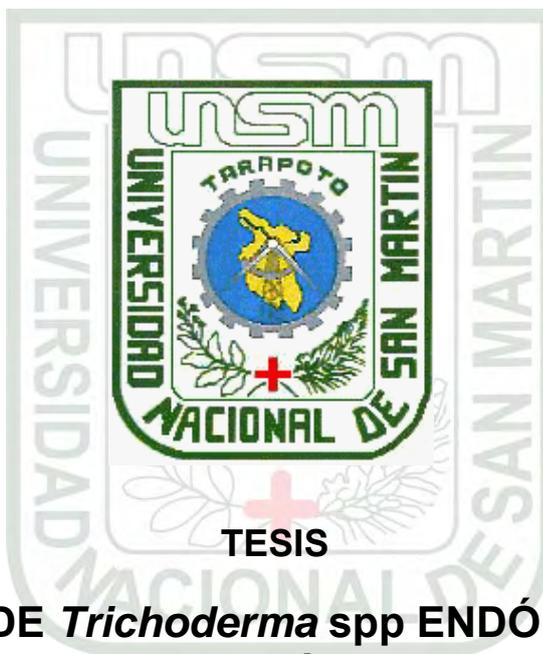




Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL**  
**ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**“INFLUENCIA DE *Trichoderma* spp ENDÓFITO SOBRE EL  
CRECIMIENTO E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA AL  
ESTRÉS HÍDRICO EN CACAO (*Theobroma cacao* L.)”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**  
**INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:**  
**ERICK TRIGOZO BARTRA**

**TARAPOTO – PERÚ**

**2012**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL  
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE AGRONOMÍA  
ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS**

**TESIS**

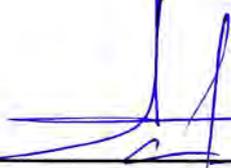
**“INFLUENCIA DE *Trichoderma* spp ENDÓFITO SOBRE EL  
CRECIMIENTO E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA AL  
ESTRÉS HÍDRICO EN CACAO (*Theobroma cacao* L.)”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:  
ERICK TRIGOZO BARTRA**

  
\_\_\_\_\_  
Ing. M.Sc. Carlos Rengifo Saavedra  
**Presidente**

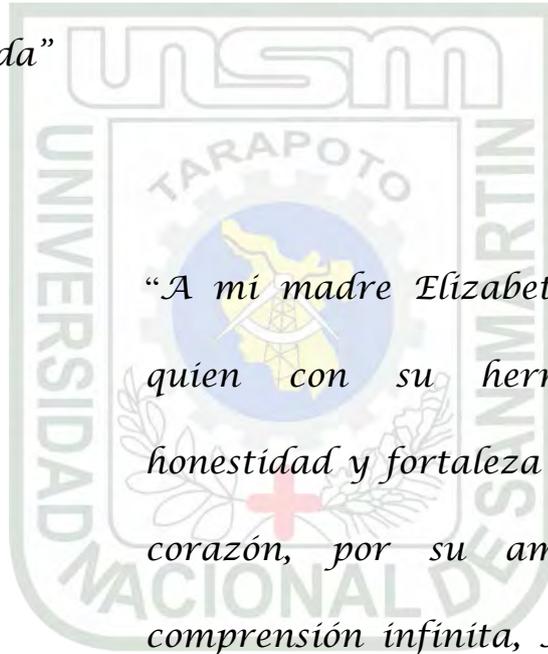
  
\_\_\_\_\_  
Ing. M.Sc. Manuel Santiago Doria Bolaños  
**Secretario**

  
\_\_\_\_\_  
Ing. M.Sc. Agustín Cerna Mendoza  
**Miembro**

  
\_\_\_\_\_  
Ing. Eybis José Flores García  
**Asesor**

## DEDICATORIA:

*“A Dios por darme la libertad de vivir  
y permitirme culminar una meta  
propuesta en mi vida”*



*“A mi madre Elizabeth Bartra Ramírez  
quien con su hermoso ejemplo de  
honestidad y fortaleza alienta siempre mi  
corazón, por su amor de madre y  
comprensión infinita, A mi padre Mauro  
Trigozo Paredes, por su incondicional  
apoyo, por sus invaluable consejos que  
fortalecen mi alma y encaminan mi vida”.*

*“A Fernando por el apoyo desmerecido  
e incondicional que me brinda día a  
día, por su aliento de hermano y por el  
hermoso regalo de existir en mi vida”.*

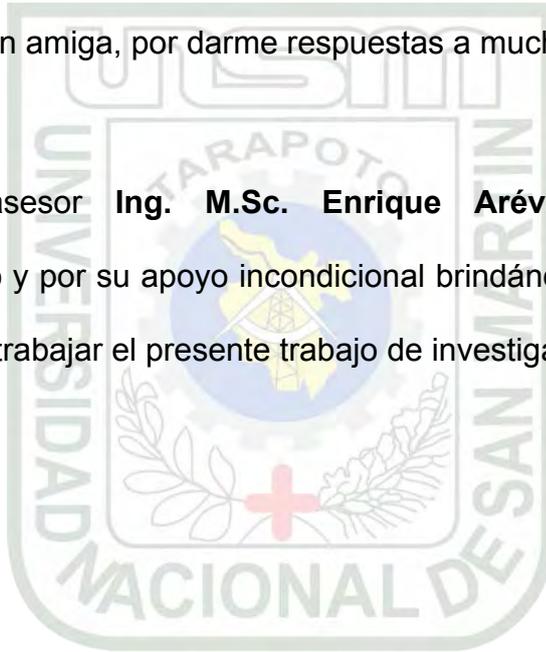
*“A mis Abuelitos Wilson Bartra y Tarsila  
Ramírez, José Trigozo y Mercedes Paredes,  
quienes con sus bendiciones y sabios  
consejos me ayudaron a encontrar la  
verdad en la oscuridad”.*



## *AGRADECIMIENTO ESPECIAL*

A mi co-asesora **Ing. M.Sc. Betsabe Leon Ttacca** por dedicar su tiempo, dedicación y sus conocimientos para guiarme, y el excelente asesoramiento recibido, además de ser una gran amiga, por darme respuestas a muchas interrogantes.

A mi co-asesor **Ing. M.Sc. Enrique Arévalo Gardini**, por el asesoramiento recibido y por su apoyo incondicional brindándome las facilidades de laboratorio para poder trabajar el presente trabajo de investigación.



## **AGRADECIMIENTO:**

A la Universidad Nacional de San Martín-T, alma mater que contribuyó a mi formación profesional.

Al Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), por brindarme sus instalaciones, y comprometerse siempre con el desarrollo de la región con la aplicación de nuevas tecnologías para el mejoramiento de la agricultura, a la vanguardia del progreso campesino.

Al Ing. Eybis José Flores García, por ser un maravilloso docente y amigo en toda circunstancia.

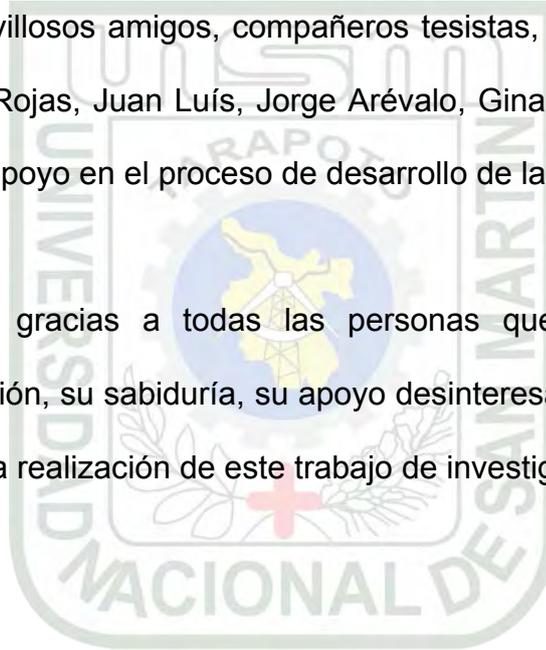
Agradecer infinitamente a toda la familia del ICT, en especial a mis grandes amigos y compañeros de trabajo, Jaime Cayotopa, Delmar Olivera, Mar Gárate, Juan Arévalo, Rolando Ramírez, Boris Gutarra, y Mayer Obando por su gran amistad, gran espíritu y calidad humana, por ser ante todo cada uno amigos incondicionales de gran espíritu y calidad humana, en todo momento especial que compartí con ellos.

A mis grandes amigos, Ing. Paquita Lao e Ing. Kadir Márquez que me ayudaron en todo momento durante la realización de la tesis.

A un gran amigo y hermano Jack Flavio Viena Bardales, quien con su constante apoyo, me ayudó a darme cuenta de mis errores y a ser una mejor persona.

A mis maravillosos amigos, compañeros tesis, Edín Vílchez, Ginsberg Rodríguez, Marcelino Rojas, Juan Luís, Jorge Arévalo, Gina Paola Sánchez y Juan Cueva, gracias por el apoyo en el proceso de desarrollo de la tesis.

Muchísimas gracias a todas las personas que me ayudaron y me brindaron su colaboración, su sabiduría, su apoyo desinteresado y por sobre todo su gran amistad durante la realización de este trabajo de investigación.



## CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Consideraciones previas del cultivo de cacao	4
3.1.1 Descripción de la planta	4
3.1.2 Importancia económica-social	4
3.1.3 Taxonomía	5
3.1.4 Requerimientos ambientales	6
3.2 Agua en el suelo y la planta	6
3.2.1 Importancia del agua	7
3.2.2 Retención de agua por el suelo	8
3.2.3 Riego	9
3.2.3.1 Humedad en el suelo	9
3.2.3.2 Medición de la humedad del suelo	9
3.2.4 Estrés hídrico por déficit y crecimiento de los cultivos	10
3.2.4.1 Mecanismo de resistencia a la sequía	13
3.2.4.1.1 Escape a la sequía	14
3.2.4.1.2 Tolerancia a la sequía con altos potenciales de agua	14
3.2.4.1.3 Tolerancia a la sequía con bajos potenciales de agua	15
3.2.5 Efectos fisiológicos del estrés hídrico	17
3.2.6 Estados de marchitez	18
3.3 Hongos endófitos	19
3.4 Generalidades de <i>Trichoderma</i>	20
3.4.1 Características	20
3.4.2 Clasificación taxonómica	22
3.4.3 Condiciones de crecimiento	22
3.5 Interacciones <i>Trichoderma</i> - planta	26
3.5.1 <i>Trichoderma</i> en el desarrollo de la planta y la resistencia a patógenos	26
3.5.2 Colonización de <i>Trichoderma</i> , en las raíces	27
3.5.3 Promoción de crecimiento vegetativo en las plantas	28
3.5.4 Inducción de resistencia al estrés	31
3.5.5 Antecedentes respecto a la sequía en cacao y <i>Trichoderma</i>	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1 Ubicación del experimento	33

4.2	Materiales de estudio	33
4.2.1	Aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito	33
4.2.2	Genotipos utilizados	34
4.2.3	Esterilización de suelo	34
4.3	Metodología	35
4.3.1	Preparación de medios de cultivo	35
4.3.1.1	Papa sacarosa agar (PSA)	35
4.3.1.2	Agar agua (AA)	35
4.3.1.3	Corn meal dextrosa agar (CMDA)	35
4.3.2	Reactivación de <i>Trichoderma</i>	35
4.3.3	Producción del <i>Trichoderma</i>	36
4.3.4	Preparación de sustrato con biodac	36
4.3.5	Obtención de semillas pre germinadas	36
4.3.6	Colonización de <i>Trichoderma</i> en plantas de cacao	37
4.3.6.1	Método 1: Inoculación de semillas con <i>Trichoderma</i> endófito	37
4.3.6.2	Método 2: Infestación de suelo con <i>Trichoderma</i> endófito	38
4.3.6.3	Reaislamiento de <i>Trichoderma</i>	40
4.3.7	Influencia de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento y estrés hídrico de plantas de cacao utilizadas para patrón	41
4.3.7.1	Crecimiento de plantas colonizadas con <i>Trichoderma</i>	41
4.3.7.2	Inducción de estrés hídrico a la planta	42
4.3.8	Diseño experimental	43
4.3.9	Parámetros a evaluar	44
4.3.9.1	Porcentaje de colonización	44
4.3.9.2	Índice de colonización	45
4.3.9.3	Altura de planta	45
4.3.9.4	Diámetro de tallo	45
4.3.9.5	Número de hojas	45
4.3.9.6	Grado de marchitez	46
4.3.9.7	Peso fresco y seco de la biomasa	46
4.3.9.8	Porcentaje de agua	46
4.3.9.9	Tasa absoluta de crecimiento	46
4.3.9.10	Longitud de raíz	47
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1	Resultados	48
5.1.1	Colonización endofítica de <i>Trichoderma</i> en plántulas de cacao	48

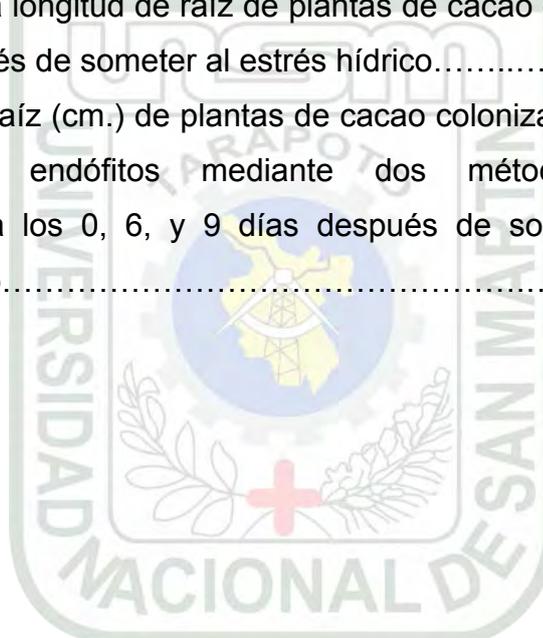
5.1.1.1 Índice y porcentaje de colonización	49
5.1.2 Influencia de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de plantas de cacao	52
5.1.2.1 Tasa de crecimiento de la planta	52
5.1.2.2 Altura de planta	59
5.1.2.3 Diámetro de tallo	64
5.1.2.4 Longitud de raíz	67
5.1.2.5 Número de hojas	71
5.1.2.6 Peso seco	74
5.1.3 Efecto de plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófito al estrés hídrico	78
5.1.3.1 Grado de marchitez de las plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófito	78
5.1.3.2 Tasa absoluta de crecimiento durante el estrés hídrico	84
5.1.3.3 Porcentaje de agua en la planta durante el estrés hídrico	90
5.1.3.4 Longitud de raíz de la planta durante el estrés hídrico	98
5.2 Discusión	103
5.2.1 Colonización endofítica de <i>Trichoderma</i> en plántulas de cacao	103
5.2.2 Influencia de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de plantas de cacao	104
5.2.3 Efecto de plantas de cacao asociadas con <i>Trichoderma</i> endófito al estrés hídrico	107
VI. CONCLUSIONES	110
VII. RECOMENDACIONES	112
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
RESUMEN	125
SUMMARY	127
ANEXOS	129

## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Procedencia de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófitos.....	34
2	Efecto de los métodos de inoculación, en el porcentaje (%) de colonización de <i>Trichoderma</i> endófito en plantas de cacao.....	49
3	Porcentaje (%) e índice de colonización de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito en plantas de cacao mediante dos métodos de inoculación.....	49
4	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito en la tasa de crecimiento de plantas de cacao de 32 días de edad.....	53
5	Tasa de crecimiento de plantas de cacao de 32 días de edad colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación.....	58
6	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito en la altura de planta de cacao de 32 días de edad.....	59
7	Altura de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación.....	63
8	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito en el diámetro de tallo de plantas de cacao de 32 días de edad.....	64
9	Diámetro de tallo de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación.....	66
10	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito en la longitud de raíz de plantas de cacao de 32 días de edad.....	67

<b>11</b>	Longitud de raíces de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación.....	70
<b>12</b>	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito en el número de hojas de plantas de cacao de 32 días de edad.....	71
<b>13</b>	Número de hojas de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación.....	73
<b>14</b>	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito en el peso seco de plantas de cacao de 32 días de edad.....	75
<b>15</b>	Peso seco de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos, mediante dos métodos de inoculación.....	77
<b>16</b>	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito en el grado de marchitez de plantas de cacao de 0, 6 y 9 días después de someter al estrés hídrico.....	79
<b>17</b>	Grado de marchitez de plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación a los 0, 6, y 9 días después de someter al estrés hídrico.....	83
<b>18</b>	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito sobre la tasa absoluta de crecimiento de plantas de cacao durante el estrés hídrico.....	85
<b>19</b>	Tasa absoluta de crecimiento de plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófito mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico.....	89
<b>20</b>	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito en el porcentaje de agua de plantas de cacao a los 0, 6 y 9 días después de someter al estrés hídrico.....	92

<b>21</b>	Porcentaje de agua de plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación a los 0, 6 y 9 días después de someter al estrés hídrico.....	97
<b>22</b>	Efecto de los métodos de inoculación de <i>Trichoderma</i> endófito en la longitud de raíz de plantas de cacao de 0, 6 y 9 días después de someter al estrés hídrico.....	99
<b>23</b>	Longitud de raíz (cm.) de plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación a los 0, 6, y 9 días después de someter al estrés hídrico.....	102



## INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Mecanismos de resistencia a la sequía.....	17
2	Laboratorio de Fitopatología ubicada en la estación experimental “Juan Bernito” – ICT.....	33
3	Obtención de semillas pre germinadas.....	37
4	Inoculación de semillas con <i>Trichoderma</i> endófito.....	38
5	Infestación de suelo con <i>Trichoderma</i> endófito.....	39
6	Siembra de semillas en suelo infestado con <i>Trichoderma</i> endófitos.....	40
7	Reaislamiento de <i>Trichoderma</i> a partir de tejidos de plantas de cacao.....	41
8	Influencia de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento.....	42
9	Parámetros de evaluación durante la inducción de estrés hídrico a la planta.....	43
10	Porcentaje de colonización de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófitos en plántulas de cacao, inoculadas con dos métodos de inoculación.....	51
11	Tasa de crecimiento las plántulas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos, mediante dos métodos de inoculación.....	54
12	Tasa de crecimiento de hipocotilo y epicotilo, de las plántulas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos, mediante dos métodos de inoculación.....	55
13	Tasa de crecimiento del diámetro de tallo de las plántulas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos, mediante dos métodos de inoculación.....	56
14	Altura de plántulas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación.....	60

<b>15</b>	Altura de hipocotilo y epicotilo de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación.....	61
<b>16</b>	Diámetro de tallo, en plántulas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos, mediante dos métodos de inoculación .....	65
<b>17</b>	Longitud de raíz en plántulas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos, mediante dos métodos de inoculación .....	68
<b>18</b>	Número de hojas promedio de plántulas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos, mediante dos métodos de inoculación.....	72
<b>19</b>	Peso seco de plantas de cacao colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófitos, mediante dos métodos de inoculación.....	76
<b>20a</b>	Grado de marchitez promedio de plántulas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación, en estado de estrés hídrico.....	80
<b>20b</b>	Grado de marchitez promedio de plántulas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófitos mediante dos métodos de inoculación, en estado de estrés hídrico.....	81
<b>21</b>	Tasa absoluta de crecimiento de la biomasa seca aérea (TAC-A) de plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófito, mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico.....	86
<b>22</b>	Tasa absoluta de crecimiento de la biomasa seca radicular (TAC-R) de plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófito, mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico.....	87
<b>23</b>	Porcentaje de agua en la parte aérea de plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófito, mediante dos métodos de inoculación, en estado de estrés hídrico.....	93

<b>24</b>	Porcentaje de agua radicular de plantas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófito, mediante dos métodos de inoculación, en estado de estrés hídrico.....	94
<b>22</b>	Longitud de raíces de plántulas de cacao colonizadas con <i>Trichoderma</i> endófito, mediante dos métodos de inoculación, en estado de estrés hídrico.....	100



## I. INTRODUCCIÓN.

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es una especie originaria del bosque húmedo tropical del Noreste de América del sur, de la región amazónica (Cuatrecasas, 1964). De ahí, se dispersó de modo natural al resto del continente americano, y luego con la ayuda del hombre, al resto de las regiones tropicales del mundo (PDA, 2007).

El cacao por ser cultivado en climas tropicales, necesita una buena distribución de agua durante todo el año, ya que es muy sensible a la falta de humedad en el suelo, siendo intolerante a la sequía y la producción se ve muy afectada por las sequías periódicas y lluvias estacionales, a efecto de esto se produce un estrés hídrico en las plantas de cacao produciendo en esta retraso en el crecimiento y en casos extremos la muerte de la planta. En este contexto, la pérdida de presión de turgencia como una consecuencia del desbalance del contenido de agua, puede resultar en crecimiento reducido o ausencia total de crecimiento bajo condiciones secas en el suelo. El estrés hídrico en las plantas es uno de los mayores factores limitantes en la producción de las cosechas. Así, a raíz del estrés hídrico causa inhibición del crecimiento en las plantas de cacao (Belsky y Siebert, 2003).

En recientes investigaciones, se aisló e identificó a muchas especies de *Trichoderma* que son endófitos de cacao, incluso se encuentran en la superficie del suelo (Holmes *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2008). En el cacao, las especies de *Trichoderma* son principalmente objeto de estudio por su capacidad para controlar enfermedades (Bastos, 1996; Evans *et al.*, 2003., Holmes *et al.*, 2006., Bailey *et al.*, 2008). Especies de *Trichoderma* son comúnmente considerados como habitantes saprófitos del suelo, pero algunos existen como simbioses de plantas oportunistas, avirulentas (Wilson, 1997., y Harman *et al.*, 2004). Actividades beneficiosas

atribuidas a la interacción *Trichoderma*/planta incluyen la resistencia a enfermedades causada por patógenos, la promoción del crecimiento vegetal, y la tolerancia de estrés abiótico como la sequía (Harman *et al.*, 2004).

Los organismos endófitos, particularmente los hongos como *Trichoderma*, han recibido una creciente atención en los años recientes. Este grupo de microorganismos viven asintóticamente dentro de tejidos vegetales sanos, y han mostrado poseer un gran potencial económico en la agricultura. Son organismos que viven en asociación con plantas en la mayor parte o en todo su ciclo de vida, y se encuentran en los espacios intercelulares y, algunas veces, intracelularmente en las hojas y tallos de muchas plantas (Salgado y Cepero, 2005). Estos *Trichodermas* endófitos influyen en el crecimiento de la planta, aumentando el sistema radicular mediante la formación de pelos absorbentes, esto hace que la planta tenga mayor área radicular y así un mejor desarrollo fisiológico; además *Trichoderma* tiene las bondades de crear resistencia al estrés hídrico en la planta (Harman *et al.*, 2004).

Actualmente el Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) cuenta con una colección de hongos endófitos, entre ellos, aislamientos del género *Trichoderma* que fueron colectados en tres expediciones realizadas en el Alto Amazonas durante los años 2008-2009.

Debido a la importancia que tienen estos microorganismos en la respuesta del cacao a la sequía, se desarrolló el presente trabajo de investigación en el laboratorio e invernadero de fitopatología del ICT con el objetivo de determinar la influencia de la colonización endofítica de *Trichoderma* sobre el crecimiento y estrés hídrico en cacao mediante dos métodos de inoculación.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general.

- Determinar la influencia de *Trichoderma* endófito sobre el crecimiento e inducción de resistencia al estrés hídrico en cacao (*Theobroma cacao* L.).

### 2.2. Objetivos específicos.

- Determinar la colonización endófito de *Trichoderma* spp en plántulas de cacao utilizadas para patrón mediante dos métodos de inoculación.
- Determinar la influencia de *Trichoderma* spp sobre el crecimiento de plántulas de cacao utilizadas para patrón mediante dos métodos de inoculación.
- Determinar el efecto de *Trichoderma* spp en plántulas de cacao al estrés hídrico mediante dos métodos de inoculación.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Consideraciones previas del cultivo de cacao

##### 3.1.1 Descripción de la planta

El árbol de cacao, (*Theobroma cacao* L.) es normalmente pequeño, entre 4 y 8 metros de alto, aunque si recibe sombra de árboles grandes puede alcanzar hasta los 10 metros, su tallo es recto, con madera de color claro, casi blanco, y la corteza es delgada, de color café. El fruto puede alcanzar una longitud de 15-25 centímetros, contiene entre 30 y 40 semillas; las semillas son de color marrón-rojizo en el exterior y están cubiertas de una pulpa blanca y dulce (Barahona, 1987).

Tiene una raíz principal, pivotante, que crece más de un metro de profundidad y sirve para sostener a la planta, con muchas raíces secundarias que se encuentran distribuidas alrededor del árbol y a poca profundidad y son las que se encargan de agarrar los nutrientes del suelo a través de los pelos absorbentes (Navarro *et al*, 2006).

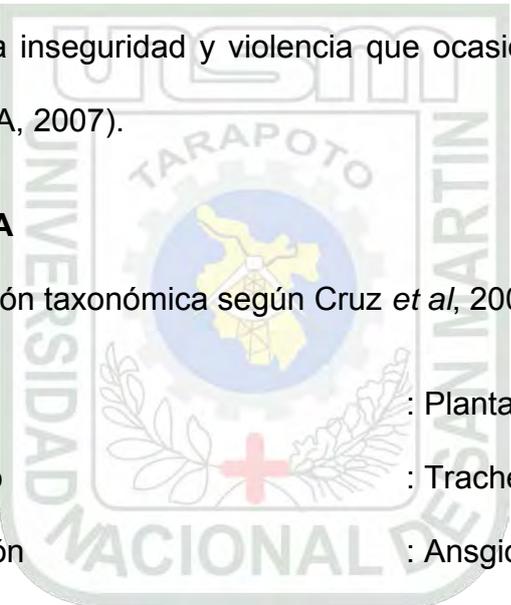
##### 3.1.2 Importancia económico-social:

El cultivo de cacao constituye una de las más valiosas opciones productivas de la Región San Martín, por la creciente demanda del mercado interno, como externo, unido a las buenas perspectivas de incremento de precio en el mercado internacional; el cultivo tiene cada vez mayor importancia en la Amazonía peruana. Ha aumentado el área

de cultivo y ya está rindiendo hasta 1500 kilogramos por hectárea. Además, la demanda del grano de cacao es cada vez mayor debido a que está mejorando su calidad por la aplicación de nuevas tecnologías. Y lo mejor de todo es que genera mucha mano de obra e ingresos lícitos que alejan la inseguridad y violencia que ocasionaba el cultivo de hoja de coca (PDA, 2007).

### 3.1.3 TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica según Cruz *et al*, 2007 es la siguiente:



Reino	: Plantae
Subreino	: Tracheobionta
División	: Ansgiospermas
Clase	: Dicotiledóneas
Subclase	: Dilleniidae
Orden	: Malvales
Familia	: Sterculiaceae
Subfamilia	: Byttnerioideae
Género	: <i>Theobroma</i>
Especie	: <i>cacao</i> L.

### 3.1.4 Requerimientos ambientales

Cuando se define un clima apropiado para el cultivo de cacao generalmente se hace referencia a la temperatura y la precipitación (lluvia), considerados como los factores críticos del crecimiento. Así mismo, el viento, la radiación solar y la humedad relativa afectan muchos procesos fisiológicos de la planta (Enríquez, 1987). El cacao es una planta C3, en estos tipos de plantas hay mayor concentración de cloroplastos en el haz que en el envés (Benavides, citado por Basurto *et al*, 2008).

El cacao es una planta sensible a la escasez de agua, al exceso de agua por lo que se precisarán de suelos provistos de buen drenaje, los rangos óptimos de agua oscilan entre 1500 y 2500 mm en las zonas bajas más cálidas y entre 1200 y 1500 mm en las zonas más frescas o los valles altos (MINAG *et al*, 2004).

### 3.2 Agua en el suelo y la planta

La capacidad de retención de agua disponible para las plantas, se basa en una clasificación biológica del agua del suelo que considera como disponible para las plantas el agua retenida entre dos situaciones: la denominada capacidad de campo que es una medida del contenido máximo de agua que puede retener el suelo cuando la mayoría de la macroporosidad está ocupada por aire, y el punto de marchitamiento permanente o contenido de agua por debajo del cual las plantas mesofíticas no son capaces de extraer agua del suelo (Porta y

López-Acevedo, 2003). El estado energético del agua del suelo es una de las propiedades físicas más importantes del suelo y cuyo conocimiento es fundamental para la irrigación técnica de los cultivos (Bayer y Gardner, 1977).

### 3.2.1 Importancia del agua

El agua del suelo, como uno de los componentes del ciclo hidrológico, constituye la principal fuente para los cultivos, por su capacidad de almacenarla y entregarla gradualmente, a medida que se requiere, también disuelve y transporta nutrientes, sales solubles y contaminantes, haciendo posible su absorción por las raíces e influyendo en la producción vegetal (Honorato, 2007).

Las bases fisiológicas de la producción vegetal radican, en gran medida, en los procesos de fotosíntesis y transpiración de las plantas, permitiendo el intercambio gaseoso necesario para la producción de biomasa vegetal; así, es necesario mantener las células guarda y oclusivas de los estomas turgentes gran parte del día y permitir la absorción de agua de las raíces. Para ello, *“el suelo debe abastecer de agua al sistema radical de las plantas en forma permanente para evitar condiciones de estrés”* (Azcón et al, 2000).

### 3.2.2 Retención de agua por el suelo

En el terreno se pueden presentar las siguientes situaciones de humedad: (Honorato, 2007)

**Saturación:** Un suelo es saturado cuando todo el espacio poroso está ocupado por el agua, su tensión de humedad es inferior a 0,3 bares y el agua está sujeta a la fuerza de gravedad, esta situación no es óptima desde el punto de vista biológico, debido a la falta de oxígeno, situación que se produce después del riego o de una lluvia.

**Capacidad de campo (CC):** Contenido de agua en el suelo una vez que ha drenado libremente en el perfil, aproximadamente 24 a 48 horas después de saturación. Sólo una parte de los poros están llenos de agua (micro-poros). Esta situación se asocia a una tensión de humedad en el suelo de 0,3 bares, desde el punto biológico es óptima, ya que es el nivel de máxima disponibilidad de agua para las plantas, con aire presente.

**Punto de marchitez permanente (PMP):** Se conceptúa como el contenido de agua en el suelo en el cual una planta es incapaz de extraer el agua y se marchita sin poder recuperarse al restablecer el contenido de humedad, lo que implica la muerte fisiológica de la planta, porque está retenida en delgadas películas y con mucha fuerza alrededor de las partículas del suelo, asociándose a una tensión de humedad de 15 bares, desde el punto biológico, esta humedad no es disponible para las plantas, el contenido de agua entre **CC** y **PMP** es considerada aprovechable por las plantas. Sin embargo, a medida que

aumenta la tensión, a partir de 0,3 bares, aumenta la energía requerida para extraer el agua y disminuye la destinada a la producción de materia seca.

Para una estimación de la cantidad de agua retenida a Capacidad de Campo (CC), disponiendo sólo de la textura del suelo, se pueden utilizar los valores medios para Humedad Equivalente (-33 kPa) (Honorato, 2007).

### **3.2.3 Riego**

#### **3.2.3.1 Humedad en el suelo**

Desde el punto de vista fisiológico, es fácil mantener un nivel adecuado de humedad para el crecimiento satisfactorio de la mayoría de las plantas mediante riego, si el suelo o mezcla para enraizar es adecuado. Pero desde el punto de vista del patólogo que investiga los patógenos del suelo, mantener niveles de humedad constante para determinar sus efectos sobre los patógenos del suelo es difícil en el ámbito de humedad por encima de la capacidad de campo (CC) y casi imposible en los niveles inferiores (French & Hebert, 1982).

#### **3.2.3.2 Medición de la humedad del suelo**

No es práctico medir la humedad de los suelos con niveles arbitrarios definidos, porque al moverlos de su sitio cambia su porosidad. Cuando se desea hacer comparaciones entre distintos suelos, bajo condiciones

iguales, no necesariamente a capacidad de saturación (CS), capacidad de campo (CC) o porcentaje de marchitez permanente (PMP), se establece el porcentaje de agua (PA) basado en el peso original y el peso después de secarlo a un peso constante a 105 °C, según la fórmula siguiente: (Baker, 1957).

$$PA = \frac{\text{Pérdida de peso}}{\text{Peso Constante}} \times 100$$

Si se desea establecer comparativos de la CC de suelos un método reproducible para el ámbito de 12 a 28% de CC es la determinación de la Humedad Equivalente (HE). El procedimiento consiste en centrifugar una muestra uniformizada por un tiempo determinado a 1000 G (Veihmeyer y Hendrickson, 1931).

Para comparar la retención de agua relativa (RAR) de distintos suelos se puede usar la fórmula:  $RAR = PA/HE$ .

### **3.2.4 Estrés hídrico por déficit y crecimiento de los cultivos**

El estrés se identifica como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida, que ocasionan cambios en todo los niveles funcionales de los organismos y desde un punto de vista biológico, el estrés tiene una connotación más amplia, refiriéndose a los cambios ambientales que alteran al estado fisiológico de las plantas (Larcher, 1995).

Biológicamente, el estrés se describe como cualquier factor del medio ambiente que disturba el normal funcionamiento de un organismo y capaz de inducir una “tensión” potencialmente perjudicial en el organismo vivo (Kramer, 1989), por otra parte estrés es la situación de un individuo vivo o de alguno de sus órganos o aparatos que por exigir de ellos un rendimiento muy superior al normal, los pone en riesgo próximo de enfermar (Armas *et al*, 1988), técnicamente, ocurre cuando hay pérdida de agua en las plantas, o una parte de ella, causando un potencial negativo del agua, medidos en términos de presión (bars), llega debajo de -0,5 hasta -1,0 bars, se dice que existe estrés y para la mayoría de los cultivos, el punto de marchitez permanente se alcanza cuando el suelo llega a una deficiencia de -20bars. Las hojas de las plantas pueden, generalmente, tolerar deficiencias más altas que -20bars por periodos cortos (algunas horas), pero si la deficiencia sigue, resulta en una marchitez permanente (Slatyer and Goode, 1967).

Es probable que el estrés esté asociado con un déficit hídrico y sea este uno de los problemas más comunes entre las plantas cultivadas y las comunidades naturales (Benavides, citado por Basurto *et al*, 2008). La pérdida de agua por el dosel vegetal es algo inevitable, ya que esto forma parte del proceso natural de transpiración de las plantas como un mecanismo de enfriamiento. Por otra parte, la asimilación de CO<sub>2</sub>, a través de los estomas, origina una pérdida natural de agua para mantener un ritmo de crecimiento. Por ejemplo, las plantas C-3 pierden un kilogramo de agua por cada 1-3 g de CO<sub>2</sub> fijado y las plantas C-4 ganan 2-5 g de CO<sub>2</sub> por kilogramo de agua transpirada y las plantas

CAM fijan de 10-40 g de CO<sub>2</sub> por kilogramo de agua transpirada (Benavides, citado por Basurto *et al*, 2002).

A causa de su papel esencial en el metabolismo de las plantas, el déficit de agua afecta rápidamente los procesos que van desde la fotosíntesis hasta la respiración. El agua es un agente químico que imparte orden y estructura en las biomoléculas y ayuda a la interacción entre estas, además de ser una fuente de protón-electrón, la carencia de agua ha sido la principal fuerza selectiva en la evolución de las plantas y su habilidad para hacer frente a los déficits hídricos es una determinante fundamental en su distribución y en la distribución y productividad de las plantas cultivadas (Fisher and Turner, 1978).

El término déficit hídrico en las plantas, significa insuficiencia interna de agua y puede ser inducida por escasez de agua en el suelo o porque la pérdida de agua por transpiración prosigue hasta ser mayor que la tasa de absorción de agua por las raíces, es decir, cuando al balance hídrico se torna negativo (Larcher, 1977), normalmente el balance hídrico debe ser positivo ya que las intensidades con que ocurren los principales procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas están estrechamente relacionadas con el balance y turgencia de sus células, tejidos y órganos (Kramer, 1989).

El término “sequía” se refiere usualmente a una condición por la cual el agua no puede ser aprovechada en forma satisfactoria por la planta, produciéndose un déficit hídrico en los tejidos al punto de afectar el crecimiento y desarrollo (Billins, 1968).

Desde el punto de vista agrícola, la sequía es definida como la situación que existe cuando hay insuficiente agua disponible para un cultivo, es decir cuando el nivel de humedad en el suelo es insuficiente para cubrir las necesidades de agua por la planta en un determinado estado de desarrollo, lo que produce en la planta déficits hídricos como para ocasionar reducción en los rendimientos (Kramer, 1989).

#### **3.2.4.1 Mecanismo de Resistencia a la sequía.**

El término “Resistencia a la sequía” es utilizado para cubrir un amplio rango de mecanismos por los cuales las plantas enfrentan y sobreviven a periodos secos o de condiciones de humedad (Jones *et al*, 1981).

Existen plantas que previenen la sequía desarrollando un sistema radicular profundo que llegue hasta el manto freático (Ehleringer *et al*, 1976). Existen plantas que previenen la sequía gracias a que presentan estomas hundidos que retrasan la transpiración, otras que presentan hojas pequeñas (cuya capa límite es delgada) que evita que la temperatura de las hojas se asemeje a la del aire y finalmente otras plantas que pierden sus hojas y entran en un estado de dormancia cuando se acerca la época de sequía (Levitt, 1980).

Los principales mecanismos de resistencia a la sequía son: el escape a la sequía; la tolerancia a la sequía con altos potenciales de agua y la tolerancia a la sequía con bajos potenciales de agua (Kramer, 1989; Turner, 1979; Levitt, 1980; Jones *et al*, 1981).

#### **3.2.4.1.1 Escape a la sequía.**

El escape a la sequía se refiere a la habilidad de las plantas para completar su ciclo de vida en un tiempo corto, antes de que se presenten condiciones adversas en disponibilidad de agua. Este mecanismo combina un rápido desarrollo fenológico, con una plasticidad en el desarrollo de las plantas (Kramer, 1989). El mecanismo de escape a la sequía es solamente un mecanismo para evitar el estrés, más que un mecanismo de resistencia en sí (Levitt, 1980).

#### **3.2.4.1.2 Tolerancia a la sequía con altos potenciales de agua.**

Este mecanismo se refiere a la habilidad que tienen algunas plantas para vencer los periodos de sequía, manteniendo altos potenciales de agua en sus tejidos. Algunos investigadores denominan a este tipo de resistencia como “evitación a la sequía” (O’Tools y Chang, 1979; Levitt, 1980). Sin embargo se debe aclarar que las plantas que poseen este mecanismo, realmente no evitan la sequía, sino que evitan la deshidratación de sus tejidos mediante la reducción de la pérdida de agua a través de mecanismos para mantener la absorción del agua. La reducción de la pérdidas de agua se consigue a través de cambios en la conductancia epidermal (cierre de los estomas y protección efectiva contra la transpiración cuticular) y a través de cambios en la morfología externa o interna y orientación de las hojas a fin de reducir la absorción de la radiación y cambiar las características de reflexión (Ehleringer *et al*, 1976).

El mantenimiento o incremento de la absorción de agua lo consiguen a través de un mayor tamaño del sistema radicular y de una mayor eficiencia en la captación del agua del suelo incrementando la conductancia hidráulica a nivel de raíces (Jones *et al*, 1981).

#### **3.2.4.1.3 Tolerancia a la sequía con bajos potenciales de agua**

Tolerancia a la deshidratación, es el mecanismo de resistencia que se refiere a la habilidad de las plantas para vencer periodos de sequía manteniendo bajos potenciales de agua en sus tejidos (Kramer, 1989). Esta es una capacidad específica y adaptativa del protoplasma para poder soportar una gran pérdida de agua, manteniendo la presión de turgencia celular por efecto de un ajuste osmótico o a través de un incremento en la elasticidad de los tejidos (Jones *et al*, 1981).

El grado de deshidratación sin daño permanente varía ampliamente, dependiendo del proceso involucrado, de la duración del estrés y del estado de desarrollo y tipo de planta. Este tipo de resistencia también involucra la tolerancia a la desecación o resistencia protoplásmica, que es una característica muy especial de las plantas poikilohídricas (“plantas que resucitan”), en las cuales las pérdidas de agua son acompañadas por una deshidratación del citoplasma en tal forma que la maquinaria metabólica pueda ser reensamblada para su normal funcionamiento, luego de la rehidratación de los tejidos (Jones *et al*, 1981). La reacción de las plantas a la deshidratación puede ser considerada desde dos puntos de vista: supervivencia y rendimiento. La supervivencia a severa deshidratación tendrá mayor importancia en

plantas nativas que en plantas cultivadas, sin embargo la tolerancia a moderada deshidratación puede ser de gran significación en plantas cultivadas. Hay cierta controversia para determinar cuál de los componentes da resistencia a la sequía; si el escape o la tolerancia son más importantes para los cultivos. Realmente los términos de expresión del concepto de resistencia a la sequía varían dependiendo del punto de vista del investigador.

Para el agrónomo y fisiólogo de cultivos, la resistencia a la sequía debe estar más ligada a la productividad, mientras que para el ecólogo y eco fisiólogo, el interés se centrará más en la capacidad de sobrevivencia de las plantas. Las bases metabólicas de la productividad por un lado y las relacionadas a la sobrevivencia por otro lado son diferentes y frecuentemente difíciles de comparar. Los mecanismos que favorecen la productividad y aquellos que posibilitan la sobrevivencia son realmente opuestos. Verdaderamente se requiere de una combinación de los mecanismos, puesto que la evitación, tolerancia y escape a la sequía juntos proporcionarán a las plantas cultivadas una mejor capacidad para resistir a éste factor adverso (Fisher y Turner, 1978).

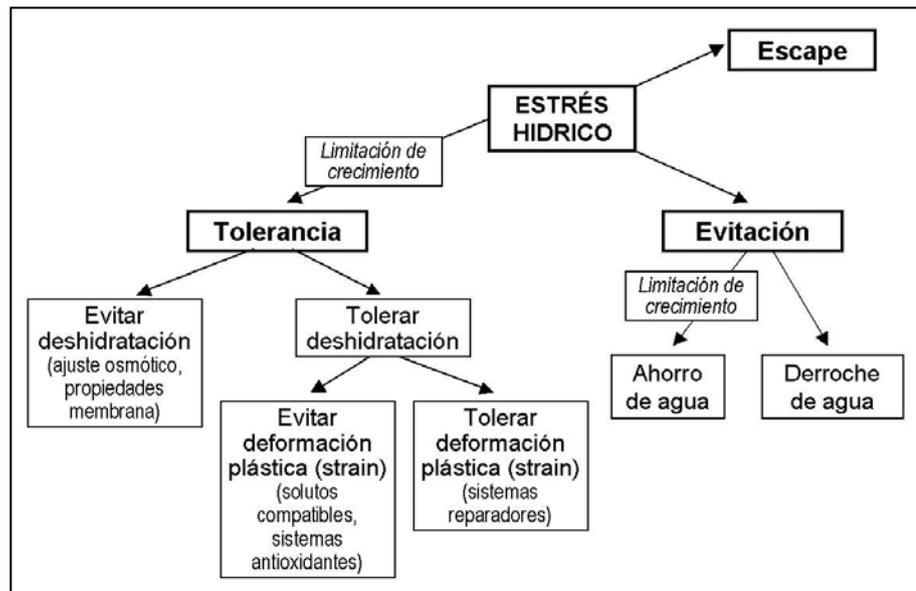


Figura 1: Mecanismos de resistencia a la sequía.

### 3.2.5 Efectos fisiológicos del estrés hídrico

El estrés hídrico puede causar diversos efectos en la planta así como la pérdida de agua en los tejidos que puede inducir una reducción en la presión hidrostática al interior de las células originando un incremento en la concentración de macromoléculas y solutos de menor peso molecular, además, una reducción en la actividad del potencial químico del agua presente en la planta. Todos estos efectos pueden influenciar en los procesos metabólicos (Carruthers y Clark, 1981).

El proceso más sensible al estrés hídrico es el crecimiento celular. Cuando la presión de turgencia en una célula vegetal decae, la expansión celular es deprimida produciéndose por lo tanto una abierta correlación entre la disminución del tamaño celular y el grado de estrés de agua en los tejidos vegetales. Además el crecimiento celular, la división celular, la síntesis de proteína y paredes celulares son los más afectados en tejidos de rápido crecimiento. El estrés hídrico inhibe la

incorporación de aminoácidos a las proteínas y causa una disminución del contenido proteico de los tejidos. Asimismo, el crecimiento de la pared celular está muy asociado con el metabolismo de la pared celular (Kramer, 1989).

Deficiencias severas de agua afectan directamente los niveles de enzimas en las plantas. Bajo estrés moderado algunos niveles de enzimas son aumentados, así como, las enzimas involucradas en la hidrólisis y deshidrogenación. En general, el estrés hídrico origina una disminución en los niveles de enzimas. En particular este es el caso de la reductasa de nitrato (Ehleringer *et al*, 1976).

La fotosíntesis es afectada con deficiencias cerca a cero (-1.0 hasta -3.0 bars), antes que el crecimiento de células y su división (Slatyer, 1967).

Cuando el estrés de agua es más pronunciado, los aminoácidos libres, particularmente la prolina puede acumularse en los tejidos vegetales existiendo una correlación positiva entre los niveles de acumulación de prolina y supervivencia de la hoja (Claussen, 2005).

### **3.2.6 Estados de marchitez**

En un estudio de tolerancia a la desecación y a la sequía, se describen cinco estados de marchitez hasta el PMP. A continuación se describen los estados de marchitez. (1) Ligeramente marchita: Hojas verdes pero con un ángulo ligeramente torcido. (2) Marchita: Hojas verdes con un ángulo de 45°, sus extremos comienzan a plegarse y hay necrosis

limitada. (3) Severamente marchita: Hojas verde con el ángulo de 90°, con un excesivo pliegue y la necrosis es más extensiva. (4) Cercana a la muerte: Muchas de las hojas necróticas, extensivo pliegue en las hojas. (5) Muerte: Todas las hojas necróticas, hojas frágiles que se caen (Tyree *et al.*, 2003).

### 3.3 Hongos endofíticos

Son organismos que viven dentro de los tejidos de las plantas, sin causar síntomas o daños aparentes (Carroll y Petrini 1983; Carroll, 1988; Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009). Ellos colonizan la mayoría de plantas sanas; considerados como simbioses y mutualistas omnipresentes (Hata *et al.*, 2002), se pueden encontrar en varios tejidos, semillas, raíces, tallos y hojas (Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009). Pueden ser extraídos del interior de las plantas o aislados desde la superficie estéril de los tejidos de las plantas (Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009). Las plantas se benefician ampliamente por la protección de estos organismos endofíticos, promoviendo el crecimiento de la planta (Compant *et al.*, 2005) y otorgando un incremento en la resistencia a varios patógenos, por la producción de varios antibióticos y metabolitos secundarios. Esto sugiere que hay presencia de hongos endofíticos mutualistas que actúan como detonantes biológicos para activar los sistemas de defensa ante condiciones adversas bióticas y/o abióticas (Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009).

La mayoría de los hongos endofíticos son ascomicetos y están presentes en gran parte de su ciclo de vida dentro del tejido de la planta, generando un

beneficio de protección y promoción de crecimiento (Sikora, 1992; Pocasangre, 2000).

### 3.4 Generalidades de *Trichoderma*

#### 3.4.1 Características.

*Trichoderma* es un aislado comúnmente del suelo y se reproduce asexualmente, es filamentoso, anamórfico, heterótrofo, aerobio, con una pared celular compuesta de quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelo ácido, *Trichoderma* crece en los medios de cultivo con un desarrollo difuso que cubre toda la superficie del agar como un césped amarillo o amarillo verdoso, la superficie de la colonia es granular o plumosa. En las características microscópicas sobresalen las hifas hialinas y septadas, conidióforos generalmente cortos que dan origen a esterigmas romos con puntas. Las conidias son esféricas y mantenidos en racimos compactos mediante una ligera secreción mucilaginosa (Harman and Chet, 1981).

La población de *Trichoderma* decrece especialmente cuando la humedad del ambiente desciende por largos periodos de tiempo. Otros estudios han determinado que el pH, la concentración de CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub>, sales y el contenido de materia orgánica son factores físicos y químicos

determinantes para la variación de la poblacional de *Trichoderma*, además de la presencia o ausencia de otros microorganismos en el ambiente (Fonseca, 1998).

Es un hongo saprofito y exigente en su crecimiento, utilizando fuentes de carbono, nitrógeno (purinas, pirimidinas y aminoácidos), azúcares (monosacáridos, polisacáridos), taninos, aldehídos, ácidos grasos de cadena larga, metanol, etc. Este hongo es fotosensible que germina rápidamente, produce clamidosporas, las cuales juegan un papel importante en el biocontrol y sobreviven en el suelo mejor que las conidias. *Trichoderma* produce algunos metabolitos que son importantes en el biocontrol. Dentro de las especies más importantes de *Trichoderma* están: *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. viríde*, *T. lignarum*, *T. virens* y *T. polysporum* (Papavizas, 1985).

Se ha encontrado que cepas específicas del hongo del género *Trichoderma* pueden colonizar y penetrar los tejidos de las raíces de las plantas, e inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las plantas, lo cual conlleva a la resistencia sistemática inducida de la planta (ISR), (Fonseca, 1998).

### 3.4.2 Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica del género *Trichoderma* es la siguiente (Papavizas, 1985).

Súper Reino	:	Eucariota
Reino	:	Fungi
Filum	:	Ascomycota
Subfilum	:	Pezizomycotina
Clase	:	Sordariomycetes
Subclase	:	Hypocreomycetidae
Orden	:	Hypocreales
Familia	:	Hypocreaceae
Género	:	<i>Trichoderma</i>



### 3.4.3 Condiciones de crecimiento

Dentro de los factores que afectan el crecimiento de *Trichoderma* se encuentran los de tipo físico y de tipo nutricional como:

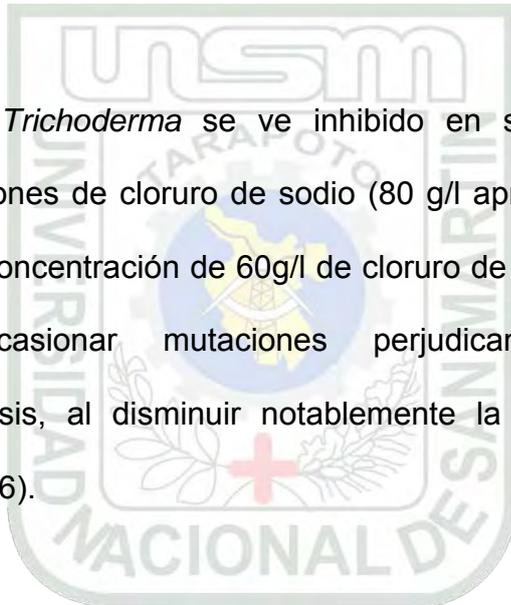
**Fototrofia:** La mayoría de especies del género *Trichoderma* son fotosensibles, puesto que presentan una mayor esporulación al ser expuestas a la luz. Sin embargo, cuando se someten a periodos alternados de luz y oscuridad, se favorece la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos (Domsch *et al.*, 1980).

**Esporulación:** *Trichoderma* esporula fácilmente sobre muchos sustratos naturales y artificiales en un patrón concéntrico circular en respuesta a la alternación de luz diurna y oscuridad, donde los conidios se producen durante el periodo de luz. La exposición de los cultivos en agar durante 20 a 30 segundos a la luz es suficiente para inducir la esporulación. La mayor foto inducción de la conidiogénesis se obtiene con la exposición a la luz del día por 3 minutos o cerca de la radiación ultravioleta Tipo A (366nm) de 10 a 30 segundos. Además, el número total de conidios producidos es inversamente proporcional a la concentración de la fuente de carbono (Fonseca, 1998).

Cuando la concentración de carbono es inferior a 50g/l, la producción de conidios se eleva, por el contrario, cuando la concentración de carbono supera este valor, la esporulación tiende a disminuir (Astudillo, 1999) de igual manera las sales minerales en general (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>) en una concentración elevada (20-70 g/l) inhiben la esporulación. Los iones de sodio y potasio producen una disminución de la presión osmótica de las células inhibiendo la esporulación. Una baja concentración de iones de calcio (1-10 g/l), aumenta la presión osmótica dentro de las células fúngicas induciendo así la esporulación (Astudillo, 1999).

**Germinación:** La germinación de los conidios de *Trichoderma* depende del tipo de enlace que presenta la fuente de carbono, la cual puede ser un disacárido o un polisacárido. Para su aprovechamiento el hongo emplea enzimas como amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas, endo y exocelulasas

que realizan la hidrólisis de los azúcares simples para dar inicio a la germinación en los diferentes medios de cultivo; mientras que para iniciar el proceso de infección, se debe tener en cuenta la composición química de la pared celular de los conidios (Astudillo, 1999).



**Salinidad:** *Trichoderma* se ve inhibido en su crecimiento en altas concentraciones de cloruro de sodio (80 g/l aproximadamente), aunque tolera una concentración de 60g/l de cloruro de sodio, estas condiciones pueden ocasionar mutaciones perjudicando el proceso de conidiogénesis, al disminuir notablemente la producción de esporas (Moore, 1996).

**Potencial de hidrógeno:** *Trichoderma* tiene un rango de pH relativamente amplio para su crecimiento. Presenta crecimiento a valores de pH comprendidas entre 2,0 y 9,0 con un pH óptimo que se encuentra entre 4,0 y 7,0. A pH ácido, la asimilación de nutrientes como glucosa ejerce una influencia importante sobre el crecimiento del hongo y su posterior esporulación. Además, procesos como la germinación, se ven afectados por la escasez de nutrientes y por niveles de pH por encima de 9,0 (Domsch *et al.*, 1980).

**Temperatura:** el rango de temperatura para el crecimiento de *Trichoderma* se encuentra entre los 10°C a los 40°C, considerándose un óptima de 25°C (Alexopoulos, 1996). Según otros estudios, se ha demostrado que el crecimiento saprófito en suelo de *Trichoderma* se

presenta a una temperatura que oscila entre los 20°C y los 30°C, con una temperatura óptima de 25°C (Cruz y Lina, 2007).

**Humedad:** El contenido de humedad que favorece el crecimiento saprófito de *Trichoderma* se encuentra entre 70% y el 80% (Wakelin *et al.*, 1999).

**Necesidades nutricionales:** *Trichoderma* es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la variada maquinaria enzimática que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. Asimismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Moore, 1996). Adicionalmente, se ha demostrado que la adición de nitrógeno en forma de sulfato de amonio al medio estimula e incrementa el crecimiento de este hongo, mientras que la adición de nitrógeno como nitrato de calcio genera una supresión en el crecimiento de *Trichoderma* (Danielson *et al.*, 1973; Wakelin *et al.*, 1999).

Por otra parte, los micro-elementos, sales y vitaminas en grandes cantidades no son indispensables para el desarrollo de *Trichoderma* (Papavizas, 1985). Los elementos traza requeridos para el crecimiento de hongos en general incluyen hierro, zinc, cobre, manganeso y molibdeno en concentraciones muy pequeñas cercanas a  $10^{-9}$ .

Dentro de las vitaminas necesarias se encuentran tiamina (B1), biotina (B7), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalamina (B12) y ácido aminobenzoico (Moore, 1996).

### **3.5 Interacciones *Trichoderma* – planta**

Respecto a las interacciones mutualistas entre plantas y hongos, el ejemplo más conocido es el de las micorrizas, el cual tiene su mayor efecto sobre la nutrición de las plantas. Sin embargo, existen otros organismos que también generan mutualismo con plantas, incrementando la resistencia de estas al ataque de patógenos, como es el caso de los hongos del género *Trichoderma* (Mousain, 1997).

*Trichoderma* es capaz de colonizar la superficie de las raíces y causar cambios sustanciales en el metabolismo de los tejidos de las plantas promoviendo el crecimiento de las plantas, incrementando la disponibilidad de nutrientes y mejorando la producción de los cultivos (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008).

#### **3.5.1 *Trichoderma* en el desarrollo de la planta y la resistencia a patógenos.**

Propiedades benéficas que se atribuyen a *Trichoderma* son el Control de patógenos en raíz y hojas (Induce a la resistencia, Control biológico

por ataque directo a enfermedades fúngicas de las plantas como antagonismo), cambio en la composición de la micro-flora en la raíz, además mejora la absorción de nutrientes, mejora solubilidad de los nutrientes del suelo, mejora crecimiento radicular, Incrementa la formación de pelos absorbentes, mejora la profundización de raíz. (Harman, 2006).

### **3.5.2 Colonización de *Trichoderma*, en las raíces**

El movimiento de las especies de *Trichoderma* en la rizosfera, es por medio de sus hifas en continuo crecimiento que exploran y penetran la corteza de las raíces, colonizando los tejidos de las plantas (Yedidia *et al.*, 1999; Vinale *et al.*, 2008). Una reacción biológica a la presencia de *Trichoderma* activa la expresión de los genes de la planta respondiendo con un sistema de defensa, promoviendo el crecimiento de la planta, el sistema radicular y disponibilidad de nutrientes (Yadidia *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004; Hason y Howell 2004).

La colonización de raíces con *Trichoderma* (cepa T-203) induce cambios significativos en el metabolismo. Plantas de maíz (*Zea mays* spp.) de cinco días de crecimiento, fueron tratadas con y sin *Trichoderma* (cepa T-22). Las plantas fueron fraccionadas con gel en una electroforesis de dos dimensiones. Aproximadamente un 40% de las proteínas que fueron visibles en presencia de *Trichoderma* (cepa T-22) no fueron visibles en el gel que contenía las proteínas de las plantas no tratadas con *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004) esto

indicaría que este hongo modifica fuertemente el metabolismo de las plantas, lo cual en muchos casos puede ser beneficioso.

### 3.5.3 Promoción del crecimiento vegetativo en las plantas

Los hongos *Trichoderma* endófitos son capaces de promover el crecimiento y desarrollo vegetativo de las plantas (Vinale *et al.*, 2008). Esto se refleja en estudios llevados a cabo con *Trichoderma harzianum* (cepa T22) y *Trichoderma atroviride* donde se reporta un incremento del crecimiento vegetativo de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), chiltoma (*Capsicum annum* L.) (Vinale *et al.*, 2008), maíz (*Zea mays* L.) (Blanchard y Bjorkman, 1996), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), zapallo (*Cucurbita maxima* L.) (Chang *et al.*, 1986; Kleifeld y Chet, 1992), petunia (*Petunia hybrida* L.) (Ousley *et al.*, 1994), tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) (Windham *et al.*, 1986), entre otras, no existiendo reportes en especies forestales. Las especies de *Trichoderma* producen ácidos orgánicos, como el glucónico, ácidos cítricos y fumáricos; estos ácidos disminuyen el pH del suelo y permite la solubilización de fosfatos, micronutrientes y minerales cationes como hierro, magnesio y manganeso útiles para los metabolitos de la planta (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008).

La estimulación del crecimiento de raíces por efecto de la presencia de *Trichoderma*, fue reportada por Bjorkman *et al.*, (1995). En experimentos de invernadero en plantas de maíz, el peso de raíces a

los 21 días después de plantación e inoculación era un 50% mayor que las plantas testigo, mientras que la exploración del suelo fue 40% mayor. La colonización de las raíces por *Trichoderma* se relacionó con la edad de éstas, siendo mayor en sus partes más viejas, colonizando incluso en los ápices radicales.

El mecanismo de acción no ha sido identificado, pero el hongo es capaz de acidificar la rizosfera en aproximadamente 0,1 unidades de pH, lo que podría aumentar el crecimiento debido a una mejor absorción de iones (Bjorkman *et al.*, 1995). Otra opción para la estimulación del crecimiento, es la que se basa en la nutrición. Aparentemente *Trichoderma* secuestra fósforo soluble en el micelio. Además es capaz de crecer a lo largo de las raíces durante su elongación, colonizando así todo el sistema radical (Sivan y Harman, 1991).

Existen evidencias experimentales de que *Trichoderma* spp pueden inducir el crecimiento de las plantas, aún en condiciones que el suelo esté libre de patógenos actuando como bioestimulador (Mónaco, 1991). Los bioestimulantes son compuestos orgánicos que difieren de los nutrientes, los cuales en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican los procesos fisiológicos de las plantas (Rodríguez y Zanahoria, 1991).

*Trichoderma* promueve el crecimiento y desarrollo de los cultivos produciendo metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo

vegetal (Sutton y Peng, 1993); tiene la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas liberando factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas (Altomare *et al.*, 1999). Se ha reportado la producción de ácido 3-indol acético (AIA), sustancia que actúa como hormona vegetal favoreciendo el desarrollo del sistema radical, entre otros beneficios (Valencia *et al.*, 2005). Estas sustancias producidas por *Trichoderma* actúan como catalizadores o aceleradores de los tejidos meristemáticos primarios en las partes jóvenes de la planta, acelerando su reproducción celular, logrando que las plantas se desarrollen más rápido en comparación con plantas que no han sido tratadas con dicho microorganismo (Valencia *et al.* 2005), *Trichoderma* también ha sido reportado como promotor del crecimiento vegetal en cultivos de berenjena, arveja, frijol, café, tomate, papa, especies forestales, entre otros (Zambrano, 1989; Börkman *et al.*, 1998; Dandurand y Knudsen, 1993).

La estimulación de crecimiento sería un proceso común en *Trichoderma*, ya que se ha reportado dicho efecto en varias especies, entre ellas: *Trichoderma harzianum* (Chang *et al.*, 1986; Harman, 2000), *Trichoderma virens* (Ousley *et al.*, 1994), y *Trichoderma koningii* (Windham and Baker, 1986).

### 3.5.4 Inducción de resistencia al estrés hídrico

Actividades beneficiosas atribuidas a las interacciones de *Trichoderma* / planta incluyen la promoción del crecimiento vegetal, la tolerancia y resistencia al estrés abiótico como la sequía (Harman *et al*, 2004).

Existen varias clases de microorganismos endófitos, además de *Trichoderma* spp, se sabe que alteran la respuesta de las plantas al estrés abiótico. *Trichoderma* endófitos de pastos de estación fría han sido estudiados por su capacidad para inducir la tolerancia a varios tipos de estrés, biótico y abiótico (Malinowski y Belesky, 2000). Algunos de los mecanismos utilizados por los *Trichodermas* endófitos de la hierba fresca de temporada para alterar la respuesta a la sequía incluyen evitar la sequía a través de adaptaciones morfológicas; toleran a la sequía a través de las adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, y se recuperan después de la sequía (Malinowski y Belesky, 2000). El impacto de los hongos endófitos en la respuesta a la sequía ha sido intensamente estudiado en hierbas de estaciones frías (Malinowski y Belesky, 2000).

### 3.5.5 Antecedentes respecto a la sequía en cacao y *Trichoderma*

De acuerdo al impacto del hongo endófito de *Trichoderma hamatum*, aislamiento DIS 219b sobre la respuesta del cacao a la sequía, induciendo la resistencia al estrés hídrico en las plantas (Bae *et al.*, 2009). Durante la sequía, las plantas pueden mostrar los siguientes

síntomas: La suspensión de crecimiento del brote, decrece la conductancia estomática, reduce la asimilación del CO<sub>2</sub>, perjudica la fotosíntesis, la acumulación de solutos, la suspensión de crecimiento de la raíz, senescencia de la hoja y marchitez de la planta (Passioura, 1996).

Un solo tratamiento de semillas o plantas que a la vez pueden conferir resistencia al estrés biótico (enfermedades) y estrés abiótico que sería de gran importancia para la producción vegetal agrícola. Los tratamientos de semillas con *T. harzianum* son capaces de aliviar las presiones abióticas y fisiológicos en semillas, y plántulas de cacao; *Trichoderma* spp se encuentran entre los organismos más utilizados para el control de la enfermedad biológica y para la promoción del crecimiento vegetal, además inducen la tolerancia al estrés abiótico (Harman et al, 2004; Harman and Shoresh, 2007).

Los cambios observados en los patrones de expresión génica en estas interacciones *Trichoderma* / cacao, mediante la caracterización de las interacciones entre las cuatro especies de *Trichoderma* y cacao a nivel molecular, plantea la posibilidad de que las especies de *Trichoderma* podría inducir la tolerancia a estrés abióticos, incluyendo posiblemente la sequía, en el cacao (Bailey et al., 2006).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 Ubicación del experimento.

La presente investigación se realizó en el laboratorio e invernadero de Fitopatología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) (Figura 2), distrito de La Banda del Shilcayo, provincia y región de San Martín, ubicado a 06° 00' 28" de latitud sur, 76° 00' 18" latitud oeste y 315 m.s.n.m.



Figura 2. Laboratorio de Fitopatología ubicada en la estación experimental “Juan Bernito” – ICT.

### 4.2 Materiales de estudio.

#### 4.2.1 Aislamientos de *Trichoderma* endófito.

De la primera colección de hongos endófitos que realizó el Instituto de Cultivos Tropicales por el alto Amazonas, se seleccionaron 12 aislamientos de *Trichoderma* spp, los hongos, fueron aislados a partir de hojas y tallos de cacao silvestres, y se encuentran conservados a -10°C en solución de glicerol 2% (Cuadro N° 01).

**Cuadro 1: Procedencia de los aislamientos de *Trichoderma* endófitos.**

<b>N°</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Órgano</b>	<b>Localidad</b>
1	T-E 3	Tallo	Aypena
2	T-E 17	Tallo	Pastasa
3	T-E 20	Tallo	Pastasa
4	T-E 22	Tallo	Ungumayo
5	T-E 39	Tallo	Nucuray
6	T-E 50	Tallo	Urituyacu
7	T-E 54	Tallo	Urituyacu
8	T-E 72	Tallo	Ungurahui
9	T-E 74	Tallo	Pastasa
10	T-E 81	Tallo	Ungumayo
11	T-E 105	Hoja	Urituyacu
12	T-E 126	Tallo	Ungurahui

#### **4.2.2 Genotipos utilizados**

Para las diferentes pruebas se utilizó semillas de polinización abierta del genotipo IMC-67 (de una plantación de cacao de la E.E. Juan Bernito). Se eligieron mazorcas más robustas, no tan maduras, de las que crecen en los troncos de los árboles.

#### **4.2.3 Esterilización de suelo:**

El suelo que se utilizó (Anexo 29) se esterilizó en un autoclave vertical, a temperatura de 120°C, a presión de 15 lbs., por tiempo de 60 minutos.

## 4.3 Metodología

### 4.3.1 Preparación de medios de cultivo.

**4.3.1.1 Papa Sacarosa Agar (PSA):** En un recipiente se incorporó 250 g de papa en trozos previamente lavada, después se hirvió con 500 ml de agua destilada por 20 min aproximadamente y en otro recipiente, se diluyó 18 g de agar con 500 ml de agua destilada, se agregó el caldo de papa y se incorporó 10 g de azúcar, finalmente, se esterilizó a 120°C, 15lbs de presión por 15 min (French y Herbert, 1982).

**4.3.1.2 Agar Agua (AA):** En un recipiente conteniendo 500 ml de agua destilada se incorporó 20 g de agar, se diluyó con ayuda de un horno microondas, se enrazó con agua destilada hasta 1000 ml, para luego ser esterilizado a 120°C, 15lb de presión por 15 min (French y Herbert, 1982).

**4.3.1.3 Corn Meal Dextrosa Agar (CMDA):** En un recipiente conteniendo 1000 ml de agua destilada se incorporó 20 g de azúcar y 17 g de Corn Meal Agar, luego se esterilizó en una autoclave a 120 °C, 15 lb de presión por 15 min (French y Herbert, 1982).

### 4.3.2 Reactivación de *Trichoderma*.

Los aislamientos seleccionados de *Trichoderma* que se encontraban en conservación en la micoteca, se reactivaron en placas petri conteniendo PSA, incubadas a temperatura ambiente (aprox. 25°C) por cinco días.

#### **4.3.3 Producción de *Trichoderma***

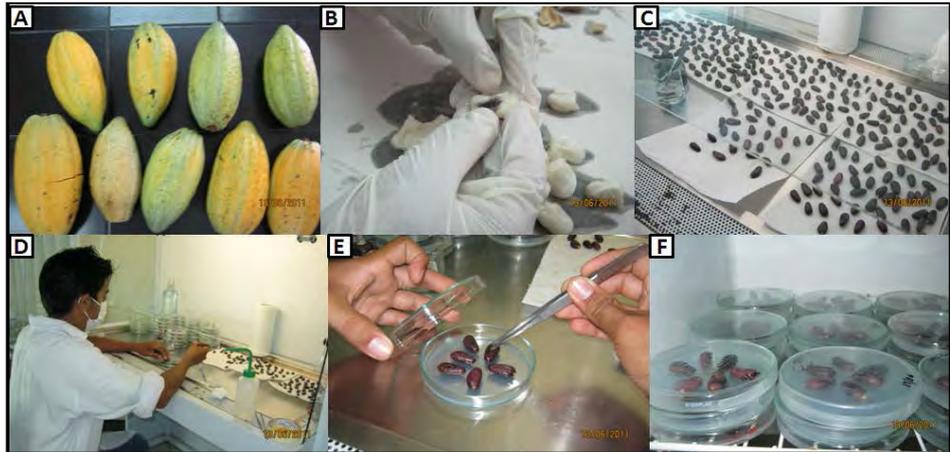
En condiciones asépticas se incorporó un disco de medio de cultivo (0,5 cm de diámetro) con micelio de *Trichoderma* en placas petri conteniendo medio PSA, se dejó en incubación a temperatura ambiente por cinco días. Así mismo, se produjo inóculo de *Trichoderma* en un sustrato “Biodac” compuesto de arcilla y celulosa.

#### **4.3.4 Preparación de sustrato con biodac**

Se preparó el sustrato con Biodac en bolsitas de polipropileno de 6 x 12 pulgadas conteniendo 200g del sustrato por bolsa, en donde se adicionó carbonato de calcio al 0,45% para estimular la esporulación de las conidias en 70ml de Agua destilada estéril (ADE)/bolsa; luego se esterilizó a 120 °C, a una presión de 15 lbs. durante 20 minutos; finalmente, se introdujo discos de PSA colonizado con *Trichoderma* en el sustrato y se incubó bajo luz durante 14 días.

#### **4.3.5 Obtención de semillas pre germinadas.**

Las semillas del Clon IMC-67 fueron pre germinadas en placas petri (15 x 90mm) conteniendo AA. Previamente se eliminó el mucílago y el tegumento con ayuda del bisturí, después la superficie de la semilla se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2% por 3 min, seguido de cuatro lavados en ADE y se colocó sobre papel toalla para su secado. Se depositaron 504 semillas en placas petri conteniendo AA, a razón de 6 semillas/placa petri, se dejó en incubación a 25 °C por cuatro días (Figura 3).



**Figura 3: Obtención de semillas pre germinadas.** A. Mazorcas de cacao IMC-67. B. Eliminación del mucílago y tegumento de las semillas. C. Semillas de cacao desinfestadas. D y E. Sembrado de semillas de cacao en AA. F. Semillas puestas en cámara de incubación a 25°C durante 4 días.

#### 4.3.6 Colonización de *Trichoderma* en plantas de cacao.

Para la colonización de plantas con *Trichoderma* se empleó dos métodos de inoculación: Método 1, Inoculación en semillas; Método 2, Infestación de suelo; propuesta por *Bailey et al, 2008*. Para estos métodos se utilizaron 14 tratamientos, que comprenden 12 aislamientos de *Trichoderma*, y dos controles sin *Trichoderma* (Control con y sin riego).

##### 4.3.6.1 Método 1: Inoculación de semillas con *Trichoderma* endófito.

Con la ayuda de un sacabocados N° 5 se obtuvo discos de medio PSA con micelio de *Trichoderma*, se colocaron tres discos cerca a las raíces de cada semilla pre-germinada, y se incubó a 25 °C durante 4 días para que el hongo endófito colonice la semilla (Figura 4).



**Figura 4: Inoculación de semillas con *Trichoderma* endófito.** A. Obtención de discos de medio PSA con *Trichoderma*. B. Inoculación de *Trichoderma* endófitos en semillas pre-germinadas. C. Semillas inoculadas incubadas a 25 °C durante 4 días. D. Llenado de tubetes con suelo estéril. E. Sembrado de semillas en los tubetes con suelo estéril. F. Primer riego de las semillas con ADE. G. Cámara de incubación de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito.

Las semillas pre-germinadas colonizadas con *Trichoderma*, fueron sembradas en tubetes conteniendo suelo estéril, y se mantuvo con riego continuo durante 15 días en un ambiente de incubación, a temperatura de 25 °C, con Humedad Relativa de 75% y 12 horas de luz artificial.

#### 4.3.6.2 Método 2: Infestación de suelo con *Trichoderma* endófito.

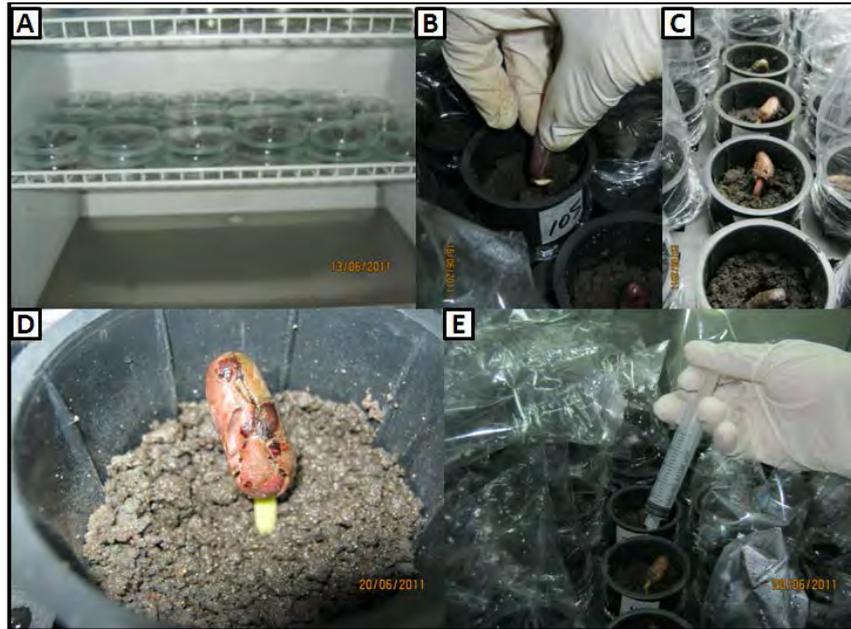
A partir de 1 g de sustrato infestado (biodac) con *Trichoderma* endófito se realizó el conteo de conidias para determinar la cantidad de sustrato a utilizar para infestar el suelo estéril a una concentración de  $1 \times 10^7$  ufc.gs<sup>-1</sup>. En bolsas conteniendo 350g de suelo se incorporó sustrato biodac con conidias de

*Trichoderma*, luego se agregó 15 ml de agua destilada estéril (ADE) para que esté a capacidad de campo y se homogenizó el suelo con el sustrato; posteriormente se transfirió la mezcla en cada tubete, luego se dejó en incubación por 14 días a 25 °C (Figura 5 y Anexo 15).



**Figura 5: Infestación del suelo con *Trichoderma* endófito.** A. Aislamientos de Sustrato Biodac infestado con *Trichoderma* endófito. B. Suspensión de conidias de *Trichoderma* para la aplicación al suelo estéril. C. Incorporación de sustrato Biodac en suelo estéril. D. Adición de ADE al suelo estéril. E. Homogenización de mezcla de *Trichoderma* mas ADE. F. Llenado de tubetes con suelo infestado de *Trichoderma*. G. incubación de suelo infestado con *Trichoderma* endófito. H. Suelo colonizado con *Trichoderma*.

Las semillas pre-germinadas fueron sembradas en los tubetes conteniendo suelo infestado con *Trichoderma*, y se mantuvo con riego continuo durante 15 días en un ambiente de incubación, a temperatura de 25 °C, con Humedad Relativa de 75% y 12 horas de luz artificial (Figura 6).

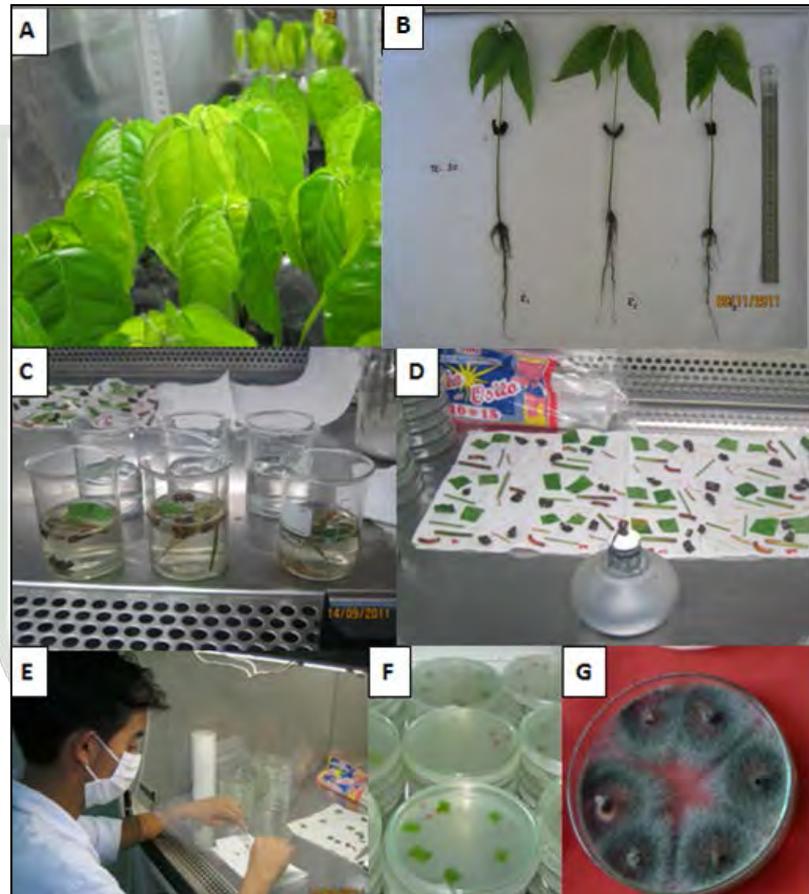


**Figura 6: Siembra de semillas en suelo infestado con *Trichoderma* endófito.** A. Semillas pre germinadas de 3 días de incubación sobre medio AA. B. Siembra de semillas pre germinadas en suelo infestado con *Trichoderma* endófito. C. Desarrollo de semillas sembradas en suelo infestado con *Trichoderma* endófitos. D. Semilla después de 4 días de sembrado. E. Adición de ADE a las semillas.

#### 4.3.6.3 Reaislamiento de *Trichoderma*

El re-aislamiento de *Trichoderma* se realizó de plántulas de cacao de 16 días de edad, de cada plántula se obtuvieron dos secciones (1 cm de tejido) de raíz principal media (RPM), punta de raíz (PR), tallos (T), cotiledones (C), hojas (H), xilema (X), corteza (Cz), y plúmulas (PI), estas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% por 5 min, seguido de cuatro lavados en ADE hasta quitar residuos de hipoclorito de sodio, posteriormente se colocó sobre papel toalla para su secado y se sembraron los tejidos en placas conteniendo medio Corn meal dextroza agar (CMDA) (Figura 7). Estas placas fueron incubadas a 25 °C por 7 días, y se registró como positivo (+) o negativo (-) para la colonización de *Trichoderma* (Anexo 25 y 26). Se

realizaron 3 repeticiones (plántulas) por cada aislamiento de *Trichoderma* endófito.



**Figura 7: Reaislamiento de *Trichoderma* a partir de tejidos de plántulas de cacao.** A y B. Plántulas de cacao IMC-67 colonizadas con *Trichoderma* endófito de 16 días de edad. C. Desinfestación de secciones de tejido en hipoclorito de sodio al 2% por 5 min. D. Secado de segmentos de plántulas de cacao. E. Cortes de secciones de 1 cm de tejido. F. Incubación de placas conteniendo secciones de tejido en medio CMDA. G. Crecimiento de *Trichoderma* endófito en placas con medio CMDA.

#### **4.3.7 Influencia de *Trichoderma* sobre el crecimiento y estrés hídrico de plántulas de cacao utilizadas para patrón.**

##### **4.3.7.1 Crecimiento de plantas colonizadas con *Trichoderma***

Para la colonización de plantas con *Trichoderma* spp, se empleó dos métodos de inoculación que fueron descritos en los puntos 4.9.1 y 4.9.2, agregando además dos controles, un control con

riego y sin riego. Las plántulas fueron mantenidos en un ambiente de incubación (25°C) durante 16 días con riego continuo (cada 2 días), posteriormente fueron trasladadas a un invernadero, donde se realizaron evaluaciones biométricas (cada 3 días) hasta los 32 días como: Diámetro de tallo, altura de planta, hipocotilo y epicotilo, número de hojas (Figura 8). A los 32 días se sacrificaron cinco plantas por tratamiento para evaluar longitud de raíz y peso seco.

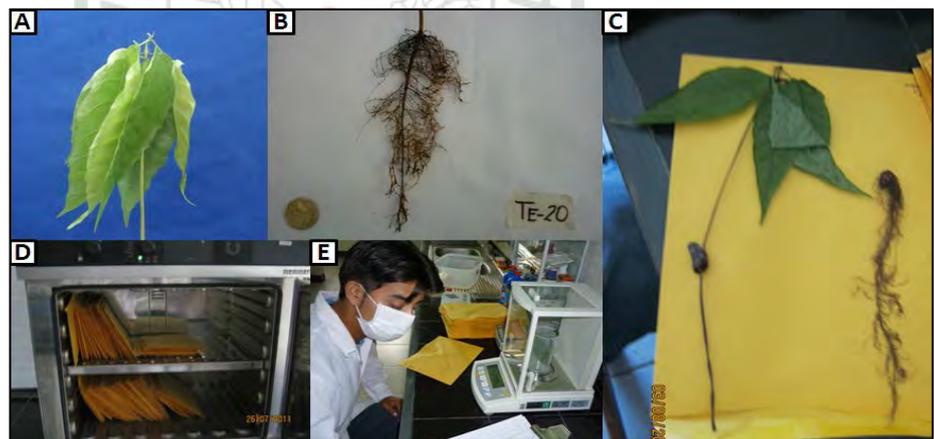


**Figura 8: Influencia de *Trichoderma* sobre el crecimiento.** A. Plantas de cacao IMC-67 de 32 días. B. Medición de altura de planta (Hipocotilo y epicotilo). C. Medición de diámetro de tallo de planta con ayuda del vernier. D. Cuantificación de hojas.

#### 4.3.7.2 Inducción de estrés hídrico a la planta

Se sometió a estrés hídrico a plantas de cacao IMC-67 de 32 días, que fueron colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito mediante dos métodos de inoculación que fueron descritos en los puntos 4.9.1 y 4.9.2. (Figura 9). Las plantas

fueron sometidas al estrés hídrico mediante la ausencia de riego durante un periodo de 10 días. Para esta prueba, se tuvo 14 tratamientos, correspondiente a 12 aislamientos de *Trichoderma*, dos controles, con y sin estrés hídrico (Anexo 27). Durante la ausencia de riego, se sacrificaron gradualmente 5 plantas por tratamiento en tres tiempos (0, 6 y 9 días después de ser sometidas al estrés hídrico) para evaluar peso seco, porcentaje de agua y longitud de raíz. Se evaluó el grado de marchitez cada 24 horas.



**Figura 9: Parámetros de evaluación durante la inducción de estrés hídrico a la planta.** A. Grado de marchitez. B. Longitud de raíz de plantas de cacao colonizados con *Trichoderma* endófito. C. Muestras de plantas para evaluar. D. Muestras en la estufa por 5 días a 50 °C. E. Pesado de Peso fresco y seco de la planta (Parte aérea y Raíz).

#### 4.3.8 Diseño experimental

- Para determinar el porcentaje de colonización (bajo condiciones controladas) se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de 2 x 12. Los factores fueron 2 métodos de inoculación y 12 aislamientos *Trichoderma* endófito. Se empleó 3 repeticiones por aislamiento.

- Para determinar la influencia de *Trichoderma* endófito sobre el crecimiento de plantas de cacao (bajo condiciones de vivero) se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2 x 13. Los factores fueron 2 métodos de inoculación, 12 aislamientos de *Trichoderma* endófito y un control (Sin *Trichoderma*). Se empleó 15 repeticiones por tratamiento.
- Para determinar el efecto de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito frente al estrés hídrico (bajo condiciones de vivero) se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2 x 14. Los factores fueron métodos de inoculación, y aislamientos de *Trichoderma* endófito y dos controles (Sin *Trichoderma*). Se empleó 5 repeticiones por tratamiento.
- La unidad experimental para los tres diseños, fue una planta de cacao inoculada con cada aislamiento de *Trichoderma* endófito, estos datos fueron procesados con el programa estadístico INFOSTAT (Di Rienzo, *et al.* 2011) y para comparar las medias se utilizó la prueba de Duncan con un coeficiente de significancia de  $p=0,05$ .

#### **4.3.9 Parámetros evaluados.**

##### **4.3.9.1 Porcentaje de colonización:**

A partir de las secciones (hoja, punta de raíz, raíz primaria madura, plúmula, cotiledón, tallo, corteza y xilema) de tejido de la planta, que fueron sembradas en medio CMDA, se registró el crecimiento de *Trichoderma* sobre cada sección, se colocó un

signo positivo (+) a los segmentos donde creció *Trichoderma* y signo negativo (-) en el segmento donde no creció *Trichoderma* endófito. (Bailey, *et al.*2008).

#### **4.3.9.2 Índice de colonización**

Se determinó el índice de colonización (IC) de cada plántula para evaluar las habilidades endofíticas de cada aislamiento en todos los tejidos. A cada sección de la planta colonizada con *Trichoderma* se asignó un valor de 1 (+) y a la sección que no fue colonizada con *Trichoderma* se asignó valor de 0 (-). El máximo valor del IC es de 8 (Bailey, *et al.* 2008).

#### **4.3.9.3 Altura de planta**

Se registró la altura de hipocotilo desde la base del tallo hasta los cotiledones y la altura del epicotilo desde los cotiledones hasta el ápice de la planta, esto con ayuda de una regla metálica milimetrada de 30 cm.

#### **4.3.9.4 Diámetro de tallo**

Se midió el diámetro de tallo con ayuda de un vernier digital a una altura de 2 centímetros de la base del tallo.

#### **4.3.9.5 Número de hojas**

Se registró cuantitativamente la cantidad de hojas que hubo en las plantas colonizadas con *Trichoderma* spp.

#### 4.3.9.6 Grado de marchitez:

Se evaluó durante la ausencia de riego (estrés hídrico) cada 24 horas durante 10 días. Se empleó una escala de evaluación de 5 grados de marchitez propuesta por Tyree *et al.*, 2003. (Anexo 28).

#### 4.3.9.7 Peso fresco y seco de la biomasa:

Con la ayuda de una balanza analítica se determinó el peso fresco ( $P_f$ ) el mismo día que las plantas fueron sacrificadas, posteriormente las muestras se pusieron en una estufa por un tiempo de 5 días a 50 °C para determinar el peso seco ( $P_s$ ), con los datos obtenidos se obtuvo la tasa absoluta de crecimiento.

#### 4.3.9.8 Porcentaje de agua:

El porcentaje de agua se obtuvo con los datos obtenidos del peso fresco ( $P_f$ ) y seco ( $P_s$ ) de la biomasa, mediante la fórmula propuesta por Azcón y Talón, 2000.

$$\%A = \frac{P_f - P_s}{P_f} \times 100$$

#### 4.3.9.9 Tasa absoluta de crecimiento

Con los datos registrados de peso seco a los 0, 6 y 9 días después del sometimiento al estrés (DDSE), se calculó mediante la fórmula propuesta por González *et al.*, 1986.

$$TAC = \frac{\left(\frac{Ps2-Ps1}{D2-D1}\right) + \left(\frac{Ps3-Ps2}{D3-D2}\right)}{2}$$

**Dónde:**

*TAC*: Tasa absoluta de crecimiento expresada en g.día<sup>-1</sup>

*Ps1*: Peso seco del primer día de evaluación, 0 DDSE

*Ps2*: Peso seco del segundo día de evaluación, 6 DDSE

*Ps3*: Peso seco del tercer día de evaluación, 9 DDSE

*D1*: Primer día de evaluación, 0 DDSE

*D2*: Segundo día de evaluación, 6 DDSE

*D3*: Tercer día de evaluación, 9 DDSE

#### **4.3.9.10 Longitud de raíz**

Después de haber sacrificado las plantas (5plantas/tratamiento), se tomó fotos digitales de las raíces, para determinar la longitud de raíz estas imágenes fueron procesadas con el programa de análisis de imágenes ASSESS – Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (Lamari, 2002).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Resultados.

#### 5.1.1 Colonización endófito de *Trichoderma* en plántulas de cacao

##### 5.1.1.1 Índice y porcentaje de colonización.

En los anexos 2 y 3 se muestra el análisis de varianza del porcentaje e índice de colonización, se encontraron diferencias significativas para el método de inoculación, los aislamientos e interacción métodos x aislamientos ( $p \leq 0,05$ ).

El cuadro N° 2, muestra el efecto de los métodos de inoculación en la colonización de *Trichoderma* endófito (TE) en plantas de cacao de 16 días de edad, indica que el método de inoculación en semillas, fue el que obtuvo mayor colonización endofítica de los aislamientos de TE con 63,54%; sin embargo, en el método de infestación de suelo fue el que obtuvo menor colonización con 57,12%. El cuadro 3 muestra el promedio del porcentaje (%) e índice de colonización de aislamientos *Trichoderma* endófito en plantas de cacao de 15 días de edad mediante dos métodos de inoculación, se encontró que plantas colonizadas con TE-39 y TE-50 presentaron los valores más altos de porcentaje con 80,21%, 78,13% respectivamente, el índice de colonización de 6,42 y 6,25 respectivamente a comparación de TE-3, TE-126, TE-17 y TE-74 que obtuvieron los valores más bajos de porcentaje e índice de colonización con valores entre 45,83% a 54,17% y 3,67 a 4,13 respectivamente.

**Cuadro 2: Efecto de los métodos de inoculación, en el porcentaje (%) de colonización de *Trichoderma* endófito en plantas de cacao.**

MÉTODOS DE INOCULACIÓN	Porcentaje de colonización	
SEMILLA	63,54*	a
SUELO	57,12*	b

\* Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con iguales letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

**Cuadro 3: Porcentaje (%) e índice de colonización de aislamientos de *Trichoderma* endófito en plantas de cacao mediante dos métodos de inoculación.**

Tratamiento	Porcentaje de colonización	Índice de Colonización	
T-E 3	54,17*	4,33*	c
T-E 17	50,00*	4,00*	c
T-E 20	58,33*	4,67*	bc
T-E 22	61,46*	4,92*	bc
T-E 39	80,21*	6,42*	a
T-E 50	78,13*	6,25*	a
T-E 54	70,83*	5,67*	ab
T-E 72	60,42*	4,83*	bc
T-E 74	45,83*	3,67*	c
T-E 81	56,25*	4,50*	bc
T-E 105	55,21*	4,42*	bc
T-E 126	53,13*	4,25*	c
Control	00,00*	0,00*	d

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con iguales letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Así mismo, en la figura 10 y anexo 4, se observa que los mayores porcentajes de colonización se encuentra en el Método 1; donde, las plantas inoculadas con TE-39 (83,33%), fueron los que obtuvieron los valores más altos de porcentaje e índice de colonización, seguido de TE-54, TE-50 y TE-22 que obtuvieron valores mayores del 79 % de colonización. Así mismo, TE- 20, TE-72, TE-81 y TE-105 fueron los que proporcionaron un porcentaje de colonización entre 50 a 78%. Sin embargo, los valores más bajos de colonización se obtuvieron con TE-74, TE-126, TE-3 y TE-17 con valores menores del 50 %. Mientras que, en el método 2, los valores más altos de porcentaje e índice de colonización se obtuvieron con TE-39 y TE-50 con 77,08 % de colonización y 6,17 de IC, seguido de TE-126, TE-3, TE-54, TE-17, TE-105 y TE-81, con valores de porcentaje de colonización entre 50 a % a comparación del aislamiento TE-20 que presentó un el valor más bajo de porcentaje e índice de colonización con 39,58% e IC de 3,17, en plantas de 16 días de edad.

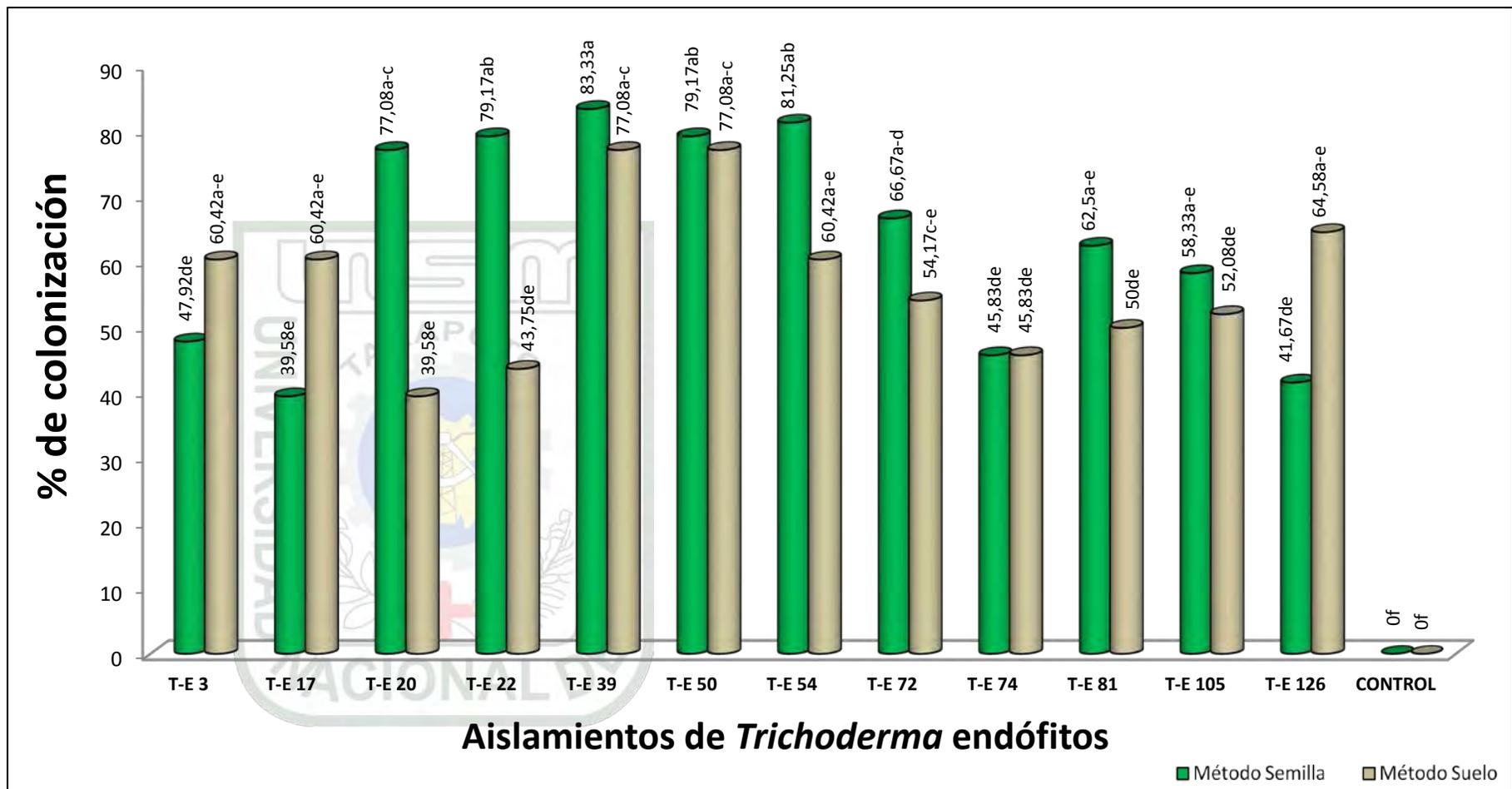


Figura 10. Porcentaje de colonización de aislamientos de *Trichoderma* endófitos en plántulas de cacao, inoculadas con dos métodos de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.1.2 Influencia de *Trichoderma* sobre el crecimiento de plantas de cacao.

### 5.1.2.1 Tasa de crecimiento de la planta

El anexo 5 muestra el análisis de varianza de la tasa de crecimiento de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma*, indica que, para el método resultó ser significativo para las variables altura de planta, hipocotilo y diámetro de tallo, y para la variable epicotilo resultó ser no significativo; sin embargo, para los aislamientos resultaron ser significativo para todas las variables mencionadas. Así mismo en las interacciones (métodos x aislamientos) para el diámetro de tallo resultó ser significativo, a comparación de las demás variables que resultaron ser no significativos ( $p \leq 0,05$ ).

En el cuadro 4 muestra el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en la tasa de crecimiento de plantas de cacao de 32 días, indica que existen diferencias significativas entre métodos para las variables altura de planta, hipocotilo y diámetro de tallo, a comparación de la variable epicotilo donde no hubo diferencias significativas. Así mismo, indica que el método de inoculación en semillas, fue el que obtuvo mayor tasa de crecimiento para todas las variables; mientras que, en el método de inoculación en suelo resultó con menor tasa de crecimiento (figura 11, figura 12, figura 13 y anexo 6), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).

**Cuadro 4: Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en la tasa de crecimiento de plantas de cacao de 32 días de edad.**

MÉTODOS DE INOCULACIÓN	Altura de planta (cm/día)		Hipocotilo (cm/día)		Epicotilo (cm/día)		Diámetro de Tallo (mm/día)	
SEMILLA	0,75*	a	0,28*	a	0,47*	a	0,10*	a
SUELO	0,65*	b	0,17*	b	0,47*	a	0,07*	b

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con iguales letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).



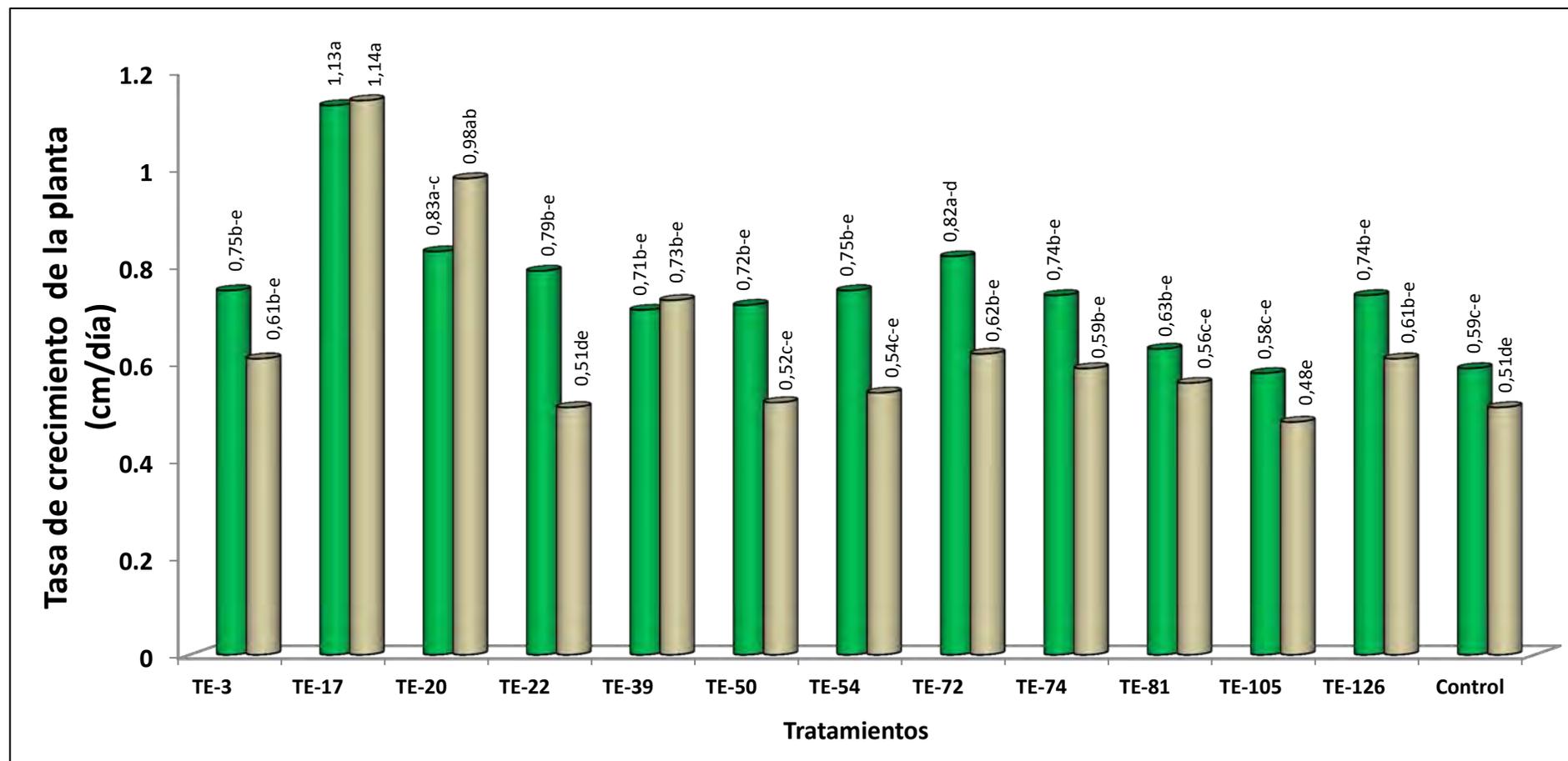


Figura 11. Tasa de crecimiento de las plántulas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófitos, mediante dos métodos de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

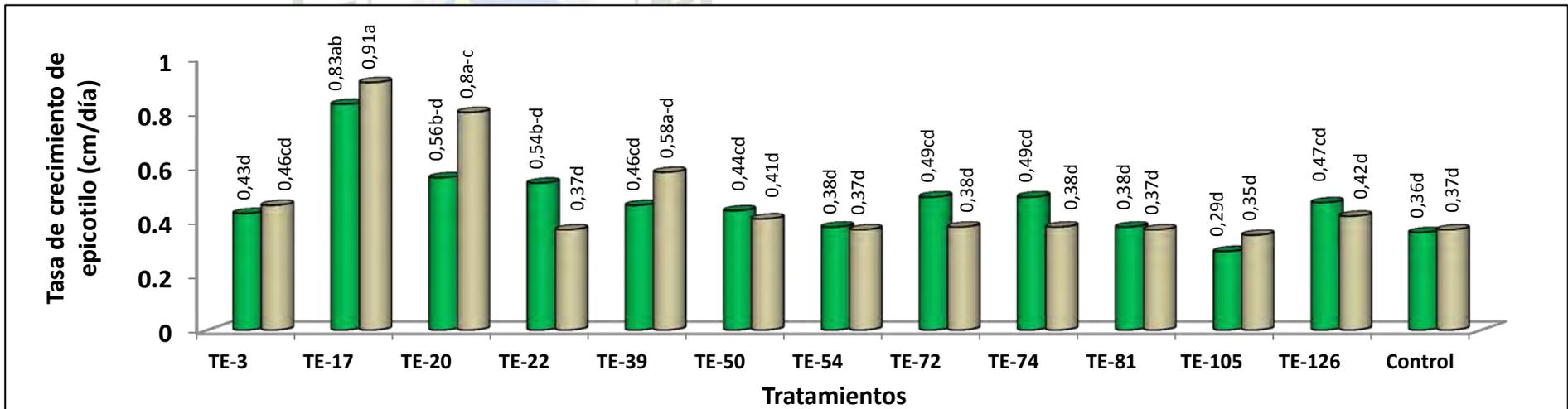
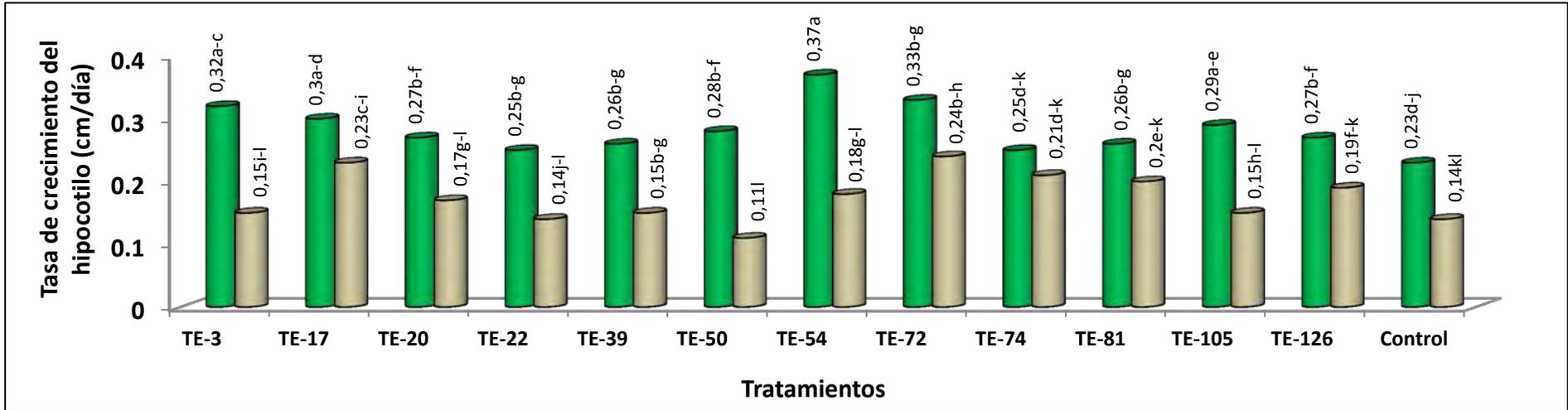


Figura 12. Tasa de crecimiento de hipocotilo y epicotilo, de las plántulas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófitos, mediante dos métodos de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

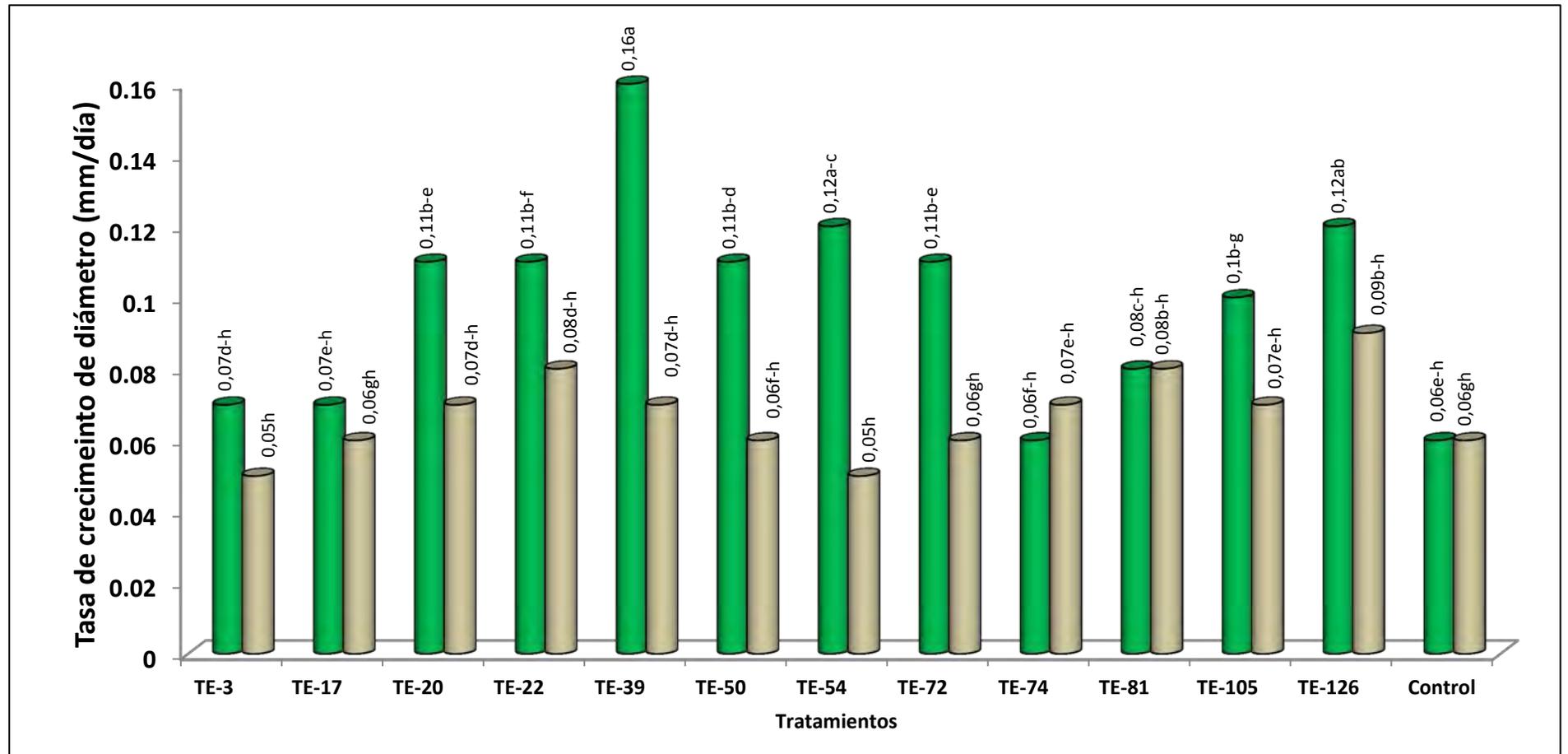


Figura 13. Tasa de crecimiento del diámetro de tallo de las plántulas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófitos, mediante dos métodos de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Según la prueba de Duncan al 5%, existen diferencias significativas entre los tratamientos para todas las variables (cuadro 5). Al comparar la tasa de crecimiento para la variable altura de planta se puede destacar que el tratamiento que tuvo el valor más alto en tasa fue el TE-17, seguido de TE-3, TE-20, TE-39, TE-72 y TE-126 que obtuvieron tasas de crecimiento con valores entre 0,90 – 0,68; y no muestran diferencias significativas entre ellos; mientras TE-22, TE-50, TE-54, TE-74, TE-81 y TE-105 fueron los que tuvieron los menores valores de tasa de crecimiento comprendidos entre 0,53- 0,67 y no muestran diferencias significativas con el control (0,55 cm/día). Sin embargo, para la variable hipocotilo, TE-72 presentó el valor más alto en tasa de crecimiento con 0,28 cm/día, seguido de TE-54 y TE-17 con valores de 0,27 y 0,26 cm/día respectivamente, además TE-3, TE-74, TE-81 y TE-126 obtuvieron valores comprendidos entre 0,23 – 0,24 cm/día y no muestran diferencias significativas entre ellos; así mismo, TE-20 y TE-105 obtuvieron valores igual a 0,22 cm/día; mientras que, TE-22, TE-39 y TE-50 obtuvieron valores menores comprendidos entre 0,18 a 0,20 cm/día y no muestran diferencias significativas con el control (0,18 cm/día). Así mismo, para la variable epicotilo la mayor tasa de crecimiento se dio en TE-17 con 0,87 cm/día, seguido del TE-20 y TE-39 con 0,68 y 0,52 cm/día respectivamente y existen diferencias significativas entre ellos; así mismo, TE-3, TE-22, TE-50, TE-72, TE-74 y TE-126

generaron los menores valores de tasa de crecimiento con valores comprendidos entre 0,43 a 0,46 cm/día superando al control (0,37cm/día); mientras que TE-54(0,37 cm/día), TE-81 (0,37 cm/día ) y TE-105 (0,32 cm/día) generaron las tasas de crecimiento más bajas. Además, en la tasa de crecimiento de diámetro de tallo, el mayor valor se mostró en TE-39 y TE-126 con valores igual a 0,11 cm/día, seguido de TE-22, TE-20 y TE-50, TE-54, TE-72, TE-81 y TE-105 que generaron valores comprendidos entre 0,08 a 0,09 cm/día y muestran diferencias significativas; mientras que, TE-3, TE-17, TE-74 y control obtuvieron los valores más bajos con 0,06 cm/día.

**Cuadro 5: Tasa de crecimiento de plantas de cacao de 32 días de edad colonizadas con *Trichoderma* endófitos mediante dos métodos de inoculación.**

Tratamiento	Altura de Planta (cm/día)		Hipocotilo (cm/día)		Epicotilo (cm/día)		Diámetro de Tallo (mm/día)	
TE-3	0,68*	bc	0,24*	abc	0,45*	c	0,06*	cd
TE-17	1,14*	a	0,26*	ab	0,87*	a	0,06*	cd
TE-20	0,90*	bc	0,22*	bc	0,68*	ab	0,09*	abcd
TE-22	0,65*	c	0,20*	c	0,46*	c	0,09*	abc
TE-39	0,72*	bc	0,20*	c	0,52*	bc	0,11*	a
TE-50	0,62*	c	0,19*	c	0,43*	c	0,09*	abcd
TE-54	0,65*	c	0,27*	ab	0,37*	c	0,08*	bcd
TE-72	0,72*	bc	0,28*	a	0,44*	c	0,08*	bcd
TE-74	0,67*	c	0,23*	abc	0,43*	c	0,06*	cd
TE-81	0,60*	c	0,23*	abc	0,37*	c	0,08*	bcd
TE-105	0,53*	c	0,22*	bc	0,32*	c	0,08*	bcd
TE-126	0,68*	bc	0,23*	abc	0,45*	c	0,11*	ab
Control	0,55*	c	0,18*	c	0,37*	c	0,06*	d

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con iguales letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.2.2 Altura de planta.

El anexo 7 muestra el análisis de varianza del crecimiento de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma*, indica que para el método resultó ser altamente significativa para las variables altura de planta, hipocotilo y epicotilo; Sin embargo, para los aislamientos resultaron ser altamente significativo para todas las variables. En tanto para la interacción (métodos x aislamientos) para la altura de la planta y epicotilo resultaron ser significativos, a comparación del hipocotilo que resultó ser no significativo ( $p \leq 0,05$ ).

En el cuadro 6 muestra el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en la altura de planta de cacao de 32 días de edad, indica que existen diferencias significativas entre métodos para todas las variables. Así mismo, indica que el método de infestación en suelo, fue el que obtuvo mayor crecimiento para todas las variables; mientras que el método de inoculación en semillas, resultó con menor crecimiento (Figura 14, figura 15 y anexo 8), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).

**Cuadro 6: Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en la altura de planta de cacao de 32 días de edad.**

METODOS DE INOCULACIÓN	Altura de Planta (cm)	Hipocotilo (cm)	Epicotilo (cm)
SEMILLA	24,45* b	10,97* b	13,48* b
SUELO	26,49* a	11,95* a	14,54* a

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con iguales letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

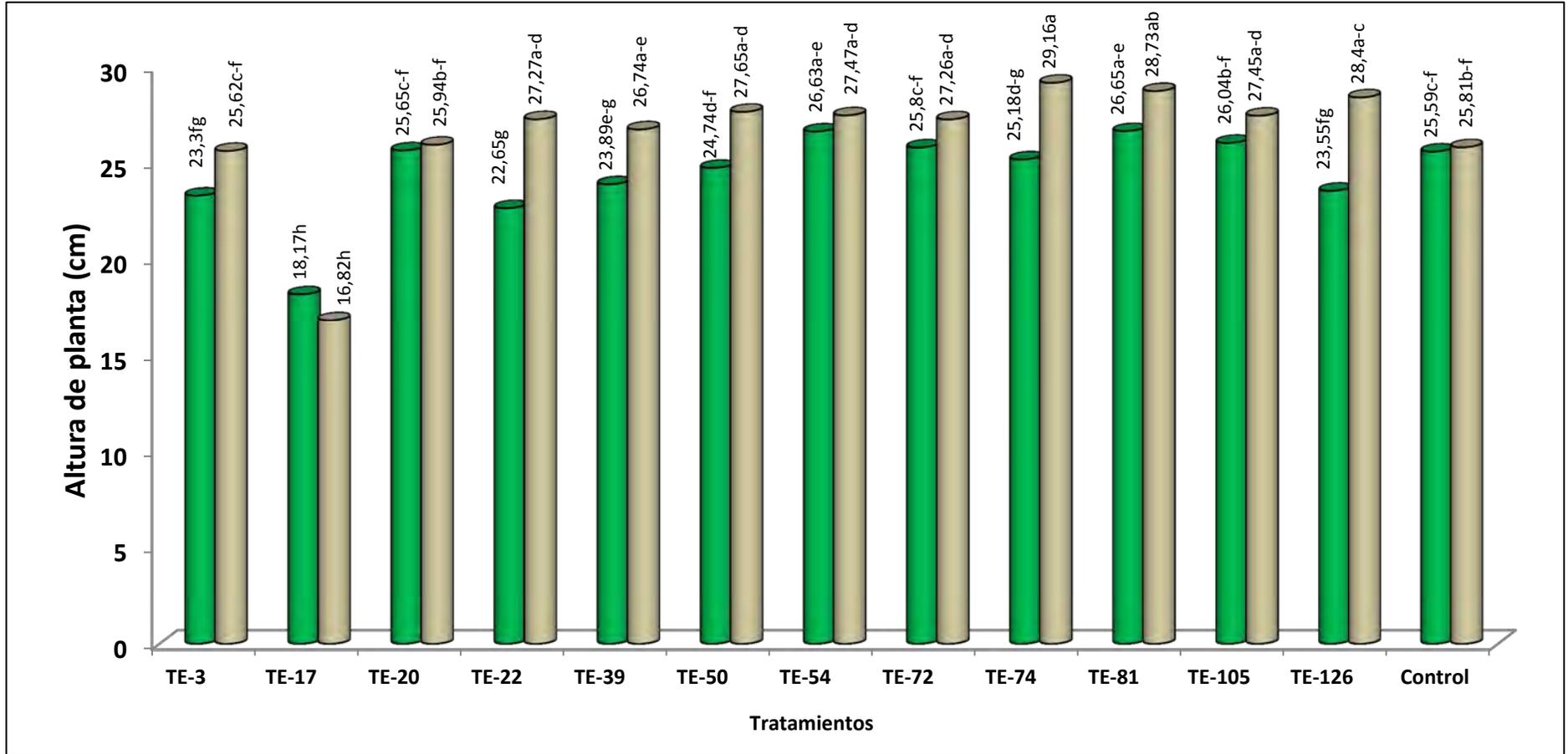


Figura 14. Altura de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con *Trichoderma* endófitos mediante dos métodos de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

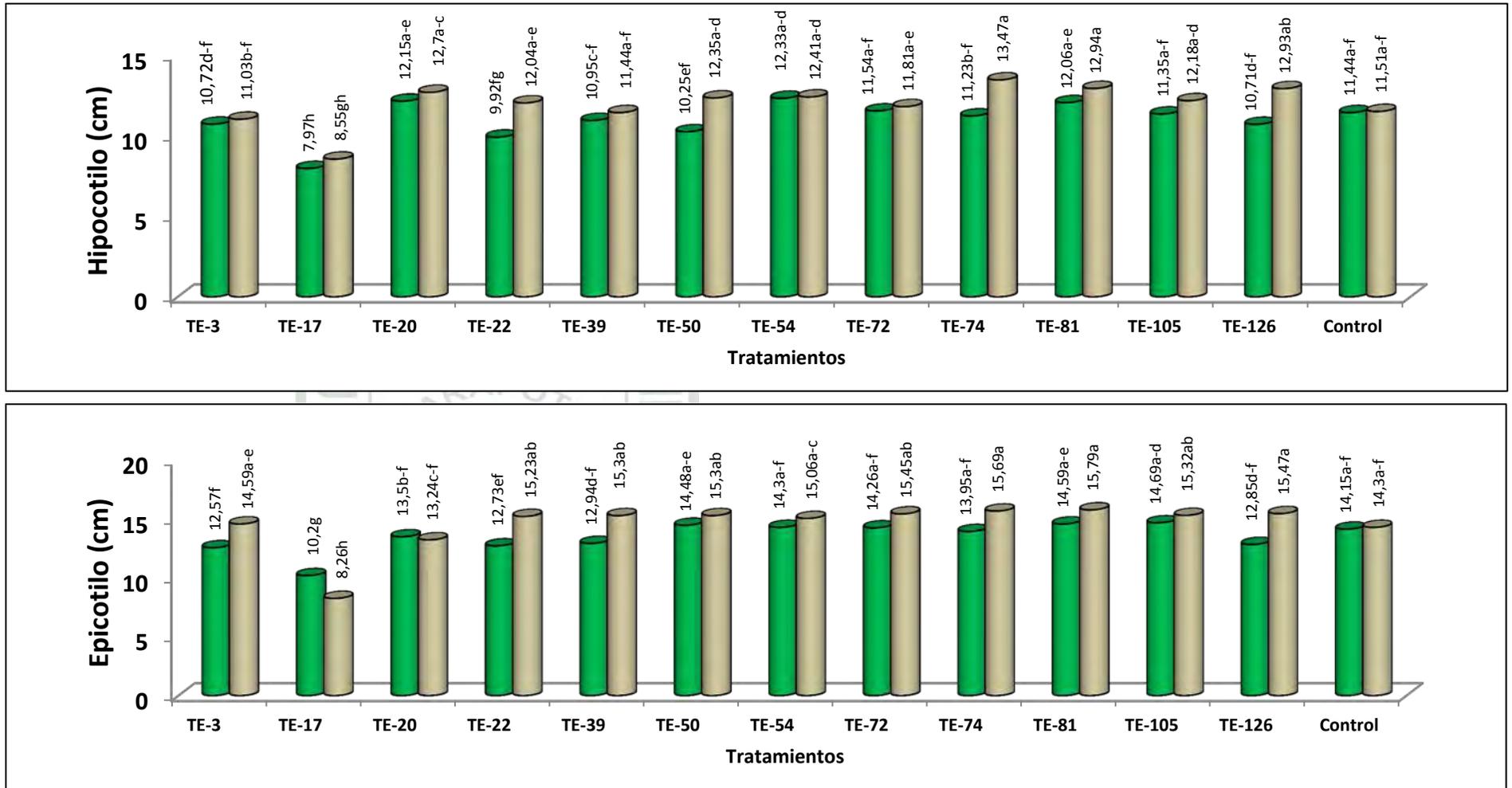


Figura 15. Altura de hipocotilo y epicotilo de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con *Trichoderma* endófitos mediante dos métodos de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Según la prueba de Duncan al 5%, existen diferencias significativas entre los aislamientos para todas las variables (cuadro 7); indica que, TE-81, TE-74, TE-54, TE-72 y TE-105 proporcionaron mayor crecimiento en todas las variables superando al control; siendo TE-81 que obtuvo el valor más alto en crecimiento para las variables altura de planta, hipocotilo y epicotilo con 27,69 cm, 12,5 cm y 15,19 cm, respectivamente; seguido, de TE-74 (27,17 cm, 12,35 cm y 14,82 cm, respectivamente) y TE-54 (27,05 cm, 12,37 cm, 14,68 cm, respectivamente); así mismo, TE-105 (26,75 cm, 11,77 cm, 15 cm, respectivamente), TE-72 (26,53 cm, 11,67 cm, 14,86 cm, respectivamente), TE-50 (26,19 cm, 11,3 cm, 14,89 cm, respectivamente) y TE-126 (25,98 cm, 11,82 cm, 14,16 cm, respectivamente), superando todos los aislamientos mencionados al control (25,7 cm, 11,48 cm, 14,23 cm, respectivamente). Sin embargo, TE-3, TE-17, TE-20, TE-22 y TE-39, generaron valores menores al control, siendo TE-17 (17,49 cm, 8,26 cm y 9,23cm, respectivamente) el que generó menor crecimiento en plantas de cacao de 32 días de edad.

**Cuadro 7: Altura de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con *Trichoderma* endófitos mediante dos métodos de inoculación.**

Tratamiento	Altura de Planta (cm)		Hipocotilo (cm)		Epicotilo (cm)	
	Medio	Letras	Medio	Letras	Medio	Letras
TE-3	24,46*	d	10,88*	b	13,58*	bc
TE-17	17,49*	e	08,26*	c	09,23*	d
TE-20	25,80*	abcd	12,43*	a	13,37*	c
TE-22	24,96*	cd	10,98*	b	13,98*	abc
TE-39	25,31*	bcd	11,20*	ab	14,12*	abc
TE-50	26,19*	abcd	11,30*	ab	14,89*	a
TE-54	27,05*	ab	12,37*	a	14,68*	ab
TE-72	26,53*	abc	11,67*	ab	14,86*	ab
TE-74	27,17*	ab	12,35*	a	14,82*	ab
TE-81	27,69*	a	12,50*	a	15,19*	a
TE-105	26,75*	abc	11,77*	ab	15,00*	a
TE-126	25,98*	abcd	11,82*	ab	14,16*	abc
Control	25,70*	abcd	11,48*	ab	14,23*	abc

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con iguales letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.2.3 Diámetro de Tallo

En el anexo 9, según el análisis de varianza del diámetro de tallo de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma*, indica que para el método resultó ser altamente significativa; así mismo, para los aislamientos resultaron ser altamente significativa. En tanto para la interacción (métodos x aislamientos) resultaron ser no significativo ( $p \leq 0,05$ ).

En el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en el diámetro de tallo de las plantas de cacao de 32 días de edad (cuadro 8), indica que existen diferencias significativas entre métodos para todas las variables; así mismo, indica que el método de inoculación en semilla (3,79 mm), fue el que proporcionó mayor diámetro de tallo; mientras que las plantas inoculadas con el método de infestación en suelo (3,63 mm), resultaron con menor diámetro (Figura 16 y anexo 10), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).

#### Cuadro 8.

**Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en el diámetro de tallo de plantas de cacao de 32 días de edad.**

MÉTODOS DE INOCULACIÓN	Diámetro de tallo (mm)	
SEMILLA	3,79*	a
SUELO	3,63*	b

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con iguales letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

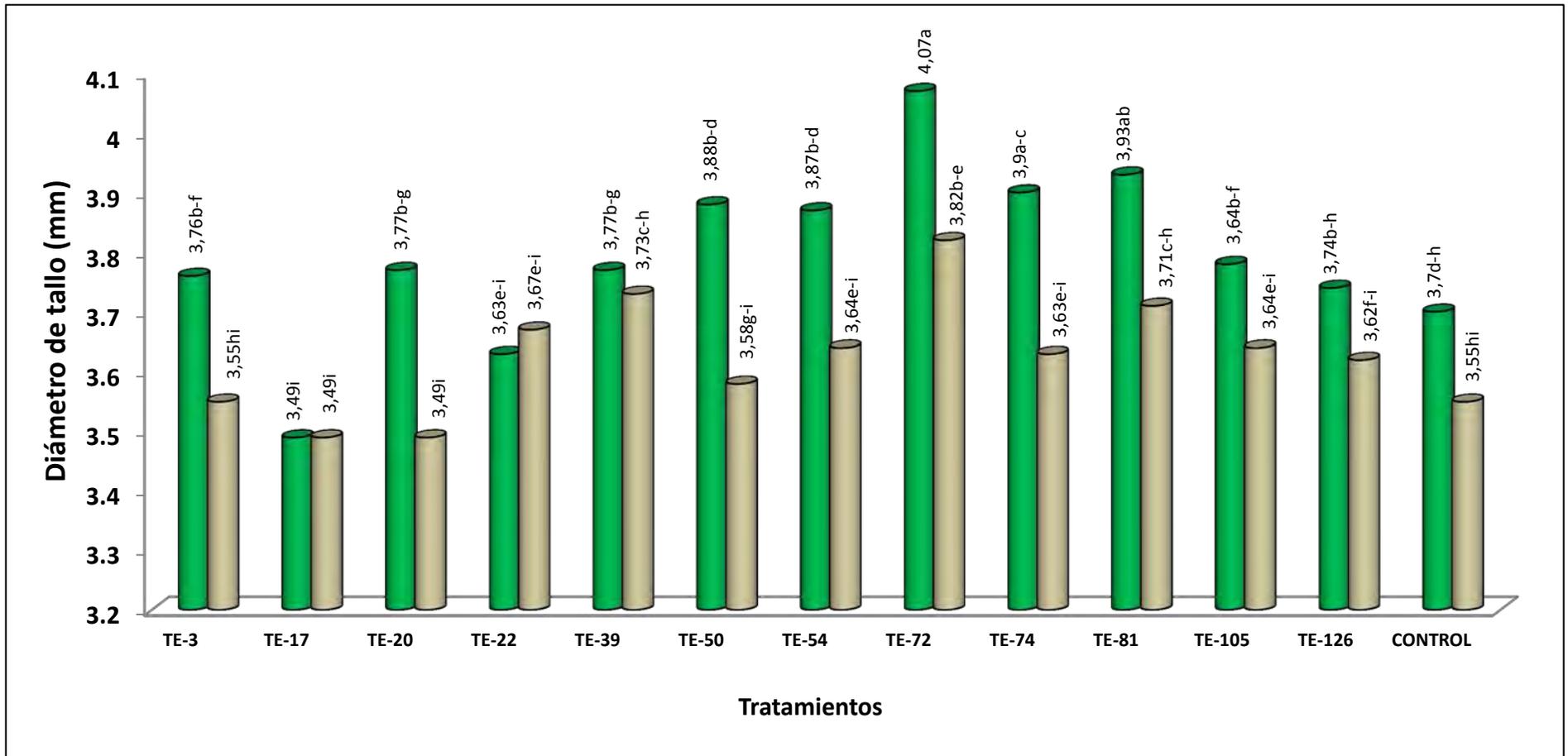


Figura 16. Diámetro de tallo, en plántulas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófitos, mediante dos métodos de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Según la prueba de Duncan al 5%, existen diferencias significativas entre los aislamientos para todas las variables (cuadro 9); indica que, TE-72 (3,94 mm) proporcionó mayor crecimiento de diámetro de tallo superando al control, seguido del TE-81 (3,82 mm); así mismo, TE-74, TE-54, TE-39, TE-50 y TE-105 generaron valores comprendidos de 3,71 a 3,76 mm y sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, TE-126, TE-3, TE-22, TE-20 se comportaron igual que el control proporcionando valores de diámetro de tallo comprendidos de 3,63 a 3,68 mm; mientras que, TE-17 (3,49 mm) fue el que generó el valor más bajo de diámetro de tallo en plantas de cacao de 32 días de edad.

**Cuadro 9: Diámetro de tallo de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con *Trichoderma* endófitos mediante dos métodos de inoculación.**

Tratamiento	Diámetro de tallo (mm)	
TE-3	3,65*	c
TE-17	3,49*	d
TE-20	3,63*	c
TE-22	3,65*	c
TE-39	3,75*	bc
TE-50	3,73*	bc
TE-54	3,76*	bc
TE-72	3,94*	a
TE-74	3,76*	bc
TE-81	3,82*	b
TE-105	3,71*	bc
TE-126	3,68*	c
Control	3,63*	c

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.1.2.4 Longitud de raíz

El anexo 11, indica el análisis de varianza de la longitud de raíces de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma*, donde resultó ser significativa para el método; sin embargo, para los aislamiento resultaron ser altamente significativo y para la interacción (métodos x aislamientos) resultaron ser significativo ( $p \leq 0,05$ ).

El cuadro 10 muestra el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en la longitud de las raíces de las plantas de cacao de 32 días de edad, indica que existen diferencias significativas entre métodos. Las plantas inoculadas con el método de infestación en suelo (380,69 cm), fueron las que obtuvieron mayor longitud de raíz; mientras que, mediante el método de inoculación en semilla (343,22 cm), resultaron con menor longitud de raíz (Figura 17 y anexo 12), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).

#### Cuadro 10.

**Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en la longitud de raíz de plantas de cacao de 32 días de edad.**

METODOS DE INOCULACIÓN	Longitud de raíz (cm)	
SUELO	380,69*	a
SEMILLA	343,22*	b

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

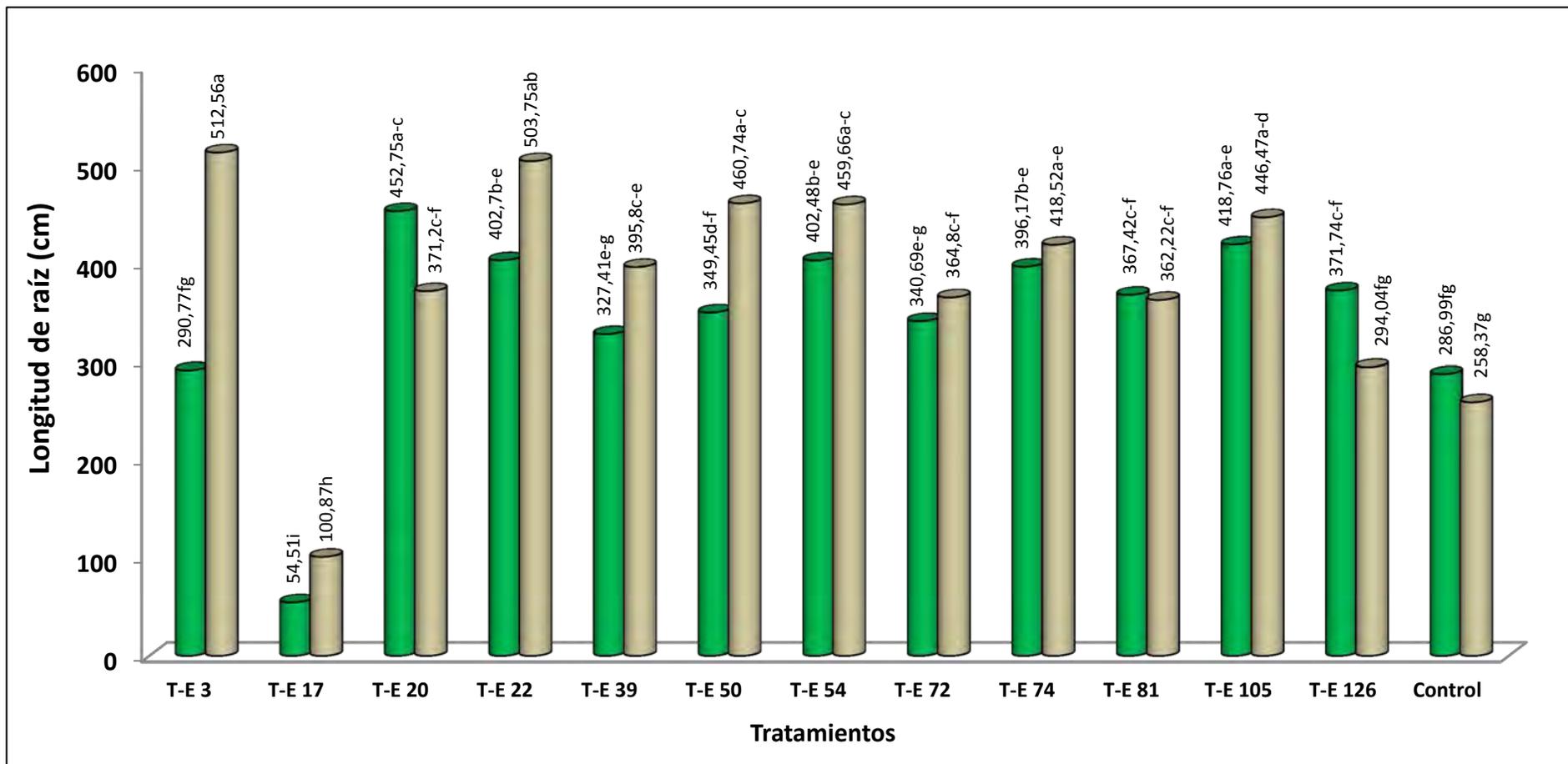


Figura 17. Longitud de raíz en plántulas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófitos, mediante dos métodos de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

El cuadro 11, muestra el promedio de longitud de raíces de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófitos mediante dos métodos de inoculación y según la prueba de Duncan al 5%, existen diferencias significativas entre los tratamientos, donde indica que, el aislamiento que generó el valor más alto de longitud de raíz fue el TE-22 con 453,23 cm; seguido de, TE-105 y TE-54 con longitudes de raíz promedio de 432,61 y 431,07 centímetros respectivamente; así mismo, TE-20, TE-74, TE-50 y TE-3 proporcionaron valores comprendidos de 401,67 a 411,98 cm de longitud de raíz y con diferencias significativas entre aislamientos; además, TE-39, TE-72 y TE-126 resultaron con valores comprendidos de 332,89 a 361,61 cm y con diferencias significativas. Once (11) aislamientos superaron al control (272,68 cm); mientras que, el aislamiento TE-17 fue el único que generó menor crecimiento radicular con 77,69 cm.

**Cuadro 11: Longitud de raíz de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con *Trichoderma* endófitos mediante dos métodos de inoculación.**

Tratamiento	Longitud de raíz (cm)	
T-E 3	401,67*	abcd
T-E 17	77,69*	f
T-E 20	411,98*	abc
T-E 22	453,23*	a
T-E 39	361,61*	cd
T-E 50	405,10*	abc
T-E 54	431,07*	ab
T-E 72	352,75*	cd
T-E 74	407,35*	abc
T-E 81	364,82*	bcd
T-E 105	432,61*	ab
T-E 126	332,89*	d
Control	272,68*	e

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.2.5 Número de hojas

En el anexo 13 muestra el análisis de varianza del número de hojas de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma*, indica que, para el método resultó ser significativo; sin embargo, para los aislamientos resultaron ser altamente significativa. En tanto para la interacción (métodos x aislamientos) resultaron ser significativo ( $p \leq 0,05$ ).

El cuadro 12 muestra el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en el número de hojas de las plantas de cacao de 32 días de edad; indica que, existen diferencias significativas entre métodos; así mismo, las plantas inoculadas con el método semilla (5,23), fueron los que obtuvieron mayor número de hojas; mientras que, con el método de infestación en suelo (4,90), resultaron con menor número de hojas (Figura 18 y anexo 14), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).

**Cuadro 12: Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en el número de hojas de plantas de cacao de 32 días de edad.**

MÉTODOS DE INOCULACIÓN	Número de hojas	
SEMILLA	5,23*	a
SUELO	4,90*	b

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

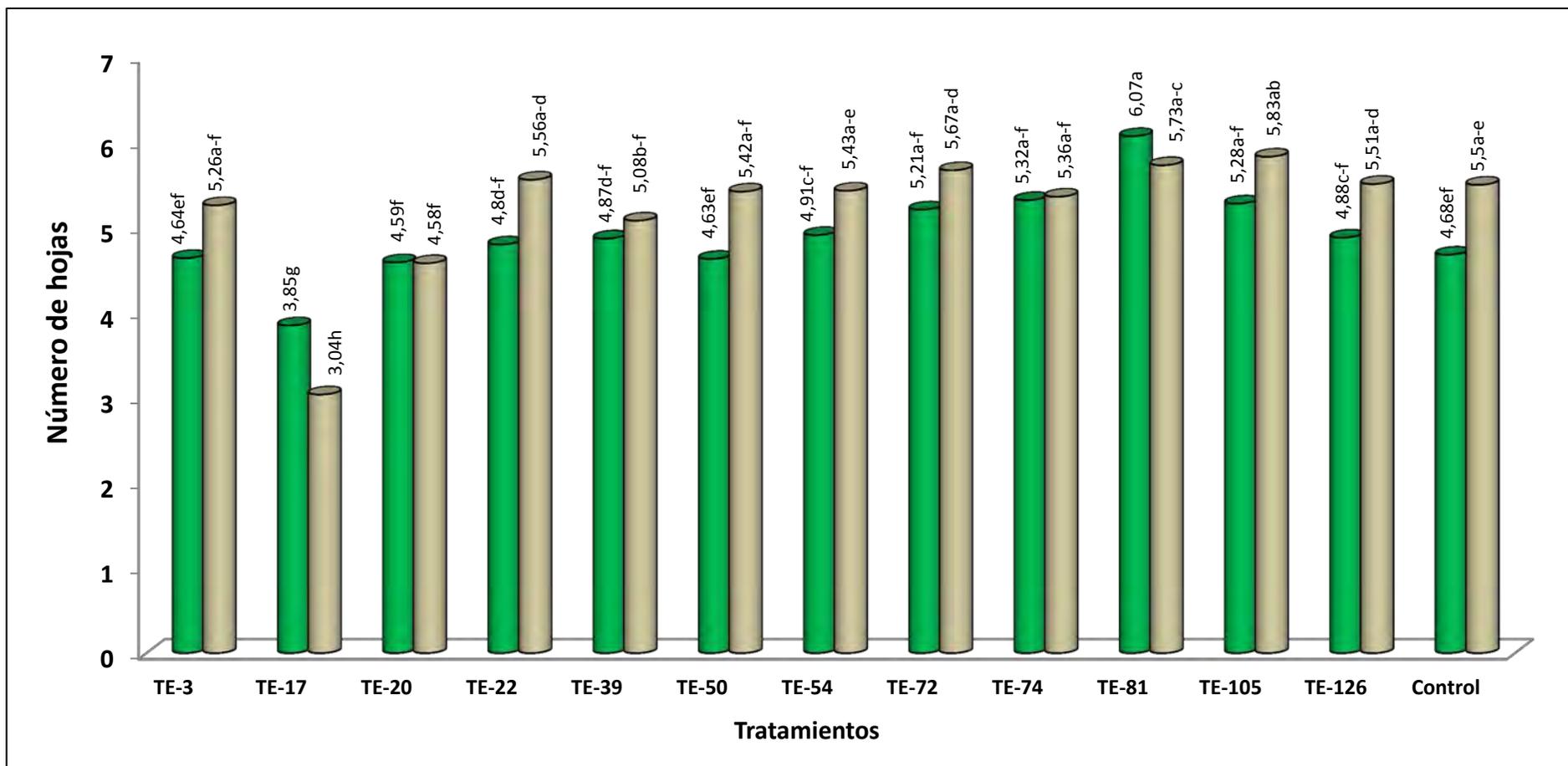


Figura 18. Número de hojas promedio de plántulas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófitos, mediante dos métodos de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Según la prueba de Duncan al 5%, existen diferencias significativas entre los tratamientos para todas las variables (cuadro 13); indica que, el aislamiento que generó mayor número de hojas fue el TE-81 con 5,9 hojas; seguido de TE-22, TE-105, TE-72, TE-54, TE-74 y TE-126 con cantidades comprendidas entre 5,17 a 5,56 hojas y con diferencias significativas entre aislamientos; así mismo, TE-3, TE-39 y TE-50 generaron número de hojas comprendido entre 4,97 a 5,09 mayores al control (4,95 hojas); mientras que, TE-20 y TE-17 generaron menor cantidad de hojas con valores comprendidos entre 3,45 a 4,58 y con diferencias significativas.

**Cuadro 13: Número de hojas de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con *Trichoderma* endófitos mediante dos métodos de inoculación.**

Tratamiento	Número de hojas	
TE-3	5,09*	bcd
TE-17	3,45*	e
TE-20	4,58*	d
TE-22	5,56*	ab
TE-39	5,02*	bcd
TE-50	4,97*	bcd
TE-54	5,20*	bc
TE-72	5,34*	abc
TE-74	5,18*	bc
TE-81	5,90*	a
TE-105	5,44*	abc
TE-126	5,17*	bc
Control	4,95*	cd

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.1.2.6 Peso seco

El anexo 15 muestra el análisis de varianza del peso seco aéreo (PS-A) y peso seco de raíz (PS-R) de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, indica que para el método resultó ser significativa para ambas variables; sin embargo, para los aislamientos para PS-R resultaron ser altamente significativo; mientras que, para la variable PS-A resultó ser no significativo. En tanto para la interacción (métodos x aislamientos) para PS-A resultó ser significativo, a comparación del PS-R que resultó ser no significativo ( $p \leq 0,05$ ).

En el cuadro 14, muestra el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en el PS-A y PS-R de plantas de cacao de 32 días de edad, indica que existen diferencias significativas entre métodos para ambas variables. Así mismo, señala que mediante el método de inoculación en semilla, se obtuvo mayor peso seco para ambas variables; mientras que, por el método de infestación en suelo las plantas resultaron con menor peso seco (Figura 19 y anexo 16), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).

**Cuadro 14: Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en el peso seco de plantas de cacao de 32 días de edad.**

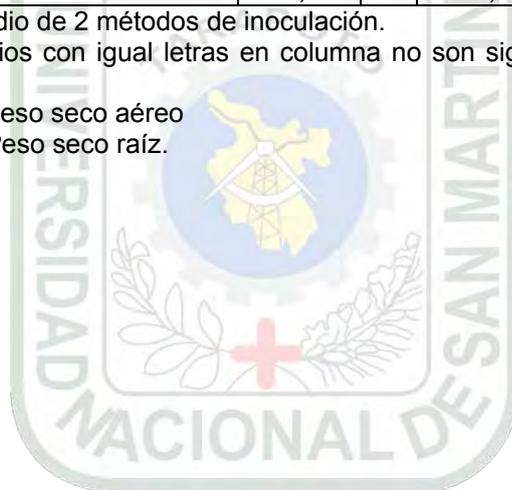
MÉTODO DE INOCULACIÓN	PESO SECO			
	PS-A		PS-R	
SEMILLA	1,14*	a	0,22*	a
SUELO	1,05*	b	0,20*	b

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

PS-A=Peso seco aéreo

PS-R=Peso seco raíz.



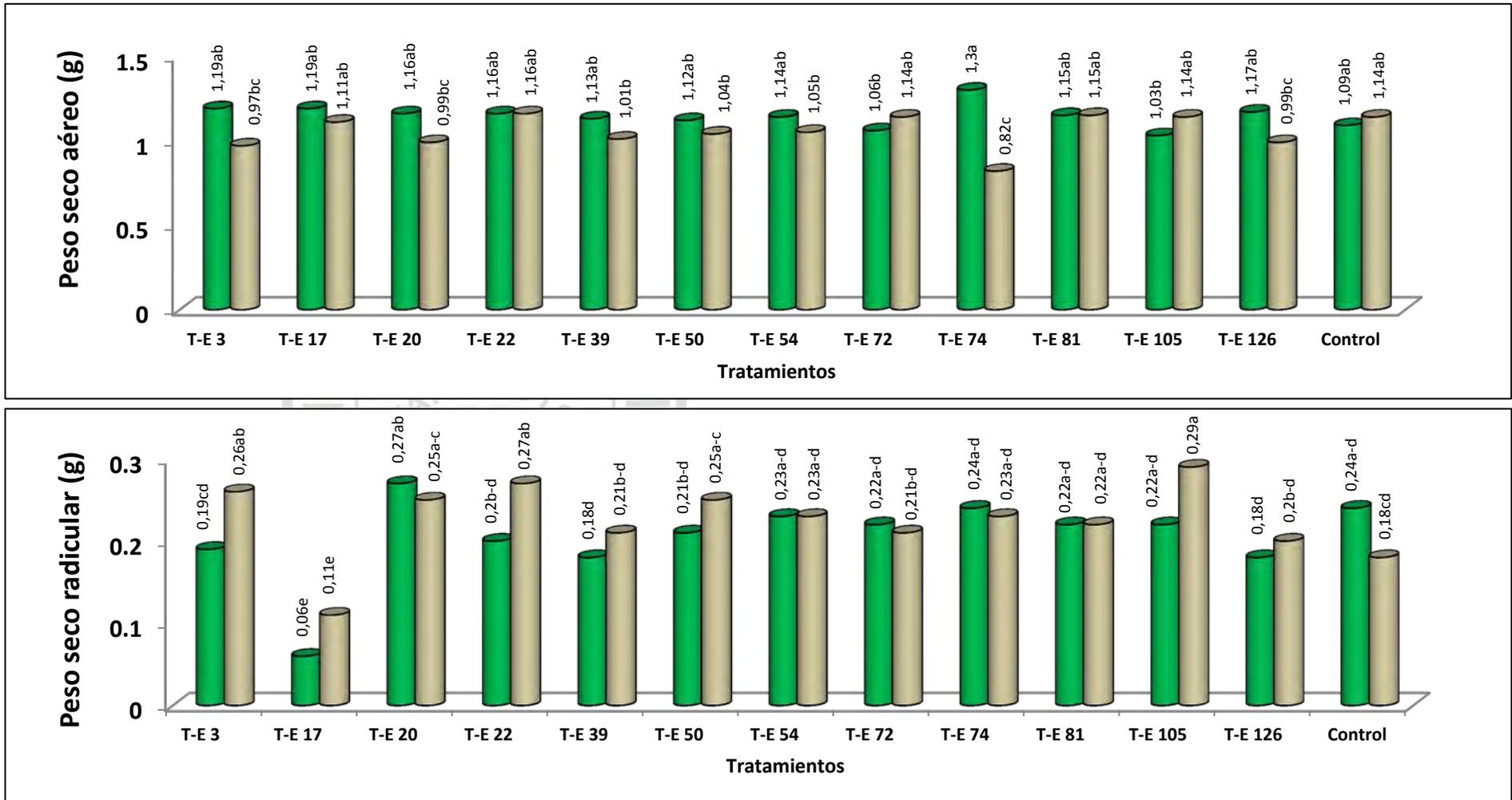


Figura 19. Peso seco de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Según la prueba de Duncan al 5%, existen diferencias significativas entre los aislamientos para la variable PS-R; mientras que, para la variable PS-A no existen diferencias significativas (cuadro 15); en tanto, en el PS-R, indica que, estadísticamente los aislamientos que tuvieron mayor peso seco fueron TE-20 y TE-105 con 0,26 y 0,25 g respectivamente, superando al control; así mismo, TE-22, TE-74, TE-54, TE-50, TE-3, TE-81, TE-72, TE-39, TE-126 y el control que obtuvieron pesos secos comprendidos entre 0,19 a 0,23 gramos y con diferencias significativas entre aislamientos; mientras que, TE-17 generó menor peso seco con 0,09 gramos.

**Cuadro 15: Peso seco de plantas de cacao de 32 días de edad, colonizadas con *Trichoderma* endófitos mediante dos métodos de inoculación.**

Tratamiento	PESO SECO			
	PS-A		PS-R	
TE-3	1,08*	a	0,23*	ab
TE-17	1,15*	a	0,09*	c
TE-20	1,08*	a	0,26*	a
TE-22	1,16*	a	0,23*	ab
TE-39	1,07*	a	0,19*	b
TE-50	1,08*	a	0,23*	ab
TE-54	1,10*	a	0,23*	ab
TE-72	1,10*	a	0,22*	ab
TE-74	1,06*	a	0,23*	ab
TE-81	1,15*	a	0,22*	ab
TE-105	1,09*	a	0,25*	a
TE-126	1,08*	a	0,19*	b
Control	1,11*	a	0,21*	ab

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ). PS-A=Peso seco aéreo; PS-R=Peso seco raíz.

### **5.1.3 Efecto de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito al estrés hídrico.**

#### **5.1.3.1 Grado de marchitez de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito.**

El anexo 21 muestra el análisis de varianza del grado de marchitez (GM) de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* mediante dos métodos de inoculación durante el estrés hídrico, según los días que fueron sometidas al estrés hídrico (0, 6 y 9 días). Donde se observa que para el método de inoculación, aislamiento e interacción de ambos resultaron ser significativos a los seis y nueve días después de ser sometidas al estrés hídrico (6 y 9DDSE); mientras que, para el caso de 0DDSE resultó ser no significativo para dichos factores ( $p \leq 0,05$ ).

El cuadro 16 muestra el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en el grado de marchitez de plantas de cacao a los 0, 6 y 9 DDSE, indica que existen diferencias significativas entre métodos para los días 6 y 9 DDSE; mientras que, para el día cero no hubo diferencias significativas. Las plantas inoculadas con el método de inoculación en semilla resultaron con menor grado de marchitez; mientras que, con el método de infestación en suelo resultaron con mayor grado de marchitez (Figura 20a y 20b; anexo 22), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).

**Cuadro 16: Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en el grado de marchitez de plantas de cacao a los 0, 6 y 9 días después de someter al estrés hídrico.**

<b>METODO DE INOCULACIÓN</b>	<b>0 DDSE</b>		<b>6 DDSE</b>		<b>9 DDSE</b>	
SEMILLA	0,00*	a	2,28*	a	4,03*	a
SUELO	0,00*	a	2,69*	b	4,30*	b

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

DDSE=Días después de someter al estrés



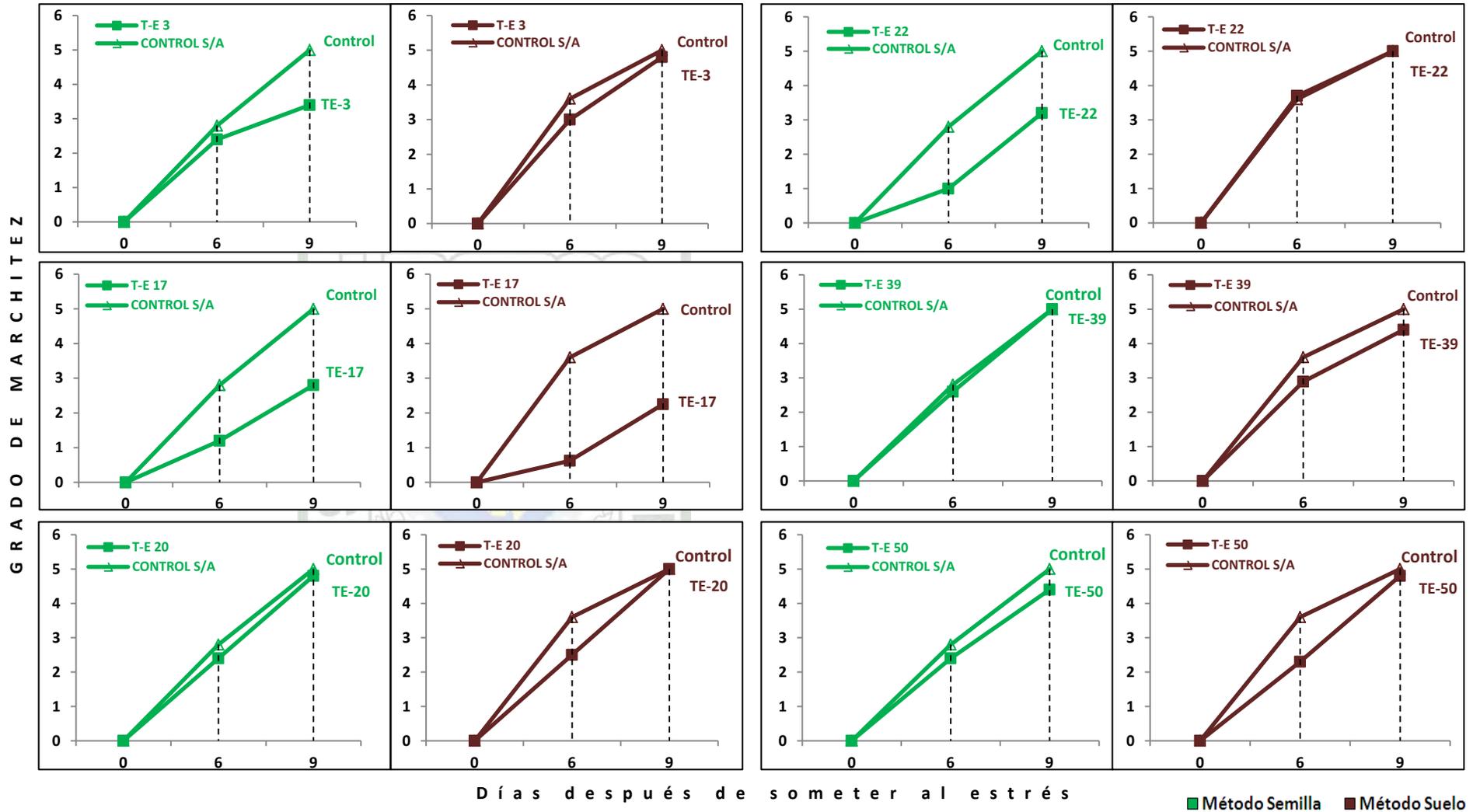


Figura 20a. Grado de marchitez de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico ( $p \leq 0,05$ ).

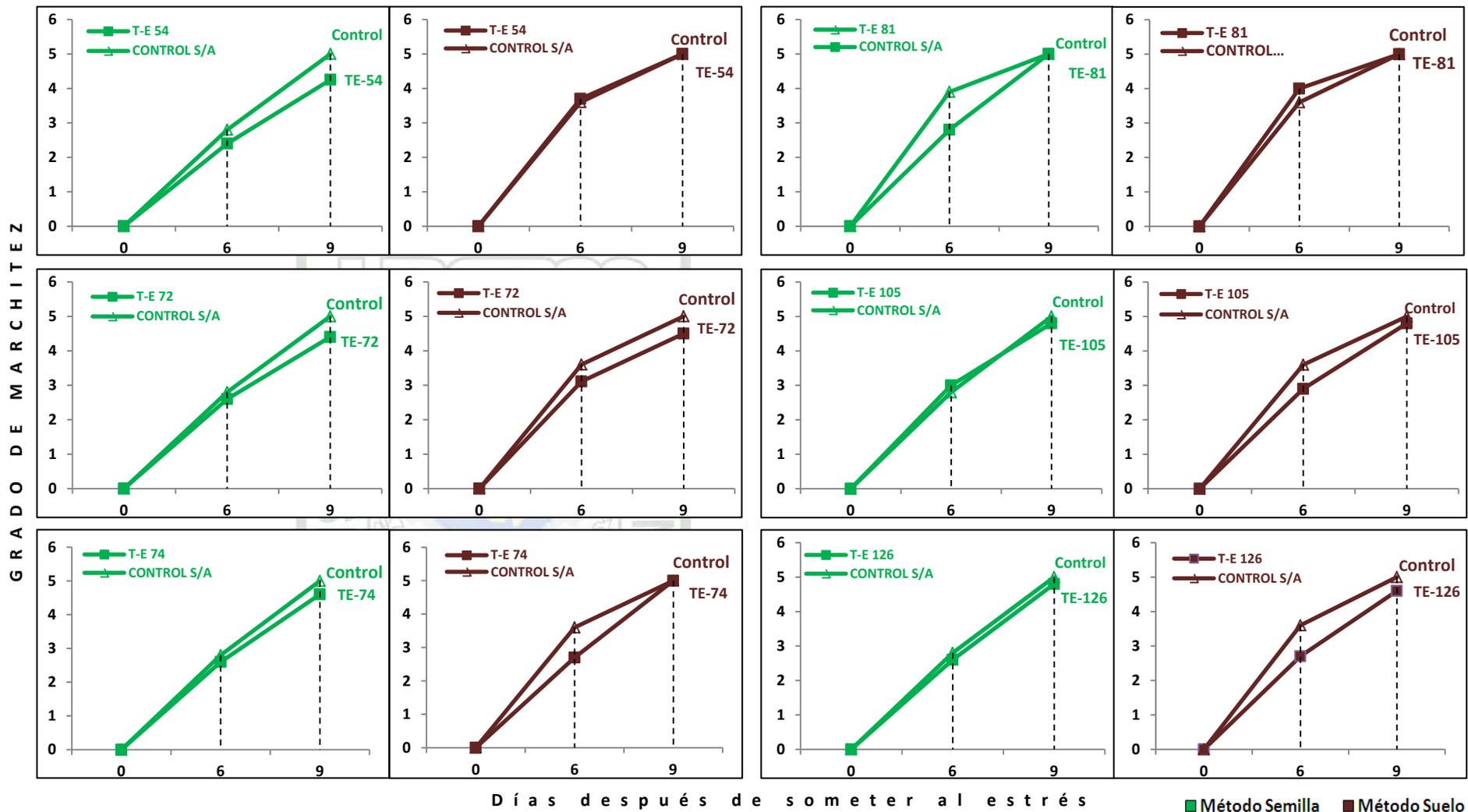


Figura 20b. Grado de marchitez de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico ( $p \leq 0,05$ ).

Según la prueba de Duncan al 5%, existen diferencias significativas entre los tratamientos a los 6 y 9 DDSE (cuadro 17). A los 6 DDSE, las plantas colonizadas con el aislamiento TE-17 presentaron menor GM (0.91), seguido de TE-22, TE-50, TE-20, TE-126, TE-74, TE-3, TE-39, TE-72 y TE-105 que obtuvieron grados comprendidos entre 2,35 a 2,95 y no existe diferencias significativas entre ellos; así mismo, TE-54 obtuvo un GM igual a 3,05 a comparación del control s/a que obtuvo un GM igual a 3,2 superior a todos los aislamientos mencionados; mientras que, con TE-81 obtuvo el mayor grado de marchitez (5). Sin embargo, a los 9DDSE las plantas que presentaron menor GM fue con TE-17 con 2,53; seguido con los aislamientos TE-22 y TE-3 con un GM igual a 4,1; así mismo, con TE-72, TE-50, TE-54, TE-39, TE-126, TE-105, TE-74 y TE-20 se obtuvieron GM comprendidos entre 4,45 a 4,9 sin diferencias significativas entre ellos; mientras que, con TE-81 y el control s/a se obtuvieron los valores más altos de grado de marchitez igual a 5.

**Cuadro 17: Grado de marchitez de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito mediante dos métodos de inoculación a los 0, 6, y 9 días después de someter al estrés hídrico.**

Tratamiento	Grado de Marchitez					
	0 DDSE		6 DDSE		9 DDSE	
TE-3	0*	a	2,70*	cde	4,10*	cd
TE-17	0*	a	0,91*	b	2,53*	b
TE-20	0*	a	2,45*	cd	4,90*	de
TE-22	0*	a	2,35*	c	4,10*	c
TE-39	0*	a	2,74*	cde	4,70*	cde
TE-50	0*	a	2,35*	cd	4,60*	cde
TE-54	0*	a	3,05*	de	4,63*	cde
TE-72	0*	a	2,86*	cde	4,45*	cde
TE-74	0*	a	2,65*	cde	4,80*	cde
TE-81	0*	a	3,95*	f	5,00*	e
TE-105	0*	a	2,95*	cde	4,80*	cde
TE-126	0*	a	2,65*	cde	4,70*	cde
Control s/a	0*	a	3,20*	e	5,00*	e
Control c/a	0*	a	0,00*	a	0,00*	a

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Control s/a=Control sin agua

Control c/a=Control con agua

DDSE=Días después de someter al estrés.

### 5.1.3.2 Tasa absoluta de crecimiento durante el estrés hídrico

El anexo 17 muestra el análisis de varianza la tasa absoluta de crecimiento (TAC) durante el estrés hídrico de las plantas de cacao colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito; indica que, para el método resultó ser significativo para las variables TAC de la biomasa seca radicular (TAC-R), mientras que, para la TAC de la biomasa seca aérea (TAC-A) resultó no significativo; así mismo, para los aislamientos y la interacción (métodos x aislamientos) resultaron ser significativos para ambas variables de TAC, ( $p \leq 0,05$ ).

El cuadro 18 muestra el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en la TAC de plantas de cacao en el 0, 6 y 9 días después de someter al estrés (DDSE), indica que existen diferencias significativas entre métodos para la TAC-R; mientras que, para la TAC-A no hay diferencias significativas entre los métodos. Así mismo, indica que en la TAC-R el método de inoculación en semillas, fue el que obtuvo mayor TAC; mientras que, el método de inoculación en suelo resultó con menor TAC (Figura 21 y 22; anexo 18), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).

**Cuadro 18: Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en tasa absoluta de crecimiento de plantas de cacao durante el estrés hídrico.**

METODO DE INOCULACIÓN	0 DDSE		6 DDSE		9 DDSE		TASA ABSOLUTA DE CRECIMIENTO	
	PS-A	PS-R	PS-A	PS-R	PS-A	PS-R	TAC-A	TAC-R
SEMILLA	1,14* a	0,22* a	1,15* a	0,30* a	1,11* a	0,33* a	-0,0002* a	0,0134* a
SUELO	1,05* b	0,20* b	1,06* b	0,28* b	1,07* a	0,31* a	-0,0026* a	0,0093* b

\*Promedio de 2 métodos de inoculación Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

PS-A=Peso seco aéreo

PS-R=Peso seco raíz

DDSE=Días después de someter al estrés

TAC-A=Tasa absoluta de crecimiento de peso seco aérea

TAC-R= Tasa absoluta de crecimiento de biomasa seca radicular.



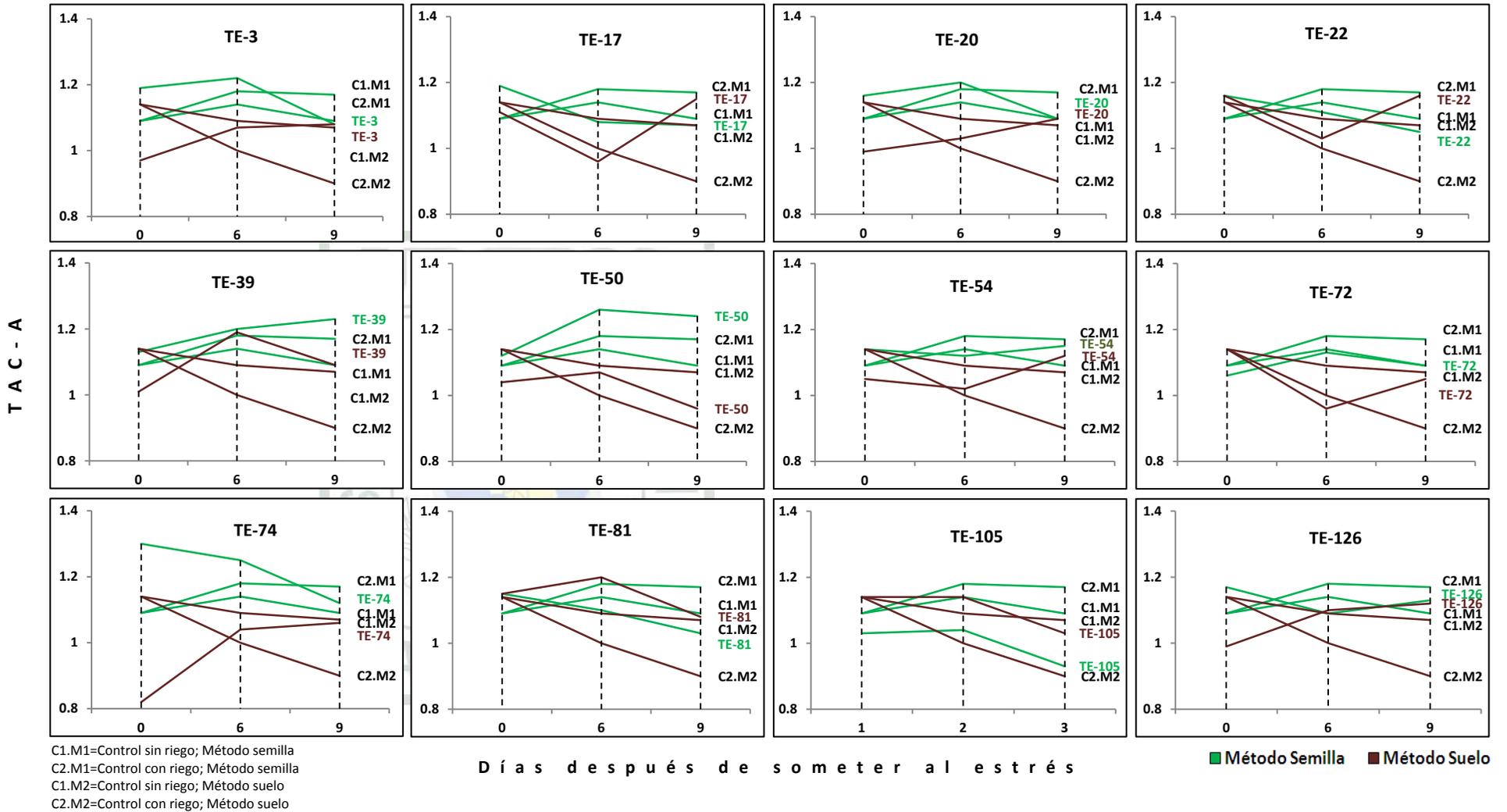
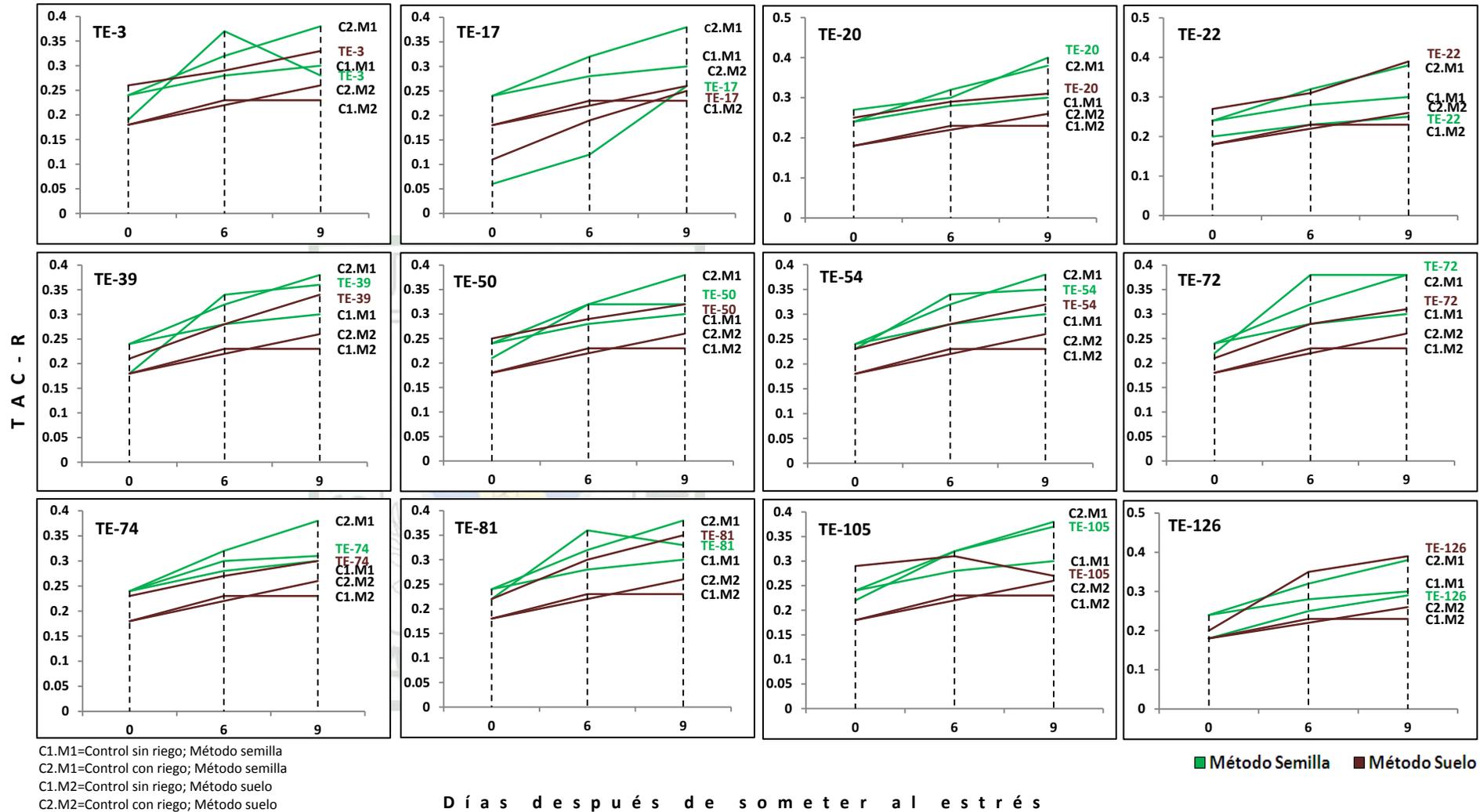


Figura 21. Tasa absoluta de crecimiento de la biomasa seca aérea (TAC-A) de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 22.** Tasa absoluta de crecimiento de la biomasa seca radicular (TAC-R) de plantas de cacao colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico ( $p \leq 0,05$ ).

Según la prueba de Duncan al 5%, existen diferencias significativas entre los aislamientos para la ambas variables de la TAC (cuadro 19); indica que, en la TAC-A se observa que existen diferencias significativas entre aislamientos, siendo los aislamientos TE-126 (0,0145g.día<sup>-1</sup>), TE-54 (0,0088g.día<sup>-1</sup>) y TE-39 (0,0053g.día<sup>-1</sup>) los que generaron mayor TAC-A, superando al control s/a (-0,0057g.día<sup>-1</sup>). En los datos de TAC-R indica que, los aislamientos TE-17 (0,0183g.día<sup>-1</sup>), TE-126 (0,0181g.día<sup>-1</sup>) y TE-39 (0,0164g.día<sup>-1</sup>) generaron mayor TAC durante el estrés hídrico, seguido de los aislamientos, TE-20 (0,0126g.día<sup>-1</sup>), TE-22 (0,0106g.día<sup>-1</sup>), TE-54 (0,0106g.día<sup>-1</sup>), TE-81 (0,0104g.día<sup>-1</sup>), TE-50 (0,0087g.día<sup>-1</sup>), TE-74 (0,0073g.día<sup>-1</sup>), TE-72 (0,0069g.día<sup>-1</sup>), superando estadísticamente al control s/a (0,0058g.día<sup>-1</sup>).

**Cuadro 19: Tasa absoluta de crecimiento de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico.**

Tratamiento	0 DDSE		6 DDSE		9 DDSE		TASA ABSOLUTA DE CRECIMIENTO									
	PS-A	PS-R	PS-A	PS-R	PS-A	PS-R	TAC-A		TAC-R							
TE-3	1,08*	a	0,23*	ab	1,15*	a	0,33*	a	1,08*	a	0.31	abc	-0,0061*	ab	0.0042*	b
TE-17	1,15*	a	0,09*	c	1,02*	a	0,15*	c	1,11*	a	0.26	c	-0,0152*	b	0.0183*	ab
TE-20	1,08*	a	0,26*	a	1,12*	a	0,30*	ab	1,09*	a	0.36	a	-0,0013*	ab	0.0126*	ab
TE-22	1,16*	a	0,23*	ab	1,07*	a	0,27*	ab	1,1*	a	0.32	abc	-0,0017*	ab	0.0106*	ab
TE-39	1,07*	a	0,19*	b	1,20*	a	0,31*	ab	1,16*	a	0.35	a	0,0053*	ab	0.0164*	ab
TE-50	1,08*	a	0,23*	ab	1,16*	a	0,31*	ab	1,1*	a	0.32	abc	-0,0029*	ab	0.0087*	ab
TE-54	1,10*	a	0,23*	ab	1,07*	a	0,31*	ab	1,13*	a	0.34	ab	0,0088*	ab	0.0106*	ab
TE-72	1,10*	a	0,22*	ab	1,04*	a	0,33*	a	1,07*	a	0.35	a	-0,0177*	b	0.0069*	b
TE-74	1,06*	a	0,23*	ab	1,15*	a	0,29*	ab	1,09*	a	0.30	abc	-0,0021*	ab	0.0073*	ab
TE-81	1,15*	a	0,22*	ab	1,15*	a	0,33*	a	1,06*	a	0.34	ab	-0,0155*	b	0.0104*	ab
TE-105	1,09*	a	0,25*	a	1,09*	a	0,31*	ab	0,98*	a	0.32	abc	-0,0181*	b	0.0059*	b
TE-126	1,08*	a	0,19*	b	1,09*	a	0,30*	ab	1,12*	a	0.34	a	0,0145*	ab	0.0181*	ab
Control s/a	1,11*	a	0,21*	ab	1,12*	a	0,25*	b	1,04*	a	0.27	bc	-0,0057*	ab	0.0058*	b
Control c/a	1,11*	a	0,21*	ab	1,09*	a	0,27*	ab	0,98*	a	0.32	abc	0,0379*	a	0.023*	a

\*Promedio de 2 métodos de inoculación. Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

PS-A=Peso seco aéreo

PS-R=Peso seco raíz

DDSE=Días después de someter al estrés

TAC-A=Tasa absoluta de crecimiento de peso seco aéreo

TAC-R= Tasa absoluta de crecimiento de biomasa seca radicular.

### 5.1.3.3 Porcentaje de agua en la planta durante el estrés hídrico.

El anexo 19 muestra el análisis de varianza del porcentaje de agua en la parte aérea (%A-A) y raíz (%A-R) de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* durante el estrés hídrico; indica que, en el caso del %A-A, en el día 0 y a los 9DDSE observamos que el método resultó ser altamente significativa; mientras que, a los 6DDSE resultó ser no significativo; en los aislamientos, todos los días mencionados resultaron ser altamente significativos; en tanto, para la interacción (método x aislamiento) a los 0DDSE y en promedio (6 y 9 DDSE) resultaron ser altamente significativos. En el caso del %A-R, el método resultó ser altamente significativa para todos los días; en los aislamientos todos los días indicados y el promedio resultaron altamente significativas; en tanto, en la interacción (método x aislamiento) para los tres días resultó ser significativas, ( $p \leq 0,05$ ).

El cuadro 20 muestra el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en el porcentaje de agua (%A) de las plantas de cacao a los 0, 6 y 9 DDSE, indica que existen diferencias significativas entre métodos para los 0DDSE para ambas variables; mientras que, para el promedio (6 y 9 DDSE) existe diferencias significativas en el caso de la variable %A-R, mientras que, la variable %A-A no hay diferencias significativas entre los métodos. Así mismo, indica que en promedio el método

de infestación en suelo, fue el que obtuvo mayor porcentaje de agua en ambas variables; mientras que, en el método de inoculación en semillas resultó con menor porcentaje de agua (Figura 23 y 24; anexo 20), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).



**Cuadro 20: Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en el porcentaje de agua de plantas de cacao a los 0, 6 y 9 días después de someter al estrés hídrico.**

MÉTODO DE INOCULACIÓN	% AGUA PLANTA															
	0DDSE		6DDSE		9DDSE		Promedio (6 y 9 DDSE)									
	%A-A	%A-R	%A-A	%A-R	%A-A	%A-R	%A-A	%A-R	%A-A	%A-R						
SEMILLA	70,99*	b	70,58*	b	56,37*	a	59,62*	a	33,64*	b	38,88*	b	45,00*	a	49,25*	b
SUELO	75,29*	a	71,95*	a	57,65*	a	45,88*	b	37,03*	a	57,63*	a	47,46*	a	51,72*	a

\*Promedio de 2 métodos de inoculación. Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

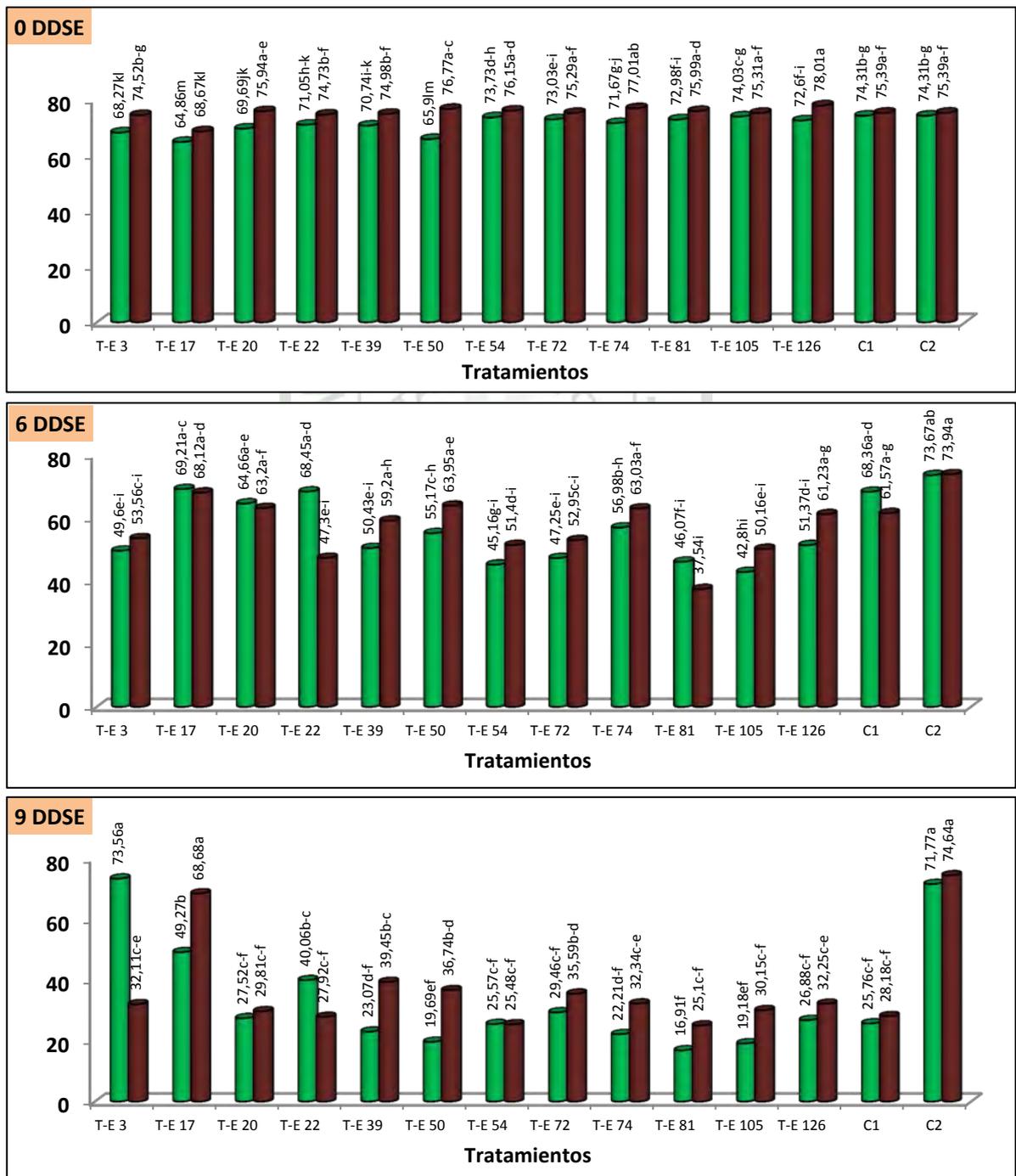
%A-A=Porcentaje de agua parte aérea.

%A-R=Porcentaje de agua de raíz.

DDSE=Días después de someter al estrés.

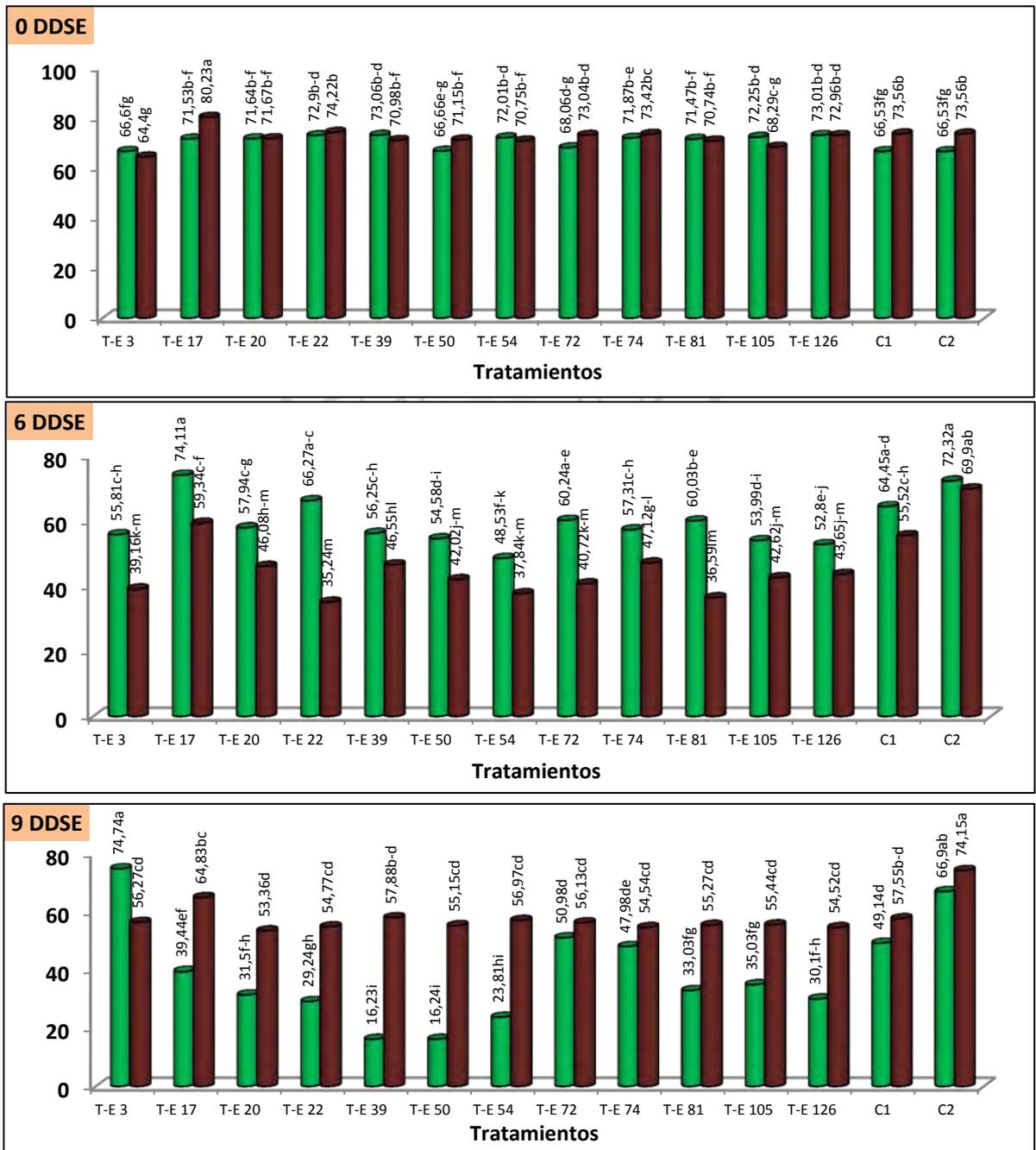


% DE AGUA EN LA PARTE AÉREA DE LA PLANTA



C1 =Control sin riego  
 C2=Control con riego  
 DDSE=Días después de someter al estrés

Figura 23. Porcentaje de agua en la parte aérea de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación, en estado de estrés hídrico. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).



C1=Control sin riego  
 C2=Control con riego  
 DDSE=Días después de someter al estrés

**Figura 24.** Porcentaje de agua radicular de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación, en estado de estrés hídrico. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Según la prueba de Duncan (5%), existen diferencias significativas entre los tratamientos para ambas variables (cuadro 21); indica que, con respecto al %A-A a los 0 DDSE TE-126 (75,31%) y TE-54 (74,94%) generaron mayor %A, superando al control s/a (74,85); seguido de TE-105, TE-81, TE-74, TE-72, TE-22, TE-39, TE-20, TE-3 y TE-50, generaron %A comprendidos entre 71,34 a 74,67%; mientras que, las plantas colonizadas con TE-17 (66,76%) resultaron con el más bajo %A; así mismo, en promedio (6 y 9 DDSE) resultó que TE-17 (63,57%), TE-3 (52,21) y TE-20 (46,3%) generaron mayores %A, existiendo diferencias significativas entre ellos y superando al control s/a (45,97%); seguido de, TE-22, TE-50, TE-74, TE-54, TE-126 y TE-72, obtuvieron %A comprendidos entre 42,37 a 45,93%; mientras que, TE-54, TE-105 y TE-81 generaron los valores más bajos de %A-A. En tanto, con respecto al %A-R a los 0 DDSE TE-17, TE-22, TE-126, TE-74, TE-39, TE-20, TE-54, TE-81, TE-72 y TE-105 generaron mayores %A-A comprendidos entre 70,27 a 75,88% con diferencias significativas entre los tratamientos, superando al control s/a (70,09%); mientras que, TE-50 (68,91%) y TE-3 (65,5%) generaron menor %A; así mismo, en promedio (6 y 9 DDSE) resultó que las plantas inoculadas con TE-17 (59,99%) obtuvieron un %A más alto, superando al control s/a (56,67%) seguido de TE-3, TE-74, TE-72, TE-20, TE-105, TE-22, TE-81 y TE-126 generaron con %A

comprendidos entre 44,23 a 56,5%; mientras TE-50 y TE-54 generó los más bajos %A-R.



**Cuadro 21: Porcentaje de agua de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito mediante dos métodos de inoculación a los 0, 6 y 9 días después de someter al estrés hídrico.**

Tratamiento	% AGUA PLANTA															
	0DDSE		6DDSE				9DDSE				Promedio (6 y 9 DDSE)					
	%A-A	%A-R	%A-A	%A-R	%A-A	%A-R	%A-A	%A-R	%A-A	%A-R						
TE-3	71,39*	c	65,50*	d	51,58*	def	47,49*	cd	52,84*	b	65,51*	a	52,21*	c	56,50*	b
TE-17	66,76*	d	75,88*	a	68,66*	ab	66,73*	a	58,98*	b	52,13*	b	63,57*	b	59,99*	b
TE-20	72,82*	bc	71,65*	bc	63,93*	abc	52,01*	c	28,67*	cd	42,43*	de	46,30*	cd	47,22*	cde
TE-22	72,89*	bc	73,56*	ab	57,88*	bcde	50,76*	cd	33,99*	c	42,01*	de	45,93*	cd	46,38*	efg
TE-39	72,86*	bc	72,02*	bc	54,81*	cde	51,40*	c	31,26*	cd	37,05*	ef	43,04*	de	44,23*	efg
TE-50	71,34*	c	68,91*	c	59,56*	bcd	48,30*	cd	28,22*	cd	35,70*	f	43,89*	de	42,00*	fg
TE-54	74,94*	a	71,38*	bc	48,28*	def	43,18*	d	25,52*	cd	40,39*	def	36,90*	efg	41,79*	g
TE-72	74,16*	ab	70,55*	bc	50,10*	def	50,48*	cd	32,53*	c	53,56*	b	42,37*	def	51,20*	cd
TE-74	74,34*	ab	72,65*	b	60,01*	bcd	52,22*	c	27,27*	cd	51,26*	bc	43,64*	de	51,74*	c
TE-81	74,48*	ab	71,10*	bc	41,81*	f	48,31*	cd	21,00*	d	44,15*	d	31,40*	g	46,23*	efg
TE-105	74,67*	ab	70,27*	bc	46,48*	ef	48,30*	cd	24,67*	cd	45,23*	cd	35,57*	fg	46,77*	def
TE-126	75,31*	a	72,99*	b	56,30*	cde	48,23*	cd	29,56*	cd	42,31*	de	42,93*	de	45,27*	efg
Control s/a	74,85*	ab	70,04*	bc	64,96*	abc	59,99*	b	26,97*	cd	53,34*	b	45,97*	cd	56,67*	b
Control c/a	74,85*	ab	70,04*	bc	73,80*	a	71,11*	a	73,21*	a	70,52*	a	73,51*	a	70,82*	a

\*Promedio de 2 métodos de inoculación. Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

%A-A=Porcentaje de agua parte aérea.

%A-R=Porcentaje de agua de raíz.

DDSE=Días después de someter al estrés.



#### 5.1.3.4 Longitud de raíz de la planta durante el estrés hídrico.

El anexo 23 muestra el análisis de varianza de la longitud de raíces de las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* durante el estrés hídrico, indica las longitudes de raíces de las plantas expresados en días después del sometimiento del estrés (DDSE); muestra que, el método en el caso del 0, 9DDSE y del promedio resultó significativa; mientras que, para el caso de 6DDSE resultó ser no significativa; sin embargo, en los aislamientos resultaron ser significativa para los tres días y el promedio de los mismos. En tanto para la interacción (método x aislamiento) para el 0 y 6DDSE resultó ser significativa, a comparación del 9DDSE que resultó ser no significativa, ( $p \leq 0,05$ ).

En el cuadro 22 nos muestra el efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito (TE) en la longitud de raíces de plantas de cacao de 0, 6 y 9 días después de someter al estrés, indica que existen diferencias significativas entre métodos para el 0, 9DDSE y el promedio; mientras que, para el 6DDSE no hubo diferencias significativas; indica que en promedio, el método de inoculación en semilla fue el que obtuvo mayor longitud de raíces (488,7 cm); mientras que, el método de infestación en suelo resultó con menor longitud de raíces (403,08 cm) (Figura 25 y anexo 24), (Duncan  $p \leq 0,05$ ).

**Cuadro 22: Efecto de los métodos de inoculación de *Trichoderma* endófito en la longitud de raíz de plantas de cacao de 0, 6 y 9 días después de someter al estrés hídrico.**

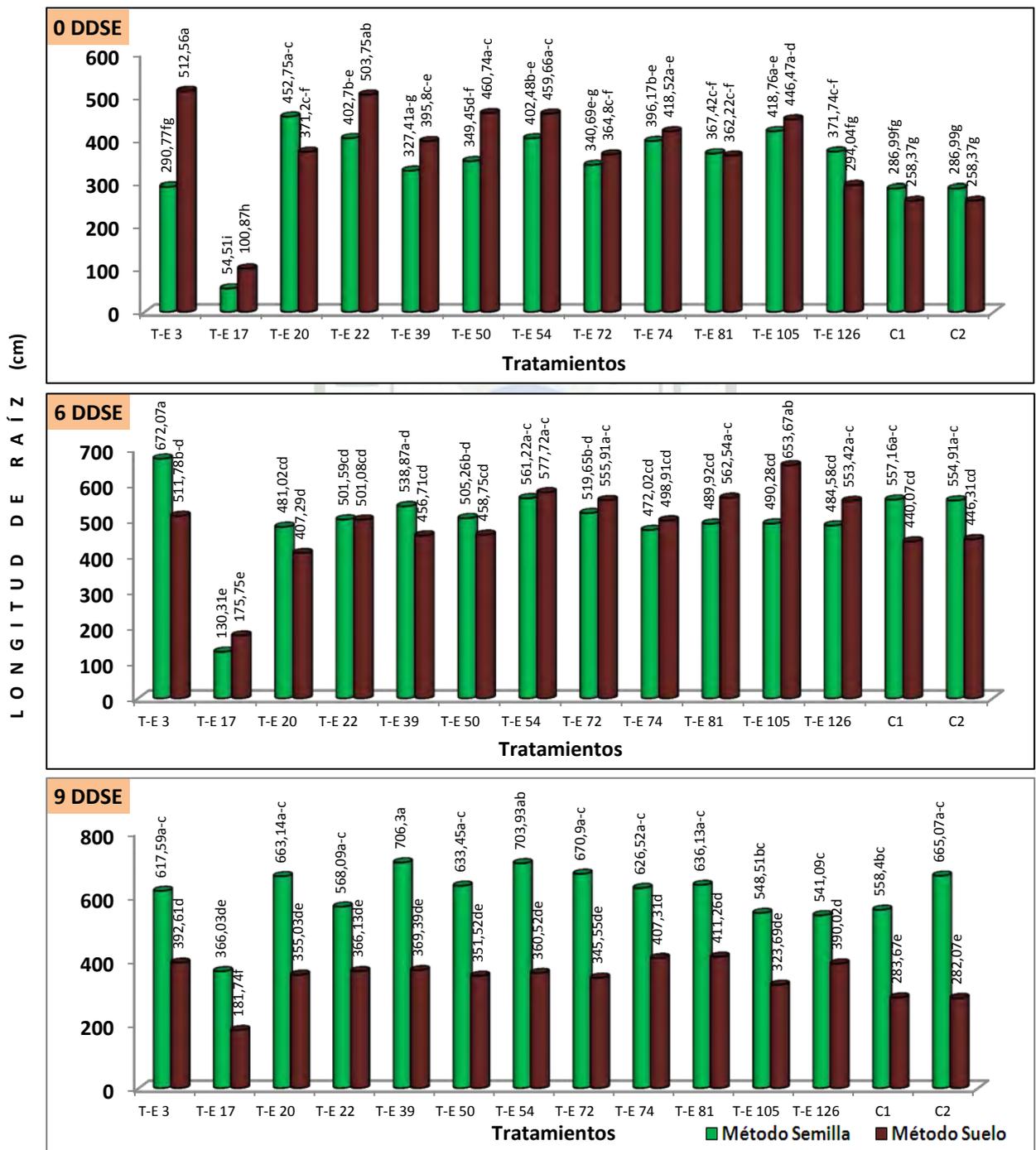
MÉTODO DE INOCULACIÓN	Longitud de raíz (cm)			
	0DDSE	6DDSE	9DDSE	Promedio
SEMILLA	343,22* b	497,06* a	607,51* a	488,70* a
SUELO	380,69* a	485,71* a	344,32* b	403,08* b

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

DDSE=Días después de someter al estrés.





C1 =Control sin riego  
 C2=Control con riego  
 DDSE=Días después de someter al estrés

**Figura 22.** Longitud de raíces de plántulas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación, en estado de estrés hídrico. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Según la prueba de Duncan al 5%, existen diferencias significativas entre los tratamientos para ambas variables (cuadro 23); indica que, en los tres días y en promedio presentan diferencias significativas entre tratamientos; Además, se observa en promedio que TE-54 (510,92 cm), TE-3 (499,56 cm) y TE-105 (480,23 cm) generaron mayor longitud de raíz; seguido de TE-74, TE-22, TE-72, TE-39, TE-50 y TE-20 que generaron valores comprendidos entre 455,07 a 476,86 cm, superando al control s/a (454,36cm); así mismo, TE-126 (444,31cm) superó al control c/a (415,62cm); mientras que, TE-17 generó menor longitud de raíz con 168,2 cm, en plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito durante el sometimiento de estrés hídrico.

**Cuadro 23: Longitud de raíz (cm) de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito mediante dos métodos de inoculación a los 0, 6, y 9 días después de someter al estrés hídrico.**

Tratamiento	Longitud de raíz (cm)							
	0DDSE		6DDSE		9DDSE		Promedio	
TE-3	401,67*	abcd	591,93*	a	505,10*	ab	499,56*	ab
TE-17	77,69*	f	153,03*	d	273,89*	d	168,20*	e
TE-20	411,98*	abc	444,15*	c	509,09*	ab	455,07*	bcd
TE-22	453,23*	a	501,34*	abc	467,11*	abc	473,89*	abc
TE-39	361,61*	cd	497,79*	abc	537,84*	a	465,75*	abc
TE-50	405,1*	abc	482,01*	bc	492,49*	abc	459,86*	abc
TE-54	431,07*	ab	569,47*	ab	532,22*	ab	510,92*	a
TE-72	352,75*	cd	537,78*	abc	508,22*	ab	466,25*	abc
TE-74	407,35*	abc	485,46*	bc	516,92*	ab	476,86*	abc
TE-81	364,82*	bcd	526,23*	abc	523,70*	ab	471,59*	abc
TE-105	432,61*	ab	571,98*	ab	436,10*	bc	480,23*	abc
TE-126	332,89*	d	519,00*	abc	465,56*	abc	444,31*	cd
Control s/a	272,68*	e	498,62*	abc	421,03*	c	454,36*	bcd
Control c/a	272,68*	e	500,61*	abc	473,57*	abc	415,62*	d

\*Promedio de 2 métodos de inoculación.

Promedios con igual letras en columna no son significativos según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

DDSE=Días después de someter al estrés.

## 5.2 Discusión.

### 5.2.1 Colonización endófitica de *Trichoderma* en plántulas de cacao.

De acuerdo a los resultados obtenidos la mayor colonización se dio por el método de inoculación en semilla, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Bailey *et al.* (2008). Los dos métodos de inoculación en promedio (Todos los aislamientos de *Trichoderma*) colonizaron a la planta (raíces, tallo, xilema, corteza y hojas) con más del 50% de colonización, lo cual concuerda con lo reportado por Bailey *et al.* (2008), quienes indican que el hongo endofítico *Trichoderma* spp, coloniza a la planta de cacao de forma asintomática, *Trichoderma* no solo colonizan los tejidos en el área de inoculación también colonizan los tejidos distantes incluso las puntas de la raíz, las plúmulas y las hojas. Además, *Trichoderma* tiene una gran facilidad de colonizar a las plantas (Hannan, 2001), y para alcanzar al xilema, los aislamientos de *Trichoderma* tienen que penetrar la corteza inmadura, un tejido relativamente espeso (Harman *et al.*, 2004). Así mismo, el movimiento de las especies de *Trichoderma* en la rizosfera, es por medio de sus hifas en continuo crecimiento que exploran y penetran la corteza de las raíces, colonizando los tejidos de las plantas, favoreciendo un nicho nutricional para *Trichoderma* y una simbiosis con la planta (Yedidia *et al.*, 1999; Vinale *et al.*, 2008). El aislamiento TE-39 obtuvo mayor porcentaje e índice de colonización con 80,21% y 6,42 respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Bailey *et al.* (2008), donde observaron que un aislamiento de *Trichoderma hamatum* colonizó

en mayor porcentaje en cinco métodos de inoculación. Las plántulas de cacao pueden ser pre-colonizadas con *Trichoderma* antes del trasplante y probablemente estos métodos de inoculación podrían ser adaptados a otros métodos de propagación de cacao (Wood and Lass, 2001; Maximova *et al.*, 2002).

### **5.2.2 Influencia de *Trichoderma* sobre el crecimiento de plantas de cacao.**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación demostraron un aumento significativo en el crecimiento en las plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófitos, probablemente se deba a la habilidad de este hongo de aumentar la proporción de crecimiento y desarrollo de la planta, sobre todo, en la producción de raíces más robustas; además, todos los mecanismos de acción de *Trichoderma* se basan en el principal papel como promotor de crecimiento vegetal, el cual se manifiesta desde las primeras fases de la plántula, y le confiere mayores ventajas a la hora del trasplante (Chang *et al.*, 1986; Yedidia *et al.*, 1999; Vinale *et al.*, 2008; Casimiro *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2005; Altomare *et al.*, 1999). Los aislamientos que generaron mayor tasa de crecimiento (Planta, Hipocotilo, Epicotilo y diámetro de tallo), diámetro de tallo (mm), número de hojas y peso seco (g.) fueron mediante el método de inoculación en semilla (M1); mientras que, en altura de planta y longitud de raíz fue en el método de infestación en suelo (M2). Probablemente se debe a la mayor colonización endofítica que se

obtuvo en el M1 (Bailey *et al.* 2008); sin embargo en el M2, *Trichoderma* se encuentra en la rizósfera, lo cual confiere mayor longitud de raíz y proporciona mayor altura de la planta (Yedidia *et al.*, 1999; Vinale *et al.*, 2008). Los aislamientos TE-17, TE-72, TE-39 y TE-126 generaron mayor tasa de crecimiento a comparación del control. Sin embargo, TE-81 generó mayor altura de planta, número de hojas y peso seco de raíz (PS-R) y parte aérea (PS-A) de las plantas, TE-72 generó mayor diámetro de tallo y TE-22 mayor longitud de raíz y peso seco (PS-R y PS-A). Así mismo, los resultados mencionados anteriormente concuerdan con reportes que han señalado importantes incrementos en el crecimiento de plántulas inoculadas con *Trichoderma* spp, como: el aumento de la biomasa de plantas de frijol (Dandurand y Knudsen, 1993), plántulas de manzana más largas y vigorosas (Windham *et al.*, 1986), incremento en la biomasa de plantas de tomate (Zambrano, 1989), mayor crecimiento del sistema radicular de plantas de maíz (Börkman *et al.*, 1998). La estimulación del crecimiento sería un proceso común en *Trichoderma*, ya que se ha reportado dicho efecto en varias especies, entre ellas: *T. harzianum* (Chang *et al.*, 1986), *T. virens* (Ousley *et al.*, 1994). Este aumento en la biomasa se debe posiblemente a la sumatoria de varias características reportadas previamente para diferentes aislamientos de esta especie en suelos cálidos tropicales, entre las cuales se puede mencionar su capacidad de producir ácido indolacético, sustancia que favorece el alargamiento de las raíces (Valencia *et al.*, 2005); así mismo, el mecanismo de inducción de crecimiento de *Trichoderma* endófito puede ser a causa de la producción

de sustancias reguladores del crecimiento (Windham *et al.*, 1986). Además, una reacción biológica a la presencia de *Trichoderma* activa la expresión de los genes de la planta promoviendo el crecimiento de la planta y el sistema radicular (Yadidia *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004; Hason y Howell 2004., Vinale *et al.*, 2008., Páez *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en aumento de peso seco por influencia del *Trichoderma* son similares a los consignados por otros autores (Harman, 2000; Kleifeld y Chet, 1992). Probablemente el crecimiento y desarrollo de la planta se dé cuando el hongo coloniza la planta, le interesa que haya más raíces para tener una mayor superficie sobre la cual actuar, así *Trichoderma* estimula a la planta por medio de las auxinas, de manera que la raíz es más grande y más densa y el hongo a su vez dispone de mayor superficie para crecer (Altomare *et al.*, 1999). Además, la promoción del desarrollo se debe a que *Trichoderma* tiene la capacidad de solubilizar el manganeso sin importar el pH del medio ni la disponibilidad del mismo, es decir, que lo solubiliza constantemente (Altomare *et al.*, 1999); así mismo, estos autores señalan que este micro-elemento es requerido para varias funciones fisiológicas de las plantas, tales como la fotosíntesis, el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de los compuestos aromáticos como precursores de aminoácidos y hormonas, de fenoles y de lignina; resaltando, que el manganeso juega un papel importante en el crecimiento; además, la producción de factores de crecimiento (Altamore *et al.* 1999). Estos resultados concuerdan con los reportes sobre la producción de factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) por *T. harzianum*, los

cuales son liberados al medio y estimulan la germinación y el desarrollo de la planta (Altomare *et al.*, 1999; Valencia *et al.*, 2005). Así mismo, Bae *et al.* (2009), menciona que *Trichoderma* genera mayor peso seco en la planta.

### **5.2.3 Efecto de plantas de cacao asociadas con *Trichoderma* endófito al estrés hídrico.**

Durante el estrés hídrico las plantas de cacao asociadas con *Trichoderma* endófito mostraron síntomas como: suspensión del crecimiento, marchitez en las hojas, senescencia de la hoja, pérdida de agua y marchitez de la planta, lo cual concuerda con lo reportado por Passioura, (1996), quien indica que las plantas de cacao durante el estrés hídrico muestran síntomas, como: suspensión del crecimiento, cierre estomático, reducción de la asimilación de CO<sub>2</sub>, senescencia de la hoja, pérdida de agua y marchitez de la planta. Además, a causa del déficit de agua, el metabolismo de las plantas se ve afectada rápidamente, por procesos que van desde la fotosíntesis hasta la respiración (Benavides, citado por Basurto *et al.*, 2002) y la actividad fotosintética se interrumpe por el cierre estomático (Azcón *et al.*, 2000). Así mismo, aumenta la acumulación de azúcares a causa de la inhibición de la síntesis de celulosa (Foyer *et al.*, 1998). A los 6 y 9 días después de someter al estrés hídrico (DDSE), las plantas inoculadas con *Trichoderma* mediante el M1 presentaron menor grado de marchitez (GM), mayor tasa absoluta de crecimiento en la biomasa seca radicular de la planta (TAC-R) y longitud de raíz. Sin embargo, en el M2 se obtuvo

mayor porcentaje de agua en raíz. Estos resultados se dieron probablemente por la mayor colonización endofítica que se dio mediante el M1, lo cual generó mayor desarrollo de la planta. Además, es muy probable que *Trichoderma* al estimular mayor crecimiento y desarrollo a la planta confiera resistencia al estrés hídrico. *Trichoderma* spp son reportados como promotores de crecimiento en varios cultivos (Dandurand y Knudsen, 1993; Windham *et al.*, 1986; Zambrano, 1989; Börkman *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1986; Altamore *et al.*, 1999), confiere resistencia a factores abióticos (Pocasangre, 2000; Carroll, 1988; Bae *et al.*, 2009; Malinowski y Belesky, 2000; Harman *et al.*, 2004). Así mismo, Armas *et al.*, 1988; Turner, 1986; y Padilla-Ramírez, 1994, mencionan que las plantas al ser sometida al estrés por sequía, pueden desarrollar mecanismos, tanto morfológicos como fisiológicos.

Las plantas colonizadas con TE-17 presentaron menor GM a los 6 DDSE, seguido de TE-22, TE-50, TE-20, TE-126, TE-74, TE-3, TE-39, TE-72 y TE-105 a comparación del control, y a los 9DDSE TE-17 fue el único que generó menor GM y retuvo mayor porcentaje de agua en raíz (%A-R) y parte aérea (%A-A). Así mismo, los aislamientos TE-126, TE-54 y TE-39 generaron en las plantas de cacao mayor tasa absoluta de crecimiento de la biomasa radicular, en tanto los aislamientos TE-17 y TE-126 generaron en las plantas de cacao mayor tasa absoluta de crecimiento de la biomasa aérea. Altomare *et al.* (1999), han reportado que *Trichoderma harzianum* genera un incremento en la biomasa de la planta, durante un estrés hídrico; Bae *et al.* (2009), menciona que *Trichoderma hamatum* genera mayor peso seco en la planta durante un

estrés hídrico, y Harman *et al*, (2004), señala importantes incrementos en la biomasa de las plántulas de cacao inoculadas con *Trichoderma* spp durante el estrés hídrico. Sin embargo, los aislamientos TE-54, TE-3 y TE-105 generaron mayor longitud de raíz superando a los controles.



## VI. CONCLUSIONES

- 6.1** Todos los aislamientos de *Trichoderma* tuvieron la capacidad de colonizar plantas de cacao de 16 días de edad en los dos métodos de inoculación; sin embargo, en el método de inoculación en semillas (M1) obtuvo mayor colonización a comparación del método de infestación en suelo (M2). Los aislamientos TE-39 y TE-50 fueron los aislamientos que mejor colonizaron en ambos métodos.
- 6.2** Los aislamientos que generaron mayor tasa de crecimiento (Planta, Hipocotilo, Epicotilo y diámetro de tallo), diámetro de tallo (mm), número de hojas y peso seco (g.) fueron mediante el M1; mientras que, en altura de planta y longitud de raíz fue en el M2. Los aislamientos TE-17, TE-72, TE-39 y TE-126 generaron mayor tasa de crecimiento a comparación del control. Sin embargo, TE-81 generó mayor altura de planta, hipocotilo, epicotilo y número de hojas, TE-72 generó mayor diámetro de tallo y TE-22 mayor longitud de raíz. Sin embargo, para el peso seco de raíz (PS-R) y parte aérea (PS-A) de las plantas, TE-22 y TE-81 resultaron mejores, a comparación del control.
- 6.3** A los 6 y 9 Después de someter al estrés hídrico (DDSE), las plantas inoculadas con *Trichoderma* mediante el M1 presentaron menor grado de marchitez (GM), mayor peso seco en la parte aérea de la planta (PS-A) y raíz (PS-R), y longitud de raíz. Sin embargo, en el M2 se obtuvieron mayor porcentaje de agua en raíz (%A). Las plantas colonizadas con TE-17 presentaron menor GM, a los 6 DDSE, seguido de TE-22, TE-50, TE-20, TE-126, TE-74, TE-3, TE-39, TE-72 y TE-105 obtuvieron grados comprendidos entre 2,35 a 2,95 a comparación del control; Sin embargo, a los 9DDSE TE-17 fue el único que generó menor GM en comparación al control. Los

aislamientos que generaron mayor TAC-A a los 6 y 9 DDSE superiores al control fueron: TE-126, TE-54 y TE-39, así mismo, TE-17, TE-126 y TE-39 generaron mayor TAC-R. Sin embargo, TE-17 retuvo mayor porcentaje de agua en raíz (%A-R) y parte aérea (%A-A), superando al control. Los aislamientos TE-54, TE-3 y TE-105 generaron mayor longitud de raíz superando a los controles.



## VII. RECOMENDACIONES

- 7.1 Considerando la naturaleza endofítica de los aislamientos de *Trichoderma* estudiados, se recomienda seguir estudiando a los aislamientos de *Trichoderma*.
- 7.2 Determinar la colonización endofítica de *Trichoderma* endófito en patrones e injertos de cacao.
- 7.3 Realizar una réplica de este trabajo con el método de inoculación en semilla en plántones de cacao de 3 meses de edad.
- 7.4 Realizar un trabajo de investigación con los mejores aislamientos de *Trichoderma* para determinar la promoción de crecimiento y resistencia al estrés hídrico en plántones de cacao de 3 meses de edad.
- 7.5 Realizar una repetición con los mejores aislamientos, considerando otros parámetros de evaluación ante el estrés hídrico.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexopoulos, C.; Mims, C.; Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. Fourth edition. Editorial Willey. New York. 237 p.
2. Altomare, C.; Norvell, W. A.; Björkman, T.; Harman, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl. Environ. Microb. 65(7), 2926-2933.
3. Astudillo, M. C.; Blanco, B. 1999. Establecimiento de los parámetros semi-industrial del hongo *T. harzianum*, utilizado en control biológico. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp. 7-11, 14, 20.
4. Azcón, J. y Talón, M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. 522 p.
5. Bae, H.; Sicher, R. C.; Kim, M. S.; Strem, M. D.; Melnick R. L.; Bailey, B. A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. Journal of Experimental Botany, 60(11): 3279–3295.
6. Bailey, B. A.; Bae, H.; Strem, M. D.; Roberts, D. P.; Thomas, S. E.; Samuels, G. J.; Choi, I. Y.; Holmes, K. A. 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. Planta 224, 1449–1464.

7. Bailey, B.A.; Bae, H.; Stream, M.D.; Crozier, J.; Thomas, S.E.; Samuels, S.J.; Vinyard, B.T.; Holmes, K.A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological control* 46 (2008): 24-35.
8. Baker, K. F. 1957. The U.C. system for producing healthy container grown plants. *California Agr. Exp. Sta. Manual*. 332 p.
9. Baker, W. 1981. *The Chocolate Plant (Theobroma cacao) and its products*. Jhon Wilson and son. Cambridge, England. 164p.
10. Bandara, W.; Seneviratne, G.; Kulasoorya, S. A. 2006. International among endophytic bacteria and fungi: effect and potentials. *J. Biosci* 31:645-650.
11. Barahona, J. 1987. *Manual del Cultivo del Cacao*. INIAP. Quevedo, Ecuador. 109 p.
12. Barcelo, C. J.; Nicolás, R, G.; Sabter, G, B.; Sánchez, T. R. 2001. *Fisiología Vegetal*. Edit. Pirámide S.A. Madrid – España. 566 p.
13. Bastos, C. N. 1996. Potential de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. *Fitopatologia Brasileira* 21, 509–512.
14. Basurto, S. M.; Núñez, B. A.; Pérez, L. R. R.; Hernández, R. O. A. 2008. "Fisiología del estrés ambiental en las plantas". Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua - México. *Synthesis - Aventuras del pensamiento*, oct.-nov. 2008:1-5

15. Belsky, J. and Siebert, S. 2003. Cultivating cacao: implications of sun grown cacao on local food security and environmental sustainability. *Agriculture and Human Values* 20: 277–285.
16. Benítez, T.; Rincón, A. M.; Limón, M. C.; Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7(4):249-260.
17. Billins, S. D. 1968. *Las plantas y el ecosistema* Trad. Por Javier Valdez Gutiérrez. México D. F. Herrero. 168 pp.
18. Blanchard, L. and Bjorkman, T. 1996. The role of auxin in enhanced root growth of *Trichoderma*-colonized sweet corn. *HortScience* 31:688 - 700.
19. Bjorkman, T., Harman G. E. and Blanchard L. 1995. Root development in sweet-corn inoculated with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *HortScience* 30(4): 810 (Abstr.)
20. Borkman, T.; Blanchard, L.; Harman, G. 1998. Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn by *Trichoderma harzianum*: effect of environmental stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 23(1), 295-322.
21. Carroll, G.; Petrini, O. 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycology* 75(1):53-63.
22. Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
23. Carruthers I. and C. Clark. 1981. *The economics of irrigation*. Liverpool University press. 300pp.

24. Casimiro, I.; Marchant, A.; Bhalerao, R. P.; Swarup, R.; Graham, N.; Inze', D.; Sandberg, G.; Casero, P. J.; Bennett, M.; 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843–852
25. Chang, Y. C.; Baker, R.; Kleifeld, O.; Chet, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.*, 70: 145-148.
26. Compant, S.; Reiter, B.; Sessitsch, A.; Nowak, J.; Clément, C. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain Ps JN. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4):1685-1693.
27. Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Sci.* 168:241-248.
28. Cruz, M. y Lina. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003, Mediante fermentación Bifásica a escala piloto. *Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, D.C.* 123 p.
29. Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus heobroma. *Contrib US Natl Herb* 35: 379D61.
30. Dandurand, L. and Knudsen, G. 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescent* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. *Phytopathol.* 83(3), 265-270.
31. Danielson, R. M. and Davey, C. B. 1973. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 495-504.

32. De Armas, R.; Ortega, E.; y Rodes R. 1988. Régimen hídrico pág. 35-73. En Fisiología Vegetal. Ed. Pueblo y Educación 325 p.
33. Di Rienzo, J.A., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Robledo, C.W., 2011. *InfoStat, versión 1.1. Manual del Usuario*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.
34. Domsch, K.; Anderson, W.; Yersoon, T. H. 1980. Compendium of soil fungi. Revision of the genus *Trichoderma*. Academic Press, London. 136:794-810.
35. Enríquez, G. A. 1966. Selección y estudio de las características de la flor, la hoja y la mazorca, útiles para la identificación y descripción de cultivares de cacao. Tesis Mag.Sc. Turrialba, CR, IICA. 97 p.
36. Ehleringer, J., Bjorkman, O. and Mooney, H.A. (1976). Leaf pubescence: Effects on absorbance and photosynthesis in desert shrub. Science 192: 376-377.
37. Fisher, R. and Turner, N. 1978. Plant productivity in the arid and semiarid zones, Ann rev. Plant physiology. 2: 277-317 pp.
38. Foyer, C.H.; Valadier, M.H.; Migge, A.; Becker, T.W. 1998. Drought induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. Plant Physiology 117, 283–292.
39. French, E. R.; Herbert, T. T. 1982. Métodos de Investigación fitopatológica. 1ª ed., 1ª reimpresión Editorial Texto Ltda. – San José, Costa Rica: IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 290p.

40. Fonseca, A. 1998. Estudio preliminar sobre la dinámica poblacional del bio-controlador *Trichoderma spp.* En el suelo. Tesis de pregrado. Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia. p. 29-32.
41. González, H. V. A.; Livera, M. M.; Mendoza, O. L. E.; y Barrera, O. C. 1986. Crecimiento y desarrollo de sorgos contrastantes en vigor y precosidad. Revista Fitotecnia Mexicana 8:95:110.
42. Hannan, G. E. 2001. *Trichoderma spp.*, Including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system), (en línea). Consultado el 6 de julio del 2005. Disponible en <http://www.birdhybrids.com/t-22 .htm>.
43. Harman, G. and Chet, I. K. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed of bio-control agent. Phytopathology 71: 579-582.
44. Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84:377-393.
45. Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology 2:43-56.
46. Harman, G. E., and Shores, M. 2007. The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. Pages 131-155 in: Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. M. Vurro and J. Gressel, eds. Springer, Amsterdam.

47. Hason, L. E. and Howell, Cr. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Hytopathology* 94(2):171-176.
48. Hata, K.; Atari, R.; Sone, K. 2002. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. *Mycoscience* 43:369-373.
49. Holmes, K.; Schroers, H.; Thomas, S.; Evans, H.; Samuels, G., 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin in South America. *Mycological Progress* 3:199–210.
50. Honorato, P. R. 2007. *Manual de Edafología*, 4ta Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. 267 p.
51. ICCO, 2005. Boletín trimestral de estadística del cacao. 31(3) - Año cacaotero. 2004/05.
52. Kleifeld, O. and Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum*. Interaction with plants and effect on growth response. *Plant ad soil* 144:267-272.
53. Kramer, P. J. 1989. Relaciones hídricas de suelos y plantas. Una síntesis moderna. Versión al español por Leonor Tejada. Edit. EDUTEX. México. 538 p.
54. Lamari, L. 2002. *Assess: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification*. The American Phytopathological Society. Department of Plant Science, *All rights reserved*. University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.
55. Larcher, W. 1977. "Ecofisiología Vegetal". Ed. Omega Barcelona. 305 p.

56. Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag. 506 p.
57. Lawlor, D. 1979. Effects of water and heat stress on carbon metabolism of plant C3 and C4 photosynthesis. En: *Stress physiology in crop plants*. Edit. Por Mussell H y R. Staples. Jhon Wiley & sons U.S.A. 2:303-326.
58. Levitt, J. 1980. Responses of plant to environment stress water, radiation, sold and other stresses. New York: Academic Press. U.S.A. v. 2, 497 p.
59. Malinowski, D. P. and Belesky, D. P. 2000. Adaptation of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*. 40:923–940.
60. Maximova, S.; Alemano, L.; Young, A.; Ferriere, N.; Traore, A. and Gultinan, M. 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:252-259.
61. Milthorpe, F. L. y Moorby, J. 1982. Introducción a la Fisiología Vegetal de los cultivos. Edit. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 259p.
62. MINAG y PROAMAZONÍA. 2004. Manual del cultivo de Cacao. Ministerio de Agricultura – Programa para el desarrollo de la Amazonía. Perú. 83 p.
63. Mónaco, C. 1991. “Incremento en el crecimiento de las plantas inducidas por *Trichoderma harzianum*”. *Revista de la Facultad de Agronomía* 67: 75-77.
64. Moore, E. 1996. *Fundament's of the Fungi*. Fourth edition. Prentice Hall. New Jersey. 574 p.
65. Mousain, 1997. Le Role Des Mycorhizes Dans La Nutrition Phosphateé Des Arbes Forestiers. *Rev. For.* XLIX: 67-81.

66. Navarro, G. 2000. "Química Agrícola". Edit Mundi-Prensa, Madrid – España. 488 p.
67. Navarro, M. P. y Mendoza, I. A. 2006. Guía Técnica para Promotores Cultivo del Cacao en Sistemas Agroforestales. Programa para el Desarrollo Rural Sostenible en el Municipio El Castillo, Río San Juan, Nicaragua. 67 p.
68. O'Tools, J. C. and Chang, T. T. 1979. Drought resistance in cereals-rice: A case study. In: Mussell H, Richard C. S., eds. Stress physiology of crop Plants. John Wiley & Sons, New York. Pp. 374-405.
69. Ousley, M.; Lynch, J. and Whipps, J. 1994. Potential of *Trichoderma spp.* as consistent plant growth stimulators. *Biol. Fertilization Soils* 17:85-90.
70. Ousley, M.; Lynch, J. and Whipps, J. 1994. The effects of addition of *Trichoderma* inocula on flowering and short growth of bedding plants. *Scientia Horticulturae* 59: 147- 155.
71. Padilla-Ramírez, J.S. 1994: *Osmotic adjustment of Cotton (G. hirsutum. L.) in Response to Water Stress*, Las Cruces, Nuevo México, Universidad de Las Cruces, p. 110.
72. Páez, O.; G. Bernaza.; M. Acosta. 2006. Uso agrícola del *Trichoderma*. (En línea) Consultado 08 enero 2012. Disponible en <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml>
73. Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* y *Gliocladium*. Biology, Ecology and potential for bio-control. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54.
74. Passioura, Jb. 1996. Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation* 20, 79-83.

75. PDA, 2007. Programa de Desarrollo Alternativo. *El cacao bajo sistemas agroforestales*. Módulo educativo, Cartilla introductoria no 1:17 p.
76. Pizarro, F. 1990. Riegos localizados de alta frecuencia (RLAF) goteo, microaspersión, exudación. 2º Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid-España. 469 p.
77. Pocasangre, L. E. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panama disease (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*). Ph.D. Thesis. University Bonn, DE. 95 p.
78. Porta, J. y López-Acevedo, M. 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-España. 960 p.
79. Rodríguez, S. y Zanahoria, C. 1991. Reguladores del crecimiento en fertilización NPK, método de aplicación, rendimiento, Bibliografía comentada sobre hortalizas, p. 1189-1194.
80. Salgado, S. C. y Cepero M. C. 2005. Aislamiento de hongos endófitos en rosa (*Rosa hybrida*, Centro de Investigaciones Microbiológicas CIMIC, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. 74 p.
81. Sikora, R. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 30:245-270.
82. Sivan, A., and harman, G. E. 1991. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusión progeny of *Thichoderma harzianum*. J. Gen Microbiol. 137:23-29.

83. Slatyer, P. J. and Goode, J. E. 1967. Crop. Responses to water al different stages of growth. Common – Wealth Bur, Hart. Plant. Crops; Maidstone, Kent res no.2: 53-57.
84. Shi, Y.; Lou, K.; Li, C. 2009. Promotion of plant growth by phytohormone producing endophytic microbes of sugar beet. Biol Fertil Soils. 45:645-653.
85. Stone, J. and Willies, W. 1983. Plant production and management under drought conditions. El Sevier Science Pub. New York U.S.A. 390 p.
86. Turner, N. C. 1986: “Adaptation to Water Stress Deficit: A Changing Perspective”, *Aust. J. Plant. Phisiol.*, 13:175-90.
87. Tyree, M.; Vargas, G. B.; Engelbrecht, T.; Kusar, 2002. Drought until death does us part: a case study of the dessication – tolerance of a tropical moist forest seeding – tree, *Licania platypus* (Hemsl.) Fritsch. Journal Experimental of Botany. 53 (378): 2239 – 2247.
88. Valencia, H.; Sánchez, J. y Valero, N. 2005. Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfato presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del Páramo el Granizo. p. 177-193. En: Bonilla, M. (ed.). Estrategias adaptativas de plantas de páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Unibiblos, Bogotá.
89. Veihmeyer, F. J. and Hendrickson, A. H. 1931. The moisture equivalent as a measure of field capacity of soil. Soil Sci. 32:181-193.
90. Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L.; Marra, R.; Woo, S. L.; Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry 40:1-10.

91. Wakelin, S. A.; Sivasithamparam, K.; Cole, A. L. J.; Skipp, R. A. 1999. Saprophytic growth in soil of a strain of *Trichoderma koningii*. New Zeland Journal of Agricultural research. Vol 42: 37-345.
92. Wilson M. 1997. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 19, 188–191.
93. Windham, M.; Elad, Y.; Baker, R. 1986. A mechanism for increased plant grows induced by *Trichoderma* spp. Phytopathol. 76, 518-521.
94. Wood, G. A. R. and Lass, R. A. 2001. Cacao, 4th edition. Oxford: Blackwell Science.
95. Yadidia, I.; Benhamoun, N.; Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65(3):1061-1070.
96. Yadidia, I.; Shoresh, M.; Kerem, Z.; Benhamou, N.; Kapulnik, Y.; Chet, I. 2003. Concomitant Induction of system resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T203) and accumulation of Phytoalexins. Applied and Environmental Microbiology 69(12):7343-7353.
97. Zambrano, C. 1989. Efecto de la concentración de inoculo de *Trichoderma harzianum* sobre el desarrollo de *Macrophomina phaseolina*. p. 56. En: Resúmenes XI Seminario Nacional de Fitopatología. Sociedad Venezolana de Fitopatología. 19 al 23 de Noviembre 1989. Trujillo, Venezuela.

## RESUMEN

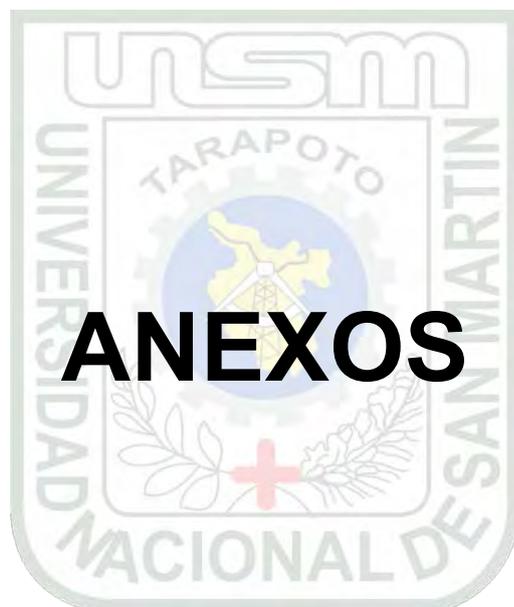
El cacao por ser cultivado en los climas tropicales, necesita una buena distribución de agua durante todo el año, ya que es muy sensible a la falta de humedad en el suelo, y la producción se ve muy afectada por las sequías periódicas y lluvias estacionales. El uso de *Trichoderma* spp podría ser una alternativa para dar solución a estos problemas, ya que existen reportes donde indican que estos microorganismos tienen las bondades de crear resistencia al estrés hídrico en la planta. Con el objetivo de determinar la influencia de especies de *Trichoderma* endófito (TE) sobre el crecimiento e inducción de resistencia al estrés hídrico en cacao (*Theobroma cacao* L.) se evaluaron 12 aislamientos de TE provenientes de cacao nativo. Para la colonización endofítica de las plántulas de cacao se empleó dos métodos de inoculación, M1: semilla, y M2: infestación en suelo. Todos los aislamientos de *Trichoderma* tuvieron la capacidad de colonizar plantas de cacao de 16 días de edad en los dos métodos de inoculación. La mayor colonización endofítica de TE en plantas de cacao se presentó con el M1 con 63,54% y los aislamientos TE-39 (80,21%) y TE-50 (78,13%) fueron los que mejor colonizaron en ambos métodos. Así mismo, Los valores más altos de tasa de crecimiento (TC), diámetro de tallo (DT), longitud de raíz (LR), número de hojas (NH), peso seco aéreo (PS-A) y peso seco radicular (PS-R) se dieron con el M1; altura de planta (AP), altura hipocotilo (AH) y altura epicotilo (AE) con el M2; siendo, los aislamientos TE-17, TE-72, TE-39 y TE-126 generaron mayor TC a comparación del control. Sin embargo, TE-81 generó mayor AP (27,69 cm), AH (12,5 cm), AE (15,19 cm) y NH (5,9), TE-72 generó mayor DT (3,94 mm) y TE-22 mayor LR (453,23 cm). Sin embargo, para el PS-R y PS-A de las plantas, TE-22 (PS-A=1,16g; PS-R=0,23g) y TE-81 (PS-A=1,15g; PS-R=0,22g) resultaron mejores, a comparación del control

(PS-A=1,11g; PS-R=0,21g). A los 6 y 9 Después de someter al estrés hídrico (DDSE), las plantas inoculadas con *Trichoderma* mediante el M1 presentaron menor GM, mayor tasa absoluta de crecimiento radicular (TAC-R), LR, sin embargo, en el M2 se obtuvo mayor porcentaje de agua. Las plantas colonizadas con TE-17 presentaron menor GM (0,91), a los 6 DDSE, seguido de TE-22, TE-50, TE-20, TE-126, TE-74, TE-3, TE-39, TE-72 y TE-105 obtuvieron grados comprendidos entre 2,35 a 2,95 a comparación del control (sin agua) que obtuvo un GM de 3,2. Sin embargo, a los 9DDSE TE-17 (2,53) fue el único que generó menor GM en comparación al control (5). Con respecto a la tasa absoluta de crecimiento (TAC), los aislamientos TE-126 (0,0145g.día<sup>-1</sup>), TE-54 (0,0088g.día<sup>-1</sup>) y TE-39 (0,0053g.día<sup>-1</sup>) generaron mayor TAC-R superiores al control sin agua (-0,0057g.día<sup>-1</sup>); así mismo, los aislamientos TE-17 (0,0183g.día<sup>-1</sup>) y TE-126 (0,0181g.día<sup>-1</sup>) generaron mayor tasa absoluta de crecimiento aéreo (TAC-A). En los resultados de porcentaje de agua en raíz (%A-R) y parte aérea (%A-A) indican que a los 6 y 9 DDSE, TE-17 (%A-A=63,57%, %A-R=59,99%) generó mayor %A superando al control (%A-A=45,97%, %A-R=56,67%). Sin embargo, TE-54 (510,92 cm), TE-3 (499,56 cm) y TE-105 (480,23 cm) generaron mayor LR superando a los controles comprendidos entre 415,62 a 476,86 cm.

## SUMMARY

The cocoa being cultivated in tropical climates, needs a good distribution of water throughout the year, as it is very sensitive to the lack of moisture in the soil, and the production is greatly affected by periodic droughts and seasonal rains. The use of *Trichoderma* spp could be an alternative to solve these problems, as there are reports which indicate that these organisms have the benefits of developing resistance to water stress in the plant. In order to determine the influence of endophyte *Trichoderma* species (TE) on the growth and induction of resistance to water stress in cocoa (*Theobroma cacao* L.) were evaluated 12 isolates of TE from native cocoa. For endophytic colonization of cacao seedlings were used two methods of inoculation, M1: seed, and M2: soil infestation. All isolates of TE were able to colonize cacao plants of 16 days old at the two inoculation methods. The highest endophytic colonization was presented with the M1 with 63,54% and the isolates TE-39 (80,21%) and TE-50 (78,13%) were better able to colonize by both methods. Also, higher values of growth rate (TC), stem diameter (SD), root length (LR), number of leaves (NL), dry weight of biomass aerea (PS-A) and root dry weight (PS-R) were given with the M1, plant height (PH), hypocotyl height (AH) and epicotyl height (AE) with M2; being, the isolates TE-17, TE-72, TE-39 and TE-126 that generated greater TC compared to the control. However, TE-81 generated greater AP (27,69cm), AH (12,5cm), AE (15,19cm) and NH (5,9); TE-72 generated greater SD (3,94mm) and TE-22 increased LR (453,23cm). However, for the PS-A and PS-R, TE-22 (PS-A=1,16g, PS-R=0,23g) and TE-81 (PS-A=1,15g; PS-R=0,22g) were the best, compared to the control (PS-A=1,11g; PS-R=0,21g). At 6 and 9 days after subjecting to water stress (DDSE), plants inoculated with TE by M1 had lower degree of wilting

plant (GM), higher absolute rate of root growth (TAC-R), LR, however, was obtained in M2 increased percentage of water. Plants colonized with TE-17 had lower GM (0,91), at 6 DDSE, followed by TE-22, TE-50, TE-20, TE-126, TE-74, TE-3, TE-39 , TE-72 and TE-105 obtained degrees between 2,35 to 2,95 compared to control (without water) that obtained a GM of 3,2. However, at the 9DDSE TE-17 (2,53) was the only that generated minor GM in comparison to the control (5). With respect to the absolute rate of growth (TAC), the isolates TE-126 (0,0145g.día-1), TE-54 (0,0088g.día-1) and TE-39 (0,0053g.día-1) generated greater TAC-R than the control without water (-0,0057g.día-1): likewise, TE-17 (0,0183 g.día-1) and TE-126 (0,0181g.día-1) generated higher absolute growth rate aerial part of the plant (TAC-A). In the results of root water percentage (% A-R) and aerial part of the plant (%A-A) indicate that at 6 and 9 DDSE, TE-17 (%A-A=63,57%; %A-R=59,99%) generated higher %A outperforming to the control (%A-A = 45,97%, %A-R=56,67%). However, TE-54 (510,92cm), TE-3 (499,56cm) and TE-105 (480,23cm) generated greater LR, outperforming to the controls ranging from 415,62 to 476,86cm.



# ANEXOS

Anexo 1: Estandarización de inóculo de *Trichoderma* para infestar suelo estéril con *Trichoderma* endófito.

Aislamientos	REGIÓN				Media	Concentración de conidias x g sustrato	Vol. Deseado ADE (ml)	Total de Conidias deseada	Sustrato a utilizar (g)	Concentración requerida dividida entre 6	
	1	2	3	4						Cantidad de sustrato Conidias (g)	ADE (ml)
T-E 3	108	113	119	123	115,75	5,79x10 <sup>8</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	108,86	18,1	45
T-E 17	144	159	151	172	156,5	7,83 x10 <sup>8</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	80,51	13,4	45
T-E 20	137	146	164	172	154,75	7,74 x10 <sup>8</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	81,42	13,6	45
T-E 22	163	142	138	148	147,75	7,39 x10 <sup>8</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	85,28	14,2	45
T-E 39	79	87	68	74	77	3,85 x10 <sup>8</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	163,64	27,3	45
T-E 50	99	111	92	89	97,75	4,89 x10 <sup>8</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	128,90	21,5	45
T-E 54	197	180	174	186	184,25	9,21 x10 <sup>8</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	68,39	11,4	45
T-E 72	194	223	215	234	216,5	1,08 x10 <sup>9</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	58,20	9,7	45
T-E 74	113	121	117	128	119,75	5,99 x10 <sup>8</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	105,22	17,5	45
T-E 81	385	367	379	389	380	1,90 x10 <sup>9</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	33,16	5,5	45
T-E 105	224	224	215	219	220,5	1,10 x10 <sup>9</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	57,14	9,5	45
T-E 126	60	64	57	60	60,25	3,01 x10 <sup>8</sup>	270	6,30x10 <sup>10</sup>	209,13	34,9	45

**Anexo 2. Análisis de varianza del porcentaje (%) de colonización de *Trichoderma* endófito en plantas de cacao.**

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor	Significancia
METODOS	331.45	1	331.45	5.28	0.026	*
AI SLAM	3155.04	11	286.82	4.57	0.0001	*
METODOS*AI SLAM	2335.32	11	212.3	3.38	0.0016	*
Error	3015.16	48	62.82			
Total	8836.96	71				

CV= 15.38 R<sup>2</sup>=0.50

**Anexo 3. Análisis de varianza del Índice de colonización de *Trichoderma* endófito en plantas de cacao.**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Significancia
METODOS	0.2	1	0.2	4.29	0.0438	*
AI SLAM	2.26	11	0.21	4.38	0.0002	**
METODOS*AI SLAM	2.02	11	0.18	3.92	0.0004	*
Error	2.25	48	0.05			
Total	6.73	71				

CV= 9.47 R<sup>2</sup>=0.51

**Anexo 4: Efecto de los métodos de inoculación en la colonización endofítica.**

METODO DE INOCULACIÓN	AI SLAM	Porcentaje de colonización					
SEMILLA	T-E 39	83,33	a				
SEMILLA	T-E 54	81,25	a	b			
SEMILLA	T-E 50	79,17	a	b			
SEMILLA	T-E 22	79,17	a	b			
SUELO	T-E 50	77,08	a	b	c		
SUELO	T-E 39	77,08	a	b	c		
SEMILLA	T-E 20	77,08	a	b	c		
SEMILLA	T-E 72	66,67	a	b	c	d	
SUELO	T-E 126	64,58	a	b	c	d	e
SEMILLA	T-E 81	62,50	a	b	c	d	e
SUELO	T-E 3	60,42	a	b	c	d	e
SUELO	T-E 17	60,42	a	b	c	d	e
SUELO	T-E 54	60,42	a	b	c	d	e
SEMILLA	T-E 105	58,33		b	c	d	e
SUELO	T-E 72	54,17			c	d	e
SUELO	T-E 105	52,08				d	e
SUELO	T-E 81	50,00				d	e
SEMILLA	T-E 3	47,92				d	e
SEMILLA	T-E 74	45,83				d	e
SUELO	T-E 74	45,83				d	e
SUELO	T-E 22	43,75				d	e
SEMILLA	T-E 126	41,67				d	e
SUELO	T-E 20	39,58					e
SEMILLA	T-E 17	39,58					e
SEMILLA	CONTROL	00,00					f
SUELO	CONTROL	00,00					f

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan (p≤0,05)

**Anexo 5. Análisis de varianza de la tasa de crecimiento de plantas de cacao colonizadas con asilamientos de *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

Tasa de Crecimiento	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif.	C.V	R <sup>2</sup>
<b>ALTURA DE PLANTA</b>	METODOS	0,23	1	0,23	9,31	0,0024	*	14,59	0,11
	AISLAMIENTOS	1,36	12	0,11	4,54	≤0,0001	**		
	METODOS*AISLAMIENTO	0,18	12	0,02	0,61	0,8355	NS		
	Error	8,97	360	0,02					
	Total	10,74	385						
<b>HIPOCOTILO</b>	METODOS	0,37	1	0,37	107,09	≤0,0001	**	6,94	0,26
	AISLAMIENTO	0,12	12	0,01	2,84	0,0009	*		
	METODOS*AISLAMIENTO	0,07	12	0,01	1,6	0,0891	NS		
	Error	1,25	360	0,0035					
	Total	1,82	385						
<b>EPICOTILO</b>	METODOS	0,0002	1	0,0002	0,01	0,9338	NS	16,53	0,08
	AISLAMIENTO	1,36	12	0,11	4,41	≤0,0001	**		
	METODOS*AISLAMIENTO	0,16	12	0,01	0,52	0,8991	NS		
	Error	9,28	360	0,03					
	Total	10,8	385						
<b>DÍAMETRO DE TALLO</b>	METODOS	0,04	1	0,04	38,36	≤0,0001	**	4,17	0,17
	AISLAMIENTO	0,04	12	0,0034	3,36	0,0001	*		
	METODOS*AISLAMIENTO	0,03	12	0,0022	2,22	0,0106	*		
	Error	0,36	360	0,0010					
	Total	0,47	385						



**Anexo 7. Análisis de varianza del crecimiento de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

ALTURA	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif.	C.V	R <sup>2</sup>
PLANTA	METODOS	3,62	1	3,62	34,38	≤0,0001	**	6,39	0,44
	AISLAMIENTO	27,79	12	2,32	21,96	≤0,0001	**		
	METODOS*AISLAMIENTO	3,1	12	0,26	2,45	0,0044	*		
	Error	37,95	360	0,11					
	Total	72,26	385						
HIPOCOTILO	METODOS	2,11	1	2,11	21,21	≤0,0001	**	9,13	0,23
	AISLAMIENTO	10,54	12	0,88	8,84	≤0,0001	**		
	METODOS*AISLAMIENTO	1,37	12	0,11	1,15	0,3207	NS		
	Error	35,78	360	0,1					
	Total	49,94	385						
EPICOTILO	METODOS	1,49	1	1,49	18,04	≤0,0001	**	7,59	0,41
	AISLAMIENTO	19,69	12	1,64	19,8	≤0,0001	**		
	METODOS*AISLAMIENTO	3,69	12	0,31	3,71	≤0,0001	**		
	Error	29,83	360	0,08					
	Total	54,16	385						

Anexo 8. Crecimiento de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.

METODO DE INOCULACIÓN	AISLAM.	ALTURA DE PLANTA (cm)						HIPOCOTILO (cm)						EPICOTILO (cm)											
SEMILLA	TE-3	23,3					f	g		10,72				d	e	f			12,57					f	
SEMILLA	TE-17	18,17							h	7,97								h	10,2						g
SEMILLA	TE-20	25,65			c	d	e	f		12,15	a	b	c	d	e				13,5	b	c	d	e	f	
SEMILLA	TE-22	22,65							g	9,92						f	g		12,73				e	f	
SEMILLA	TE-39	23,89					e	f	g	10,95			c	d	e	f			12,94				d	e	f
SEMILLA	TE-50	24,74				d	e	f	g	10,25					e	f			14,48	a	b	c	d	e	
SEMILLA	TE-54	26,63	a	b	c	d	e			12,33	a	b	c	d					14,3	a	b	c	d	e	f
SEMILLA	TE-72	25,8			c	d	e	f		11,54	a	b	c	d	e	f			14,26	a	b	c	d	e	f
SEMILLA	TE-74	25,18				d	e	f	g	11,23		b	c	d	e	f			13,95	a	b	c	d	e	f
SEMILLA	TE-81	26,65	a	b	c	d	e			12,06	a	b	c	d	e				14,59	a	b	c	d	e	
SEMILLA	TE-105	26,04		b	c	d	e	f		11,35	a	b	c	d	e	f			14,69	a	b	c	d		
SEMILLA	TE-126	23,55						f	g	10,71				d	e	f			12,85				d	e	f
SEMILLA	CONTROL	25,59			c	d	e	f		11,44	a	b	c	d	e	f			14,15	a	b	c	d	e	f
SUELO	TE-3	25,62			c	d	e	f		11,03		b	c	d	e	f			14,59	a	b	c	d	e	
SUELO	TE-17	16,82							h	8,55							g	h	8,26						h
SUELO	TE-20	25,94			b	c	d	e	f	12,7	a	b	c						13,24			c	d	e	f
SUELO	TE-22	27,27	a	b	c	d				12,04	a	b	c	d	e				15,23	a	b				
SUELO	TE-39	26,74	a	b	c	d	e			11,44	a	b	c	d	e	f			15,3	a	b				
SUELO	TE-50	27,65	a	b	c	d				12,35	a	b	c	d					15,3	a	b				
SUELO	TE-54	27,47	a	b	c	d				12,41	a	b	c	d					15,06	a	b	c			
SUELO	TE-72	27,26	a	b	c	d				11,81	a	b	c	d	e				15,45	a	b				
SUELO	TE-74	29,16	a							13,47	a								15,69	a					
SUELO	TE-81	28,73	a	b						12,94	a								15,79	a					
SUELO	TE-105	27,45	a	b	c	d				12,18	a	b	c	d					15,32	a	b				
SUELO	TE-126	28,4	a	b	c					12,93	a	b							15,47	a					
SUELO	CONTROL	25,81		b	c	d	e	f		11,51	a	b	c	d	e	f			14,3	a	b	c	d	e	f

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 9. Análisis de varianza de diámetro de tallo de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif.
METODOS	0,16	1	0,16	51,96	≤0,0001	**
AISLAMIENTO	0,25	12	0,02	6,79	≤0,0001	**
METODOS*AISLAMIENTO	0,06	12	0,01	1,7	0,0654	NS
Error	1,09	360	0,003			
Total	1,56	385				

CV=2,68 R<sup>2</sup>=0,25

**Anexo 10. Diámetro de tallo de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

METODO DE INOCULACIÓN	AISLAM.	DIAMETRO DE TALLO (mm)									
SEMILLA	TE-3	3,76	b	c	d	e	f	g			
SEMILLA	TE-17	3,49									i
SEMILLA	TE-20	3,77	b	c	d	e	f	g			
SEMILLA	TE-22	3,63				e	f	g	h	i	
SEMILLA	TE-39	3,77	b	c	d	e	f	g			
SEMILLA	TE-50	3,88	b	c	d						
SEMILLA	TE-54	3,87	b	c	d						
SEMILLA	TE-72	4,07	a								
SEMILLA	TE-74	3,9	a	b	c						
SEMILLA	TE-81	3,93	a	b							
SEMILLA	TE-105	3,78	b	c	d	e	f				
SEMILLA	TE-126	3,74	b	c	d	e	f	g	h		
SEMILLA	CONTROL	3,7			d	e	f	g	h		
SUELO	TE-3	3,55							h	i	
SUELO	TE-17	3,49									i
SUELO	TE-20	3,49									i
SUELO	TE-22	3,67				e	f	g	h	i	
SUELO	TE-39	3,73		c	d	e	f	g	h		
SUELO	TE-50	3,58						g	h	i	
SUELO	TE-54	3,64				e	f	g	h	i	
SUELO	TE-72	3,82	b	c	d	e					
SUELO	TE-74	3,63				e	f	g	h	i	
SUELO	TE-81	3,71		c	d	e	f	g	h		
SUELO	TE-105	3,64				e	f	g	h	i	
SUELO	TE-126	3,62					f	g	h	i	
SUELO	CONTROL	3,55							h	i	

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan (p≤0,05)

**Anexo 11. Análisis de varianza de longitud de raíz de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif.
METODOS	33,64	1	33,64	11,66	0,0009	*
AISLAMIENTO	1280,33	12	106,69	36,98	≤0,0001	**
METODOS* AISLAMIENTO	134,08	12	11,17	3,87	0,0001	*
Error	294,29	102	2,89			
Total	1744,65	127				

CV= 9,08 R<sup>2</sup>=0,79

**Anexo 12. Longitud de raíz de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

METODO DE INOCULACIÓN	AISLAM.	LONGITUD DE RAÍZ (cm)									
SEMILLA	T-E 3	290,77						f	g		
SEMILLA	T-E 17	54,51									i
SEMILLA	T-E 20	452,75	a	b	c						
SEMILLA	T-E 22	402,70		b	c	d	e				
SEMILLA	T-E 39	327,41					e	f	g		
SEMILLA	T-E 50	349,45				d	e	f			
SEMILLA	T-E 54	402,48		b	c	d	e				
SEMILLA	T-E 72	340,69					e	f	g		
SEMILLA	T-E 74	396,17		b	c	d	e				
SEMILLA	T-E 81	367,42			c	d	e	f			
SEMILLA	T-E 105	418,76	a	b	c	d	e				
SEMILLA	T-E 126	371,74			c	d	e	f			
SEMILLA	CONTROL	286,99						f	g		
SUELO	T-E 3	512,56	a								
SUELO	T-E 17	100,87									h
SUELO	T-E 20	371,20			c	d	e	f			
SUELO	T-E 22	503,75	a	b							
SUELO	T-E 39	395,8			c	d	e				
SUELO	T-E 50	460,74	a	b	c						
SUELO	T-E 54	459,66	a	b	c						
SUELO	T-E 72	364,80			c	d	e	f			
SUELO	T-E 74	418,52	a	b	c	d	e				
SUELO	T-E 81	362,22			c	d	e	f			
SUELO	T-E 105	446,47	a	b	c	d					
SUELO	T-E 126	294,04						f	g		
SUELO	CONTROL	258,37							g		

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan (p≤0,05)

**Anexo 13. Análisis de varianza de número de hojas promedio de planta de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif.
METODOS	0,41	1	0,41	9,64	0,0021	*
AISLAMIENTO	6,25	12	0,52	12,37	≤0,0001	**
METODOS*AISLAMIENTO	1,18	12	0,10	2,34	0,0069	*
Error	15,16	360	0,04			
Total	22,84	385				

CV= 8,74 R<sup>2</sup>=0,29

**Anexo 14. Número de hojas promedio de planta de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

METODO DE INOCULACIÓN	AISLAM.	NÚMERO DE HOJAS						
SEMILLA	TE-3	4,64				e	f	
SEMILLA	TE-17	3,85					g	
SEMILLA	TE-20	4,59					f	
SEMILLA	TE-22	4,80			d	e	f	
SEMILLA	TE-39	4,87			d	e	f	
SEMILLA	TE-50	4,63				e	f	
SEMILLA	TE-54	4,91		c	d	e	f	
SEMILLA	TE-72	5,21	a	b	c	d	e	f
SEMILLA	TE-74	5,32	a	b	c	d	e	f
SEMILLA	TE-81	6,07	a					
SEMILLA	TE-105	5,28	a	b	c	d	e	f
SEMILLA	TE-126	4,88			c	d	e	f
SEMILLA	CONTROL	4,68					e	f
SUELO	TE-3	5,26	a	b	c	d	e	f
SUELO	TE-17	3,04						h
SUELO	TE-20	4,58					f	
SUELO	TE-22	5,56	a	b	c	d		
SUELO	TE-39	5,08		b	c	d	e	f
SUELO	TE-50	5,42	a	b	c	d	e	f
SUELO	TE-54	5,43	a	b	c	d	e	
SUELO	TE-72	5,67	a	b	c	d		
SUELO	TE-74	5,36	a	b	c	d	e	f
SUELO	TE-81	5,73	a	b	c			
SUELO	TE-105	5,83	a	b				
SUELO	TE-126	5,51	a	b	c	d		
SUELO	CONTROL	5,5	a	b	c	d	e	

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan (p≤0,05)

**Anexo 15. Análisis de varianza de la biomasa seca de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

EDAD PLANTA	PESO SECO	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif	C.V	R <sup>2</sup>
32 días Planta	PS-A	METODO	0,04	1	0,04	13,56	0,0004	*	4,37	0,21
		AISLAMIENTO	0,02	12	0,0017	0,57	0,861	N.S		
		METODO*AISL.	0,12	12	0,01	3,24	0,0006	*		
		Error	0,31	103	0,003					
		Total	0,49	128						
	PS-R	METODO	0,01	1	0,01	6,69	0,0111	*	3,25	0,47
		AISLAMIENTO	0,08	12	0,01	9,1	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	0,02	12	0,0014	1,84	0,0513	N.S		
		Error	0,08	103	0,00075					
		Total	0,18	128						

PS-A=Peso Seco Aéreo  
PS-R=Peso Seco Raíz

**Anexo 16. Biomasa seca de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

METODO DE INOCULACIÓN	AISLAM.	PESO SECO DE RAÍZ (g)				PESO SECO AÉREO (g)					
SEMILLA	T-E 3	0,19		c	d	1,19	a	b			
SEMILLA	T-E 17	0,06				e	1,19	a	b		
SEMILLA	T-E 20	0,27	a	b			1,16	a	b		
SEMILLA	T-E 22	0,20		b	c	d		1,16	a	b	
SEMILLA	T-E 39	0,18				d		1,13	a	b	
SEMILLA	T-E 50	0,21		b	c	d		1,12	a	b	
SEMILLA	T-E 54	0,23	a	b	c	d		1,14	a	b	
SEMILLA	T-E 72	0,22	a	b	c	d		1,06		b	
SEMILLA	T-E 74	0,24	a	b	c	d		1,3	a		
SEMILLA	T-E 81	0,22	a	b	c	d		1,15	a	b	
SEMILLA	T-E 105	0,22	a	b	c	d		1,03		b	
SEMILLA	T-E 126	0,18				d		1,17	a	b	
SEMILLA	CONTROL	0,24	a	b	c	d		1,09	a	b	
SUELO	T-E 3	0,26	a	b				0,97		b	c
SUELO	T-E 17	0,11					e	1,11	a	b	
SUELO	T-E 20	0,25	a	b	c			0,99		b	c
SUELO	T-E 22	0,27	a	b				1,16	a	b	
SUELO	T-E 39	0,21		b	c	d		1,01		b	
SUELO	T-E 50	0,25	a	b	c			1,04		b	
SUELO	T-E 54	0,23	a	b	c	d		1,05		b	
SUELO	T-E 72	0,21		b	c	d		1,14	a	b	
SUELO	T-E 74	0,23	a	b	c	d		0,82			c
SUELO	T-E 81	0,22	a	b	c	d		1,15	a	b	
SUELO	T-E 105	0,29	a					1,14	a	b	
SUELO	T-E 126	0,20		b	c	d		0,99		b	c
SUELO	CONTROL	0,18			c	d		1,14	a	b	

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 17. Análisis de varianza de la tasa absoluta de crecimiento de plantas de cacao colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito.**

Edad Planta	Variable	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif.	C.V	R <sup>2</sup>
ODDSE	PS-A	METODO	0,04	1	0,04	13,56	0,0004	*	4,37	0,21
		AISLAMIENTO	0,02	12	1,70E-03	0,57	0,861	N.S		
		METODO*AISL.	0,12	12	0,01	3,24	0,0006	*		
		Error	0,31	103	3,00E-03					
		Total	0,49	128						
	PS-R	METODO	0,01	1	0,01	6,69	0,0111	*	3,25	0,47
		AISLAMIENTO	0,08	12	0,01	9,1	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	0,02	12	1,40E-03	1,84	0,0513	N.S		
		Error	0,08	103	7,50E-04					
		Total	0,18	128						
6DDSE	PS-A	METODO	0,04	1	0,04	9,26	0,0029	*	5,32	0,05
		AISLAMIENTO	0,05	13	4,00E-03	0,89	0,5647	N.S		
		METODO*AISL.	0,06	13	4,40E-03	0,98	0,4776	N.S		
		Error	0,51	112	4,50E-03					
		Total	0,66	139						
	PS-R	METODO	0,01	1	0,01	4,15	0,0441	*	4,32	0,33
		AISLAMIENTO	0,09	13	0,01	4,78	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	0,04	13	3,30E-03	2,24	0,012	*		
		Error	0,16	112	1,50E-03					
		Total	0,31	139						
9DDSE	PS-A	METODO	0,01	1	0,01	1,46	0,2298	N.S	5,47	0
		AISLAMIENTO	0,04	13	3,20E-03	0,68	0,7811	N.S		
		METODO*AISL.	0,07	13	0,01	1,19	0,2931	N.S		
		Error	0,52	110	4,70E-03					
		Total	0,64	137						
	PS-R	METODO	0,02	1	2,00E-03	1,3	0,2571	N.S	4,29	0,19
		AISLAMIENTO	0,03	13	2,50E-03	1,68	0,0742	N.S		
		METODO*AISL.	0,05	13	4,10E-03	2,73	0,0022	*		
		Error	0,17	110	1,50E-03					
		Total	0,25	137						
TAC (Tasa absoluta de crecimiento)	TAC-A	METODO	0,00012	1	1,20E-04	0,14	0,7127	N.S	4,16	0,12
		AISLAMIENTO	0,01	13	1,10E-03	1,28	0,2331	N.S		
		METODO*AISL.	0,03	13	2,00E-03	2,28	0,0105	*		
		Error	0,1	112	8,60E-04					
		Total	0,14	139						
	TAC-R	METODO	0,00028	1	2,80E-04	2,47	0,1186	N.S	1,47	0,1
		AISLAMIENTO	0,002	13	1,60E-04	1,4	0,1727	N.S		
		METODO*AISL.	0,0025	13	1,90E-04	1,7	0,0712	N.S		
		Error	0,01	112	1,10E-04					
		Total	0,02	139						

**Anexo 18. Tasa absoluta de crecimiento de plantas de cacao colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito.**

METODO	TRAT.	TAC-R					TAC-A			
SEMILLA	T-E 3	-0,0006				d	e	-0,0213	b	c
SEMILLA	T-E 17	0,0278	a	b				-0,0108	b	c
SEMILLA	T-E 20	0,0186	a	b	c	d		-0,0147	b	c
SEMILLA	T-E 22	0,0054		b	c	d	e	-0,0142	b	c
SEMILLA	T-E 39	0,0167	a	b	c	d	e	0,0113	b	c
SEMILLA	T-E 50	0,0091		b	c	d	e	0,0093	b	c
SEMILLA	T-E 54	0,0103		b	c	d	e	0,0035	b	c
SEMILLA	T-E 72	0,0133		b	c	d	e	-0,0003	b	c
SEMILLA	T-E 74	0,0064		b	c	d	e	-0,0268	b	c
SEMILLA	T-E 81	0,0064		b	c	d	e	-0,0155	b	c
SEMILLA	T-E 105	0,017	a	b	c	d	e	-0,0177	b	c
SEMILLA	T-E 126	0,013		b	c	d	e	0,0007	b	c
SEMILLA	CONTROLS/A	0,0074		b	c	d	e	-0,0033	b	c
SEMILLA	CONTROL C/A	0,0363	a					0,0966	a	
SUELO	T-E 3	0,0089		b	c	d	e	0,0091	b	c
SUELO	T-E 17	0,0089		b	c	d	e	-0,0195	b	c
SUELO	T-E 20	0,0067		b	c	d	e	0,0121	b	c
SUELO	T-E 22	0,0158	a	b	c	d	e	0,0108	b	c
SUELO	T-E 39	0,0161	a	b	c	d	e	-0,0007	b	c
SUELO	T-E 50	0,0083		b	c	d	e	-0,0151	b	c
SUELO	T-E 54	0,011		b	c	d	e	0,0142	b	c
SUELO	T-E 72	0,0004			c	d	e	-0,0352		c
SUELO	T-E 74	0,0081		b	c	d	e	0,0226	b	c
SUELO	T-E 81	0,0144	a	b	c	d	e	-0,0156	b	c
SUELO	T-E 105	-0,0052					e	-0,0185	b	c
SUELO	T-E 126	0,0232	a	b	c			0,0283	b	
SUELO	CONTROLS/A	0,0042		b	c	d	e	-0,008	b	c
SUELO	CONTROL C/A	0,0098		b	c	d	e	-0,0208	b	c

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 19. Análisis de varianza del porcentaje de agua de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

EDAD PLANTA	% AGUA	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif.	C.V	R <sup>2</sup>
ODDSE	%A-A	METODO	247,66	1	247,66	150,35	≤0,0001	**	2,18	0,72
		AISLAMIENTO	254,86	12	21,24	12,89	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	82,8	12	6,9	4,19	≤0,0001	**		
		Error	169,66	103	1,65					
		Total	749,34	128						
	%A-R	METODO	25,51	1	25,51	5,6	0,0198	*	3,7	0,4
		AISLAMIENTO	299,17	12	24,93	5,47	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	183,13	12	15,26	3,35	0,0004	*		
		Error	469,27	103	4,56					
		Total	977,71	128						
6DDSE	%A-A	METODO	19,38	1	19,38	0,42	0,5173	N.S	13,79	0,34
		AISLAMIENTO	3657,05	13	281,31	6,12	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	849,03	13	65,31	1,42	0,1603	N.S		
		Error	5144,6	112	45,93					
		Total	9670,06	139						
	%A-R	METODO	2257,81	1	2257,81	115,77	≤0,0001	**	9,47	0,65
		AISLAMIENTO	2817,68	13	216,74	11,11	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	561,06	13	43,16	2,21	0,0131	*		
		Error	2184,36	112	19,5					
		Total	7820,91	139						
9DDSE	%A-A	METODO	211,42	1	211,42	5,33	0,0228	*	17,56	0,7
		AISLAMIENTO	10818,9	13	832,23	20,98	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	2770,65	13	213,13	5,37	≤0,0001	**		
		Error	4363,71	110	39,67					
		Total	18020,2	137						
	%A-R	METODO	4380,79	1	4380,79	257,38	≤0,0001	**	9,44	0,84
		AISLAMIENTO	5055,69	13	388,9	22,85	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	3097,77	13	238,29	14	≤0,0001	**		
		Error	1872,3	110	17,02					
		Total	14405,5	137						
PROMEDIO (6 y 9 DDSE)	%A-A	METODO	80,33	1	80,33	4,01	0,0477	*	10,46	0,68
		AISLAMIENTO	5433,54	13	417,96	20,86	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	1063,05	13	81,77	4,08	≤0,0001	**		
		Error	2244,2	112	20,04					
		Total	8821,11	139						
	%A-R	METODO	75,61	1	75,61	9,22	0,003	*	6,32	0,76
		AISLAMIENTO	2946,92	13	226,69	27,65	≤0,0001	**		
		METODO*AISL.	866,68	13	66,67	8,13	≤0,0001	**		
		Error	918,12	112	8,2					
		Total	4807,34	139						

Anexo 20. Porcentaje de agua de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.

METODO DE INOCULACIÓN	AISLAM.	ODDSE		6DDSE		9DDSE	
		% Agua aérea	% Agua raíz	% Agua aérea	% Agua raíz	% Agua aérea	% Agua raíz
SEMILLA	T-E 3	68,27 <sup>kl</sup>	66,6 <sup>fg</sup>	49,6 <sup>e-i</sup>	55,81 <sup>c-h</sup>	73,56 <sup>a</sup>	74,74 <sup>a</sup>
SEMILLA	T-E 17	64,86 <sup>m</sup>	71,53 <sup>b-f</sup>	69,21 <sup>a-c</sup>	74,11 <sup>a</sup>	49,27 <sup>b</sup>	39,44 <sup>ef</sup>
SEMILLA	T-E 20	69,69 <sup>jk</sup>	71,64 <sup>b-f</sup>	64,66 <sup>a-e</sup>	57,94 <sup>c-g</sup>	27,52 <sup>c-f</sup>	31,5 <sup>f-h</sup>
SEMILLA	T-E 22	71,05 <sup>h-k</sup>	72,9 <sup>b-d</sup>	68,45 <sup>a-d</sup>	66,27 <sup>a-c</sup>	40,06 <sup>b-c</sup>	29,24 <sup>gh</sup>
SEMILLA	T-E 39	70,74 <sup>i-k</sup>	73,06 <sup>b-d</sup>	50,43 <sup>e-i</sup>	56,25 <sup>c-h</sup>	23,07 <sup>d-f</sup>	16,23 <sup>i</sup>
SEMILLA	T-E 50	65,9 <sup>lm</sup>	66,66 <sup>e-g</sup>	55,17 <sup>c-h</sup>	54,58 <sup>d-i</sup>	19,69 <sup>ef</sup>	16,24 <sup>i</sup>
SEMILLA	T-E 54	73,73 <sup>d-h</sup>	72,01 <sup>b-d</sup>	45,16 <sup>g-i</sup>	48,53 <sup>f-k</sup>	25,57 <sup>c-f</sup>	23,81 <sup>hi</sup>
SEMILLA	T-E 72	73,03 <sup>e-i</sup>	68,06 <sup>d-g</sup>	47,25 <sup>e-i</sup>	60,24 <sup>a-e</sup>	29,46 <sup>c-f</sup>	50,98 <sup>d</sup>
SEMILLA	T-E 74	71,67 <sup>g-j</sup>	71,87 <sup>b-e</sup>	56,98 <sup>b-h</sup>	57,31 <sup>c-h</sup>	22,21 <sup>d-f</sup>	47,98 <sup>de</sup>
SEMILLA	T-E 81	72,98 <sup>f-i</sup>	71,47 <sup>b-f</sup>	46,07 <sup>f-i</sup>	60,03 <sup>b-e</sup>	16,91 <sup>f</sup>	33,03 <sup>fg</sup>
SEMILLA	T-E 105	74,03 <sup>c-g</sup>	72,25 <sup>b-d</sup>	42,8 <sup>hi</sup>	53,99 <sup>d-i</sup>	19,18 <sup>ef</sup>	35,03 <sup>fg</sup>
SEMILLA	T-E 126	72,6 <sup>f-i</sup>	73,01 <sup>b-d</sup>	51,37 <sup>d-i</sup>	52,8 <sup>e-j</sup>	26,88 <sup>c-f</sup>	30,1 <sup>f-h</sup>
SEMILLA	CONTROL S/A	74,31 <sup>b-g</sup>	66,53 <sup>fg</sup>	68,36 <sup>a-d</sup>	64,45 <sup>a-d</sup>	25,76 <sup>c-f</sup>	49,14 <sup>d</sup>
SEMILLA	CONTROL C/A	74,31 <sup>b-g</sup>	66,53 <sup>fg</sup>	73,67 <sup>ab</sup>	72,32 <sup>a</sup>	71,77 <sup>a</sup>	66,9 <sup>ab</sup>
SUELO	T-E 3	74,52 <sup>b-g</sup>	64,4 <sup>g</sup>	53,56 <sup>c-i</sup>	39,16 <sup>k-m</sup>	32,11 <sup>c-e</sup>	56,27 <sup>cd</sup>
SUELO	T-E 17	68,67 <sup>kl</sup>	80,23 <sup>a</sup>	68,12 <sup>a-d</sup>	59,34 <sup>c-f</sup>	68,68 <sup>a</sup>	64,83 <sup>bc</sup>
SUELO	T-E 20	75,94 <sup>a-e</sup>	71,67 <sup>b-f</sup>	63,2 <sup>a-f</sup>	46,08 <sup>h-m</sup>	29,81 <sup>c-f</sup>	53,36 <sup>d</sup>
SUELO	T-E 22	74,73 <sup>b-f</sup>	74,22 <sup>b</sup>	47,3 <sup>a-i</sup>	35,24 <sup>m</sup>	27,92 <sup>c-f</sup>	54,77 <sup>cd</sup>
SUELO	T-E 39	74,98 <sup>b-f</sup>	70,98 <sup>b-f</sup>	59,2 <sup>a-h</sup>	46,55 <sup>h-l</sup>	39,45 <sup>b-c</sup>	57,88 <sup>b-d</sup>
SUELO	T-E 50	76,77 <sup>a-c</sup>	71,15 <sup>b-f</sup>	63,95 <sup>a-e</sup>	42,02 <sup>j-m</sup>	36,74 <sup>b-d</sup>	55,15 <sup>cd</sup>
SUELO	T-E 54	76,15 <sup>a-d</sup>	70,75 <sup>b-f</sup>	51,4 <sup>d-i</sup>	37,84 <sup>k-m</sup>	25,48 <sup>c-f</sup>	56,97 <sup>cd</sup>
SUELO	T-E 72	75,29 <sup>a-f</sup>	73,04 <sup>b-d</sup>	52,95 <sup>c-i</sup>	40,72 <sup>k-m</sup>	35,59 <sup>b-d</sup>	56,13 <sup>cd</sup>
SUELO	T-E 74	77,01 <sup>ab</sup>	73,42 <sup>bc</sup>	63,03 <sup>a-f</sup>	47,12 <sup>g-l</sup>	32,34 <sup>c-e</sup>	54,54 <sup>cd</sup>
SUELO	T-E 81	75,99 <sup>a-d</sup>	70,74 <sup>b-f</sup>	37,54 <sup>l</sup>	36,59 <sup>lm</sup>	25,1 <sup>c-f</sup>	55,27 <sup>cd</sup>
SUELO	T-E 105	75,31 <sup>a-f</sup>	68,29 <sup>c-g</sup>	50,16 <sup>e-i</sup>	42,62 <sup>j-m</sup>	30,15 <sup>c-f</sup>	55,44 <sup>cd</sup>
SUELO	T-E 126	78,01 <sup>a</sup>	72,96 <sup>b-d</sup>	61,23 <sup>a-g</sup>	43,65 <sup>j-m</sup>	32,25 <sup>c-e</sup>	54,52 <sup>cd</sup>
SUELO	CONTROL S/A	75,39 <sup>a-f</sup>	73,56 <sup>b</sup>	61,57 <sup>a-g</sup>	55,52 <sup>c-h</sup>	28,18 <sup>c-f</sup>	57,55 <sup>b-d</sup>
SUELO	CONTROL C/A	75,39 <sup>a-f</sup>	73,56 <sup>b</sup>	73,94 <sup>a</sup>	69,9 <sup>ab</sup>	74,64 <sup>a</sup>	74,15 <sup>a</sup>

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 21. Análisis de varianza del grado de marchitez (GM) de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico.**

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif.	C.V	R <sup>2</sup>
<b>0 DDSE</b>	METODO	0	1	0	sd	sd	N.S	0	sd
	AISLAMIENTO	0	13	0	sd	sd	N.S		
	METODO*AISL.	0	13	0	sd	sd	N.S		
	Error	0	388	0					
	Total	0	415						
<b>6 DDSE</b>	METODO	1,33	1	1,33	15,9	0,0001	*	17,36	0,59
	AISLAMIENTO	30,18	13	2,32	27,7	≤0,0001	**		
	METODO*AISL.	4,23	13	0,33	3,89	≤0,0001	**		
	Error	20,79	248	0,08					
	Total	56,38	275						
<b>9 DDSE</b>	METODO	0,15	1	0,15	4,26	0,0413	*	8,93	0,84
	AISLAMIENTO	24,42	13	1,88	52,82	≤0,0001	**		
	METODO*AISL.	0,86	13	0,07	1,86	0,0428	*		
	Error	3,88	109	0,04					
	Total	29,31	136						

DDSE= Días Después del Sometimiento del Estrés

Anexo 22. Grado de marchitez (GM) de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación, durante el estrés hídrico.

METODO DE INOCULACIÓN	AISLAM.	GRADO DE MARCHITEZ		
		0 DDSE	6 DDSE	9 DDSE
SEMILLA	T-E 3	0*	2,4 <sup>c</sup>	3,4 <sup>cd</sup>
SEMILLA	T-E 17	0*	1,2 <sup>b</sup>	2,8 <sup>bc</sup>
SEMILLA	T-E 20	0*	2,4 <sup>c</sup>	4,8 <sup>e</sup>
SEMILLA	T-E 22	0*	1,0 <sup>b</sup>	3,2 <sup>cd</sup>
SEMILLA	T-E 39	0*	2,6 <sup>cd</sup>	5 <sup>e</sup>
SEMILLA	T-E 50	0*	2,4 <sup>c</sup>	4,4 <sup>e</sup>
SEMILLA	T-E 54	0*	2,4 <sup>c</sup>	4,25 <sup>de</sup>
SEMILLA	T-E 72	0*	2,6 <sup>cd</sup>	4,4 <sup>e</sup>
SEMILLA	T-E 74	0*	2,6 <sup>cd</sup>	4,6 <sup>e</sup>
SEMILLA	T-E 81	0*	3,9 <sup>fg</sup>	5 <sup>e</sup>
SEMILLA	T-E 105	0*	3 <sup>c-g</sup>	4,8 <sup>e</sup>
SEMILLA	T-E 126	0*	2,6 <sup>cd</sup>	4,8 <sup>e</sup>
SEMILLA	CONTROL S/A	0*	2,8 <sup>c-e</sup>	5 <sup>e</sup>
SEMILLA	CONTROL C/A	0*	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
SUELO	T-E 3	0*	3 <sup>c-g</sup>	4,8 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 17	0*	0,62 <sup>b</sup>	2,25 <sup>b</sup>
SUELO	T-E 20	0*	2,5 <sup>c</sup>	5 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 22	0*	3,7 <sup>e-g</sup>	5 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 39	0*	2,89 <sup>c-f</sup>	4,4 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 50	0*	2,3 <sup>c</sup>	4,8 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 54	0*	3,7 <sup>e-g</sup>	5 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 72	0*	3,11 <sup>c-g</sup>	4,5 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 74	0*	2,7 <sup>c-e</sup>	5 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 81	0*	4 <sup>g</sup>	5 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 105	0*	2,9 <sup>c-f</sup>	4,8 <sup>e</sup>
SUELO	T-E 126	0*	2,7 <sup>c-e</sup>	4,6 <sup>e</sup>
SUELO	CONTROL S/A	0*	3,6 <sup>d-g</sup>	5 <sup>e</sup>
SUELO	CONTROL C/A	0*	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

**Anexo 23. Análisis de varianza de la longitud de raíces de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

DDSE	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Signif.	C.V	R <sup>2</sup>
0 DDSE	METODO	33,64	1	33,64	11,66	0,0009	*	9,08	0,79
	AISLAMIENTO	1280,33	12	106,69	36,98	≤0,0001	**		
	METODO*AISL.	134,08	12	11,17	3,87	0,0001	*		
	Error	294,29	102	2,89					
	Total	1744,65	127						
6 DDSE	METODO	1,66	1	1,66	0,39	0,5335	N.S	9,42	0,66
	AISLAMIENTO	1124,73	13	86,52	20,3	≤0,0001	**		
	METODO*AISL.	133,3	13	10,25	2,41	0,0068	*		
	Error	477,44	112	4,26					
	Total	1737,14	139						
9 DDSE	METODO	1290,63	1	1290,63	329,63	≤0,0001	**	9,21	0,75
	AISLAMIENTO	379,81	13	29,22	7,46	≤0,0001	**		
	METODO*AISL.	69,56	13	5,35	1,37	0,1868	N.S		
	Error	438,53	112	3,92					
	Total	2178,53	139						
PROMEDIO	METODO	143,34	1	143,34	109	≤0,0001	**	5,47	0,83
	AISLAMIENTO	33,64	1	33,64	11,66	0,0009	*		
	METODO*AISL.	1280,33	12	106,69	36,98	≤0,0001	**		
	Error	134,08	12	11,17	3,87	0,0001	*		
	Total	294,29	102	2,89					

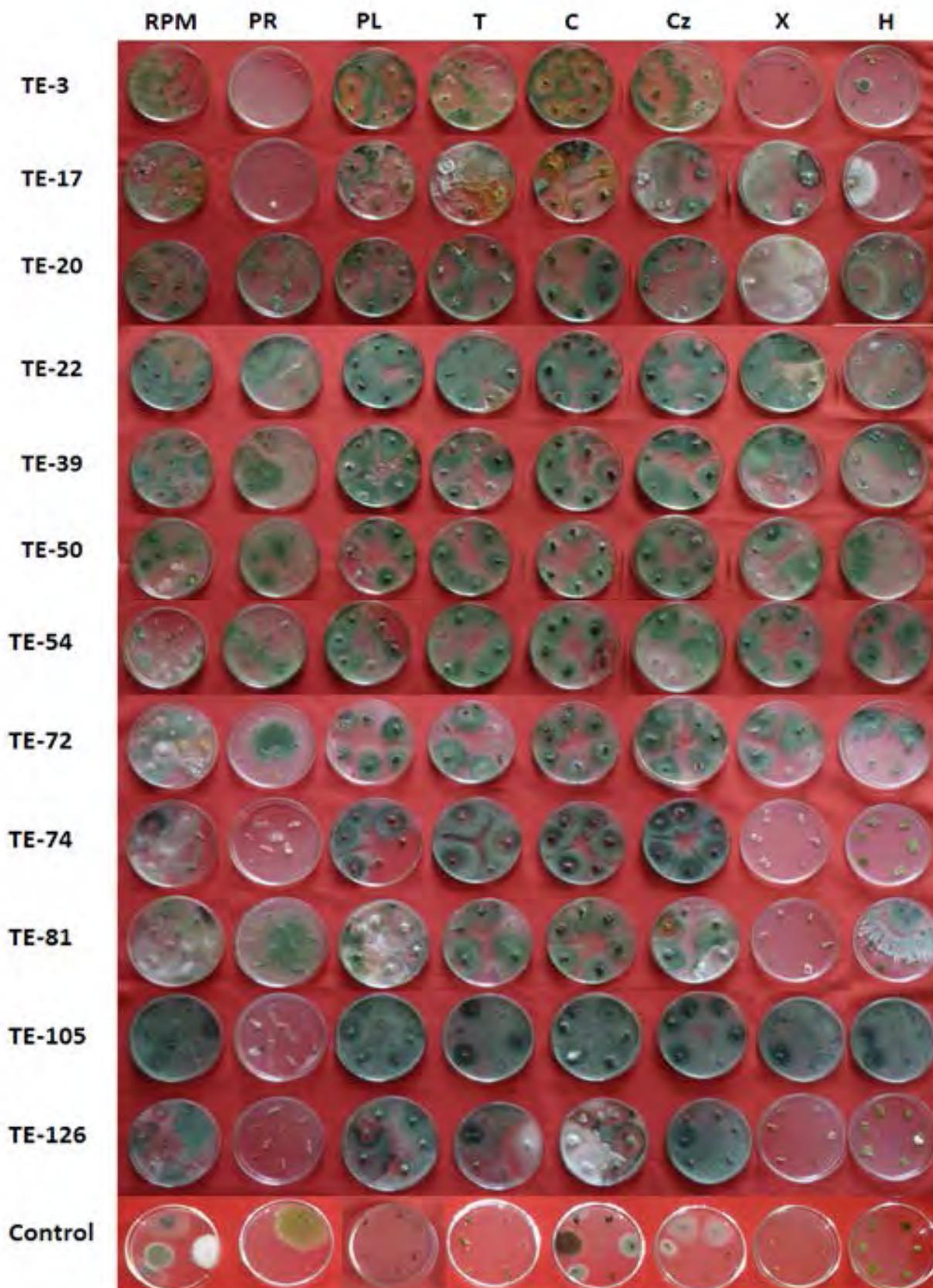
DDSE= Días Después del Sometimiento del Estrés

**Anexo 24. Longitud de raíces de plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito, mediante dos métodos de inoculación.**

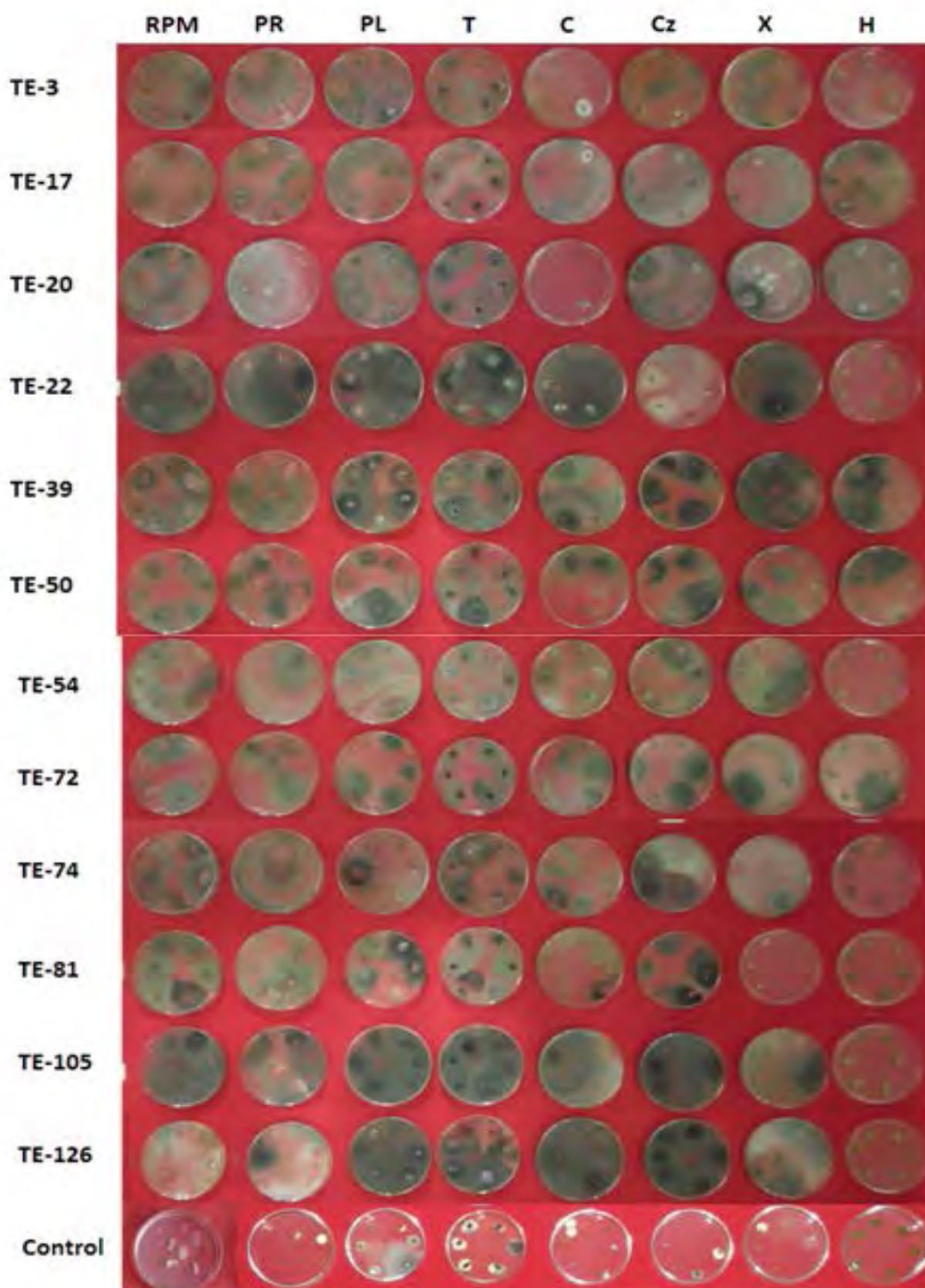
METODO DE INOCULACIÓN	AISLAM.	LONGITUD DE RAÍZ		
		0 DDSE	6 DDSE	9 DDSE
SEMILLA	T-E 3	290,77 <sup>fg</sup>	672,07 <sup>a</sup>	617,59 <sup>a-c</sup>
SEMILLA	T-E 17	54,51 <sup>i</sup>	130,31 <sup>e</sup>	366,03 <sup>de</sup>
SEMILLA	T-E 20	452,75 <sup>a-c</sup>	481,02 <sup>cd</sup>	663,14 <sup>a-c</sup>
SEMILLA	T-E 22	402,7 <sup>b-e</sup>	501,59 <sup>cd</sup>	568,09 <sup>a-c</sup>
SEMILLA	T-E 39	327,41 <sup>e-g</sup>	538,87 <sup>a-d</sup>	706,3 <sup>a</sup>
SEMILLA	T-E 50	349,45 <sup>d-f</sup>	505,26 <sup>b-d</sup>	633,45 <sup>a-c</sup>
SEMILLA	T-E 54	402,48 <sup>b-e</sup>	561,22 <sup>a-c</sup>	703,93 <sup>ab</sup>
SEMILLA	T-E 72	340,69 <sup>e-g</sup>	519,65 <sup>b-d</sup>	670,9 <sup>a-c</sup>
SEMILLA	T-E 74	396,17 <sup>b-e</sup>	472,02 <sup>cd</sup>	626,52 <sup>a-c</sup>
SEMILLA	T-E 81	367,42 <sup>c-f</sup>	489,92 <sup>cd</sup>	636,13 <sup>a-c</sup>
SEMILLA	T-E 105	418,76 <sup>a-e</sup>	490,28 <sup>cd</sup>	548,51 <sup>bc</sup>
SEMILLA	T-E 126	371,74 <sup>c-f</sup>	484,58 <sup>cd</sup>	541,09 <sup>c</sup>
SEMILLA	CONTROL S/A	286,99 <sup>fg</sup>	557,16 <sup>a-c</sup>	558,4 <sup>bc</sup>
SEMILLA	CONTROL C/A	286,99 <sup>fg</sup>	554,91 <sup>a-c</sup>	665,07 <sup>a-c</sup>
SUELO	T-E 3	512,56 <sup>a</sup>	511,78 <sup>b-d</sup>	392,61 <sup>d</sup>
SUELO	T-E 17	100,87 <sup>h</sup>	175,75 <sup>e</sup>	181,74 <sup>f</sup>
SUELO	T-E 20	371,2 <sup>c-f</sup>	407,29 <sup>d</sup>	355,03 <sup>de</sup>
SUELO	T-E 22	503,75 <sup>ab</sup>	501,08 <sup>cd</sup>	366,13 <sup>de</sup>
SUELO	T-E 39	395,8 <sup>c-e</sup>	456,71 <sup>cd</sup>	369,39 <sup>de</sup>
SUELO	T-E 50	460,74 <sup>a-c</sup>	458,75 <sup>cd</sup>	351,52 <sup>de</sup>
SUELO	T-E 54	459,66 <sup>a-c</sup>	577,72 <sup>a-c</sup>	360,52 <sup>de</sup>
SUELO	T-E 72	364,8 <sup>c-f</sup>	555,91 <sup>a-c</sup>	345,55 <sup>de</sup>
SUELO	T-E 74	418,52 <sup>a-e</sup>	498,91 <sup>cd</sup>	407,31 <sup>d</sup>
SUELO	T-E 81	362,22 <sup>c-f</sup>	562,54 <sup>a-c</sup>	411,26 <sup>d</sup>
SUELO	T-E 105	446,47 <sup>a-d</sup>	653,67 <sup>ab</sup>	323,69 <sup>de</sup>
SUELO	T-E 126	294,04 <sup>fg</sup>	553,42 <sup>a-c</sup>	390,02 <sup>d</sup>
SUELO	CONTROL S/A	258,37 <sup>g</sup>	440,07 <sup>cd</sup>	283,67 <sup>e</sup>
SUELO	CONTROL C/A	258,37 <sup>g</sup>	446,31 <sup>cd</sup>	282,07 <sup>e</sup>

Letras distintas indican diferencias significativas. Test Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Anexo 25. Colonización endofítica de *Trichoderma* en secciones de cacao, mediante inoculación en semilla (Método 1).



Anexo 26. Colonización endofítica de *Trichoderma* en secciones de cacao, mediante



A

0 DDSE



6 DDSE



9 DDSE



AISLAMIENTOS

3

17

20

22

39

50

54

72

74

81

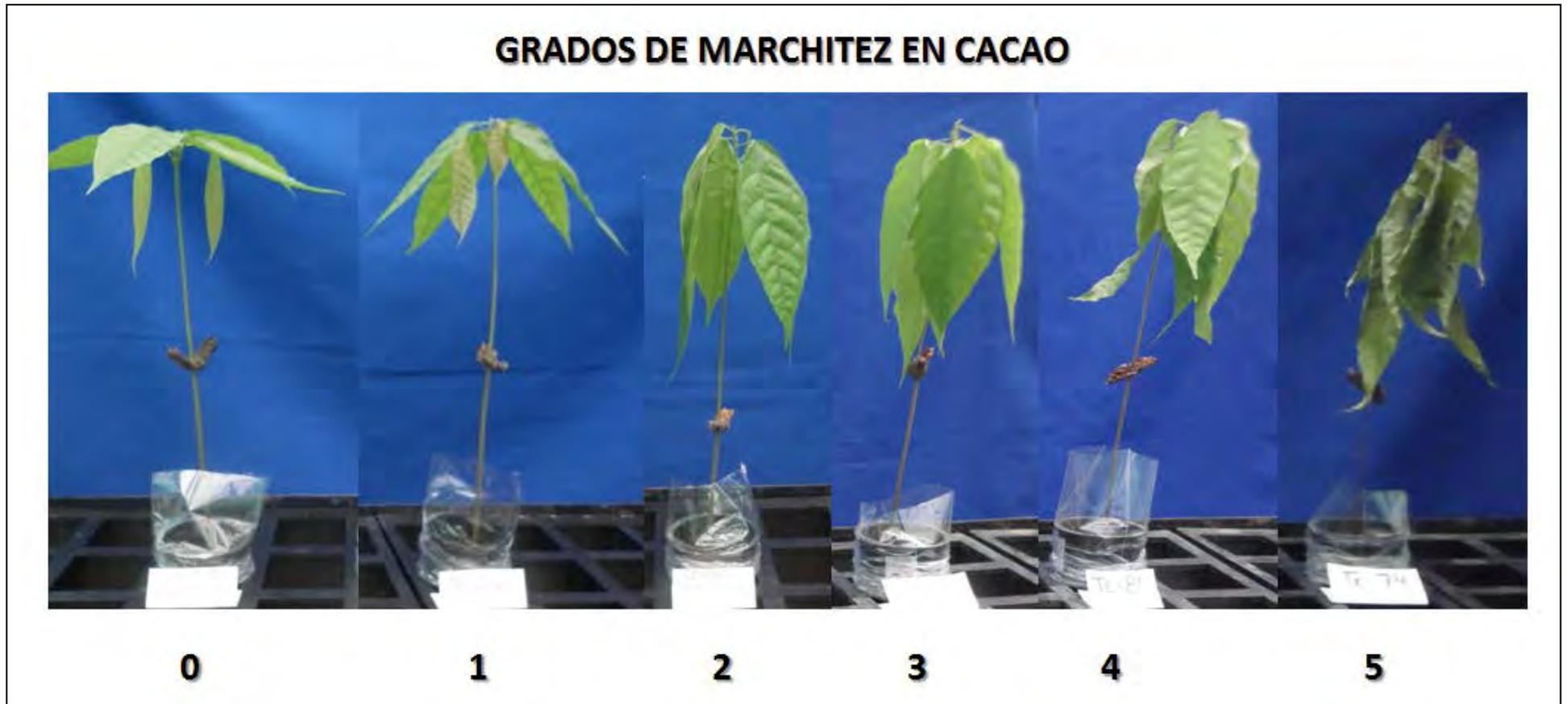
105

126

CS/A

CC/A

Anexo 28. Grados de Marchitez en cacao (Escala del 0 al 5), a causa del estrés hídrico.



## Anexo 29. Resultado de análisis de suelo.

N° Solicitud : **AS0036-11**  
 SOLICITANTE : **Lab. Fitopatología ICT (Atte Ing. Betsabe León T.)**  
 PROCEDENCIA : **San Antonio de Cumbaza-Tarapoto-San Martín-San Martín**  
 EXPERIMENTO : **Arboles Forestales**

FECHA DE MUESTREO : **14/04/2011**  
 FECHA DE RECEP. LAB : **20/04/2011**  
 FECHA DE REPORTE : **29/04/2011**

Número de la muestra				pH	C.E dS/m	CaCO <sub>3</sub> (%)	M.O (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	ANÁLISIS MECÁNICO			CIC	CATIONES CAMBIABLES					Suma de bases	% Sat. de bases	
											Arena	Limo	Arcilla		CLASE TEXTURAL	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>			Al <sup>3+</sup> +H <sup>+</sup>
Lab.		Campo												meq/100								
11	04	00162	M1	4,64	0,06	0,00	2,17	0,10	20,13	30	71,68	8,00	20,32	Fra-Arc-Are	3,05	0,71	0,12	0,08		2,14	0,91	29,95

### MÉTODOS :

TEXTURA : HIDROMETRO  
 pH : POTENCIOMETRO Suspensión Suelo-Agua relación 1:2.5  
 CONDUCT. ELECTRICA : CONDUCTIMETRO Suspensión Suelo-Agua relación 1:2.5  
 CARBONATOS : GAS - Volumétrico  
 FOSFORO : OLSEN MODIFICADO EXTRACT. NaHCO<sub>3</sub> =0.5M , pH 8.5 Esp. Vis  
 POTASIO : OLSEN MODIFICADO EXTRACT. NaHCO<sub>3</sub> =0.5M , pH 8.5 Esp. Absorción Atómica  
 MATERIA ORGANICA : WALKLEY y BLACK  
 CALCIO Y MAGNESO : EXTRACT. KCl 0.1N Esp. Absorción Atómica  
 ACIDES INTERC. : EXTRACT. KCl 1N, Volumetria

Ing. MSc. Luis Zúñiga Cernades  
 Especialista Suelos ICT

La Banda de Shilcayo, 29 de Abril del 2011