimiento del patógeno se detuvo cuando el micelio de éste entra en contacto con el micelio de la cepa de *Trichoderma* sp y en algunos casos el patógeno creció un día más después de entrar en contacto con el antagonista.

El tiempo de contacto en cultivo dual *Paecilomyces-Moniliophthora* ocurrió entre los 6 y 8 días después de establecido el enfrentamiento; mientras que en la prueba de cultivo dual *Clonostachys-Moniliophthora* el tiempo de contacto fue de 7 días.

En algunas pruebas de *Paecilomyces* y el patógeno *M. roreri* (PaLV - MUF-29 12, PaRe - MUF-29 12, PaSM - UF-29 12 y Clonost - MUF-29 2) no se observó contacto entre ambas colonias, formándose una zona libre de crecimiento entre ambos hongos, lo que se debe posiblemente a la producción de metabolitos secundarios tal como menciona Sánchez (2009). Los aislados PaSM de *Paecilomyces* sp y el aislado de Clonost de *Clonostachys* sp, inhibieron el crecimiento de los aislados del patógeno MUF-29 12 y MUF-29 2 respectivamente, entre 5 y 6 días post inoculación.

4.6.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)

Para los aislados de *Trichoderma*, el análisis de varianza (ANDEVA) detectó diferencias significativas en los efectos principales y al efectuar la prueba de rangos múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$) se encontró que existe diferencias significativas entre los aislados, ejerciendo mayor inhibición el aislado TSMS con 46.77 %, seguido del TRE3 con 46.01 %, en tercer lugar los aislados TBOS3 y TSMF con 44.38 % y 44.36 % los que no muestran diferencias estadísticas entre sí. El aislado con menor efecto inhibitorio corresponde a TERS, alcanzando un 40.13 % (Figura 13).

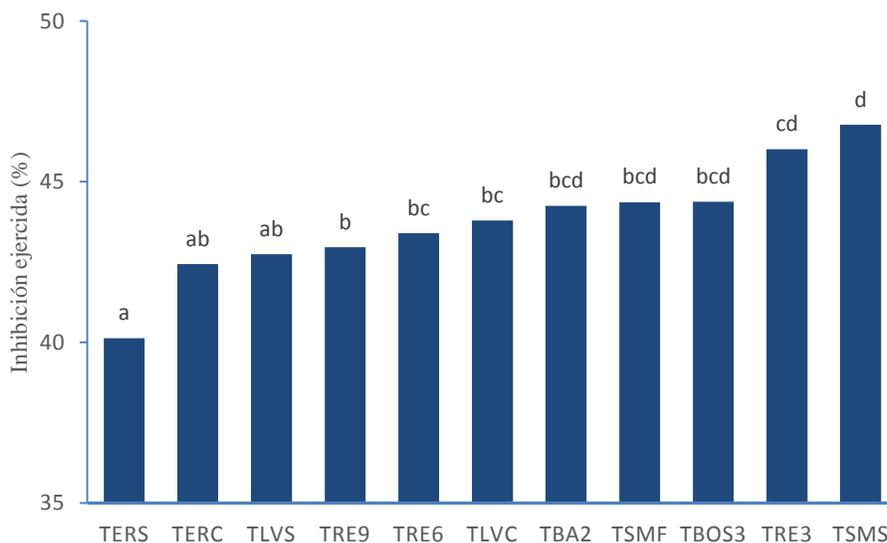


Figura 13. Actividad antagónica ejercida por *Trichoderma* sp sobre el crecimiento radial de *M. roreri*, UNA, Managua, 2015. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P<0.05$) según prueba de Tukey.

El efecto de inhibición del crecimiento radial sobre los cuatro aislados de *M. roreri* ejercido por once aislados de *Trichoderma*, al efectuar la prueba de rangos múltiples Tukey=0.05 indica que existe diferencias significativas entre los aislados, agrupándose en cuatro categorías estadísticas. Es decir, el aislado que fue mayormente inhibido es MUF-29 2 con 47.62 %, seguido de los aislados MUF-29 12 con 44.92 %, MLV con 42.02 % y MSM con 40.44 %. Siendo los dos últimos aislados (MLV y MSM), quienes mostraron mayor resistencia al antagonismo ejercido por los aislados de *Trichoderma* (Figura 14). Esto podría ser atribuido a la producción de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de *Trichoderma* sp, lo cual se observó en *Aspergillus bisporus*, que produce metabolitos aún no determinados con efecto sobre *T. harzianum* (Mumpuni *et al.*, 1998).

Rodríguez y Osorio (2005), reportan porcentaje de inhibición del crecimiento radial de 51%. Sin embargo, Magdama (2010) en estudio de efecto de cepas de *Trichoderma* sp para el control de *M. roreri*, obtuvo porcentajes de inhibición en un rango que varió de 89.57 % a 100 %, resultados superiores a los encontrados en el presente estudio. Esto se debe probablemente a las condiciones en las que se desarrolló el ensayo, siendo establecido a temperatura de 27°C y sin ventaja competitiva de *M. roreri*.

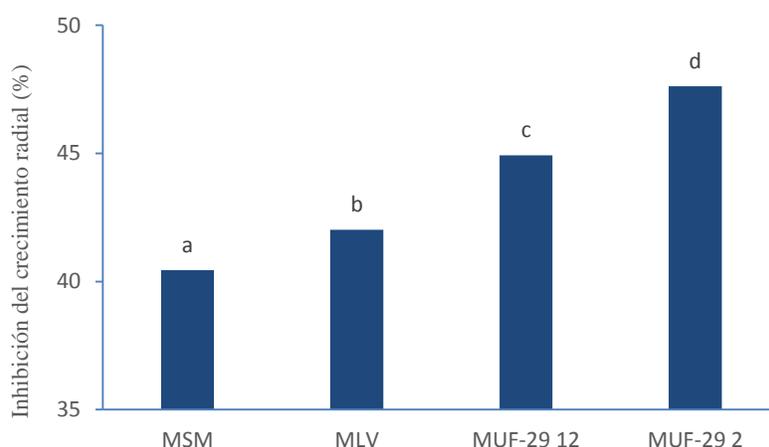


Figura 14. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de cuatro aislados de *M. roreri* ejercida por *Trichoderma* sp, UNA, Managua, 2015. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.

La actividad antagónica sobre los cuatro aislados de *M. roreri* respecto a la inhibición del crecimiento radial ejercido por cinco aislados de *Paecilomyces* sp, al efectuar la prueba de rangos múltiples Tukey=0.05 indica que existe diferencias significativas entre los aislados, agrupándose en cinco categorías estadísticamente distintas. Destacándose con mayor inhibición el aislado PaLV con 67.43 % seguido del aislado PaRe con 65.31 %, PaER con 64.62 %, PaSM con 62.91 % y el aislado PaBA quien ejerció el menor efecto inhibitorio del crecimiento radial con 59.38 % ((Figura 15), valor inferior a lo encontrado por Suárez y Rangel (2014) quienes reportan valores superiores al 60 % frente a 10 aislados de *M. roreri*.

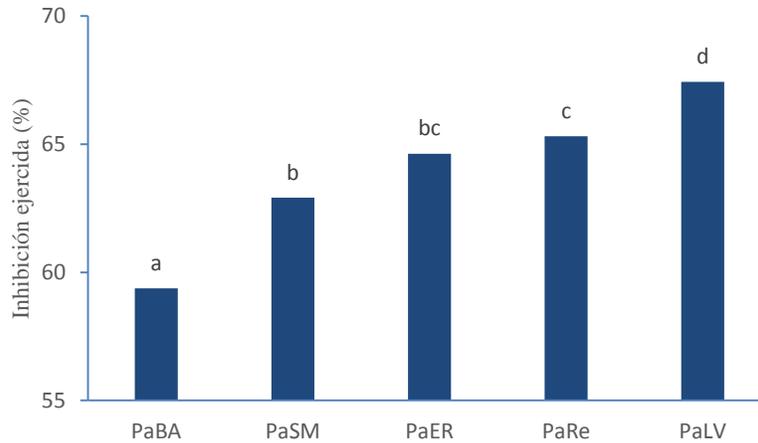


Figura 15. Actividad antagónica ejercida por *Paecilomyces* sp sobre el crecimiento radial de *M. roreri*, UNA, Managua, 2015. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.

El efecto de inhibición del crecimiento radial sobre los cuatro aislados de *M. roreri* ejercido por cinco aislados de *Paecilomyces* sp, al efectuar la prueba de rangos múltiples Tukey=0.05 indica que existe diferencias significativas, el aislado que fue mayormente inhibido es MUF-29 12 con 66.90 %, seguido de los aislados MLV con 64.11 % y MSM con 63.76 % quienes no muestran diferencias respecto al porcentaje de inhibición, el aislado MUF-29 2 resulto el menos inhibido con 62.19 % (Figura 16). Resultados similares a los obtenidos por Suárez y Rangel (2014) quienes encontraron porcentajes de inhibición superior al 60 %, con una media de porcentaje de inhibición de 78.24 %. No así con Rodríguez y Osorio (2005), quienes reportan en ensayos de plato dual frente al fitopatógeno *M. roreri*, porcentajes de inhibición del crecimiento radial de 34.28%.

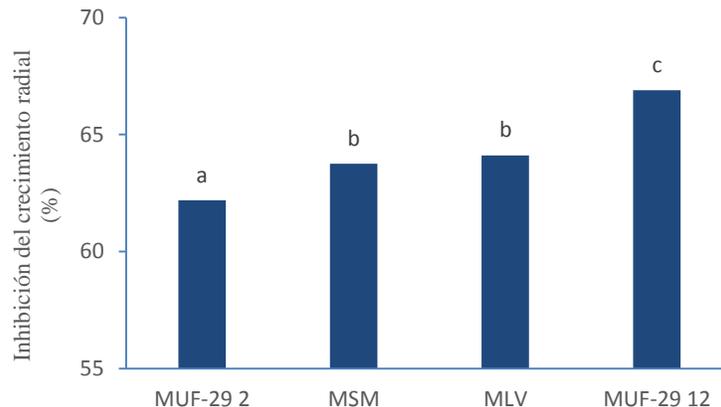


Figura 16. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de cuatro aislados de *M. roreri* ejercida por *Paecilomyces* sp, UNA, Managua, 2015. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.

El efecto de inhibición del crecimiento radial sobre los cuatro aislados de *M. roreri* ejercido por *Clonostachys* sp, al efectuar la prueba de rangos múltiples Tukey=0.05 indica que existe diferencias significativas, el aislado que fue mayormente inhibido es MLV con 67.62 %, seguido de los aislados MUF-29 12 con 66.68 %, MUF-29 2 con 65.74 % que no muestran diferencias en cuanto a la porcentaje de inhibición y el aislado MSM quien resultó ser el menos inhibido con 63.22 % (Figura 17). Resultados superiores a los obtenidos por Mejía *et al.*, (2008) en estudio de hongos endófitos como agente control biológico de patógenos de *T. cacao*, quienes reportaron inhibición del crecimiento radial de *M. roreri* ejercido por aislados de *Clonostachys rosea* del 40 %, mientras que Krauss *et al.*, (2006), reportan porcentajes de control biológico en campo de 46.90 %.

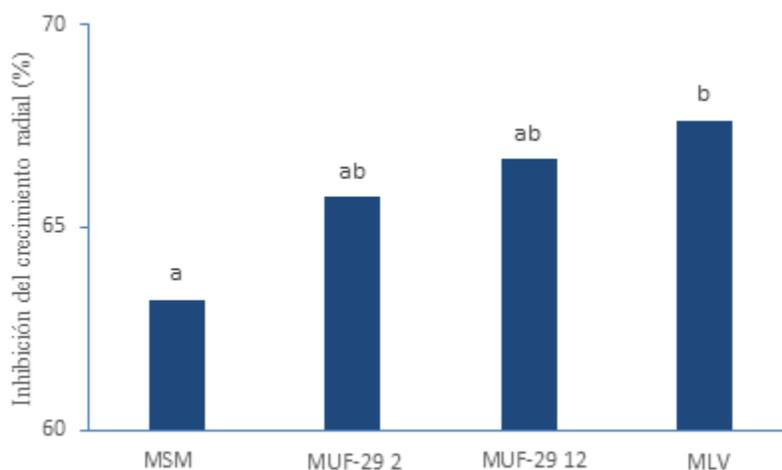


Figura 17. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de cuatro aislados de *M. roreri* ejercida por *Clonostachys* sp, UNA, Managua, 2015. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.

Estudios de antagonismo *in vitro* en cuanto al porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *M. roreri* son pocos, reportándose mayormente para bioensayos con *Botrytis cinerea*, en los que reportan Zaldúa *et al.*, (2012) inhibición de 27 % en condición de temperatura a 25 °C, mientras que Rodríguez y Chico (2013) y Flores *et al.*, (2015) reportan inhibición de 63.95 % y 11.32 % respectivamente. Siendo *Clonostachys* sp conocida mundialmente por sus características como agente de control biológico contra una diversidad de patógenos, entre ellos *M. roreri* (Ten *et al.*, 2003; Köhl *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 2006; Morandi *et al.*, 2003; Sutton *et al.*, 1997).

4.6.3. Competencia por sustrato

Ahmad y Baker (1987), Hjeljord y Tronsmo (1998), refieren que la competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante, donde dos o más organismos presentan un comportamiento desigual ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de éste por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio

disponible para los demás, viéndose favorecido por las características del agente biocontrolador como la velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como pH, temperatura, humedad, entre otros. Aunque Wardle *et al.*, (1993), citado por Samuel (1996) mencionan que la competencia está en dependencia de la especie.

Infante *et al.*, (2009), sugieren que la competencia por sustrato o espacio depende de la velocidad de crecimiento conjuntamente con otros mecanismos de acción del antagonista, siendo determinante en el control biológico del patógeno y colonización del sustrato. Martínez *et al.*, (2013) mencionan que si el crecimiento del antagonista es más rápido que el del patógeno, éste no tiene la capacidad de explorar el sustrato debido a la ausencia de germinación y formación de estructuras.

Transcurridos los 21 días de evaluación para el enfrentamiento *Trichoderma-Moniliophthora* y los 9 días para el enfrentamiento *Paecilomyces-Moniliophthora* y *Clonostachys-Moniliophthora*, se procedió a determinar el grado de antagonismo según la escala de Bell *et al.*, (1982) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Grado de antagonismo competencia por sustrato de aislados de *Trichoderma* sp, *Paecilomyces* sp y *Clonostachys* sp frente a *M. roreri* de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, (1982). UNA, Managua, 2015.

Antagonistas	Aislados <i>M. roreri</i>			
<i>Trichoderma</i> sp	MLV	MSM	MUF-29 2	MUF-29 12
TLVC	2	2	1	1
TLVS	2	2	1	1
TERC	2	2	1	1
TERS	2	2	1	1
TSMF	2	2	1	1
TSMS	2	2	1	1
TRE3	2	2	1	1
TRE6	2	2	1	1
TRE9	2	2	1	1
TBA2	2	2	1	1
TBOS3	2	2	1	1
<i>Paecilomyces</i> sp	MLV	MSM	MUF-29 2	MUF-29 12
PaER	3	3	3	3
PaRe	3	3	3	3
PaLV	3	3	3	3
PaSM	3	3	3	3
PaBA	3	3	3	3
<i>Clonostachys</i> sp	MLV	MSM	MUF-29 2	MUF-29 12
Clonost	3	3	3	3

a) Enfrentamiento *Trichoderma* - *Moniliophthora*

Los once aislados de *Trichoderma* sp frente a los aislados de MLV y MSM lograron colonizar las dos terceras partes del sustrato, asignándoles el grado 2 en la escala de Bell *et al.*, (1982), mientras que con los aislados MUF-29 2 y MUF-29 12, colonizaron por completo el sustrato creciendo y esporulando sobre el patógeno, asignándoles el grado 1 de la escala, caracterizándose como buenos controladores frente a estos aislados por su alta especificidad (Figura 18).

Estos resultados están de acuerdo con Infante *et al.*, (2009) y Martínez *et al.*, (2008) quienes registraron que *Trichoderma* sp tiene una alta capacidad de competencia por el sustrato.

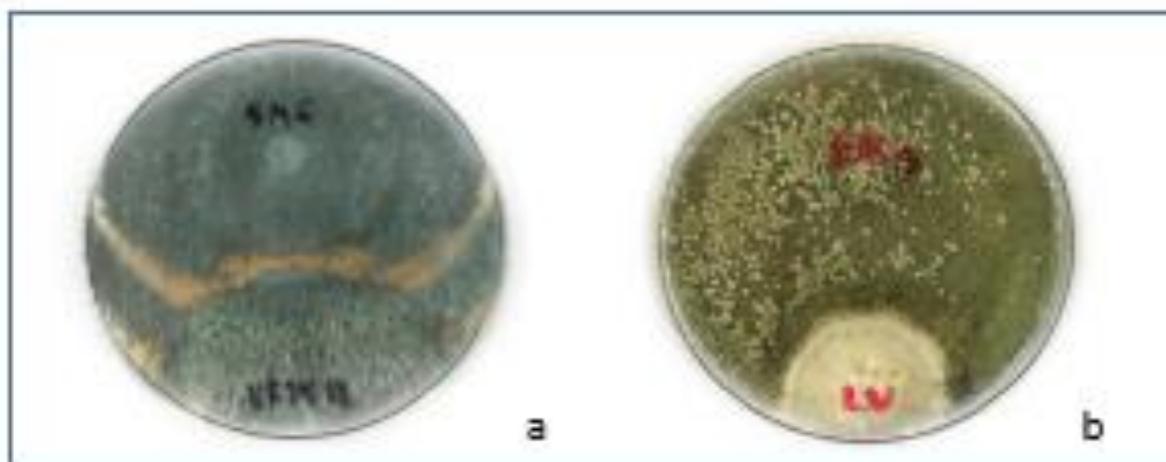


Figura 18. Grado de antagonismo competencia por sustrato de aislados de *Trichoderma* sp frente a *M. roleri* de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, (1982). Enfrentamiento TSMF-MUF-29 12 grado 1 (a), enfrentamiento TERS-MLV grado 2 (b). UNA, Managua, 2015.

b) Enfrentamiento *Paecilomyces* - *Moniliophthora*

Cuatro de los cinco aislados de *Paecilomyces* sp detuvieron el crecimiento de los cuatro aislados de *M. roleri* aproximadamente a la mitad del espacio entre inóculos de 4 cm, mostrando una competencia mutua por espacio en el medio entre los hongos en enfrentamiento, a excepción del aislado PaLV que creció más de la mitad del espacio entre inóculos en el medio.

Debido a que ningún aislado del antagonista sobrepasó la colonia del patógeno y viceversa, todos los aislados de *Paecilomyces* sp se asignaron en el grado 3 de la escala de Bell *et al.*, (1982) (Figura 19).

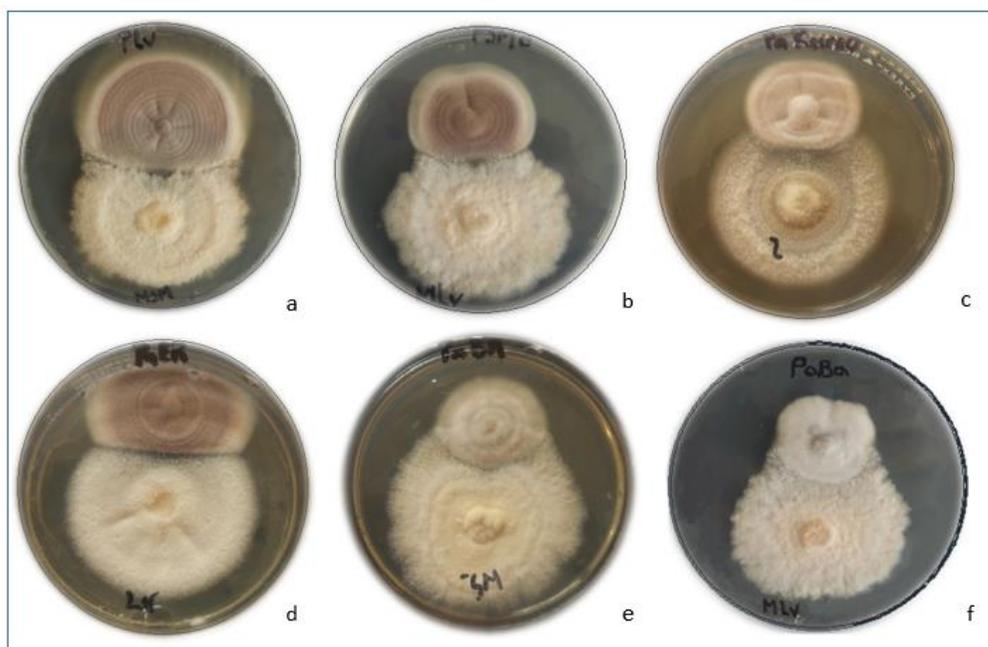


Figura 19. Grado 3 de antagonismo competencia por sustrato de aislados de *Paecilomyces* sp frente a *M. royeri* de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, (1982). Enfrentamientos: PaLV-MSM (a), PaSM-MLV (b), PaRe-MUF-29 2 (c), PaER-MLV (d), PaBA-MSM (e), PaBA-MLV (f). UNA, Managua, 2015.

c) Enfrentamiento *Clonostachys* - *Moniliophthora*

El aislado Clonost, frente a los cuatro aislados de *M. royeri* creció más de la mitad del espacio entre inóculos establecido a 4 cm. En todos los tratamientos ningún hongo parece dominar al otro, similar a lo observado por Mejía *et al.*, (2008), por lo que se asigna el grado 3 de la escala de Bell *et al.*, (1982) (Figura 20).

Costa *et al.*, (2013) mencionan que el principal mecanismo que *C. rosea* utiliza contra patógenos como *Botrytis cinerea* es la competencia por sustrato.

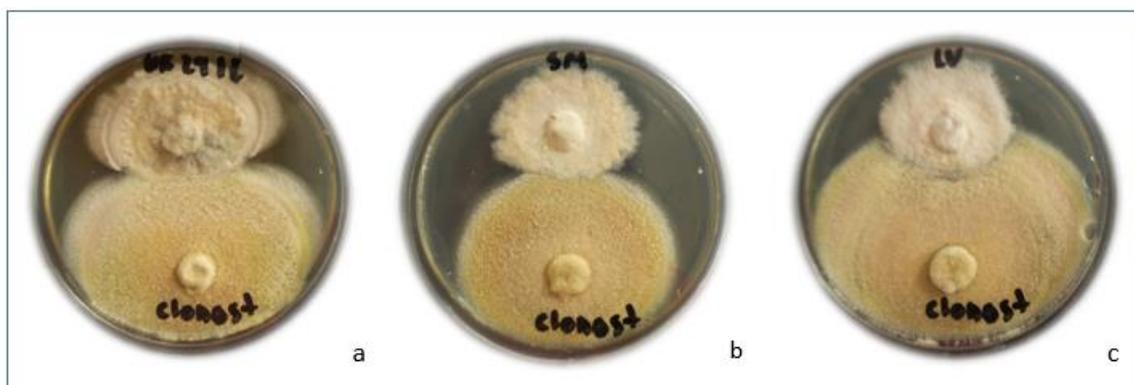


Figura 20. Grado 3 de antagonismo competencia por sustrato de *Clonostachys* sp frente a *M. royeri* de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, (1982). Enfrentamiento Clonost-MUF-29 12 (a), enfrentamiento Clonost-MSM (b), Clonost-MLV (c). UNA, Managua, 2015.

4.7. Micoparasitismo

El efecto de micoparasitismo como mecanismo de acción antagonista, ejercido por *Trichoderma* sp sobre cuatro cepas de *M. roleri*, se observó de manera macroscópica. Por una parte, todos los aislados de *Trichoderma* sp crecieron de forma parcial sobre las cepas MSM y MLV procedentes del municipio de Rancho Grande. Por otro lado, los mismos aislados de *Trichoderma* sp cubrieron de forma total y esporularon sobre la colonia de las cepas MUF-29 2 y MUF-29 12, procedentes de El Rama.

Aunque los aislados de *Trichoderma* sp sobrecrecieron parcialmente a las cepas MSM y MLV, se logró observar microscópicamente interacciones hifales de algunos aislados antagonistas en el punto de inoculación de *M. roleri*, tal como reporta Sánchez (2009) en pruebas de enfrentamiento de *T. koningiopsis* contra el patógeno *Aspergillus parasiticus*.

Bajo microscopio óptico con aumento 40X, se observaron interacciones hifales como enrollamiento, penetración y lisis únicamente en los aislados TBOS3, TBA2, TLVC, TRE6, TSMF, TSMS, TERS y TRE3 de *Trichoderma* sp (Figura 21). El enrollamiento y formación de apresorios son estructuras especializadas de *Trichoderma* sp involucradas en el micoparasitismo para poder parasitar la hifa del patógeno y causar su degradación celular (Benítez *et al.*, 2004).

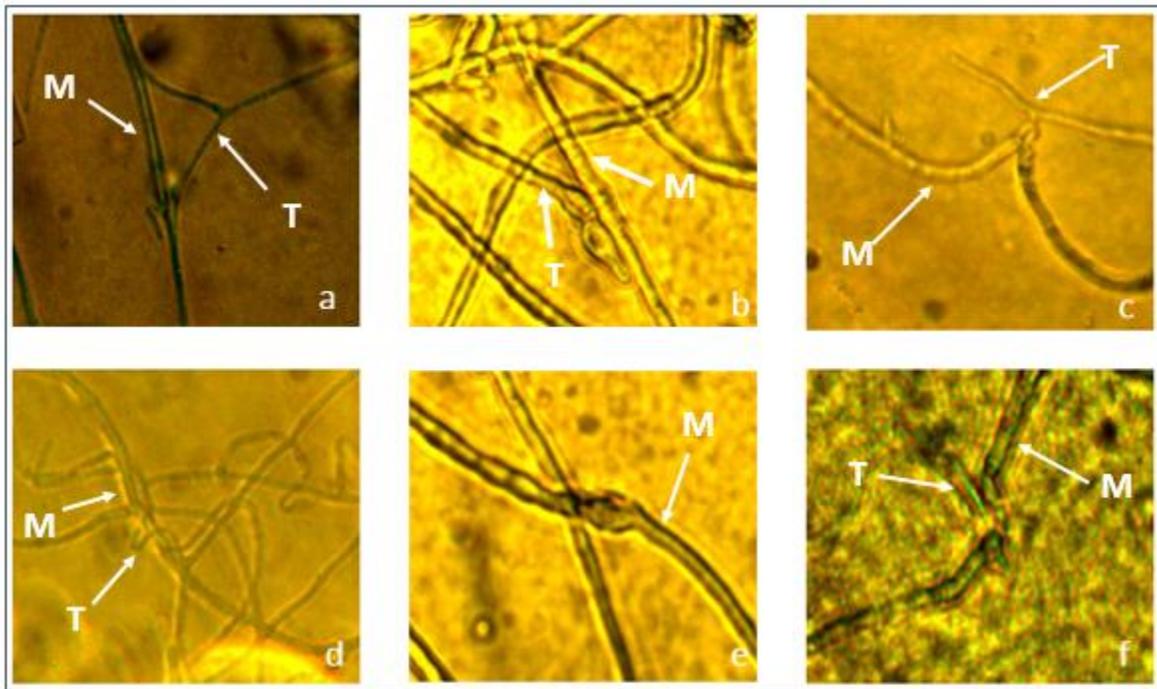


Figura 21. Micoparasitismo de *Trichoderma* sp (T) sobre *M. roleri* (M). Penetración (a y b), Enrollamiento hifal (c y d), Lisis (e y f). UNA, Managua, 2015.

Para los aislados de *Paecilomyces* sp y *Clonostachys* sp no se observó mecanismo de micoparasitismo, sin embargo, Suárez y Rangel (2014) reportan este mecanismo de acción de *Paecilomyces* sp contra *M. roreri* en pruebas duales.

De lo anterior se podría deducir que el mecanismo ejercido fue posiblemente la antibiosis por estos hongos antagonistas de *M. roreri*, ya que se observó claramente una zona con esporulación reducida para el patógeno. Mecanismo evidente ejercido por *Paecilomyces* sp sobre el patógeno *M. roreri* (Rodríguez y Osorio, 2005; Suárez y Rangel, 2014).

Mejía *et al.*, (2008) y Morandi *et al.*, (2000) observaron que aislados de *C. rosea* presentan dos mecanismos de antagonismo en enfrentamientos duales en dependencia del aislado. Los autores encontraron que en aislados epífitos el mecanismo ejercido era el micoparasitismo y en aislados endófito observaron como mecanismo de acción la antibiosis. Situación similar se encontró en este estudio con el aislado endófito de fruto de cacao de *Clonostachys* sp.

Los tratamientos PaLV - MUF-29 12, PaRe - MUF-29 12, PaSM - UF-29 12 y Clonost - MUF-29 2 después de 9 días de evaluación no hicieron contacto, por lo que ocurrió un rechazo entre 1 a 3 mm entre ambas colonias (Figura 22), dándose un cambio de pigmentación en el medio tornándose de color amarillento, probablemente se deba a la secreción de metabolitos secundarios al medio, tal como menciona Sánchez (2009), ocurriendo un efecto fungistático (Guédez *et al.*, 2012).

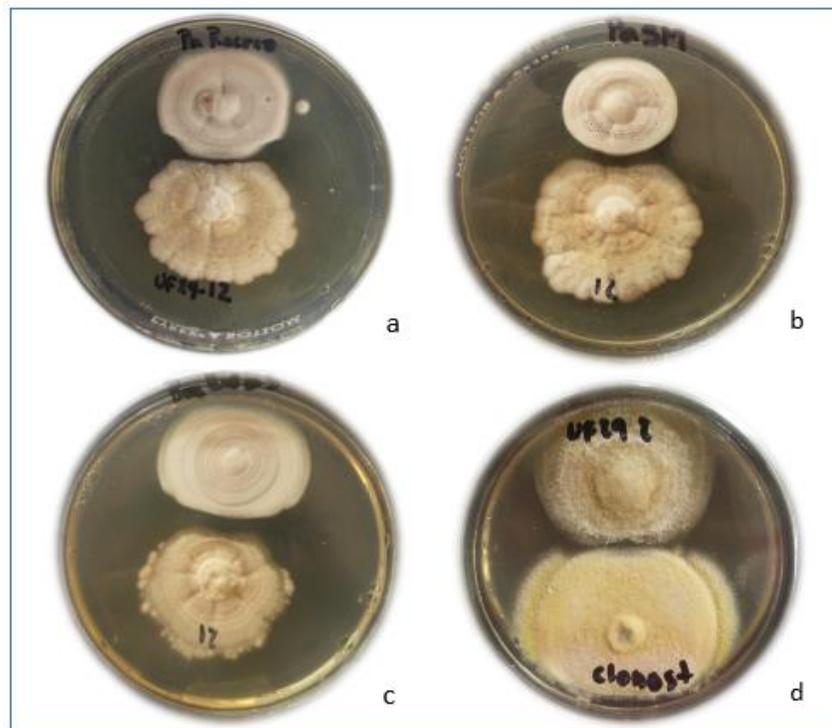


Figura 22. Antibiosis mostrada en ensayos duales por aislados de *Paecilomyces* sp (a, b, c) y *Clonostachys* sp (d) frente a *M. roreri*. UNA, Managua, 2015.

4.8. Caracterización morfológica de los hongos con mayor potencial antagonístico de *M. roreri*.

a) *Clonost*

Aislado endófito de fruto de la finca El Recreo, identificado como *Clonostachys* sp, presenta coloración inicial de blanco amarillento que fue tornándose de color rosáceo a partir de los 8 días de edad de la colonia (Figura 23), bajo condiciones de 25 °C y períodos alternos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, con micelio de aspecto granuloso, resultado de la formación de conidióforos con masas de conidios hialinos y lisas, los que siempre son más abundantes en el centro que en los márgenes de la colonia, tal como reporta Piontelli y Giusiano (2003). Microscópicamente se observan fiálides alargadas dispuestos en conidióforos de dos tipos, uno de tipo verticilado y otro penicilado; siendo estos últimos los que producen la mayor cantidad de conidios (Sutton *et al.*, 1997).

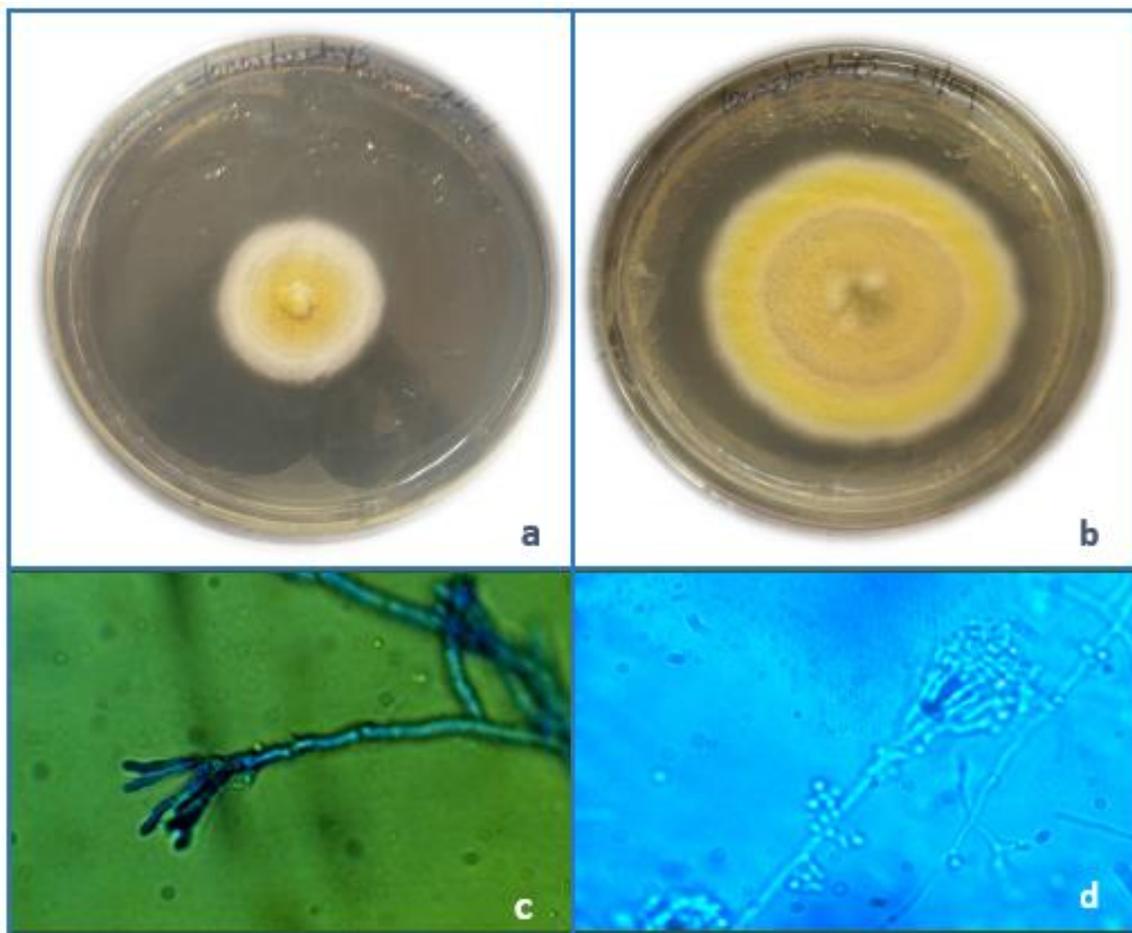


Figura 23. Característica macroscópica y microscópica *Clonostachys* sp. Colonia de 4 días (a), colonia de 8 días (b), Conidióforo verticilado (c), conidióforo penicilado (d). UNA, Managua, 2015.

b) TRE3

Aislado de fruto de la finca El Recreo, presentando crecimiento muy rápido en PDA, cubriendo el plato en dos días de incubación a 25 °C.

El reverso del plato presenta coloración amarillenta y el anverso inicialmente es blanco, que cambia gradualmente a verde amarillento con esporulación hacia el extremo. Microscópicamente presentan hifas hialinas septadas y conidióforos hialinos ramificados, las fiálides son hialinas e infladas en su base, los conidios también son hialinos de forma redondeada u ovoide (Figura 24), siendo características pertenecientes al género *Trichoderma* (Villamil *et al.*, 2012; Barnett y Hunter, 1999).

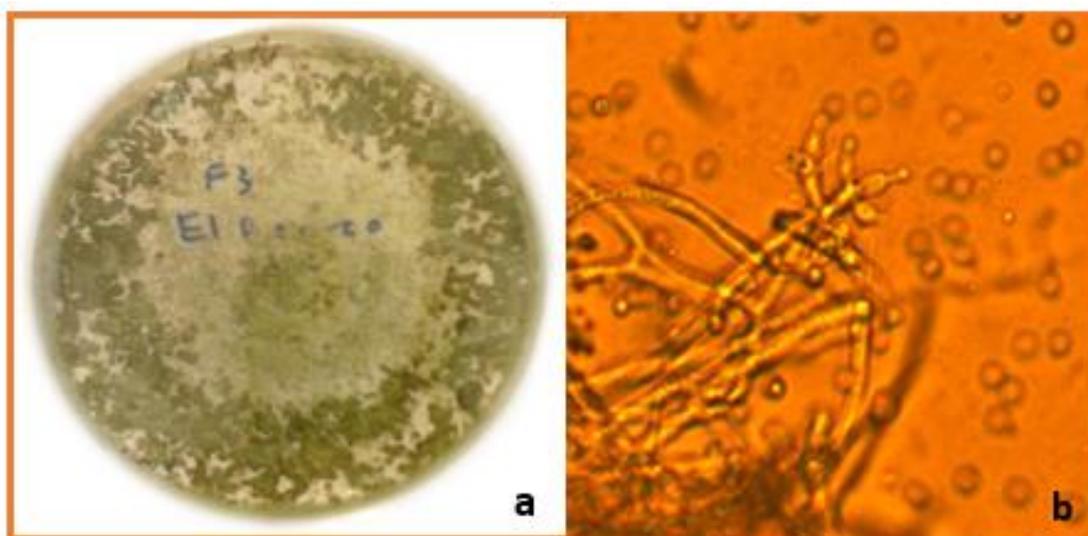


Figura 24. Característica macroscópica y microscópica aislado TRE3. Colonia de 8 días (a), conidióforo y conidio (b). UNA, Managua, 2015.

c) TSMF

Aislado a partir de muestras de fruto sano de la finca Santa Marta, con crecimiento rápido en PDA, cubriendo en su totalidad el plato Petri a las 60 horas después de su inoculación, con inicio de esporulación a las 24 horas.

La colonia presenta coloración blanquecino inicialmente y a partir del segundo día se observa la formación de anillos, producto de las masas de conidios que en conjunto le dan una coloración color verde intenso a la colonia, posee hifas hialinas septadas y ramificadas (Figura 25), no se observó coloración amarillenta en el reverso del plato, el borde de la colonia es entero. Características que según las claves de Barnett y Hunter (1999) pertenecen al género *Trichoderma*, descritas también por estudio realizado por Galeano *et al.*, (2009).

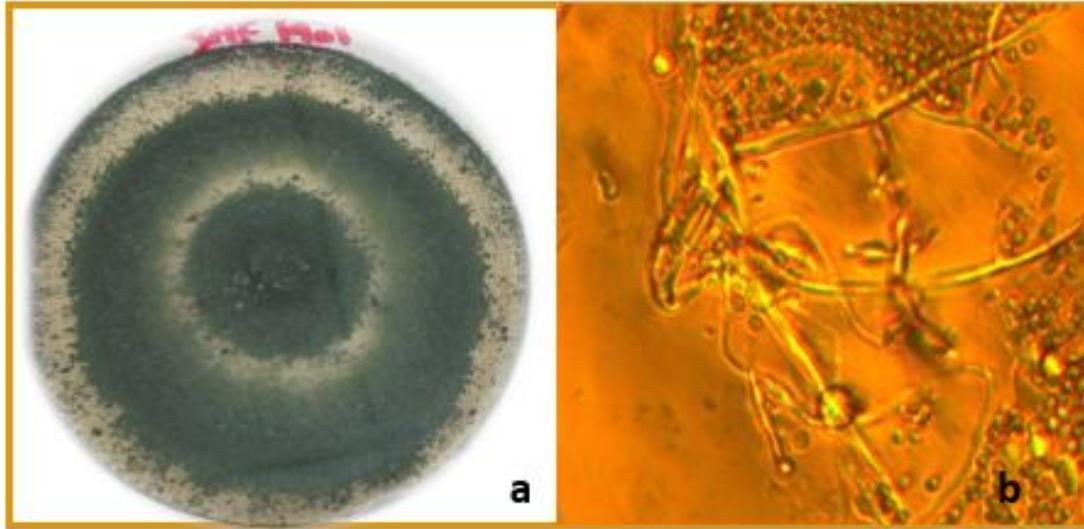


Figura 25. Característica macroscópica y microscópica aislado TSMF. Colonia de 8 días (a), conidióforo y conidio (b). UNA, Managua, 2015.

d) TBOS3

Aislado a partir de muestras de fruto sano de la finca El Bálsamo, cubriendo totalmente el plato en 72 horas, iniciando a esporular entre los 3 y 4 días. La colonia presenta coloración blanquecina al inicio, que se torna a verde oscuro con esporulación dispersa en toda la colonia. En el reverso del plato Petri se observa coloración amarillenta. Microscópicamente se observaron hifas hialinas septadas y conidióforos ramificados, fiálides engrosadas en la base y conidios hialinos a verdes, de forma redonda u ovoide (Figura 26). Características que según las claves de Barnett y Hunter (1999) pertenecen también al género *Trichoderma*.

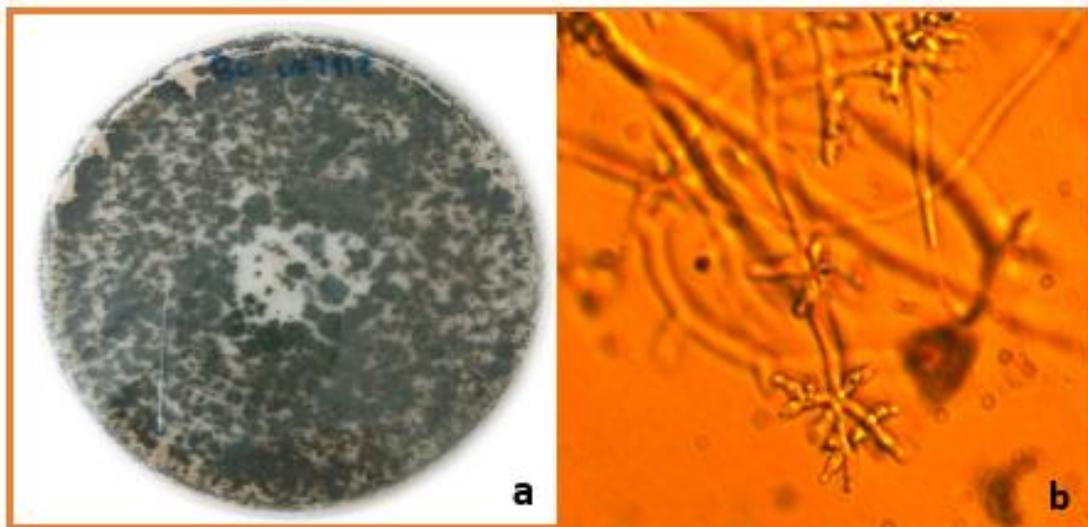


Figura 26. Característica macroscópica y microscópica aislado TBOS3. Colonia de 8 días (a), conidióforo y conidio (b). UNA, Managua, 2015.

e) TSMS

Aislado a partir de muestras de suelo de la finca Santa Marta, presenta crecimiento más rápido en comparación a los aislados de fruto, cubriendo totalmente el plato en 48 horas, el inicio de esporulación fue más tardada entre los 3 y 4 días.

Macroscópicamente la coloración de la colonia es blanquecina al inicio y después se torna verde pálido con poca esporulación, concentrándose la mayor parte en el centro de la colonia con textura es de aspecto algodonoso y borde entero. Al reverso del plato la coloración es blanquecina.

Microscópicamente se observaron hifas hialinas septadas y conidióforos hialinos ramificados, con fiálides engrosadas en la base y conidios hialinos a verdes y de forma redonda u ovoide (Figura 27), características que según las claves de Barnett y Hunter (1999), también pertenecen al género *Trichoderma*.

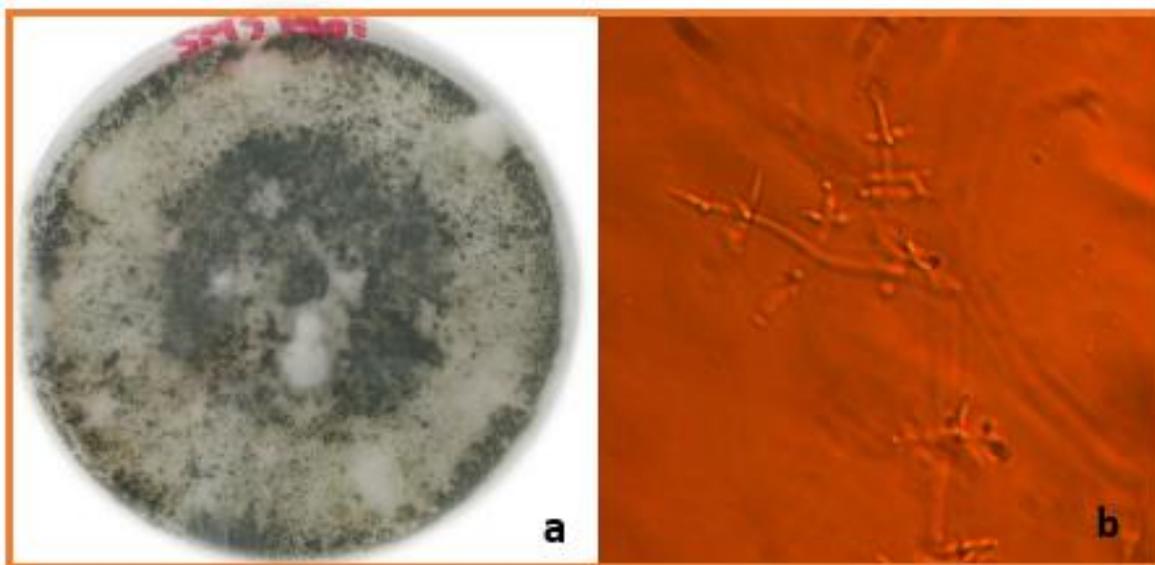


Figura 27. Característica macroscópica y microscópica aislado TSMS. Colonia de 8 días (a), conidióforo y conidio (b). UNA, Managua, 2015.

f) PaLV

Aislado a partir de muestras de suelo de la finca Las Vegas, cubriendo totalmente el plato Petri en 18 días, con esporulación a partir de las 36 horas. Inicialmente la colonia presenta coloración blanco-rosácea que a partir del día 6 se intensifica hasta alcanzar un color vinoso a violeta producto de la abundante esporulación uniforme en toda la colonia. En el reverso del plato se observa coloración amarillenta. Microscópicamente se observan conidióforos ramificados divergentes hialinos, con fiálides que se hinchan en sus bases y se estrechan hacia sus ápices, los conidios son ovales de color hialino y forman cadenas largas (Figura

28). Características corresponden al género *Paecilomyces*, según las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1999) y Domsch, Gams y Anderson (1980) y reporte de estudio realizado por Carr *et al.*, (2003).

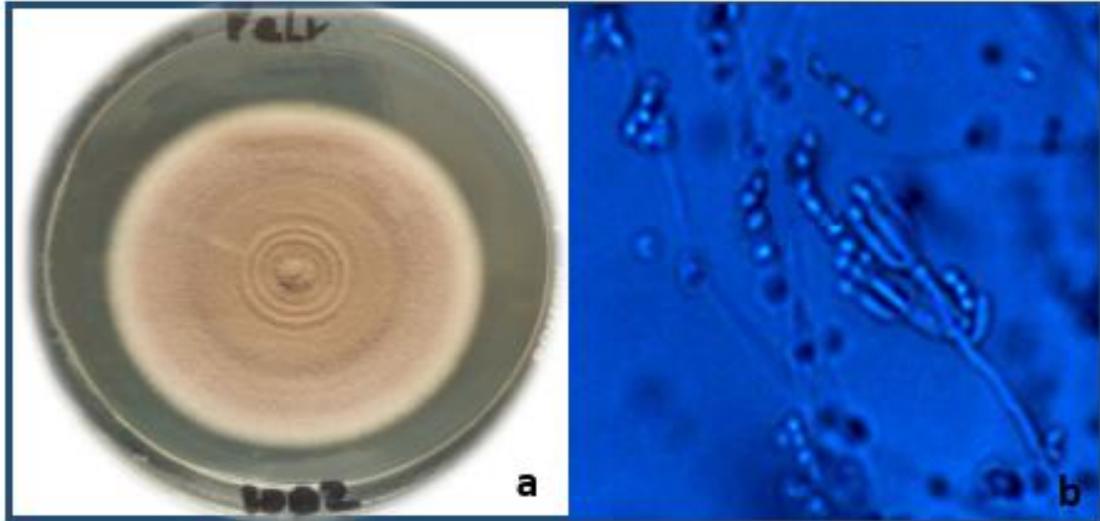


Figura 28. Característica macroscópica y microscópica aislado PaLV. Colonia de 12 días (a), conidióforo y conidios (b). UNA, Managua, 2015.

4.9. Conservación de hongos con mayor potencial antagonico

Para el establecimiento de una estrategia de conservación de hongos, se debe considerar que todos los cultivos se mantengan vivos y puros, que cada cepa permanezca estable morfológica y genéticamente; en el caso de los patógenos, que conserven su patogenicidad (De Vicente y Andersson, 2006). También es importante considerar que cada cepa debe conservarse al menos por dos métodos, uno de los cuales debe ser a largo plazo (Fernández *et al.*, 2005).

La conservación de los mejores hongos con potencial antagonico de *M. roreri*, se realizó aplicando la técnica de conservación con glicerol utilizada por Panizo *et al.*, (2005) con algunas modificaciones, en tarjeta FTA[®] y la conservación en discos de papel filtro Whatman[®] #41. Resultando 100% de viabilidad de los aislados en todas las técnicas, permitiendo garantizar la pureza y viabilidad de los aislados de hongos antagonistas para futuras investigaciones.

V. CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron morfológicamente 4 aislados del fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, que presentaron características macroscópicas diferentes entre sí y se identificaron 17 aislados de hongos antagonistas, siendo 11 de *Trichoderma* sp, 5 aislados de *Paecilomyces* sp y 1 aislado de *Clonostachys* sp.

Los mecanismos de antagonismo encontrado fueron el micoparasitismo y competencia por espacio y nutrientes para aislados del género *Trichoderma*, ubicados en el grado 1 y 2 de la escala de antagonismo, y la antibiosis como principal mecanismo para aislados del género *Paecilomyces* y *Clonostachys* que se ubicaron en el grado 3 de antagonismo.

Los aislados de hongos nativos con mayor capacidad antagónica fueron un aislado de *Trichoderma* de la localidad Santa Marta y un aislado de *Paecilomyces* de la localidad Las Vegas procedentes de suelo, además un aislado de *Trichoderma* y un aislado de *Clonostachys* ambos procedentes de fruto del Centro de Desarrollo Tecnológico El Recreo del INTA en el municipio de El Rama.

Las tres metodologías de conservación a mediano plazo permitieron garantizar la viabilidad y pureza de los hongos antagonistas.

VI. RECOMENDACIONES

El procesamiento de las muestras debe realizarse lo más pronto posible después de haber sido colectadas y bajo condiciones asépticas controladas para evitar la contaminación y el crecimiento de hongos ambientales interferentes.

Realizar estudios de identificación molecular que permita una caracterización a nivel de especie para los hongos antagonistas.

Realizar investigaciones *in situ* en plantaciones de cacao para comprobar la efectividad antagónica de los hongos nativos aislados, que permitan llegar a la etapa de formulación y producción masiva de formulados a base de estos hongos.

Ampliar el banco de cepas de hongos nativos antagonistas a través de investigaciones en zonas cacaoteras que no fueron abarcadas en este estudio.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Acebo, Y; Hernández, A; Heydrich, M; El Jaziri, M; Hernández, AN. 2012. Gestión de la pudrición de la vaina de cacao en negro (*Theobroma cacao* L.). Rev. Fruits 67(1):41-48.
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. California, United States of America. Elsevier Academic Press. 948 p.
- Ahmad, P. and Baker, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology. 77:182-189.
- Alexander, M. 1977. Introducción a la microbiología del suelo. Segunda edición. John Wiley y Sons, New York. 467 p.
- Arbeláez, L. 2010. Análisis de la diversidad intra especie de *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.*, por medio de marcadores morfológicos y genéticos. Tesis MSc. Biotec. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Maestría en Biotecnología. Medellín, CO. 67 p.
- Arnold, A; Maynard, Z; Gilbert, G; Coley, P; Kursar, T. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecology letters. 3:267-274.
- Ávila, A; Campos, M; Guharay, F; Camacho, A. 2013. Aprendiendo e innovando sobre el Manejo Integrado de plagas del cacao en sistemas agroforestales. Managua, NI. Printex. 59 p.
- Bailey, B; Bae, H; Strem, M; Crozier, J; Thomas, S; Samuels, G; Vinyard, B; Holmes, K. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Article in Press. Biological Control.
- Barnett, H; and Hunter, B. 1999. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. Minnesota, United States of America. The American Phytopathological Society. 218 p.
- Bell, D; Wells, H; Markam C. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. Phytopathology. 72:379-382
- Benitez, T; Rincón, A; Limón, M; Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma straims*. International Microbiology. 7:249-260
- Bernal, A; Andreu, C; Moya, M; González, M; Fernández, O. 2007. Utilización de *Trichoderma* spp., como alternativa ecológica para control de *Fusarium oxysporum* Schlecht, *F. sp cubense* (E.F. Smith) Snyd & Hans. Revista del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Cuba 83:26-29.
- Buhariwalla, H.; Srilankshmi, P.; Kannan S.; Kanchi, S.; Chandra, K.; Satyaprasad, F.; Waliyar, R.; Thakur, P.; Crouch, J. 2005. AFLP Analysis of *Trichoderma* spp. from India Compared

with Sequence and Morphological-based Diagnostics. *Journal of Phytopathology*. 153: 389-400.

Calvo, J; Rivera, G; Orozco, S; Orozco, R. 2012. Aislado y Evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinérea* en Mora. *Agronomía Mesoamericana*. Heredia, CR. 23(2): 225-231.

Carr, A; Elósegui, O; Padrón, N. 2003. Aislado, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (wize) broum & smit. *Fitosanidad*. 7(3):27-32.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR). 2011. Control integrado de la moniliasis basado en variedades tolerantes: Proyecto cacao Centroamérica. Consultado el 23 feb 2015. Disponible en: http://www.ceplac.gov.br/paginas/cbc/paginas/palestras/P4_2.pdf

CETREX (Centro de Trámites de las exportaciones, NI). 2016. Exportación de cacao (en línea). Managua, NI. Consultado 20 ene. 2016. Disponible en <http://www.cetrex.gob.ni/website/servicios/tproduc15.html>

Chan, W; Ruiz, E; Cristóbal, J; Pérez, A; Munguía, R; Lara, J. 2010. Desarrollo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. *Agrociencia*. 44:587-597

CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CO). 2006. Capacitación sobre uso de metodologías y protocolos para realizar investigaciones con fitopatógenos y potenciales antagonistas en cacao (*Theobroma cacao* L.). Laboratorio de Fitopatología. Cundinamarca, CO. 15 p.

De Vicente, M. and Andersson M. 2006. IT. DNA Banks providing novel options for genebanks?. International Plant Genetic Resources Institute. Consultado 12 feb. 2016. Disponible en: http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/images/file/learning_space/dna_banks.pdf

Dennis, C. and Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society*. 57:363-369.

Domsch, H; Gams, W; Anderson, T. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press. London, UK. 860 p.

Druzhinina, I; Kubicek, C. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J. Zhejiang Univ. Sci*. 6: 100-112.

Druzhinina, I; Kopchinskiy, A; Kubicek, C. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*. Viena, AT. 47:55-64.

- Fernandez, C; Martinez, G; Perurena, M; Illnait, M.; Valdes, I. 2005. La colección de cultivos de hongos del instituto de medicina tropical “Pedro Kourí”: funciones y retos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 57(3):1-7
- Flores, W; Chico, J; Cerna, L. 2015. Actividad antagonica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinérea*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. Trujillo, PE. 35(1):34-42
- French, E., y Hebert, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. IICA. San José, CR. 150 p.
- Galeano, M; Mendez, F; Urbaneja, A. 2009. Efecto de *Trichoderma Harzianum* rifai (cepa T-22) sobre cultivos hortícolas. (en línea) consultado el 29 de nov 2015. Disponible en:
- González, A. y Roble, A. 2014. Aislado y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* en frutos de *Theobroma cacao* L. (cacao) del cultivar San José del Real de la Carrera, Usulután. Tesis. Lic Q.F. Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, SV. 193 p.
- Guédez, C; Cañizaleza, L; Castillo, C; Olivar, R. 2012. Evaluación in vitro de aislados de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 32:44-49
- Guigón, C; Guerrero, V; Vargas, F; Carvajal, E; Ávila, G; Bravo, L; Ruocco, M; Lanzuise, S; Woo, S; Lorito, M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra hongos fitopatogenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28:87-96.
- Gutierrez, B; González, M; Rumbos, R; Parra, D; Sosa, D; Pérez, S. 2009. Actualización del registro de hongos y cromistas asociados al cacao en los estados Sucre y Monagas. *Fitopatología Venezolana*. Aragua, VE. 22(2):46-49.
- Hebbar, P. 2007. Cacao diseases: A global perspective from an industry point view. *Phytopathology*. 97:1658-1663.
- Hermosa, M; Grondona, I; Iturriaga, E; Díaz, J; Castro, C; Monte, E. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5):1890-1898.
- Hjeljord L. and Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman GE, Kubicek CP, editors. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London: Taylor and Francis. P. 131–52

- Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* spp in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*. 87(1):4-10.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2006. Protocolo estandarizado de oferta tecnológica para el cultivo del cacao en el Perú / IICA. Lima, Perú. 73 p.
- Infante, D; Martínez, B; González, N; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal*. La Habana, CU. 24(1):14-21.
- Jaimes, A; Coronado, R and Jaimes, Y. 2008. Evaluación in vitro e in vivo de cinco cepas de *Bacillus* sp., como agentes de biocontrol de *Moniliophthora roreri*. Memorias del Seminario Internacional de Cacao: Avances de Investigación. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Instituto Colombiano Agropecuario. Federación Nacional de Cacaoteros, Bucaramanga, CO 26–27 junio.
- Köhl, J; Gerlagh, M; De Haas, B; Krijger, M.1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology*. 88:568-575.
- Krauss U; Ten, M; Hidalgo, E; Matínez, A; Stirrup, T; Arroyo, C; García J; Palacios, M. 2006. The effect of cane molasses amendment biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) and black pod (*Phytophthora* spp.) of cocoa (*Theobroma cacao*) in Panama. *Biological Control*. Panamá. PA. 39(2): 232-239
- Krauss, U. and Soberanis, W. 2003. Biological control of frosty pod (*Moniliophthora roreri*) and other pod pathogens in Peru. In 13° Conferencia Internacional de Investigación en cacao. p. 741-748.
- Krauss, U; Ten, M; Hidalgo, E; Martínez, A; Arroyo, C; García, J; y Portuguese, A. 2003. Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). *Agroforestería en las Américas*. Talamanca, CR. 10:37-38
- Kubicek, C. and Harman, G. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Vol 1. Laylor & Francis Ltd. London, UK.
- López Baez, O; Gonzáles Mejia, O; Lee Rodriguez, V; Alvarado Gaona, A; Ramirez González, SI; Mendez Ramirez, JL; Gehrke Velez, M. 2006. Diagnóstico y técnicas para el manejo de la moniliasis del caco. Chiapas, ME. Universidad Autonoma de Chiapas. 40 p.
- Magdama, F. 2010. Estudio de efectos de bioles y cepas de *Trichoderma* sp aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones in vitro. Tesis Ing. Agric. y Biol. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil, EC. 102 p.

- MAGFOR (Ministerio Agropecuario y Forestal, NI). 2010. Diagnóstico del sector cacao de Nicaragua. Managua, NI. 54 p.
- Martínez, B; Reyes, Y; Infante, D; González, E; Baños H; Cruz A. 2008. Selección de aislados de *Trichoderma* spp., candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp., en arroz. Rev Protección Vegetal. 23(2):118-125
- MEFCCA (Ministerio de Economía Familiar, Comunitaria, Cooperativa y Asociativa, NI). 2013. El cacao en Nicaragua, situación actual y perspectivas. (en línea) Managua, NI .consultado 11 feb 2015. Disponible en: <http://www.magfor.gob.ni/descargas/publicaciones/cafecacao/cacaoactual.pdf>
- Mejía, L., N. Rojas, Z. Maynard, S. Van Bael, E. Arnold, P. Hebbar, G. Samuels, N. Robbins, E. Allen. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. Biological Control 46: 4-14.
- Meza, C; Fernández, R; Valero, N; Gámez, R; Paéz, A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart) Sacc., asociado a la marchitez de la maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología. Medellín, CO. 10(2): 35-43
- Michel, A. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Euascomycetes:Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales). Tesis Dr. Biotec. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Colima, MX. 176 p.
- Miguel Estrada, WJ; Romero Castellano, XG; Moreno Peraza, JA. 2011. Guía técnica del cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas. San Salvador, SV. CATIE. 18 p.
- Molina, G; Zaldúa, S; González, G; Sanfuentes, E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Bosque. Concepción, CL. 27(2):126-134.
- Morandi, M; Sutton, J; Maffia, L. 2000. Effects of host and microbial factor son development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinérea* in rose. European Journal of Plant Pathology. 106:439-448
- Mosquera, L. 2014. Caracterización cultural, morfológica y fisiológica *in vitro* de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al., agente causante de la Moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L), en comunidades kichwas amazónicas de la provincia de Napo-Ecuador. Tesis Ing. Agrop. Universidad Estatal Amazónica. Pastaza, EC. 89 p.
- Mumpuni, A; Sharma, S; Brown, A. 1998. Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. Applied and Enviromental Microbiology. 64(12):5053-5056.

- Osborne, L. and Landa, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Fla. Entomol. 75: 456-471.
- Panizo, M; Reviákina, V; Montes, W; González, G. 2005. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 25(1):35-40.
- Phillips, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.*, as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Tesis Ph.D. Londres, Inglaterra. Universidad de Reading. 349 p.
- Phillips, W. 2006. La moniliasis del cacao: Un enemigo que podemos y debemos vencer. In Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo, Ecuador. p. 21-25.
- Phillips, W; Coutiño, A; Ortíz, CF; López, AP; Hernández, J; Aime, MC. 2006. Primer reporte de *Monilophthora roreri* causante de la moniliasis (moniliasis disease) del cacao en México. Plant Pathology. 55(4):584.
- Pionteli, E. y Giusiano, G. 2003. Notas micológicas VI: Selección de microhongos asociados a material vegetal y queratina desde Argentina y Chile. Boletín Micológico 18:89-99.
- Ramírez, S; López, O; Guzmán, T; Munguía, S; Moreno, J. 2011. El polisulfuro de calcio en el manejo de la moniliasis *Moniliophthora roreri* (Cif & Par Evans *et al.*) del cacao (*Theobroma cacao* L.) Tecnología en Marcha. 24(4):10-18.
- Rodríguez, G; Flores, E; León, B; Arévalo, E. 2011. Caracterización morfológica de hongos endófitos asociados a cacao nativo y su capacidad antagonica para el control de *Moniliophthora perniciosa*. Universidad Nacional de San Martín. Facultad de Ciencias Agrarias. San Martín, PE. 21 p.
- Rodríguez, M y Chico, J. 2013. Efecto antagonico in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinifera*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Trujillo, PE. 33(2): 42-49
- Rodríguez, Y y Osorio, J. 2005. Evaluación de microorganismos por su potencial antagonico para el control biológico de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans *et al.*, agente causal de la Moniliasis del cacao. Fitopatología Colombiana. 28(1):14-20.
- Salazar, W; Tórrez, E; Caballero, A. 2014. Control Biológico de Enfermedades de Plantas en Nicaragua. In Bettioli, W; Rivera, M; Mondino, P; Montealegre, J; Colmenárez, Y. Eds. Control Biológico de Enfermedades de Plantas en America Latina y el Caribe. León, NI. p. 287-295.

- Samaniego, J; Ulloa, A; Herrera, T. 1989. Hongos del suelo antagónicos de *Phymatorichum omnivorum*. Fitopatología Mexicana. 7(1):86-95.
- Samuels, G. 2006. Trichoderma: Systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96: 195-206.
- Samuels, G; Suarez, C; Solis, K; Holmes, K; Thomas, S; Adnan, I; Evans, H. 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. Mycol. Res. 110: 381-392.
- Samuels, G. 1996. *Trichoderma*: A review of biology and systematic of the genus. Mycological Research, 100:923-935.
- Sánchez, M. 2009. Aislado y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp nativos del norte de Tamaulipas. Tesis MSc. Q.F.B. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Tampico, MX. 124 p.
- Sánchez, F. y Garcés, F. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans *et al.*, en el cultivo de cacao. Scientia Agropecuaria 3:249-258.
- Schroers, H. 2001. A monograph of Bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. Studies in Mycology. 46:1-214
- Schroers, H; Samuels, G; Seifer, K; Gams, W. 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium* like fungi. Mycology. 91(2):365-385.
- Schubert, M; Mourad, S; Fink, S; Schwarze, F. 2009. Ecophysiological responses of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* (T-15603.1) to combined environmental parameters. Biological Control. 49:84-90.
- Silva, N. 2010. Efectos de fungicidas sobre formulados de los entomopatógenos *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* utilizados contra la mosquita blanca (*Bemisia argentifolii*). Tesis Dr. Biotec. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Nuevo León, MX. 116 p.
- Solarte, C; Rosero, C; Cárdenas, H; Burgos, W; Eraso, J; Zambrano, G. 2009. Identificación de polimorfismo del gen de la Kappa caseína bovina: Nariño-Colombia. Rev Lasallista de Investigación, Nariño, CO. 6(2):39-45.
- Suárez, L. y Rangel, A. 2014. Aislado de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. Acta Agronómica. Santander, CO. 62(4):370-378.
- Suárez, L y Cabrales, C. 2008. Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo patógeno

- nativo *Moniliophthora roreri* de la región nororiental de Norte de Santander. Santander, CO. 13(1): 45-56.
- Sutton, J; Li, D; Peng, G; Yu, H; Zhang, P; Valdebenito, R. 1997. *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. Plant Dis. 81: 316-328.
- Ten-Hoppen, G; Rees, R; Aisa, P; Stirrup, T; Krauss, U. 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cocoa*). Mycological Research. 107:587-596.
- Uquillas, L. 2004. Inducción de la germinación para mejorar la eficacia de dos agentes antagonicos para el control de la monilia (*Crinipellis roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). Tesis MSc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, CR. 72 p.
- Uzunović, A. and Webber, J. 1998. Comparison of bluestain fungi grown *in vitro* and in freshly cut pine billets. European Journal of Forest Pathology 28:323-334.
- Valencia, J. y Castro, B. 2004. Aspectos biológicos de aislado de *Trichoderma* sp antagonicos a *Rosellinia bunodes*. CENICAFE. Caldas, CO. 55(1):16-28.
- Villamil, J; Viteri, S; Villegas, W. 2015. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par., en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de Campo. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín, CO. 68(1):7441-7450.
- Villamil, J; Blanco, J; Viteri, S. 2012. Evaluación in vitro de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, CO. 65(1):6305-6315.
- Villavicencio, M. 2010. “Caracterización morfológica, fisiológica y patológica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. Tesis. Ing. Agric. y Biol. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil, EC. 59 p.
- Wardle, D; Parkinson, D; Waller, J. 1993. Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. Oecologia. 94:165-172
- Zaldúa, S. 2012. Caracterización de cepas de *Clonostachys rosea* para el control de *Botrytis cinerea* en viveros de *Eucalyptus globulus*. Tesis Dr. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales. Concepción, CL. 134 p.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Zonas cacaoteras y georreferenciación de las fincas en estudio.

Zona	Comunidad	Finca	Coordenadas		T (°C)	Altitud (msnm)
			Lat. N	Long. O		
Siuna	El Bálsamo	Lino Jarquín	13°39'28.40''	84°58'43.30''	23-30	235
El Rama	La Esperanza	El Recreo	12°10'29.58''	84°18'58.06''	27-30	21
Rancho Grande	Buenos Aires	El Diamante	13°14'33.12''	84°31'49.78''	25-27	615
	Las Carpas 3	Santa Marta	13°17'30.66''	85°32'54.22''	25-27	789
	Las Brisas	Las Vegas	13°16'25.70''	85°29'34.45''	25-27	607
	La Curva	El Rosario	13°14'49.41''	85°34'06.11''	25-28	641

Anexo 2. Descripción de los tratamientos en cultivo dual antagonistas - patógeno. UNA, Managua, 2015.

Antagonistas <i>Trichoderma</i> sp	Aislados <i>M. royeri</i>			
	MLV	MSM	MUF-29 2	MUF-29 12
TLVC	TLVC - MLV	TLVC - MSM	TLVC - MUF-29 2	TLVC - MUF-29 12
TLVS	TLVS - MLV	TLVS - MSM	TLVS - MUF-29 2	TLVS - MUF-29 12
TERC	TERC - MLV	TERC - MSM	TERC - MUF-29 2	TERC - MUF-29 12
TERS	TERS - MLV	TERS - MSM	TERS - MUF-29 2	TERS - MUF-29 12
TSMF	TSMF - MLV	TSMF - MSM	TSMF - MUF-29 2	TSMF - MUF-29 12
TSMS	TSMS - MLV	TSMS - MSM	TSMS - MUF-29 2	TSMS - MUF-29 12
TRE3	TRE3 - MLV	TRE3 - MSM	TRE3 - MUF-29 2	TRE3 - MUF-29 12
TRE6	TRE6 - MLV	TRE6 - MSM	TRE6 - MUF-29 2	TRE6 - MUF-29 12
TRE9	TRE9 - MLV	TRE9 - MSM	TRE9 - MUF-29 2	TRE9 - MUF-29 12
TBA2	TBA2 - MLV	TBA2 - MSM	TBA2 - MUF-29 2	TBA2 - MUF-29 12
TBOS3	TBOS3-MLV	TBOS3-MSM	TBOS3-MUF-29 2	TBOS3-MUF-29 12
<i>Paecilomyces</i>	MLV	MSM	MUF-29 2	MUF-29 12
PaER	PaER - MLV	PaER - MSM	PaER - MUF-29 2	PaER - MUF-29 12
PaRe	PaRe - MLV	PaRe - MSM	PaRe - MUF-29 2	PaRe - MUF-29 12
PaLV	PaLV - MLV	PaLV - MSM	PaLV - MUF-29 2	PaLV - MUF-29 12
PaBA	PaBA - MLV	PaBA - MSM	PaBA - MUF-29 2	PaBA - MUF-29 12
PaSM	PaSM - MLV	PaSM - MSM	PaSM - MUF-29 2	PaSM - MUF-29 12
<i>Clonostachys</i> sp	MLV	MSM	MUF-29 2	MUF-29 12
Clonost	Clonost- MLV	Clonost - MSM	Clonost - MUF-29 2	Clonost - MUF-29 12

Anexo 3. Análisis de la varianza del Crecimiento Radial de *Trichoderma* sp en mm.hora⁻¹

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
crecradhora	176	1.00	1.00	2.94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	37.47	43	0.87	1218.75	<0.0001
Tiempo	33.15	3	11.05	15453.91	<0.0001
Aislado tricho	3.13	10	0.31	437.24	<0.0001
Tiempo*aisladotricho	1.20	30	0.04	55.74	<0.0001
Error	0.09	132	7.1		
Total	37.56	175			

Anexo 4. Separación de medias del crecimiento radial medio de aislados de *Trichoderma* sp en mm.día⁻¹

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.03050

Error: 0.0007 gl: 132

aisladotricho	Medias	n	E.E.	
ERS	0.68	16	0.01	A
LVC	0.71	16	0.01	A
BOS3	0.79	16	0.01	B
R9	0.89	16	0.01	C
SMF	0.92	16	0.01	D
ERC	0.92	16	0.01	D
BA2	0.94	16	0.01	D
LVS	0.94	16	0.01	D
R6	1.00	16	0.01	E
R3	1.07	16	0.01	F
SMS	1.14	16	0.01	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 5. Análisis de la Varianza del Crecimiento Radial de *Paecilomyces* sp en mm.día⁻¹

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
crecrad	90	1.00	1.00	2.34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9086.66	29	313.33	1125.75	<0.0001
Tiempo	8075.38	5	1615.08	5802.67	<0.0001
Aislado paec	766.31	4	191.58	688.30	<0.0001
Tiempo*aisladopaec	244.97	20	12.25	44.01	<0.0001
Error	16.70	60	0.28		
Total	9103.36	89			

Anexo 6. Separación de medias del crecimiento radial medio de aislados de *Paecilomyces* sp en mm.día⁻¹

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.49459

Error: 0.2783 gl: 60

aisladopaec	Medias	n	E.E.	
PaBA	18.74	18	0.12	A
PaSM	19.64	18	0.12	B
PaRe	23.52	18	0.12	C
PaER	23.98	18	0.12	C
PaLV	26.63	18	0.12	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 7. Análisis de la Varianza del Crecimiento Radial de *Moniliophthora roreri* en mm.día⁻¹

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
crecrad	140	1.00	1.00	2.64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19770.60	19	1040.56	2074.89	<0.0001
Tiempo	19671.52	4	4917.88	9806.34	<0.0001
Aisladomon	42.05	3	14.02	27.95	<0.0001
Tiempo*amon	57.03	12	4.75	9.48	<0.0001
Error	60.18	120	0.50		
Total	19830.78	139			

Anexo 8. Separación de medias del crecimiento radial medio de aislados de *Moniliophthora roreri* en mm.día⁻¹

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.44314

Error: 0.5015 gl: 120

aisladomon	Medias	n	
LV	26.34	35	A
UF-29 2	26.37	35	A
SM	26.73	35	A
UF-29 12	27.69	35	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 9. Análisis de Varianza del PICR (*Trichoderma - Moniliophthora*)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PICR	264	0.64	0.56	6.71

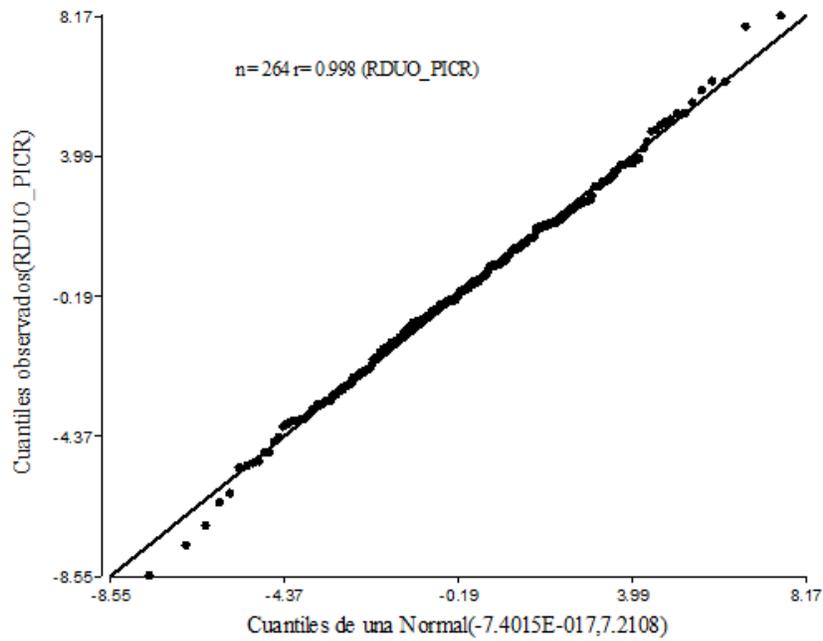
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3314.34	43	77.08	8.94	<0.0001
<i>Trichoderma</i>	763.41	10	76.34	8.86	<0.0001
patógeno	1999.07	3	666.36	77.30	<0.0001
<i>Trichoderma</i> *patógeno	551.86	30	18.40	2.13	0.0010
Error	1896.44	220	8.62		
Total	5210.78	263			

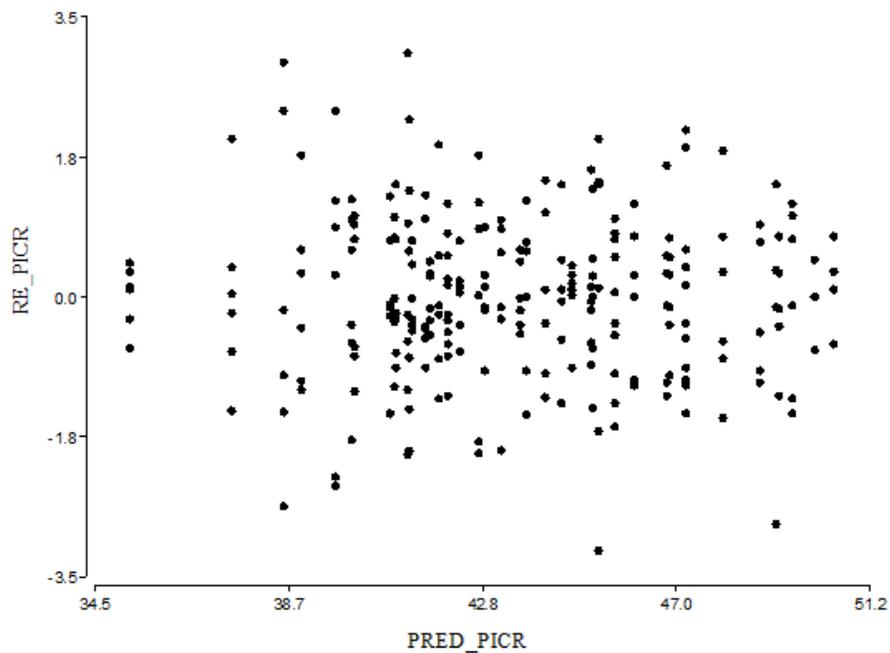
Anexo 10. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilks (modificado) del PICR (*Trichoderma - Moniliophthora*)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO PICR	264	0.00	2.69	0.99	0.9412

Anexo 11. Prueba gráfica de normalidad con QQ-plot (*Trichoderma -Moniliophthora*)



Anexo 12. Prueba de homogeneidad mediante un gráfico de dispersión (*Trichoderma - Moniliophthora*)



Anexo 13. Análisis de Varianza del PICR (*Paecilomyces/Clonostachys-Moniliophthora*)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PICR	120	0.84	0.81	2.98

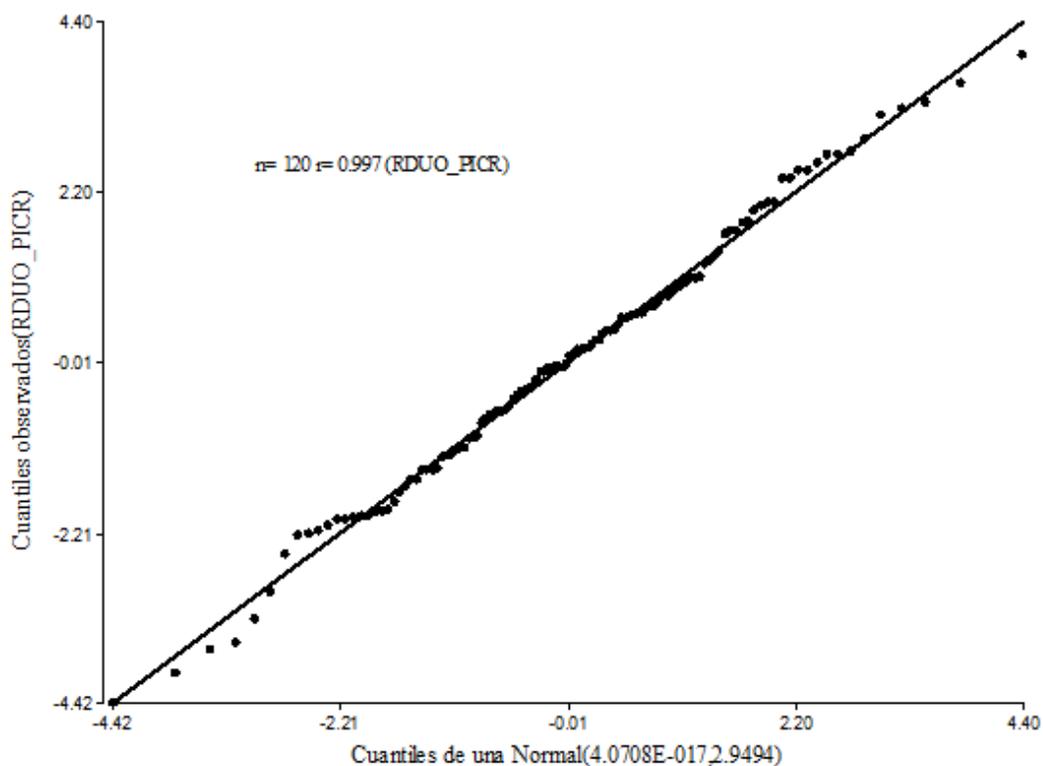
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1904.43	23	82.80	22.65	<0.0001
PaecClonos	786.32	5	157.26	43.01	<0.0001
patógeno	345.79	3	115.26	31.53	<0.0001
PaecClonos*patógeno	772.33	15	51.49	14.08	<0.0001
Error	350.98	96	3.66		
Total	2255.41	119			

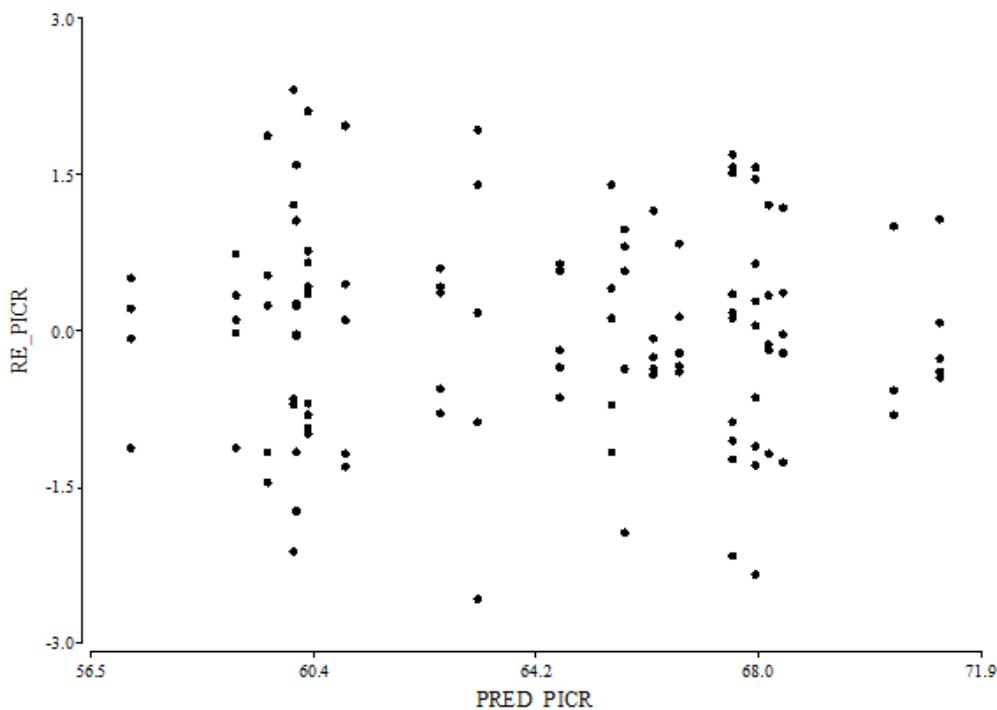
Anexo 14. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilks (modificado) del PICR (*Paecilomyces/Clonostachys-Moniliophthora*)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO PICR	120	0.00	1.72	0.98	0.5295

Anexo 15. Prueba gráfica de normalidad con QQ-plot (*Paecilomyces/Clonostachys-Moniliophthora*)



Anexo 16. Prueba de homogeneidad mediante un gráfico de dispersión (*Paecilomyces/Clonostachys-Moniliophthora*)



Anexo 17. Resultado de la prueba de Tukey ($P < 0.05$) de la variable crecimiento radial (mm.h^{-1}) para los once aislados de *Trichoderma* sp.

Medias de crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp (Aislados*tiempo)				
Aislados	mm.h^{-1}			
	12	24	36	48
TERS	7.15 a	11.98 de	19.63 j	27.03 m
TBOS3	7.70 a	15.20 fg	23.83 kl	29.60 n
TERC	7.73 a	16.60 gh	26.73 m	37.45 q
TLVC	7.83 ab	13.50 ef	19.45 j	27.33 m
TBA2	8.08 ab	17.25 hi	27.70 m	36.98 pq
TSMF	8.08 ab	16.93 ghi	27.28 m	36.15 pq
TLVS	8.15 ab	17.45 hi	27.45 m	37.28 q
TRE6	8.48 ab	17.28 hi	28.40 mn	42.10 r
TRE9	8.53 ab	16.60 gh	24.90 l	35.23 p
TRE3	9.53 bc	18.65 ij	29.85 n	44.40 s
TSMS	10.43 cd	22.10 k	32.65 o	44.53 s

Anexo 18. Resultado de la prueba de Tukey ($P < 0.05$) de la variable crecimiento radial (mm.día^{-1}) para los cinco aislados de *Paecilomyces* sp.

Medias de crecimiento radial <i>Paecilomyces</i> sp. (Aislados*tiempo)						
Aislado	mm.h⁻¹					
	72	144	216	288	360	432
PaSM	8.50 a	12.53 c	16.83 e	21.77 gh	26.37 j	31.87 l
PaBA	8.83 ab	12.27 c	16.37 e	20.27 fg	24.60 i	30.10 k
PaRe	9.20 ab	13.77 cd	19.37 f	26.37 j	33.37 l	39.03 n
PaER	9.33 ab	14.37 d	21.03 fg	27.37 j	33.03 l	38.77 mn
PaLV	10.30 b	16.37 e	22.93 hi	29.53 k	37.10 m	43.53 o

Anexo 19. Resultado de la prueba de Tukey ($P < 0.05$) de la variable crecimiento radial (mm.día^{-1}) para los cinco aislados de *Moniliophthora roreri*

Medias de crecimiento radial <i>M. roreri</i> (Aislados*tiempo)					
Aislados	mm.h⁻¹				
	72	144	216	288	360
MUF-29 2	9.80 a	17.49 cd	26.27 fg	36.27 i	42.00 j
MLV	9.87 a	16.47 c	25.69 f	36.10 i	43.56 k
MUF-29 12	10.97 ab	19.23 e	27.30 g	36.83 i	44.13 k
MSM	11.46 b	17.97 de	26.26 fg	34.13 h	43.81 k

Anexo 20. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (*Moniliophthora*Trichoderma*)

Aislados	Aislados <i>M. roreri</i>			
	MLV	MSM	MUF-29 2	MUF-29 12
TERS	35.27 a	37.45 ab	42.12 bcdefgh	45.68 efghijkl
TLVC	40.97 abcdef	40.85 abcdef	48.00 ghijkl	45.35 defghijkl
TLVS	40.98 abcdef	38.57 abc	47.22 fghijkl	44.20 cdefghijkl
TERC	41.35 abcdefg	41.27 abcdef	45.23 cdefghijkl	41.92 abcdefg
TBA2	41.73 abcdefg	42.37 bcdefgh	46.82 fghijkl	46.10 efghijkl
TBOS3	42.12 bcdefgh	41.62 abcdefg	49.22 ijkl	44.57 cdefghijkl
TRE9	42.88 bcdefghij	40.12 abcde	48.80 hijkl	40.05 abcde
TRE6	43.25 bcdefghij	39.68 abcde	46.87 fghijkl	43.80 bcdefghijkl
TSMF	43.65 bcdefghijk	38.95 abcd	49.15 ijkl	45.70 efghijkl
TSMS	44.78 cdefghijkl	42.77 bcdefghi	50.00 kl	49.52 jkl
TRE3	45.18 cdefghijkl	41.23 abcdef	50.40 l	47.22 fghijkl

Anexo 21. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial
(*Moniliophthora*Paecilomyces/Clonostachys*).

Aislados	Aislados <i>M. roleri</i>			
	MUF-29 2	MUF-29 12	MSM	MLV
PaBA	57.24 a	59.04 ab	60.94 abc	60.30 abc
PaER	59.60 ab	68.02 fgh	64.62 cdef	66.24 defg
PaRe	60.08 ab	68.02 fgh	65.52 def	67.62 efgh
PaSM	60.10 abc	71.18 h	60.04 ab	60.30 abc
Clonost	65.74 def	66.68 defgh	63.22 bcde	67.62 efgh
PaLV	70.40 gh	68.48 fgh	68.24 fgh	62.58 bcd