

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**DOCTORADO EN AGRICULTURA SUSTENTABLE**



**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Trichoderma* COMO AGENTE  
BIOCONTROLADOR DE LA MONILIASIS (*Moniliophthora roreri*) PARA  
LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DEL CACAO NATIVO”**

**Presentada por**

**SANTOS TRIUNFO LEIVA ESPINOZA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR**

***DOCTORIS PHILOSOPHIAE* EN AGRICULTURA SUSTENTABLE**

**Lima - Perú**

**2022**









## Document Information

---

<b>Analyzed document</b>	tesis_doctoral_sleiva_1.60.pdf (D151538096)
<b>Submitted</b>	2022-11-30 15:55:00
<b>Submitted by</b>	Leonor Mattos Calderón
<b>Submitter email</b>	leomattos@lamolina.edu.pe
<b>Similarity</b>	0%
<b>Analysis address</b>	leomattos.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

---

<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW">https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW</a> Fetched: 2022-11-30 17:54:00		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Maria del Rosario.pdf</b> Document Maria del Rosario.pdf (D134595313)		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Tesis Corregida 1.docx</b> Document Tesis Corregida 1.docx (D13727155)		<b>1</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02">https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02</a> Fetched: 2022-11-30 17:53:00		<b>2</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.3390/agronomy10091376">https://doi.org/10.3390/agronomy10091376</a> Fetched: 2022-11-30 17:57:00		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>TESIS DAVID ULLOA BUCARAM URKUND.docx</b> Document TESIS DAVID ULLOA BUCARAM URKUND.docx (D137224208)		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Quinoa-NOC8-JAC7b.pdf</b> Document Quinoa-NOC8-JAC7b.pdf (D76197098)		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>TESIS HENRY TUQUERRES C 010-08-2016 henryf.docx</b> Document TESIS HENRY TUQUERRES C 010-08-2016 henryf.docx (D21361411)		<b>1</b>

## Entire Document

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA DE POSGRADO DOCTORADO EN AGRICULTURA SUSTENTABLE "DIVERSIDAD GENÉTICA DE TRICHODERMA COMO AGENTE BIOCONTROLADOR DE LA MONILIASIS (Moniliophthora roreri) PARA LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DEL CACAO NATIVO" Presentada por SANTOS TRIUNFO LEIVA ESPINOZA TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN AGRICULTURA SUSTENTABLE LIMA-PERU 2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**DOCTORADO EN AGRICULTURA SUSTENTABLE**

**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Trichoderma* COMO AGENTE  
BIOCONTROLADOR DE LA MONILIASIS (*Moniliophthora roreri*) PARA LA  
PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DEL CACAO NATIVO”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR**

***Doctoris Philosophiae* (Ph.D)**

**Presentada por**

**SANTOS TRIUNFO LEIVA ESPINOZA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Ph.D. Walter Apaza Tapia  
**PRESIDENTE**

Dra. Leonor Mattos Calderón  
**ASESOR**

Dr. Raúl Blas Sevillano  
**MIEMBRO**

Ph.D. Julio Alegre Orihuela  
**MIEMBRO**

Ph.D. Alberto Anculle Arenas  
**MIEMBRO EXTERNO**

*¡Te pido señor!*

*Por el primer párrafo de todos mis escritos  
y por el último capítulo de todos mis libros.  
por el primer respiro de la mañana y  
el último pensamiento de cada noche.*

*Por los primeros sueños de un hijo y  
el último adiós de una madre.  
Porque no haya mala hierba en mi siembra...  
y no se eche a perder la semilla.  
Porque cada uno dé su fruto  
y podamos vivir con el aporte de todos.*

*Te pido por los imposibles de mi impotencia,  
por el sufrimiento que dejo perder,  
por los sueños postergados,  
las alas cerradas y el miedo de seguir.*

*Te pido humildad y amor para vivir,  
aunque ésa sea la vida más sacrificada  
y tenga las lágrimas más amargas,  
los sueños más difíciles  
y el camino más tormentoso.  
Porque la vida sin amor es fría,  
y una vida fría no vale nada.*

*Z. Bacardí*

*Dedicado a Nayelhi Almendra, Xziomara Rousany y Esther Nataniel...*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por mantenerme en pie y con esperanza de mejores tiempos para los tuyos los míos también.

A la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM) – Instituto de Investigación Para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva INDES-CES; a PROCENCIA – Contrato N°10-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV.

A la Escuela de Posgrado de la UNALM, Doctorado en Agricultura Sustentable (PDAS).

A la Dra. Luz Leonor Mattos Calderón, Ph.D. Jorge Ronny Díaz Valderrama, Mg. Karol Rubio Rojas, Dr. Magdiel Torres, Mg. María Silva, Ing. Oswaldo Ananco, Ing. Elgar Hernández y Vilma Aguilar, por su apoyo en la ejecución del presente trabajo.

A los miembros del comité consejero Dr. Raúl Blas Sevillano y Dr. Julio Alegre Orihuela por la revisión, enseñanzas y acertados consejos.

A todo el personal de la Escuela de Posgrado de la UNALM y del PDAS, por su apoyo en los trámites académicos y administrativos.

A todos y a quienes desde un inicio estuvieron, algunos siguen hasta hoy...

# ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1. El cacao en el mundo .....	5
2.2. Cacao en el Perú. ....	6
2.3. La moniliasis del cacao.....	8
2.3.1. Denominación y agente causal .....	8
2.3.2. Origen de la enfermedad. ....	8
2.3.3. Ciclo de vida y Síntomas.....	9
2.4. El género <i>Trichoderma</i> .....	12
2.5. Biodiversidad y Filogenia.....	12
2.6. El protocolo comparación por pares .....	14
2.7. Morfología macroscópica .....	15
2.8. Morfología microscópica.....	16
2.9. Usos de <i>Trichoderma</i> en la agricultura.....	17
2.9.1. Control biológico.....	17
2.9.2. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> .....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
3.1. Lugar de ejecución.....	23
3.2. Métodos .....	26
3.2.1. Etapa I: Diversidad genética de <i>Trichoderma</i> en el agroecosistema de cacao nativo región Amazonas -Perú .....	26
a. Recolección de muestras de suelo .....	26
b. Aislamiento de hongos del suelo.....	26
c. Conservación de las cepas de <i>Trichoderma</i> .....	27
d. Identificación molecular de especies del género <i>Trichoderma</i> .....	28
e. Identificación de especies.....	30
f. Validación de la identificación molecular.....	32
g. Identificación morfológica de especies del género <i>Trichoderma</i> .....	33
h. Estimación de índices de diversidad y análisis ecológico.....	33

3.2.2. Etapa II: Biocontrol <i>in-vitro</i> de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sobre la moniliasis del cacao Amazonas, Perú .....	34
a. Adquisición del antagonista, los aislamientos nativos de <i>Trichoderma</i> spp.....	34
b. Adquisición del fitopatógeno <i>Moniliophthora roreri</i> . .....	36
c. Ensayos de micoparasitismo. ....	36
d. Ensayos de antibiosis.....	38
e. Antagonismo potencial.....	39
f. Análisis de datos.....	39
3.2.3. Etapa III: Potencial de biocontrol <i>in-vivo</i> de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sobre la moniliasis ( <i>Moniliophthora roreri</i> ) para la producción sostenible de cacao.....	40
a. Obtención de las cepas nativas y/o microorganismos .....	41
b. Acondicionamiento de las parcelas de cacao y/o ensayos .....	41
c. Estimación de la incidencia de la moniliasis del cacao.....	45
d. Estimación de la severidad externa e interna de la moniliasis del cacao .....	45
e. Estimación del rendimiento.....	46
f. Eficiencia de los tratamientos.....	46
g. Análisis de datos.....	47
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
4.1. Diversidad genética de <i>Trichoderma</i> en el agroecosistema de cacao nativo, Región Amazonas, Perú .....	48
4.1.1. Identificación molecular de aislados .....	48
4.1.2. Identificación morfológica. ....	58
4.1.3. Diversidad y análisis ecológico.....	99
4.2. Biocontrol <i>in-vitro</i> de cepas nativas del género <i>Trichoderma</i> sobre la moniliasis del cacao ( <i>Moniliophthora roreri</i> )......	103
4.2.1. Ensayos de micoparasitismo .....	103
4.2.2. Ensayos de antibiosis.....	110
4.2.3. Antagonismo potencial.....	117
4.3. Potencial de biocontrol <i>in-vivo</i> de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la moniliasis del cacao ( <i>Moniliophthora roreri</i> ) .....	121
4.3.1. Incidencia de la enfermedad.....	122

4.3.2. Severidad de la enfermedad .....	128
4.3.3. Rendimiento .....	130
V. CONCLUSIONES .....	134
VI. RECOMENDACIONES .....	136
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	137
VIII. ANEXOS .....	159



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación geográfica y variables climatológicas de zonas referenciales de siete provincias de la Región Amazonas .....	25
Cuadro 2. Condiciones de PCR para la amplificación de 4 códigos de barra de ADN.....	30
Cuadro 3. Tratamientos para el potencial de biocontrol de aislamientos nativos de 22 especies y 234 aislamiento de <i>Trichoderma</i> (tratamientos) evaluados contra <i>Moniliophthora roreri</i> en Amazonas Perú.....	35
Cuadro 4. Tratamientos en estudio para evaluar potencial de biocontrol <i>in-vivo</i> de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sobre la moniliasis ( <i>Moniliophthora roreri</i> ).....	40
Cuadro 5. Identificación molecular de cepas del género <i>Trichoderma</i> aislados del agroecosistema de cacao nativo, basado en la comparación de similitud por pares de ITS, rpb2 y tef1. ....	48
Cuadro 6. Identificación molecular de especies del género <i>Trichoderma</i> aislados del agroecosistema de CNFA Amazonas-Perú.....	52
Cuadro 7. Micoparasitismo de 234 aislamientos nativos agrupados en 22 especies de <i>Trichoderma</i> de Amazonas, Perú, evaluado sobre <i>Moniliophthora roreri</i> .....	104
Cuadro 8. Antibiosis de 234 aislamientos nativos, agrupados en 20 especies de <i>Trichoderma</i> de Amazonas, Perú.....	110
Cuadro 9. Antagonismo potencial de 234 aislamientos nativos de <i>Trichoderma</i> de Amazonas, Perú.....	117

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas y signo en el proceso de desarrollo de la enfermedad.....	10
Figura 2. Morfología de especies de <i>Trichoderma</i> .....	16
Figura 3. Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp.....	20
Figura 4. Mapa de ubicación y ámbito de estudio.....	24
Figura 5. Recolección de muestras de suelo hasta identificación de hongos del género <i>Trichoderma</i> .....	27
Figura 6. Identificación de similitud por pares, basado en tres secuencias de ADN.....	32
Figura 7. Metodología para ensayos de micoparasitismo.....	37
Figura 8. Metodología para ensayos de antibiosis.....	39
Figura 9. Croquis de los tratamientos (DBCA) .....	41
Figura 10. Metodología para evaluar el potencial de biocontrol <i>in-vivo</i> .....	44
Figura 11. Niveles de severidad externa e interna de la Moniliasis del cacao .....	46
Figura 12. Árbol filogenético para nuevas especies grupo 1 y 2.....	54
Figura 13. Árbol filogenético para nuevas especies grupo 3.....	55
Figura 14. Árbol filogenético para nuevas especies grupo 4.....	56
Figura 15. Árbol filogenético para nuevas especies grupo 5.....	57
Figura 16. <i>Trichoderma afroharzianum</i> (CNF12_C1).....	61
Figura 17. <i>Trichoderma parareesei</i> (UJF2_C1).....	64
Figura 18. <i>Trichoderma reesei</i> (CNF5_C1).....	66
Figura 19. <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (UCF5A_C1).....	68
Figura 20. <i>Trichoderma lentiforme</i> (BIF12_C1).....	70
Figura 21. <i>Trichoderma orientale</i> (UCF19A_C1) .....	72
Figura 22. <i>Trichoderma asperelloides</i> (UCF8_M5).....	74
Figura 23. <i>Trichoderma inhamatum</i> (BIF8_C1) .....	76
Figura 24. <i>Trichoderma zelobreve</i> (BMF2_C2).....	78
Figura 25. <i>Trichoderma afarasin</i> (BIF1_C3).....	80
Figura 26. <i>Trichoderma ghanense</i> (F4M3) .....	82
Figura 27. <i>Trichoderma breve</i> (BLPF2_C1).....	84
Figura 28. <i>Trichoderma koningiopsis</i> (BMF2_C1).....	86

Figura 29. <i>Trichoderma brevicompactum</i> (BBF1_C3) .....	88
Figura 30. <i>Trichoderma</i> sp. 1 (CRSF6_C1) .....	90
Figura 31. <i>Trichoderma</i> sp. 2 (CNF7_C2) .....	92
Figura 32. <i>Trichoderma</i> sp. 3 (F2M4) .....	94
Figura 33. <i>Trichoderma</i> sp. 4 (BIF26_C1) .....	96
Figura 34. <i>Trichoderma</i> sp. 5 (CNF10_C3) .....	98
Figura 35. Abundancia de especies de <i>Trichoderma</i> en el agroecosistema cacao .....	99
Figura 36. Curva de acumulación de especies de hongos del género <i>Trichoderma</i> .....	101
Figura 37. Riqueza de especies de <i>Trichoderma</i> en el agroecosistema cacao .....	102
Figura 38. Niveles de micoparasitismo. ....	108
Figura 39. Antibiosis de 234 aislados sobre <i>M. royeri</i> .....	115
Figura 40: Porcentaje acumulado de incidencia final de la moniliasis del cacao .....	122
Figura 41. Niveles de incidencia y severidad de la Moniliasis del cacao .....	125
Figura 42: Porcentaje eficiencia de 4 especies de <i>Trichoderma</i> sobre la moniliasis del cacao .....	127
Figura 43: Porcentaje severidad externa de daños causados por moniliasis del cacao .....	128
Figura 44: Porcentaje severidad interna de daños causados por moniliasis del cacao .....	129
Figura 45: Rendimiento estimado del cacao nativo fino de aroma según tratamientos. ....	130

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Identificación molecular de cepas del género <i>Trichoderma</i> aislados del agroecosistema de cacao nativo, basado en la comparación de similitud por pares de ITS, rpb2 y tef1. Los códigos (COD/CEPA) son representativos para 14 especies correctamente identificadas, de un total de 234 aislados .....	160
Anexo 2AB. características morfológicas en placa petri (especies agrupadas con caracteres similares (color de cepa, color de pigmentación en reverso y anverso). .....	165
Anexo 3. Antagonismo de 234 aislados sobre <i>M. royeri</i> . Correspondiente a 19 especies del género <i>Trichoderma</i> , presentes en el Agroecosistema de cacao. Amazonas 2022. ....	188
Anexo 4. Imágenes fotográficas para los niveles de micoparasitismo de 234 aislados del género <i>Trichoderma</i> , correspondiente a 19 especies del agroecosistema de cacao. Amazonas, Perú. (Placas precolonizadas, evaluadas 21 días después de colonización.....	205
Anexo 5. Cepas de referencia (types) para la identificación de especies del género <i>Trichoderma</i> a partir del protocolo de comparación de similitud por pares (Cai & Drizhinina, 2021).....	225
Anexo 6. Mapa regional de puntos de muestreo .....	235
Anexo 7. Ubicación de los puntos de muestreo .....	236
Anexo 8. Panel fotográfico .....	241

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivos estudiar la diversidad de especies de *Trichoderma* presentes en el agroecosistema cacao de Amazonas, Perú, y su potencial como agente de biocontrol *in-vitro* e *in-vivo* sobre la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*), en adelante MC. Realizamos la identificación molecular y morfológica de 234 aislados de *Trichoderma* para posteriormente determinar su potencial de biocontrol *in-vitro*, sobre la MC y finalmente determinar el potencial de biocontrol en campo definitivo. En la identificación se incluyeron análisis de las secuencias ITS, *tef1*, *rpb2* sometidas al protocolo de comparación de similitud por pares, respaldado mediante la identificación morfológica. Para la evaluación del biocontrol *in-vitro*, mediante un DCA, evaluamos el micoparasitismo, antibiosis y finalmente se calculó el antagonismo potencial como indicador de selección de candidatos al biocontrol eficiente de MC a nivel de campo, en donde evaluamos el efecto *in-vivo* de cuatro aislados, utilizando un diseño DBCA y variables epidemiológicas, rendimiento y eficacia del biocontrol. Se identificaron a diecinueve especies del género *Trichoderma*, cinco de las cuales son primer reporte para el Perú y cinco especies corresponderían a nuevas especies: además, se determinó que *T. afroharzianum* fue la especie más abundante. Por otro lado, los resultados observados para micoparasitismo y antibiosis contra *M. roreri* apoyan la existencia de una alta variabilidad intra e interespecífica en *Trichoderma*. Dieciocho especies tuvieron aislados con un alto potencial de antagonismo *in vitro* (más del 50 por ciento). Se demuestra que la evaluación *in vitro* del potencial de biocontrol de las cepas de *Trichoderma*, incluso dentro de la misma especie, es variable y debe evaluarse integrando los niveles de micoparasitismo y antibiosis, en forma de antagonismo potencial. Finalmente, las cuatro cepas de *Trichoderma* aplicadas en campo, obtuvieron valores superiores en la reducción de incidencia con impacto directo en el incremento del rendimiento. Las cepas CP24-6 y F14M3, con 27 por ciento y 38 por ciento, alcanzaron los menores niveles de incidencia de FPR; además de una eficiencia del 62 por ciento.

**Palabras clave:** Control biológico, diversidad, variabilidad, moniliasis, cacao.

## ABSTRACT

The present study aimed to study the diversity of *Trichoderma* species present in the cocoa agroecosystem of Amazonas, Peru, and its potential as an *in vitro* and *in vivo* biocontroller of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*), hereinafter referred to as CM. Molecular and morphological identification of 234 *Trichoderma* isolates was carried out to determine their *in-vitro* biocontrol potential on MC and finally to determine their biocontrol potential in the final field. Molecular identification included analysis of ITS, *tef1*, *rpb2* sequences subjected to the pairwise similarity comparison protocol, supported by morphological identification. For *in-vitro* biocontrol evaluation, using a DCA, we evaluated mycoparasitism, antibiosis and finally potential antagonism was calculated as an indicator for selection of candidates for efficient biocontrol of MC at field level, where we evaluated the *in-vivo* effect of four isolates, using a DBCA design and epidemiological variables, performance and biocontrol efficacy. Nineteen species of the genus *Trichoderma* were identified, five of which are first reported for Peru and five species correspond to new species: in addition, it was determined that *T. afroharzianum* was the most abundant species. On the other hand, the results observed for mycoparasitism and antibiosis against *M. roreri* support the existence of a high intra- and interspecific variability in *Trichoderma*. Eighteen species had isolates with high *in vitro* antagonism potential (more than 50 por ciento). It is shown that the *in vitro* evaluation of the biocontrol potential of *Trichoderma* strains, even within the same species, is variable and should be evaluated by integrating the levels of mycoparasitism and antibiosis, in the form of potential antagonism. Finally, the four *Trichoderma* strains applied in the field obtained superior values in incidence reduction with direct impact on yield increase. The strains CP24-6 and F14M3, with 27 por ciento and 38 por ciento, reached the lowest levels of FPR incidence; besides an efficiency of 62 por ciento.

**Keywords:** Biological control, diversity, variability, moniliasis, cocoa.

## I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) que significa “alimento de los dioses” es un cultivo que aporta a la economía familiar y contribuye a mejorar el nivel de vida de miles de familias productoras en todo el mundo; alrededor de 6 millones de pequeños agricultores están vinculados a su producción y los ingresos de 40 a 50 millones de personas dependen de este cultivo (Beg *et al.* 2017; Díaz-Valderrama *et al.* 2020). Su importancia, además de los económicos, radica en los beneficios sociales y ambientales (Gama-Rodríguez *et al.* 2021).

En el Perú se cultivan aproximadamente 144 232.44 ha de cacao (INEI 2013); además, nuestro país forma parte del centro de origen del cacao. Posee el 60 por ciento de las variedades de cacao del mundo y ha sido calificado por la Organización Internacional del Cacao (ICCO) como un país donde se produce y se exporta cacao fino y de aroma (MINAGRI 2019). En el departamento de Amazonas existen 13 483.16 hectáreas de cacao, cifra que la convierte en la quinta región productora del Perú, después de San Martín, Junín, Cusco y Huánuco; esta superficie está distribuida en 11 664 unidades productivas (INEI 2013). Entonces, el cacao es una actividad económica que representa el sustento diario de miles de familias Amazonenses. Además, las cualidades del cacao que se produce en este departamento, ha permitido obtener premios internacionales y la “Denominación de origen “Cacao Amazonas Perú” (INDECOPI 2016). Muchas son las bondades que ha adquirido el cacao nativo de esta parte del país; sin embargo, en la actualidad, está siendo severamente afectado por la moniliasis del cacao MC, cuyo agente causal *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans , Stalpers, Samson & Benny, origina una de las enfermedades más destructivas y desastrosa del cacao; los daños que puede causar este fitopatógeno podrían llegar al 100 por ciento y resultar en el abandono del campo de cultivo (Bailey *et al.* 2008). En Perú, se reportó por primera vez en Quebrada Seca, Utcubamba, Amazonas en el año de 1989 (Díaz-Valderrama *et al.* 2020) convirtiéndose así en el principal problema fitosanitario y limitación parasítica del cultivo de cacao; Además, se ha reportado que

*M. royeri* ha provocado efectos socioeconómicos y ambientales negativos (Bailey *et al.* 2018), a los que se suma la pérdida de diversidad genética del cacao. Los altos niveles de incidencia de esta enfermedad, ha llevado al abandono de extensas áreas del cultivo de cacao (Leiva *et al.* 2020).

En este escenario, la producción del cacao se enfrenta al desafío de buscar y encontrar formas sostenibles de aumentar la producción al mismo tiempo que logre satisfacer las demandas de una sociedad moderna (Guirlanda *et al.* 2021) que exige una marcada tendencia por los productos orgánicos, inocuos y libres de residuos químicos como plaguicidas y que en su producción, son manejados con tecnologías amigables con el medio ambiente. Entonces, el control biológico de enfermedades, resulta ser la herramienta ideal capaz de resolver estas exigencias que además podría permitirnos avanzar hacia una producción sostenible de cacao.

Múltiples estrategias se han evaluado y recomendado para el control de la MC; a saber, aquellas relacionadas con el manejo cultural del cultivo, purgas, podas y cosechas oportunas (Bateman *et al.* 2005); sin embargo, éstas resultarían ser insuficientes, por lo que fundamentados en experiencias previas específicas de control biológico de la MC como el de Krauss & Soberanis (2001), Torres de la Cruz *et al.* (2011), Hoyos-Carvajal *et al.* (2011) y Leiva *et al.* (2020), estudios realizados en su mayoría en países diferentes a Perú, sugieren a diferentes especies del género *Trichoderma* como agentes con alto potencial de biocontrol de la moniliasis del cacao. *Trichoderma* (Teleomorph Hypocrea, Ascomycota, Hypocreales) es un género que ostenta especies cosmopolitas que habitan en variados nichos ecológicos (Jaklitsch & Voglmayr 2015; Migheli *et al.* 2009; Schmoll & Schuster 2010), atribuyéndose propiedades económicamente importantes y de mucha utilidad para el bienestar humano (Ali Nusaibah & Musa 2019). Diversas especies de este género son ampliamente utilizadas como agentes efectivos de control biológico, capaces de reducir los daños causados por fitopatógenos, (Mohiddin *et al.* 2021; Vinale *et al.* 2008), a partir de procesos como el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por los recursos y el espacio; sumándose a ello, efectos adicionales para las plantas, incluida la resistencia sistémica o localizada, aumento del crecimiento de las plantas, incluyendo la absorción de nutrientes (Harman 2006; Ten Hoopen & Krauss 2016).



A julio del 2020, se han identificado al menos 375 especies del género *Trichoderma* (Cai & Druzhinina 2021), principalmente, mediante el análisis filogenético a partir de secuencias de ADN (Azuddin *et al.* 2021; Bustamante *et al.* 2021; Jaklitsch *et al.* 2013), pues al existir un número limitado de caracteres morfológicos, que además son variables en formas taxonómicamente significativas (Plessis *et al.* 2018), la identificación de especies podrían dar lugar a errores, ser inciertos o confusos, originando que los estudios de diversidad prioricen el uso de herramientas moleculares bajo la aplicación del concepto de reconocimiento de especies filogenéticas de concordancia genealógica, basado en las secuencias parciales de diferentes marcadores moleculares como 1-alfa (*tef1*), calmodulina (*cal1*), endochitinasechi18-5, *rpb2*, *tact* y otros loci (Barrera *et al.* 2021; Schmoll & Schuster 2010; Ten Hoopen & Krauss 2016; Toala *et al.* 2019).

En un escenario donde el agroecosistema de cacao, Amazonas-Perú, posee un variado patrón geográfico y condiciones ecológicas diversos (Vidal 2014); lo que sugiere una biodiversidad muy extensa en la zona de estudio, y aunque, los estudios de diversidad de especies de *Trichoderma* con potencial de biocontrol sobre la MC, hasta donde sabemos son escasos, una reciente investigación localizada en solo una provincia de Amazonas-Perú, demuestra la existencia de tres nuevas especies asociadas a fincas de cacao, *Trichoderma awajun*, sp. nov., *Trichoderma jaklitschii*, sp. nov. y *Trichoderma peruvianum*, sp. nov., (Bustamante *et al.* 2021); sugiriendo que ésta región podría poseer altos índices de diversidad, compuesta además, por especies de *Trichoderma* con potencial de biocontrol de la MC, por lo que resulta necesaria explorar su diversidad, a partir de su caracterización morfológica y molecular que podrían ofrecer una identificación coherente de *Trichoderma* spp. (Druzhinina *et al.* 2005; Kubicek *et al.* 2008) que además, nos permita una adecuada identificación de especies como requisito indispensable para evaluar el potencial de control biológico sobre microorganismos fitopatógenos como *Moniliophthora roreri*.

Ante una creciente necesidad por obtener una herramienta de control que haga frente a la MC, que además procure la producción sostenible del cacao, en el presente estudio, nos planteamos el objetivo general de estudiar la diversidad de especies de *Trichoderma* presentes en el agroecosistema cacao de Amazonas, Perú, y su potencial como agente de control biológico sobre

*M. roreri* para la producción sostenible de cacao nativo de Amazonas, para lo cual nos planteamos objetivos específicos de i) identificar morfológica y molecularmente las especies de *Trichoderma* presentes en el agroecosistema cacao nativo de la región Amazonas, Perú., ii) Determinar el potencial de biocontrol *in-vitro*, de la diversidad de cepas del género *Trichoderma* spp. sobre la moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny) presentes en el agroecosistema del cacao nativo de Amazonas., y iii) Determinar el potencial de biocontrol en campo definitivo, de las cepas de *Trichoderma* sp. sobre la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) presentes en el agroecosistema del cacao nativo de Amazonas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. EL CACAO EN EL MUNDO

El cacao (*Theobroma cacao*) (STERCULIACEAE) es un cultivo originario de América del Sur, más probablemente en la parte alta de la Amazonía Peruana ecuatoriana y la región amazónica integrada por Perú, Colombia y Brasil (Motamayor *et al.* 2008; Thomas *et al.* 2012; Zarrillo *et al.* 2018), se produce en los trópicos húmedos en un cinturón entre 10 °N y 10 °S del Ecuador, donde el clima es apropiado para su producción; posee un hábitat natural que se encuentra en el piso inferior de la selva tropical siempre verde, y factores climáticos específicos como la temperatura y precipitación, determinan un crecimiento óptimo (ICCO 2021). Los frutos del cacao, llamados también vainas o mazorcas, contienen semillas que son procesadas por una multimillonaria industria del chocolate (Motamayor *et al.* 2008).

Una clasificación tradicional del cacao hacía referencia a la existencia de dos grandes grupos: Criollo y Forastero (Cheesman 1944), posteriormente un tercer grupo: Trinitario, hace referencia que se aplica a los cultivares híbridos entre Criollo y Forastero (Cuatrecasas 1964) el mismo que aparece después de las pérdidas de la producción en Trinidad (1720), debido a la presencia de una enfermedad conocida como explosión (Leiter & Harding 2004). Por otro lado, otra clasificación, a partir de herramientas moleculares (marcadores microsatélites) ha permitido distinguir a 11 grupos genéticos, a saber: Amelonado, Criollo, Marañón, Iquitos, Nanay, Curaray, Contamana, (Motamayor *et al.* 2003) Purús, Guayana, Nacional (Motamayor *et al.* 2008) y Nacional Boliviano (Zhang *et al.* 2012). Además, en el Perú existen tres cultivares de cacao nativo reconocidos: Cacao “Chuncho”, “Cacao Amazonas Perú” (con denominación de origen protegida) (INDECOPI 2016) y 'Blanco Piurano’ que posee propiedades organolépticas únicas (Quiñones *et al.* 2018).

Hoy en día, el cacao se produce mayoritariamente en África Occidental, principalmente Costa de Marfil y Ghana (60 por ciento del cacao total mundial), pero generalmente se procesa en la Unión Europea (43 por ciento en 2019), Indonesia, Estados Unidos Unidos y Brasil (Ozlem *et al.* 2021).

Es preciso señalar que la importancia económica del cacao se basa principalmente en el uso de los granos o semillas por multimillonarias industrias que elaboran el chocolate. Diversos estudios en todo el mundo dan a conocer y coinciden que el mercado de cacao seguirá en ascenso. Se ha proyectado el tamaño global del mercado de confitería de chocolate de 116.790 millones de EUR en 2017 a más de 169 000 millones de EUR para el año 2026 (Misevic *et al.* 2020), y se estima que el mercado de cacao premium, con certificación de sostenibilidad y origen único, acelera el crecimiento general del mercado estudiado; solamente el mercado Europeo podría crecer hasta 57 000 millones de USD para 2024 (Mordor Intelligencia 2022). Por otro lado, la región Asia-Pacífico, resulta ser un mercado atractivo y sólido para el cacao y sub productos, la evidencia más notable es el incremento del 4.5 por ciento en el consumo esperado entre 2015 y 2020 en comparación con el 1,7 por ciento a nivel mundial (Euromonitor International 2016). Además, algunos factores como el crecimiento de la confitería en China e India y la creciente demanda de productos de confitería saludables y de alimentos premium incentivan a la generación de nuevos negocios vinculados al cacao. Otro factor que promueve el crecimiento del mercado del cacao es la ascendente demanda por productos con alto contenido de cacao y chocolates orgánicos (Jambor *et al.* 2017).

## **2.2. EL CACAO EN EL PERÚ**

El cacao dinamiza la economía de muchas de familias en todo el Perú; su importancia ha sido relevante desde épocas muy remotas y para antiguas civilizaciones; prueba de ello son los restos arqueológicos de 3000 años de antigüedad, encontrados en el Pueblo de tembladera (costa norte) (Ogata *et al.* 2006) que revelan, además, las interacciones de los pueblos amazónicos y costeros en el antiguo Perú, hace unos 3500 a 2900 aC. Otra prueba de la magnitud de la importancia del cacao en antiguas civilizaciones peruanas vincula a la sociedad “Chachapoyas” (800 al 1470 dC), que floreció en la actual provincia de Utcubamba, Amazonas (Church y Von Hagen

2008). El “cacao Amazonas Perú” es originario de esta región y actualmente tiene la denominación de origen ( INDECOPI 2016), única para Perú, en cultivo de cacao.

Además, que coincidentemente, el dominio “Chachapoyas” se encuentra en el extremo sureste de la Cuenca Binacional Mayo-Chinchipec-Marañón, donde se encuentra el primer centro conocido de domesticación del cacao, según Zarrillo *et al.* (2018) , quienes a partir de análisis bioquímicos y moleculares, vasijas de cerámica encontradas en Palanda, Ecuador (cultura Mayo-Chinchipec-Marañón) con sede en el Alto Amazonas (frontera Ecuador – Perú), revelaron no solo que el cacao se consumía desde 5450 a 5300 a. de C., si no que refieren que el centro de domesticación más antiguo conocido fue en la región del Alto Amazonas de América del Sur en oposición a Mesoamérica (Zarrillo *et al.* 2018). Por lo tanto, queda científicamente demostrado que el centro de origen y el centro más antiguo de domesticación del cacao sucedieron en la misma zona del Alto Amazonas de América del Sur (Díaz-Valderrama *et al* 2020).

Hoy en día, en el Perú, el cacao beneficia de forma directa a una cifra mayor a 90 mil familias e indirectamente a 450 mil personas; por otro lado, este cultivo ha pasado por un incremento sostenido de sus volúmenes de producción de hace 10 años de 12.6 por ciento promedio anual (MINAGRI 2020), actualmente se ubica en el noveno lugar en importancia en el mundo, (2 por ciento de la producción mundial) (MINAGRI 2019). Por otro lado, el Perú ha sido reconocido como un país productor y exportador de cacao fino y de aroma (75 por ciento), es el segundo productor de cacao criollo en el mundo (López *et al.* 2020), atributo que permite diferenciarse del cacao producido en África y/o Asia; complementado a ello que el 60 por ciento de la diversidad genética de cacao del mundo (germoplasma) se encuentra en nuestro país, es así que partiendo de la clasificación clásica, la región Junín es la mayor productora de cacao Trinitario (53.3 por ciento), Cusco y Ayacucho producen al menos el 37.3 por ciento de Forastero Amazónico y en la zona de San Martín, Amazonas y Cajamarca, con un 9.4 por ciento de cacao criollo (ICCO 2021; MINAGRI 2020).

El cacao es, por lo tanto, un producto básico estratégico, que en el Perú, tiene una tendencia al incremento de la demanda, ello está demostrado con la comprobación del incremento del

procesamiento que ha permitido mantener e incluso de incrementar los precios de los granos de cacao (López *et al.* 2020).

## **2.3. LA MONILIASIS DEL CACAO**

### **2.3.1. Denominación y agente causal**

Esta enfermedad ha adquirido diversas denominaciones; en idioma español, por ejemplo, se conoce como Monilia, Moniliasis, Mancha parda, Mancha Helada, Pasma, Nieve, Paludismo y Pringue. En inglés, la denominación más común es Frosty Pod Rot (Ali *et al.* 2015) . El agente causal es el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson y Benny, Basidiomycota (Phylum), Agaricomycetes (Clase), Agaricales (Orden), Marasmiaceae (Familia) (Evans *et al.* 1978).

### **2.3.2. Origen de la enfermedad**

Los primeros reportes de la existencia de daños causados por esta enfermedad refieren al año 1851, al Nor este del río Cauca (Sopetrán y Santa Fe de Antioquia) - Colombia, aunque existen reportes anteriores de una epidemia causada por la moniliasis que ocurrió al norte de Santander en el año de 1817, muchos años antes de los registrados en Ecuador provincia de Guayas (1895), donde se convierte en epidemia (Ali *et al.* 2015), que causó una reducción del 60 por ciento entre 1916 y 1931, la mayor disminución de la producción de cacao del país, (McCook 2002 ). Esto creó una crisis económica nacional inesperada y, posteriormente, trastornos sociales catalogados como uno de los peores en la historia de Ecuador (Pineo 1988). Estudios científicos demuestran que en el Valle del Magdalena de Colombia, se encontraron los niveles más altos de diversidad genética que cataloga a esta región como el posible centro de origen de *M. roreri* (Ali *et al.* 2015). Por otro lado, trabajos científicos en la historia, hacen referencia que en Panamá, la enfermedad arribó en 1958 (Phillips-Mora 2003), a Costa Rica, en 1978 ( Enríquez y Suárez 1978), a Bolivia en el 2012 (Phillips-Mora *et al.* 2015). En el Perú, el primer reporte de la presencia de la moniliasis del cacao hace referencia a la localidad de Quebrada Seca, Utcubamba en el año de 1988 (Hernández *et al.* 1990), tras lo cual se originan, cuantiosas pérdidas de las cosechas de cacao. Uno de los últimos reportes de presencia de este patógeno refiere al año 2012, a una localidad conocida como Alto Beni – La Paz –Bolivia (Phillips-Mora *et al.* 2015).

### 2.3.3. Ciclo de vida y Síntomas

La moniliasis del cacao, causa la pudrición del fruto del cacao y se ha convertido en un verdadero obstáculo para su producción; este cultivo ha sido sujeto de una constante co-evolución y rápida adaptación de sus enemigos naturales en este hospedero, procesos como su domesticación lejana al centro de origen y la adaptabilidad a diferentes regiones agroclimáticas han contribuido (Ploetz 2007). No hay duda que la aparición de la moniliasis y otras enfermedades del cacao han moldeado la historia moderna de la producción de cacao, actualmente, los países africanos y asiáticos producen aproximadamente el 70,2 y el 13 por ciento, mientras que los países de las Américas producen el 15,7 por ciento del cacao mundial. La mayoría del cacao ahora se produce lejos de su centro de origen (Díaz-Valderrama *et al.* 2020), y la moniliasis del cacao ha influenciado en este suceso.

El mecanismo de infección de *Moniliophthora roreri*, sugiere que las esporas germinan y penetran directamente a través de la epidermis y/o estomas del fruto, logrando colonizar los tejidos intercelularmente y sin causar nivel de antagonismo alguno (necrosis celular, por ejemplo) (Suarez 1971), los frutos tiernos o meristemáticamente activos pueden ser susceptibles, además, en esta etapa también las plántulas y brotes tiernos del cacao (Evans 1981). Sin embargo, *M. roreri* no logra esporular en estos tejidos tiernos (proceso de infección artificial), no relevante para el ciclo de la enfermedad en campo, Además, existen evidencias que el hongo podría invadir el cojín floral por intermedio del fruto infectado, permanecer en el tejido del fruto e infectar a los nuevos frutos que se formen (Evans 1981), aunque no existe mayor evidencia de ello.

Los frutos de cacao son más susceptibles al ataque del patógeno, durante los 3 primeros meses de desarrollo; desde el momento de la penetración hasta la aparición de síntomas externos, el patógeno posee un amplio periodo de incubación, lo que estaría determinado por la edad del fruto y otros factores (Bailey & Meinhardt 2016).

Evans (1986), hace referencia que *M. roreri*, es capaz de desarrollar la enfermedad en frutos de cualquier etapa de desarrollo; sin embargo, muchos estudios coinciden al aseverar que la etapa de fruto que está más expuesta al ataque del patógeno en las primeras etapas de desarrollo (Bailey *et al.* 2018) .

*M. royeri* es un hongo hemibiotrófo, esto se debe a que este microorganismo, posee una etapa biótropa y una necrotrófica (Griffith *et al.* 2003). Estudios vinculados al proceso de infección del fitopatógeno, a partir de inoculaciones en campo, han demostrado que cuando los frutos fueron expuestos a *M. royeri* a los 20 a 60 días, la colonización intercelular y la necrosis ocurre dentro de los 40 días, un síntoma de ello se observa en las mazorcas jóvenes (Figura 1AB), las cuales se pueden notar muy hinchadas (Bailey & Meinhardt 2016). Cuando la inoculación se realizó a frutos de 60-80 días de desarrollo, el proceso de la enfermedad se completó dentro de los 2 meses siguientes (entre los 55 a 75 días), incluyendo síntomas como la maduración prematura o deformación del fruto (Figura 1b). Por otro lado, cuando la inoculación se realizó a los frutos de 120-160 días de desarrollo, el proceso de infección fue más lento, pudiendo observarse algunas lesiones pequeñas, generalmente no se produce la penetración al endocarpio y por lo tanto no hay daños en los granos del fruto (Suarez 1972; Evans 1981). Además, un trabajo reciente, realizado en Utcubamba, Amazonas, confirma que los primeros síntomas en frutos se observaron después de 20 días de la inoculación (síntomas en grado 1), siendo a los 160 días cuando se presentaron el mayor nivel de severidad (Alejandria *et al.* 2021).



**Figura 1. Síntomas y signo en el proceso de desarrollo de la enfermedad: AB: Deformación y/o aparición de gibas hasta necrosis y amarillamiento - maduración prematura (B) (Grado 1 de daño); C: Mancha chocolate en 25 por ciento del fruto, D: Mancha chocolate en alrededor del 50 por ciento del fruto; E: Aparición de esporulación y manchas en 75 por ciento del fruto; F: Esporulación y daños externos en el 100 por ciento del fruto**

La presencia repentina de lesiones irregulares color marrón oscuro – chocolate que se expanden y logran juntarse para rápidamente cubrir toda la superficie del fruto, resulta ser el primer



síntoma externo de la enfermedad (Figura 1C), para que de 3 a 8 días después, una densa capa de micelio (pseudostroma) cubra parcial o totalmente al fruto (Figura 1D), tornándose de coloración crema, rosa a marrón bronceado, a medida que las esporas llegan a desarrollar (Bailey & Meinhardt 2016). Se estima que por cada  $\text{cm}^2$  de superficie del fruto la densidad de esporulación alcanzaría los 44 millones de esporas, y en un fruto maduro se pueden encontrar hasta siete mil millones de esporas (Campuzano 1976).

Los síntomas de la parte interna del fruto, podrían ser variables y depender de la edad y la variedad, cuando la infección fue temprana, se evidencian alteraciones en la formación de los granos, con tejidos desorganizados y gelatinosos (pudrición acuosa de la vaina). Cuando los frutos son infectados en etapas posteriores al crecimiento inicial, se produce una hiperplasia originándose compactación de los tejidos, los granos deformes se pegan entre sí, originándose una pudrición húmeda, generalmente (Figura 3d) (Bailey & Meinhardt 2016), en la práctica, se pueden notar que estos frutos son más pesados que los sanos (cuando son comparados en edad similar).

El inicio del ciclo de vida del hongo (independientemente de las condiciones ambientales) coincide con el inicio de la época seca o menos lluviosa; momento que los frutos infectados dispersan sus esporas, motivados por varios factores (viento, movimiento de la planta de cacao debido a labores de poda, cosecha, etc.), una ligera llovizna, el rocío de la noche o de la mañana puede ser suficiente para que las esporas puedan iniciar la infección, lo que además explica, el ciclo infeccioso constante, en regiones con climas secos prolongados (Evans 1981). Además, factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa en zonas productoras de cacao ubicadas en altitudes superiores a 1000 msnm, desfavorecen la dispersión de esporas, lo que origina que los síntomas y signos de la enfermedad se expresen a los 80 +/- 10 días de desarrollo del fruto enfermo y así complete su infección. Por otro lado, cuando las plantaciones de cacao se encuentran por debajo de los 600 msnm, estos mismos factores contribuyen a una aceleración del ciclo de la infección, el mismo que se completa en 50 +/- 10 días (FEDECACAO 2013).

## **2.4. EL GÉNERO *TRICHODERMA***

*Trichoderma* es un género hiperdiverso taxonómicamente difícil y con un número extraordinariamente alto de especies (Jaklitsch 2011); está conformado por hongos filamentosos (ascomicetos) comunes con esporas de color verde y hialinas que han demostrado una variedad de estilos de vida e interacciones con otros hongos, animales y plantas. Frecuentemente se encuentran en el suelo, creciendo sobre madera, cortezas, otros hongos y muchos sustratos más, demostrando así, un elevado potencial oportunista y adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas (Druzhinina *et al.* 2011; Kubicek & Harman 2002).

La taxonomía de los hongos de este género es complicada debido al pleomorfismo que posee, lo que significa que pueden existir en dos etapas morfológicas y fisiológicamente diferentes; desarrolla una etapa sexual (teleomórfica) conocida como *Hypocrea*, y otra etapa asexual (anamórfica) conocida como *Trichoderma* (de allí las referencias *Hypocrea/Trichoderma* mostradas por investigadores de todo el mundo) (Druzhinina *et al.* 2011), es preciso resaltar que varias especies ya han perdido su capacidad sexual de reproducción, convirtiéndose en especies clonales; es el caso de *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, y *T. parareesei* (Druzhinina *et al.* 2010), aunque la mayor parte de la diversidad genética de *Trichoderma* aún mantiene la capacidad de poseer formas sexuales (Benítez *et al.* 2004). Algunas especies se aíslan tanto como anamorfos como teleomorfos, con la misma frecuencia.

## **2.5. BIODIVERSIDAD Y FILOGENIA**

*Trichoderma* (Hypocreaceae) está compuesto por especies con características raras y difíciles de observar, lo que conlleva a encontrar dificultades durante la identificación de las especies (Zin & Badaluddin 2020). Este género fue descrito por primera vez hace 200 años como un gasteromicete y solo un siglo después se realizaron los análisis de su estructura y características para ser clasificado como género entre los hongos filamentosos (Harman 2006) .

En 1969, se introdujo el concepto de “agregado de especies”, lográndose clasificar las especies de *Trichoderma* en nueve agregados, diferenciados por sus características morfológicas (Rifai 1969); que desafortunadamente fueron poco diferenciables. Posteriormente (Bissett 1991), basado en la morfología, clasificó el género en cinco secciones *Saturnisporum*, *Pachybasium*,

Longibrahiatum, *Trichoderma* e *Hypocreanum*. Posteriormente, se descubren varias especies *Trichoderma/Hypocrea*, por lo que para el año 2006 ya existían más de 100 especies filogenéticamente identificadas (Druzhinina *et al.* 2006). Su taxonomía refiere:

Reyno: Fungi

Division: Ascomycotina

Subdivision: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Debido a la real importancia emergente de *Trichoderma* y lo que representa para la humanidad, así como un motivado esfuerzo sin precedentes de los taxónomos, se ha producido un incremento drástico en el número de especies de *Trichoderma* identificados (Cai & Druzhinina 2021). La historia data que hace 50 años, se reconoció a *T. reesei* como productor eficiente de enzimas de biomasa vegetal para biocombustibles y otras industrias, dos décadas después, se reconoce la existencia de *T. atroviride*, *T. virens*, *T. harzianum* y otras, las que se propusieron como potenciales microorganismos para la protección de plantas (biofungicidas) y la promoción del crecimiento de las plantas (Biofertilizantes) (Druzhinina *et al.* 2011; Harman *et al.* 2004); Estas especies, ahora son ampliamente utilizadas como agentes de biocontrol, promotores de una agricultura sostenible (Cai & Druzhinina 2021).

Otra de las causas que motivaron este incremento en la identificación de especies se debe a que *Trichoderma* fue documentado como agente causal de la enfermedad del moho verde en hongos comestibles del género *Pleurotus* (Komoń-Zelazowska *et al.* 2007) y también como patógeno oportunista de humanos (Sandoval-Denis *et al.* 2014), causando un incremento notorio en el número de publicación científicas que incluyen identificación de especies. Finalmente, otro factor que definitivamente ha tenido trascendental relevancia en el incremento repentino del número de especies, es el uso de herramientas de reconocimiento filogenético de especies, o de concordancia genealógica, técnicas de códigos de barras de ADN, pues antes de la incorporación de estos códigos, las especies se reconocían en función de su morfología y demás

características de crecimiento, pero la introducción de técnicas moleculares trajo como consecuencia el reconocimiento de varios cientos de especies de *Trichoderma* (Cai & Druzhinina 2021; Druzhinina *et al.* 2006).

A julio del 2020, se han identificado al menos 375 especies del género *Trichoderma* (Cai & Druzhinina 2021), principalmente, mediante el análisis filogenético a partir de secuencias de ADN (Azuddin *et al.* 2021; Bustamante *et al.* 2021; Jaklitsch *et al.* 2013), pues al existir un número limitado de caracteres morfológicos, que además son variables en formas taxonómicamente significativas (Plessis *et al.* 2018), la identificación de especies podrían dar lugar a errores, ser inciertos o confusos, originando que los estudios de diversidad prioricen el uso de herramientas moleculares bajo la aplicación del concepto de reconocimiento de especies filogenéticas de concordancia genealógica, basado en las secuencias parciales de diferentes marcadores moleculares como 1-alfa (*tef1*), calmodulina (*cal1*), endochitinasechi18-5, *rpb2*, *tact* y otros loci (Barrera *et al.* 2021; Hoopen and Krauss 2016; Schmoll and Schuster 2010; Toala *et al.* 2019). Finalmente se sabe que los estudios de identificación de especies de *Trichoderma* donde incluyen análisis filogenético a partir de secuencias de ADN hacen referencia al uso de marcadores moleculares específicos (fragmentos de ADN con una ubicación física identificable) como 1-alfa (*tef1*), calmodulina (*cal1*), endochitinasechi18-5, *rpb2*, *tact*, ITS (Inglis *et al.* 2020) ;Gu *et al.* 2020; Liu *et al.* 2020; Chen *et al.* 2021; Bustamante *et al.* 2021; Barrera *et al.* 2021; del Carmen *et al.* 2021; Azuddin *et al.* 2021; Mohiddin *et al.* 2021; Umar 2021).

## **2.6. EL PROTOCOLO COMPARACIÓN POR PARES**

Cai and Druzhinina (2021), refieren que, en los hongos, la delimitación de especies es subjetiva con mucha frecuencia, porque depende de la elección de un concepto de especie y de los posibles criterios acertados y seleccionados por un taxónomo. Contrario a esto, se espera que la identificación de especies de hongos sea lo más exacta y precisa posible porque debe predecir las propiedades que se requieren para las aplicaciones o que son relevantes en patología. Los hongos industriales y beneficiosos para las plantas del género *Trichoderma* (Hypocreales) otorgan un modelo adecuado para abordar esta colisión entre la delimitación de especies y la identificación de especies. Hace ya algunas décadas, la diversidad del género *Trichoderma*

estuvo delimitado a unas pocas docenas de especies. Sin embargo; la introducción de métodos evolutivos moleculares resultó en la expansión exponencial de la taxonomía de *Trichoderma*, con hasta 50 nuevas especies reconocidas por año. Estos autores revisan la taxonomía de todo el género de *Trichoderma* y compilado un inventario completo de todas las especies de *Trichoderma* y el material de código de barras de ADN depositado en bases de datos públicas (el inventario está disponible en el sitio web de la Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Trichoderma* ([www.Trichoderma.info](http://www.Trichoderma.info)) Entre las 375 especies con nombres válidos a julio de 2020, 361 (96 por ciento) se han reactivado de manera in vitro y ya posee código de barras de ADN. Es así que desarrollan un protocolo para la identificación molecular de *Trichoderma*, lo cual requiere el análisis de los tres códigos de barras de ADN (ITS, *tef1* y *rpb2*), y está respaldado por herramientas en línea que están disponibles en [www.trichokey.info](http://www.trichokey.info). Posteriormente, los autores utilizan todas las cepas de *Trichoderma* secuenciadas del genoma completo (WGS) que están disponibles en bases de datos públicas para proporcionar ejemplos prácticos versátiles de identificación molecular, revelar deficiencias y discutir posibles ambigüedades. Además, los autores brindan una discusión en profundidad de los conceptos de especies que se aplican en la taxonomía de *Trichoderma*, y concluyen que estos hongos se ajustan para la implementación de un enfoque polifásico que fue introducido por primera vez en la taxonomía de *Trichoderma* por John Bissett (1948–2020), cuyo trabajo fue motivo de inspiración de su estudio. Proponen además el regular y unificar las comisiones internacionales sobre la taxonomía de grupos de hongos particulares.

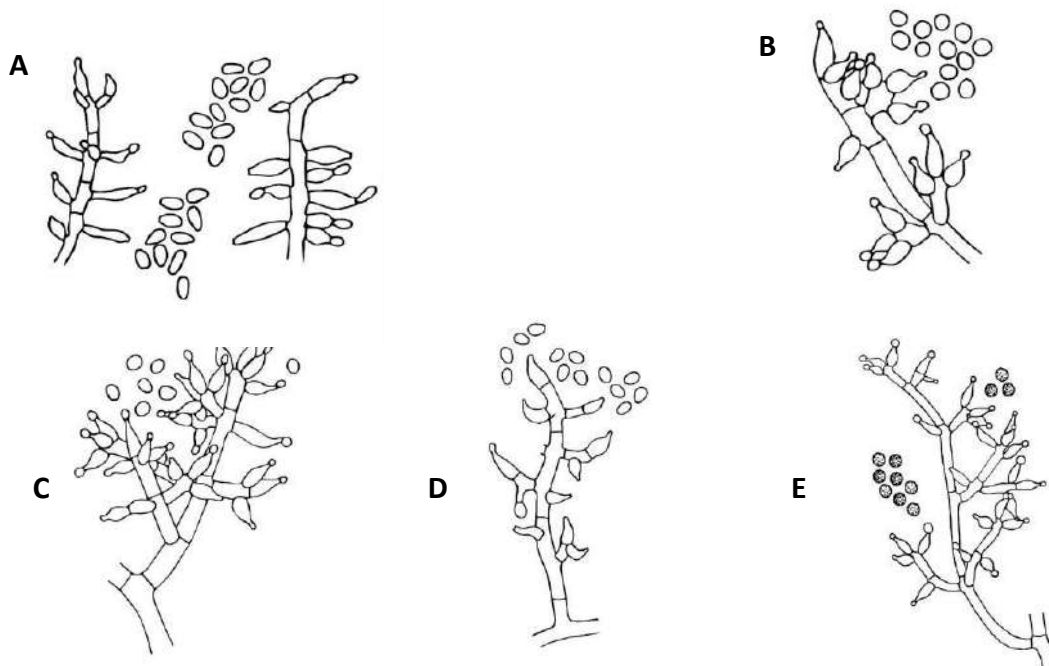
## **2.7. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA**

Las tasas de crecimiento, desarrollo de pústulas, la pigmentación y el olor son las características morfológicas típicas que puede presentar una especie del género *Trichoderma* (Gams and Bissett 2002). Por otro lado, se ha determinado que el crecimiento óptimo se produce entre 25 y 30°C. temperaturas de 35° a más podrían influir en la disminución y/o inhibición del crecimiento (Samuels *et al.* 2002); Sin embargo, existen especies que pueden crecer bien por sobre los 35°C, característica que puede ser utilizado para diferenciar especies, tal es el caso de *T. harzianum*, que tiene características morfológicas muy similares a *T. aggressivum* y *T. atroviride*, pero la diferencia es notable cuando se someten a temperaturas de crecimiento de 35°C, donde *T. harzianum*, crece con normalidad, no sucediendo lo mismo con *T. atroviride*,

por ejemplo (Samuels 2002). Cultivos en medio PDA, permite observar mejor la formación de micelio y su pigmentación, que pueden ser blancos y transparentes (CMD), además, se pueden observar conidios verdosos o amarillo verdosos, a veces, dando lugar a la formación de anillos concéntricos (Samuels *et al.* 2002). El reverso de la colonia puede presentar una pigmentación pálida, amarillenta, rojiza (Gams & Bissett 2002).

## 2.8. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Las especies del género *Trichoderma*, normalmente forman hifas vegetativas septadas, de paredes lisas y hialinas (Gams & Bissett 2002) y con conidióforos muy ramificados (Figura 2). Poseen células conidiógenas, que también se denominan fiálides, frecuentemente son ensanchadas en el centro (en forma de matraz) y pueden ser cilíndricas o subglobosas. Los conidióforos son irregulares, en pareja o aislados (Samuels *et al.* 2002). Los conidios son unicelulares, elipsoidales, generalmente verdes y a veces incoloros, marrones o de color gris. Tienen superficies lisas; sin embargo, se encuentran conidios rugosos en varias especies, por ejemplo, *T. viride* (Gams & Bissett 2002).



**Figura 2.** Morfología de especies de *Trichoderma*. A-D: A: *T. longibrachiatum*, B: *T. inhamatum*, C: *T. harzianum*, D: *T. reesei*; E: *T. viride*

**Fuente:** (Kubicek & Harman 2002)

Las clamidosporas juegan un papel importante en la supervivencia de las especies. Normalmente, poseen pared gruesa y células vegetativas ensanchadas con el citoplasma (Lin & Heitman 2005). Son unicelulares, globosos o subglobosos, y se producen dentro de las hifas o en las puntas de éstas. Normalmente son incoloras – hialinas, amarillentas o verdosas (Gary J. Samuels *et al.* 2002). Las clamidosporas cumplen una importante función como propágulos activos en muchas formulaciones biológicas, ofreciendo menos vulnerabilidad, mayor resistencia ambiental, mayor potencial de inóculo (comparados a los conidios) y una vida mas larga. En general, son incoloras, de color amarillo pálido o verdes (Samuels *et al.* 2002; Gams y Bissett 2002).

Las clamidosporas se producen profusamente en cultivos sumergidos en líquido y también son los propágulos activos en muchas formulaciones basadas en *Trichoderma*. La ventaja de estos propágulos es su menor vulnerabilidad a la fungistasis del suelo, resistencia al estrés ambiental, mayor potencial de inóculo en comparación con los conidios y una vida útil más larga (Papavizas 1985).

## **2.9. USOS DE *TRICHODERMA* EN LA AGRICULTURA**

### **2.9.1. Control biológico**

El control biológico se refiere al uso de organismos vivos para disminuir la densidad de población o los daños de una plaga específica, provocando menos abundancia o menos dañina (Eilenberg *et al.* 2001). Los mecanismos a través de los cuales los organismos pueden ejercer control de enfermedades podrían estar referidos a: antibiosis, parasitismo, competencia por recursos y resistencia inducida.

El control biológico se puede dividir aproximadamente en tres categorías algo superpuestas: control biológico inundativo, clásico y de conservación. El control biológico por inoculación es considerado por algunos como una cuarta categoría. El control biológico por inundación implica la inundación regular o el aumento de enemigos naturales nativos o endémicos del sitio de liberación (Evans 2003). Los sistemas inundados tienden a volver a su estado original (Ten Hoopen *et al.* 2003; Krauss *et al.* 2006), lo que limita la eficacia y la durabilidad del biocontrol.

Existen cuatro categorías de control biológico, a saber: control biológico inundativo, clásico, de conservación y el control biológico por inundación. El control biológico por inundación se refiere al incremento de enemigos naturales nativos o endémicos del sitio de liberación (Holmes *et al.* 2004), este tipo de control tiene una eficacia y durabilidad limitada debido a que los sistemas inundativos tienden a volver a su estado original (Ten Hoopen *et al.* 2003)

En un escenario global, que incluye un constante incremento de la población mundial y los daños producidos por el cambio climático, procurar una agricultura sustentable con altos rendimientos y de calidad requiere el uso de estrategias sostenibles y eficientes (Poveda 2021). El género *Trichoderma* es conocido hace mucho tiempo por su capacidad de acción como agentes de biocontrol contra diversos patógenos de las plantas, es muy beneficioso para la agricultura, propiedad que junto a la capacidad de producción de enzimas, se han convertido en el principal interés económico actual (Jangir *et al.* 2017).

Ya por la década de 1920, se conocía que los hongos del género *Trichoderma* tienen la capacidad para actuar como agentes de biocontrol sobre los fitopatógenos. *Trichoderma* spp. han desarrollado numerosos mecanismos de represión contra los hongos patógenos, también mejoran simultáneamente el crecimiento de las plantas y las raíces. Algunos de los mecanismos son la competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, producción de sustancias inhibitoras y resistencia inducida (Haran 1996; Lorito *et al.* 1996; Yedidia *et al.* 2000)

## **2.9.2. Mecanismos de acción de *Trichoderma***

### **a. Competencia**

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este, por uno de los organismos, reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Infante *et al.* 2009).

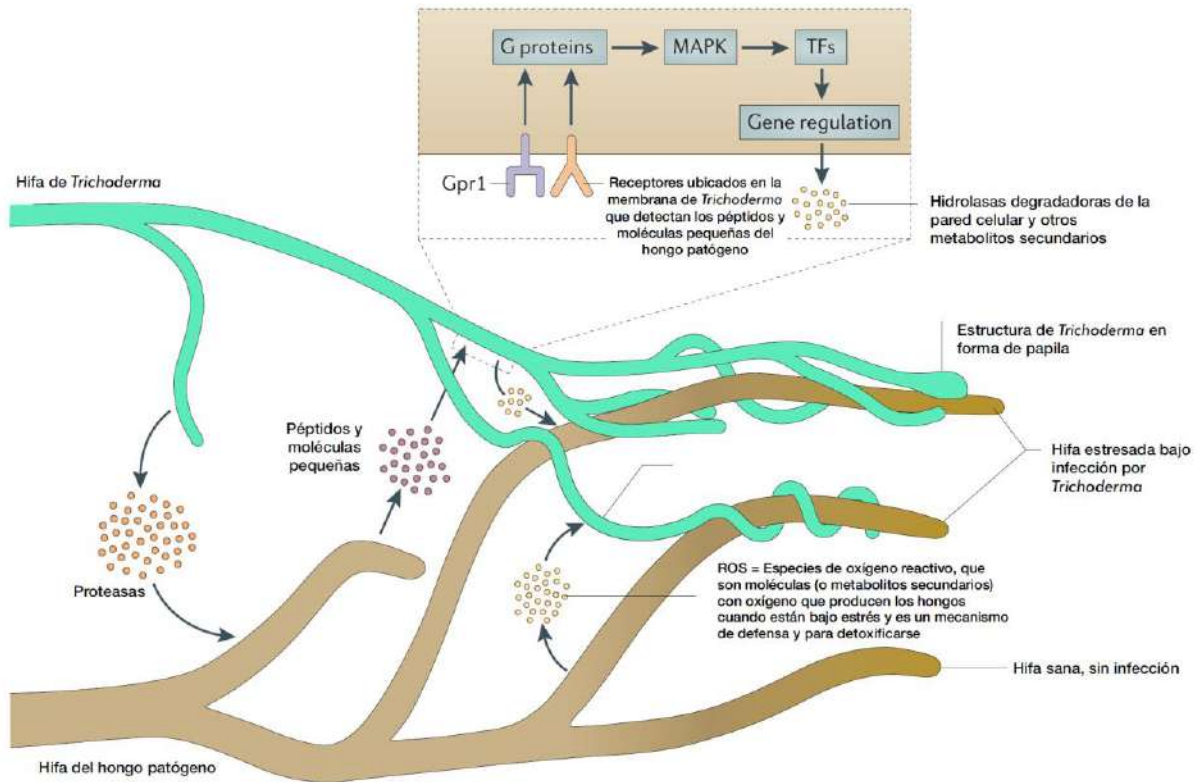


## **b. Micoparasitismo**

El proceso de micoparasitismo es complejo: sucede que cuando las cepas de *Trichoderma* detectan otros hongos, se inicia un proceso de crecimiento hacia ellas; antes del contacto ya se producen endoquitinasas fungitóxicas (Zeilinger *et al.* 2003). Cuando los hongos ya entran en contacto, *Trichoderma* es capaz de adherirse al huésped y puede enrollarse alrededor de él, formando apresores en la superficie del huésped. El contacto permite que *Trichoderma* llegue a producir enzimas fungitóxicas que degradan la pared celular, se producen también antibióticos peptaibol (Schirmböck *et al.* 1994). las acciones combinadas de estos compuestos dan como resultado el micoparasitismo del hongo objetivo (disolución de las paredes celulares). Los apresorios, pueden producir agujeros en el hongo objetivo, produciéndose invasión o entrada directa de las hifas de *Trichoderma*.

## **c. Antibiosis**

Los metabolitos con actividad antifúngica, secretados por *Trichoderma*, constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diverso en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben a otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico; y estas sustancias inhibitorias son consideradas «antibióticos». La capacidad de una cepa de *Trichoderma* de secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos, aspecto relevante desde el punto de vista práctico. Lo anterior resalta la importancia de la antibiosis como parte de la actividad antagonista de *Trichoderma* (Mont 2002).



**Figura 3. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. dentro de la comunidad del suelo. *Trichoderma* sp, reconoce un hongo fitopatógeno a partir de pequeñas moléculas que éste libera, una molécula puede ser péptidos liberadas por acción de proteasas secretadas por *Trichoderma* spp. antes del contacto**

**Fuente: (Druzhinina et al. 2011)**

#### **d. Antagonismo potencial**

El fenómeno de antagonismos involucra diversas relaciones de orden ecológico como la antibiosis y la competencia y de orden simbiótico como la explotación o parasitismo. Los antagonistas pueden hacerse presentes produciendo metabolitos antibióticos, o enzimas que degradan la pared celular. Sin embargo, el éxito de los antagonistas en la planta puede también ser gobernada por su capacidad de colonizar y utilizar los sustratos en la superficie de la planta, permitiendo que compita efectivamente con los patógenos (Mont 2002).

Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permitan ejercer su efecto biorregulador. Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico (Infante *et al.* 2009).

#### **e. Resistencia inducida**

Los hongos del género *Trichoderma*, son capaces de interactuar con las raíces de las plantas, induciendo a cambios metabólicos que aumentan la resistencia a diversos microorganismos fitopatógenos (Harman *et al.* 2004). Una variedad de compuestos son producidos por las cepas de *Trichoderma*, lo que es beneficioso para muchas especies de plantas (no se produce patogenicidad de *Trichoderma* a la planta); estos compuestos son péptidos, proteínas y otras sustancias de bajo peso molecular (Yedidia *et al.* 2000), cabe resaltar que esta sinergia microorganismo-raíz ha originado cambios sustanciales en el proteoma y el metabolismo de la planta (Sharon *et al.* 2011).

#### **2.9.3. El uso de *Trichoderma* y la agricultura sustentable**

La agricultura sustentable es aquella que, a largo plazo, contribuye la calidad del medio ambiente y los recursos básicos de los cuales ésta depende; provee alimentos y fibras que los humanos necesitan; es económicamente viable y mejora la calidad de vida de los agricultores y sociedad en su conjunto (American Society of Agronomy 1987). Otros conceptos hacen referencia a la capacidad de un agroecosistema para mantener la calidad y cantidad de los recursos naturales a mediano y largo plazo, vinculando la productividad y la reducción del impacto ambiental y atendiendo a las necesidades sociales y económicas de las comunidades rurales (FAO 1989).

Finalmente, la agricultura sustentable debe cumplir algunos requisitos como: i) Ser adecuadamente productiva, económicamente viable, ecológicamente adecuada, con aceptación social y cultural; requisitos que se ajustan al modelo y/o herramienta de control biológico de

plagas, la misma que se enfoca en los principios de sostenibilidad de la agricultura (Sarandón 2002).

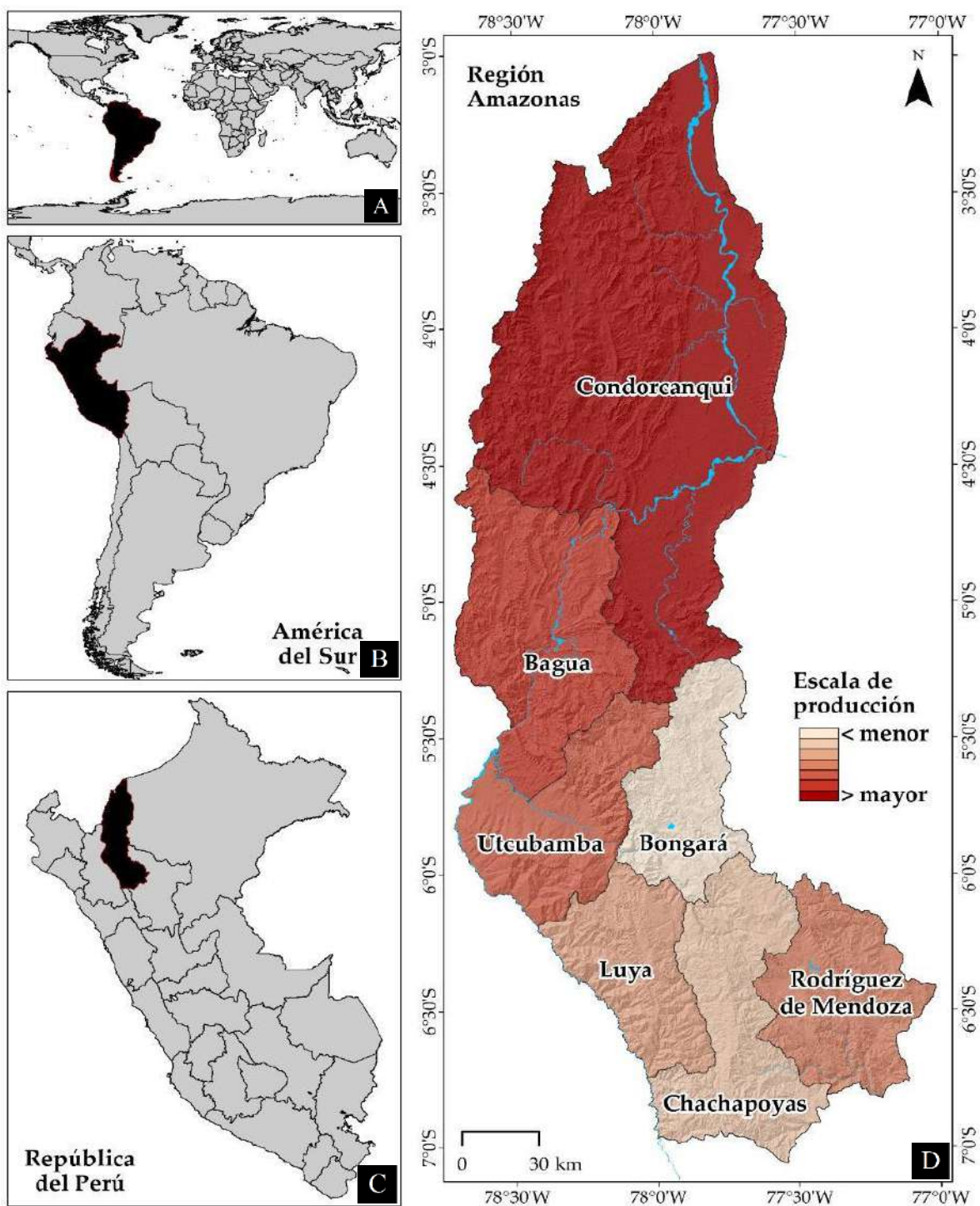
Uno de los principales motivos que impulsan las investigaciones en procesos de biocontrol con *Trichoderma* es la sustentabilidad. Varias especies de este género poseen un elevado potencial para llegar a convertirse en biofungicidas comerciales; sin embargo, resulta ser todo un reto en este campo de la investigación, el desarrollar técnicas fiables que permitan lograr una eficiente herramienta de biocontrol de las enfermedades de las plantas. Es preciso señalar que está pendiente investigar, los efectos ecológicos de la aplicación de una sola especie (o pocas especies) de hongos en la agricultura, tal que garantice un efecto realmente beneficioso para el medio ambiente (Schmoll & Schuster 2010).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El estudio se desarrolló durante los años 2019, 2020 y 2021, tuvo como ámbito de acción a la región Amazonas, Perú. Situada en la zona Nor occidental del Perú, ubicada entre la cordillera de los andes y la llanura de la Amazonía (IIAP 2011). Posee una superficie de 39,249.13 Km<sup>2</sup> (3.5 por ciento del territorio nacional). La investigación se desarrolló en tres etapas relacionadas entre sí. En la etapa I (Diversidad genética de *Trichoderma* en el agroecosistema de cacao nativo), en la que se incluyeron como zonas de muestreo a los distritos y/o localidades representativas de la producción de cacao de las siete provincias de la región (muestreo proporcional con representación de todas las localidades productivas de cacao de Amazonas) a saber: Condorcanqui (Nieva, Río Santiago, Cenepa), Bagua (La Peca, Copallín, Aramango, Imaza, El Milagro, Bagua), Utcubamba (Bagua Grande, Cajaruro, Cumba, Yamón, Jamalca), Chachapoyas (Balsas), Rodríguez de Mendoza (Zarumilla), Luya (Pisuquia, Cocabamba) y Bongará (Jazán). En la Etapa II (Biocontrol *in-vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre la MC) tuvo como lugar de ejecución al Laboratorio de Sanidad Vegetal LABISANV, de la universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas UNTRM. Finalmente, la etapa III (Potencial de biocontrol *in-vivo* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre la MC), tuvo como lugar de ejecución, la provincia de Utcubamba, localidades de Quebrada Seca (442 m.s.n.m) y Llunchicate (965 m.s.n.m), distritos de Bagua Grande y Cajaruro, respectivamente (Figura 4).

Amazonas es una región productora de cacao nativo fino de aroma, ello se debe a que posee clima y suelo adecuado para tal fin, su variabilidad de climas y su ubicación geográfica es estratégica para la producción de cultivos tropicales. En el Cuadro 1, se hace referencia a los niveles promedio de temperatura y demás variables climatológicas.



**Figura 4. Mapa de ubicación y ámbito de estudio. A: Color negro corresponde a América del Sur en el mundo.; B: Perú en América del Sur.; C: Región Amazonas en el Perú.; D: Ubicación geográfica de la Región Amazonas, Escala gráfica de mayor (rojo intenso) a menor área de cultivo de cacao instalada**

**Cuadro 1. Ubicación geográfica y variables climatológicas de zonas referenciales de siete provincias de la Región Amazonas, Perú, ámbito de acción del estudio: Diversidad genética de *Trichoderma* como agente biocontrolador de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) para la producción sostenible del cacao nativo**

Provincia	Distrito	Poblado referencial	Precipitación (mm)	Temp. media (°C)	Temp. Máx (°C)	Coordenadas WGS1984		Altitud (msnm)
						Este (°)	Norte (°)	
Bagua	La Peca	La Peca	1130.0	26.5	38.5	-78.533159	-5.638031	437.0
Utcubamba	Cajaruro	Llunchicate	950.0	24.5	37.8	-78.426446	-5.761745	459.0
Rodríguez de Mendoza	Chirimoto	Zarumilla	1580.0	19.7	33.5	-77.4872	-6.52861	1150.0
Bongará	Jumbilla	Jazán	1250.0	19.0	28.0	-77.787412	-5.908199	2018.0
Luya	Luya	Pisuquia	880.0	19.5	28.0	-77.952561	-6.136144	1900.0
Chachapoyas	Balsas	Hornopampa	912.0	23.0	36.0	-78.018312	-6.83556	854.0
Condorcanqui	Nieva	Nieva	2198.0	26.6	38.6	-77.871475	-4.596296	243.0

Amazonas es una región peruana que tiene al cacao como el segundo cultivo perenne de mayor importancia económica, posee una superficie cultivada de 13.416,83 ha, lo que equivale al 5,3 por ciento de la superficie agrícola Nacional (INEI 2013); por otro lado, el cacao es un cultivo de climas tropicales que requiere niveles de precipitación entre 1600 y 2500 mm al año, con temperaturas entre 23 – 32 °C, con un nivel óptimo de 25 °C; estas condiciones de clima están presentes en las provincias de Condorcanqui, Bagua y Utcubamba que en definitiva, favorecen las condiciones de este cultivo (Paredes 2003). Se sabe además que las provincias más representativas en producción de cacao refiere a Bagua, con el 75 por ciento de su producción corresponde a la variedad CCN-51, un 22.5 por ciento es criollo y un restante 2.5 por ciento está representada por la variedad ICS95; Utcubamba, sin embargo un 22,8 por ciento del área de cultivo corresponde a la variedad CCN-51 y un 77,2 por ciento a cacao Criollo, tendencia que se mantiene en la provincia de Condorcanqui, donde el CCN-51 está presente en un 21,7 por ciento del total del área cultivada y un 78.3 por ciento para el cacao criollo (Torres & González 2018); por otro lado, en las provincias como Luya, Chachapoyas, Rodríguez de Mendoza y Bongará, existen pequeños espacios geográficos con condiciones de clima y suelo adecuados para la producción de cacao, aunque con áreas de cultivo muy disminuidas (INEI 2013).

## **3.2. MÉTODOS**

La presente investigación está dividida en tres etapas, según las cuales, para su mejor comprensión metodológica se detallan a continuación:

### **3.2.1. Etapa I: Diversidad genética de *Trichoderma* en el agroecosistema de cacao nativo región Amazonas –Perú**

#### **a. Recolección de muestras de suelo**

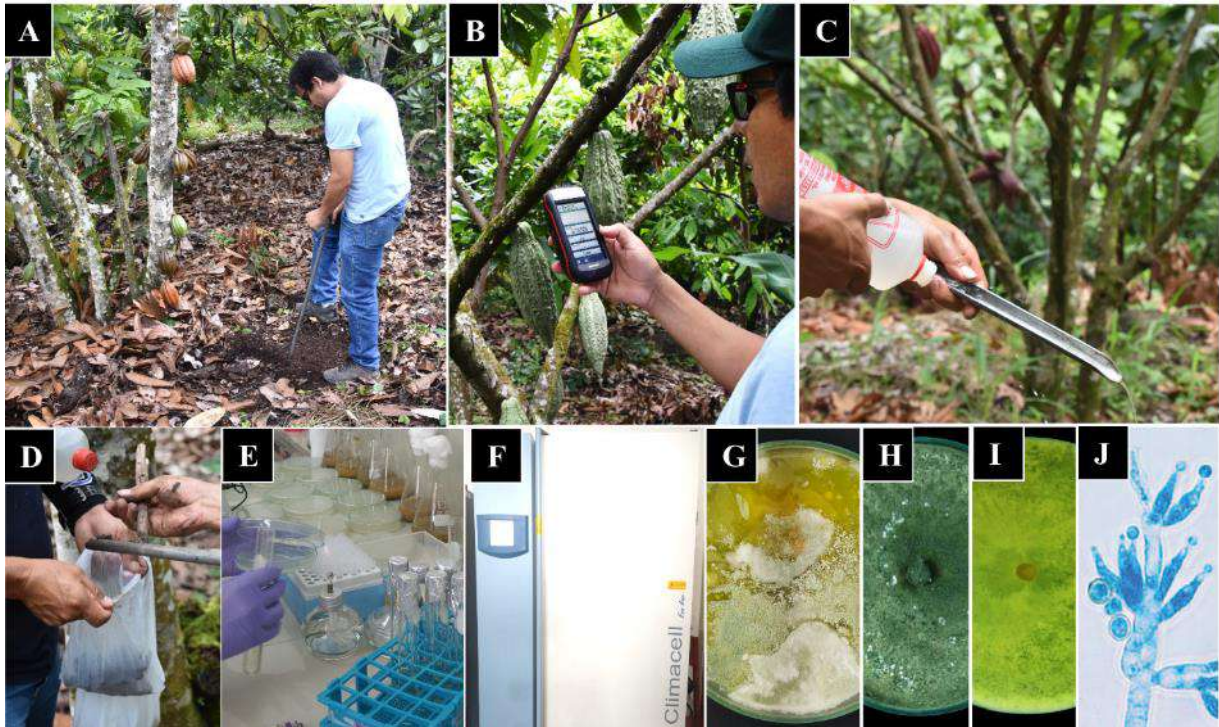
La recolección de muestras tuvo lugar entre marzo y agosto de 2019. Se recolectaron muestras de suelo de un total de 127 parcelas de cacao nativo fino de aroma CNFA, las que corresponden a un total de 17 distritos y cinco provincias de la región Amazonas, Perú. Se utilizó un tubo barreno muestreador de acero inoxidable de 1.20 m de longitud y de 1.5 pulgadas de diámetro con una punta bisel de 0.4 m (Figura 5). A una distancia de un metro del tallo de plantas de cacao en estado productivo y sin síntomas de moniliasis, previa desinfestación del barreno (alcohol al 96 por ciento) se tomaron 300 cm<sup>3</sup> de suelo, introduciendo el barreno a una profundidad de 15 a 20 cm, aproximadamente; tras lo cual, la muestra fue colocada en bolsas de polietileno de primer uso, con cierre hermético; una vez que las bolsas contenían al suelo, se selló la bolsa previa presión y eliminación de aire, en lo posible. Se registró las coordenadas UTM, así como algunas observaciones encontradas en cada lugar de colección. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (En el tiempo más corto posible), en donde se mantuvieron a 7°C, por un tiempo máximo de 72 horas, hasta su respectivo tratamiento.

#### **b. Aislamiento de hongos del suelo**

El proceso de aislamientos de los hongos a partir de las muestras de suelo, se realizó siguiendo la metodología de Chaverri & Samuels (2003) y Atanasova *et al.* (2010). Para lo cual, en un inicio, se colocó 10 g de suelo en 100 mL de agua esterilizada contenida en un matraz de 250mL el mismo que fue sometido a agitación a 300 rpm durante 1 hora, seguidamente, esta suspensión se diluyó 10 veces (100 uL de suspensión sobre 900 uL de agua destilada estéril). Se trabajaron con diluciones en serie, hasta 10<sup>-5</sup> mg/mL; Además, se extendieron alícuotas de 100 uL de las diluciones de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup> sobre la superficie del medio PDA contenido en las placas Petri, las



siembras se incubaron a 28°C en oscuridad y por 48 horas. Se identificaron y seleccionaron las colonias que crecieron en la superficie del agar, considerando morfología macroscópica (pigmentación de placa, coloración de la colonia, principalmente), características que nos permitieron sospechar de la presencia de *Trichoderma*. Las colonias seleccionadas se llevaron a nuevas placas Petri conteniendo medio de cultivo PDA, para obtener un cultivo monospórico (Cai & Druzhinina 2021).



**Figura 5. A: Recolección de muestras de suelo; B: Georreferenciación; C: Desinfección de barreno; D: Muestra de suelo en bolsa; E: Tratamiento de muestra; F: Incubación de dilución – alícuota; G: Microorganismos de muestra de suelo desarrolladas en placa.; H: Anverso de colonia de *Trichoderma*; I: Reverso de colonia; J: Fiálides típicas del género *Trichoderma***

### **c. Conservación de las cepas de *Trichoderma***

Las colonias con características morfológicas muy semejantes al género *Trichoderma*, se sometieron a conservación, para lo cual, se utilizaron tubos de 20 mL con PDA a 4°C para su conservación a corto plazo. Para su conservación a largo plazo, Se colocó sobre la superficie de medio de cultivo PDA contenido en placas, colonias de siete días de edad, una solución de

glicerol al 20 por ciento, se raspó la superficie de la colonia y posteriormente se filtró el tejido por lana de vidrio (Leiva *et al.* 2021). La suspensión obtenida por cada muestra, se mantuvo en tubos de crio conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , además; muestras tipo también fueron liofilizadas para su conservación (Ryan & Smith 2012). Los especímenes tratados y preparados para su conservación se depositaron en la micoteca del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

#### **d. Identificación molecular de especies del género *Trichoderma***

##### **- Extracción de ADN, PCR y secuenciación**

Para realizar la extracción de ADN, cada aislamiento se cultivó en placas Petri de 9 cm de diámetro conteniendo papa dextrosa agar (PDB; Difco; Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts); con ayuda de una cámara bioclimática marca Climacell EVO, las siembras se sometieron a incubación durante 48 a 72 horas a  $28^{\circ}\text{C}$  en un fotoperiodo de 12 h de luz fluorescente blanca. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar, y con un asa de Kolle (asa bacteriológica), el micelio de cada aislamiento se colocó en tubos de micro centrifuga de 1,5 ml. De esta manera, la muestra queda lista para iniciar con el proceso de extracción de ADN, para lo cual se utilizó el kit NucleoSpin Microbial DNA (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las siguientes instrucciones:

Se agregó 40  $\mu\text{L}$  del Buffer MG y 10  $\mu\text{L}$  de Liquid proteinase K a cada muestra. Se cerró los tubos y agitó durante 4 a 10 minutos, las muestras se incubaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, para luego someterlas a centrifugación a 11.000 rpm x 30 s.

Luego se agregó 600  $\mu\text{L}$  de Buffer MG y mezcló bien (Vortex por 3 s) y se centrifugó durante 30 s a 11, 000 rpm.

Posteriormente, se colocó el sobrenadante a una columna NucleoSpin Microbial DNA en un nuevo tubo de recolección (2mL), y se agregó un máximo de 500-600  $\mu\text{L}$  de la muestra y posteriormente se centrifugó durante medio minuto a 11, 000 rpm y se desechó el sobrenadante. Aquí se realizaron los siguientes lavados:

*Primer Lavado:* Se agregó 500  $\mu\text{L}$  Buffer BW a la NucleoSpin Microbial DNA Columna, y centrifugó durante 30 s a 11, 000 rpm y desechó el sobrenadante.

*Segundo lavado:* Se agregó 500  $\mu$ L Buffer B5 a la NucleoSpin Microbial DNA Columna y centrifugó durante 30 s a 11, 000 rpm y desechó el sobrenadante.

*Elución:* Se colocó la columna NucleoSpin Microbial DNA en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 mL. en la que se agregó 50  $\mu$ L de Buffer PE (65°C), incubando la columna durante cinco minutos a 65°C. y centrifugando durante 1 minuto a 11, 000 rpm para eludir (lavar para limpiar) el ADN. Se repitió este paso.

El rendimiento de ADN se cuantificó, colocando 1  $\mu$ L de muestra, en un espectrofotómetro (EPPENDORF BioSpectrometer kinetic, Alemania). Por otro lado, la amplificación de porciones de los marcadores *tef1* (EF1: ATGGGTAAGGARGACAAGAC, EF2: GGARGTACCAGTSATCATGTT), *rpb2* (fRPB2-5f: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG, fRPB2-7CR: CCCATRGCTTGTYRCCCAT), ITS (ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG, ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC) y *act* (Tact1: TGGCACCACACCTTCTACAATGA, Tact2; TCTCCTTCTGCATACGGTCGGA), se realizaron usando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la reacción se utilizó una mezcla total de 10  $\mu$ L, que contenía cinco  $\mu$ L de 10 mM dNTP Master mix (mezcla que contiene la enzima Taq polimerasa, dNTPs y Mg+2); 2,6  $\mu$ L de agua destilada; 0,2  $\mu$ L de primers sentido y antisentido, y 2  $\mu$ L de ADN genómico, colocando luego en Termocycler (T100™ Thermal Cycler- Biorad, USA) usando los protocolos de los cebadores *Tef1* (Cai & Druzhinina 2021), ITS (ITS1F, ITS4) (Samuels *et al.* 2000); *rpb2* (Cai & Druzhinina 2021; P. Chaverri *et al.* 2003), *Act* (Samuels *et al.* 2006) (Cuadro 2).

Los productos amplificados se confirmaron visualmente mediante electroforesis en gel de agarosa, compuesta de 2  $\mu$ L de la solución de reacción en geles de agarosa al 1 por ciento en un tampón Tris-borato 0,045M y EDTA 0,001M. La electroforesis fue sometida a 100 voltios durante 20 minutos. Los geles fueron teñidos con 0,02  $\mu$ L/mL de SYBR® Safea DNA Gel Stain. Las bandas resultantes se dimensionaron con la escalera de 1 kb (0,5  $\mu$ g - 50  $\mu$ g) y fueron fotografiadas con el foto documentador (OMNIDOC Cleaver Scientific, Reino Unido). Finalmente, las reacciones amplificadas fueron secuenciadas comercialmente por Macrogen, Seúl - Corea del Sur.

**Cuadro 2. Condiciones de PCR para la amplificación de 4 códigos de barra de ADN**

		Marcadores para código de barras de ADN							
		ITS		rpb2		tef1		Tact	
Primers (5' - 3')		ITS 1F		fRPB2-5f		EF1		Tact 1	
		GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		GAYGAYMGWGATCAYTTYGG		ATGGGTAAGGARGACAAGAC		TGGCACCACACCTTCTACAATGA	
		ITS 4		fRPB2-7cr		EF2		Tact 2	
		TCCTCCGCCTTATGATATGC		CCCATRGCTTGYYRCCCAT		GGARGTACCAGTSATCATGTT		TCTCCTTCTGCATACGGTCGG	
Receta para PCR (µL)									
Template DNA 100 ng		2		2		2		2	
Master Mix		5		5		5		5	
Forward primer, 100µM		0.2		0.2		0.2		0.2	
Reverse primer, 100µM		0.2		0.2		0.2		0.2	
ddH2O		2.6		2.6		2.6		2.6	
Protocolo PCR		T°, °C	Tiempo	T°, °C	Tiempo	T°, °C	Tiempo	T°, °C	Tiempo
Pre - desnaturalización		94	5	94	3	94	5	94	3
35 ciclos	Desnaturalización	94	30"	94	1	94	30"	94	1
	Anidng	50	45"	57	1	50	30"	57	1
	Extensión	72	1	72	1	72	1	72	1
Extension Final		72	7	72	7	72	7	72	2

### e. Identificación de especies

#### - Protocolo de identificación molecular para un único aislado de *Trichoderma*

Para la identificación molecular de especies del género *Trichoderma*, se utilizó el protocolo de comparación por pares (Cai & Druzhinina 2021) el mismo que permite 1) identificar el género *Trichoderma*, 2) identificar especies de *Trichoderma* y 3) verificar la ambigüedad de la identificación. En el procedimiento protocolar, se incluyen como patrones/types de comparación a todas las especies que existen y se identificaron al mes de julio del 2020.

La metodología refiere que para lograr la identificación de la especie de interés, se deben cumplir dos condiciones: 1) Se puede identificar una especie del género *Trichoderma* si su secuencia ITS alcanza un valor de similitud mayor o igual  $\geq$  a 76 por ciento con las secuencias de cepas de referencia (types) más estrechamente relacionadas (secuencias del conjunto de datos en Anexo 1), y 2) la especie del género *Trichoderma* queda identificada si los marcadores de código de barras de ADN *tef1* y *rpb2* son similares a la secuencias de las cepas de referencia, cumpliéndose la siguiente condición:  $rpb2 \geq 99$  por ciento y  $tef1 \geq 97$  por ciento. Entonces, las especies identificadas deberán cumplir el siguiente estándar de secuencia:

*Trichoderma* [ITS<sub>76</sub>] ~ sp ∃! ( $rpb2_{99} \cong tef1_{97}$ ),

#### Donde:

*Trichoderma* es la especie de *Trichoderma* identificada, *Sp* es la especie, “~” indica una concordancia entre ITS y otros loci, “ $\cong$ ” se refiere a la concordancia entre *rpb2* y *tef1*, ∃! Referido a la existencia de las

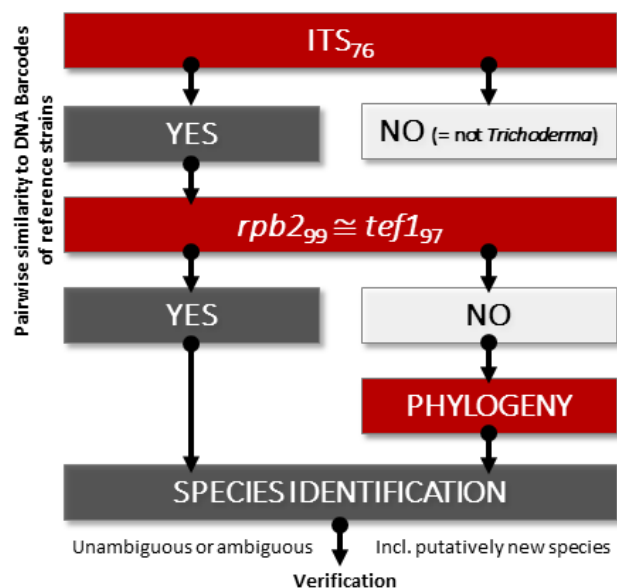
condiciones. Los sub índices indican el valor porcentual mínimo de la similitud que debe alcanzarse por cada marcador.

*En este contexto, el proceso de identificación se realizó de la siguiente manera:*

Una vez que se obtuvieron las secuencias de cada una de las cepas de interés, éstas se limpiaron con el software Sequencher 4.0, posteriormente, se inició a trabajar con las secuencias ITS, para lo cual, cada una de las secuencias de las cepas de interés son sometidas al BLAST del NCBI donde se hace la búsqueda y ubicación del valor porcentual de similitud de la cepa e referencia (type) (Anexo 5), la consulta para cada cepa fue efectuada por separado; los resultados del porcentaje de similitud y su par más cercano (type específico) fueron anotados en una hoja excel en la cual se muestra la condicionante de cumplimiento o no de la **primera condición**: Cuando la similitud fue mayor o igual a  $\geq 76$  por ciento, se concluyó que la cepa de consulta pertenece al género *Trichoderma* spp. Lo contrario indicó que no correspondía (Figura 6).

Posteriormente se continuó con el proceso de identificación de cada aislado (este paso estuvo sujeto al cumplimiento de la primera condición). Los genes *rpb2* y *tef1* fueron alineados y recortados manualmente con ayuda del Software Mega X (alineación ClustalW) (Kopchinskiy *et al.* 2005; Larsson 2014) con secuencias de especies representativas de ocho clados infragenéricos basados en *rpb2* y *tef1*, estadísticamente respaldados por antecedentes y taxonomía de *Trichoderma* (Atanasova *et al.* 2010). Posteriormente, las secuencias cortadas fueron colocadas al software editor de notas “sublime” y guardadas en archivo formato fasta. Seguidamente, cada una de las secuencias cortadas (*rpb2* y *tef1*) fueron sometidas a Blast del NCBI a fin de establecer el cálculo las similitudes por pares entre la cepa de consulta y las secuencias de cepas de referencia estrechamente relacionadas (Anexo 1); en este caso, cuando se cumplió la condición  $\exists !(rpb2\ 99 \cong\ tef1\ 97)$ , se registró los nombres de las cepas identificadas y continuó con el siguiente paso. Por otro lado, cuando la condición no se cumplió, se realizó un análisis filogenético para *rpb2* y *tef1* por separado (se registraron las cepas con secuencias cortas o faltantes) a fin de no ser consideradas en el análisis; en esta etapa, se realizó el método de análisis de máxima verosimilitud o bayesiano. Dichos análisis fueron realizados con ayuda de la aplicación en línea CIPRES SCIENCE GATEWAY y los árboles filogenéticos se visualizaron en el software Figtree. Cabe indicar que en cada árbol se incluyeron además de las secuencias de las cepas de consulta, las secuencias de las cepas de referencia más similares.

En este paso, además de las cepas de consulta que no cumplieron la segunda condición, se incluyeron aquellas cuyos resultados fueron ambiguos. El diagrama para la identificación molecular de *Trichoderma*, basado en tres secuencias de código de barras de ADN se presenta en la Figura 6.



**Figura 6. Identificación de similitud por pares, basado en tres secuencias de ADN**

**Fuente: (Cai & Druzhinina 2021)**

En el presente estudio, además de la filogenia individual propuesta en el protocolo de comparación de similitud por pares, se consideró incluir al marcador act actina (*tac1*, *tac2*) como un tercer marcador adicional a *tef1* y *rpb2* e ITS.

#### **f. Validación de la identificación molecular**

Los resultados, fueron validados, en base al cumplimiento de los siguientes criterios:

La cepa de consulta pertenece al género *Trichoderma*, siempre y cuando cumplió con el estándar *Trichoderma* [ITS<sub>76</sub>].

Cuando la cepa de consulta tuvo secuencias de *rpb2* y *tef1* que no cumplieron con el estándar  $\exists!$  ( $rpb2\ 99 \cong tef1\ 97$ ) entonces fue considerada como especie no conocida debido a la menor similitud de uno o ambos loci.

Las especies que están estrechamente relacionadas, tienen conjuntos completos de códigos de barras de ADN de referencia. La hipótesis de la nueva especie estuvo respaldada por la tipología de ambos filogramas (*rpb2* y *tef1*) y no se contradice con otros marcadores.

Entre tanto se cumplan con las condiciones expuestas; entonces, si se cumplen las condiciones, la hipótesis de la nueva especie fue inequívoca, precisa y exacta (Cai & Druzhinina 2021). Los resultados se registraron “T. sp. cepa ID”. Finalmente, se consideró como identificación ambigua, i) cuando la atribución de la cepa consultada al género *Trichoderma* no cumplía con el estándar *Trichoderma* [ITS<sub>76</sub>], (similitud <70 por ciento), ii) cuando las secuencias estaban incompletas (código de barras incompletos o muy cortos), y/o la calidad de las secuencias no satisfactorias y iii) cuando la identificación de una nueva especie no estuvo respaldada por la topología de ambos filogramas (*rpb2* y *tef1*) o se contradecía con otros marcadores (act).

#### **g. Identificación morfológica de especies del género *Trichoderma***

Todas las colonias aisladas a partir de cultivo monospórico, se cultivaron en medio papa dextrosa agar PDA, y fueron sometidos a incubación a 28°C en una cámara bioclimática Climacell Evo a 12 horas luz fluorescente blanca y 12 horas oscuridad, durante 3 a 4 días (Chaverri & Samuels 2003). Se identificaron características macroscópicas como coloración de la colonia y pigmentación en placa, así como características microscópicas como la morfología de conidios, y fiálides, principalmente. Para las observaciones microscópicas se realizaron microcultivos en medio PDA en portaobjeto de vidrio, complementándose con ácido láctico y azul de metileno para los montajes. Además, se realizaron mediciones de conidios, conidióforos y fiálides. Las características macroscópicas y microscópicas se observaron con ayuda de un microscopio Olympus IX83; Tokio, Japón con software Aview 2.8; dichas características fueron identificadas utilizando los códigos morfológicos específicos (Chaverri *et al.* 2003; Chaverri *et al.* 2015; Jang *et al.* 2017; Kubicek & Harman 2002).

#### **h. Estimación de índices de diversidad y análisis ecológico**

Una vez realizada y confirmada la identificación de las especies del género *Trichoderma*, se analizaron variables de diversidad como: La riqueza específica, así como la abundancia de las especies; para ello, se utilizó el índice de diversidad de Margalef ( $D_{Mg}$ ); se determinó la riqueza

específica en tres estratos productivos de cacao (1 estrato: 200-450 msnm, 2 estrato: 400-800 msnm y 3 estrato: >800 msnm).

$D_{Mg} = (S-1)/\log N$ ; N= total de individuos, S = número de especies. Posteriormente, a partir del número total de especies identificadas, se estimó la abundancia de especies, para lo cual se utilizó el índice de diversidad Shannon –Wiener ( $H'$ ) (Torres-De La Cruz *et al.* 2015; Magurran 1991).  $H' = -\sum p_i (\log p_i)$ ; donde  $p_i$  es el total de individuos que es representada por la especie  $i$ . Además, se comparó la composición de las comunidades de *Trichoderma* entre los estratos o pisos altitudinales a partir de la estimación del índice de similitud de Sorensen (ISS) (Mueller-Dombois, 1981).  $ISS = [(2C)/(A+B * 100)]$ ; donde C es el número de especies en las muestras. Finalmente, se calculó la frecuencia de constancia (FC) (Heredia 1999), lo que permitió conocer la presencia de las especies en cada estrato o zona muestreada.

### **3.2.2. Etapa II: Biocontrol *in-vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre la moniliasis del cacao Amazonas, Perú**

En esta etapa de la investigación se evalúa el potencial de control biológico *in vitro* de cada una de las cepas de *Trichoderma* presentes en el Agroecosistema de CNFA, Amazonas Perú. Para lo cual, se realizó la siguiente metodología:

#### **a. Adquisición del antagonista, los aislamientos nativos de *Trichoderma spp.***

Se evaluaron un total de 234 nuevos aislamientos de hongos pertenecientes a 19 especies y 21 grupos del género *Trichoderma* (identificados en presente estudio). Estos aislamientos fueron recuperados del suelo de la rizósfera de *Teobroma cacao* de plantaciones cultivadas de cacao nativo fino de aroma CNFA de las provincias de Condorcanqui, Bagua, Utcubamba, Chachapoyas, Luya y Rodríguez de Mendoza en la región Amazonas al norte de Perú (Cuadro 3, Anexo 6, 7). Recalamos que los aislamientos forman parte del primer componente del presente estudio; además, que la totalidad de cepas fueron aisladas utilizando la técnica de dilución (Nelson *et al.* 1983), luego se obtuvieron cultivos mono-espóricos de cada colonia identificada (Estrada *et al.* 1997). Cada aislamiento fue molecular y morfológicamente identificado, conservado, y actualmente forman parte de la micoteca del laboratorio de Sanidad



Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (LABISANV-UNTRM).

**Cuadro 3. Tratamientos para el potencial de biocontrol de aislamientos nativos de 19 especies y 234 aislamiento de *Trichoderma* (tratamientos) evaluados contra *Moniliophthora roreri* en Amazonas Perú**

Grupo/taxa	Aislados	N° aislados
1	UYF1_C1, UCPF4_C3, UCPF2_C3, UCMF21_M2, UCF21_M1, UCF20_M3, UCF20_M1, UCF19_M4, UCF16_M1, UCF13_M4, UCF12_M3, UCF10_M5, UCF10_M1, UCF5_M5, UCF5_M4, UCF1_M4, IP3M4_C2, IP3M4_C1, IP3M3_C2, IP3M3_C1, IP3M1_C3, IP3M1_C2, F21M4, F21M3, F21M2, F21M1, F20M5, F20M4, F20M3, F20M2, F20M1, F19M4, F19M1, F18M5, F18M4, F18M1, F16M3, F16M1, F15M5, F14M5, F14M4, F13M4, F12M4, F12M3, F12M1, F10M5, F10M2, F10M1, F7M3, F5M5, F5M3, F5M3, F3M5, F3M4, F1M4, F1M2, CNF12_C1, CNF10_C1, BIF28_C2, BIF28_C1, BIF22_C2, BIF20_C1, BIF17_C2, BIF16_C1, BIF14_C1, BIF13_C2, BIF12_C2, BIF11_C4, BIF2_C5, BIF2_C4, AP2M2_C1,	69
2	UJF2_C2, UJF2_C1, UCMF2_C4, UCF18_M3, UCF17_M1, UCF7_M4, F9M4, F9M3, CRSF6_C2, CRSF3_C2, CRSF1_C2, CRSF1_C5, CNF16_C1, CNF15_C4, CNF7_C3, CNF7_C1, CNF4_C2, CNF4_C1, CNF3_C1, CNF1_C2, CNF1_C1, CMF1_C1, CCF5_C5, CCF5_C2, BMF19_C4, BMF15_C5, BMF1_C1, BIF27_C1, BIF20_C2, BIF4_C2, BIF1_C2, BBF4_C4, BBF4_C2, BIF13_C1	33
3	UCPF2_C1, UCM2_C1, UCF7_M2, F7M2, CTN3_C1, CRSF2_C3, CRSF1_C4, CRSF1_C3, CNF20_C1, CNF8_C1, CNF5_C1, CCF6_C1, CCF3_C1, CB04_C2, CB04_C1, BPF3_C1, BIF15_C1, BIF8_C2, BIF5_C4, BIF4_C1, BIF3_C2, BIF3_C1, BIF2_C3	22
4	UCPF4_C2, UCPF1_C1, UCMF3_C1, UCF21_C1, UCF17_M4, UCF14_C1, UCF10A_C1, UCF7_M5, UCF5A_C2, UCF5A_C1, UBGf1_C1, F21M5, F18M2, F17M4, F14M3, F1M3, BIF7_C3, BBF3_C1, UCMF2_C3, CPF3_C1	20
5	UCF5_M1, IP3M2_C4, IP3M2_C3, F5M4, CNF21_C2, CNF12_C2, BLPF2_C2, BIF25_M2, BIF12_C1, BIF11_C2, BIF11_C1, BIF10_C2, BIF1_C4, AP1M5_C1, AP1M4_C1, UCF3_M5	16
6	UJF3_C4, UJF3_C2, UCF19A_C2, UCF19A_C1, UCF18A_C3, UCF18A_C1, UCF1A_C2, CRSF1_C1, CNF16_C2, BMF19_C2, BMF18_C1, UCMF2_C1, CRSF6_C1, CMBF1_C1	13
7	UCF8_M5, UCF6_M5, UCF2_M2, F19M3, F8M5, F8M2, F6M5, BLPF4_C1, BLPF3_C1, BIF17_C1, BIF7_C1, BBF1_C1	11
8	IP3M3_C3, BIF28_C3, BIF18_C2, BIF16_C2, BIF14_C3, BIF14_C2, BIF12_C3, BIF11_C3, BIF9_C1, BIF8_C1, UBGf2_C1	11
9	F2M5, BMF2_C2, BIF15_C2, BIF4_C4	4
10	BIF1_C3, AP2M1_C2	2
11	F4M3, BLPF4_C2	2
12	BMF2_C1	1
13	BLPF2_C1	1
14	BBF1_C3	1
15	UJF1_C1, UCF1_C1, CRSF6_C1	3
16	CNF7_C2, CCF4_C1, BLPF4_C3, BLPF1_C4, BLPF1_C3	5
17	BBF1_C3, BIF2_C2	2
18	F2M4	1

19	BIF26_C1	1
20	CTN3_C3, CNF10_C3, CNF10_C2, BIF18_C1, BIF7_C2	5
21	<i>Trichoderma</i> uncertain F20M5, CRSF5_C1, CCF2_C2, BLPF1_C2, BIF27_C2, BIF5_C3, BIF2_C2, BBF1_C1	13
<b>Total aislados /tratamientos</b>		<b>234</b>

Se sometieron a evaluación del potencial de biocontrol un total de 234 tratamientos (aislados) organizados en 21 grupos o taxas, cada uno representado por cinco repeticiones, haciendo un total de 1170 observaciones (tanto para micoparasitismo, así como para antibiosis).

#### **b. Adquisición del fitopatógeno *Moniliophthora roreri***

Se utilizó la cepa MBG\_1 plenamente caracterizada de *M. roreri* (foto 16 del Anexo 8) para los ensayos del presente estudio. Esta cepa fue aislada de la mazorca de cacao con síntomas de moniliasis, colectada de una plantación de cacao del sector Quebrada Seca – Utcubamba, Amazonas coordenadas 5° 43' 00.0'' S y 78° 28' 50.6'' W (en este sector se reportó por primera vez la presencia de la moniliasis del cacao (Díaz-Valderrama *et al.* 2021). Este aislamiento fue identificado, caracterizado y conservado como parte de la colección de hongos del laboratorio de sanidad vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

#### **c. Ensayos de micoparasitismo**

A fin de evaluar el potencial de biocontrol *in-vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre la moniliasis del cacao, en primer lugar se realizaron los ensayos de micoparasitismo, considerándose para ello un total de 234 tratamientos, cada uno representado por cinco repeticiones, haciendo un total de 1170 unidades de observación (Cuadro 3); para lo cual, se hizo uso de la metodología de placas Petri pre colonizadas (Evans *et al.* 2003). Para ello, se colocó un disco de 5 mm de diámetro obtenidas de colonias de *M. roreri* de 12 días de edad, cultivadas en medio PDA, para ello se utilizó placas Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo el medio previamente plaqueado. Seguidamente fueron colocadas en una cámara bioclimática Climacell EVO durante cinco semanas aproximadamente, a 28°C a un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (precolonización). Transcurridas las cinco semanas (35-38 días) y una vez que *M. roreri* colonizó el 100 por ciento de la placa (Figura 7), del lado opuesto del lado opuesto de la placa Petri (donde inicialmente se colocó el disco de *M. roreri*), se ubicó, una tira de

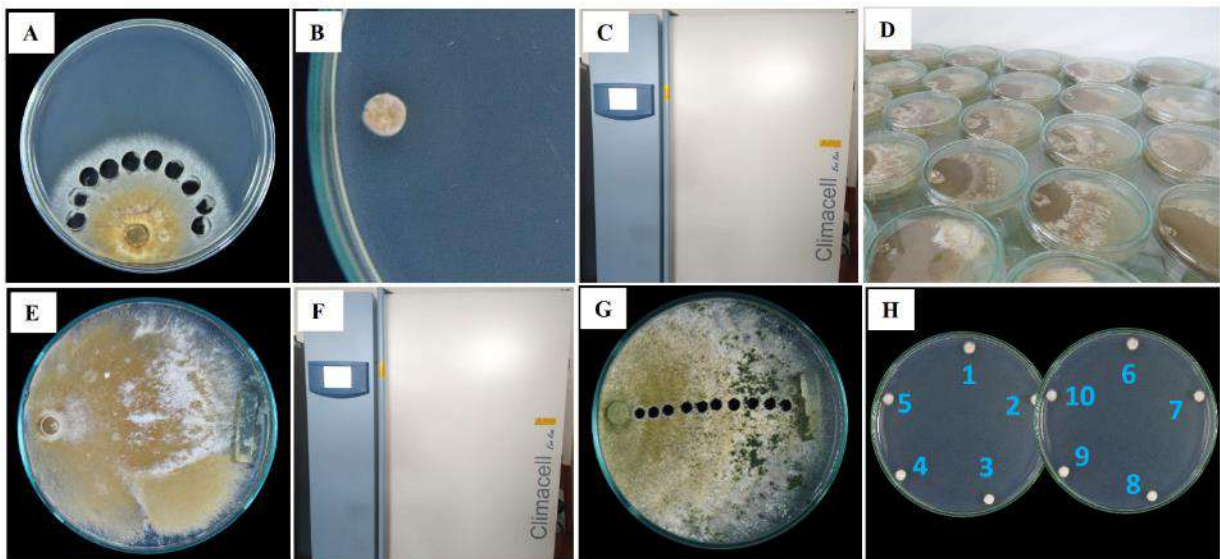
inóculo de 2,5 x 0,5 cm, extraída del borde de una colonia recién esporulada de *Trichoderma* de 3-4 días desarrollada en medio PDA (Figura 7). Las placas así tratadas fueron sometidos a incubación en las mismas condiciones que en la precolonización. Luego de dos semanas de incubación, por cada placa (cada una representa un aislado) se extrajo un total de 10 discos de 5 mm de radio/cada uno, la extracción comenzó desde la ubicación del inóculo de *M. roreri* hacia la tira de inóculo de *Trichoderma*). Estos discos fueron colocados en dos placas Petri con medio de cultivo PDA al 20 por ciento (cinco discos fueron colocados en el borde cercano la placa y distribuidos equitativamente) (Figura 7) e incubados a  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12/12 horas luz/oscuridad y se observó por dos semanas a fin de detectar la presencia de *Trichoderma* o *M. roreri*, según sea el caso. El porcentaje de micoparasitismo se estimó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{PP} = (\text{CT} \times 100) / \text{N}$$

Dónde: PP = parasitismo ( por ciento);

CT = crecimiento de *Trichoderma*;

N = Número de muestras tomadas por cada repetición



**Figura 7. Metodología para ensayos de micoparasitismo. A: *M. roreri* de 12 días; B: Disco de 5 mm de diámetro en extremo de placa Petri en medio PDA; C: Primera incubación a  $28^{\circ}\text{C}$  con 12 horas luz/oscuridad; D: Colonia de *M. roreri*; E: Tira de 2.5 cm x 0.5 cm de *Trichoderma* spp; F: Segunda incubación por 2 semanas; G: Micoparasitismo; H: Disposición de 10 discos extraídos en G**

#### **d. Ensayos de antibiosis**

Para desarrollar los ensayos de antibiosis se utilizó la metodología de cultivos pareados (Olmes *et al.* 2004), y del mismo modo que para los ensayos de micoparasitismo, se utilizaron como tratamientos a 234 aislados de *Trichoderma* y un control, y en el ensayo de antibiosis estuvieron representados también por cinco repeticiones haciendo un total de 1175 observaciones. La metodología propiamente dicha, se inició colocando un fragmento de 5 mm de diámetro de *M. roreri* (previamente cultivado en PDA) cerca al borde interno de una placa Petri que contenía medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), para luego ser incubado en una cámara bioclimática Climacell Evo a  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12/12 horas luz/oscuridad durante  $10 \pm 1$  días; esta actividad se realizó con la finalidad de establecer la colonia del fitopatógeno que en promedio, alcanzó  $2.3 \pm 1$  mm en 11 a 13 días.

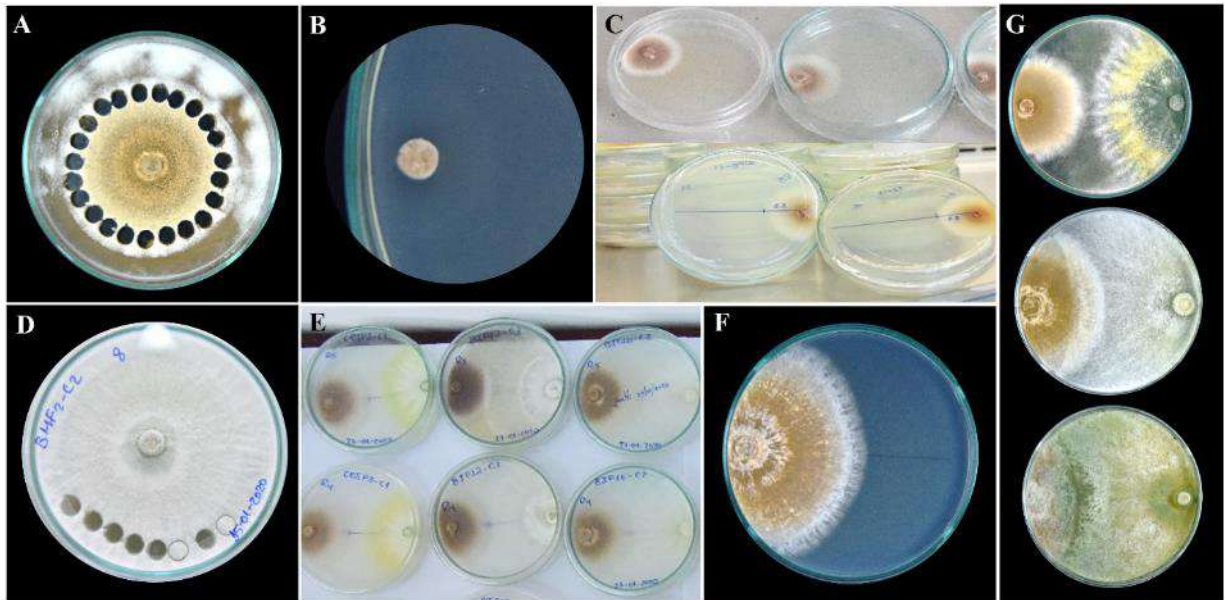
Una vez que el fitopatógeno *M. roreri* desarrolló una colonia de  $2.3 \pm 1$  mm de radio Aprox; Al lado opuesto de la misma placa (Figura 8), se colocó un disco de 5 mm de diámetro de una colonia de *Trichoderma* de 4 días de desarrollo en medio PDA (Figura 8). Una vez que las placas quedaron sembradas con *M. roreri* y *Trichoderma*, uno frente del otro, se sometieron a incubación en una cámara bioclimática Climacell Evo a  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$  a 12/12 horas luz/oscuridad. En el ensayo, se instalaron, además de las cinco repeticiones por cada cepa de *Trichoderma*, cinco placas control (inóculo de *M. roreri* no sometido a confrontación). En cada tratamiento se tomaron medidas diarias del crecimiento radial de *M. roreri*, hasta que, en al menos una placa, las colonias de *M. roreri* y *Trichoderma* hicieron contacto. Finalmente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del fitopatógeno mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{PA} = [(\text{RG} - \text{RGT}) / \text{RG}] \times 100$$

Dónde: PA = Antibiosis (porcentaje),

RG = Crecimiento radial en mm de *M. roreri* (control),

RGT = Crecimiento radial de *M. roreri* en presencia de *Trichoderma* spp.



**Figura 8. Metodología para ensayos de antibiosis. A: Extracción de discos de *M. royeri* de 5 mm de diámetro en medio PDA; B: Disco de *M. royeri*, colocado cercano a borde de la placa; C: Colonia de *M. royeri* de 2.3 +/- 1 mm de diámetro; D: Extracción de discos de 5 mm de diámetro de *Trichoderma*; E: Disco de *Trichoderma* frente a colonia de *M. royeri* (izquierda); F: Control; G: Placas Petri con diferentes niveles de antibiosis**

#### **e. Antagonismo potencial**

Para determinar el antagonismo potencial se realizó un cálculo a partir de la fórmula de Reyes-Figueroa *et al.* (2016) en la que intervienen los datos recabados del micoparasitismo y antibiosis:

$$AP = (MT + AT) / 2;$$

Donde: **AP** = Antagonismo potencial;

**MT** = Porcentaje de Micoparasitismo de *Trichoderma* contra *M. royeri*;

**AT** = Porcentaje de *Trichoderma* contra *M. royeri*.

#### **f. Análisis de datos**

Los datos fueron analizados bajo un diseño de experimento completo al azar (DCA) con un total de 234 tratamientos para micoparasitismo y 235 tratamientos para antibiosis. Además, Análisis de varianza fueron realizados para micoparasitismo, antibiosis y antagonismo potencial. Cuando el análisis de varianza evidenció diferencias significativas se realizó la prueba de

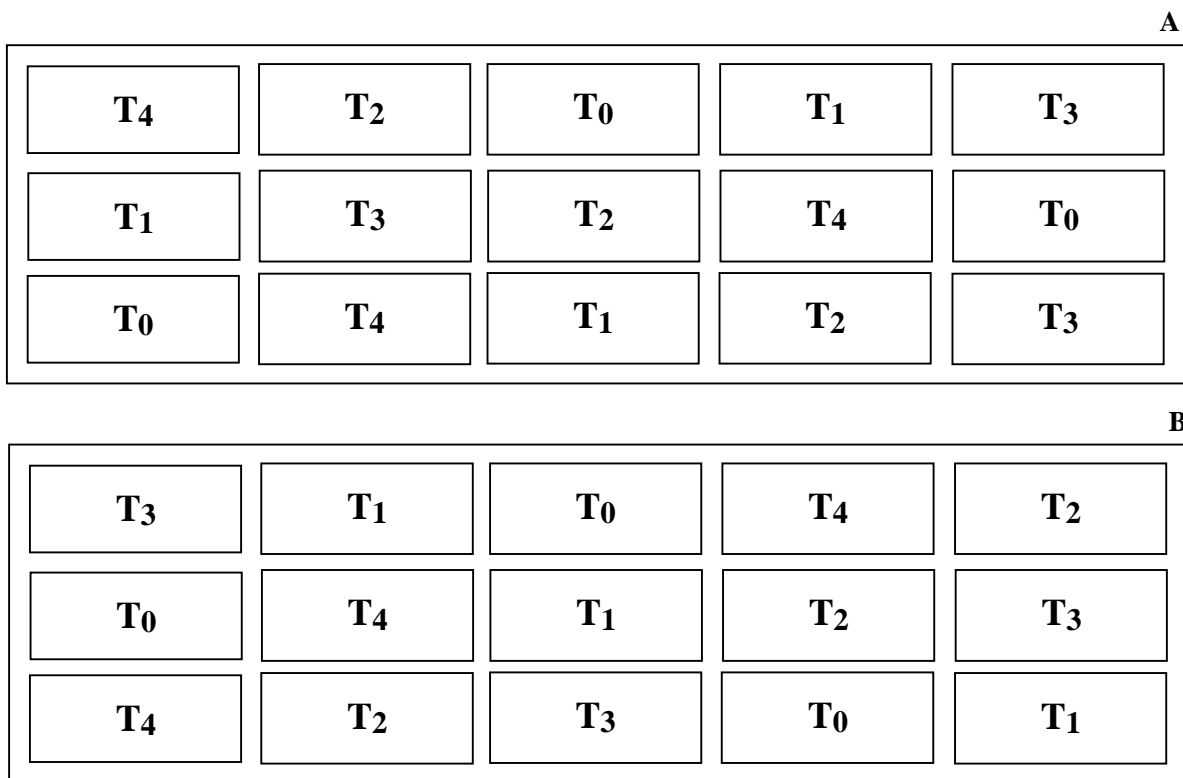
separación de medias de Scott Knott ( $\alpha=0.05$ ). Todos los análisis fueron realizados en el software Infostat V.2020 (Di Rienzo *et al.* 2020).

### 3.2.3. Etapa III: Potencial de biocontrol *in-vivo* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) para la producción sostenible de cacao

En esta etapa, de la investigación, se someten a prueba a partir de dos ensayos (diferenciadas en espacio) *in-vivo* cuatro aislamientos nativos de *Trichoderma* con mejores características de antagonismo potencial (*in-vitro*). El estudio se llevó a cabo en campos de cultivo situados en la provincia de Utcubamba, se seleccionó dos parcelas de cacao con una densidad media de 816 árboles ha/1, una finca de se ubicó en el caserío Llunchicate del distrito de Cajaruro a 965 m.s.n.m. y coordenadas 5° 44' 21.9" S y 78° 17' 03.5 " W, este y sur, respectivamente, y la segunda plantación de cacao se ubicó en el distrito de Bagua grande, caserío Quebrada seca, a 442 m.s.n.m., coordenadas 5° 43' 00.0" S y 78° 28' 50.6" W. En cada lugar, se utilizó un diseño de bloques al azar (DBCA) con cinco tratamientos (Figura 9). Cada tratamiento estuvo representado por 64 árboles de cacao en un diseño de bloques completos al azar DBCA (Hidalgo *et al.* 2003). De cada tratamiento se seleccionó 16 árboles de la parte interna, para evaluar las variables dependientes y los 48 árboles circundantes, aunque fueron tratados, funcionaron para eliminar los efectos de borde. Entre bloques había dos filas de cacao que no fueron tratadas ni observadas.

**Cuadro 4. Tratamientos en estudio para evaluar potencial de biocontrol *in-vivo* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre la moniliasis (*Moniliophthora roreri*)**

Descripción de los tratamientos		
Tratamientos	Código de cepa	Especie
T0	Control	NA
T1	CP 24-6	<i>T. afroharzianum</i>
T2	BMF19_C2	<i>T. orientale</i>
T3	F14M3	<i>T. longibrachiatum</i>
T4	BIF14_C2	<i>T. inhamatum</i>



**Figura 9. Croquis de los tratamientos (DBCA); A: Parcela Localidad de Quebrada Seca, a 442 m.s.n.m., coordenadas 5° 43' 00.0''S y 78° 28' 50.6''W – Bagua Grande-Utcubamba.; B: Parcela de la localidad de Llunchicate, Cajaruro a 965 m.s.n.m. y coordenadas 5° 44' 21.9''S y 78° 17' 03.5'' W**

**a. Obtención de las cepas nativas y/o microorganismos**

Se trabajó con 4 cepas, especies nativas del género *Trichoderma* (Cuadro 4); a saber: *T. afroharzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. orientale* y *T. inhamatum* identificadas por los códigos CP 24-6, BMF19\_C2, F14M3, BIF14\_C2, respectivamente. Actualmente forman parte de la micoteca del Laboratorio de Investigaciones en Sanidad Vegetal (LABISANV) del Instituto de Investigaciones para el Desarrollo Sostenible de Ceja de Selva (INDES-CES), Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Estas cepas se obtuvieron de suelo recolectado de plantaciones de cacao nativo de las zonas productoras de la región de Amazonas, Perú.

**b. Acondicionamiento de las parcelas de cacao y/o ensayos**

Se identificaron dos plantaciones de cacao nativo cuya edad aproximada de la plantación estuvo entre los 25 – 30 años. La primera plantación corresponde a la localidad de Quebrada Seca-

Bagua Grande (1.75 hectáreas de cacao) y en la localidad de Llunchicate, distrito de Cajaruro (2.2 hectáreas), estuvo ubicada la segunda parcela, tal como se describe en el capítulo de ubicación del presente estudio. Ambas parcelas presentaron características similares en cuanto a los ecotipos y edad de plantación.

Las plantaciones fueron sometidas a un control de malezas y podas de mantenimiento durante todo el desarrollo del estudio (campana productiva 2020-2021), además se realizó la remoción completa de vainas residuales (incluyendo frutos recientemente cuajados) del ciclo productivo anterior con la finalidad de preparar la parcela y también para facilitar el control de al menos siete generaciones de frutos (campana productiva 2020-2021); entonces, los trabajos se inician dejando las plantas de cacao en floración y libre de frutos.

Posteriormente (30 a 40 días después. Aprox.) se identificaron los frutos (primera generación – Figura 10A), con una dimensión de 8 a 12 cm y fueron etiquetados e identificados con cintillos de colores (el color rojo representó la primera generación). Este proceso de identificación de los frutos por generación, fueron efectuados en siete oportunidades (momento en el cual se define las generaciones sucesivas), iniciándose en el mes de noviembre del 2020 hasta el mes de julio 2021.

Se repicaron las cepas de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo PDA y se incubaron por 6 días a 28 °C. Posteriormente, mediante raspado, se extrajo del micelio del cultivo de *Trichoderma* spp en un tubo con 10 ml de agua destilada, se homogenizó y se vertió el inóculo en los matraces conteniendo 30 g de arroz pre cocido; se incubó a 28 °C por una semana con constante remoción del matraz. Se adicionó al matraz, 200 ml de agua destilada y se homogenizó por 10 minutos. Posteriormente, con una jeringa estéril se adicionó 10 ml de este inóculo sobre matraces fermentativos con 400 g de arroz precocido y se dejó incubar por una semana. Seguidamente se realizó la recuperación de esporas mediante tres lavados consecutivos del arroz de los matraces fermentativos y se dejó sedimentar por 48 horas, finalmente el sedimentado se colocó sobre una bandeja y se colocó a la estufa a 35°C por 48 horas para la obtención del *Trichoderma* deshidratado.



Posteriormente, se preparó la solución o caldo Biofungicida a base de *Trichoderma*, agregando al sustrato de arroz, que contenía los conidios de *Trichoderma* previamente cuantificados, 100 ml de aceite agrícola/800 g de sustrato para facilitar el desprendimiento de las esporas, además se reguló el pH del agua a 6.5 (Figura 10C). La aplicación del caldo Biofungicida fue a una dosis de  $1 \times 10^{12}$  conidias mL<sup>-1</sup> usando una pulverizadora a palanca de 20-L “Jacto” a razón de 250 ml por planta de cacao. La aspersión se realizó de forma focalizada a los frutos y copa de la planta (Figura 10F) cada 15 días, desde la etapa de floración y durante todo el ciclo productivo (en siete generaciones de la campaña productiva 2020-2021).

Cada dos semanas se contó el número de vainas enfermas y sanas, por fase de desarrollo (cherelle, inmadura, madura y madura). También se contaron las mazorcas atacadas por otros factores (enfermedades, insectos y/o roedores). Todas las mazorcas enfermas, atacadas y maduras se eliminaron de los árboles. Los datos se analizaron utilizando el número acumulado de mazorcas sanas, maduras y enfermas por parcela y el porcentaje final de mazorcas enfermas por parcela.



**Figura 10. Metodología para evaluar el potencial de biocontrol *in-vivo*. A: Identificación de frutos por generación.; B: Identificación de plantas por tratamiento y bloque.; C: Preparación del caldo Biofungicida; D: Evaluación de incidencia y severidad externa; E-F: Aplicación del caldo Biofungicida; G: Evaluación de severidad interna; H: Pesado de los granos**

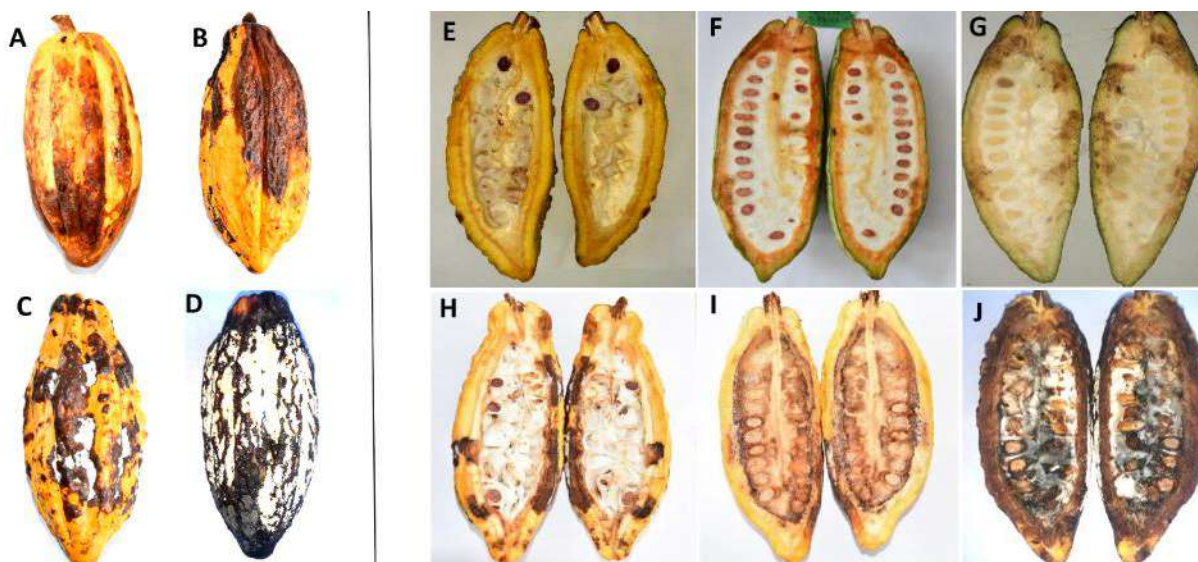
### **c. Estimación de la incidencia de la moniliasis del cacao**

La evaluación de la incidencia de los síntomas causados por la moniliasis del cacao fue efectuada a partir del seguimiento a cada uno de los frutos identificados y codificados por cada generación; en este contexto se realizaron siete evaluaciones de incidencia (momento previo a la aplicación del caldo biofungicida) y se cuantificó mediante la siguiente fórmula de Krauss & Soberanis (2002).

$$Incidencia = \frac{\text{Frutos enfermos}}{\text{Total de frutos evaluados}}$$

### **d. Estimación de la severidad externa e interna de la moniliasis del cacao**

La severidad del daño externo de las mazorcas de cacao infectadas se midió y registró como el porcentaje (0–100 por ciento) de la superficie de la vaina cubierta por manchas oscuras y/o necróticas y posterior presencia de micelio (Figura 11 A-D), dicha evaluación se realizó a partir del seguimiento de desarrollo de síntomas por parte de cada fruto identificado en cada una de las siete generaciones identificadas para la evaluación de la incidencia; del mismo modo, la evaluación de severidad interna se evaluó en base al porcentaje (0–100 por ciento) de necrosis o pudrición interna del fruto (Figura 11 E-J); esta operación se efectuó a nivel de la última cosecha (última generación). En ambos casos, se examinó cada fruto infectado para determinar la gravedad de la infección y luego se anotó como un promedio por árbol y por tratamiento.



**Figura 11. Niveles de severidad externa e interna de la MC. A: Severidad externa, manchas oscuras menores a 20 por ciento; B: mancha marrón oscuro-chocolate en el 40 por ciento del fruto; C: Micelio en manchas oscuras en el 60 por ciento de la superficie del fruto; D: Micelio generalizado y manchas en el 100 por ciento del fruto. E: Síntomas internos: 0 por ciento de necrosis, F: 1-25 por ciento de necrosis; G: 26-40 por ciento de necrosis; H: 41-60 por ciento de necrosis en el fruto; I: 61-80 por ciento de necrosis y J: más de 80 por ciento del fruto necrosado**

**Fuente: (Sánchez 1982; Alejandria *et al.* 2021)**

#### **e. Estimación del rendimiento**

Los granos de cacao fueron pesados (peso en baba) al momento de la cosecha. El cálculo del rendimiento, se estimó y proyectó en kg de cacao en grano seco seleccionado/ha; para ello, se tuvo en cuenta el cambio de masa durante el procesamiento (el peso seco es el 40 por ciento del peso fresco del material equivalente); como resultado de esto se obtuvo kg de cacao seco ha<sup>-1</sup> año, para una densidad de unas 833 plantas ha<sup>-1</sup> por cada parcela.

#### **f. Eficiencia de los tratamientos**

El efecto en el biocontrol *in-vivo* de las cepas de *Trichoderma* se determinó utilizando dos variables epidemiológicas; por un lado, se estima el rendimiento del cultivo, además de la

eficacia de esta aplicación o del tratamiento. Para esto se utilizó la fórmula del porcentaje de eficiencia de control adaptada de Abbott (1925).

$$E = (\% \text{ IFSAT} - \% \text{ IFCAT} / \text{ IFSAT}) / 100$$

**Donde:**

E= eficiencia (por ciento)

**por ciento IFSAT**= Porcentaje de incidencia final sin aplicación de *Trichoderma* spp.

**IFCAT**= Porcentaje de incidencia final con aplicación de *Trichoderma* spp.

**g. Análisis de datos**

Los datos fueron analizados bajo un diseño DBCA bloques completamente al azar. Antes del análisis, los datos de incidencia, severidad y eficiencia se transformaron a la raíz cuadrada del arco seno de la relación. Los datos se sometieron a ANOVA con el software Infostat. Se aplicó la prueba de separación de medias (Scott Knott,  $\alpha = 0.05$ ) cuando la prueba F fue significativa para los tratamientos.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *TRICHODERMA* EN EL AGROECOSISTEMA DE CACAO NATIVO, REGIÓN AMAZONAS, PERÚ

#### 4.1.1. Identificación molecular de aislados

En el siguiente Cuadro se presenta la relación de las especies identificadas.

**Cuadro 5. Identificación molecular de cepas del género *Trichoderma* aislados del agroecosistema de cacao nativo, basado en la comparación de similitud por pares de ITS, rpb2 y tef1**

N°	* CODIGO/CEPA	Estándar Similitud con cepa de referencia						Concordancia filogenética de rpb2 y tef1	ESPECIES ID	Total aislados ID
		Género/ ITS (≥ 76%)		Especie/ RPB2 (≥ 99%)		Especie/TEF1 (≥ 97%)				
		Accesion	% Ident	Accesion	% Ident	Accesion	% Ident			
1	AP2M2_C1	NR137304	99.83%	FJ442691	99.38%	KP008851	100.00%	Si	<i>T afroharzianum</i>	69
2	BIF1_C3	FJ442259	99.33%	FJ442778	99.75%	AF348093	98.55%	Si	<i>T afarasin</i>	2
3	BIF7_C1	NR231451	96,54%	GU248411	99.88%	GU248412	98.70%	Si	<i>T asperelloides</i>	11
4	BLPF2_C1	MH342556	95.40%	KY687983	100.00%	KY688045	99.68%	Si	<i>T breve</i>	1
5	F4M3	NR768563	99.84%	JN175559	99.75%	AY937423	99.53%	Si	<i>T ghanense</i>	2
6	BIF9_C1	MH861134	99.34%	FJ442725	99.63%	AF348099	97.30%	Si	<i>T inhamatum</i>	11
7	UCF7_M5	MH859229	99.82%	DQ087242	99.87%	AY937412	97.56%	Si	<i>T longibrachiatum</i>	20
8	BLPF2_C2	NR144868	99.64%	FJ442749	100.00%	FJ463379	100.00%	Si	<i>T lentiforme</i>	16
9	UJF3_C4	NR111317	99.80%	JN175522	99.75%	EU401581	97.66%	Si	<i>T orientale</i>	13
10	UJF2_C2	MH863773	99.50%	HM182963	100.00%	GQ354353	99.59%	Si	<i>T parareesei</i>	33
11	UCM2_C1	MH861154.1	100.00%	HM182969	99.34%	AF401004	99.48%	Si	<i>T reesei</i>	22
12	BIF4_C4	MN594474	99.47%	MN605872	99.39%	MN605883	99.67%	Si	<i>T zelobreve</i>	4
13	BMF2_C1	NR_131281	100.00%	EU241506.1	99.38%	DQ284966	98.35%	Si	<i>T koningiopsis</i>	1
14	BBF1_C3	EU330955.1	93.73%	EU338314.1	99.51%	EU338299	97.44%	Si	<i>T brevicompactum</i>	1
<b>Total especies identificadas</b>									<b>206/234</b>	

\*Los códigos (COD/CEPA) son representativos para 14 especies correctamente identificadas, de un total de 234 aislados. El cuadro completo se muestra como archivo Anexo (Anexo 1).

El Cuadro 5 muestra los porcentajes de similitud por pares para un total de 206 aislados identificados, y 24 no identificados (Cuadro 6). Se estimó el nivel de similitud por pares entre la secuencia ITS de la cepa de consulta y las demás secuencias proporcionadas en los conjuntos de datos ITS56. Los resultados indican que, para este caso, cada una de las cepas consultadas

(234) pertenecen al género *Trichoderma* spp. con valores de similitud superiores al 89 por ciento, en comparación a las secuencias del conjunto de datos (Anexo 1).

La similitud de secuencia por pares de ITS entre las 234 aislados recuperados del agroecosistema de CNFA Amazonas-Perú, y las accesiones más próximas muestran valores por encima del 76 por ciento de similitud, se indica que el 100 por ciento de las cepas pertenecen al género *Trichoderma*; resultados que son respaldados por las características morfológicas básicas, tanto macroscópicas y microscópicas encontradas para cada aislamiento; el cultivo *in-vitro* de las cepas, dejan notar variables típicas para el género como la coloración de la colonia, la presencia de fiálides y conidios verdes y hialinos; entre otras características adicionales (Chaverri & Samuels 2003; Gams & Meyer 1998). Por otro lado, cada uno de los 234 aislados, de manera independiente, se sometieron a prueba de similitud por pares de *rpb2* y *tef1*; en el Cuadro 5 se muestra un total de 14 aislados, cada uno representa a una especie diferente; en este contexto, se observa a un primer grupo y el más numeroso de todos, estar conformado por 69 aislados identificados (Códigos de aislamiento y números de acceso para las secuencias se proporcionan en Anexo 1), representados en el Cuadro 1 por el código AP2M2\_C1, cuya secuencia genética comparada con las accesiones de referencia para *rpb2* y la más estrechamente relacionada especie *T. afroharzianum* (accesión FJ442691) que se encuentra en este locus fue de 99,38 por ciento (Cuadro 1), y la similitud de *tef1* entre la cepa de referencia y la más estrechamente relacionada *T. afroharzianum* (accesión KP008851) que se encuentra en este locus fue 100,00 por ciento; en consecuencia, la condición  $\exists!$  ( $rpb2_{99} \cong tef1_{97}$ ) se cumplió, lográndose identificar la presencia de 69 aislados de la especie *Trichoderma afroharzianum*.

Además, la similitud de *rpb2* para un grupo conformado por dos aislados AP2M1\_C2 y BIF1\_C3, representado en el Cuadro 1 por esta última cepa, y la más estrechamente relacionada especie; *T. afarasin* (accesión FJ442778) fue de 99.75 por ciento (Cuadro 1) mientras que la similitud de *tef1* entre la cepa BIF1\_C3 y la especie más estrechamente relacionada *T. afarasin* (accesión AF348093) fue del 98,55 por ciento; resultados que indican el cumplimiento de la condición  $\exists!$  ( $Rpb2_{99} \cong tef1_{97}$ ), por lo que según el protocolo, se identificó la existencia de la especie *Trichoderma afarasin*. Del mismo modo, un total de 11 aislados, UCF8\_M5, UCF6\_M5, UCF2\_M2, F19M3, F8M5, F8M2, F6M5, BLPF4\_C1, BLPF3\_C1,

BIF17\_C1, representados en el Cuadro 1 por el aislado BIF7\_C1, fueron identificados como *Trichoderma asperelloides*, pues los niveles de similitud de RPB2 y TEF1 para la especie más estrechamente relacionada superan el 99 por ciento y 97 por ciento, en todos los casos (anexo 1). Esta tendencia fue constante y se logró identificar a la cepa BLPF2\_C1 como único aislado de la especie *Trichoderma breve*; las cepas: BLPF4\_C2 y F4M3 identificadas como *Trichoderma ghanense*; además, en el presente estudio se logró aislar a las cepas BIF18\_C2, BIF16\_C2, BIF14\_C3, BIF14\_C2, BIF12\_C3, BIF11\_C3, BIF9\_C1, BIF8\_C1, IP3M3\_C3, UBGF2\_C1 y BIF28\_C3, grupo representado en el cuadro 1 por la cepa BIF9\_C1 e identificadas como *Trichoderma inhamatum*, pues estos aislados logran cumplir con la condición  $\exists!$  ( $rpb2_{99} \cong tef1_{97}$ ) (Anexo 1). Además, mediante la aplicación del protocolo de comparación de similitud por pares, se determinó que la cepa UCF7\_M5, representa a un grupo de 20 aislados (UCPF4\_C2, UCMF2\_C3, UCPF1\_C1, UCMF3\_C1, UCF21\_C1, UCF17\_M4, UCF14\_C1, UCF10A\_C1, UCF7\_M5, UCF5A\_C2, UCF5A\_C1, UBGF1\_C1, F21M5, F18M2, F17M4, F14M3, F1M3, BIF7\_C3, BBF3\_C1, BBF1\_C2) (Anexo 1), y alcanzó una similitud con el gen rpb2 y la especie más estrechamente relacionada *Trichoderma longibrachiatum* (accesión DQ087242) de 99.87 por ciento; mientras que, la similitud de tef1 (accesión AY937412) fue de 97.59 por ciento (Cuadro 1), en consecuencia, la condición  $\exists!$  ( $Rpb2_{99} \cong tef1_{97}$ ) se cumple y además que para los pares ITS, los niveles de similitud superan el 76 por ciento, se ha logrado identificar la presencia de *Trichoderma longibrachiatum*, como una especie con alto nivel de presencia en el agroecosistema de CNFA Amazonas-Perú.

También; dos grupos de aislados que en el Cuadro 1 son representadas por los códigos BLPF2\_C2 (16 cepas: UCF5\_M1, UCF3\_M5, IP3M2\_C4, IP3M2\_C3, F5M4, CNF21\_C2, CNF12\_C2, BLPF2\_C2, BIF25\_M2, BIF12\_C1, BIF11\_C2, BIF11\_C1, BIF10\_C2, BIF1\_C4, AP1M5\_C1, AP1M4\_C1) y UJF3\_C4 (13 cepas: UJF3\_C4, UJF3\_C2, UCMF2\_C1, UCF18A\_C3, UCF18A\_C1, UCF1A\_C2, CRSF1\_C1, CNF16\_C2, CNF1\_C1, CMBF1\_C1, BMF19\_C2, BMF18\_C1, BIF17\_C3) fueron identificadas como *Trichoderma lentiforme* y *Trichoderma orientale*, respectivamente (los niveles de similitud, types más próximos, se muestran en el Anexo 1. Una de las especies que conforma los grupos más abundantes del género *Trichoderma* spp., presente en el agroecosistema de cacao nativo Amazonas-Perú, está representado en el Cuadro 1 por el aislado UJF2\_C2, mismo que representa a un total de 33



aislados, cuyas secuencias fueron sometidas al protocolo de identificación de similitud por pares, siendo comparadas con las accesiones de referencia para *rpb2* y la más estrechamente relacionada especie *T. parareesei* (accesión HM182963) que se encuentra en este locus fue de 100.00 por ciento (Cuadro 1), y la similitud de *tef1* entre la cepa de referencia y la más estrechamente relacionada *T. parareesei* (accesión GQ354353) que se encuentra en este locus fue 100,00 por ciento; en consecuencia, la condición  $\exists!$  ( $rpb2_{99} \cong tef1_{97}$ ) se cumplió, lográndose identificar la presencia de 33 aislados de la especie *Trichoderma parareesei*. Del mismo modo, se logró identificar que un total de 22 aislados (UCM2\_C1,UCF7\_M2, F7M2, CTN3\_C1, CRSF2\_C3, CRSF1\_C4, CRSF1\_C3, CNF20\_C1, CNF8\_C1, CNF5\_C1, CCF6\_C1, CCF3\_C1, CB04\_C2, CB04\_C1, BPF3\_C1, BIF15\_C1, BIF8\_C2, BIF5\_C4, BIF4\_C1, BIF3\_C2, BIF3\_C1, BIF2\_C3), que en el Cuadro 1 están representados por UCM2\_C1, pertenecientes a la especie *Trichoderma reesei*, en su proceso de identificación, se determina que la condición  $\exists!$  ( $rpb2_{99} \cong tef1_{97}$ ) se cumplió, para ello se utilizaron las accesiones de referencia HM182969 y AF401004, para el gen *rpb2* y *tef1*, respectivamente.

Los niveles de similitud de *rpb2* entre la cepa BIF4\_C4, que en el Cuadro 1 representa a cuatro aislados: F2M5, BMF2\_C2, BIF15\_C2, BIF4\_C4, y la especies más estrechamente relacionada *Trichoderma zelobreve* (accesión MN605872) fue de 99.39 por ciento, mientras que el nivel de similitud de *tef1* entre esta cepa y la especie más próxima (*Trichoderma zelobreve*, accesión MN605883) fue de 99.67 por ciento; ¡indicando que, en ambos genes, la condición protocolar de  $\exists!$  ( $rpb2_{99} \cong tef1_{97}$ ) se cumplió y por lo tanto se da fe de la existencia de la especie *Trichoderma zelobreve* en el agroecosistema de cacao nativo Amazonas Perú. Finalmente, se logró determinar que la similitud de *rpb2* entre la cepa BMF2\_C1 (única cepa) y la más estrechamente relacionada especie *Trichoderma koningiopsis* (accesión EU241506) fue de 99,38 por ciento (Cuadro 1), mientras que la similitud de *tef1* entre la cepa BMF2\_C1 y la especie más estrechamente relacionada *Trichoderma koningiopsis* (accesión DQ284966) fue de 98,35 por ciento (Cuadro 1); cumpliéndose, la condición  $\exists!$  ( $Rpb2_{99} \cong tef1_{97}$ ) e identificándose la presencia de *Trichoderma koningiopsis* en la zona de estudio. De igual modo, la cepa única BBF1\_C1, cumple con los niveles de similitud de *rpb2* y *tef1* para la accesión EU338314 y EU338299, respectivamente y fue identificada como *Trichoderma koningiopsis*. Se identificaron un total de 14 especies, a saber: *T. afroharzianum*, *T. parareesei*, *T. reesei*, *T.*

*longibrachiatum*, *T. lentiforme*, *T. orientale*, *T. asperelloides*, *T. inhamatum*, *T. zelobreve*, *T. afarasin*, *T. ghanense*, *T. koningiopsis*, *T. brevicompactum* y *T. breve*., y en su proceso de validación, no se reportan mayores niveles de ambigüedades que generen algún tipo de incertidumbre en el proceso de identificación, a excepción de 13 aislados UCPF2\_C1, UCPF3\_C1, UCF19A\_C2, UCF19A\_C1, IP3M1\_C4, F20M5, CRSF5\_C1, CCF2\_C2, BLPF1\_C2, BIF27\_C2, BIF5\_C3, BIF2\_C2, BBF1\_C1, que al ser comparadas con sus pares más próximos, mostraron valores cambiantes al establecido por el protocolo y son analizados en un árbol filogenético para *rpb2* y *tef1*. El protocolo de identificación de especies por similitud por pares, ha permitido encontrar cepas cuya identificación es compleja. Las especies con identificación ambigua o no identificadas se presentan en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Identificación molecular de especies del género *Trichoderma* aislados del agroecosistema de CNFA Amazonas-Perú, basado en la comparación de similitud por pares de RPB2 y TEF1**

COD/CEPA	* CEPA DE REFERENCIA A	Estándar Similitud con cepa de referencia						Concordancia filogenética de <i>rpb2</i> y <i>tef1</i>	CONDICION
		Género/ ITS (≥ 76%)		Especie/ RPB2 (≥ 99%)		Especie/TEF1 (≥ 97%)			
		Accesion	% Ident	Accesion	Per Ident	Accesion	Per Ident		
UJF1_C1	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	99.84%	JQ685884.1	98.28%	EU401581.1	97.56%	No	No identificada
IP3M1_C4	<i>T. afarasin</i>	EU330955.1	91.73%	FJ442778.1	98.03%	AF348093.1	96.55%	No	No identificada
F2M4	<i>T. lentiforme</i>	FJ442615.1	99.49%	FJ442749.1	98.40%	FJ463379.1	90.43%	No	No identificada
CRSF6_C1	<i>T. orientale</i>	NR_111317.1	99.29%	JN175522.1	98.28%	EU401581.1	97.56%	No	No identificada
CRSF5_C1	<i>T. lentiforme</i>	FJ442615.1	99.82%	FJ442749.1	99.26%	FJ463379.1	93.53%	No	No identificada
CNF10_C3	<i>T. virens</i>	EU330955.1	96.73%	AF545547.1	98.15%	AY750891.1	96.89%	No	No identificada
CNF10_C2	<i>T. virens</i>	EU330955.1	100.00%	AF545547.1	98.15%	AY750891.1	96.77%	No	No identificada
CNF7_C2	<i>T. orientale</i>	NR_111317.1	99.63%	JN175522.1	98.28%	EU401581.1	97.07%	No	No identificada
CCF4_C1	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	99.83%	JQ685884.1	98.89%	EU401581.1	98.29%	No	No identificada
CCF2_C2	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	99.19%	JQ685884.1	98.77%	EU401581.1	99.61%	No	No identificada
BLPF4_C3	<i>T. orientale</i>	NR_111317.1	99.81%	JQ685884.1	98.89%	EU401581.1	97.56%	No	No identificada
BIF27_C2	<i>T. rifaaii</i>	FJ442621.1	99.66%	FJ442720.1	98.65%	FJ463321.1	90.79%	No	No identificada
BLPF1_C3	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	99.84%	JQ685884.1	98.89%	EU401581.1	97.56%	No	No identificada
BLPF1_C2	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	99.84%	JQ685884.1	98.40%	JN175573.1	96.38%	No	No identificada
BIF26_C1	<i>T. inhamatum</i>	MH861134.1	99.34%	FJ442725.1	99.63%	AF348099.1	91.42%	No	No identificada
BIF18_C1	<i>T. virens</i>	EU330955.1	100.00%	AF545547.1	98.15%	AY750891.1	97.09%	No	No identificada
CTN3_C3	<i>T. virens</i>	EU330955.1	92.47%	AF545547.1	98.15%	AY750891.1	96.51%	No	No identificada
BIF7_C2	<i>T. lentiforme</i>	FJ442221.1	99.38%	FJ442683.1	99.29%	AF443931.1	96.97%	No	No identificada
BIF5_C3	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	99.83%	JQ685884.1	99.14%	EU401581.1	82.75%	No	No identificada
F20M5	<i>T. afroharzianu</i>	NR_137304.1	90.88%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	86.24%	No	No identificada
UCF19A_C1	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	98.22%	DQ087242.1	98.41%	EU401581.1	96.44%	No	No identificada
UCF19A_C2	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	99.51%	JQ685884.1	99.02%	JQ685868.	95.24%	No	No identificada
BIF2_C2	<i>T. lentiforme</i>	FJ442221.1	99.83%	FJ442683.1	99.51%	AF443931.1	96.97%	No	No identificada
UCF1_C1	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	99.28%	JQ685884.1	98.28%	JN175573	98.79%	No	No identificada
UCPF2_C1	<i>T. reesei</i>	MH861154.1	90.16%	HM182969.1	99.74%	AF401004.1	86.27%	No	No identificada
UCPF3_C1	<i>T. inhamatum</i>	FJ442259.1	96.19%	FJ442725.1	99.26%	AF348099.1	99.16%	No	No identificada
BBF1_C1	<i>T. asperelloides</i>	FJ442615.1	99.67%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	96.30%	No	No identificada
BLPF1_C4	<i>T. orientale</i>	JQ685873.1	99.83%	JQ685884.1	98.77%	EU401581.1	97.56%	No	No identificada

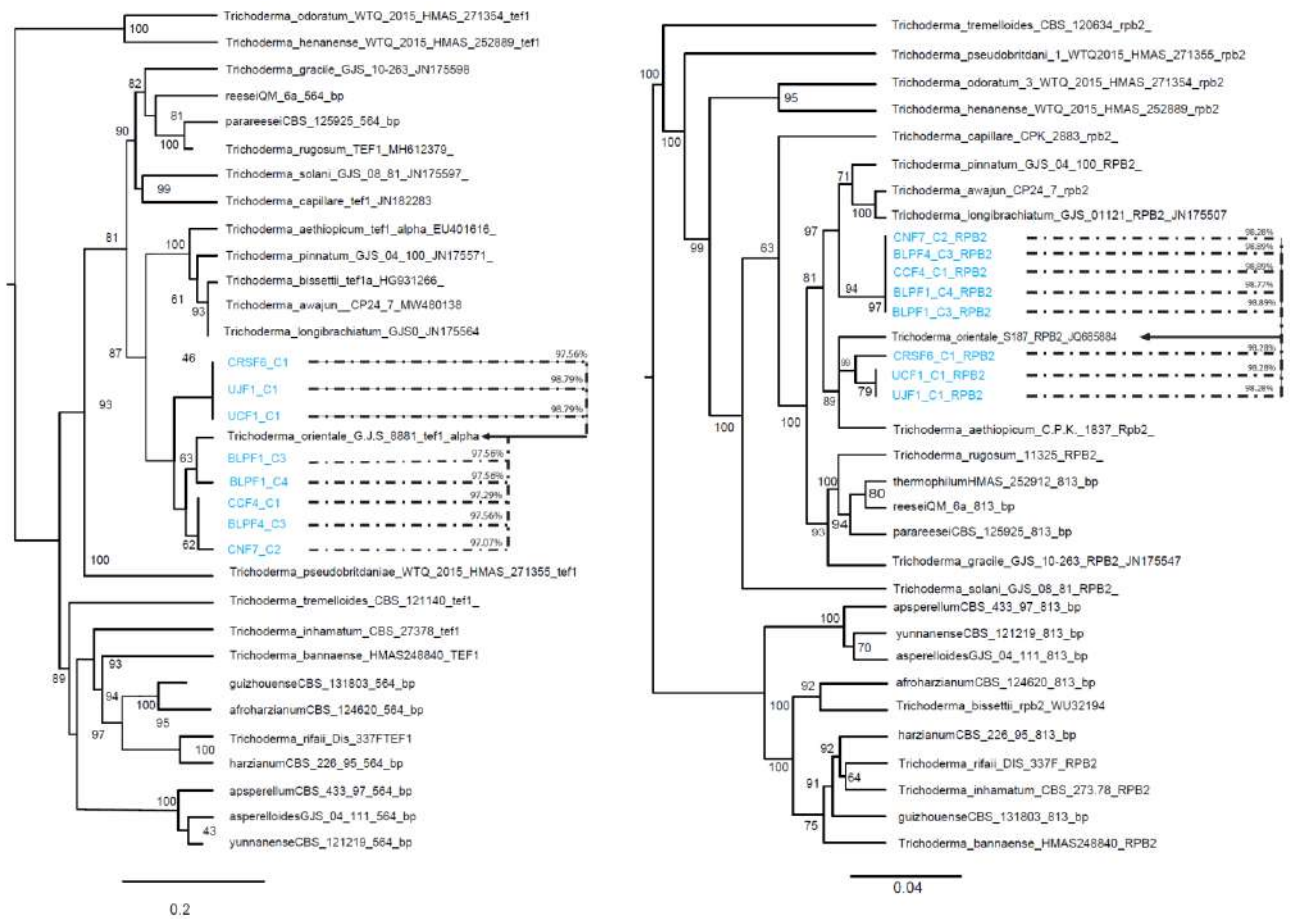
\*Los códigos (COD/CEPA) son representativos para 28 especies no identificadas de un total de 234 aislados.

La similitud de secuencia por pares del gen ITS entre cada una de las 28 cepas mostradas en el Cuadro 6 y las referencias que se dan en el conjunto de datos (a nivel de cada accesión) mostraron valores mayores a 76 por ciento lo que indica que los 28 aislados pertenecen al género *Trichoderma* spp. Sin embargo, la similitud de *rpb2* y/o *tef1* entre cada una de estas cepas y sus especies más estrechamente relacionadas (Cuadro 6), no poseen concordancia filogenética y consecuentemente no cumplen con la condición  $\exists!$  ( $rpb2\ 99 \cong tef1\ 97$ ), lo que indica que estas cepas, podrían reconocerse como ambiguas en su identificación y/o nuevas especies, que ameritan ser evaluados filogenia de máxima verosimilitud.

Los aislamientos que no fueron identificados por el método de similitud por pares y adicionalmente aquellos que presentaron ambigüedad (Cuadro 6) se sometieron a un análisis de filogenia, donde, se realizó un análisis de los marcadores *tef1-a* y *rpb2*, cuyo resultado se muestran en árboles topológicamente similares con diferencias menores. Cada nuevo taxón de *Trichoderma* formó un clado distinto y consecuentemente cumple con el estándar de nueva especie de *Trichoderma* (no cumple con el estándar  $sp\ \exists!$  ( $rpb2\ 99 \cong tef1\ 97$ ) para especies conocidas de *Trichoderma*) (Cai y Druzhinina 2021). El valor de similitud entre la nueva especie y la cepa de referencia se muestra en el número del lado derecho de los árboles filogenéticos (Figura 12-17)

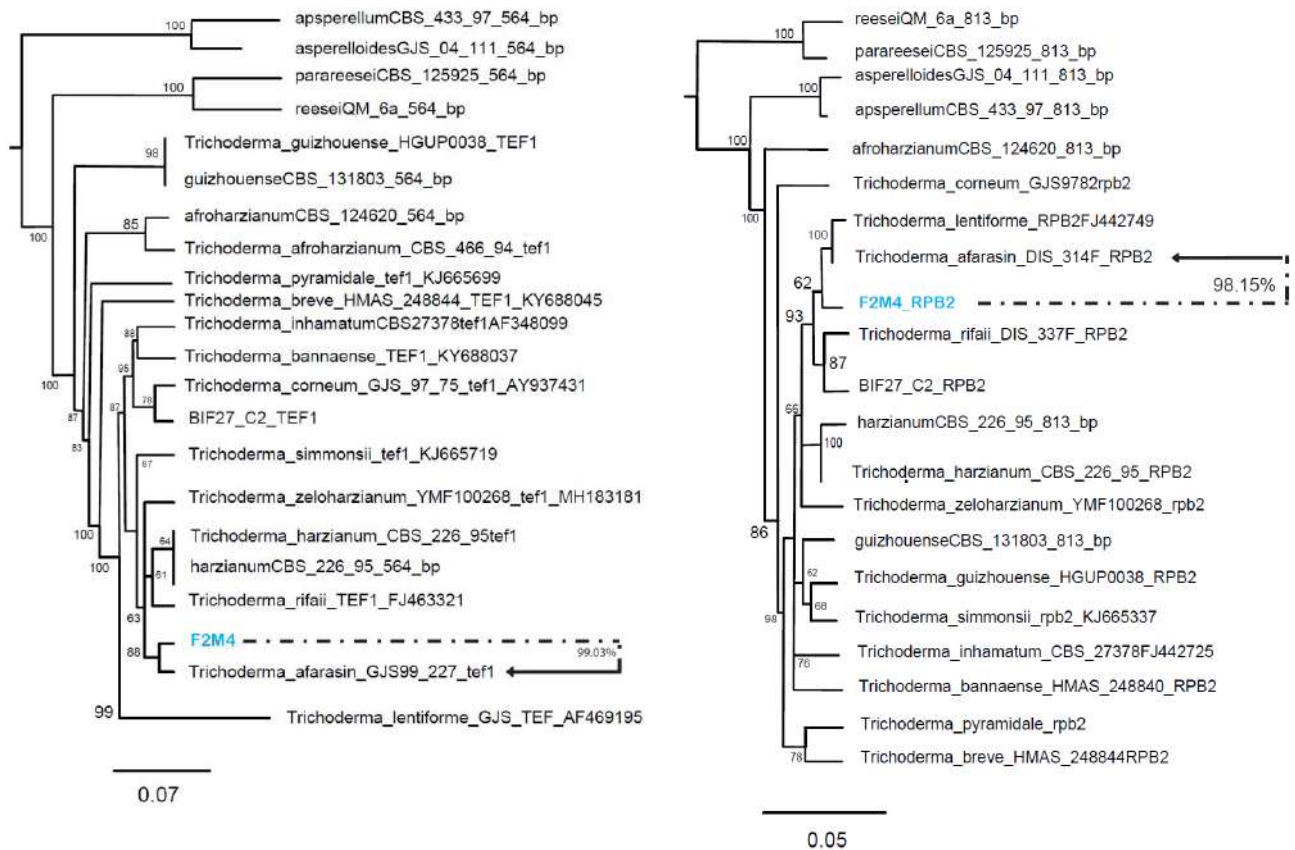
La filogenia de las especies seleccionadas de *Trichoderma* muestran la conformación de cinco grupos claramente diferenciados y distantes de sus parientes más cercanos (3 en clado Harzianum y 2 en clado Longibrachiatum), a saber, *Trichoderma* sp. 1: CNF7\_C2, BLPF1\_C4, BLPF1\_C3, BLPF4\_C3, CCF4\_C1 (Figura 12); *Trichoderma* sp. 2: CRSF6\_C, UJF1\_C1, UCF1\_C1 (Figura 12); *Trichoderma* sp 3: F2M4 (Figura 13); *Trichoderma* sp. 4: BIF26\_C1 (Figura 13); *Trichoderma* sp. 5: BIF18\_C1, CNF10\_C3, CTN3\_C3, CNF10\_C2, BIF7\_C2 (Figura 14). Sin embargo, estos resultados podrían ameritar estudios adicionales (manuscrito en elaboración) que incluye métodos con enfoque integrador como el de parsimonia estadística

[SPN], coalescente mixto generalizado [GMYC] y filogenética - filogeografía bayesiana [BPP], que permitirán delimitar las especies y reportar al menos cinco especies nuevas para la ciencia.



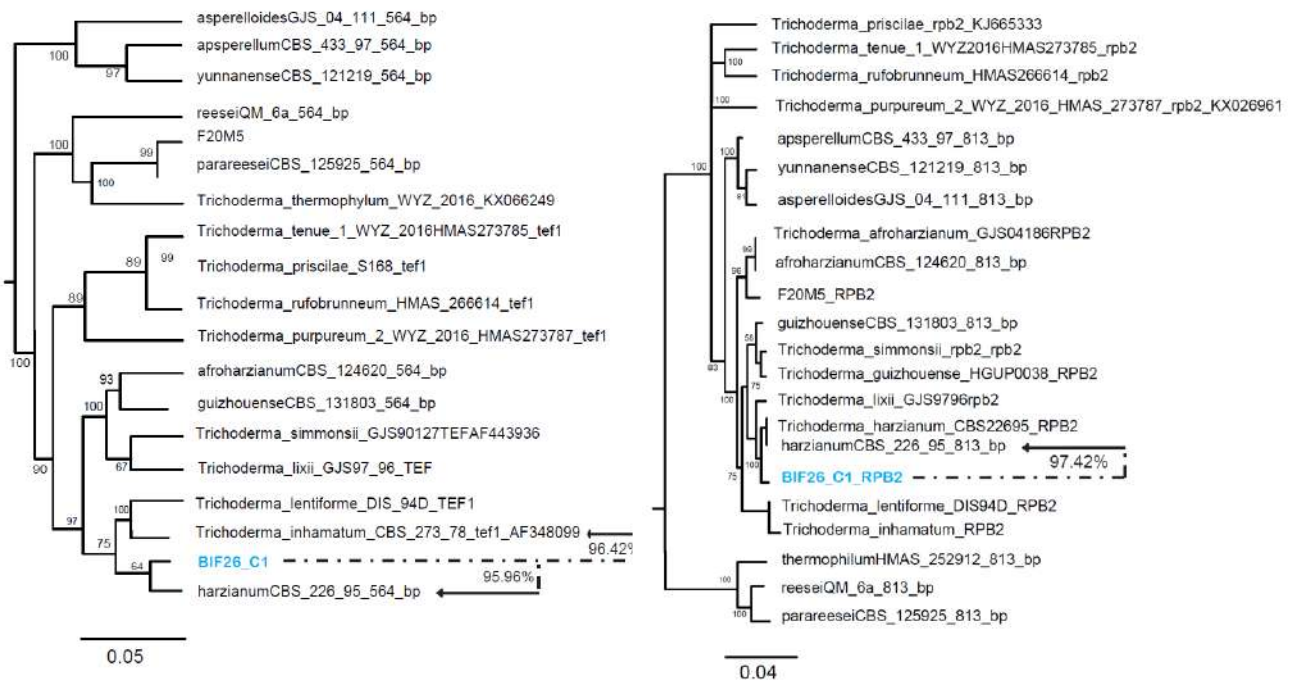
**Figura 12. Árbol filogenético para nuevas especies grupo 1 y 2, *Trichoderma* sp. 1: CNF7\_C2, BLPF1\_C4, BLPF1\_C3, BLPF4\_C3, CCF4\_C1 y *Trichoderma* sp. 2: CRSF6\_C, UJF1\_C1, UCF1\_C1, basado en el análisis de Máxima Verosimilitud del conjunto de datos *tef1* - $\alpha$  (izquierda) y *rpb2* (derecha)**

Los valores de Bootstrap de Máxima probabilidad y Máxima parsimonia se encuentran por encima del 50 por ciento (nodos). Los códigos de las nuevas especies propuestas aquí se indican en azul (*Trichoderma* sp. 1: CNF7\_C2, BLPF1\_C4, BLPF1\_C3, BLPF4\_C3, CCF4\_C1 y *Trichoderma* sp. 2: CRSF6\_C, UJF1\_C1, UCF1\_C1). Todas las cepas sometidas a comparación corresponden a cepas tipo. Los resultados de comparación de la similitud de secuencia por pares se ilustran en las líneas discontinuas entre la cepa de consulta y sus especies estrechamente relacionadas (las flechas apuntan a las cepas de referencia).



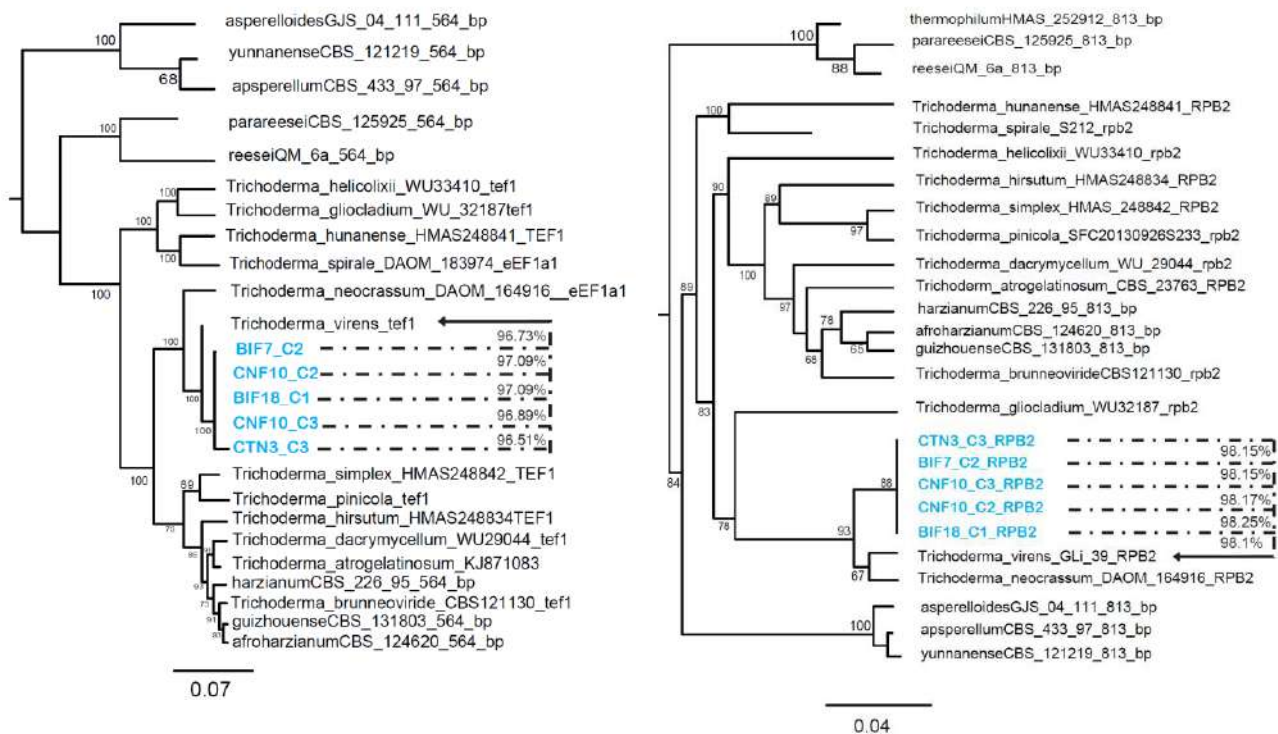
**Figura 13. Árbol filogenético para nuevas especies grupo 3, especie sp. 3, basado en el análisis de Máxima Verosimilitud del conjunto de datos tef1 - $\alpha$  (izquierda) y rpb2 (derecha)**

Los valores de Bootstrap de Máxima probabilidad y Máxima parsimonia se encuentran por encima del 50 por ciento (nodos). Los códigos de las nuevas especies propuestas aquí se indican en azul, resaltando a un único aislado F2M4. La topología de los arboles filogenéticos realizados con tef y rpb2 concuerdan con el protocolo (Cai & Druzhinina 2021), aunque con algunas mínimas diferencias. Todas las cepas sometidas a comparación corresponden a cepas tipo. Los resultados de comparación de la similitud de secuencia por pares se ilustran en las líneas discontinuas entre la cepa de consulta y sus especies estrechamente relacionadas (las flechas apuntan a las cepas de referencia).



**Figura 14. Árbol filogenético para nuevas especies grupo 4, *Trichoderma* sp. 4, basado en el análisis de Máxima Verosimilitud del conjunto de datos *tef1-α* (izquierda) y *rpb2* (derecha)**

Los valores de Bootstrap de Máxima probabilidad y Máxima parsimonia se encuentran por encima del 50 por ciento (nodos). Los códigos de las nuevas especies propuestas aquí se indican en azul, resaltando a un único aislado BIF26\_C1. La topología de los árboles filogenéticos realizados con *tef1-α* (izquierda) y *rpb2* (derecha) concuerdan con el protocolo (Cai & Druzhinina 2021), aunque con algunas mínimas diferencias. Nótese también la topología diferente para el aislado F20M5, cuya identificación fue ambigua. Todas las cepas sometidas a comparación corresponden a cepas tipo. Los resultados de comparación de la similitud de secuencia por pares se ilustran en las líneas discontinuas entre la cepa de consulta y sus especies estrechamente relacionadas (las flechas apuntan a las cepas de referencia).



**Figura 15. Árbol filogenético para nuevas especies grupo 5, especie sp. 5, representado por BIF18\_C1, CNF10\_C3, CTN3\_C3, CNF10\_C2, BIF7\_C2 y basado en el análisis de Máxima Verosimilitud del conjunto de datos *tef1-α* (izquierda) y *rpb2* (derecha)**

Los valores de Bootstrap de Máxima probabilidad y Máxima parsimonia se encuentran por encima del 50 por ciento (nodos). Los códigos de las nuevas especies propuestas aquí se indican en azul. La topología de los árboles filogenéticos realizados con *tef1-α* (izquierda) y *rpb2* (derecha) concuerdan con el protocolo (Cai & Druzhinina 2021), aunque con algunas mínimas diferencias. Todas las cepas sometidas a comparación corresponden a cepas tipo. Los resultados de comparación de la similitud de secuencia por pares se ilustran en las líneas discontinuas entre la cepa de consulta y sus especies estrechamente relacionadas (las flechas apuntan a las cepas de referencia).

Finalmente, y respecto a las cepas con problemas de ambigüedad a la hora de su identificación por el método de similitud por pares, la filogenia para 13 aislados : UCPF2\_C1, UCPF3\_C1, UCF19A\_C2, UCF19A\_C1, IP3M1\_C4, F20M5, CRSF5\_C1, CCF2\_C2, BLPF1\_C2,

BLPF1\_C2, BIF27\_C2, BIF5\_C3, BIF2\_C2, BBF1\_C1, no ha podido descifrarse su identificación debido a que la topología de los árboles filogenéticos realizados con *tef* y *rpb2* no concuerdan con el protocolo, específicamente con el paso 3 (Cai & Druzhinina 2021); consecuentemente y de acuerdo al protocolo de comparación de similitud por pares, estas son identificadas como: T . Sp. UCPF2\_C1, T . Sp. UCPF3\_C1, T . Sp. UCF19A\_C1, T . Sp. IP3M1\_C4, T . Sp. F20M5, T . Sp. CRSF5\_C1, T . Sp. CCF2\_C2, T . Sp. BLPF1\_C2, T . Sp. BIF27\_C2, T . Sp. BIF5\_C3, T . Sp. BIF2\_C2, T . Sp. BBF1\_C1.

Partiendo de la premisa que el género hiperdiverso *Trichoderma* es un grupo de microorganismos de mayor utilidad para un sin número de actividades humanas y consecuentemente su correcta identificación es crucial (Druzhinina *et al.* 2010). La taxonomía de estos hongos se encuentra en constante actualización y ha encontrado en la filogenia y comparaciones morfológicas entre especies estrechamente relacionadas a las herramientas más utilizadas en estos tiempos (Zhan *et al.* 2022; Barrera *et al.* 2021; Bustamante *et al.* 2021; Gu *et al.* 2020); entonces estamos en tiempos de taxonomía moderna, y al menos para grupos taxonómicos dados, nos enrumbamos hacia el establecimiento de listas autorizadas globales de especies que asumen los principios básicos y estandarizados de reconocimiento de especies, bajo este concepto se pone a prueba la metodología de comparación de similitud por pares (Cai & Druzhinina 2021), sostenido en un inventario completo de todas las especies de *Trichoderma* identificadas a julio del 2020 y el material de códigos de barras de ADN depositado en bases de datos públicas que ha permitido la identificación de 234 aislamientos agrupados en 19 especies, cinco de las cuales podrían ser nuevas especies (manuscrito en proceso de elaboración). El protocolo de comparación de similitud por pares, ha permitido en corto tiempo y a partir de tres marcadores moleculares ITS, *tef1* y *rpb2* y respaldados por herramientas en línea, la identificación de una extensa diversidad de especies del género *Trichoderma*.

#### **4.1.2. Identificación morfológica**

La identificación morfológica de especies de *Trichoderma* es una acción complementaria a la identificación genética de especies (Cai & Druzhinina 2021); diversos trabajos de identificación de especies han priorizado las herramientas moleculares, y como segunda opción y de soporte,



la caracterización morfológica de especies (Barrera *et al.* 2021; Bustamante *et al.* 2021; Gu *et al.* 2020; Jang *et al.* 2017). Con la finalidad de corroborar los rasgos morfológicos para cada especie identificada mediante los códigos de ADN y protocolo de identificación molecular de comparación de similitud por pares, se realizó la caracterización a nivel morfológico macro y microscópico de cada uno de los 234 aislados de *Trichoderma* obtenidos en el presente estudio. Estos resultados están estructurados en base a los grupos genéticos y/o taxas identificadas en la primera etapa de esta investigación.

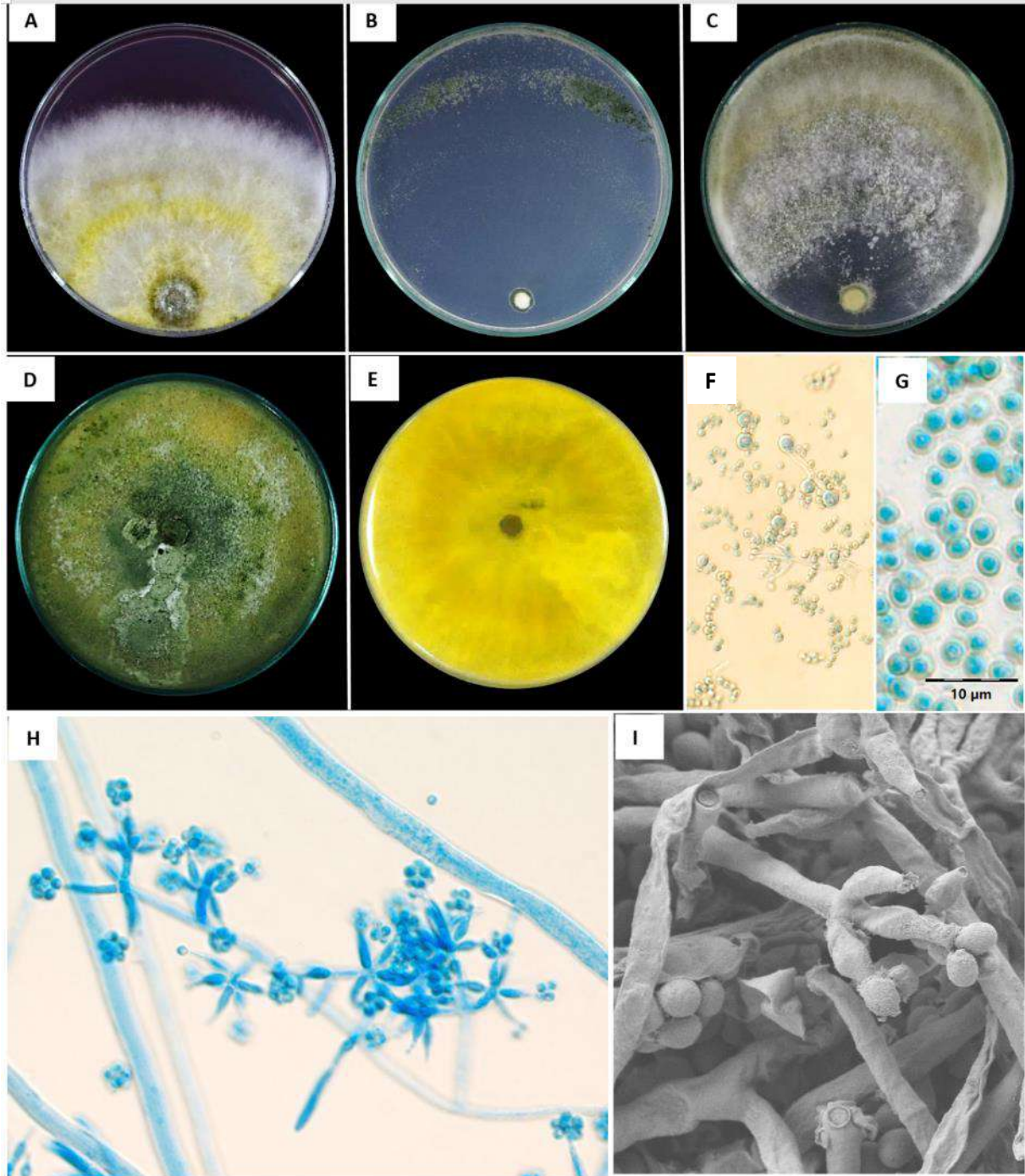
*Trichoderma afroharzianum* P. Chaverri, F.B. Rocha, Degenkolb & I. Druzhinina, sp. nov.

La etimología del nombre hace referencia a un “hongo similar a *T. harzianum*” fue encontrado originalmente en África (Chaverri *et al.* 2015b). En el presente estudio se utilizó como tipo de referencia (dry culture) (BPI 881096), Ex-type: G.J.S. 04-186 = CBS 124620 y como secuencias representativas tef1: FJ463301, FJ463401, AF469194; rpb2: FJ442691, FJ442726., las mismas que a partir del protocolo de comparación de similitud por pares (Cai & Druzhinina 2021), permitió la identificación de 69 aislados (Cuadro 5) como cepas pertenecientes a la especie *T. afroharzianum*. Presentes en el suelo del agroecosistema de cacao nativo Amazonas Perú; casualmente, el tipo representativo (BPI 881096) para la especie fue tipificada sobre *M. roreri* (*T. cacao*) y recuperada de Junín, Perú; estos hábitats son similares y confirman de cierto modo la presencia de esta especie en el norte del Perú. La presencia de *T. afroharzianum* en esta parte del Perú, además es respaldada por (Bustamante *et al.* 2019) quienes también reportan su existencia en el mismo hábitat (agroecosistema de cacao) y región que las del presente estudio.

Por otro lado, en el Cuadro 5 y con referencia a las características del cultivo, *T. afroharzianum*, alcanzó, después de 72 h y a 28°C, un radio de colonia en medio PDA de 51-66 mm y en SNA de 42-52 mm. Se evidencia, además, presencia de micelio aéreo abundante y radiante (Figura 16) tanto el medio RBA y PDA (desde las 96 horas, siendo más evidente a los siete días de cultivo); posee conidiación abundante, formando tres anillos concéntricos alrededor del punto de inoculación. La colonia en siete días luce una coloración más verdosa en punto de inoculación a verdosa amarillenta hacia los bordes de la placa, además en reverso de placa Petri se deja notar una pigmentación amarilla. En CMD el micelio es escaso. Por otro lado, los conidióforos forman

una apariencia piramidal, las fialides son lageniforme y ampuliforme con dimensiones promedio de entre 3,5 -17,5 x 2,3 - 4,1  $\mu\text{m}$ , para largo y ancho, respectivamente. Por otro lado, los conidios son sub globosos a ovoides con dimensiones promedio de 2,7- 3.5 x 2,5 - 3,3  $\mu\text{m}$ , para largo/ancho, respectivamente, son de coloración verde y lisos en su superficie. Además, raramente encontramos clamidosporas. Estos resultados son muy similares a los reportados por Chaverri *et al.* (2015) y Jang *et al.* (2017), aunque con algunas variaciones de color de pigmentación en placa, lo que hace pensar que esta variable es diferente en cada cultivo en placa; además podrían darse otras diferencias, como por ejemplo en el tamaño de crecimiento radial, puesto que existe una diferencia de 1 mm de crecimiento mayor para el medio PDA avistado en el presente estudio, lo que se debería a los 3°C de temperatura adicionales, en el presente estudio.

*Trichoderma afroharzianum* ha sido aislado del suelo, raíces y otros hongos, posiblemente con propiedades fungicolas (Chaverri & Samuels 2013), posee una amplia distribución geográfica y aunque no existía descripción alguna, en el año 2010 ya se introdujo el nombre de *T. afroharzianum* (Druzhinina *et al.* 2010) en el Perú, es reportada en el año 2021 (Bustamante *et al.* 2021) . Esta especie tiene las fialides más largas del complejo o clado Harzianum (Jang *et al.* 2017), lo que también se corrobora en el presente estudio. Además, es preciso señalar que *T. afroharzianum* a pasado por un proceso de reclasificación pues hasta antes del 2015, se consideraba la cepa T22 (*T. harzianum*), una de las más conocidas en el mundo (Haouhach *et al.* 2020), que posteriormente y con ayuda de herramientas moleculares pasó a ser correctamente identificada como *T. afroharzianum* (Chaverri *et al.* 2015; Jang *et al.* 2017). En el presente estudio y sobre una estructura de análisis molecular reportamos la presencia de *T. afroharzianum* y la ausencia de *T. harzianum*. Actualmente las especies del *Trichoderma* spp. se usan para el biocontrol de fitopatógenos, debido a sus diversos mecanismos de acción, la cepa de *T. afroharzianum* anteriormente *T. harzianum* T22, es usado como un bioinsumo agrícola en cultivos de hortalizas, cultivos leñosos a nivel de invernadero y campo. Estos antecedentes orientan que en el presente estudio, al menos una cepa local de esta especie sean considerada en el proceso de búsqueda de antagonistas de la MC.



**Figura 16. *Trichoderma afroharzianum* (CNF12\_C1). Cultivo a 28°C después de siete días (A en CMD, B en RBA, C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo a 28°C + 12 horas luz, en anverso de placa.; E: Pigmentación de colonia de siete días de cultivo a 28°C + 12 horas luz, en reverso de placa.; F: Clamidosporas.; G: Conidios.; H: Fialides y conidióforos.; I: Imagen de fialides y espora en microscopio de barrido.**

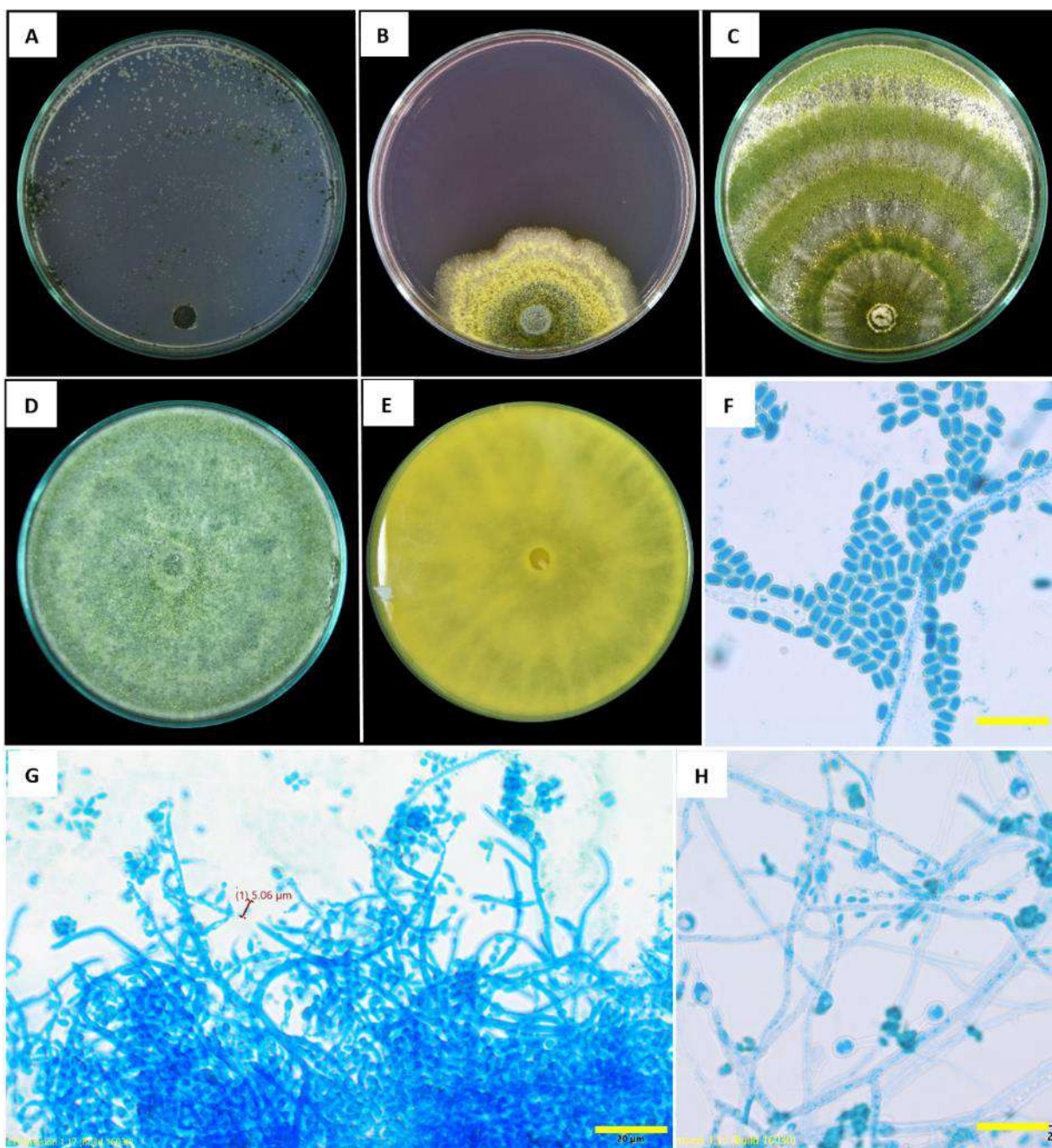
*Trichoderma parareesei* Atanasova, Jaklitsch, Komon-Zelazowska., C.P. Kubicek & Druzhinina

Filogenéticamente *Trichoderma parareesei* pertenece al clado de Longibrachiatum siendo parte de las especies putativas de *Trichoderma reesei*, *Trichoderma orientalis* y *Trichoderma longibrachiatum* (Hinterdobler *et al.* 2021). Esta especie es hermana de *Hypocrea jecorina* y comparte un ancestro en común con *Trichoderma reesei* (Kubicek *et al.* 2019).

La Figura 17, referencia a las estructuras macro y microscópicas que presenta esta especie; se deja notar que en medio CMD y SNA, a 28°C, 12 horas de fotoperiodo, las placas fueron totalmente cubiertas a los 3 días de cultivo; el crecimiento es muy lento en RBA inclusive a los siete días; el crecimiento de la colonia fue de 58-65 µm, a las 72 horas en medio PDA y 47-52 µm en medio SNA; se observó un micelio denso concentrado en el agar. La colonia presenta una coloración verde oliva (medio PDA a siete días), así como una pigmentación amarillenta verdosa en el reverso de la placa (Figura 17). Se observan la presencia de clamidosporas globosas a piriformes, aunque no se observaron en todos los aislados. Estas características morfológicas descritas confirman los resultados respecto a la identificación de la especie a partir de herramientas moleculares en la cual, se utilizó como cepa de referencia (type) a CBS 125925, aislado de las Cataratas del Iguazú, Argentina (1997) y secuencias representativas para tef1: GQ354353 y rpb2: HM182963, lo que permitió identificar y corroborar morfológicamente un total de 33 aislados, a saber: UJF2\_C2, UJF2\_C1, UCMF2\_C4, UCF18\_M3, UCF17\_M1, UCF7\_M4, F9M4, F9M3, CRSF6\_C2, CRSF3\_C2, CRSF1\_C2, CRSF1\_C5, CNF16\_C1, CNF15\_C4, CNF7\_C3, CNF7\_C1, CNF4\_C2, CNF4\_C1, CNF3\_C1, CNF1\_C2, CMF1\_C1, CCF5\_C5, CCF5\_C2, BMF19\_C4, BMF15\_C5, BMF1\_C1, BIF27\_C1, BIF20\_C2, BIF4\_C2, BIF1\_C2, BBF4\_C4, BBF4\_C2, BIF13\_C1 como cepas de la especie *T. parareesei*. Los resultados aquí expuestos son similares a los descritos para la especie por Atanasova *et al.* (2010). Por otro lado, esta especie, ha sido aislada del suelo y reportada áreas subtropicales y tropicales en América del Sur (Brasil, Argentina, Colombia), América Central (México), África (Ghana y Etiopía) e India (Druzhinina *et al.* 2010; Druzhinina *et al.* 2011); en el Perú se reporta en el año 2021 (Bustamante *et al.* 2021). Otros de los reportes indican que la especie fue encontrada en suelos de la palma aceitera africana (*Elaeis guineensis*) en América del Sur (Hoyos-Carvajal *et al.* 2009), además, Błaszczyk *et al.* (2016) reportaron que en las piezas de madera en descomposición es uno de los hábitats con mayor índice de presencia de *H. jecorina* mientras que *Trichoderma parareesei* solo se han reportado

aislamientos de suelos. A estos hallazgos, se suman los nuestros, haciendo referencia que esta especie fue encontrada en suelos de *T. cacao* en Amazonas, Perú.

Por otro lado, *Trichoderma parareesei* era identificada como cepa Anamórfica T6 de *Trichoderma reesei* (Rubio *et al.* 2014), empleada en el control biológico con efectos positivos en la interacción microorganismo - planta, contribuyendo al desarrollo radicular e inducción a la resistencia sistémica inducida y la promoción de crecimiento bajo condiciones de estrés salino (Atanasova *et al.* 2013) respecto al control biológico, dentro de sus características a destacar se encuentra su capacidad de mico parasitismo (Rubio *et al.* 2014); En aplicaciones agrícolas demostró un efecto inhibitorio sobre fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea* y *Pythium irregularulare* en plántulas de tomate (Poveda 2020). Además, a nivel industrial demostraron ser productoras de enzimas de celulasas y una especie de reciente descubrimiento por lo cual se estima que aún no se ha descubierto todo su potencial (Pérez *et al.* 2015), presenta características similares al ancestro de *Trichoderma reesei*, sin embargo, este no presenta capacidad de control biológico; siendo un hongo oportunista al ambiente (Atanasova *et al.* 2013). Estas características pueden ser tomadas en cuenta en nuestro proceso de selección de especies a partir del comportamiento de micoparasitismo sobre *M. roreri.*, la moniliasis del cacao.

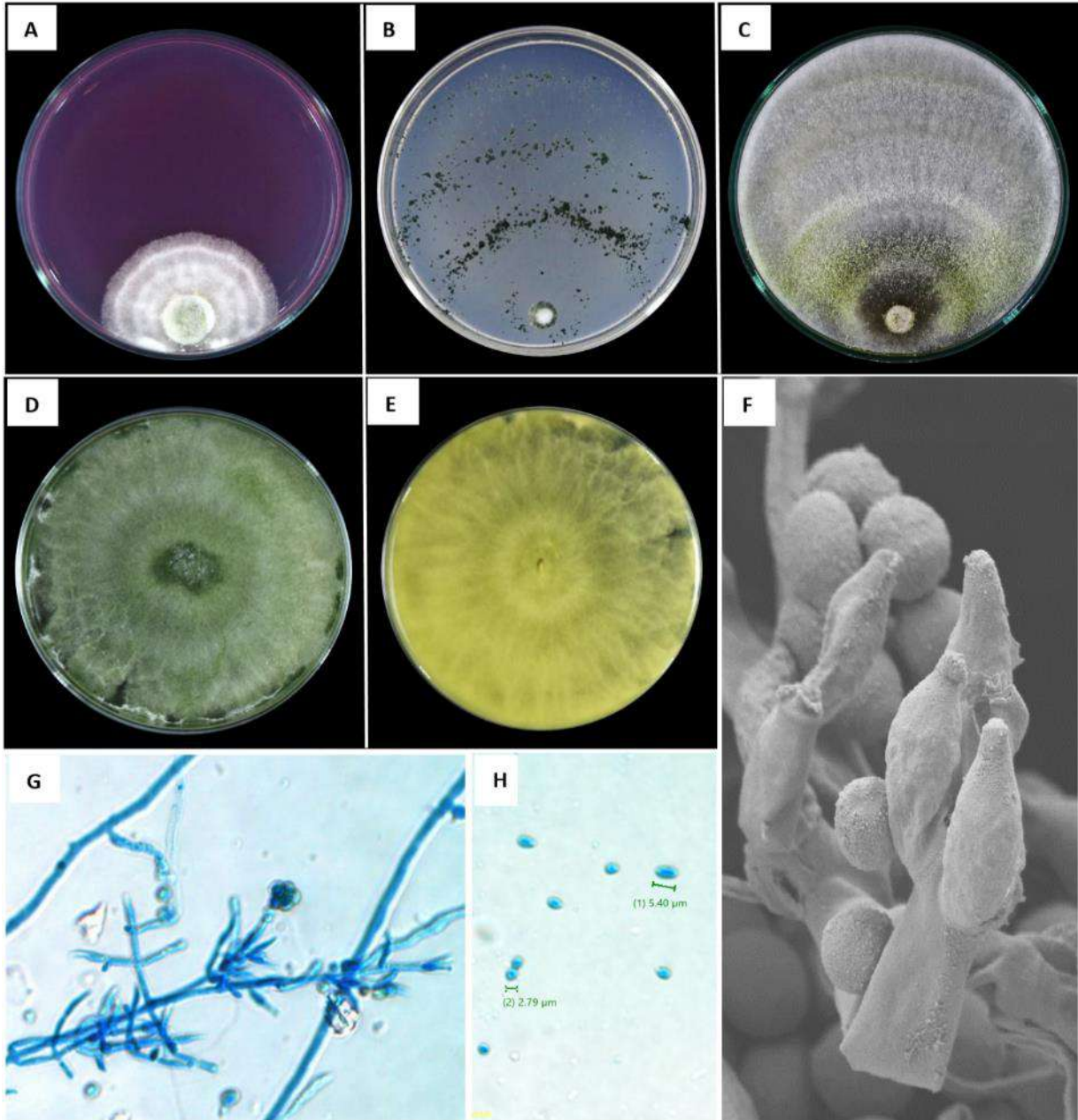


**Figura 17. *Trichoderma parareesei* (UJF2\_C1). Cultivo a 28°C después de siete días (A en CMD, B en RBA, C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo a 28°C + 12 horas luz, en anverso de placa.; E: Pigmentación de colonia de siete días de cultivo a 28°C + 12 horas luz, en reverso de placa.; F: Conidios.; G: Conidióforos y fialides.; H: Clamidosporas. Barras a escala de 20 μm**

### *Trichoderma reesei* E.G. Simmons

Respecto a esta especie (Figura 18), los resultados encontrados en el presente estudio sugieren que después de 72 horas, a 28°C y a 12 horas de Fotoperiodo, en medio PDA, la colonia presentó un crecimiento de 53-59 mm, en medio SNA de 48-51 mm. Por otro lado, dentro de los siete días de cultivo, las colonias ya han cubierto por completo la placa Petri de 90 mm de diámetro, se observa micelio abundante, originando una coloración de colonia verde oliva, con 2 o tres anillos concéntricos, presentando además una pigmentación de amarillenta opaca en el reverso de placa. En medio RBA, la colonia es incolora y presenta un limitado crecimiento inferior a 30 mm. Las fialides son ligeramente más largas que *T. parareesei*, de forma ampuliforme (forma de botellas) de 3.9 - 10.3  $\mu\text{m}$  x 2.1 - 3.6  $\mu\text{m}$  (medidas promedio de 5.1 x 3.4  $\mu\text{m}$ ). Además, se encontraron conidios menos abundantes que *T. parareesei*, globosos y también sub globosos y ovoides (Figura 18H) de 2.1 - 3.6  $\mu\text{m}$  x 2.1 - 3.1  $\mu\text{m}$  (largo/ancho, respectivamente). No se encontraron clamidosporas. Estas características morfológicas son similares a las reportadas por (Hinterdobler *et al.* 2021) lo que respaldan nuestros hallazgos y confirman la identificación a partir de los códigos de ADN y protocolo de comparación de similitud por pares (Druzhinina *et al.* 2012) donde se utilizó el type de referencia QM 6a = CBS 383.79 y secuencias representativas para tef1: AF401004, rpb2: HM182969. Permitiéndonos identificar a 22 aislados (UCM2\_C1, UCF7\_M2, F7M2, CTN3\_C1, CRSF2\_C3, CRSF1\_C4, CRSF1\_C3, CNF20\_C1, CNF8\_C1, CNF5\_C1, CCF6\_C1, CCF3\_C1, CB04\_C2, CB04\_C1, BPF3\_C1, BIF15\_C1, BIF8\_C2, BIF5\_C4, BIF4\_C1, BIF3\_C2, BIF3\_C1, BIF2\_C3), como *T. reesei*. Los resultados respecto a la morfología de *T. reesei* guardan similitud con los reportados por Atanasova *et al.* (2010) quienes en su trabajo denominado: Especie Clonal *Trichoderma parareesei* sp. nov. Probablemente se parece al antepasado del productor de celulasa *Hypocrea jecorina/T. reesei* estudio en el que realizan un análisis profundo respecto a la ascendencia y diferencias de la especie *T. parareesei*. *T. reesei*, pertenece a la sección Longibrachiatum y es el amorfo del ascomiceto *Hypocrea jecorina*; la misma que se encuentra estrechamente relacionada con *T. parareesei* (Druzhinina *et al.* 2010). En el 2014, Samuels (2014) propone que se conserve el nombre de *T. reesei* sobre *H. jecorina* por ser el más utilizado. Posee un amplio historial como microorganismo de uso industrial (biotecnológica para la producción de enzimas celulolíticas y biocombustibles) (Kumar *et al.* 2008). Fue recolectada inicialmente durante la segunda Guerra Mundial, donde se reportaron haber destruido lienzos y otros materiales que contenían celulosa,

del ejército de los EE. UU (Atanasova *et al.* 2010), específicamente de las Islas Salomón (Oceanía). A sido reportada como una especie pantropical del suelo, aspecto que relaciona su existencia y/o presencia en el suelo del agroecosistema de cacao nativo Amazonas, Perú.



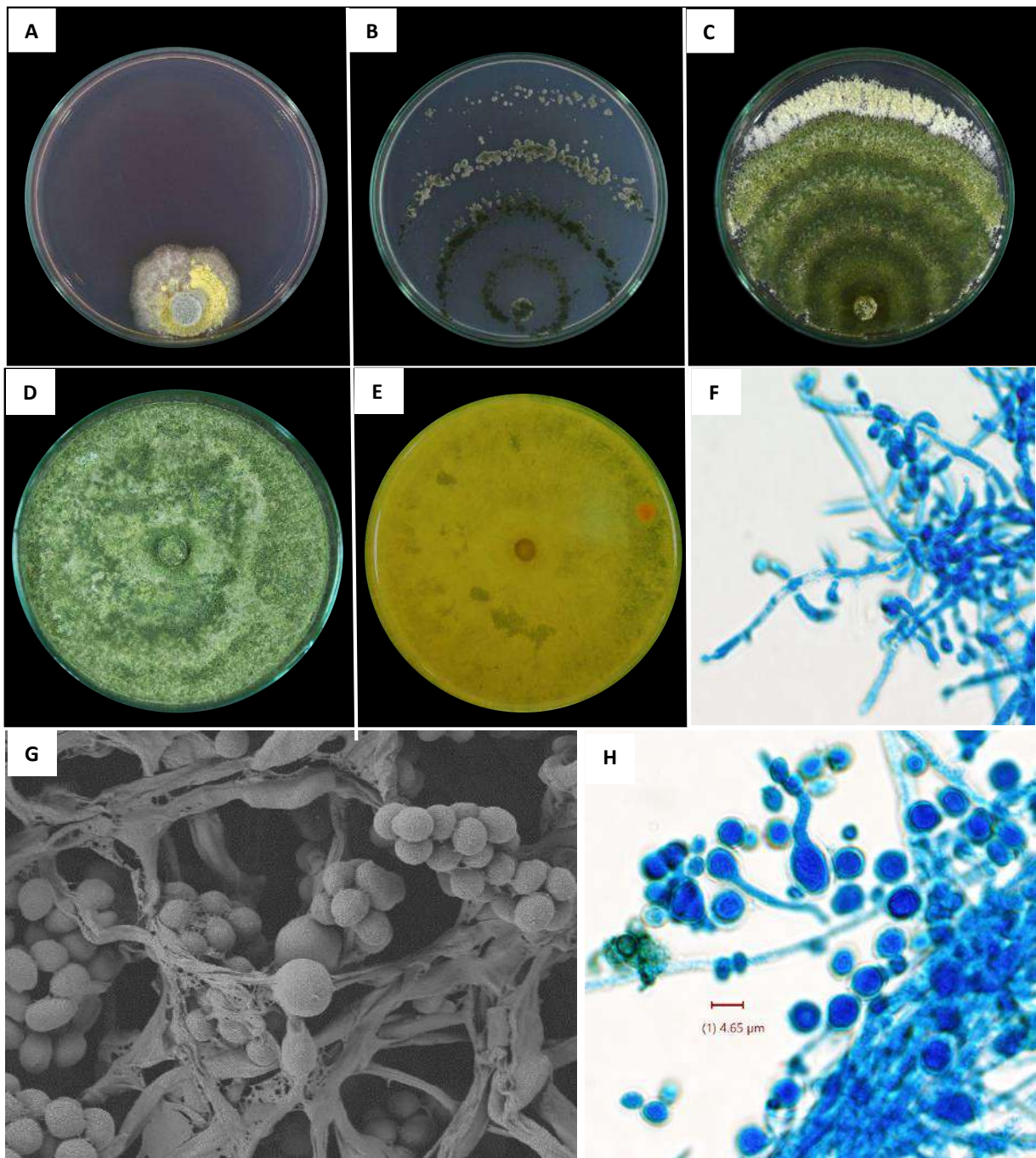
**Figura 18. *Trichoderma reesei* (CNF5\_C1). Cultivo a 28°C después de 7 días (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo en PDA a 28°C + 12 horas luz, en anverso de placa.; E: Pigmentación de colonia en reverso de placa.; F: Fialides y conidios.; G: Fialides y conidióforos.; H: Conidios tomados en microscopio Olympus IX 83 invertido**



### *Trichoderma longibrachiatum* Rifai

Respecto a las características morfológicas, los resultados encontrados en el presente estudio dan a saber que después de 72 horas de cultivo a 28°C y a 12 horas de fotoperiodo, esta especie alcanza un crecimiento de colonia promedio de 52-60 mm en medio PDA; en medio SNA, fue de 45-53 mm y en medio RBA de 18-25 mm. Cuando las colonias tuvieron siete días, en medio PDA, se observa una coloración verde con manchas blanquizas o verde más claro, al reverso de la placa se puede notar una pigmentación amarilla intensa (Figura 19); en medio SNA, se observa una formación de al menos 4 anillos concéntricos alrededor del disco que dio origen a la colonia. Por otro lado, presentó fialides lageniformes de 4,6-13,8 µm x 2,0-3,3 µm (proporción, largo/ancho) y conidiación densa con conidios ovoides de 3,3-4,6 x 2,3-3,4 µm. Además, se encontraron clamidosporas y no se evidencia olor distintivo de la colonia. Estas características son similares a las reportadas por Bissett (1984) y ratificadas por Park *et al.* (2005), por lo que complementado a los resultados de la identificación molecular, para la cual se utilizó como holotype para comparación de similitud con sus pares más cercanos a CBS 816.68 = ATCC 18648, y secuencias de referencia para *tef1*: EU401591 y *rpb2*: DQ087242, se concreta la identificación de 20 aislados (UCPF4\_C2, UCPF1\_C1, UCMF3\_C1, UCF21\_C1, UCF17\_M4, UCF14\_C1, UCF10A\_C1, UCF7\_M5, UCF5A\_C2, UCF5A\_C1, UBGF1\_C1, F21M5, F18M2, F17M4, F14M3, F1M3, BIF7\_C3, BBF3\_C1, UCMF2\_C3, BBF1\_C2) como *Trichoderma longibrachiatum*.

Por otro lado, esta especie representa el clado Longibrachiatum, el mismo que está conformado por 21 especies (Samuels *et al.* 2012). Además, se ha reportado que vive en el suelo, de presencia cosmopolita y preferentemente en las zonas tropicales, lo que permite ratificar la presencia de esta especie en el suelo de *T. cacao*.

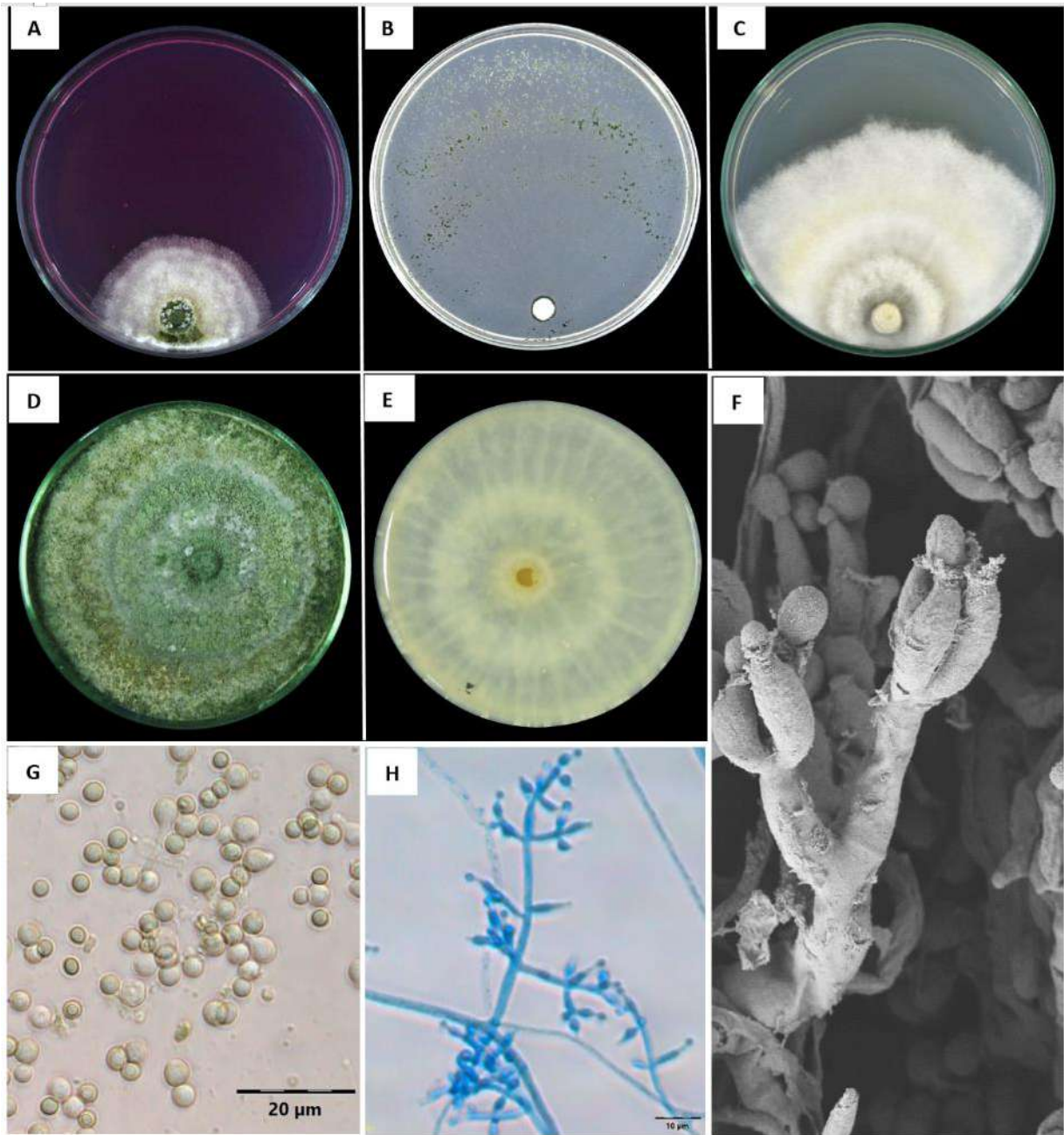


**Figura 19.** *Trichoderma longibrachiatum* (UCF5A\_C1). Cultivo a 28°C después de siete días (A en RBA, B en CMD, C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo a 28°C + 12 horas luz, en anverso de placa.; E: Pigmentación de colonia de siete días en reverso de placa.; F: Conidióforos y fialides.; G: Clamidosporas y conidios.; H: Clamidosporas y conidios

*Trichoderma lentiforme* (Rehm) Chaverri, Samuels & Rocha

La Figura 20 hace referencia a las características morfológicas que muestra esta especie. A las 72 horas de cultivo a 28°C en medio de cultivo PDA, alcanzó un radio de colonia de 55-63 mm, en SNA fue menor con 30-39 mm. Por otro lado, en PDA y bajo un fotoperiodo de 12 horas, presentó abundante micelio algodonoso, presentó además se encontró conidios abundantes dispuestos en anillos concéntricos anchos, coloración de colonia verde con algunas puntuaciones marrones concéntricas, además de una pigmentación verde pálido a grisáceo en el reverso de la placa (Figura 20E). En SNA, no se observó pigmentación; por otro lado, se observaron fialides ampuliformes además de lageniforme y obpiriforme con una longitud promedio de 4,2 - 6,5  $\mu\text{m}$  x 3,1 - 3,9  $\mu\text{m}$  de ancho, pudiéndose encontrar de hasta 12  $\mu\text{m}$  de longitud por 5  $\mu\text{m}$  de ancho. Presenta conidios globosos a sub globosos y en menos frecuencia, conidios ovoides, con longitud promedio de 2,5-3,2 x 2,5-2,7  $\mu\text{m}$  de ancho. Además, no se reportan la presencia de clamidosporas.

*T. lentiforme* es una especie que ha sido aislada como endofítico en tallos de árboles tropicales además del suelo (hábitat), posee una distribución geográfica Neotropical (Región tropical del continente Americano), lo que respalda nuestros hallazgos en el presente estudio, donde a partir del uso de herramientas moleculares (como type referencial de acuerdo a protocolo fue isotypus HBG #812 Ex-epitype: G.J.S. 98-6 = CBS 100542) y se usaron como secuencias representativas *tef1*: AF443931, AF469195; *rpb2*: FJ442749, FJ442687) se identificaron 16 aislados pertenecientes a esta especie (UCF5\_M1, IP3M2\_C4, IP3M2\_C3, F5M4, CNF21\_C2, CNF12\_C2, BLPF2\_C2, BIF25\_M2, BIF12\_C1, BIF11\_C2, BIF11\_C1, BIF10\_C2, BIF1\_C4, AP1M5\_C1, AP1M4\_C1, UCF3\_M5); además, las características morfológicas de esos aislados son idénticas a las reportadas por Chaverri *et al.* (2015) cuando realizan un reordenamiento del clado Harzianum. La identificación de esta especie sugiere ser el primer reporte para el País.



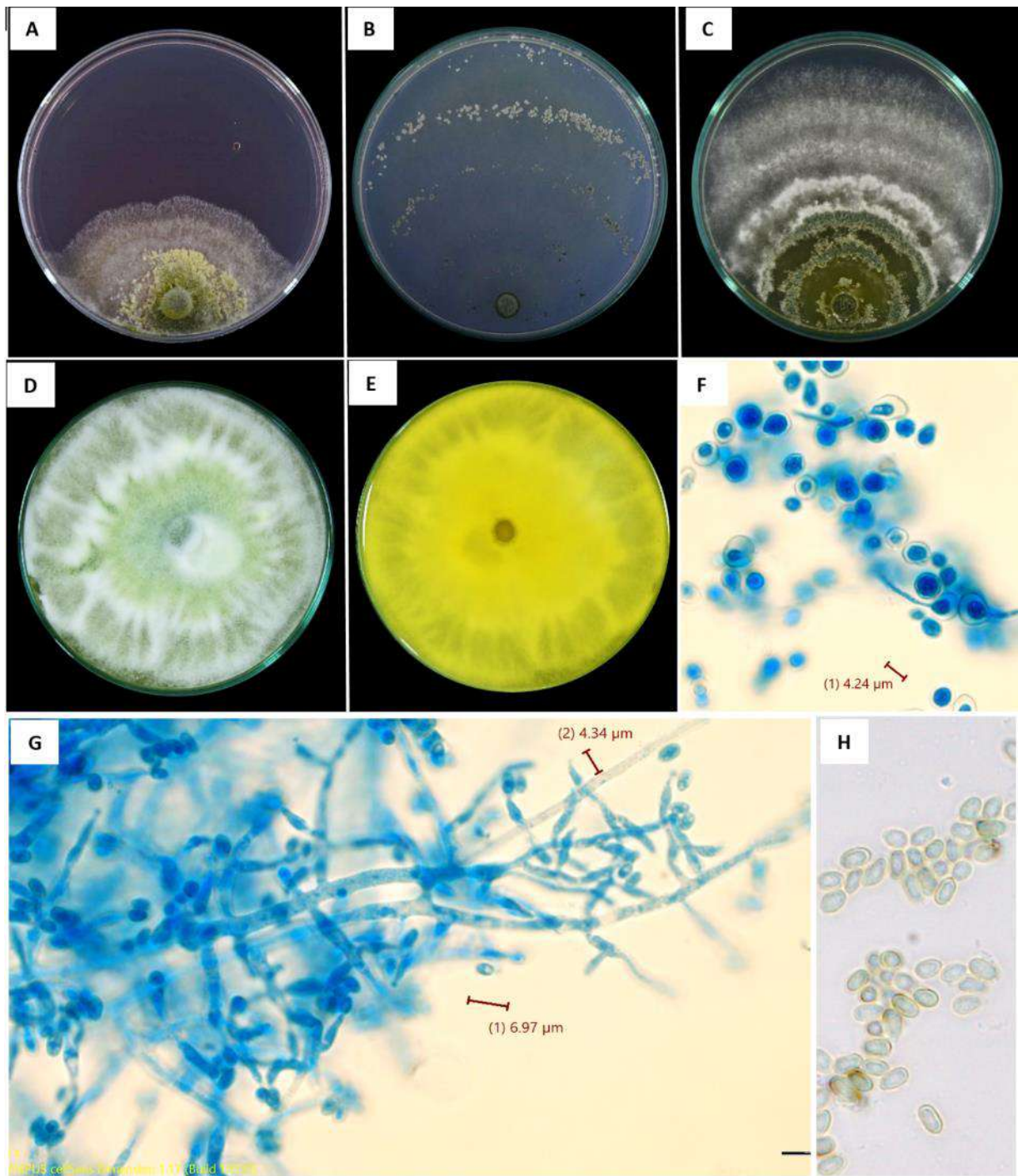
**Figura 20. *Trichoderma lentiforme* (BIF12\_C1). Cultivo a 28°C después de 7 días (A en CMD, B en RBA, C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo en anverso de placa.; E: Pigmentación de colonia en reverso de placa.; F: Imagen en microscopía electrónica para fialides y conidios.; G: Conidios en medio sin tinción.; H: Conidióforos y fialides en azul de metileno**

*Trichoderma orientale* (Samuels & Petrini) Jaklitsch & Samuels

La Figura 21 muestra algunas de las características morfológicas más resaltantes para la especie; los cultivos a 28°C y después de 72 horas, en medio PDA, indicaron que existió un crecimiento de la colonia de 47-56 mm; y en medio SNA de 39-44 mm, además en medio RBA, fue menor de 22 mm. A los siete días, solamente en el medio CMD, se cubre la placa al 100 por ciento, aunque con una formación de escaso micelio aéreo, la formación de los conidios se produce en varios anillos concéntricos con tonalidad verde a blanca (zona de crecimiento), más visible en SNA. Por otro lado, en medio de cultivo PDA, se observó micelio aéreo algodonoso, además de la formación de conidios en amplios anillos partidos y concéntricos, generando una coloración verde claro con segmentos blanquecinos estrellados en la colonia y en el reverso de la placa se observa una difusión de pigmento amarillo algo pálido. No se identificó algún olor distintivo.

Además, se observaron fialides cilíndricas, de 7-11,9 µm de largo y 2- 4,1 µm de ancho (en la parte más ancha). Los conidios oblongos a elipsoidales y lisos, de 3,4 - 4,6 × 2,3 - 3,1 µm. Raramente se observaron clamidosporas. Por otro lado y con respecto a estas características, Jang *et al.* (2017) reportan morfología similar para *T. orientale* lo que permite y/o contribuye que en este estudio confirmemos la presencia de esta especie. Los resultados aquí encontrados, junto a los referidos a la caracterización molecular, en donde se utilizó el Holotype BPI 1109853 y las secuencias de referencia *tef1*: EU401581 y *rpb2*: JQ685884 (Bissett *et al.* 2015; Druzhinina *et al.* 2012), quienes confirman que al menos 13 de los aislados (UJF3\_C4, UJF3\_C2, CNF1\_C1, UCF18A\_C3, UCF18A\_C1, UCF1A\_C2, CRSF1\_C1, CNF16\_C2, BMF19\_C2, BMF18\_C1, UCMF2\_C1, CRSF6\_C1, CMBF1\_C1) caracterizados, pertenecen a la especie *T. orientale*.

*T. orientale*, ha sido aislada del suelo y reportada en Nueva Zelanda, China, Sudáfrica, también en Ecuador y España, (Jaklitsch & Voglmayr (2015) y Korea Jang *et al.* (2017), en el Perú, fue reportada en la región San Martín (GBIF 2022).



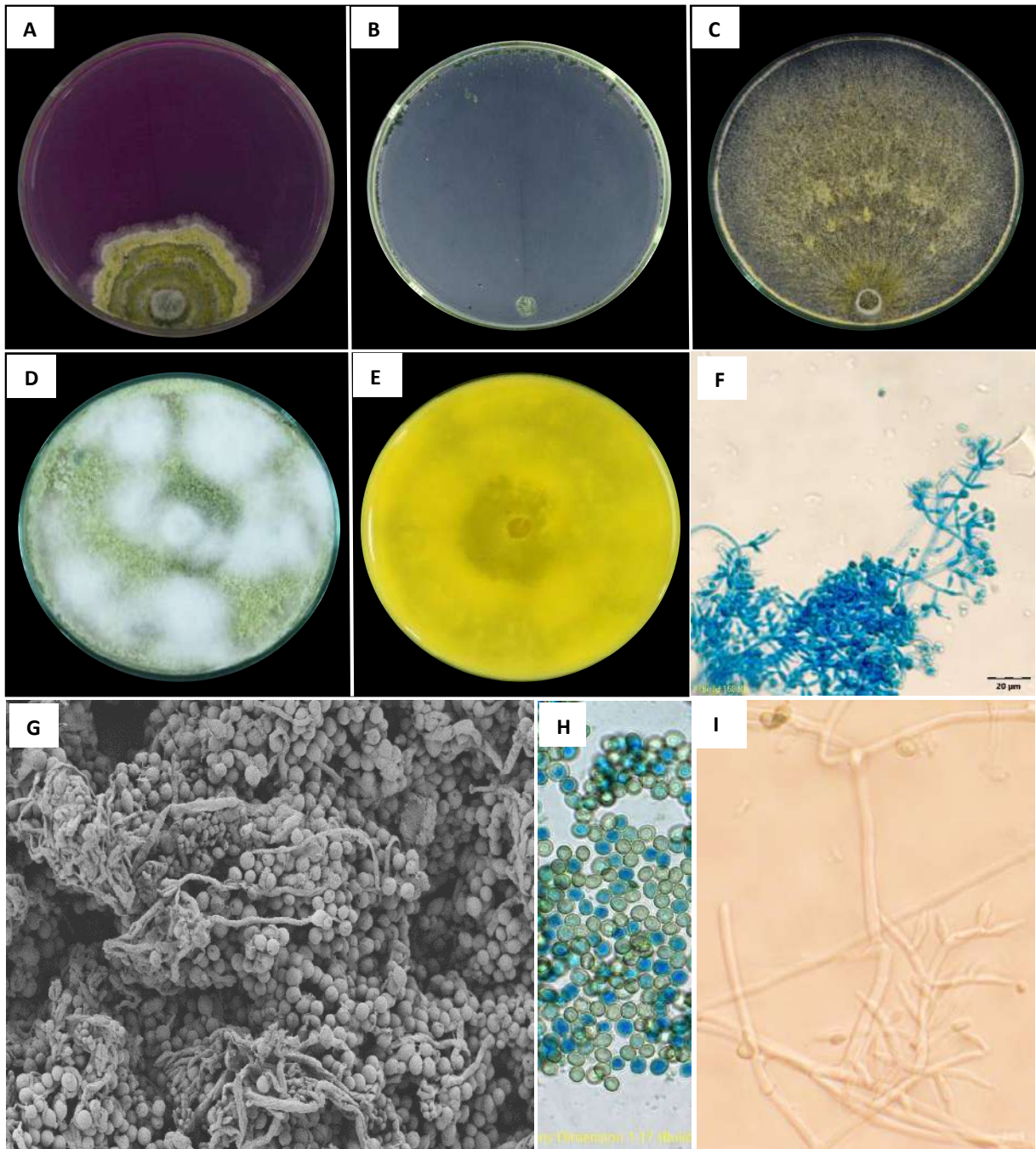
**Figura 21.** *Trichoderma orientale* (UCF19A\_C1). Cultivo a 28°C después de siete días (A en CMD, B en RBA, C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo a 28°C + 12 horas luz, en anverso de placa.; E: Pigmentación de colonia de siete días; F: Clamidosporas en tinción azul de metileno y lactofenol.; G: Fialides y conidióforos.; H: Conidios

### *Trichoderma asperelloides* Samuels

Los resultados indican que después de 72 h a 28°C y a 12 horas de fotoperiodo, se reporta que en medio PDA, se produjo un crecimiento de la colonia de 45-53 mm y de 38-51 mm en medio SNA, en iguales condiciones de cultivo; además, el crecimiento en medio RBA fue inferior, inclusive a los siete días, se observó un escaso crecimiento (23-29 mm). Las placas de siete días en medio PDA presentan una colonia de coloración verde con abundante micelio aéreo blanquecino, presentando un pigmento difuso amarillo intenso en el reverso de la placa (Figura 22). No se evidencia algún olor distintivo en la colonia. Las fialides son en forma de botella, pero más o menos hinchado en la parte central; alcanzaron 5,1-10,4 µm de largo y de 2,5-3,4 µm en la zona más ancha. Por otro lado, se observaron conidios verdes sub globosos (Figura 22) de 3,4 - 4,6 × 2,9 - 3,8 µm. Estos resultados indican que corresponden a la especie *T. asperelloides*, así lo confirman, por un lado Jang *et al.* (2017) y también (Samuels *et al.* 2010), aunque manifiestan que no observaron pigmentación difusa de la colonia, caso que pudo observarse en todos los aislados que representan la especie (Anexo 2AB). Entonces, las características morfológicas aquí presentes se suman al protocolo de identificación molecular y permite afirmar que en el presente trabajo un total de 11 aislados recuperados del suelo de *T. cacao* (UCF8\_M5, UCF6\_M5, UCF2\_M2, F19M3, F8M5, F8M2, F6M5, BLPF4\_C1, BLPF3\_C1, BIF17\_C1, BIF7\_C1,) corresponden a la especie *T. asperelloides*.

Esta especie, probablemente se derive de *T. asperellum* (Samuels *et al.* 2010) y ha sido reportada como endófito y también como un habitante del suelo de muchos lugares en el mundo (pantropical); tiene a Korea, China, África, América del sur como zonas de distribución conocida, además, se hace referencia que fue reportado en zona no perturbadas de montaña alta de Perú (Samuels *et al.* 2010). En el presente trabajo, se confirma este reporte y además afirma que también es un habitante de los suelos perturbados vinculados al agroecosistema de cacao Amazonas Perú. Finalmente es preciso señalar que esta especie también ha sido reportada como potencial agente de control biológico que incluye a *Trichoderma asperellum*, casualmente confrontada con *M. roreri* (Olmes *et al.* 2004), donde concluyen que se produce inhibición del crecimiento radial del patógeno, a nivel *in-vitro*. También refiere que *Trichoderma*, persistió en la superficie y dentro de los tejidos de las mazorcas de cacao en el campo durante al menos 10

semanas. Estos resultados, junto a los obtenidos por Hanada *et al.* (2008), refuerzan la teoría que *T. asperelloides* podría ser un eficiente agente de biocontrol de la MC.



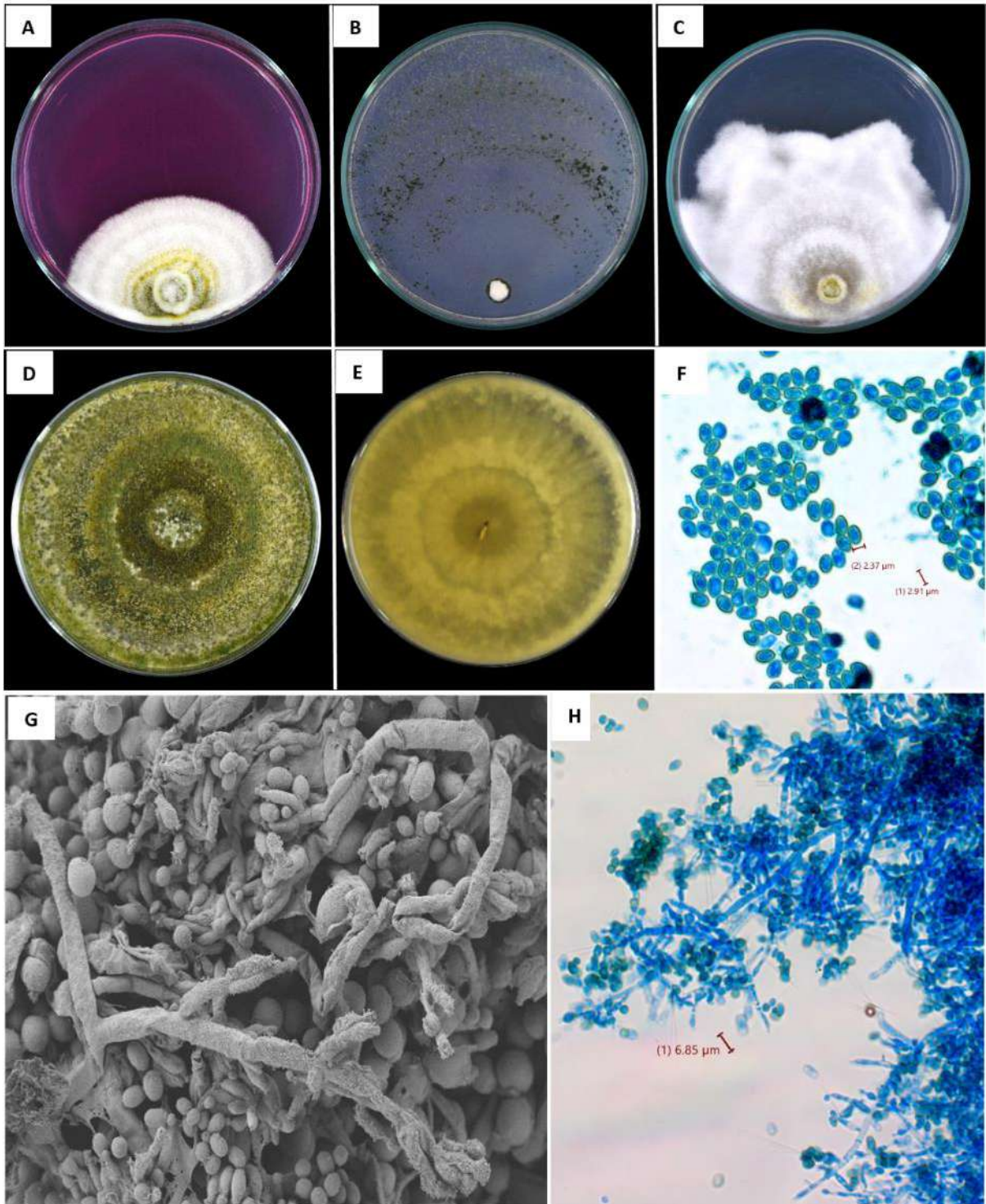
**Figura 22. *Trichoderma asperelloides* (UCF8\_M5). Cultivo (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo en PDA a 28°C + 12 horas luz; E: Pigmentación de colonia en reverso de placa.; F: Fialides y conidióforos.; G: Conidios-Clamidosporas; H: Conidios verdes.; I: Fialides y conidióforos en coloración natural**



## *Trichoderma inhamatum* Veerkamp & Gams

*T. inhamatum* ha sido reportada como habitante del suelo en Colombia y Perú (Chaverri *et al.* 2015), lo que es corroborado en el presente estudio. Filogenéticamente, está más estrechamente relacionado con *T. lentiforme*. Aunque algunos podrían considerarlos con-específicos (pertenencia a una misma especie), sin embargo; existen trabajos que sugieren una marcada diferencia. En el presente estudio, y en base al protocolo de caracterización molecular utilizada, usamos el type CBS H-18863, ex type CBS 273.78 y las secuencias representativas tef1: AF348099, rpb2: FJ442725, nos ha permitido identificar que los aislados IP3M3\_C3, BIF28\_C3, BIF18\_C2, BIF16\_C2, BIF14\_C3, BIF14\_C2, BIF12\_C3, BIF11\_C3, BIF9\_C1, BIF8\_C1, UBGf2\_C1, corresponden a esta especie.

Las características morfológicas hacen referencia que el radio de la colonia después de 72 h a 28°C en medio PDA fue de 58-62 mm, en SNA, fue de 49-54 mm. Después de siete días, las colonias presentaron micelio aéreo abundante y algo algodonoso, con conidios que desarrollan de manera abundante en anillos concéntricos. Las colonias fueron de color verde amarillento oscuro con puntuaciones amarillentas y presentó una pigmentación amarillo pálido en el reverso de placa, difundido en el Agar (Figura 23). Presenta Conidióforos piramidales y fialides ampuliformes de 3.9-6,1 x 2,7-3,5  $\mu\text{m}$  de largo/ancho, respetivamente. También, poseen conidios lisos sub globosos a ovoides, de 2,5-3,0 x 2,2-2,7  $\mu\text{m}$  relación largo/ancho. Entonces, resulta que *T. inhamatum* podría ser fácil de distinguir y diferenciarlo de otras especies debido a sus pequeños conidios, fialides cortos y angostos y su lento crecimiento de la colonia. Estos resultados concuerdan con los reportados por Chaverri *et al.* (2015) debido a que las características encontradas son muy similares a las reportadas por estos autores; además, el solo hecho de que la especie ya fue reportada para Perú, podría ser un indicador fehaciente que confirma su presencia en este estudio (GBIF 2022).

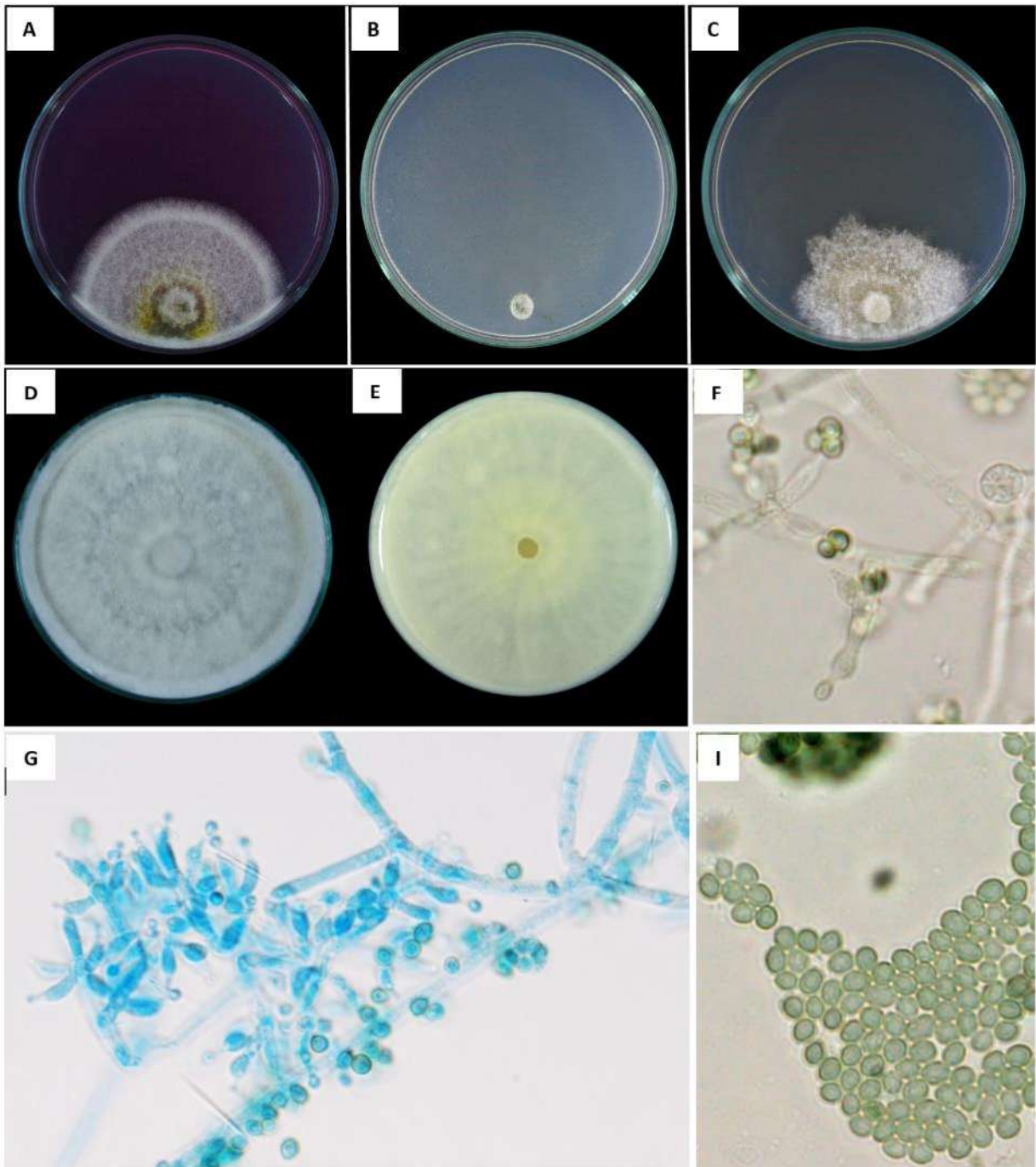


**Figura 23. *Trichoderma inhamatum* (BIF8\_C1). Cultivo (A en CMD, B en RBA, C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo en PDA a 28°C; E: Pigmentación de colonia de siete días; F: Conidios.; G: Fialides y conidióforos en microscopía electrónica.; H: Fialides y conidios**

*Trichoderma zelobreve* Jing Z. Sun & X.Z. Liu, sp. Nov.

La Figura 24, representa imágenes referenciales para el aislado BMF2\_C2 y nos indica que después de 72 horas de cultivo a 28°C en fotoperiodo de 12 horas, en medio PDA se observó un crecimiento de la colonia de 53-59 mm; en medio SNA y RBA el crecimiento fue menor con 31-38 y 28-34 mm, respectivamente. La colonia tuvo una coloración blanco amarillenta con micelo denso en dos anillos concéntricos; en el reverso de la placa se puede notar una coloración blanca ligeramente amarillo, aparentando no originar algún pigmento difusor. Además, no se observaron clamidosporas. Por otro lado, la muestra presenta fialides ampuliformes a lageniformes, con un cuello estrecho debajo de la punta (Figura 24F), con tamaños promedio de  $4,1-6.2 \times 2,5-3.3 \mu\text{m}$ , relación: largo/ancho. Conidios ovoides a sub globosos (Figura 24F) y lisos con  $2,2-2,6 \times 1,7-2,2 \mu\text{m}$ , para el largo y ancho, respectivamente. Los resultados son similares a los reportados por (Gu *et al.* 2020), por lo que deducimos que esta caracterización y adicionalmente la caracterización molecular realizada en el presente estudio, confirman que en el agroecosistema de cacao Amazonas Perú, al menos cuatro aislados (F2M5, BMF2\_C2, BIF15\_C2, BIF4\_C4) son identificadas como *Trichoderma zelobreve*.

*Trichoderma zelobreve* es la especie hermana de *T. breve*, morfológicamente se distingue por que la primera tiene las fialides de menor tamaño, al igual que los conidios más pequeños, fue catalogada como nueva especie para el clado Harzianum y reportada recientemente, luego de su aislamiento del suelo en octubre del 2018 y reportada como nueva especie para China en el 2020 (Gu *et al.* 2020). La presencia de esta especie en el suelo de *T. cacao* refiere ser el primer reporte de su existencia en el Perú.

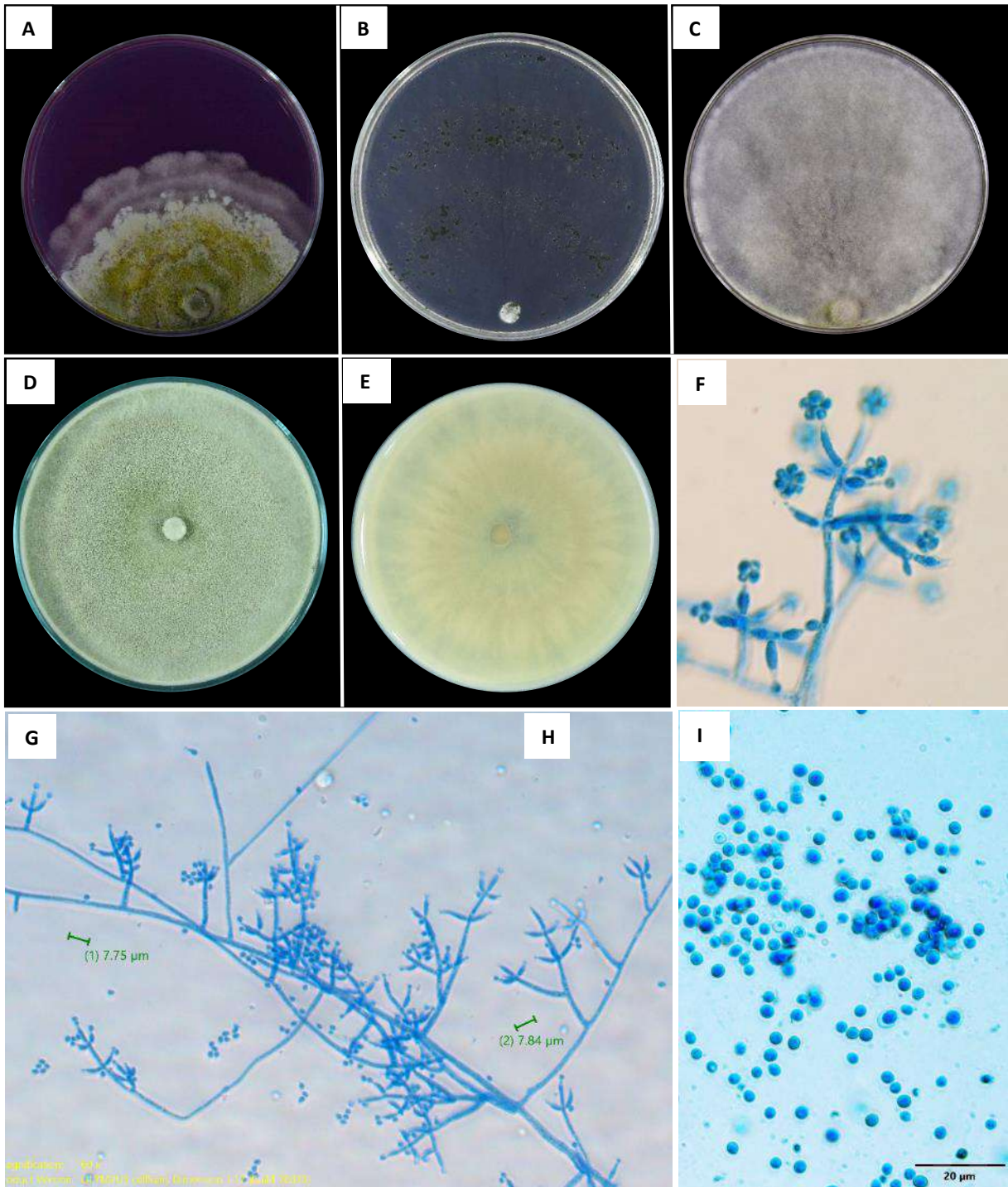


**Figura 24. *Trichoderma zelobreve* (BMF2\_C2). Cultivo a 28°C y de siete días (A en CMD, B en RBA, C en SNA) D: Colonia de doce días de cultivo a 28°C + 12 horas luz; E: Pigmentación de colonia en reverso de placa.; F: fialides.; G: fialides y conidióforos.; I: conidios**

*Trichoderma afarasin* Chaverri & Rocha, sp. Nov.

Etimológicamente, el nombre: “afarasin” proviene de la palabra yoruba “afarasin”, que significa “el que se esconde”, en referencia a su ocurrencia críptica como endófito, aunque también se ha encontrado en el suelo (Chaverri *et al.* 2015). En nuestro estudio, esta especie es recuperada del suelo de plantaciones de cacao, lo que confirma su ocurrencia en este medio. El type (dry culture): BPI 88109, Ex-type: G.J.S. 99-227 = CBS 130755 = IMI 393967 y las secuencias representativas *tef1*: AF348093, FJ463327; *rpb2*: FJ442778, FJ442799 (Bissett *et al.* 2015), permitieron su comparación con el aislado de referencia y su par más próximo, permitiendo identificar a un total de dos cepas (BIF1\_C3, AP2M1\_C2) catalogadas a esta especie, lo que además hace la primera referencia respecto presencia de esta especie en el Perú.

Los resultados, respecto al crecimiento de radio de colonia indican que después de 72 horas a 28°C en medio PDA, alcanzó los 57 - 68 mm, en medio SNA 56 - 63 mm. Por otro lado, dentro de los siete días después del cultivo, en medio PDA, se observa la placa completamente llena de micelio aéreo abundante con una coloración de colonia verde grisáceo, lo mismo que la tinción en reverso de placa (Figura 25), los conidios de apariencia algodonosa. Además, y en referencia a los fialides, éstas son ampuliforme (forma de botellas) de 4,5 - 8 µm x 2,5 - 3,2 µm (medidas promedio de 5.4 x 3.2 µm). Además, se encontraron conidios globosos y también sub globosos (Figura 25I) de 2,2-3.7 µm x 2,2-3,2 µm (largo/ancho, respectivamente). No se pudieron observar clamidosporas. Estas características morfológicas son similares a las reportadas por Chaverri *et al.* (2015) quienes reestructuran la sistemática del complejo de especies de *Trichoderma harzianum* y la re identifican como cepas comerciales de control biológico a partir de herramientas moleculares y morfología; además, reportan que la colonia de *T. afarasin* desprende un olor ligero a dulce, el mismo que en segundas pruebas de cultivo pudo evidenciarse. *Trichoderma afarasin*, tiene un hábitat endofítico, reportado en tallos de *Cola* sp. y también ha sido reportado a partir de aislados del suelo, tiene a África como lugar de distribución geográfica, con patrones similares a *T. ghanense*, y puede diferenciarse de otras especies como *T. afroharzianum*, *T. camerunense*, *T. guizhouense*, por la longitud de sus fialides y tasa de crecimiento. En el presente estudio, se reporta estar presente en las muestras de suelo del agro ecosistema de cacao nativo de Amazonas, Perú.



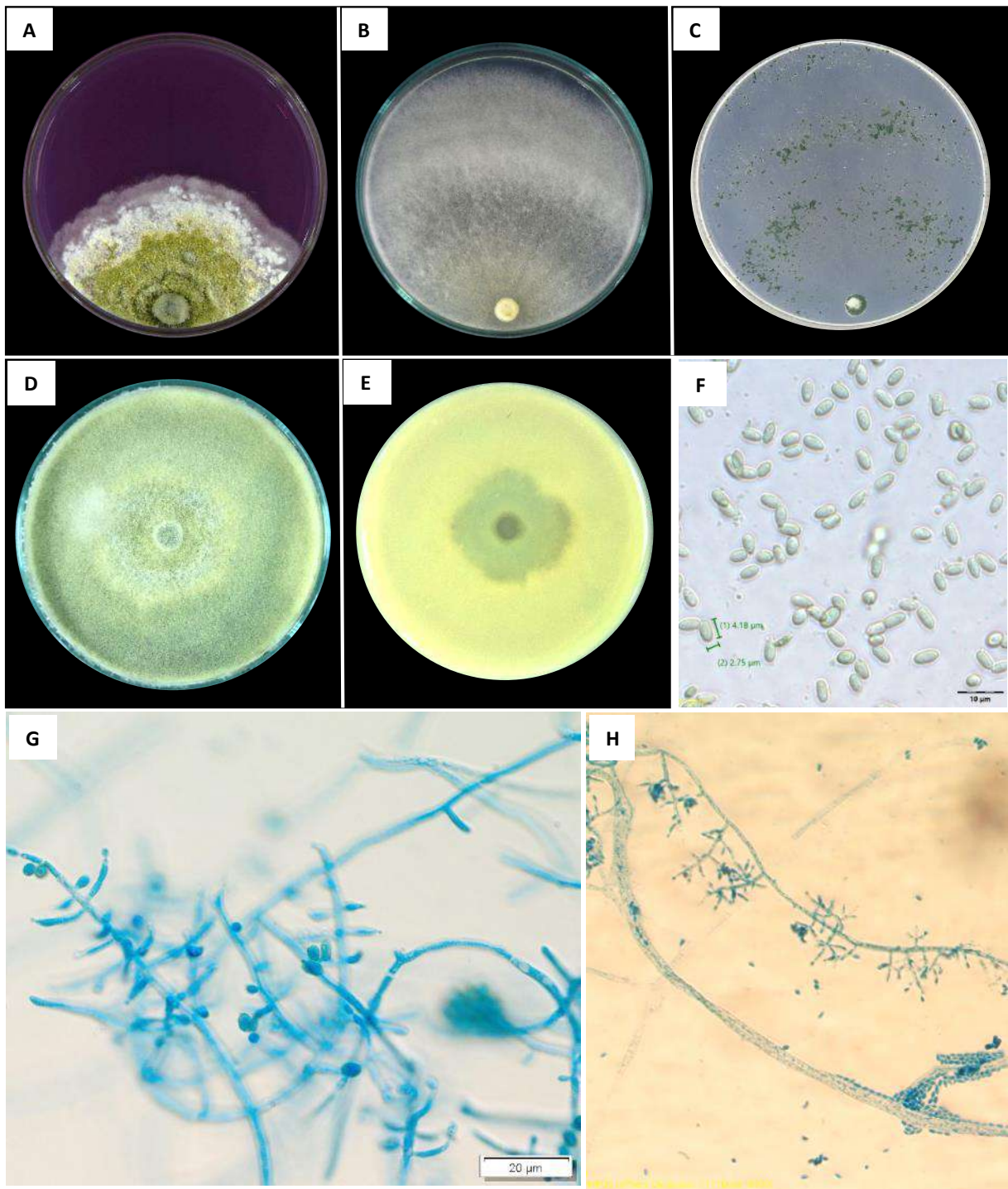
**Figura 25.** *Trichoderma afarasin* (BIF1\_C3). Cultivo a 28°C después de siete días (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia de doce días de cultivo en PDA; E: Pigmentación de colonia de siete días-PDA; F: Fialides y conidióforos a 100x.; G: Fialides y conidióforos a 60x; H: Conidios

*Trichoderma ghanense* Yoshim. Doi, Y. Abe & J. Sugiy

Los resultados de la caracterización morfológica de nuestros aislados determinan que en medio PDA y después de 72 h de cultivo a 28°C con 12 horas de fotoperiodo, el crecimiento de colonia fue en promedio de 53-57 mm y de 43-54 mm en medio SNA y en las mismas condiciones. Después de siete días, en medio PDA, se observa un exuberante micelio algodonoso verde claro con algunas secciones amarillentas que crece en forma concéntrica alrededor del punto de inoculación, notándose también una visible pigmentación amarillenta a verdosa en el reverso de la placa.

Las fialides son lageniformes de 4,3-9,7 µm x 2,4-3,3 µm largo y ancho, respectivamente. Los conidios presentan un tamaño de 4,2-5,6 x 2,8-3,4 µm ovoides, verde claro a los 4 días y un poco más oscuros a los 7. Estas características morfológicas guardan similitud con las reportadas por (Samuels *et al.* 2012) quien además indica que esta especie pertenece al clado Longibrachiatum. Entonces, tras la identificación molecular y correspondiente identificación morfológica podemos afirmar que en el presente estudio, se ha determinado que las cepas F4M3, BLPF4\_C2, fueron identificadas como *T. ghanense*.

Es preciso mencionar además que esta especie se reportó por primera vez a partir de los suelos de Ghana en 1987 tras lo cual se ha intentado renombrarla como *T. parceramosum* (Kuhls *et al.* 1997). Aunque no existe un reporte contundente sobre su presencia en América del Sur (Hoyos-Carvajal *et al.* 2009), esta especie ha sido reportada para los suelos de Camerún, Ghana, Nigeria e Italia y finalmente de Perú, donde casualmente se encontraron y estudiaron cepas peruanas aisladas plantas y frutos de *T. cacao* (cacao) infectados con *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de Bruja) y *M. roreri* parasitando los frutos de cacao (Samuels *et al.* 2012), por lo que podría ser considerada como un potencial agente de control biológico de estas enfermedades. Estas referencias son un importante antecedente que permite ratificar la presencia de esta especie en el presente estudio.



**Figura 26. *Trichoderma ghanense* (F4M3). Cultivo a 28°C después de siete días (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo en PDA; E: Pigmentación de colonia en reverso de placa; F: Conidios. G: Fialides y conidióforos; G: Fialides y conidióforos a 40x.**

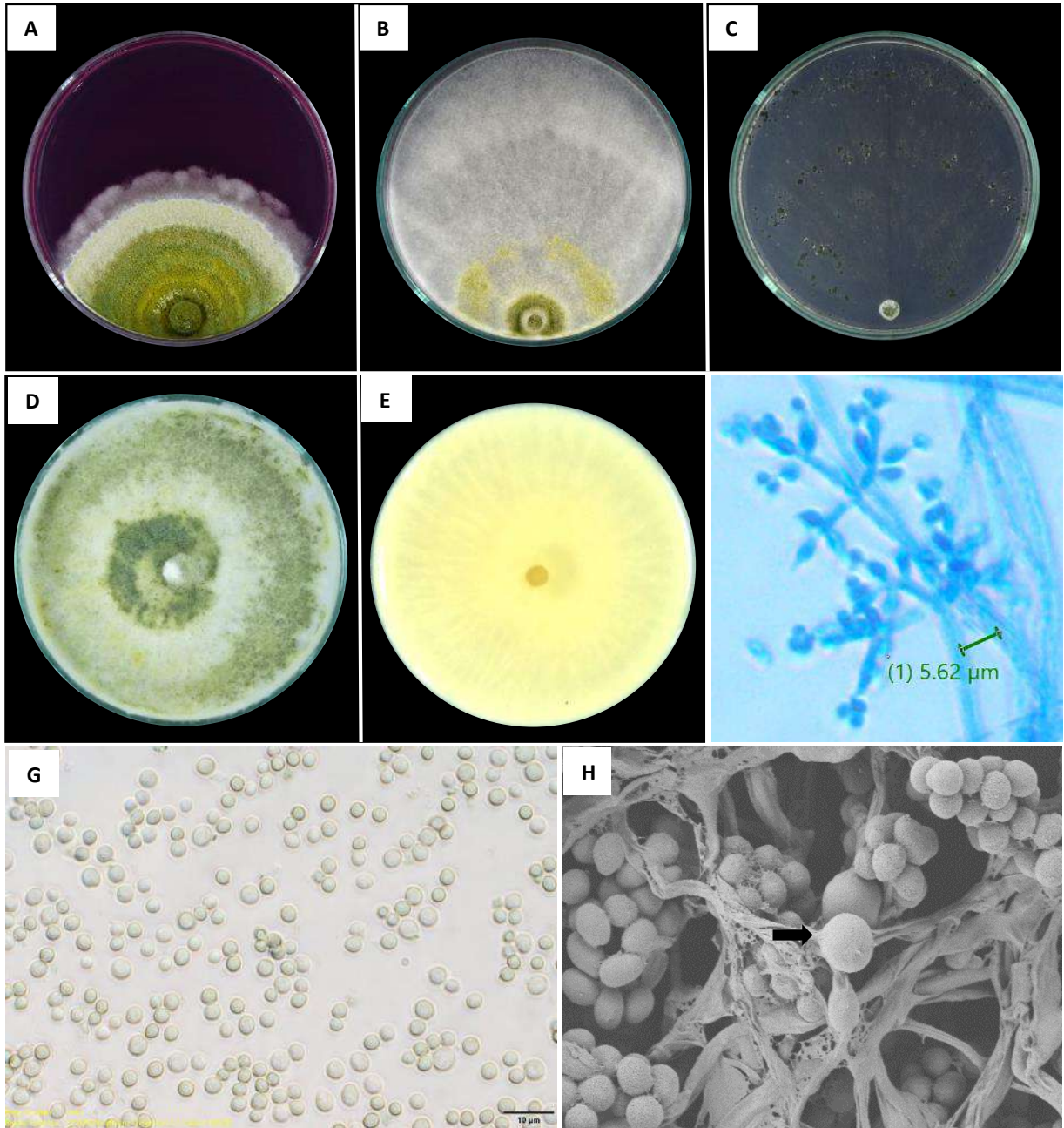


*Trichoderma breve* Chen & Zhuang, sp. Nov.

Los resultados de la caracterización morfológica muestran que después de 72 horas de cultivo en placa petri de 90 mm, a 28°C y fotoperiodo de 12 horas, luz blanca, en medio de cultivo PDA esta especie alcanzó un crecimiento radial de colonia de 60-65 mm, lo propio en SNA con un tamaño de 54-62 mm y en RBA, el crecimiento fue menor (27-36 mm); en medio PDA se observó que la colonia cubrió por completo la placa en 3 días, originando una coloración verde olivo con anillos blanquecinos a amarillentos (Figura 27) con micelio abundante y algodonoso. Además, en reverso de la placa se observa una pigmentación amarillo cremosa. No se evidenció algún olor característico distintivo.

En cuanto a las fialides, estas fueron ampuliformes o lageniformes de 6,5-10,2 x 2,7-4,1 µm, para el largo y ancho, respectivamente; los conidios son lisos, globosos y sub globosos de globosos a subglobosos, 2,4 - 3,6 x 2,5 - 3,1 µm, largo y ancho, respectivamente. Se pudieron observar clamidosporas globosas o elipsoides (Figura 25H) de 4,0-7,8 x 3,5-6,2 µm. Los resultados aquí descritos guardan similitud con los resultados reportados por Chen & Zhuang (2017) aunque con ligeras variaciones específicamente en los tamaños de las fialides y conidios. Por lo que luego de haberse determinado las características morfológicas, así como la identificación molecular, misma en la que se utilizó el type de referencia HMAS 248844 y las secuencias para *tef1*: FJ860717, *rpb2*: FJ860605, llegamos a la conclusión sin lugar a duda que en el agroecosistema de cacao nativo Amazonas Perú, está presente la especie *Trichoderma breve*.

Finalmente hacemos referencia que *Trichoderma breve* se distingue por las fialides cortas y anchas. A la que se debe la etimología del corto nombre, aunque precisamente no forme parte del complejo *T. harzianum*. Además, ha sido reportada en diferentes lugares del mundo que incluyen zonas con climas tropicales, lo que da más soporte a la existencia de esta especie en nuestro país, siendo éste el primer reporte de la existencia de esta especie en el Perú.



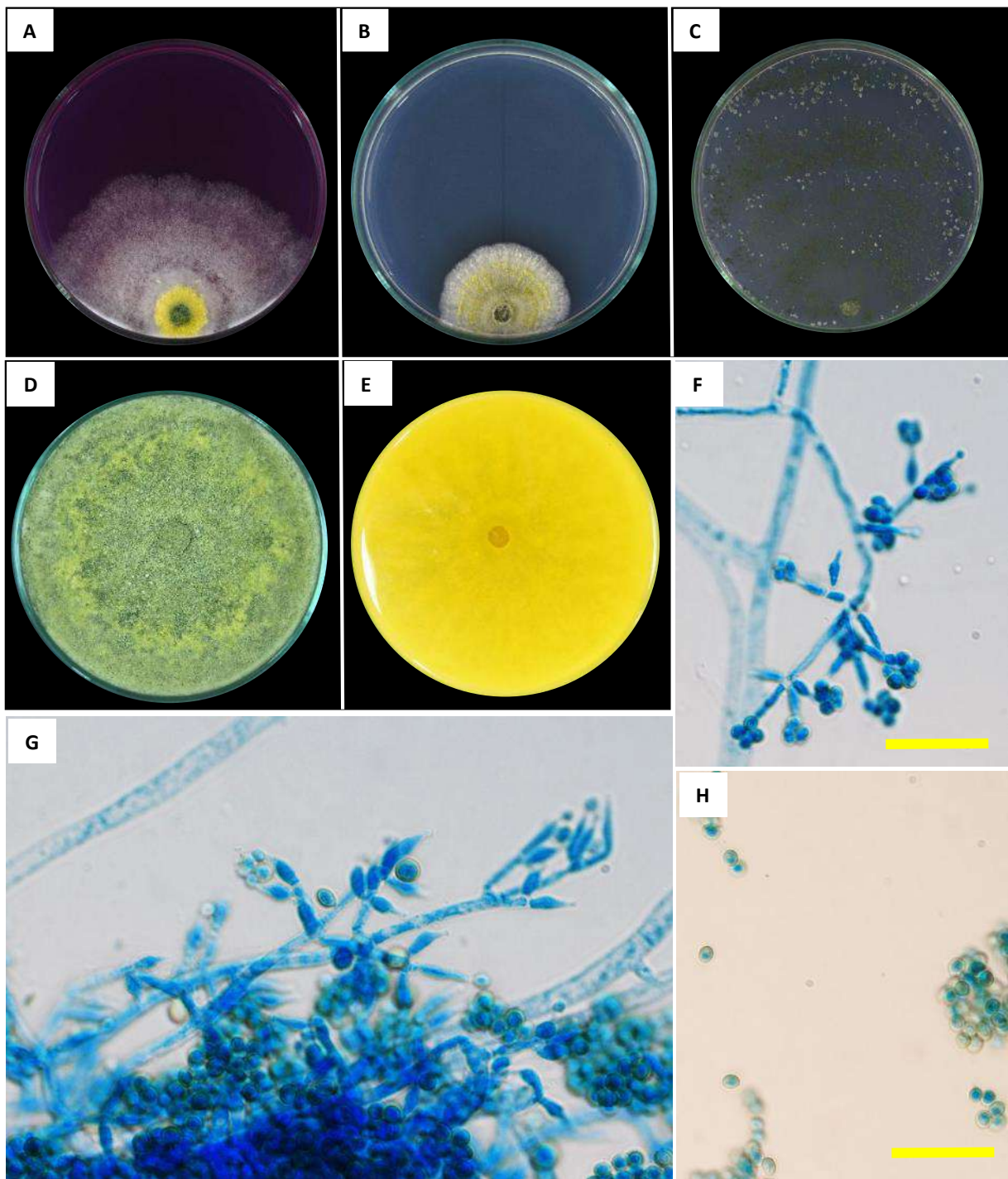
**Figura 27.** *Trichoderma breve* (BLPF2\_C1). Cultivo después de siete días (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia de 12 días de cultivo en anverso de placa.; E: Pigmentación de colonia de siete días de cultivo medio PDA en reverso de placa.; F: Fiálides. G: Conidios; H: Conidios globosos y sub globosos, Clamidosporas

*Trichoderma Koningiopsis* Samuels, C. Suarez & H.C. Evans.

La Figura 28 hace referencia a las características morfológicas encontradas en el aislado BMF2\_C1, única cepa identificada como la especie *T. koningiopsis*; se encontró que en medio PDA y después de 72 h de cultivo a 28°C con 12 horas de fotoperiodo, el crecimiento de colonia fue en promedio de 51-59 mm y de 42-52 mm en medio SNA y en las mismas condiciones. Después de siete días, en medio PDA, presenta micelio algodonoso verde con algunas secciones amarillentas que crece en forma concéntrica alrededor del punto de inoculación, notándose además la ausencia de pigmentación en el reverso de la placa.

Las fialides de esta especie son lageniformes de 4,1-10,7 µm x 2,2-3,5 µm largo y ancho, respectivamente. Los conidios presentan un tamaño de 3,9-5,7 x 2,4-3,3 µm ovoides, verde a los 4 días aproximadamente y un poco más oscuros a los siete días. Estas características morfológicas guardan similitud con las reportadas por Samuels *et al.* (2006) quien además indica que esta especie representa el nombre del clado Longibrachiatum. Entonces, tras la identificación molecular y correspondiente identificación morfológica podemos afirmar que en el presente estudio, se ha determinado que la cepa BMF2\_C1, fue identificada como *T. koningiopsis*.

Por otro lado, podemos afirmar que *T. koningiopsis*, es una especie tropical común que se encontró con mayor frecuencia como aislamientos directos de sustratos, incluso como endófito de troncos de árboles de *Theobroma cacao*, tras lo cual existen reportes que cinco aislamientos de *T. koningiopsis* de Ecuador, fueron específicamente aislados de vainas de *Theobroma cacao* infectadas con *Moniliophthora roreri* lo que definitivamente confirma la existencia de esta especie en el agroecosistema de cacao de Amazonas, Perú.

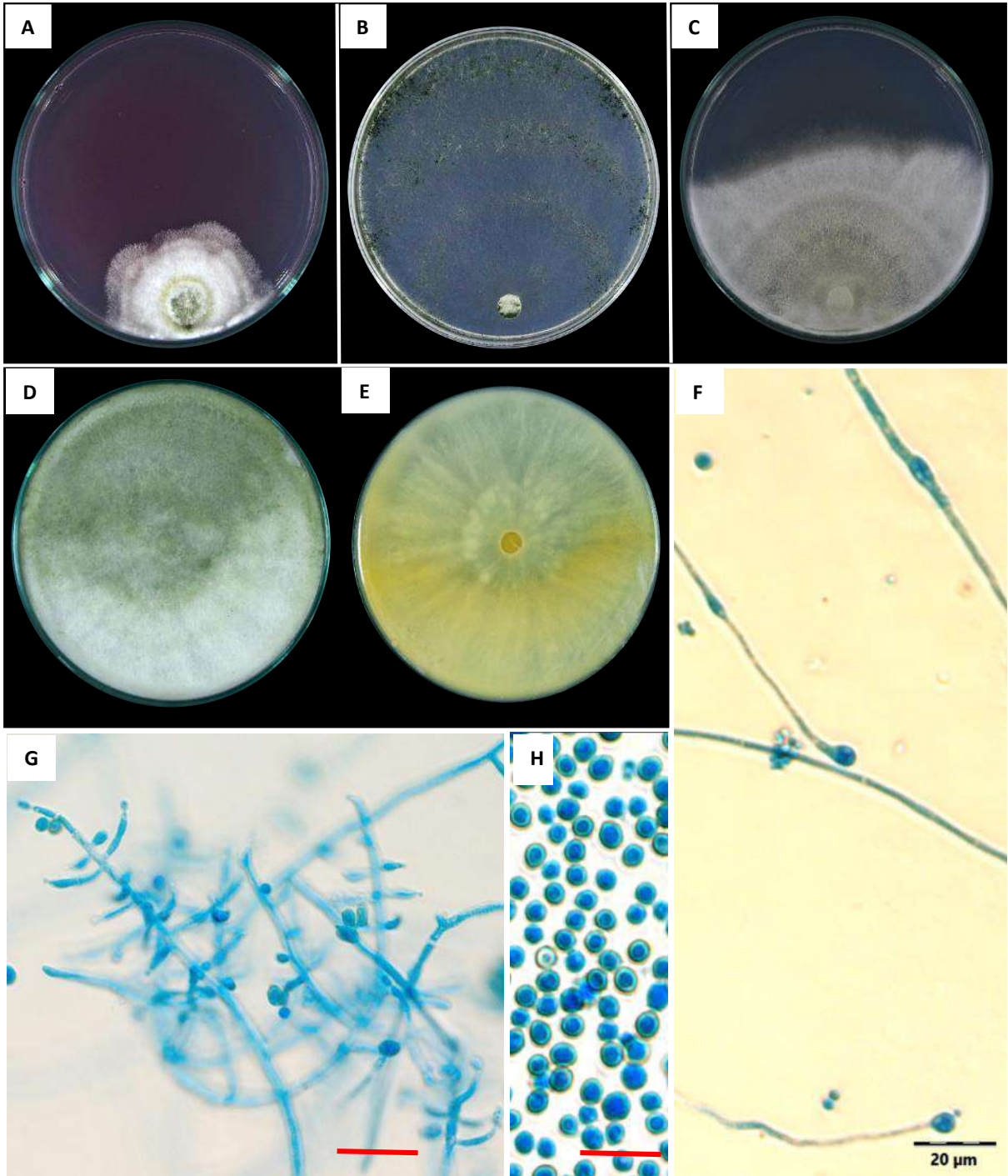


**Figura 28.** *Trichoderma koningiopsis* (BMF2\_C1). Cultivo a 28°C después de siete días (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia de siete días de cultivo en PDA - anverso de placa.; E: Pigmentación de colonia de siete días de cultivo medio PDA a 28°C en reverso de placa.; F-G: Conidióforo y fiálides - conidios, H: Conidios

*Trichoderma brevicompactum* G.F. Kraus, C.P. Kubicek & W. Gams

En cuanto a esta especie, las características morfológicas observadas (Figura 29), refieren que después de 72 h y a 28°C, un radio de colonia en medio PDA de 62-69 mm y en SNA de 47-54 mm. Se evidencia, además, presencia de micelio aéreo algo abundante (Figura 29) tanto el medio RBA y PDA (desde las 96 horas, siendo más evidente a los siete días de cultivo); en esta especie se observa esporulación abundante, formando anillos concéntricos alrededor del punto de inoculación (entre el margen y el inóculo). La colonia en siete días luce una coloración más verdosa en punto de inoculación, además en reverso de placa Petri no se deja notar una pigmentación contundente. En CMD el micelio es escaso. Por otro lado, los conidióforos forman una apariencia piramidal, las fiálides son ligeramente agrandadas en el medio y lageniformes cuando surgen en ramas fértiles ampliamente espaciadas; más cortas y más anchas, ampuliformes, cuando surgen de ramas fértiles abarrotadas; con dimensiones promedio de entre 3,9 -15,5 x 2,6 - 5,1  $\mu\text{m}$ , para largo y ancho, respectivamente. Por otro lado, los conidios son sub globosos con dimensiones promedio de 2,7- 3.0 x 2,2 - 2,7  $\mu\text{m}$ , para largo/ancho, respectivamente, son de coloración verdosas y lisas en su superficie. Además, se pueden encontrar pocas clamidosporas sub globosas. Estos resultados son muy similares a los reportados por (Degenkolb *et al.* 2008), aunque con algunas variaciones de color de pigmentación en placa, lo que hace pensar que esta característica es algo diferente cultivado en placa; además es de notarse algunas otras diferencias, como por ejemplo en el tamaño de crecimiento radial, puesto que existe una diferencia de 1.5 mm de crecimiento mayor para el medio PDA observado en el presente estudio, lo que podría deberse a los 3°C de temperatura adicionales, en el presente estudio.

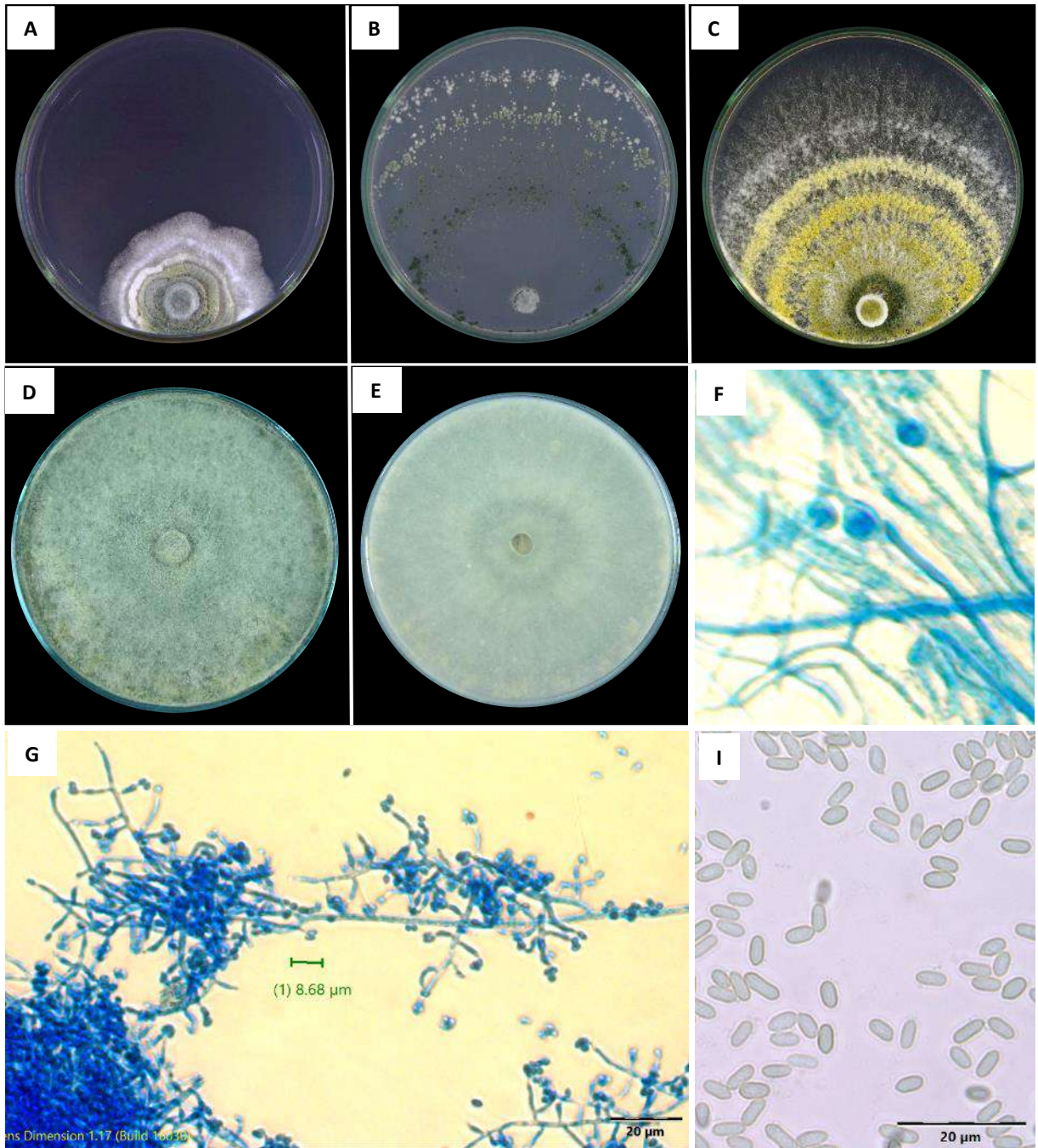
*T. brevicompactum*, tiene como hábitat al suelo, se ha reconocido como distribución conocida a San Vicente y las Granadinas, Región del Caribe (Isla Unión), India, Irán, Papua-Nueva Guinea, Perú, Estados Unidos (N.Y., Wis.), México, Costa Rica, Irán, Colombia. Entonces, probablemente es de comportamiento cosmopolita (Degenkolb *et al.* 2008); y además se convierte en un primer reporte existente de la especie, para el Perú, en el presente estudio se confirma la presencia de *Trichoderma brevicompactum* en el agroecosistema de cacao nativo Amazonas, Perú.



**Figura 29.** *Trichoderma brevicompactum* (BBF1\_C3). Cultivo a 28°C después de siete días  
**D:** Colonia en anverso de placa; **E:** Pigmentación de colonia en reverso de placa; **F:** Clamidosporas; **G:** Fiálides y conidióforos; **H:** Conidios

### *Trichoderma* sp. 1

Los aislados UJF1\_C1, UCF1\_C1 y CRSF6\_C1, de acuerdo con el protocolo de comparación de similitud por pares indican no corresponder alguna de las especies hasta ahora identificadas; en tal sentido que las características morfológicas dan a saber que después de 72 horas de cultivo a 28°C y a 12 horas de fotoperiodo, esta especie alcanza un crecimiento de colonia promedio de 51-62 mm en medio PDA; en medio SNA fue de 47-55 mm y en medio RBA de 16-24 mm. Cuando las colonias tuvieron 7 días, en medio PDA, se observa una coloración verde claro con una tonalidad grisácea, al reverso de la placa no se puede notar una pigmentación diferenciada del anverso (Figura 30); en medio SNA se observa una formación de anillos concéntricos alrededor del disco que dio origen a la colonia. Por otro lado, presentó fiálides lageniformes de 4,3-11,8  $\mu\text{m}$  x 2,1-3,6  $\mu\text{m}$  (proporción, largo/ancho) y conidiación densa con conidios ovoides de 3,4-4,7 x 2,5-3,7  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, no se encontraron clamidosporas y no se evidencia olor distintivo de la colonia. Estas características se aproximan a las características morfológicas de del clado Longibrachiatum de la especie *T. longibrachiatum*; también son similares también a la especie *T. orientale* según lo reportado por Bissett (1984) y ratificadas por Park *et al.* (2005), aunque con ligeras variaciones como la ausencia o poca visibilidad de clamidosporas, y longitud de fiálides ligeramente inferior a los de *T. longibrachiatum*.

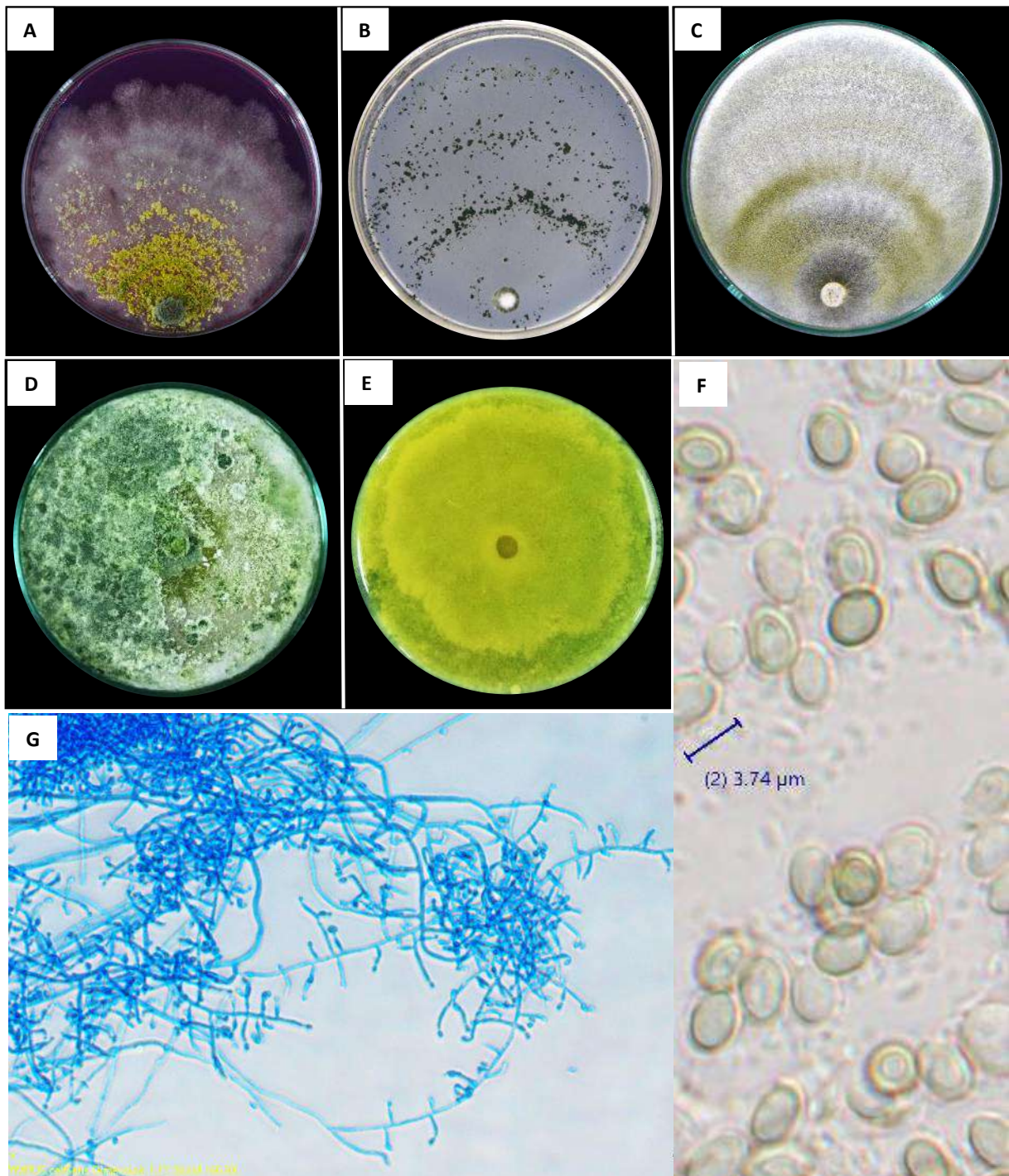


**Figura 30. *Trichoderma* sp. 1 (CRSF6\_C1). Cultivo a 28°C después de siete días D: Colonia en anverso de placa; E: Pigmentación de colonia de siete días de cultivo a 28°C + 12 horas luz, en reverso de placa; F: Clamidosporas; G: Fiálides y conidióforos; I: Conidios**



## *Trichoderma* sp. 2

En el proceso de identificación a partir de códigos genéticos de ADN, mismo que incluye la construcción de árboles filogenéticos para los marcadores moleculares *rpb2* y *tef1* (Cai & Druzhina 2021), deja notarse claramente el agrupamiento de un clado integrado por los aislados CNF7\_C2, CCF4\_C1, BLPF4\_C3, BLPF1\_C4, BLPF1\_C3, mismos que se diferencian genéticamente de sus pares más próximos como *T. longibrachiatum*, *T. orientale* y a *Trichoderma* sp1.; estas diferencias pueden notarse cuando se observan las características morfológicas de estos aislados; puesto que después de 72 horas de cultivo a 28°C y a 12 horas de fotoperiodo, esta especie alcanza un crecimiento de colonia promedio de 49-63 mm en medio PDA; en medio SNA fue de 46-53 mm y en medio RBA de 30-34 mm. Estos valores son ligeramente inferiores a los encontrados en la sp1, aunque con la diferencia notoria de crecimiento en el medio RBA (Figura 31). Cuando las colonias tuvieron siete días, en medio PDA, se observa una coloración verdosa con máculas blanquecinas, características notoriamente distintas a los observados en la sp 1. Por otro lado, en el reverso de la placa se puede notar una pigmentación diferenciada del anverso, con una ligera tonalidad de amarillo verdosa (Figura 31E); en medio SNA se observa una formación de anillos concéntricos alrededor del disco que dio origen a la colonia. Por otro lado, se puede visualizar diferencias notorias en el tamaño de las fiálides lageniformes de 4,1-13,8  $\mu\text{m}$  x 2,3-3,8  $\mu\text{m}$  (proporción, largo/ancho), las mismas que son ligeramente superiores a las reportadas por Park *et al.* (2005), cuando caracteriza a *T. longibrachiatum*. Finalmente, en cuanto a la conidiación, ésta se presentó densa con conidios ovoides y fusiformes de 3,0-4,9 x 2,3-3,9  $\mu\text{m}$ . Además, no se encontraron clamidosporas y tampoco se evidenció algún olor distintivo de la colonia, lo que aparentemente podría ser una característica frecuente en especies del clado *Longibrachiatum* (Bissett 1984).

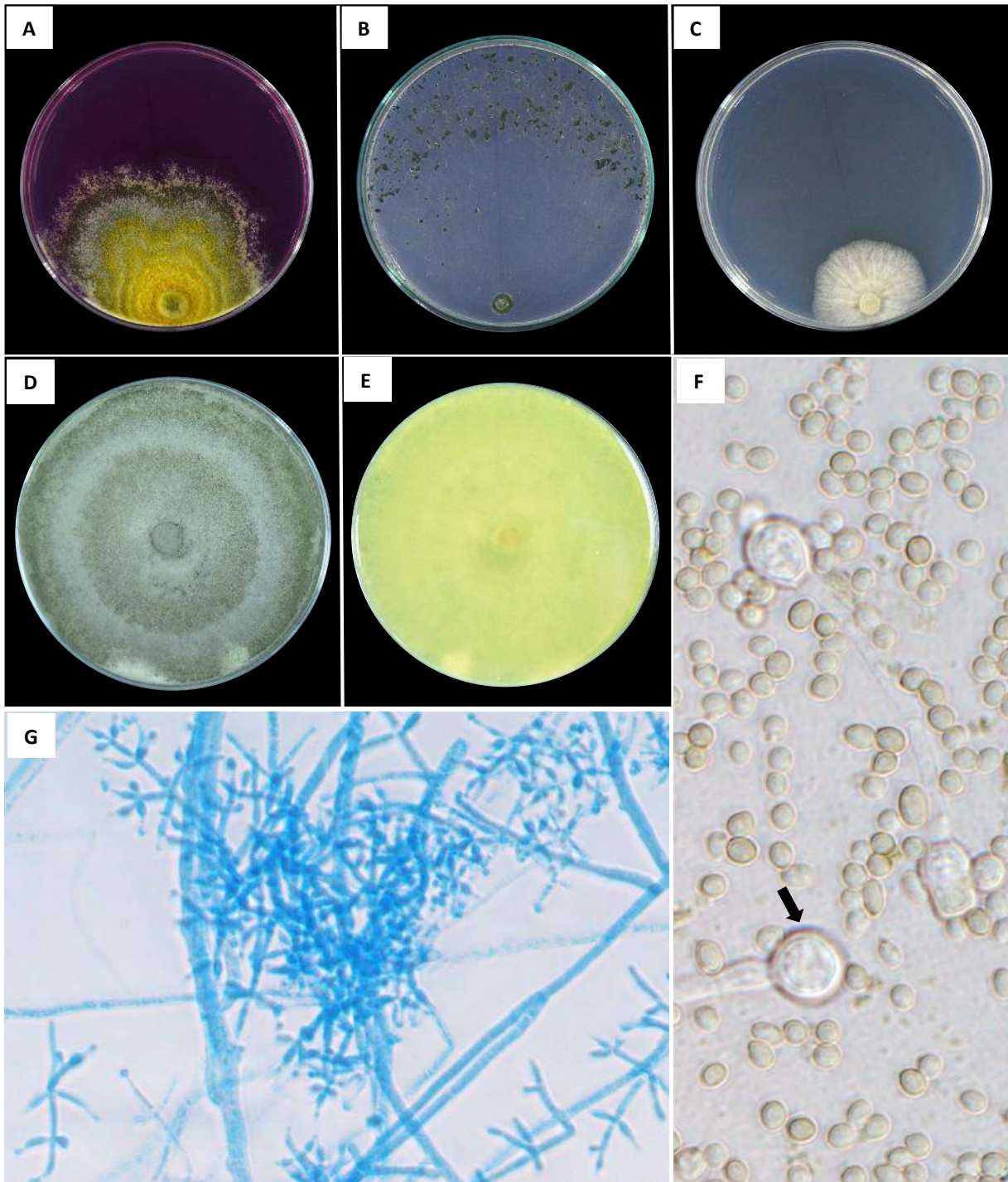


**Figura 31. *Trichoderma sp. 2* (CNF7\_C2). Cultivo a 28°C después de siete días (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia en anverso de placa; E: Pigmentación de colonia en reverso de placa; F: Conidios; G: Fiálides y conidióforos; H: Clamidosporas**

### *Trichoderma* sp. 3

Los rasgos morfológicos observados en el único aislado F2M4, cepa identificada como una nueva especie, a partir de la aplicación de herramientas de caracterización molecular que la posiciona en el clado Harzianum, posee rasgos morfológicos propios del género *Trichoderma* y dejan notar que después de 72 horas de cultivo, a 28°C y a 12 horas de fotoperiodo, esta especie alcanza un crecimiento de colonia promedio de 47-53 mm en medio PDA; en medio SNA fue de 43-51 mm y en medio RBA de 26-32 mm. Estos valores son inferiores a los encontrados en la sp. 1 y sp. 2, en todos los medios de cultivo. En la Figura 32, se puede observar además que en medio RBA, el crecimiento fue similar a las demás especies, inclusive a las especies del clado Harzianum; en el medio de cultivo SNA, puede notarse una conidiación poco densa aunque con un crecimiento rápido; por lo contrario, en el medio CMD, el crecimiento fue típico para el medio, dejándose notar dos anillos dispersos que rodean el inóculo inicial (Figura 32B). Por otro lado, dentro de los siete días después del cultivo, en medio PDA, se observa la placa completamente llena de micelio aéreo abundante con una coloración de colonia verde grisáceo y anillos concéntricos de color más intenso; en reverso de la placa se observa una tinción amarillo verdosa (Figura 32D, E).

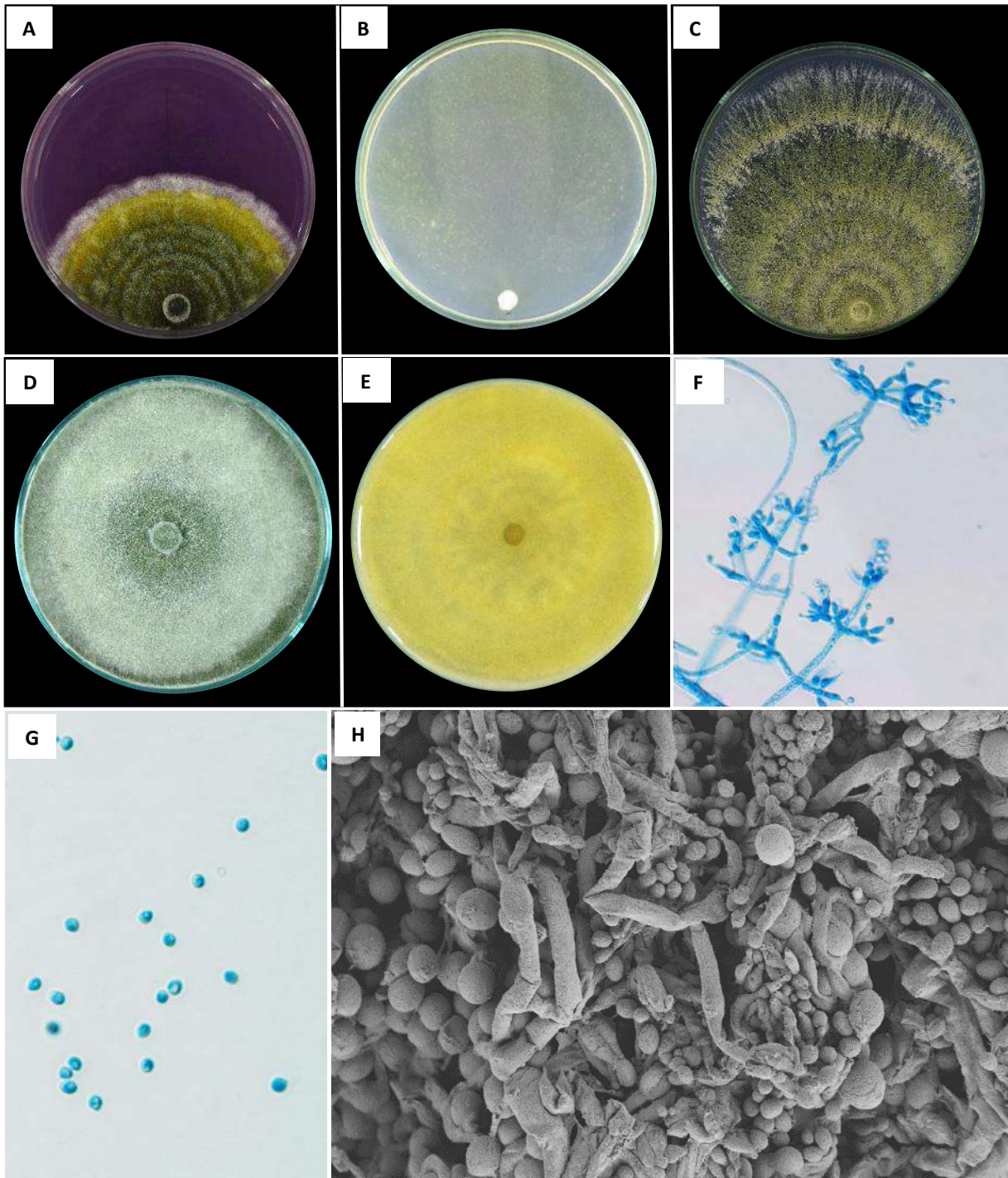
Esta especie, presenta Fiálides ampuliformes de 4,1-9,4  $\mu\text{m}$  x 2,3-3,3  $\mu\text{m}$  (proporción, largo/ancho), dimensiones que son ligeramente inferiores a las reportadas por Chaverri *et al.* (2015), cuando caracteriza a *T. afarasin*, especie genéticamente más próxima. Finalmente, en cuanto a la conidiación, ésta se presentó densa con conidios globosos y sub globosos de 2,4 - 3,6 x 2,2-3,5  $\mu\text{m}$ . Tamaños ligeramente superiores a su par más próximo (*T. afarasin*), por lo que podemos afirmar que estas especies son diferentes; además, de que en esta especie si se encontraron clamidosporas (Figura 32F) sin evidencia de algún olor distintivo de la colonia.



**Figura 32. *Trichoderma* sp. 3 (F2M4). Cultivo a 28°C después de siete días (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia en anverso de placa; E: Pigmentación de colonia en reverso de placa; F: Conidios y clamidosporas; G: Fiálides y conidioforos. Barras amarillas a 20 µm**

#### *Trichoderma* sp. 4

BIF26\_C2 es uno de los aislados cuya secuencia genética, fue sometida al protocolo de comparación de similitud por pares, lográndose determinar que molecularmente corresponde a una nueva especie para el género *Trichoderma*; estas afirmaciones son corroboradas cuando realizamos la caracterización morfológica de la cepa; es así que los resultados, respecto al crecimiento del radio de colonia (Figura 33) indican que después de 72 horas a 28°C en medio PDA, alcanzó los 55 - 66 mm, en medio SNA 51 - 60 mm y de 33-38 mm en medio RBA. Por otro lado, dentro de los siete días después del cultivo, en medio PDA, se observa la placa completamente llena de micelio aéreo abundante con una coloración de colonia verde grisáceo, aunque con una tinción de amarillo intenso en el reverso de la placa (Figura 33E), los conidios se observan de apariencia algodonosa. Presenta fiálides ampuliforme (forma de botellas) de 3,8 – 7.9  $\mu\text{m}$  x 2,4 - 3,5  $\mu\text{m}$  (medidas promedio de 5.3 x 3.1  $\mu\text{m}$ ). Además, se encontraron conidios globosos y también sub globosos (Figura 32GH) de 2,1-3.5  $\mu\text{m}$  x 2,1-3,1  $\mu\text{m}$  (largo/ancho, respectivamente). No se pudieron observar clamidosporas. Estas características morfológicas son similares a las reportadas por Chaverri *et al.* (2015) quienes reestructuraron la sistemática del complejo de especies de *Trichoderma harzianum* y la re identifican como cepas comerciales de control biológico a partir de herramientas moleculares y morfología; además se reporta que las colonias de esta cepa, desprende un ligero olor a dulce, el mismo que se evidenció en cultivos adicionales.

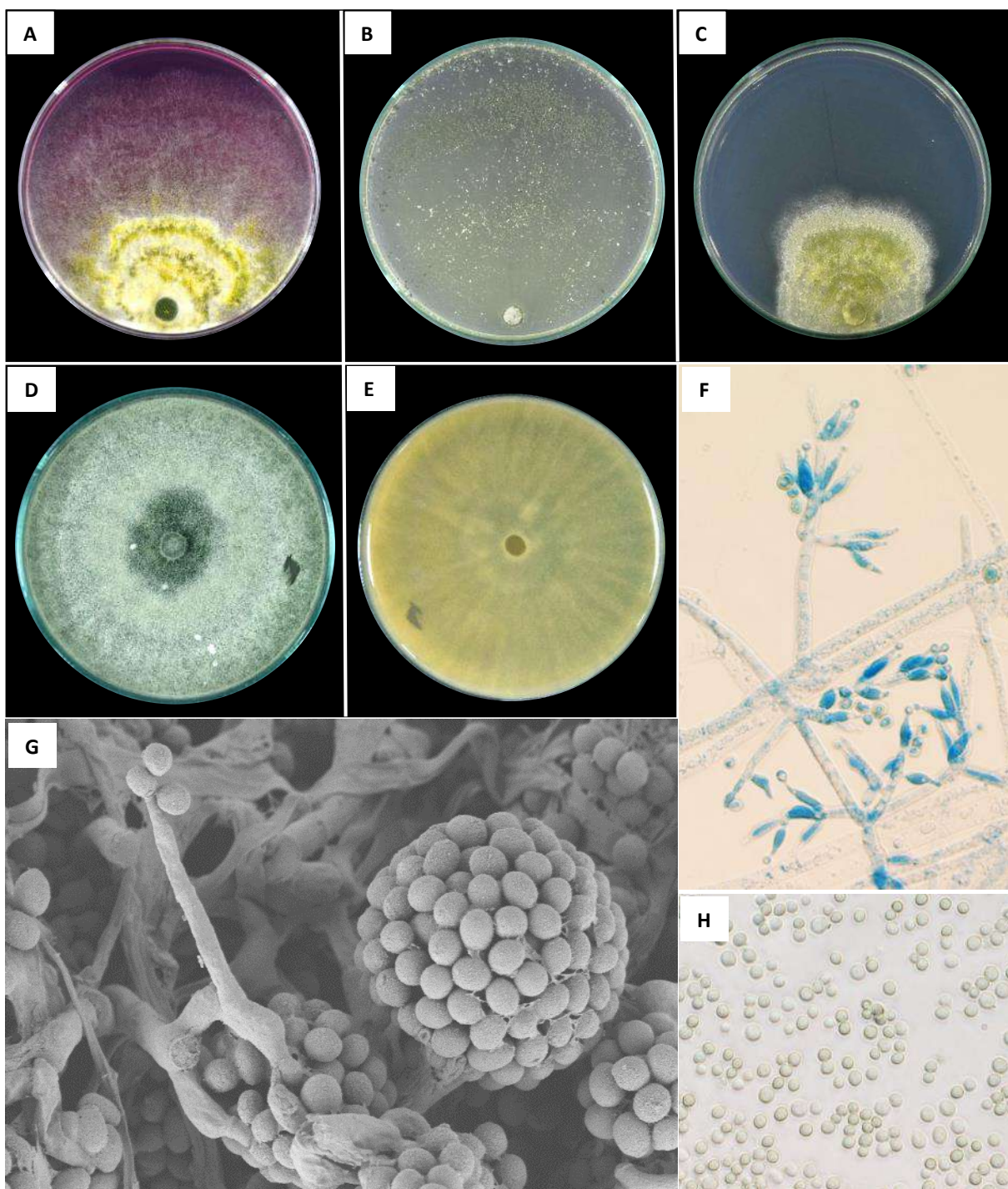


**Figura 33. *Trichoderma* sp. 4 (BIF26\_C1). Cultivo a 28°C después de siete días (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia en anverso de placa; E: Pigmentación de colonia en reverso de placa; F: Fiálides y conidióforos; G: Conidios; H: Conidios en microscopía electrónica**

### *Trichoderma* sp. 5

Finalmente, y en referencia a uno de los cinco *nuevos* clados del género *Trichoderma*, identificados en el presente estudio, se pudo determinar que los aislados CTN3\_C3, CNF10\_C3, CNF10\_C2, BIF18\_C1, BIF7\_C2 corresponden a una quinta nueva especie, puesto que el análisis molecular correspondiente así lo determina; y más aún las características morfológicas presentes en este estudio así lo demuestran, en tal sentido, esta especie, alcanzó, después de 72h y a 28°C, un radio de colonia en medio PDA de 53-65 mm y en SNA de 25-37 mm y de 32-37 mm en medio RBA. Se evidencia, además, presencia de micelio aéreo abundante y radiante (Figura 34) tanto el medio RBA y PDA (desde las 96 horas), siendo más evidente a los siete días de cultivo); en medio PDA, posee conidiación abundante, formando un anillo concéntrico al rededor del punto de inoculación. La colonia en siete días luce una coloración más verdosa en punto de inoculación a verdosa blanquecina hacia los bordes de la placa, además en reverso de placa petri se deja notar una pigmentación amarillenta con apariencia a marrón claro (Figura 34DE). En CMD el micelio es algo escaso. Por otro lado, los conidióforos forman una apariencia ligeramente piramidal, las fiálides son lageniforme y ampuliforme con dimensiones promedio de entre 3,3 -14,6 x 2,5 - 4,3  $\mu\text{m}$ , para largo y ancho, respectivamente.

Por otro lado, los conidios son globosos o sub globosos con dimensiones promedio de 2,5- 3.4 x 2,3 - 3,1  $\mu\text{m}$ , para largo/ancho, respectivamente, son de coloración verde y lisos en su superficie. Además, no se encontraron clamidosporas. Aunque con algunas variaciones de color de pigmentación en placa. Estos resultados son muy similares a los reportados por Chaverri *et al.* (2015) y Jang *et al.* (2017), lo que hace pensar que esta variable es diferente en cada cultivo en placa; además podrían darse otras diferencias, como por ejemplo en el tamaño de crecimiento radial, puesto que existe una diferencia de 1.2 mm de crecimiento mayor para el medio PDA avistado en el presente estudio, lo que se debería a los 3°C de temperatura adicionales.

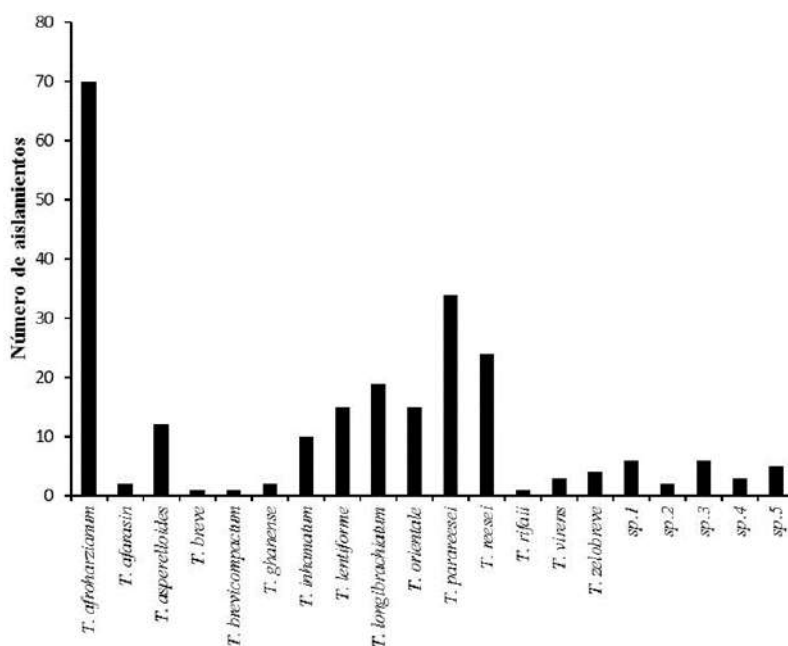


**Figura 34. *Trichoderma* sp. 5 (CNF10\_C3). Cultivo a 28°C después de siete días (A en RBA, B en CMD y C en SNA) D: Colonia en anverso de placa; E: Pigmentación en reverso de placa; F: Conidioforo y fiálides; G: Fiálides y conidios; H: Conidios**



### 4.1.3. Diversidad y análisis ecológico

En el presente estudio se determinaron 19 taxas. Este número de taxas presentó un  $D_{Mg} = 3.28$  y una  $H' = 2.23$ . La especie más abundante fue *T. afroharzianum* (35.5 por ciento) (Figura 1AS del archivo suplementario). Esta especie estuvo presente en 42 de 118 sitios muestreados. Así también, esta especie fue dominante en 19 sitios de muestreo. Después de *T. afroharzianum*, *T. parareesei* fue más abundante (22 por ciento). Esta especie estuvo presente en 26 de 118 fincas muestreadas; además, fue dominante en cinco sitios. Dieciocho especies más ocurrieron con frecuencias menores al 17 por ciento: *T. afarasin*, *T. asperelloides*, *T. breve*, *T. brevicompactum*, *T. ghanense*, *T. inhamatum*, *T. lentiforme*, *T. longibrachiatum*, *T. orientale*, *T. reesei*, *T. zelobreve*, sp.1, sp.2, sp.3, sp.4 y sp.5 (Figura 35).



**Figura 35. Abundancia de especies de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao, por altitud, en Amazonas, Perú. 2022**

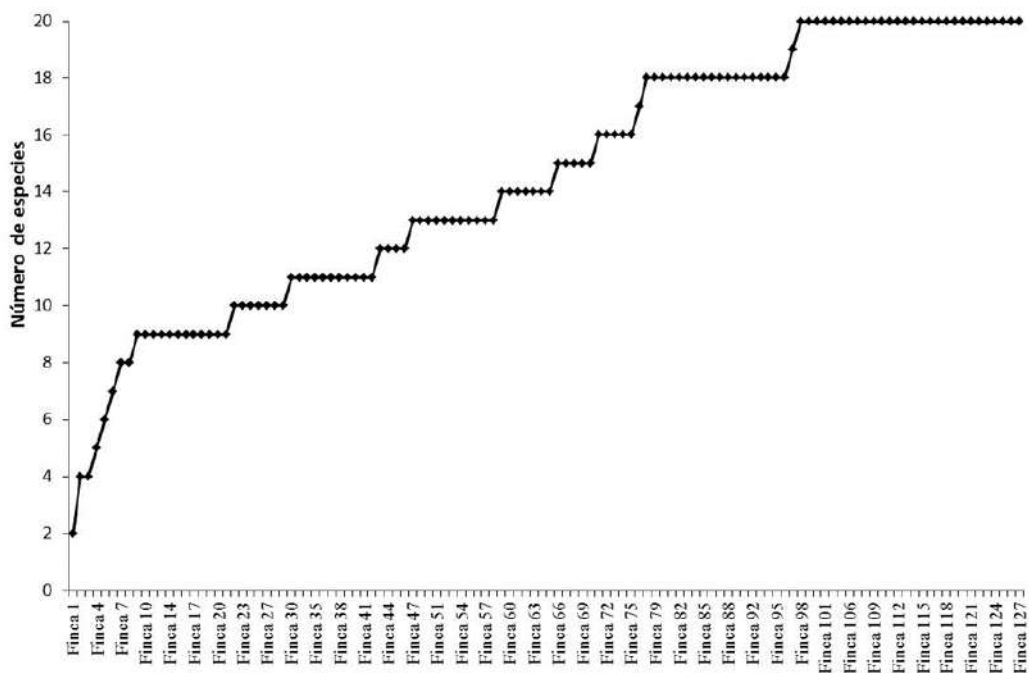
Los estudios de diversidad del género *Trichoderma* en el agroecosistema cacao son escasos. En Perú, este es el primer estudio de diversidad de *Trichoderma* del suelo de *Theobroma cacao*, basadas en morfología e identificación molecular. La escasez de estudios de diversidad de este género en Perú dificulta su comparación con la diversidad en este y otros agroecosistemas del país. En México, Torres de la Cruz *et al.* (2015) estudiaron la diversidad de *Trichoderma* en la

rizósfera de *Theobroma cacao*, en el estado de Tabasco, región que concentra la mayor área productiva de cacao en este país. Estos autores reportaron nueve especies de *Trichoderma* con un índice de riqueza ( $D_{Mg}$ ) y abundancia ( $H'$ ) de 1.75 y 1.69, respectivamente. El  $D_M$  encontrado en el agroecosistema cacao en Perú es mayor (3.48) al reportado para el agroecosistema cacao en México. Así también, la abundancia encontrada en el presente estudio es mayor (2.35). Por otro lado, la diversidad de *Trichoderma* encontrada en el suelo de *T. cacao* en Perú, también es mayor a la que reportó Rivas-Cordero y Pavone-Maniscalco (2010) en la rizósfera de *T. cacao* del estado de Carabobo, Venezuela; estos autores reportaron seis especies con un  $D_{Mg} = 1.37$ .

Diversos autores han reportado índices de diversidad en otras latitudes y ecosistemas, en los que se presentan índices de diversidad con valores inferiores a los reportados en la presente investigación. Al respecto, para América del Sur, Druzhinina *et al.* (2005) reportaron 10 especies de *Trichoderma*, con un  $D_{Mg} = 2.26$ . En la isla Sardinia, Italia, Migheli *et al.* (2009) reportaron 14 especies con un  $D_{Mg} = 2.1$ . Para el sudeste de Asia Kubicek *et al.* (2003) reportó 14 especies, con un  $D_{Mg} = 2.84$ . En China, Zhang *et al.* (2005) reportaron 13 especies de *Trichoderma*, con un  $D_{Mg} = 2.44$ . La notable diversidad encontrada en esta investigación refleja la importancia del manejo conservacionista del agroecosistema cacao y el papel del agroecosistema cacao en la conservación de diversidad de *Trichoderma*.

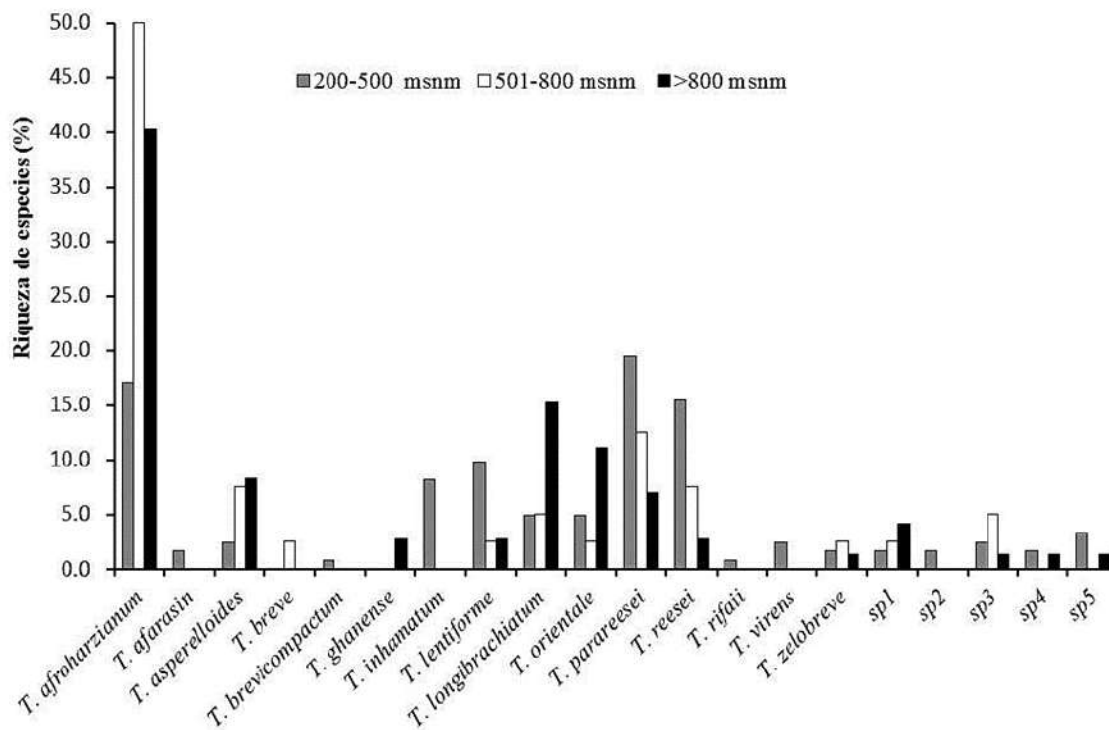
El valor del índice de uniformidad de Pielou ( $J$ ) fue de 0.77, el cual indicó uniformidad en la distribución de las especies, con dominancia de pocas especies. Este índice fue similar a lo reportado por Torres-de la Cruz *et al.* (2015) para el agroecosistema cacao en México. Por otro lado, el índice de diversidad verdadera fue de 10.5, el cual indica el número de especies efectivas en el agroecosistema estudiado. El número de especies ( $S$ ) incrementó de manera importante, desde el primer sitio ( $S = 2AS$ ) hasta el sitio nueve ( $S = 9$ ) (Figura 2AS). A partir de este sitio, el esfuerzo de muestreo para encontrar otras especies fue mayor. La curva de acumulación de especies mostró estabilidad después de 91 sitios de muestreo (Finca 98), y aunque se realizaron otras exploraciones, no se encontraron nuevos taxones de este género (Figura 36). El número de especies esperadas (índice Chao-1) fue de 20.75; lo cual es muy similar al número de especies encontradas. Así, la completitud del muestreo realizado para la determinación de la diversidad de *Trichoderma* en la rizósfera de *T. cacao*, fue del 96.3 por ciento. La estabilidad observada en

la curva de acumulación de especies indica que la amplitud (esfuerzo) de muestreo realizado permitió obtener la mayor diversidad de *Trichoderma* que alberga el suelo de *Theobroma cacao* en el área de estudio.



**Figura 36. Curva de acumulación de especies de hongos del género *Trichoderma*, obtenidas en el agroecosistema cacao, en Amazonas, Perú. 2022**

En relación al índice de similitud cualitativa (ISS), la comunidad de *Trichoderma* del estrato 200-500 msnm fue 69 por ciento similar a la comunidad encontrada en el estrato 501-800 msnm, compartiendo una riqueza de 10 especies. Así también, la comunidad de *Trichoderma* del estrato 200-500 msnm comparte una riqueza de 12 especies con la comunidad del estrato >800 msnm, con un valor de similitud del 71.4 por ciento. Por otro lado, la comunidad del estrato 501-800 msnm fue 83.3 por ciento similar con la comunidad del estrato >800 msnm, compartiendo una riqueza de 10 especies. La mayor riqueza se registró en el estrato de 200 a 500 msnm (18 especies,  $D_{Mg} = 1.8$ ); con una diferencia de siete y cinco especies con el estrato 501-800 (11 especies;  $D_{Mg} = 2.7$ ) y > 800 (13 especies,  $D_{Mg} = 2.8$ ), respectivamente (Figura 37).



**Figura 37. Riqueza de especies de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao, por altitud, en Amazonas, Perú. 2022**

En este estudio, la especie *T. afroharzianum* mostró predominancia; seguida por *T. parareesei*. Estos resultados difieren con lo reportado por Torres-de la Cruz *et al* (2015) y Rivas-Cordero y Pavone-Maniscalco (2010) quienes reportaron a *T. harzianum* y *T. virens* como especies predominante en el agroecosistema cacao en Tabasco, México y en Carabobo, Venezuela. Con base en la presencia de las especies, en los tres estratos involucrados en esta investigación, las especies *T. afroharzianum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. longibrachiatum*, *T. orientale*, *T. parareesei*, *T. reesei*, *T. zelobreve*, y los taxos sp.1 y sp.3, mostraron una FC del 100 por ciento (Cuadro 2AS). Dos taxos mostraron una FC del 66.7 por ciento. Los taxos *T. afarasin*, *T. breve*, *T. brevicompactum*, *T. ghanense*, *T. inhamatum*, *T. rifaii*, *T. virens* y sp.2 mostraron la menor FC (Cuadro 2AS). Las especies *T. afarasin*, *T. brevicompactum*, *T. inhamatum*, *T. rifaii* y *T. virens* sólo se registraron en el estrato con altitud de 200 a 500 msnm. La especie *T. breve* se encontró solamente en el estrato de 501 a 800 msnm. Por otro lado, el taxa *T. ghanense* se registró únicamente en el estrato con altitud >800 msnm.

## **4.2. BIOCONTROL *IN-VITRO* DE CEPAS NATIVAS DEL GÉNERO *TRICHODERMA* SOBRE LA MONILIASIS DEL CACAO (*MONILIOPHTHORA RORERI*)**

### **4.2.1. Ensayos de micoparasitismo**

La moniliasis del cacao llegó a Perú para quedarse; fue reportada por primera vez en 1988 en Quebrada Seca-Bagua Grande, Utcubamba Amazonas (Rios-Ruiz 2004), y desde entonces, se ha convertido en una de las enfermedades más devastadoras del cacao en el Perú (Krauss & Soberanis 2001). En 1988 se reportan daños de hasta el 100 por ciento (Soberanis *et al.* 1999) y desde entonces, los productores se iniciaron en un proceso de forzada convivencia con este problema, pues a pesar de los esfuerzos desplegados, aunque al parecer no fueron suficientes, en la actualidad, esta realidad no ha cambiado y los daños aún siguen causando estragos en la producción de cacao nativo.

En los intentos por hacer frente este problema, a partir del uso, principalmente de herramientas de bajo impacto ambiental y accesibles económicamente, los primeros reportes documentados con especificidad en el biocontrol de la moniliasis del cacao mediante aislados de *Trichoderma*, datan a trabajos como el de Krauss & Soberanis (2001), que casualmente se realiza en Perú y con reporte específico de pruebas *in-vitro*, que fueron reportados por Krauss *et al.* (2003), Arnold *et al.* (2003), Evans *et al.* (2003), Bailey *et al.* (2006), Mejía *et al.* (2008), Bailey *et al.* (2008) posteriormente Reyes-Figueroa *et al.* (2016), todos ellos sugieren que hongos endófitos como *Trichoderma* asociados con *T. cacao* reducen el daño asociado con patógenos en una variedad de formas diferentes en la planta. En nuestros resultados se respaldan estos hallazgos al demostrar que todas las especies en evaluación (90 por ciento de aislados) mostraron algún nivel de micoparasitismo sobre *M roreri*. En líneas generales estos resultados sugieren que el conjunto diverso de todas las especies locales de *Trichoderma* podrían tener un rol determinante como agente de biocontrol de la MC

Los resultados de los ensayos de micoparasitismo se presentan en el Cuadro 7.

**Cuadro 7. Micoparasitismo de 234 aislamientos agrupados en 19 especies de *Trichoderma* de Amazonas, Perú, evaluado sobre *Moniliophthora roreri* ( $\pm$  = error estándar; medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Scott Knott,  $\alpha = 0.05$ ))**

Specie	Strain	Micoparasitism ( por ciento)	Specie	Strain	Micoparasitism ( por ciento)
<i>T. reesei</i>	CTN3_C1	100 $\pm$ 0 a	<i>T. parareesei</i>	BIF4_C2	64 $\pm$ 14.7 c
<i>T. brevicompactum</i>	BBF1_C3	100 $\pm$ 0 a	<i>T. parareesei</i>	BMF15_C5	64 $\pm$ 9.8 c
<i>T. parareesei</i>	BBF4_C4	100 $\pm$ 0 a	<i>T. asperelloides</i>	BIF17_C1	62 $\pm$ 5.83 c
<i>T. lentiforme</i>	BIF11_C1	100 $\pm$ 0 a	<i>T. afroharzianum</i>	F20M3	62 $\pm$ 19.6 c
<i>T. afroharzianum</i>	BIF11_C4	100 $\pm$ 0 a	<i>T. longibrachiatum</i>	F18M2	60 $\pm$ 18.71 c
<i>T. afroharzianum</i>	BIF12_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. lentiforme</i>	AP1M4_C1	58 $\pm$ 11.58 c
<i>T. inhamatum</i>	BIF14_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. afroharzianum</i>	F18M5	58 $\pm$ 12 c
<i>T. inhamatum</i>	BIF18_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. lentiforme</i>	IP3M2_C3	58 $\pm$ 10.68 c
<i>T. afroharzianum</i>	BIF2_C4	100 $\pm$ 0 a	<i>T. longibrachiatum</i>	UCF5A_C1	58 $\pm$ 13.93 c
<i>T. afroharzianum</i>	BIF2_C5	100 $\pm$ 0 a	<i>T. asperelloides</i>	UCF6_M5	58 $\pm$ 5.83 c
<i>T. parareesei</i>	BIF20_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. longibrachiatum</i>	UCF14_C1	56 $\pm$ 6 c
<i>T. afroharzianum</i>	BIF22_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. lentiforme</i>	UCF3_M5	56 $\pm$ 13.64 c
<i>T. inhamatum</i>	BIF28_C3	100 $\pm$ 0 a	<i>T. afroharzianum</i>	UCF5_M5	56 $\pm$ 2.45 c
<i>T. reesei</i>	BIF5_C4	100 $\pm$ 0 a	<i>T. afroharzianum</i>	UCMF21_M2	56 $\pm$ 5.1 c
<i>Trichoderma sp5</i>	BIF7_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. ghanense</i>	BLPF4_C2	54 $\pm$ 6 d
<i>T. longibrachiatum</i>	BIF7_C3	100 $\pm$ 0 a	<i>T. reesei</i>	CRSF2_C3	54 $\pm$ 9.27 d
<i>T. reesei</i>	BIF8_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. parareesei</i>	CRSF3_C2	52 $\pm$ 12.41 d
<i>Trichoderma sp2</i>	BLPF1_C3	100 $\pm$ 0 a	<i>T. longibrachiatum</i>	UCF7_M5	52 $\pm$ 2 d
<i>T. lentiforme</i>	BLPF2_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. parareesei</i>	UJF2_C1	52 $\pm$ 7.35 d
<i>Trichoderma sp2</i>	BLPF4_C3	100 $\pm$ 0 a	<i>T. longibrachiatum</i>	BBF3_C1	50 $\pm$ 13.78 d
<i>T. orientale</i>	BMF19_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. orientale</i>	BIF17_C3	50 $\pm$ 0 d
<i>T. reesei</i>	BPF3_C1	100 $\pm$ 0 a	<i>T. afroharzianum</i>	F1M2	50 $\pm$ 13.04 d
<i>T. sp (uncertain)</i>	CCF2_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. lentiforme</i>	IP3M2_C4	50 $\pm$ 0 d
<i>T. parareesei</i>	CCF5_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>sp (uncertain)</i>	BBF1_C1	48 $\pm$ 13.56 d
<i>T. orientale</i>	CMBF1_C1	100 $\pm$ 0 a	<i>T. zelobreve</i>	BIF4_C4	48 $\pm$ 2 d
<i>Trichoderma sp5</i>	CNF10_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. inhamatum</i>	UBGF2_C1	48 $\pm$ 2 d
<i>Trichoderma sp5</i>	CNF10_C3	100 $\pm$ 0 a	<i>T. orientale</i>	UJF3_C4	48 $\pm$ 13.93 d
<i>T. orientale</i>	CNF16_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>Trichoderma sp2</i>	BLPF1_C4	46 $\pm$ 2.45 d
<i>T. afarasin</i>	AP2M1_C2	100 $\pm$ 0 a	<i>T. afroharzianum</i>	BIF13_C2	44 $\pm$ 6.78 d
<i>T. afroharzianum</i>	F10M5	100 $\pm$ 0 a	<i>T. afroharzianum</i>	BIF20_C1	44 $\pm$ 17.49 d
<i>T. afroharzianum</i>	F12M4	100 $\pm$ 0 a	<i>T. afroharzianum</i>	BIF28_C1	44 $\pm$ 4 d

<i>T. longibrachiatum</i>	F14M3	100±0 a	<i>T. parareesei</i>	CNF4_C2	44±2.45 d
<i>T. afroharzianum</i>	F14M5	100±0 a	<i>T. afroharzianum</i>	UCF1_M4	44±5.1 d
<i>T. afroharzianum</i>	F16M3	100±0 a	<i>T. sp (uncertain)</i>	UCF19A_C	44±6 d
<i>T. afroharzianum</i>	F19M1	100±0 a	<i>T. longibrachiatum</i>	UCF5A_C2	44±4 d
<i>T. asperelloides</i>	F19M3	100±0 a	<i>T. parareesei</i>	UJF2_C2	44±2.45 d
<i>T. longibrachiatum</i>	F1M3	100±0 a	<i>T. afroharzianum</i>	CNF10_C1	42±16.55 d
<i>T. afroharzianum</i>	F20M4	100±0 a	<i>T. afroharzianum</i>	UYF1_C1	42±3.74 d
<i>T. afroharzianum</i>	F21M1	100±0 a	<i>T. reesei</i>	CNF20_C1	40±10 d
<i>T. zelobreve</i>	F2M5	100±0 a	<i>T. reesei</i>	CNF8_C1	40±5.48 d
<i>T. ghanense</i>	F4M3	100±0 a	<i>T. afroharzianum</i>	F18M1	40±8.37 d
<i>T. lentiforme</i>	F5M4	100±0 a	<i>T. sp (uncertain)</i>	F20M5	40±16.73 d
<i>T. parareesei</i>	F9M3	100±0 a	<i>T. orientale</i>	UJF3_C2	40±4.47 d
<i>T. parareesei</i>	F9M4	100±0 a	<i>T. afroharzianum</i>	F3M4	38±10.68 d
<i>T. sp (uncertain)</i>	IP3M1_C4	100±0 a	<i>T. longibrachiatum</i>	UCF10A_C1	38±17.15 d
<i>T. afroharzianum</i>	IP3M3_C2	100±0 a	<i>T. parareesei</i>	CRSF6_C2	36±4 e
<i>T. inhamatum</i>	IP3M3_C3	100±0 a	<i>T. longibrachiatum</i>	F17M4	36±7.48 e
<i>T. afroharzianum</i>	IP3M4_C1	100±0 a	<i>Trichoderma sp5</i>	BIF18_C1	34±4 e
<i>T. afroharzianum</i>	IP3M4_C2	100±0 a	<i>T. reesei</i>	BIF3_C2	34±5.1 e
<i>T. afroharzianum</i>	UCF10_M5	100±0 a	<i>T. parareesei</i>	BIF1_C2	32±2 e
<i>T. afroharzianum</i>	UCF12_M3	100±0 a	<i>T. reesei</i>	UCM2_C1	32±11.14 e
<i>T. afroharzianum</i>	UCF16_M1	100±0 a	<i>T. reesei</i>	BIF3_C1	30±3.16 e
<i>T. afroharzianum</i>	UCF19_M4	100±0 a	<i>T. parareesei</i>	UCF7_M4	30±12.25 e
<i>T. orientale</i>	UCF1A_C2	100±0 a	<i>T. afroharzianum</i>	UCPF4_C3	30±9.49 e
<i>T. afroharzianum</i>	UCF20_M3	100±0 a	<i>T. koningiopsis</i>	BMF2_C1	28±5.83 e
<i>T. afroharzianum</i>	UCF21_M1	100±0 a	<i>T. parareesei</i>	CMF1_C1	26±8.72 e
<i>T. lentiforme</i>	UCF5_M1	100±0 a	<i>T. longibrachiatum</i>	UBGF1_C1	26±2.45 e
<i>T. afroharzianum</i>	UCPF2_C3	100±0 a	<i>T. reesei</i>	BIF15_C1	24±5.1 e
<i>T. sp (uncertain)</i>	UCPF3_C1	100±0 a	<i>T. reesei</i>	CCF3_C1	24±4 e
<i>T. lentiforme</i>	AP1M5_C1	98±2 a	<i>T. parareesei</i>	CNF1_C2	24±6.78 e
<i>T. longibrachiatum</i>	BBF1_C2	98±2 a	<i>T. afroharzianum</i>	UCF20_M1	22±4.9 e
<i>T. lentiforme</i>	BIF25_M2	98±2 a	<i>T. reesei</i>	UCF7_M2	22±5.83 e
<i>T. afroharzianum</i>	F5M5	98±2 a	<i>T. longibrachiatum</i>	UCPF1_C1	22±5.83 e
<i>T. afroharzianum</i>	IP3M1_C3	98±2 a	<i>T. reesei</i>	BIF2_C3	20±4.47 f
<i>T. parareesei</i>	BIF13_C1	96±4 a	<i>T. parareesei</i>	CNF4_C1	18±2 f
<i>T. sp (uncertain)</i>	BIF27_C2	96±4 a	<i>T. reesei</i>	CCF6_C1	16±2.45 f
<i>T. breve</i>	BLPF2_C1	96±4 a	<i>T. reesei</i>	CRSF1_C4	16±2.45 f
<i>T. afroharzianum</i>	F21M2	96±4 a	<i>T. orientale</i>	UCF18A_C1	16±10.3 f

<i>Trichoderma sp3</i>	F2M4	96±4 a	<i>T. reesei</i>	CB04_C1	8±4.9 f
<i>T. afroharzianum</i>	UCF13_M4	96±4 a	<i>T. longibrachiatum</i>	UCPF4_C2	8±5.83 f
<i>T. afroharzianum</i>	BIF16_C1	94±4 a	<i>T. parareesei</i>	BBF4_C2	6±4 f
<i>Trichoderma sp4</i>	BIF26_C1	94±6 a	<i>T. lentiforme</i>	CNF21_C2	6±6 f
<i>T. afroharzianum</i>	BIF28_C2	94±4 a	<i>T. asperelloides</i>	UCF8_M5	6±6 f
<i>T. inhamatum</i>	BIF16_C2	92±4.9 a	<i>T. reesei</i>	BIF4_C1	4±4 f
<i>T. inhamatum</i>	BIF8_C1	92±3.74 a	<i>T. sp (uncertain)</i>	BIF5_C3	4±2.45 f
<i>T. inhamatum</i>	BIF9_C1	92±5.83 a	<i>T. orientale</i>	BMF18_C1	4±4 f
<i>T. sp (uncertain)</i>	CRSF5_C1	92±8 a	<i>T. lentiforme</i>	CNF12_C2	4±2.45 f
<i>T. parareesei</i>	UCF18_M3	92±8 a	<i>T. reesei</i>	CRSF1_C3	4±2.45 f
<i>T. lentiforme</i>	BIF12_C1	90±6.32 a	<i>Trichoderma sp5</i>	CTN3_C3	4±2.45 f
<i>T. inhamatum</i>	BIF14_C3	90±10 a	<i>T. afroharzianum</i>	F12M3	4±2.45 f
<i>T. zelibre</i>	BIF15_C2	90±6.32 a	<i>T. asperelloides</i>	F8M5	4±2.45 f
<i>T. orientale</i>	CNF1_C1	90±6.32 a	<i>T. parareesei</i>	UCF17_M1	4±4 f
<i>T. afroharzianum</i>	F13M4	90±10 a	<i>T. orientale</i>	UCMF2_C1	4±4 f
<i>T. afroharzianum</i>	F20M1	90±10 a	<i>T. parareesei</i>	CCF5_C5	2±2 f
<i>T. afroharzianum</i>	F5M3	90±10 a	<i>T. reesei</i>	CNF5_C1	2±2 f
<i>T. asperelloides</i>	F6M5	90±10 a	<i>T. parareesei</i>	CRSF1_C2	2±2 f
<i>T. inhamatum</i>	BIF12_C3	88±9.7 a	<i>T. afroharzianum</i>	F21M3	2±2 f
<i>T. afroharzianum</i>	BIF14_C1	88±7.35 a	<i>T. afroharzianum</i>	IP3M1_C2	2±2 f
<i>T. afroharzianum</i>	F14M4	88±4.9 a	<i>T. orientale</i>	UCF18A_C3	2±2 f
<i>T. afroharzianum</i>	UCF5_M4	88±12 a	<i>T. asperelloides</i>	UCF2_M2	2±2 f
<i>T. lentiforme</i>	BIF11_C2	86±6 a	<i>T. longibrachiatum</i>	UCMF2_C3	2±2 f
<i>T. afroharzianum</i>	AP2M2_C1	84±6.78 a	<i>T. parareesei</i>	UCMF2_C4	2±2 f
<i>T. afroharzianum</i>	F10M1	84±10.3 a	<i>T. lentiforme</i>	BIF1_C4	0±0 f
<i>T. inhamatum</i>	BIF11_C3	82±11.14 b	<i>T. asperelloides</i>	BIF7_C1	0±0 f
<i>T. parareesei</i>	CNF15_C4	82±7.35 b	<i>T. sp (uncertain)</i>	BLPF1_C2	0±0 f
<i>T. afroharzianum</i>	F12M1	82±11.14 b	<i>T. parareesei</i>	BMF1_C1	0±0 f
<i>T. sp (uncertain)</i>	BIF2_C2	80±12.25 b	<i>T. parareesei</i>	BMF19_C4	0±0 f
<i>T. orientale</i>	CRSF1_C1	80±12.25 b	<i>T. reesei</i>	CB04_C2	0±0 f
<i>T. afroharzianum</i>	F10M2	80±12.65 b	<i>Trichoderma sp2</i>	CCF4_C1	0±0 f
<i>T. afroharzianum</i>	UCF10_M1	80±12.25 b	<i>T. parareesei</i>	CNF3_C1	0±0 f
<i>T. longibrachiatum</i>	UCF17_M4	80±12.25 b	<i>T. parareesei</i>	CNF7_C1	0±0 f
<i>T. afarasin</i>	BIF1_C3	78±9.7 b	<i>Trichoderma sp2</i>	CNF7_C2	0±0 f
<i>T. asperelloides</i>	F8M2	78±10.2 b	<i>T. parareesei</i>	CRSF1_C5	0±0 f
<i>T. zelibre</i>	BMF2_C2	76±11.22 b	<i>Trichoderma sp 1</i>	CRSF6_C1	0±0 f
<i>T. afroharzianum</i>	CNF12_C1	76±9.27 b	<i>T. afroharzianum</i>	F15M5	0±0 f

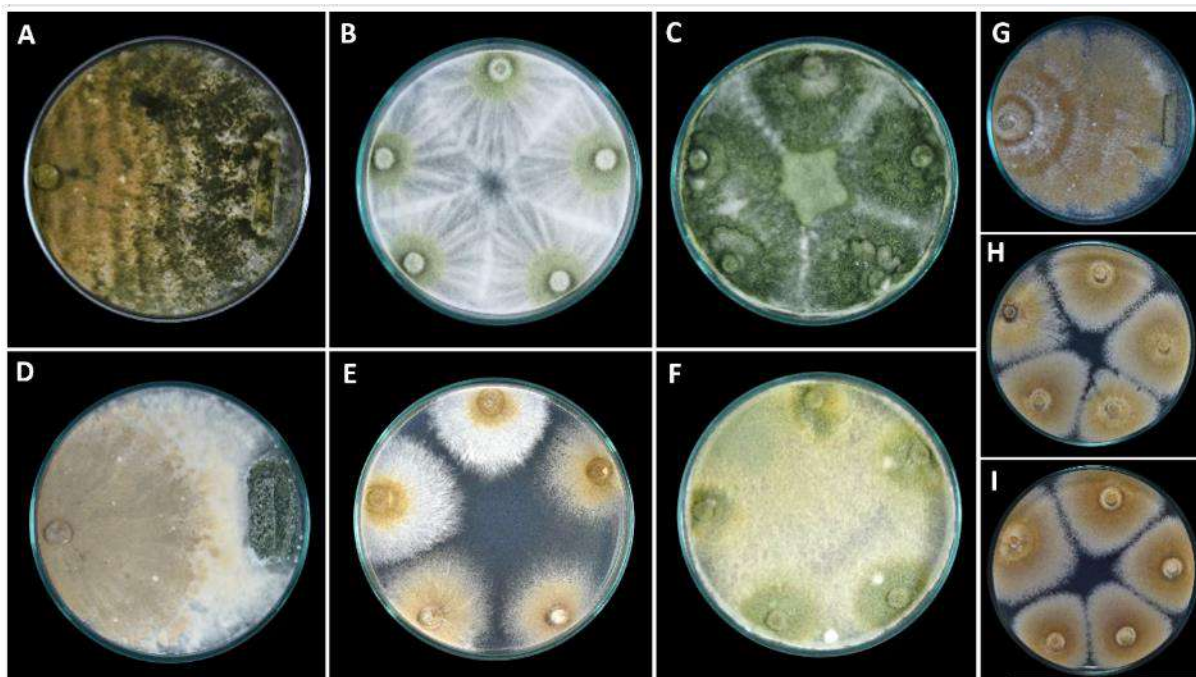


<i>T. parareesei</i>	CNF16_C1	76±11.22 b	<i>T. afroharzianum</i>	F19M4	0±0 f
<i>T. parareesei</i>	CNF7_C3	76±11.66 b	<i>T. afroharzianum</i>	F1M4	0±0 f
<i>T. afroharzianum</i>	F18M4	76±11.22 b	<i>T. afroharzianum</i>	F20M2	0±0 f
<i>T. afroharzianum</i>	F16M1	74±14 b	<i>T. afroharzianum</i>	F21M4	0±0 f
<i>T. parareesei</i>	BIF27_C1	72±9.7 b	<i>T. longibrachiatum</i>	F21M5	0±0 f
<i>T. asperelloides</i>	BLPF4_C1	72±11.58 b	<i>T. reesei</i>	F7M2	0±0 f
<i>T. sp (uncertain)</i>	UCPF2_C1	72±11.58 b	<i>T. afroharzianum</i>	F7M3	0±0 f
<i>T. lentiforme</i>	BIF10_C2	70±15.81 b	<i>Trichoderma sp 1</i>	UCF1_C1	0±0 f
<i>T. afroharzianum</i>	BIF17_C2	70±12.25 b	<i>T. sp (uncertain)</i>	UCF19A_C1	0±0 f
<i>T. asperelloides</i>	BLPF3_C1	70±6.32 b	<i>T. longibrachiatum</i>	UCF21_C1	0±0 f
<i>T. afroharzianum</i>	F3M5	70±10.49 b	<i>T. longibrachiatum</i>	UCMF3_C1	0±0 f
<i>T. afroharzianum</i>	IP3M3_C1	70±6.32 b	<i>Trichoderma sp 1</i>	UJF1_C1	0±0 f

Los ensayos de micoparasitismo dan a saber que los aislamientos de *Trichoderma* evaluados mostraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.0001$ ) en su comportamiento parasítico contra *M. royeri* (Cuadro 7). Las medias del porcentaje de micoparasitismo mostrado por los 234 aislamientos evaluados fueron distribuidas en seis grupos estadísticamente diferentes entre sí y variaron desde 0 a 100 por ciento de micoparasitismo. Los resultados indican que no todas las especies evaluadas tuvieron aislamientos con algún comportamiento parasítico sobre *M. royeri*. A saber: 160 aislamientos, que en términos porcentuales equivalen a un 68 por ciento de los aislados, alcanzaron porcentajes promedio de parasitismo por encima del 40 por ciento; mientras que, 59 aislamientos (25 por ciento) alcanzaron un 100 por ciento de parasitismo sobre *M. royeri*. Por otro lado, solo 25 aislamientos no tuvieron comportamiento parasítico sobre *M. royeri* y pertenecen a las especies *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma asperelloides*, *Trichoderma sp. (uncertain) BLPF1\_C2*, *Trichoderma parareesei*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma sp. 2*, *Trichoderma sp. 1*, *Trichoderma afroharzianum*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma sp (uncertain) UCF19A\_C1*.

Por otro lado, de la Cuadro anterior se deduce que de los seis grupos conformados y estadísticamente diferentes entre sí, el 39.7 por ciento de aislados (93 cepas), liderados por la cepa CTN3\_C1 (*T. reesei*) e integrada por las especies *T. afroharzianum*, *T. brevicompactum*, *T. parareesei*, *T. lentiforme*, *T. inhamatum* y *T. longibrachiatum*, alcanzaron el mayor nivel con

valores que oscilaron entre los 84 y 100 por ciento de micoparasitismo. Un segundo grupo encabezado por la cepa F12M1 (*T. afroharzianum*) y conformada por 24 aislados (10.25 por ciento) de las especies *T. inhamatum*, *T. parareesei*, *T. afroharzianum*, *Trichoderma* sp (uncertain), *T. orientale*, *T. longibrachiatum*, alcanzaron niveles de micoparasitismo entre 70 – 82 por ciento. Un tercer grupo (14 aislados de las especies) tuvieron valores de micoparasitismo entre el 56 y 64 por ciento; también, un cuarto grupo (31 aislados tuvieron niveles de micoparasitismo entre 38 por ciento y 54 por ciento. Finalmente, hallamos a dos grupos rezagados; el primero, compuesto por 18 aislados de las especies , que alcanzaron niveles de micoparasitismo de 22-34 por ciento y además un grupo de 54 aislados (23 por ciento) de las especies *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma asperelloides*, *Trichoderma* sp. (uncertain) *BLPF1\_C2*, *Trichoderma parareesei*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma* sp. 2, *Trichoderma* sp1, *Trichoderma afroharzianum*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma* sp. (uncertain) *UCF19A\_C1*, mostraron entre 0 - y un disminuido 20 por ciento de micoparasitismo. Entonces, El grupo con el mayor porcentaje de aislados (39.7 por ciento) alcanzó el mayor nivel de micoparasitismo, frente a un 23 por ciento que no lo presentó; además, precisamos que el 89.4 por ciento de aislados expresó algún nivel de micoparasitismo. En términos prácticos podríamos aseverar que encontramos a aislamientos con micoparasitismo alto, medio y bajo (Figura 38).



**Figura 38. Niveles de micoparasitismo. A-C: Nivel alto de micoparasitismo de *T. longibrachiatum* (F14M3) (A: 21 días después de inoculación sobre *M. royeri*; B: Nivel medio de micoparasitismo; C: Nivel bajo de micoparasitismo). D-I: Otros niveles de micoparasitismo de diferentes especies de *Trichoderma*.**

**medio de micoparasitismo, cepa CRSF3\_C2, (*T. parareesei*). E-G: Nivel bajo de micoparasitismo de la especie *T. longibrachiatum* (F21M5)**

Reyes-Figueroa *et al.* (2016) en su trabajo “Especies de *Trichoderma* del agroecosistema cacao con potencial de biocontrol sobre *Moniliophthora roreri*” se proponen el objetivo de evaluar el potencial de 50 aislamientos nativos de *Trichoderma* con las mejores características antagónicas y fisiológicas sobre *M. roreri*, en este contexto, encontraron diferencias significativas ( $P = 0.0001$ ) en todas las variables evaluadas, enfatizan que el micoparasitismo varió de 0 a 100 por ciento y solo los aislamientos de seis especies mostraron esta característica, Resultados se asemejan a los encontrados en el presente estudio, puesto que también reportamos estas variaciones de micoparasitismo 0-100 por ciento, asemejándose también a los reportados por (Leiva *et al.* 2020). Estos estudios han sido referentes y son determinantes para aseverar variabilidad de expresión de micoparasitismo por distintos aislados de distintas especies del género *Trichoderma*.

Entonces, el micoparasitismo mostrado en este estudio dentro de aislamientos de una misma especie es variable. Esto ya ha sido observado anteriormente por otros autores como Hoyos-Carvajal *et al.*(2011), Reyes-Figueroa *et al.* (2016) y Leiva *et al.* (2020). En este sentido, ya se han reportado la actividad de micoparasitismo de *T. afroharzianum*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis*; *T. brevicompactum* y *T. reesei* sobre *M. roreri* por Cuervo-Parra *et al.* (2011); Evans *et al.* (2003); Galarza *et al.* (2015); Krauss *et al.* (2006) y Reyes-Figueroa *et al.* (2016). Para las demás especies este estudio representa la primera ocasión en la que se reporta actividad de parasitismo sobre *M. roreri*. Aunque, aislamientos de *T. asperelloides*, *T. lentiforme* y *T. reesei* han sido reportados como micoparásitos en otras enfermedades fungicas como *Phytophthora palmivora* en cultivo de palma (Sarria *et al.* 2021); mientras que, *T. koningiopsis* se ha reportado como un agente parasitario de *Macrophomina phaseolina* en cultivo de maní (Martínez-Salgado *et al.* 2021).

En base a estos resultados podríamos establecer como una hipótesis altamente probable que estos aislamientos producen metabolitos que los ayudan a parasitar a *M. roreri* con mayor o menor agresividad según la matriz enzimática producida (Bailey *et al.* 2008; Infante *et al.* 2009;

Reyes-Figueroa *et al.* 2016). Entonces, metabolitos como b-glucanasa, celulasa y proteasa son los responsables directos de los mecanismos de micoparasitismo de las especies de *Trichoderma* aquí evaluadas (Bailey *et al.* 2008).

#### 4.2.2. Ensayos de antibiosis

El proceso de antibiosis se produce en interacciones en el que intervienen compuestos difusibles de peso molecular bajo o debido a antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Benítez *et al.* 2004). La gran mayoría de las especies de *Trichoderma* tiene el potencial de producir metabolitos volátiles y no volátiles de naturaleza tóxica, por lo que logran impedir la colonización que podrían causar algunos microorganismos antagonizados (por ejemplo, fitopatógenos); entre los metabolitos que sintetizan, se han descrito la producción de peptaibols, alameticinas, ácido harziánico, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, tricolina, antibióticos, gliovirina, viridina, ácido heptelídico, masoilactona, glisopreninas, etc (Vey *et al.* 2001). Los datos presentados en nuestro estudio (Cuadro 7) verifican que los aislamientos estudiados son capaces de mostrar algún nivel de antibiosis, frente al agente causal de la MC por lo que demostramos que todas las especies poseen la capacidad de producir antibiosis frente al fitopatógeno *M. roreri*, pues evaluamos el nivel de antibiosis de 234 aislados organizados en 19 especies, como un paso obligado en el proceso de búsqueda de un agente de biocontrol de la enfermedad. Los resultados de la antibiosis alcanzados por cada uno de los aislamientos, se muestran en el Cuadro 8.

**Cuadro 8. Antibiosis de 234 aislamientos nativos, agrupados en 19 especies de *Trichoderma* de Amazonas, Perú, evaluado sobre *Moniliophthora roreri* ( $\pm$  = error estándar; medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Scott Knott,  $\alpha$  = 0.05))**

Specie	Strain	Antibiosis (por ciento)	Specie	Strain	Antibiosis (por ciento)
<i>T. afroharzianum</i>	F13M4	31.09 $\pm$ 2.15 a	<i>T. zelibreve</i>	BIF15_C2	15.82 $\pm$ 2.1 b
<i>T. longibrachiatum</i>	UCF5A_C1	31.07 $\pm$ 2.08 a	<i>T. afroharzianum</i>	BIF22_C2	15.81 $\pm$ 1.97 b
<i>T. parareesei</i>	F9M3	30.55 $\pm$ 1.3 a	<i>T. afroharzianum</i>	F10M2	15.79 $\pm$ 3.49 b
<i>T. longibrachiatum</i>	F14M3	29.83 $\pm$ 4.19 a	<i>T. longibrachiatum</i>	F17M4	15.79 $\pm$ 3.14 b
<i>T. sp (uncertain)</i>	CRSF5_C1	29.37 $\pm$ 2.61 a	<i>T. asperelloides</i>	F19M3	15.79 $\pm$ 2.57 b
<i>T. afroharzianum</i>	F5M5	29.37 $\pm$ 1.12 a	<i>T. sp (uncertain)</i>	UCPF3_C1	15.75 $\pm$ 2.35 b

<i>T. orientale</i>	BMF19_C2	29.35±1.96 a	<i>T. breve</i>	BLPF2_C1	15.7±3.59 b
<i>T. longibrachiatum</i>	BBF1_C2	28.93±4.62 a	<i>T. parareesei</i>	BIF20_C2	15.69±3.71 b
<i>T. parareesei</i>	BIF4_C2	28.86±1.99 a	<i>T. afroharzianum</i>	BIF11_C4	15.67±5.2 b
<i>T. asperelloides</i>	BLPF4_C1	28.81±1.99 a	<i>T. asperelloides</i>	UCF6_M5	15.45±4.44 c
<i>T. afroharzianum</i>	F5M3	28.75±1.93 a	<i>T. reesei</i>	CTN3_C1	15.28±3.79 c
<i>T. zelobreve</i>	BMF2_C2	28.2±1.83 a	<i>T. orientale</i>	CNF1_C1	15.22±2.02 c
<i>T. zelobreve</i>	F2M5	28.19±1.65 a	<i>T. inhamatum</i>	BIF16_C2	15.21±3.76 c
<i>T. lentiforme</i>	F5M4	28.14±2.39 a	<i>T. reesei</i>	F7M2	15.2±2.94 c
<i>T. longibrachiatum</i>	UCMF2_C3	28.13±2.3 a	<i>T. afroharzianum</i>	IP3M4_C2	15.18±2.84 c
<i>T. afroharzianum</i>	IP3M4_C1	28.12±2.81 a	<i>T. reesei</i>	BIF4_C1	15.14±3.11 c
<i>T. afroharzianum</i>	UCF16_M1	28.1±3.23 a	<i>T. afroharzianum</i>	F21M4	15.12±3.39 c
<i>T. asperelloides</i>	BIF7_C1	28.09±3.06 a	<i>T. afroharzianum</i>	CNF12_C1	15.08±4.32 c
<i>T. afroharzianum</i>	BIF2_C4	27.59±1.82 a	<i>Trichoderma sp5</i>	BIF18_C1	14.73±1.82 c
<i>T. lentiforme</i>	AP1M4_C1	27.48±3.27 a	<i>T. reesei</i>	CRSF2_C3	14.68±1.48 c
<i>T. inhamatum</i>	BIF14_C2	27.04±1.39 a	<i>T. afroharzianum</i>	IP3M3_C2	14.68±1.43 c
<i>T. parareesei</i>	BMF19_C4	27.02±2.23 a	<i>T. afroharzianum</i>	UCF20_M1	14.63±1.65 c
<i>T. afroharzianum</i>	UCF19_M4	27±2.67 a	<i>T. afroharzianum</i>	BIF2_C5	14.62±4.33 c
<i>T. longibrachiatum</i>	UCF17_M4	26.41±1.04 a	<i>T. reesei</i>	BIF5_C4	14.6±2.39 c
<i>T. afroharzianum</i>	UCF5_M5	26.41±1.38 a	<i>T. reesei</i>	CCF6_C1	14.59±2.66 c
<i>Trichoderma sp5</i>	CNF10_C3	26.39±1.65 a	<i>T. longibrachiatum</i>	F21M5	14.58±2.63 c
<i>T. parareesei</i>	CCF5_C2	26.31±3.05 a	<i>T. longibrachiatum</i>	BBF3_C1	14.55±2.96 c
<i>T. afroharzianum</i>	F3M4	25.86±1.91 a	<i>T. afroharzianum</i>	IP3M1_C2	14.15±2.99 c
<i>T. lentiforme</i>	UCF3_M5	25.86±1.91 a	<i>T. afroharzianum</i>	F21M1	14.11±1.34 c
<i>T. inhamatum</i>	BIF8_C1	25.4±4.24 a	<i>T. reesei</i>	CNF20_C1	14.1±2.83 c
<i>T. longibrachiatum</i>	F1M3	25.25±2.84 a	<i>T. inhamatum</i>	BIF14_C3	14.06±2.96 c
<i>T. parareesei</i>	CNF3_C1	25.24±1.8 a	<i>T. parareesei</i>	CRSF1_C5	14.01±2.75 c
<i>T. longibrachiatum</i>	UBGF1_C1	25.23±2.27 a	<i>Trichoderma sp 1</i>	UCF1_C1	14.01±2.07 c
<i>T. afroharzianum</i>	CNF10_C1	25.13±3.51 a	<i>Trichoderma sp3</i>	F2M4	13.99±3.32 c
<i>T. brevicompactum</i>	BBF1_C3	24.08±1.14 a	<i>T. afroharzianum</i>	UCPF4_C3	13.57±2.48 c
<i>T. lentiforme</i>	BIF10_C2	23.49±2.5 a	<i>T. reesei</i>	BPF3_C1	13.53±2.04 c
<i>T. longibrachiatum</i>	UCPF4_C2	23.02±2.22 a	<i>T. orientale</i>	CRSF1_C1	13.52±2.36 c
<i>T. afroharzianum</i>	UCF5_M4	22.94±1.34 a	<i>T. afroharzianum</i>	F20M2	13.5±1.94 c
<i>T. parareesei</i>	CMF1_C1	22.92±2.08 a	<i>T. afroharzianum</i>	UCF10_M1	13.46±2.71 c
<i>T. lentiforme</i>	AP1M5_C1	22.87±3.38 a	<i>T. ghanense</i>	BLPF4_C2	13.33±4.11 c
<i>T. inhamatum</i>	UBGF2_C1	22.86±2.22 a	<i>T. afroharzianum</i>	F18M5	13±5.7 c
<i>T. afroharzianum</i>	BIF14_C1	22.85±2.13 a	<i>Trichoderma sp4</i>	BIF26_C1	12.93±1.19 c
<i>T. lentiforme</i>	BLPF2_C2	22.83±2.45 a	<i>T. sp (uncertain)</i>	BBF1_C1	12.92±1.5 c

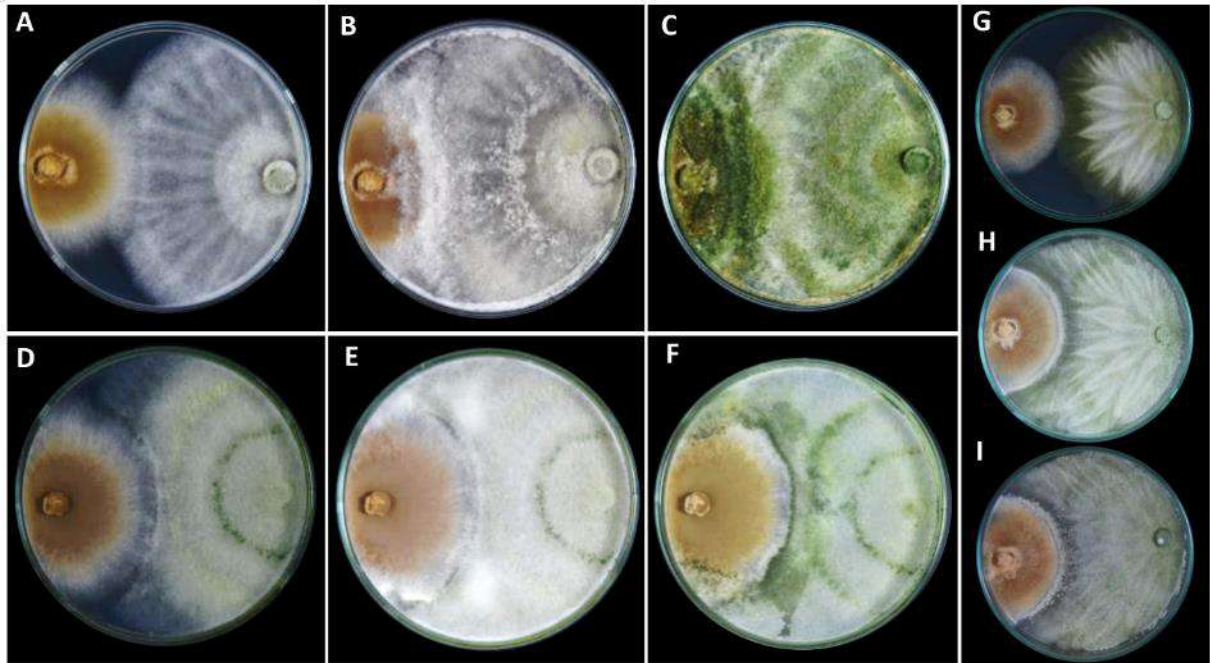
<i>T. afarasin</i>	BIF1_C3	22.23±2.46 b	<i>Trichoderma sp5</i>	CNF10_C2	12.9±5.21 c
<i>T. inhamatum</i>	IP3M3_C3	21.72±2.14 b	<i>T. parareesei</i>	BMF15_C5	12.87±3.77 c
<i>T. parareesei</i>	CNF1_C2	21.7±1.61 b	<i>T. afroharzianum</i>	F16M3	12.87±2.5 c
<i>T. afroharzianum</i>	BIF16_C1	21.69±2.21 b	<i>T. sp (uncertain)</i>	UCPF2_C1	12.85±3.47 c
<i>T. lentiforme</i>	BIF12_C1	21.64±3.1 b	<i>T. afroharzianum</i>	F16M1	12.42±1.97 c
<i>T. lentiforme</i>	CNF21_C2	21.19±2.48 b	<i>T. reesei</i>	UCF7_M2	12.42±3.13 c
<i>T. afarasin</i>	AP2M1_C2	21.13±2.09 b	<i>T. afroharzianum</i>	F1M4	12.3±4.31 c
<i>T. afroharzianum</i>	BIF28_C2	21.13±2.24 b	<i>T. orientale</i>	BMF18_C1	12.28±3.12 c
<i>T. parareesei</i>	BIF27_C1	21.1±1.97 b	<i>T. reesei</i>	CCF3_C1	12.21±3.04 c
<i>T. lentiforme</i>	BIF11_C2	21.09±1.87 b	<i>T. afroharzianum</i>	UCF12_M3	12.21±4.06 c
<i>T. afroharzianum</i>	UCF21_M1	21.05±2.39 b	<i>Trichoderma sp2</i>	BLPF4_C3	11.69±2.11 c
<i>T. lentiforme</i>	BIF1_C4	21.04±3.13 b	<i>T. zelobreve</i>	BIF4_C4	11.67±3.51 c
<i>T. asperelloides</i>	F8M2	20.69±3.78 b	<i>T. afroharzianum</i>	F20M1	11.15±2.77 c
<i>T. parareesei</i>	UCF18_M3	20.41±3.38 b	<i>T. parareesei</i>	BIF13_C1	11.14±1.12 c
<i>T. asperelloides</i>	BLPF3_C1	20.04±1.59 b	<i>T. lentiforme</i>	CNF12_C2	11.02±4.48 c
<i>T. reesei</i>	CRSF1_C3	20.04±1.31 b	<i>T. sp (uncertain)</i>	UCF19A_C1	10.62±2.09 c
<i>T. inhamatum</i>	BIF12_C3	20.02±1.4 b	<i>T. orientale</i>	CNF16_C2	10.58±1.06 c
<i>T. parareesei</i>	CNF7_C3	19.99±2.15 b	<i>T. asperelloides</i>	UCF2_M2	10.48±2.82 c
<i>T. afroharzianum</i>	F19M4	19.99±1.93 b	<i>T. parareesei</i>	CNF4_C2	10.43±3.36 c
<i>T. parareesei</i>	BBF4_C4	19.98±2.04 b	<i>T. afroharzianum</i>	BIF13_C2	10.41±3.5 c
<i>T. afroharzianum</i>	F14M4	19.97±2.12 b	<i>Trichoderma sp2</i>	CNF7_C2	10.13±2.67 c
<i>T. orientale</i>	UCMF2_C1	19.95±0.96 b	<i>T. asperelloides</i>	UCF8_M5	10.05±2.71 c
<i>T. orientale</i>	CMBF1_C1	19.92±1.98 b	<i>T. parareesei</i>	CCF5_C5	9.98±4.05 c
<i>T. afroharzianum</i>	F12M4	19.92±2.21 b	<i>T. orientale</i>	UCF18A_C3	9.91±2.39 c
<i>Trichoderma sp 1</i>	CRSF6_C1	19.91±3.91 b	<i>T. sp (uncertain)</i>	IP3M1_C4	9.4±2.64 d
<i>T. afroharzianum</i>	UCPF2_C3	19.89±3.68 b	<i>T. asperelloides</i>	F6M5	9.27±3.07 d
<i>T. lentiforme</i>	IP3M2_C4	19.87±2.52 b	<i>T. parareesei</i>	UCF7_M4	9.26±3.63 d
<i>T. orientale</i>	UJF3_C2	19.41±0.46 b	<i>T. afroharzianum</i>	F18M1	9.19±4.99 d
<i>T. afroharzianum</i>	BIF20_C1	19.38±1.11 b	<i>T. parareesei</i>	CRSF3_C2	8.79±5.84 d
<i>T. sp (uncertain)</i>	CCF2_C2	19.37±1.28 b	<i>T. afroharzianum</i>	UCF1_M4	8.75±1.29 d
<i>T. lentiforme</i>	BIF11_C1	19.35±1.66 b	<i>T. afroharzianum</i>	F18M4	8.72±1.96 d
<i>T. afroharzianum</i>	AP2M2_C1	19.31±2.55 b	<i>T. sp (uncertain)</i>	UCF19A_C2	8.72±2.25 d
<i>T. sp (uncertain)</i>	BLPF1_C2	19.27±2.61 b	<i>T. afroharzianum</i>	UCF20_M3	8.72±2.25 d
<i>T. afroharzianum</i>	BIF12_C2	18.79±0.87 b	<i>T. orientale</i>	UCF1A_C2	8.24±2.15 d
<i>T. parareesei</i>	CNF16_C1	18.75±2.97 b	<i>T. ghanense</i>	F4M3	8.19±2.89 d
<i>T. afroharzianum</i>	UCF13_M4	18.75±2.97 b	<i>T. asperelloides</i>	F8M5	8.14±3.98 d
<i>T. afroharzianum</i>	BIF17_C2	18.74±2.45 b	<i>T. reesei</i>	CNF8_C1	8.08±4.94 d

<i>T. lentiforme</i>	BIF25_M2	18.74±2.31 b	<i>T. sp (uncertain)</i>	F20M5	8.04±4.02 d
<i>Trichoderma sp2</i>	BLPF1_C3	18.71±2.36 b	<i>T. afroharzianum</i>	F21M3	8.02±3.91 d
<i>T. orientale</i>	UJF3_C4	18.7±2.3 b	<i>T. parareesei</i>	BIF1_C2	7.72±1.81 d
<i>T. afroharzianum</i>	F20M4	18.41±3.68 b	<i>T. asperelloides</i>	BIF17_C1	7.64±1.79 d
<i>T. reesei</i>	CNF5_C1	18.18±1.48 b	<i>T. parareesei</i>	BBF4_C2	7.6±1.38 d
<i>T. lentiforme</i>	UCF5_M1	18.16±2.16 b	<i>T. orientale</i>	UCF18A_C1	7.53±2.74 d
<i>T. parareesei</i>	CRSF1_C2	18.14±3.65 b	<i>T. afroharzianum</i>	F14M5	7.45±3.94 d
<i>T. reesei</i>	BIF2_C3	17.63±0.95 b	<i>T. orientale</i>	BIF17_C3	7.43±4.4 d
<i>T. inhamatum</i>	BIF9_C1	17.63±1.59 b	<i>Trichoderma sp 1</i>	UJF1_C1	7.17±3.36 d
<i>T. inhamatum</i>	BIF11_C3	17.6±4.15 b	<i>T. afroharzianum</i>	F10M5	7.05±2.13 d
<i>T. longibrachiatum</i>	UCF7_M5	17.6±1.23 b	<i>T. afroharzianum</i>	UYF1_C1	6.99±1.75 d
<i>Trichoderma sp5</i>	CTN3_C3	17.58±1.8 b	<i>T. parareesei</i>	CRSF6_C2	6.95±2.95 d
<i>T. sp (uncertain)</i>	BIF2_C2	17.57±1.85 b	<i>T. afroharzianum</i>	F3M5	6.92±2.98 d
<i>T. parareesei</i>	CNF7_C1	17.57±1.69 b	<i>T. afroharzianum</i>	BIF28_C1	6.91±3.55 d
<i>T. sp (uncertain)</i>	BIF5_C3	17.55±2.14 b	<i>T. longibrachiatum</i>	UCPF1_C1	6.31±3.82 d
<i>T. afroharzianum</i>	UCF10_M5	17.55±4.35 b	<i>T. inhamatum</i>	BIF28_C3	6.3±4.47 d
<i>T. longibrachiatum</i>	UCF14_C1	17.54±6.19 b	<i>T. reesei</i>	BIF8_C2	6.27±3.61 d
<i>Trichoderma sp2</i>	BLPF1_C4	17.51±3.24 b	<i>T. parareesei</i>	CNF15_C4	6.26±4.33 d
<i>T. inhamatum</i>	BIF18_C2	17.47±3.23 b	<i>T. reesei</i>	BIF3_C1	5.77±2.62 d
<i>T. afroharzianum</i>	F19M1	17.12±1.52 b	<i>T. reesei</i>	UCM2_C1	5.3±2.15 d
<i>T. reesei</i>	BIF3_C2	17.1±0.92 b	<i>T. afroharzianum</i>	IP3M1_C3	4.71±2.7 d
<i>T. longibrachiatum</i>	F18M2	17.03±1.94 b	<i>T. parareesei</i>	CNF4_C1	4.68±4.85 d
<i>T. reesei</i>	CB04_C1	17.02±3.03 b	<i>T. koningiopsis</i>	BMF2_C1	4.64±4.63 d
<i>T. parareesei</i>	UCF17_M1	17.01±0.99 b	<i>T. afroharzianum</i>	F21M2	3.94±6.85 d
<i>T. parareesei</i>	UJF2_C1	17.01±5.48 b	<i>T. parareesei</i>	UCMF2_C4	3.58±3.43 d
<i>Trichoderma sp2</i>	CCF4_C1	16.99±2.31 b	<i>T. parareesei</i>	BMF1_C1	3.52±4.44 d
<i>T. afroharzianum</i>	F10M1	16.98±1.75 b	<i>T. reesei</i>	CRSF1_C4	3.51±2.91 d
<i>T. parareesei</i>	F9M4	16.51±2.64 b	<i>T. longibrachiatum</i>	UCF21_C1	3.51±0.72 d
<i>T. afroharzianum</i>	F1M2	16.45±1.88 b	<i>T. reesei</i>	BIF15_C1	2.93±3.72 d
<i>T. afroharzianum</i>	F20M3	16.45±1.93 b	<i>T. afroharzianum</i>	F12M3	2.22±3.89 d
<i>T. afroharzianum</i>	F7M3	16.44±1.93 b	<i>T. sp (uncertain)</i>	BIF27_C2	1.71±1.43 d
<i>T. afroharzianum</i>	IP3M3_C1	16.43±1.89 b	<i>T. lentiforme</i>	IP3M2_C3	1.71±5.61 d
<i>T. longibrachiatum</i>	UCF5A_C2	16.42±2.82 b	<i>T. longibrachiatum</i>	UCMF3_C1	1.14±3.49 d
<i>T. longibrachiatum</i>	BIF7_C3	16.36±2.67 b	<i>T. longibrachiatum</i>	UCF10A_C1	0.48±2.63 d
<i>Trichoderma sp5</i>	BIF7_C2	16.29±3.42 b	<i>T. reesei</i>	CB04_C2	0.06±5.53 d
<i>T. afroharzianum</i>	F15M5	15.97±2.69 b	<i>T. parareesei</i>	UJF2_C2	-1.98±5.23 d
<i>T. afroharzianum</i>	F12M1	15.83±1.41 b	<i>T. afroharzianum</i>	UCMF21_M2	-3.45±2.81 d

El Cuadro 8 nos muestra que en la antibiosis de los aislamientos evaluados también se evidenciaron diferencias altamente significativas entre las medias ( $p < 0.0001$ ). contexto en el que se observan cuatro grupos muy bien diferenciados entre sí, el primero de los cuales está conformado por 43 aislamientos (F13M4,UCF5A\_C1, F9M3, F14M3, CRSF5\_C1, BMF19\_C2, F5M5, BIF4\_C2,BLPF4\_C1, BBF1\_C2, F5M3, BIF7\_C1, BMF2\_C2, IP3M4\_C1, F2M5, F5M4, UCF16\_M1, UCMF2\_C3, BIF2\_C4, AP1M4\_C1, BIF14\_C2, BMF19\_C4, UCF19\_M4, CNF10\_C3, CCF5\_C2, UCF5\_M5, UCF17\_M4, F3M4, UCF3\_M5, CNF10\_C1, CNF3\_C1, F1M3, BIF8\_C1, UBGF1\_C1, BBF1\_C3, BIF10\_C2, UCPF4\_C2, UCF5\_M4, BLPF2\_C2, AP1M5\_C1, UBGF2\_C1, CMF1\_C1, BIF14\_C1), correspondientes a las especies *T. afroharziannum*, *T. longibrachiatum*, *T. parareesei*, *Trichoderma* sp. (uncertain), *T. orientale*, *T. asperelloidides*, *T. zelobreve*, *T. lentiforme* y *T. inhamatum*, condición que podría connotar un importante indicador de mayor efecto antibiótico contra la moniliasis y sugieren ser tomados en cuenta para procesos de control biológico en campo.

Por otro lado, un segundo grupo de aislamientos, encabezados por la cepa BIF1\_C3 (*T. afarasin*), con 22 por ciento de antibiosis está conformado por 83 aislados de las especies *T. afroharziannum*, *T. longibrachiatum*, *T. parareesei*, *Trichoderma* sp (uncertain), *T. orientale*, *T. asperelloidides*, *T. zelobreve*, *T. lentiforme* y *T. inhamatum*, que lo convierte en el grupo más numeroso (39.3 por ciento de aislados) y aunque no lideran los niveles de antibiosis, los valores de antibiosis que alcanzaron podrían no ser de interés . Un tercer grupo está integrado por 58 aislados de las especies *T. parareesei*, *Trichoderma* sp. (uncertain), *T. orientale*, *T. asperelloidides*, *T. zelobreve*, *T. lentiforme*, y alcanzaron niveles de 30 a 50 por ciento. Finalmente un cuarto grupo y rezagado al final, estuvo conformado por 50 aislados de las especies *T. parareesei*, *Trichoderma* sp. (uncertain), *T. orientale*, *T. asperelloidides*, *T. zelobreve*, *T. lentiforme* con valores de antibiosis de -3.45 a 9.4 por ciento, los valores negativos corresponden a los aislados UJF2\_C2 y UCMF21\_M2, fueron los que no presentaron algún indicio de antibiosis frente a *M. royeri*. Estos resultados nos muestran además que el nivel de antibiosis fue alto (24 por ciento a más), medio (15.67-27 por ciento) y bajo (menor de 15.7 por ciento), la Figura 39 contextualiza estos resultados y las imágenes de antibiosis por cada aislamiento se encuentra adjunto en Anexo 3.





**Figura 39. Antibiosis de 234 aislados sobre *M. roreri*. A-C: Nivel de antibiosis alto: *T. afroharzianum* cepa F13M4 (A,B,C: 62, 72 y 96 horas después de inoculación de *Trichoderma*; D-E: Nivel de antibiosis medio, cepa UCF7\_M2, especie *T. reesei*.; G-I: Nivel de antibiosis bajo, cepa F12M3, *T. afroharzianum***

Podemos afirmar entonces que todas las especies evaluadas tuvieron al menos un aislamiento con comportamiento antibiótico contra *M. roreri*. De los 234 aislamientos evaluados, 232 mostraron antibiosis mientras que los 2 restantes no mostraron comportamiento antibiótico y pertenecen a las especies *Trichoderma parareesei* (cepa UJF2\_C2) y *Trichoderma afroharzianum* (cepa UCMF21\_M2); inclusive, con valores negativos de antibiosis, lo que indica que las colonias de *M. roreri*, tuvieron un crecimiento (frente a *Trichoderma*) sin ninguna restricción, inclusive menores que el tratamiento control. Por otro lado, es preciso señalar que existieron al menos 25 aislados (BMF1\_C1, BMF19\_C4, CNF21\_C2, CCF4\_C1, UCF1\_C1, F15M5, BIF7\_C1, UCF21\_C1, CBO4\_C2, BLPF1\_C2, UCMF3\_C1, UCF19A\_C1, UJF1\_C1, F7M3, F7M2, CNF7\_C2, CNF7\_C1, F1M4, F20M2, CNF16\_C2, CRSF1\_C5, F21M4, CRSF6\_C1, F21M5, CNF3\_C1) que pertenecen a las *T. lentiforme*, *T. asperelloides*, *Trichoderma* sp. (uncertain), *T. parareesei*, *T. reesei*, *Trichoderma* sp. 2, *T. aroharzianum*, *Trichoderma* sp. 1 y *Trichoderma longibrachiatum* (Cuadro 7) no presentaron micoparasitismo

y casualmente, todos ejercieron antibiosis frente a *M. roleri* (Cuadro 7). Este comportamiento (acción de antibiosis sin micoparasitismo) podría indicarnos que los aislados poseen metabolitos con algún nivel de actividad antifúngica, o que estas cepas impiden el crecimiento del fitopatógeno, motivados por mecanismos de competencia por espacio y por nutrientes (García-Simoes *et al.* 2011).

El porcentaje de antibiosis promedio para cada uno de los 232 aislamientos estuvo en un rango de 0.06 a 31.09 por ciento. Así mismo 174 aislamientos superaron el porcentaje de antibiosis de 9.91 por ciento; mientras que, los aislamientos F14M4, UCF5A-C1, F9M3, F14M3, CRSF5-C1, BMF19-C2 y F5M5 alcanzaron un porcentaje de antibiosis superior a 28 por ciento o más. Estos aislamientos pertenecen a las especies *Trichoderma afroharzianum* (2); *Trichoderma longibrachiatum* (2), *Trichoderma parareesei*, *Trichoderma* sp.(2) y *Trichoderma orientale* respectivamente. Salvo algunas excepciones, en la mayoría de aislamientos con alta expresión de micoparasitismo se reduce la expresión de antibiosis (Cuadro 8). En el caso de los aislamientos que no mostraron comportamiento parasitario, todos excepto los aislamientos UJF2\_C2 Y UCMF21\_M2 tuvieron alguna actividad antagonista (Cuadro 9). Situaciones similares han sido observadas por Reyes-Figueroa *et al.* (2016) cuando evaluaron aislamientos de *Trichoderma* de forma similar a la evaluación hecha en este estudio, ellos describen que aislamientos de *T. longibrachiatum*, *T. reesei* y *T. pleuroticola* mostraron antibiosis aunque no micoparasitismo. En nuestro estudio, aunque algunos aislamientos no tuvieron antibiosis, hubieron aislamientos de todas las especies evaluadas que expresaron algún nivel de actividad antibiótica sobre *M. roleri*. Finalmente y con respecto a la antibiosis, podemos mencionar que en algunos casos, la producción de antibióticos está correlacionado con la capacidad de control biológico por lo que muchas veces, artificialmente se sintetizan los antibióticos purificados para imitar el efecto del agente completo (Benítez *et al.* 2004). En este contexto, es preciso señalar que también hay ejemplos de cepas sobreproductoras de antibióticos, como por ejemplo algunos mutantes de *T. virens* sobreproductoras de gliovirina (Chet *et al.* 1997). En general, para el caso de *T. virens* con la mejor eficacia como agentes de biocontrol producen gliovirina (Howell 2003). En nuestro estudio, ésta especie (cepa CTN3\_C3) alcanza un 60 por ciento de antibiosis y podría tener un importante potencial de biocontrol de fitopatógenos entre los que incluimos al agente causal de la monilisis del cacao.

### 4.2.3. Antagonismo potencial

El antagonismo potencial alcanzado por cada uno de los aislamientos estudiados se presentan en el Cuadro 9.

**Cuadro 9. Antagonismo potencial de 234 aislamientos nativos de *Trichoderma* de Amazonas, Perú, evaluado sobre *Moniliophthora roreri* (Scott Knott,  $\alpha = 0.05$ )**

Aislamiento	Antagonismo potencial (por ciento)	Aislamiento	Antagonismo potencial (por ciento)	Aislamiento	Antagonismo potencial (por ciento)
F9M3	102 ± 0.03 a	CNF7_C3	72 ± 0.09 c	UCPF4_C2	43 ± 0.04 e
F14M3	101 ± 0.07 a	BIF16_C2	72 ± 0.07 c	CNF3_C1	43 ± 0.03 e
BMF19_C2	100 ± 0.04 a	BIF27_C1	72 ± 0.08 c	BIF18_C1	42 ± 0.02 e
F5M5	99 ± 0.03 a	BMF15_C5	72 ± 0.04 c	CRSF3_C2	41 ± 0.12 f
F5M4	98 ± 0.05 a	BIF15_C2	72 ± 0.05 c	BIF2_C3	40 ± 0.02 f
F2M5	98 ± 0.03 a	UCF3_M5	72 ± 0.07 c	CNF4_C2	40 ± 0.07 f
IP3M4_C1	98 ± 0.05 a	CNF10_C2	72 ± 0.09 c	BIF13_C2	40 ± 0.07 f
UCF16_M1	98 ± 0.06 a	CNF1_C1	71 ± 0.04 c	UCF21_M1	39 ± 0.05 f
F13M4	98 ± 0.09 a	UCF12_M3	71 ± 0.07 c	UCPF4_C3	38 ± 0.08 f
BBF1_C2	98 ± 0.09 a	BIF11_C3	71 ± 0.11 c	BIF17_C3	38 ± 0.08 f
BIF2_C4	97 ± 0.03 a	F10M1	71 ± 0.06 c	UCF19A_C2	37 ± 0.05 f
CRSF5_C1	96 ± 0.04 a	BLPF4_C3	70 ± 0.04 c	UCF1_M4	37 ± 0.04 f
UCF19_M4	96 ± 0.05 a	CNF16_C1	70 ± 0.05 c	UCMF2_C1	36 ± 0.01 f
BIF14_C2	96 ± 0.03 a	BIF1_C2	70 ± 0.07 c	CRSF1_C3	36 ± 0.02 f
CNF10_C3	95 ± 0.03 a	BIF14_C3	69 ± 0.04 c	UCF20_M1	36 ± 0.05 f
CCF5_C2	95 ± 0.06 a	BIF26_C1	69 ± 0.04 c	F18M1	36 ± 0.12 f
F5M3	94 ± 0.06 a	BLPF3_C1	69 ± 0.05 c	CNF21_C2	36 ± 0.06 f
F1M3	93 ± 0.05 a	F12M1	68 ± 0.08 c	F20M5	34 ± 0.05 f
BBF1_C3	91 ± 0.02 a	F19M4	68 ± 0.02 c	CRSF6_C1	34 ± 0.07 f
BIF8_C1	89 ± 0.06 b	F10M2	67 ± 0.11 c	CNF8_C1	34 ± 0.09 f
CMF1_C1	89 ± 0.05 b	BIF13_C1	67 ± 0.01 c	BIF28_C1	34 ± 0.05 f
AP1M5_C1	88 ± 0.06 b	BIF17_C2	67 ± 0.07 c	CNF16_C2	34 ± 0.03 f
IP3M3_C3	87 ± 0.04 b	IP3M1_C4	66 ± 0.05 c	CCF3_C1	33 ± 0.04 f
BMF2_C2	86 ± 0.09 b	UCF20_M3	65 ± 0.04 d	UYF1_C1	33 ± 0.05 f
BIF1_C4	86 ± 0.05 b	CNF12_C1	64 ± 0.07 d	CBO4_C1	33 ± 0.06 f
AP2M1_C2	86 ± 0.04 b	CNF10_C1	64 ± 0.15 d	CCF6_C1	33 ± 0.06 f
BLPF4_C1	85 ± 0.05 b	CNF12_C2	64 ± 0.08 d	BLPF1_C2	33 ± 0.05 f
UCF5_M5	85 ± 0.08 b	UCF1A_C2	64 ± 0.04 d	UCF7_M2	32 ± 0.06 f
F12M4	84 ± 0.04 b	F4M3	64 ± 0.05 d	IP3M2_C3	32 ± 0.13 f
BIF16_C1	84 ± 0.05 b	CRSF1_C1	63 ± 0.09 d	BIF5_C3	32 ± 0.04 f
CMBF1_C1	84 ± 0.04 b	F14M5	63 ± 0.07 d	CRSF1_C2	32 ± 0.07 f
UCPF2_C3	84 ± 0.07 b	F3M4	63 ± 0.04 d	CNF5_C1	32 ± 0.03 f
BBF4_C4	84 ± 0.04 b	UCF10_M1	63 ± 0.09 d	CTN3_C3	32 ± 0.03 f

UCF5_M4	83 ± 0.08 b	UBGF2_C1	63 ± 0.04 d	UCF7_M4	31 ± 0.11 f
BIF14_C1	83 ± 0.07 b	IP3M3_C1	63 ± 0.04 d	UCF17_M1	31 ± 0.03 f
BIF11_C1	83 ± 0.03 b	F10M5	62 ± 0.04 d	CNF7_C1	30 ± 0.03 f
CCF2_C2	83 ± 0.02 b	BIF8_C2	61 ± 0.06 d	CRSF6_C2	30 ± 0.06 f
BIF28_C2	83 ± 0.02 b	BIF28_C3	61 ± 0.08 d	CCF4_C1	29 ± 0.04 g
UCF5A_C1	82 ± 0.05 b	F6M5	61 ± 0.09 d	BIF2_C2	29 ± 0.02 g
BIF12_C2	82 ± 0.02 b	F16M3	60 ± 0.04 d	F7M3	28 ± 0.03 g
BIF12_C1	82 ± 0.04 b	F18M2	59 ± 0.1 d	BIF4_C1	28 ± 0.06 g
BLPF1_C3	82 ± 0.04 b	F20M3	59 ± 0.08 d	F15M5	27 ± 0.04 g
BIF25_M2	81 ± 0.05 b	IP3M2_C4	59 ± 0.05 d	F7M2	26 ± 0.05 g
UCF5_M1	81 ± 0.06 b	F16M1	58 ± 0.07 d	BIF3_C1	25 ± 0.05 g
F20M4	81 ± 0.04 b	F18M5	58 ± 0.06 d	IP3M1_C2	25 ± 0.05 g
F8M2	81 ± 0.08 b	UCF14_C1	58 ± 0.14 d	F21M5	25 ± 0.05 g
BIF4_C2	81 ± 0.07 b	IP3M1_C3	57 ± 0.05 d	UCM2_C1	25 ± 0.05 g
UCF13_M4	80 ± 0.04 b	UJF3_C4	56 ± 0.08 d	UCF1_C1	24 ± 0.04 g
BIF18_C2	80 ± 0.06 b	UBGF1_C1	56 ± 0.05 d	CRSF1_C5	24 ± 0.05 g
UCF10_M5	80 ± 0.08 b	UCF7_M5	56 ± 0.03 d	BMF18_C1	23 ± 0.04 g
F19M1	79 ± 0.02 b	BIF20_C1	55 ± 0.09 d	F20M2	23 ± 0.03 g
BIF11_C2	79 ± 0.05 b	F21M2	55 ± 0.12 d	UCPF1_C1	22 ± 0.05 g
F14M4	78 ± 0.05 b	UJF2_C1	55 ± 0.12 d	BMF2_C1	22 ± 0.08 g
BIF7_C3	78 ± 0.05 b	UCF6_M5	55 ± 0.09 d	UCMF21_M2	22 ± 0.07 g
BIF12_C3	78 ± 0.07 b	UCPF2_C1	54 ± 0.09 d	UCF18A_C1	21 ± 0.1 g
BIF7_C2	78 ± 0.06 b	F18M4	53 ± 0.06 e	F20M1	21 ± 0.07 g
F9M4	78 ± 0.04 b	BLPF1_C4	53 ± 0.06 e	F1M4	21 ± 0.07 g
F19M3	77 ± 0.05 b	F1M2	53 ± 0.08 e	UCF10A_C1	20 ± 0.07 g
BIF11_C4	77 ± 0.09 b	UJF3_C2	53 ± 0.02 e	UCF8_M5	20 ± 0.03 g
UCPF3_C1	77 ± 0.04 b	CNF15_C4	52 ± 0.06 e	UCF2_M2	19 ± 0.05 g
BIF20_C2	77 ± 0.06 b	BLPF2_C2	52 ± 0.04 e	UJF2_C2	19 ± 0.1 g
BIF22_C2	77 ± 0.04 b	CRSF2_C3	52 ± 0.04 e	UCF18A_C3	18 ± 0.04 g
BIF1_C3	77 ± 0.06 b	BIF27_C2	51 ± 0.03 e	UCF19A_C1	18 ± 0.03 g
CTN3_C1	76 ± 0.07 c	BBF3_C1	50 ± 0.07 e	CCF5_C5	18 ± 0.07 g
BIF9_C1	76 ± 0.05 c	BLPF4_C2	50 ± 0.07 e	BIF15_C1	17 ± 0.07 g
AP1M4_C1	76 ± 0.05 c	UCF5A_C2	50 ± 0.06 e	CNF7_C2	17 ± 0.04 g
IP3M4_C2	76 ± 0.05 c	CNF1_C2	49 ± 0.04 e	CNF4_C1	17 ± 0.08 g
BIF2_C5	75 ± 0.07 c	UCMF2_C3	49 ± 0.05 e	BBF4_C2	16 ± 0.03 g
IP3M3_C2	75 ± 0.03 c	BIF7_C1	48 ± 0.06 e	F8M5	16 ± 0.08 g
BLPF2_C1	75 ± 0.07 c	F3M5	47 ± 0.06 e	F21M3	15 ± 0.06 g
BIF5_C4	75 ± 0.04 c	F21M4	26 ± 0.06 g	CRSF1_C4	14 ± 0.06 g
BIF10_C2	75 ± 0.11 c	BMF19_C4	46 ± 0.04 e	UJF1_C1	12 ± 0.06 g
AP2M2_C1	75 ± 0.05 c	BBF1_C1	46 ± 0.09 e	UCMF2_C4	7 ± 0.06 h
F21M1	74 ± 0.02 c	BIF3_C2	46 ± 0.02 e	F12M3	6 ± 0.06 h
UCF18_M3	74 ± 0.09 c	F17M4	45 ± 0.08 e	BMF1_C1	6 ± 0.07 h
BPF3_C1	73 ± 0.03 c	BIF17_C1	44 ± 0.04 e	UCF21_C1	6 ± 0.01 h
UCF17_M4	73 ± 0.03 c	BIF4_C4	44 ± 0.06 e	UCMF3_C1	2 ± 0.06 h
F2M4	72 ± 0.06 c	CNF20_C1	44 ± 0.08 e	CBO4_C2	0 ± 0.09 h

En cuanto al antagonismo potencial, el Cuadro 9 nos indica que existieron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.0001$ ) entre las medias del antagonismo potencial de los aislamientos evaluados. De los aislamientos evaluados, 234 muestran algún nivel de antagonismo contra *M. royeri*; aunque dos aislamientos (CBO4-C2 y UCMF3\_C1), tuvieron valores de antagonismo potencial muy cercanos a 0 por ciento. El promedio antagonismo potencial de los aislamientos que lo mostraron fue de 0.57 al 65.28 por ciento.

El Cuadro 9, también muestra valores máximos y mínimos de potencial de antagonismo que alcanzan las especies de *Trichoderma*; se presentan 25 aislados que superaron el 52 por ciento de antagonismo potencial, las especies *T. parareesei\_F9M3*, *T. longibrachiatum\_F14M3* *T. orientale\_BMF19\_C2* superan el 64.5 por ciento de antagonismo potencial y se convierten en los aislados que alcanzan los mejores resultados, aunque no difieren estadísticamente ( $p < 0.0001$ ) del antagonismo potencial alcanzado por aislamientos de las especies *zelo breve\_F2M5*, (64.1 por ciento), *Trichoderma lentiforme\_F5M4* (95 por ciento), *T. afroharzianum\_IP3M4\_C1* (64.06 por ciento), *Trichoderma inhamatum\_BIF14\_C2* (63.2 por ciento), *T. longibrachiatum\_BBF1\_C2* (63.47 por ciento).

Así mismo, se muestra los menores valores de antagonismo potencial (inferiores a 10.79 por ciento); en este grupo se encuentran especies como *Trichoderma* sp. 5 (una cepa), *Trichoderma* sp. (uncertain) (3 cepas), *T. lentiforme* (una cepa), *T. reesei* (3 cepas con el menor valor de antagonismo potencial), *T. longibrachiatum* (3 cepas), *T. parareesei* (8 cepas), *T. afroharzianum* (9 cepas); *T. asperelloides* (2 cepas) y finalmente, la especie *T. orientale* con 2 aislados. Los resultados indican variabilidad intraespecífica al expresarse como antagonistas del fitopatógeno *Moniliophthora royeri* puesto que existen aislamientos de las mismas especies con los mejores y peores niveles de antagonismo (Reyes-Figueroa *et al.* 2016).

Aislamientos de todas las especies tuvieron antagonismo potencial por encima del 20 por ciento. Sin embargo, cuando observamos los aislamientos que superaron el 80 por ciento de antagonismo potencial (Cuadro 9), un total de 50 aislamientos de 13 especies superan este porcentaje, siendo *T. afroharzianum* (18) y *T. lentiforme* (7) las especies que tienen el mayor número de aislamientos con antagonismo potencial que sobrepasa este umbral.

Teniendo en cuenta estos resultados, son estas especies las que tienen un mayor potencial de antagonismo contra *M. roreri*. Sin embargo; considerando la alta variabilidad observada también nos conducen a indicar que el micoparasitismo y antibiosis son importantes factores y se debe considerar su interacción cuando se seleccionan aislamientos de *Trichoderma* como agentes de biocontrol como ya fue reportado por Monte (2001). En este estudio se aplicó la metodología anteriormente utilizada por Garcia Simoes *et al.* (2011) y Reyes-Figueroa *et al.* (2016), para evaluar micoparasitismo y antibiosis de manera simultánea, ya que muchos estudios analizan estas características pero de manera independiente. Esto permite establecer un mejor enfoque para la selección de aislamientos con alto potencial de biocontrol.

Entonces, fundamentados en la capacidad de las cepas de *Trichoderma* para proteger a las plantas contra los patógenos, característica atribuida durante mucho tiempo a un efecto antagónico contra el patógeno invasivo, en el presente trabajo y tras el análisis de resultados vinculados a micoparasitismo y antibiosis, podemos diferenciar a 18 aislados antagonistas de *M. roreri*, superiores y que poseen alto nivel de antagonismo y corresponden a 10 especies del género *Trichoderma*; a saber: *T. parareesei* (F9M3, CCF5\_C2), *T. longibrachiatum* (F14M3), *T. orientale* (BMF19\_C2), *T. zelobreve* (F2M5), *T. lentiforme* (F5M4, BLPF2\_C2, AP1M5\_C1), *T. afroharzianum* (IP3M4\_C1, UCF16\_M1, BIF2\_C4, F5M5, UCF19\_M4, F13M4, UCF21\_M1, ), *T. inhamatum* (BIF14\_C2, IP3M3\_C3), *T. longibrachiatum* (BBF1\_C2, F1M3), *Trichoderma* sp. 5 (CNF10\_C3), *T. brevicompactum* (BBF1\_C3), *Trichoderma* sp (uncertain) CRSF5\_C1, *T. afarasin* (AP2M1\_C2), confirmando una alta diversidad de especies con potencial de biocontrol de la moniliasis del cacao. Este grupo debe ser sometido a pruebas de propagación masiva para que se haga una selección adecuada de los aislados con mayor potencial de agente de biocontrol para ser evaluado en campo definitivo.

#### **4.3. POTENCIAL DE BIOCONTROL *IN-VIVO* DE CEPAS NATIVAS DE *TRICHODERMA* SPP. SOBRE LA MONILIASIS DEL CACAO (*MONILIOPHTHORA RORERI*)**

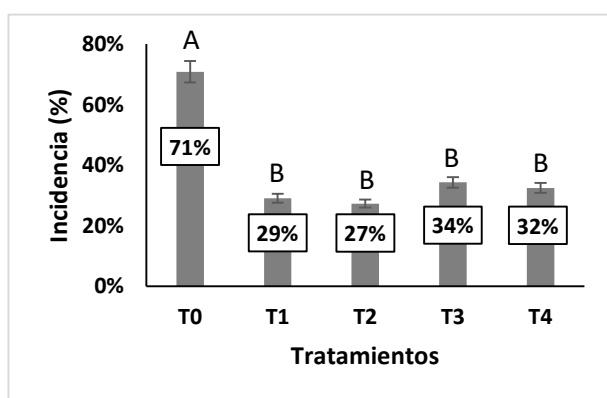
Identificar aislados de control biológico superior es el primer paso para desarrollar una estrategia de control biológico exitosa para cualquier enfermedad (Sawant *et al.* 2017). Por lo que existe un interés creciente por desarrollar estudios de diferentes especies de *Trichoderma* debido a su potencial de biocontrol frente a enfermedades de distintos cultivos (Harman 2000; Benítez *et al.* 2004; Hyder *et al.* 2017). En nuestro estudio y ante una puntual necesidad de hacer frente al problema fitopatológico más agresivo del cacao en el Perú, pretendemos encontrar aislados locales (nativos) de *Trichoderma*, para lo cual iniciamos a partir de un proceso de identificación de especies (etapa I), pasamos por la determinación de los niveles de antagonismo potencial (etapa I - micoparasitismo y antibiosis) y posteriormente, tras un proceso de selección de las especies con mayor potencial de biocontrol de la moniliasis del cacao que alcanzaron a nivel de laboratorio y además luego de explorar y poner a prueba algunos requisitos y/o condiciones mínimas que debe reunir un controlador biológico como la capacidad de producción masiva en sustrato sólido y alta viabilidad de conidios (Crozier *et al.* 2015), logramos identificar a los aislados i) BMF19\_C2 (*T. orientale*), que alcanzó el 100 por ciento de antagonismo potencial (con niveles de 100 por ciento de micoparasitismo y 100 por ciento de antibiosis); ii) al aislado F14M3 (*T. longibrachiatum*) que superó el 100 por ciento de antagonismo potencial; iii) también seleccionamos al aislado BIF14\_C2 (*T. inhamatum*), con 96 por ciento de antagonismo (100 por ciento de micoparasitismo y 92 por ciento de antibiosis) y finalmente seleccionamos al aislado CP24-6 (*T. afroharzianum*), especie local, que formó parte de un estudio previo donde se determina un alto potencial de biocontrol para hacerle frente a la moniliasis del cacao (Leiva *et al.* 2020). Además, las especies de *Trichoderma* son bien conocidas por suprimir los patógenos de las plantas mediante varios mecanismos; contexto en el que se ha informado que posee potencial, por ejemplo, para destruir la producción de micotoxinas de *F. verticillioides* (Khatun *et al.* 2020) de inhibir el crecimiento de colonias de *M. phaseolina* (Maheshwari *et al.* 2001), de *Colletotrichum graminicola*, agente causal de la antraxosis del sorgo (Manzar *et al.* 2021), y de inhibir la pudrición de las raíces de las plantas causada por patógenos presentes en el suelo como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *M. phaseolina*, *Pythium* sp., etc. en varios cultivos de

importancia económica (Anand & Reddy 2009). Estos solo son unos pocos trabajos a citar, entonces, *Trichoderma* sp. reducen significativamente la incidencia de enfermedades y mejoran el crecimiento de las plantas (Hermosa *et al.* 2001). En este contexto, los probables agentes de control biológico, deben pasar por un proceso de selección riguroso que permita encontrar el candidato ideal con capacidad de biocontrol (Bailey *et al.* 2006; Martínez-Salgado *et al.* 2021). Partiendo de la premisa que refiere al hecho de que los agentes microbianos introducidos no proporcionen un control biológico constante y eficaz (Blagodatskaya *et al.* 2014), en nuestro estudio, luego de un riguroso proceso de selección evaluamos a cuatro especies locales del género *Trichoderma* en dos ensayos, separados por dos pisos altitudinales, parcelas de productores de la provincia de Utcubamba, que fueron evaluadas durante el ciclo productivo 2020 - 2021.

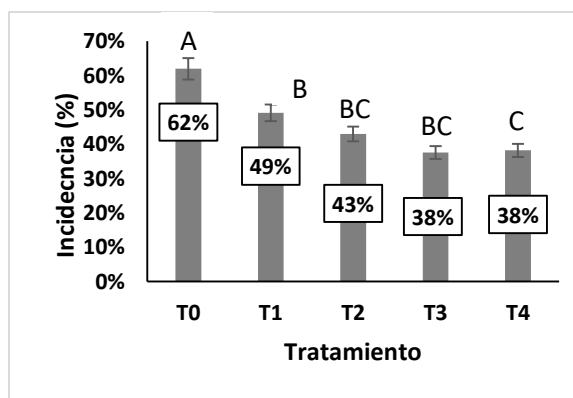
#### 4.3.1. Incidencia de la enfermedad

La Figura 40, muestra los niveles porcentuales de incidencia de los daños causados por la MC, después de la aplicación del caldo biofungicida (inóculo) a base de cuatro especies de *Trichoderma*. Los datos corresponden a la incidencia acumulada (media) tomadas en siete generaciones sucesivas de fructificación del cacao, evaluadas en dos parcelas de cacao, diferenciadas por las condiciones climáticas motivadas por la altitud.

##### Quebrada Seca



##### Llunchicate



**Figura 40: Porcentaje acumulado de incidencia final de la moniliasis del cacao, después de la aplicación de cuatro especies de *Trichoderma*, para determinar el potencial de biocontrol *in-vivo***



En la Figura 40, se hace referencia que la incidencia de moniliasis del cacao fue distinta en Quebrada Seca y Llunchicate y los valores porcentuales así lo demuestran; para el caso de Quebrada Seca, se encontró que los valores de incidencia fueron de 27 a 71 por ciento, lo que motivó a formarse dos grupos estadísticamente distintos ( $p < 0.05$ ), el primero de los cuales, y que además alcanzó el mayor nivel de incidencia fue el tratamiento T0 (tratamiento control) con 71 por ciento de incidencia, frente al resto de tratamientos representados por las cuatro especies de *Trichoderma*, las que tuvieron menores niveles que oscilaron entre los 29 y 32 por ciento de incidencia, valores que en la práctica estuvieron muy próximos entre sí; numéricamente el tratamiento con el cual se alcanzó el menor valor de incidencia fue el tratamiento T<sub>2</sub> (*T. orientale*\_ BMF19\_C2) con 27 por ciento, seguido de cerca por el tratamiento T<sub>1</sub> (*T. afroharzianum*\_CP24-6) con 29 por ciento de incidencia, tratamiento T<sub>4</sub> (*T. inhamatum*\_BIF14\_C2) con 32 por ciento y finalmente el tratamiento T<sub>3</sub> (*T. longibrachiatum*\_F14M3) con 34 por ciento de incidencia. Estos resultados demuestran que todas las especies de *Trichoderma* en evaluación ejercieron un nivel de represión similar, y consecuentemente, el tratamiento control así lo demuestra, las cuatro especies de *Trichoderma*, disminuyeron el nivel de incidencia de daño causado por la moniliasis del cacao.

En el caso de la parcela experimental ubicada en Llunchicate, la tendencia no cambió y es que los resultados evidencian la conformación de tres grupos estadísticamente diferenciados entre sí; uno de los cuales es el tratamiento testigo que se diferencia del resto al mostrar un nivel de 62 por ciento de incidencia de la MC, valor visiblemente superior al 38 por ciento de incidencia que se alcanzó en el tratamiento T<sub>3</sub> (*T. longibrachiatum*\_F14M3), tan igual que el tratamiento T<sub>4</sub> (*T. inhamatum*\_ BIF14\_C2) que para el caso de la parcela de Llunchicate, se convierten en los tratamientos más eficientes, pues aquí se encontraron los menores niveles de daño causado por la MC. Además, el tratamiento T<sub>1</sub> (*T. afroharzianum*\_CP24-6) sin bien no alcanzó los menores niveles de incidencia, éste tuvo efecto sobre la incidencia de los daños causados por la MC, esto se confirma, cuando notamos que sus niveles de incidencia (49 por ciento) fueron estadísticamente distintos a los alcanzados en el tratamiento control.

Al examinar los dos ensayos por separado, los efectos de los tratamientos tienen valores más o menos similares, el tratamiento T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> superaron significativamente al tratamiento de control en ambos lugares (Figura 41). En Quebrada Seca, los tratamientos con *Trichoderma* no

mostraron diferencias significativas (Figura 41). Además, es notable que el porcentaje de incidencia de las parcelas tratadas con cualquier cepa utilizada en el presente estudio tuvieron porcentajes significativamente menores en comparación con el control; por otro lado, cabe mencionar que en la parcela de Llunchicate se mostraron tres grupos homogéneos, también se puede observar que *Trichoderma* mostró mayor control de moniliasis en la parcela de Quebrada seca, lo que pudo estar condicionado a la menor carga de frutos por plana que se presentó en esa campaña, en comparación a la mayor carga de frutos que hubo en el ensayo de Llunchicate, curiosamente, se observa que el tratamiento T<sub>3</sub> en la parcela de Quebrada Seca muestra mayor porcentaje de incidencia con respecto a los demás tratamientos; mientras que, en la parcela de Llunchicate el tratamiento T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> que tienen los mismos valores son los que mostraron menor porcentaje de incidencia de moniliasis en comparación con los otros tratamientos, lo que podría deberse a que éste aislado fue recuperado de una plantación de cacao que estuvo ubicada a una altitud superior a los 900 msnm y la parcela donde fue liberado se encuentra ubicada a una altura inferior (490 msnm) y definitivamente estuvo sujeto a procesos de mayor exigencia en adaptación a este ecosistema, lo que pudo provocar su menor efectividad en comparación a la mostrada en el ensayo de Llunchicate (940 msnm.) agroecosistema del cual es nativo o local (Blagodatskaya *et al.* 2014).

En cuanto al tratamiento control o testigo, en Quebrada seca, se encontraron valores que superaron el 75 por ciento de incidencia, Al respecto, Torres de-la-Cruz *et al.* (2011) reportaron incidencia de 75 por ciento de dicha enfermedad en bajo condiciones de manejos tradicionales que coinciden con la incidencia ocurrida en el presente trabajo. Por otro lado, y en contraste con la aplicación de *Trichoderma* en ambas parcelas, la incidencia final promedio registrada entre los tratamientos con mayor acción (menor incidencia) fue una diferencia de 11 *por ciento*; en este estudio, la acción de represión frente a la incidencia por cada una de las cuatro especies evaluadas, fue variable, lo cual concuerda con Hoyos-Carvajal *et al.* (2008), quienes indican que las especies de *Trichoderma*, pueden actuar de manera diferente. Uno de los primeros ensayos de biocontrol de moniliasis del cacao en campos de cultivo fue realizado por Krauss & Soberanis (2002), ellos estudiaron cinco agentes de biocontrol contra moniliasis, mazorca negra y escoba de bruja, dentro de estos agentes de biocontrol evaluaron tres cepas de hogos del género *Trichoderma* (*Trichoderma virens*, *T. longibrachiatum* y *T. stromaticum*), y demostraron que tienen efecto en la reducción de la incidencia de moniliasis ya las que alcanzaron niveles de

incidencia de 18.8 por ciento, 20.1 por ciento, y 18.9 respectivamente, y fueron significativamente inferiores a la incidencia alcanzada por un control sin tratamiento (24.1 por ciento) y de un fungicida cúprico (22.8 por ciento).



**Figura 41. Niveles de incidencia y severidad de la MC tras la aplicación cuatro especies de *Trichoderma* sp. A: Incidencia y severidad de frutos; B: Incidencia externa bloque III T<sub>4</sub>; C: Incidencia y severidad, Bloque I, T<sub>2</sub>; D. Incidencia y severidad interna de los frutos; E: Incidencia en tratamiento control; F: Semillas del fruto sano de cacao T<sub>3</sub>, Bloque III**

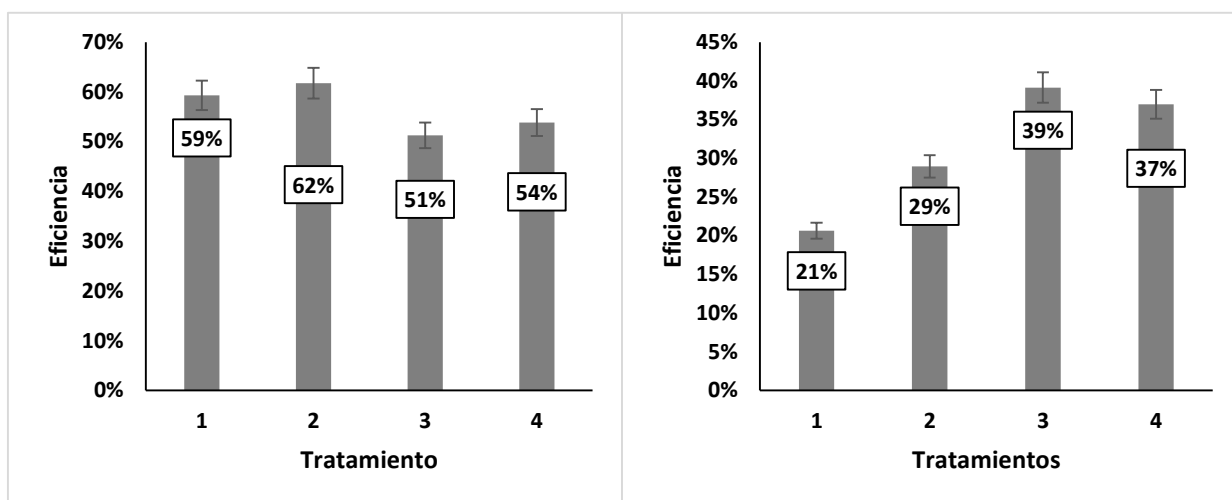
Leiva *et al.* (2020) por su parte, pudieron recuperar un gran número de cepas de hongos del género *Trichoderma*, y evidenciando el potencial de biocontrol *in vitro* de los mismos. En ese mismo estudio evaluaron la capacidad de biocontrol de cuatro cepas de estos hongos, demostrando que las plantas de cacao tratadas con aplicaciones de *Trichoderma* inhibe la infección de moniliasis a las mazorcas de cacao, ellos observaron que las parcelas tratadas con *Trichoderma* mostraban incidencia de daños de entre 4 por ciento y 10 por ciento, mientras que las parcelas no tratadas estaban entre 15 por ciento y 20 por ciento de incidencia de daños.

Respecto a la eficiencia evaluada a partir de los valores de incidencia, realizando comparaciones entre los tratamientos, en la Figura 42 se observa que no hubo una diferencia estadística significativa, tanto en el ensayo de Quebrada Seca como en el de Llunchicate. Los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> son los que alcanzaron mayor valor de eficiencia con 62 por ciento y 39 por ciento para Quebrada Seca y Llunchicate, respectivamente. Además, cuando los datos son analizados por ensayo y por separado, los resultados fueron parecidos. Los menores niveles de eficiencia fueron encontrados en los tratamientos T<sub>3</sub> y T<sub>1</sub> con valores de 51 por ciento y 21 por ciento para Quebrada Seca y Llunchicate, respectivamente. Al respecto, Tuquerres (2016) presenta resultados similares con aislados de *Trichoderma* spp. mostrando una eficacia mayor a 70 por ciento indicando, además, en sus hallazgos, que los agentes de biocontrol *Trichoderma* UEA-T<sub>3</sub> y UEA-T<sub>2</sub>, tuvieron mayor influencia en la reducción de daños causados por *M. roreri*; y fueron estadísticamente similares entre sí y diferentes al tratamiento control, resultados guardan similitud a los encontrados en el presente estudio.

Los resultados del presente estudio concuerdan también con los obtenidos por Leiva *et al.* (2020), quienes encontraron una eficiencia de biocontrol de *Trichoderma* de 71,9 por ciento y refieren que las cepas de *Trichoderma* demostraron un efecto sobre la intensidad epidémica de la moniliasis del cacao, afectando la incidencia final y la severidad del daño. Otros resultados reportados fueron similares y concuerdan que especies como *T. harzianum*, *T. viride* y *T. hamatum* ejercieron antagonismo y represión sobre *M. roreri*, tanto en medio *in-vitro* como *in-vivo* (Bailey *et al.* 2008; Osorio 2010; Villamil Carvajal *et al.* 2015; Crozier *et al.* 2015).

## Quebrada seca

## Llunchicate



**Figura 42: Porcentaje eficiencia de 4 especies de *Trichoderma* sobre la moniliasis del cacao, Amazonas 2022**

Todas las cepas de *Trichoderma* afectaron los parámetros de incidencia y de eficiencia, mostrando así un efecto protector sobre las mazorcas de cacao durante el ciclo productivo. Este estudio, nos permitió preseleccionar cepas prometedoras para el control biológico. En el presente estudio, la eficiencia que muestra *Trichoderma* spp. concuerda con Krauss & Soberanis (2002), que evaluaron diferentes cepas de *Trichoderma* en el campo, donde manifiestan la eficacia de todas las cepas que probaron, reduciendo la presencia de moniliasis e incrementando su rendimiento.

La capacidad de los hongos del género de *Trichoderma* de proteger los frutos del cacao ha sido evaluada en base a indicadores epidemiológicos y de rendimiento, sin embargo, el nivel de eficiencia de la aplicación de este tipo de tratamientos ha sido observado de forma limitada. En este estudio utilizamos como referencia una parcela sin tratamiento como referencia para estimar la eficiencia de la aplicación de agentes de control biológico sobre la MC.

En este sentido, se observa que el nivel de eficiencia de control contra la MC es consistente y define a estos hongos como excelentes agentes de biocontrol. Así, Krauss y Soberanis (2002), aunque no calcularon el nivel de eficiencia de sus tratamientos de una sola cepa, sus datos nos permiten estimar este indicador entre 16 por ciento y 21 por ciento. Aunque se exhiben niveles

de eficiencia menores a los reportados en nuestro estudio, es necesario notar que el nivel de incidencia en parcelas no tratadas es significativamente menor.

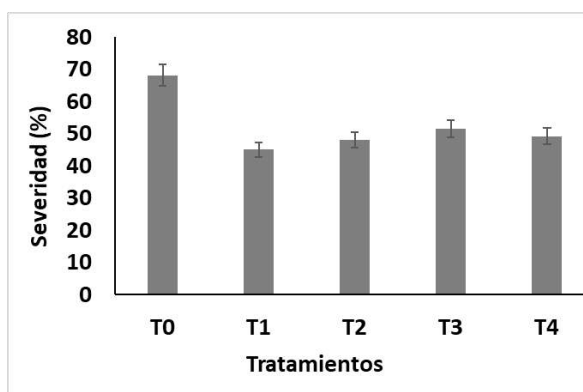
Sin embargo, Leiva *et al.* (2020) reportaron niveles de eficiencia de entre 40 y 70 por ciento con niveles de incidencia en parcelas no tratadas relativamente bajos. Esto podría explicarse por la utilización de cepas nativas que están mejor adaptadas a las condiciones ambientales en las que son evaluadas.

#### 4.3.2. Severidad de la enfermedad

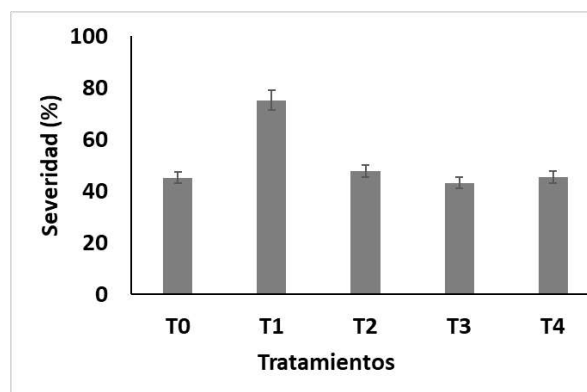
Cuando evaluamos la severidad de daño del fruto del cacao, tanto externa como interna, causado por la MC, observamos que, para severidad externa, en la parcela Quebrada Seca el análisis de varianza muestra que existen diferencias estadísticas significativas entre los promedios de severidad interna alcanzados por los tratamientos. En esta parcela el nivel de severidad de daños estuvo entre 45 por ciento y 68 por ciento siendo el tratamiento control (T<sub>0</sub>) el que obtiene los niveles de severidad más altos (Figura 43).

Por otro lado, cuando observamos los niveles de severidad externa alcanzados en la parcela Llunchicate, el análisis de varianza también evidenció diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, en esta parcela el promedio de severidad de daño interna más alto fue alcanzado en el tratamiento T1 (75 por ciento) en los demás tratamientos incluido el control los promedios de severidad no son significativamente diferentes y estuvieron entre 43 por ciento y 45 por ciento.

#### Quebrada seca

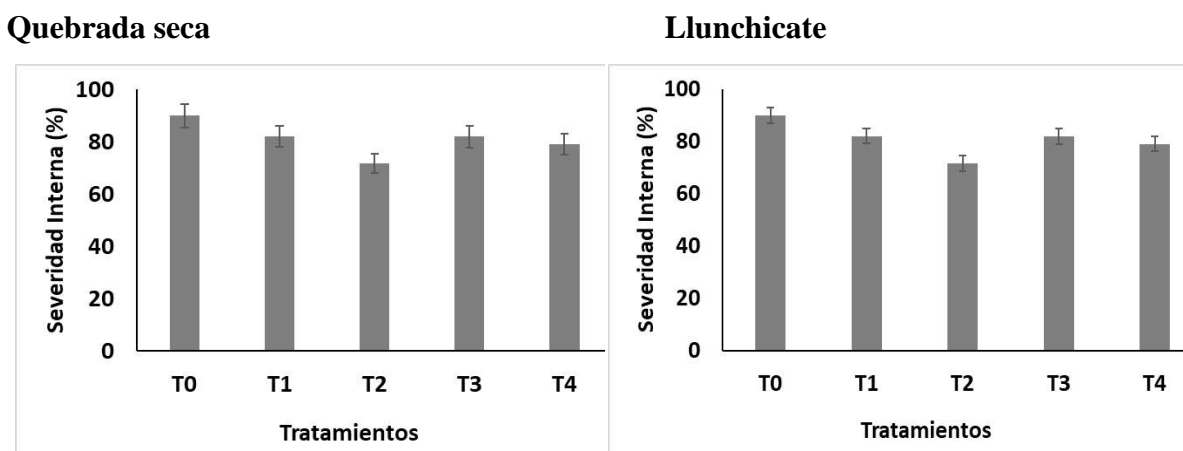


#### Llunchicate



**Figura 43: Porcentaje severidad externa de daños causados por moniliasis del cacao nativo fino de aroma. Parcela Quebrada Seca y Parcela Llunchicate**

Por otro lado, cuando observamos el nivel de severidad de daño interno (Figura 44) causado por moniliasis en los frutos del cacao, el análisis de varianza no evidencia diferencias significativas en ninguna de las dos parcelas. En el caso de la parcela Quebrada Seca el porcentaje de severidad interna estuvo entre 71 por ciento y 90 por ciento; mientras que, en la parcela Llunchicate estuvo entre 73 por ciento y 100 por ciento.



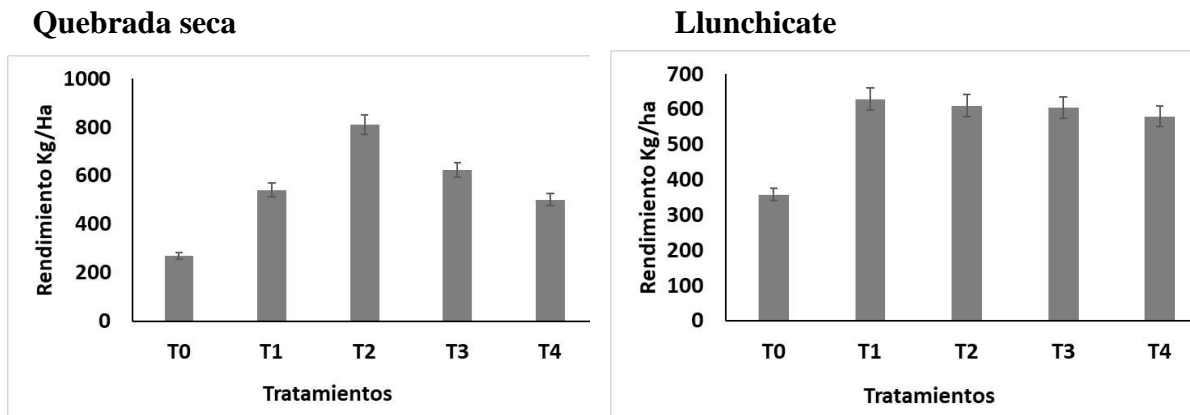
**Figura 44: Porcentaje severidad interna de daños causados por moniliasis del cacao nativo fino de aroma. Parcela Quebrada Seca y Parcela Llunchicate**

Son muy limitados los estudios que han evaluado la severidad de daño causado por la moniliasis en frutos de cacao. Leiva *et al* (2020), reportan niveles de severidad externa de entre 34 por ciento y 52 por ciento, obteniendo porcentajes de severidad externa más bajos en parcelas tratadas con cepas nativas de *Trichoderma* sugiriendo que estos hongos tienen la capacidad de reducir el avance de la esporulación del hongo *Moniliophthora roreri*. En nuestro caso, en la parcela Quebrada seca se observó esa misma tendencia, sin embargo, en la parcela Llunchicate no hubieron diferencias significativas entre el nivel de severidad externa del control y de las parcelas tratadas con *Trichoderma*, incluso el ataque fue más severo cuando se aplicó el tratamiento T<sub>1</sub>. Al respecto, Krauss *et al.* (2010), en un estudio donde evaluaron la periodicidad de aplicación de agentes de control biológico (*Trichoderma ovalisporum*) y químicos reportaron niveles de frutos de cacao infectados de entre 70 por ciento y 84 por ciento, mientras que solo el 25 por ciento a 34 por ciento llegaron a mostrar esporulación del patógeno, sin embargo, el tratamiento con *T. ovalisporum* no fue diferente significativamente respecto del control sin aplicación de tratamientos.

Entonces, cuando observamos el nivel de severidad de daño interno en ninguno de los casos las parcelas tratadas con *Trichoderma* se diferenciaron de los tratamientos de control. Esto sugiere que la aplicación de *Trichoderma* tiene efecto en evitar la infección, y en cierto modo de inhibir la aparición de síntomas externos y la posterior esporulación del hongo, sin embargo, cuando los frutos son infectados es incapaz de inhibir el desarrollo interno de la enfermedad.

### 4.3.3. Rendimiento

Respecto del nivel de rendimiento en kilogramos por hectárea calculado en ambas parcelas (Figura 45) el análisis de varianza evidenció que el rendimiento de granos de cacao en las parcelas sin tratamiento (control) fue menor a los rendimientos alcanzados en las parcelas tratadas con *Trichoderma*.



**Figura 45: Rendimiento estimado del cacao nativo fino de aroma según tratamientos. Parcela Quebrada Seca y Parcela Llunchicate**

Así, en la parcela “Quebrada Seca” las parcelas tratadas con *Trichoderma* alcanzan rendimientos de entre 500 y 809 kg/ha.; mientras que, el control alcanza 267 kg/ha. Por su parte en la parcela Llunchicate ocurre algo similar, en las parcelas tratadas con *Trichoderma* se reportan rendimientos de entre 579 y 627 kg/ha.; mientras que, el tratamiento control alcanzó 357 kg/ha por hectárea como rendimiento.

Los rendimientos, están principalmente determinados por la cantidad de frutos de cacao que llegan a ser cosechados sin ser infectados por alguna enfermedad, en nuestro caso la MC. Leiva *et al.* (2020) reportan niveles de rendimiento de entre 449 y 1095 kg/ha, en zonas cacaoteras de Amazonas, lo cual es mayor a lo reportado en el presente estudio, sin embargo, en ese estudio



se incluyeron plantaciones que tenían un régimen de manejo de mayor intensidad de fertilización y limpieza. Aun cuando los niveles de rendimiento son diferentes, en el estudio de Leiva *et al.* (2020) se observa también se obtuvieron los menores rendimientos en parcelas de control sin aplicación de *Trichoderma*.

La actividad protectante de *Trichoderma*, permite que mayor número de frutos lleguen a la cosecha sin ser infectados por moniliasis, permitiendo incrementar la cantidad de granos cosechados por unidad de producción. Este efecto ya ha sido observado por estudios anteriores, Krauss y Soberanis (2002), observaron que la aplicación de hongos del género *Trichoderma* mejoraba el rendimiento basado en la cantidad de frutos que llegaban sanos a la cosecha en un 19.9 por ciento. Del mismo modo Bateman *et al.* (2005), alcanzaron niveles frutos sanos de 36 por ciento cuando aplicaron *Trichoderma* mientras que en el tratamiento control sin aplicación solo alcanzaron 32 por ciento de frutos sanos.

#### **4.4. Análisis económico vinculado al control biológico y difusión de resultados con productores líderes de cacao**

En el siguiente Cuadro, se muestran los resultados del análisis económico vinculado al control biológico de la moniliasis del cacao.

**Cuadro 10. Utilidad neta motivada por el uso de *Trichoderma* como agente de control biológico**

Análisis económico	Plantación de cacao	
	Con control biológico de moniliasis	Sin control biológico
Rendimiento kg/ha	809	357
Precio de venta S/	6.7	6.7
Valor total de la cosecha S/.	5420.3	2391.9
Total costo de producción S/.	1650	1350
Utilidad neta S/.	3770.3	1041.9

El Cuadro anterior indica que la mayor utilidad neta (S/. 3770.3) se alcanza en los tratamientos en los cuales se realizó la aplicación del biofungicida a base de *Trichoderma*. Aquí se notar que los costos de producción, el mismo que aparentaría ser bajo, hace referencia a un costo de mantenimiento que solamente involucra el uso de mano de obra en actividades como deshierbo,

podas y cosecha, pues en nuestro estudio, imitamos las actividades que normalmente vienen realizando un agricultor. En este sentido los resultados nos dan a saber que en los tratamientos en los que no se realizó la aplicación de trichoderma, se obtuvieron la menor utilidad neta por hectárea; en este sentido, los resultados son contundentes y hacen referencia la importancia del método de control en la represión de la enfermedad y obtención de una mejor utilidad neta. Sin lugar a duda, el rendimiento de cacao, es una variable que determina los resultados del análisis de rentabilidad y los resultados alcanzados en el presente estudio determinan que los rendimientos de cacao se vieron influenciados por la aplicación del agente de control biológico (Leiva et al. 2020), aunque estos rendimientos dependen de los caracteres genéticos propios del cacao nativo (Thomaziello *et al.* 2000). Además, los resultados aquí mostrados son superiores al rendimiento promedio reportado por el INDES-CES 2017), cuyo reporte indica rendimientos de cacao nativo por debajo de los 510 kg/há para plantaciones adultas de cacao nativo; entonces indicamos aquí que *Trichoderma* sp., contribuye a incrementar los rendimientos del cacao nativo fino de aroma.

El control biológico de plagas y enfermedades promueven una producción sostenible de los cultivos (Elnahal *et al.* 2022). En este contexto, luego de los resultados de campo definitivo, realizamos una socialización de resultados a partir de la difusión de los mismos para lo cual se realizaron reuniones grupales con líderes de productores cacaoteros de uno de los gremios más importantes de la región (APROCAM).

Entonces, en el presente estudio, a partir de la difusión de los resultados positivos de la investigación, pretendemos que la tecnología generada aquí, en un futuro cercano esté disponible para el productor cacaotero, avizoramos que el agente de control biológico *Trichoderma*, esté fácilmente disponible y a costos mínimos a fin de que se inicie un proceso de adopción de la tecnología generada, para lo cual se prevé la necesidad de una estrecha coordinación, cooperación, e integración de ideas, a partir de estas experiencias que realicen actores diversos a fin de transferir conocimiento e innovación viable (Leeuwis & Van den Ban 2004).

La actual agricultura, enfrenta retos cada vez más exigentes que sugieren intensificar la producción de alimentos, pero sin descuidar la protección de la salud y medio ambiente, a partir de soluciones sustentables que promuevan el uso adecuado y racional de los pesticidas sintéticos, buscando así un abastecimiento sostenible de los alimentos para el futuro (Notarnicola 2017). En este contexto, en todo el mundo se vienen proponiendo estrategias diversas que promueven la disminución en el uso de plaguicidas químicos, a saber, por ejemplo, la unión Europea actualmente promueve reducir el uso de pesticidas en un 50 por ciento para 2030 (Prahl *et al.* 2022).

Lo dicho anteriormente converge en la necesidad de buscar propuestas alternativas para hacer frente a los problemas fitosanitarios, a partir del uso de estrategias de represión que sean amigables con el medio ambiente, que además protejan la salud humana (Leiva *et al.* 2020). Entonces, el control biológico ocupa un nicho único como alternativa flexible a las técnicas convencionales que dependen de los pesticidas, así como a la agricultura orgánica estricta (Ehlers 2017). Además, algunos agroecólogos argumentan que bajo ciertas condiciones, el biocontrol es un enfoque superior al control químico en términos de productividad a largo plazo y competitividad económica (Dunham & Trimmer 2012). Por otro lado, la creciente preferencia de los consumidores por productos agrícolas libres de pesticidas ha creado nuevos incentivos para que algunos agricultores cambien los pesticidas sintéticos por métodos de biocontrol. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, la tasa mundial de dependencia de los agentes de control biológico como el principal método de control de plagas sigue siendo inferior (Ehlers 2017). Nuestro estudio propone y busca la implementación alternativa de represión de la moniliasis del cacao, a partir de una estrategia amigable con el medio ambiente y con valiosa contribución a la producción sostenible de cacao.

Finalmente, los resultados mostrados aquí, atestiguan la posibilidad de que el control biológico mediante el uso de especies nativas de *Trichoderma*, contribuyen a la sustentabilidad del cultivo de cacao nativo, porque promueven menor contaminación, aceptabilidad social y competitividad (Thomaziello *et al.* 2000).

## V. CONCLUSIONES

Se identificó la existencia de 14 especies de *Trichoderma* en el agroecosistema de CNFA Amazonas-Perú; a saber en orden de abundancia: *T. afroharzianum*, *T. parareesei*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. lentiforme*, *T. orientale*, *T. asperelloides*, *T. inhamatum*, *T. zelobreve*, *T. virens*, *T. ghanense*, *T. afarasin*, *T. breve*, *T. brevicompactum*, y *T. koningiopsis*; cinco de las cuales representan primer reporte para el país. Además; el estudio proporciona evidencia de la existencia de cinco nuevas taxas del género *Trichoderma* en la microbiota peruana.

Se evidencia una alta diversidad de especies del género *Trichoderma*, indicando que el agroecosistema de cacao Amazonas forma parte de espacios aún poco perturbados. Los aislamientos identificados y conocimientos aquí encontrados constituyen el primer eslabón en la búsqueda de elementos de biocontrol de la MC.

Los resultados observados para micoparasitismo y antibiosis contra *M. royeri* apoyan la existencia de una alta variabilidad intraespecies e interespecies en *Trichoderma*. De 17 especies (*T. afarasin*, *T. afroharzianum*, *T. asperelloides*, *T. breve*, *T. ghanense*, *T. inhamatum*, *T. lentiforme*, *T. longibrachiatum*, *T. orientale*, *T. parareesei*, *T. reesei*, *T. zelobreve*, *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 3, *Trichoderma* sp. 4 y *Trichoderma* sp. 5), 8 especies albergan aislados con un alto potencial de biocontrol in vitro superior al 50 por ciento. Por tanto, teniendo en cuenta la alta variabilidad observada en cuanto al antagonismo, demostramos que la evaluación in vitro del potencial biocontrolador de cepas de *Trichoderma*, aun siendo de la misma especie, es variable y constituye de vital importancia en procesos de selección de bioagentes de control para su evaluación in vivo (campo).

Los resultados evidencian altos niveles de diversidad en el hábitat de cacao nativo fino de aroma de Amazonas-Perú y proporcionan conocimiento respecto a la diversidad de *Trichoderma* y la búsqueda de agentes de biocontrol de las principales enfermedades del cacao.

De las cuatro cepas de *Trichoderma* aplicadas en campo se obtuvo valores más altos en la reducción de incidencia con la cepa *Trichoderma afroharzianum* CP24\_6 y *Trichoderma inhamatum* BIF14\_C2 con 27 por ciento y 38 por ciento con relación al testigo que alcanzó 71 por ciento y 62 por ciento de incidencia de moniliasis. Se logró obtener una eficiencia de 62 por ciento y 39 por ciento lo que demuestra su viabilidad técnica.

La identificación de especies del género *Trichoderma*, se convierte en el primer paso para iniciarse en un proceso de evaluación y/o determinación de biocontrol *in-vitro* e *in-vivo* del problema fitopatológico más importante del cacao. La estrategia de control biológico promueve la sostenibilidad productiva de este cultivo.

Se demostró que la reducción de incidencia repercute directamente en el número de frutos que llegan a ser cosechados y por lo tanto afecta también en el rendimiento, mejorando los ingresos del productor, la calidad de su cosecha y consecuentemente, demostramos aquí que el control biológico de la moniliasis, a partir del uso de cepas nativas de *Trichoderma*, contribuyen en la producción sostenible de cacao nativo.

## VI. RECOMENDACIONES

Los ensayos *in-vivo* podrían repetirse en tiempo y espacio a fin de promover el desarrollo de un Biofungicida que permita el control y/o restricción de una de las enfermedades más destructivas del cacao en esta parte del país.

Debido a las propiedades de biocontrol que poseen las especies de *Trichoderma* aquí mostradas, se sugiere realizar pruebas de control biológico sobre la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), lo que además permitirá probar su efecto en probables espacios en los que se encuentren los dos problemas fitopatológicos de forma simultánea.

Se debe promover el desarrollo del producto mediante la participación colectiva de los productores cacaoteros, lo que además podría incluir procesos de investigación participativa que permita realizar la difusión adecuada y oportuna de la tecnología.

Promover el desarrollo de protocolos de propagación masiva de *Trichoderma*, incluyendo en el proceso, insumos técnicamente viables, de bajo costo y de fácil acceso en el mercado de insumos locales.

Por lo anterior y considerando que las herramientas de control biológico de enfermedades podría ser una estrategia que contribuye a la sostenibilidad de la producción de cacao, se recomienda que los productores de cacao integren dentro de su manejo tradicional la aplicación de *Trichoderma*, acción que sin lugar a duda contribuirá en la producción sostenible de cacao.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97(5), 1012–1022. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832751>
- Alejandria, L., Leiva, S., & Diaz-Valderrama, J. 2021. Estudio del proceso de infección de *Moniliophthora roreri* en frutos de cacao (*Theobroma cacao*), en la provincia de Utcubamba - región Amazonas [Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas]. <http://repositorio.untrm.edu.pe/handle/UNTRM/2514>
- Ali Nusaibah, S., & Musa, H. 2019. A Review Report on the Mechanism of *Trichoderma* spp. as Biological Control Agent of the Basal Stem Rot (BSR) Disease of *Elaeis guineensis*. *Trichoderma - The Most Widely Used Fungicide*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84469>
- Ali, S. S., Shao, J., Strem, M. D., Phillips-Mora, W., Zhang, D., Meinhardt, L. W., & Bailey, B. A. 2015. Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00850>
- American Society of Agronomy. 1987. Environment, growth and development. Washinton D.C., EUA: Development Committee Pamphlet N° 14. 20p
- Anand S., Reddy J. 2009. Bio-control potential of *Trichoderma* spp. against plant pathogens. *International Journal of Agriculture Sciences*, ISSN: 0975-3710, 2009; 1:30-39.
- Anzules, V., Borjas, R., Alvarado, L., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. 2019. Cultural, biological and chemical control of *Moniliophthora roreri* and *Phytophthora* spp. IN *Theobroma cacao* 'CCN-51.' *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 511–520. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.08>

- Arnold, A. E., Mejia, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15649–15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>
- Atanasova, L., Crom, S. Le, Gruber, S., Coulpier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics*, 14(1), 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-121>
- Atanasova, L., Jaklitsch, W. M., Komoń-Zelazowska, M., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. 2010. Clonal species *Trichoderma* parareesei sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulase producer *Hypocrea jecorina/T. reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7259–7267. <https://doi.org/10.1128/AEM.01184-10>
- Azuddin, N. F., Mohd, M. H., Rosely, N. F. N., Mansor, A., & Zakaria, L. 2021. Molecular Phylogeny of Endophytic Fungi from Rattan (*Calamus castaneus* Griff.) Spines and Their Antagonistic Activities against Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Fungi*, 7(4), 301. <https://doi.org/10.3390/jof7040301>
- Bailey, B., Bae, H., Strem, M., Roberts, D., Thomas, S., Crozier, J., 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(6), 1449–1464. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0314-0>
- Bailey, B., Evans, H., Phillips-Mora, W., Ali, S., & Meinhardt, L. 2018. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580–1594. <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. 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(1), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
- Bailey, Bryan A, & Meinhardt, L. W. 2016. *Cacao Diseases* (Bryan A. Bailey & L. W. Meinhardt (eds.). Springer Netherlands.
- Barrera, V. A., Iannone, L., Romero, A. I., & Chaverri, P. 2021. Expanding the *Trichoderma harzianum* species complex: Three new species from Argentine natural and cultivated



- ecosystems. *Mycologia*, 113(6), 1–20. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1947641>
- Bateman, R. P., Hidalgo, E., García, J., Arroyo, C., Ten Hoopen, G. M., Adonijah, V., & Krauss, U. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology*, 147(2), 129–138. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.00012.x>
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. 2017. Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249–260. <https://doi.org/10.2436/im.v7i4.9480>
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma* . I. Section Longibrachiatum sect. nov. . *Canadian Journal of Botany*, 62(5), 924–931. <https://doi.org/10.1139/b84-131>
- Bissett, John. 1991. A revision of the genus *Trichoderma* . III. Section Pachybasium . *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2373–2417. <https://doi.org/10.1139/b91-298>
- Bissett, John, Gams, W., Jaklitsch, W., & Samuels, G. J. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*, 6(2), 263–295. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2015.06.02.02>
- Blagodatskaya, E., Blagodatsky, S., Anderson, T. & Kuzyakov, Y. 2014. Microbial Growth and Carbon Use Efficiency in the Rhizosphere and Root-Free Soil. *PLoS ONE*, 9(4), e93282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093282>
- Błaszczuk, L., Strakowska, J., Chelkowski, J., Gąbka-Buszek, A., & Kaczmarek, J. 2016. *Trichoderma* species occurring on wood with decay symptoms in mountain forests in Central Europe: genetic and enzymatic characterization. *Journal of Applied Genetics*, 57(3), 397–407. <https://doi.org/10.1007/s13353-015-0326-1>
- Bustamante, D.E., Oliva, M., Leiva, S., Mendoza, J. E., Bobadilla, L., Angulo, G., & Calderon, M. S. 2019. Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. Peruviansis* sp. Nov. *MycoKeys*, 58. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.58.35764>
- Bustamante, Danilo E., Calderon, M. S., Leiva, S., Mendoza, J. E., Arce, M., & Oliva, M. 2021. Three new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* and *Longibrachiatum* lineages from

- Peruvian cacao crop soils based on an integrative approach. *Mycologia*, 00(00), 1–17. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1917243>
- Cai, F. & Druzhinina, I. S. 2021. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. In *Fungal Diversity* (Vol. 107, Issue 1. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>
- Campuzano, H. 1976. Fluctuación de poblaciones de esporas de *Monilia roreri* Cif. Et Par., y viabilidad durante un ciclo completo de afección. *Noticias fitopatológicas (Colombia)* 5 (2): 107
- Chaverri, Priscila., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., & Geiser, D. M. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(2), 302–313. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00400-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00400-1)
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T. & Samuels, G. J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558–590. <https://doi.org/10.3852/14-147>
- Chaverri, Priscila, & Samuels, G. J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology*, 2003(48), 1–113.
- Chaverri, Priscila, & Samuels, G. J. 2013. Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution*, 74(12), 156–186. <https://doi.org/10.1111/evo.12169>
- Chen, J., Zhou, L., Din, I. U., Arafat, Y., Li, Q., Wang, J., Wu, T., Wu, L., Wu, H., Qin, X., Pokhrel, G. R., Lin, S. & Lin, W. 2021. Antagonistic Activity of *Trichoderma* spp. Against *Fusarium oxysporum* in Rhizosphere of *Radix pseudostellariae* Triggers the Expression of Host Defense Genes and Improves Its Growth Under Long-Term Monoculture System. *Frontiers in Microbiology*, 12(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.579920>
- Chen, K. & Zhuang, W. Y. 2017. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. *Scientific Reports*, 7(1), 1–37. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07807-3>
- Cheesman, E. E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. **Trop. Agric.** 21:144-159.
- Chet I, Inbar J, Hadar, I. 1997) Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT,

- Söderström B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp 165-184
- Crozier, J., Arroyo, C., Morales, H., Melnick, R. L., Strem, M. D., Vinyard, B. T., Collins, R., Holmes, K. A. & Bailey, B. A. 2015. The influence of formulation on *Trichoderma* biological activity and frosty pod rot management in *Theobroma cacao*. *Plant Pathology*, 64(6), 1385–1395. <https://doi.org/10.1111/ppa.12383>
- Cuervo-Parra, J. A., Ramírez-Suero, M., Sánchez-López, V. & Ramírez-Lepe, M. 2011. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. *African Journal of Biotechnology*, 10(52), 10657–10663. <https://doi.org/10.5897/ajb11.1333>
- Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contrib. U.S. Natl. Herb.* 35:379-614.
- Church, W. B., and von Hagen, A. 2008. Chachapoyas: Cultural development at an Andean cloud forest crossroads. Pages 903-926 in: *The Handbook of South American Archeology*. H. Silverman and W. H. Isbell, eds. Springer, New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74907-5\\_45](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74907-5_45)
- Degenkolb, T., Dieckmann, R., Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Theis, C., Zafari, D., Chaverri, P., Ismaiel, A., Brückner, H., von Döhren, H., Thrane, U., Petrini, O., & Samuels, G. J. 2008. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycological Progress*, 7(3), 177–219. <https://doi.org/10.1007/s11557-008-0563-3>
- Del Carmen H. Rodríguez, M., Evans, H. C., de Abreu, L. M., de Macedo, D. M., Ndacnou, M. K., Bekele, K. B. & Barreto, R. W. 2021. New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. *Scientific Reports*, 11(1), 19229. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97704-7>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Cuadroda, M., & Robledo, C. W. 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Catherine Aime, M. 2020. The history of cacao and its diseases in the Americas. *Phytopathology*, 110(10), 1604–1619. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
- Druzhinina, I. S., Komoń-Zelazowska, M., Atanasova, L., Seidl, V., & Kubicek, C. P. 2010.

- Evolution and Ecophysiology of the Industrial Producer *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) and a New Sympatric Agamospecies Related to It. *PLoS ONE*, 5(2), e9191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009191>
- Druzhinina, I. S., Komon-Zelazowska, M., Ismaiel, A., Jaklitsch, W., Mullaw, T., Samuels, G. J., & Kubicek, C. P. 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma* | Enhanced Reader. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 358–368.
- Druzhinina, I. S., Komon-Zelazowska, M., Atanasova, L., Seid, V., & Kubicek, C. P. 2010. *Trichoderma reesei* and *parareesei*.pdf. *PLoS ONE*, 5(2), e9191.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(10), 813–828. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.007>
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., & Kubicek, C. P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55–64. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0279-7>
- Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komo-Zelazowska, M., Mulaw, T. B., & Bissett, J. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: Complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-94>
- Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., Belayneh Mulaw, T., & Bissett, J. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-94>
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., & Kubicek, C. P. 2011. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
- Dunham, W. and M. Trimmer. 2012. Biological control industry overview: companies & products. Retrieved from [http://dunhamtrimmer.com/wpcontent/uploads/2012/07/Ed2SampleBioControlCompanies\\_Products.pdf](http://dunhamtrimmer.com/wpcontent/uploads/2012/07/Ed2SampleBioControlCompanies_Products.pdf).

- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387–400. <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>
- Estrada, M. N., Vélez, P. E., & López, J. C. 1997. Estandarización de una metodología para obtener cultivos monoesporicos del hongo *Beauveria bassiana*. *Federacion Nacional de Cafeteros de Colombia, Caldas (Colombia)*.
- Ehlers, R. U. 2017. “REBECA – EU-policy support action to review regulation of biological control agents.” In Gisi, Chet & Gullino (Eds), *Plant pathology in the 21st century* 9th International Congress: recent development in management of plant diseases. New York: Springer Science
- Elnahal, ASM, El-Saadony, MT, Saad, AM. 2022. El uso de inoculantes microbianos para el control biológico, la promoción del crecimiento vegetal y la agricultura sostenible: una revisión. *Eur J Plant Pathol* 162 , 759–792. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7>
- Evans, H. C., Holmes, K. A., & Thomas, S. E. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2(2), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0053-4>
- Evans, H. C., Stalpers, J. A., Samson, R. A., & Benny, G. L. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*, 56(20), 2528–2532. <https://doi.org/10.1139/b78-305>
- Evans, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. *Phytopathological Papers*, 24, 44.
- Euromonitor International. 2016. Global trends and developments in Cocoa ingredients (world. Strategy Briefing, <https://www.euromonitor.com/global-trends-and-developments-in-cocoa-ingredients-world/report> (accessed 21 february 2022).
- FAO. 1989. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación* (22nd ed.).
- Fedecacao (2013). Situación mundial y nacional del Cacao. Septiembre, Bucaramanga, Colombia.
- Gama-Rodrigues, A. C., Müller, M. W., Gama-Rodrigues, E. F., & Mendes, F. A. T. 2021. Cacao-based agroforestry systems in the Atlantic Forest and Amazon Biomes: An ecoregional analysis of land use. *Agricultural Systems*, 194.

<https://doi.org/10.1016/j.agsy.2021.103270>

- Galarza, L., Akagi, Y., Takao, K., Kim, C. S., Maekawa, N., Itai, A., Peralta, E., Santos, E., & Kodama, M. 2015. Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 81(3), 201–210. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0587-x>
- Gams, W., & Meyer, W. 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum*? . *Mycologia*, 90(5), 904–915. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026984>
- Gams, W., Bissett J (2002) Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE (eds) *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis Ltd, London, pp 3–31
- Garcia Simoes, M. L., Tauk-Tornisielo, S. M., Niella, G. R., & Tapia, D. M. T. 2011. Evaluation of *Trichoderma* spp for the biocontrol of *Moniliophthora perniciosa* Subgroup 1441. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1), 18–36. <https://doi.org/10.5296/jbpls.v3i1.1097>
- Griffith, G. W., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch, R. N., & Hedger, J. N. 2003. Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*, 41(3), 423–435. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2003.9512860>
- Gu, X., Wang, R., Sun, Q., Wu, B., & Sun, J.-Z. 2020. Four new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* clade from northern China. *MycKeys*, 73, 109–132. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.73.51424>
- Guirlanda, C. P., da Silva, G. G., & Takahashi, J. A. 2021. Cocoa honey: Agro-industrial waste or underutilized cocoa by-product? *Future Foods*, 4(June), 100061. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>
- Gurr, G. and S. Wratten. 2000. Measures of success in biological control. Kluwer: Dordrecht.
- Hanada, R. E., de Jorge Souza, T., Pomella, A. W. V., Hebbbar, K. P., Pereira, J. O., Ismaiel, A., & Samuels, G. J. 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycological Research*, 112(11), 1335–1343. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.06.022>
- Haouhach, S., Karkachi, N., Oguiba, B., Sidaoui, A., Chamorro, I., Kihal, M., & Monte, E. 2020. Three New Reports of *Trichoderma* in Algeria: *T. atrobrunneum*, (South) *T. longibrachiatum* (South), and *T. afroharzianum* (Northwest. *Microorganisms*, 8(10), 1455. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101455>

- Haran, S. 1996. Differential Expression of *Trichoderma harzianum* Chitinases During Mycoparasitism. *Phytopathology*, 86(9), 980. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-980>
- Harman, G. E. 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84(4), 377–393. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. In *Phytopathology* (Vol. 96, Issue 2, pp. 190–194). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., & Pathology, P. 2004. *Trichoderma* species — opportunistic , avirulent plant symbionts. 2(January). <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Heredia, G. 1999. *Diversidad y sucesion de Hyphomycetes de la superficie de las hojas en descomposición de tres especies arbóreas dominantes en un bosque mesofilo de montaña en el centro de Veracruz* [Universidad Nacional Autonoma De Mexico]. <http://132.248.9.195/pd1999/273113/273113.pdf>
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Díaz-Mínguez, J. M., Iturriaga, E. A., & Monte, E. 2001. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Current Genetics*, 38(6), 343–350. <https://doi.org/10.1007/s002940000173>
- Hidalgo, E., Bateman, R., Krauss, U., Ten Hoopen, M., & Martínez, A. 2003. A Field Investigation into Delivery Systems for Agents to Control *Moniliophthora roreri*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(9), 953–961. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000003746.16934.e2>
- Hinterdobler, W., Li, G., Spiegel, K., Basyouni-Khamis, S., Gorfer, M., & Schmoll, M. 2021. *Trichoderma reesei* Isolated From Austrian Soil With High Potential for Biotechnological Application. *Frontiers in Microbiology*, 12(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.552301>
- Holmes, K. A., Schroers, H.-J., Thomas, S. E., Evans, H. C., & Samuels, G. J. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress*, 3(3), 199–210. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0090-z>
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of

- plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4–10. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Hoyos-Carvajal, L., Duque, G., & Orduz P., S. 2011. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2(1), 76–86. <https://doi.org/10.17584/rcch.2008v2i1.1175>
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 615–631. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.006>
- Hyder, S., Inam-ul-Haq, M., Bibi, S., Rawalpindi, U., Aamir Humayun Malik Biotechnology Lab, P., Ganj-Baksh Road Satellite Town Rawalpindi, D., Salman Ghuffar, P., Iqbal, S., Correspondence Sajjad Hyder, P., Humayun Malik, A., & Ghuffar, S. 2017. Novel potential of *Trichoderma* Spp. As biocontrol agent. ~ 214 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(4), 214–222.
- IIAP. 2011. *Propuesta de zonificación ecológica y económica del departamento de Amazonas*. [http://www.regionamazonas.gob.pe/sicre/documentos/archivos/2\\_ZEE\\_Amazonas\\_2007.pdf](http://www.regionamazonas.gob.pe/sicre/documentos/archivos/2_ZEE_Amazonas_2007.pdf)
- INDECOPI. 2016. El Indecopi entrega décima Denominación de Origen Cacao Amazonas Perú que contribuirá al desarrollo económico de más de 1,200 productores. Lima, <http://repositorio.indecopi.gob.pe/handle/11724/5443>
- INDES-CES. Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva. 2017. Caracterización de la producción de cacao en Amazonas. Informe final de resultados. Chachapoyas, Amazonas. 124p.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal*, 24(1), 14–21.
- Inglis, P. W., Mello, S. C. M., Martins, I., Silva, J. B. T., Macêdo, K., Sifuentes, D. N., & Valadares-Inglis, M. C. 2020. *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. *PLOS ONE*, 15(3), e0228485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228485>
- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Ismaiel, A., & Voglmayr, H. 2013. Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31, 112–146. <https://doi.org/10.3767/003158513X672234>



- Jaklitsch, W. M., & Voglmayr, H. 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology*, 80, 1–87. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001>
- Jaklitsch, Walter M. 2011. European species of *Hypocrea* part II: Species with hyaline ascospores. *Fungal Diversity*, 48, 1–250. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0088-y>
- Jambor, A., Toth, A. T., & Koroshegyi, D. 2017. The export competitiveness of global cocoa traders. *Agris On-Line Papers in Economics and Informatics*, 9(3), 27–37. <https://doi.org/10.7160/aol.2017.090303>
- Jang, S., Jang, Y., Kim, C.-W., Lee, H., Hong, J., Heo, Y. M., Lee, Y. M., Lee, D. W., Lee, H. B., & Kim, J. 2017. Five New Records of Soil-Derived *Trichoderma* in Korea: *T. albolutescens*, *T. asperelloides*, *T. orientale*, *T. spirale*, and *T. tomentosum*. *Mycobiology*, 45(1), 1–8. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.1.1>
- Jangir, M., Pathak, R., & Sharma, S. 2017. *Trichoderma* and Its Potential Applications. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (Vol. 2, pp. 323–339). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4_13)
- Khatun, M. J., Khalequzzaman, K., Naher, M. S., & Neela, F. 2020. Management of fusarium wilt of tomato by botanicals and biocontrol agents and their effect on yield. *Bangladesh Journal of Botany*, 49(1), 71–74. <https://doi.org/10.3329/bjb.v49i1.49095>
- Komoń-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. 2007. Genetically Closely Related but Phenotypically Divergent *Trichoderma* Species Cause Green Mold Disease in Oyster Mushroom Farms Worldwide. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7415–7426. <https://doi.org/10.1128/AEM.01059-07>
- Kopchinskiy, A., Komoń, M., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. 2005. TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research*, 109(Pt 6), 658–660. <https://doi.org/10.1017/S0953756205233397>
- Krauss, U, Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, J., Portuguez, A., & Sánchez, V. 2003. Manejo integrado de la moniliasis ( *Moniliophthora roreri* ) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca . *Agroforestería En Las Américas*, 10(Manejo de la moniliasis),52–58.  
file:///D:/Users/Enelvi/Downloads/Kraussetal2003AgroforesteriaenlasAmericas (3).pdf

- Krauss, Ulrike, ten Hoopen, G., Hidalgo, E., Martínez, A., Stirrup, T., Arroyo, C., García, J., & Palacios, M. 2006. The effect of cane molasses amendment on biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) and black pod (*Phytophthora* spp.) of cocoa (*Theobroma cacao*) in Panama. *Biological Control*, 39(2), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.005>
- Krauss, Ulrike, & Soberanis, W. 2001. Biocontrol of Cocoa Pod Diseases with Mycoparasite Mixtures. *Biological Control*, 22(2), 149–158. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0956>
- Krauss, Ulrike, & Soberanis, W. 2002. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biological Control*, 24(1), 82–89. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00007-5](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00007-5)
- Kubicek, C., Koon-Zelazowska, M., & Druzhinina, I. S. 2008. Fungal genus *Hypocrea*/*Trichoderma*, from barcodes to biodiversity.pdf. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10, 753–763. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0860015>
- Kubicek, C. P., & Harman, G. E. 2002. *Trichoderma and Gliocladium* (2nd ed.). Taylor & Francis e-Library.
- Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., Cai, F., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, E. M., Kuo, A., Baroncelli, R., Sarrocco, S., Noronha, E. F., Vannacci, G., Shen, Q., Grigoriev, I. V., & Druzhinina, I. S. 2019. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics*, 20(1), 485. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T., & Kubicek, C. P. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7755–7760. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7755>
- Kuhls, Katrin, Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Meyer, W., Kubicek, C. P., & Börner, T. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 89(3), 442–460. <https://doi.org/10.1080/00275514.1997.12026803>
- Kumar, R., Singh, S., & Singh, O. V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology &*

- Biotechnology*, 35(5), 377–391. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0327-8>
- Larsson, A. 2014. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Leiter, J., & Harding, S. 2004. Trinidad, Brazil, and Ghana: Three melting moments in the history of cocoa. *Journal of Rural Studies*, 20(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/S0743-0167\(03\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0743-0167(03)00034-2)
- Leiva, S., Oliva, M., Hernández, E., Chuquibala, B., Rubio, K., García, F., & de la Cruz, M. T. 2020. Assessment of the potential of *Trichoderma* spp. strains native to bagua (Amazonas, Peru) in the biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*). *Agronomy*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy10091376>
- Leiva, S. T., Hernández Diaz, E., & Mattos Calderon, L. L. 2021. Estabilidad de cepas nativas de *Trichoderma* conservadas mediante liofilización. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 5(1), 25–31. <https://doi.org/10.25127/aps.20211.756>
- Leeuwis, C; Van Den Ban, A. 2004. Changing perspectives on innovation In: Communication for Rural Innovation: Rethinking Agricultural Extension. Third Edition. London Oxford: Blackwell Science Ltd. p.129-146.
- Lin, X., & Heitman, J. 2005. Chlamyospore Formation during Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 4(10), 1746–1754. <https://doi.org/10.1128/EC.4.10.1746-1754.2005>
- Liu, S.Y., Yu, Y., Zhang, T.-Y., Zhang, M.-Y., & Zhang, Y.X. 2020. *Trichoderma panacis* sp. nov., an endophyte isolated from *Panax notoginseng*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5), 3162–3166. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004144>
- López, Y., Cunias, M., & Carrasco, Y. 2020. El cacao peruano y su impacto en la economía nacional. *Universidad y Sociedad*, 12(3), 54–67. <http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>
- Lorito, M., Mach, R. L., Sposato, P., Strauss, J., Peterbauer, C. K., & Kubicek, C. P. 1996. Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the ech42 (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14868–14872.

<https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14868>

- Maheshwari, D. K., Dubey, R. C., & Sharma, V. K. 2001. Biocontrol effects of *Trichoderma virens* on *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Indian Journal of Microbiology*, 41(4), 251–256.
- Manzar, N., Singh, Y., Kashyap, A. S., Sahu, P. K., Rajawat, M. V. S., Bhowmik, A., Sharma, P. K., & Saxena, A. K. 2021. Biocontrol potential of native *Trichoderma* spp. against anthracnose of great millet (*Sorghum bicolor* L.) from Tarai and hill regions of India. *Biological Control*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104474>
- Martínez-Salgado, S. J., Andrade-Hoyos, P., Parraguirre Lezama, C., Rivera-Tapia, A., Luna-Cruz, A., & Romero-Arenas, O. 2021. Biological control of charcoal rot in peanut crop through strains of *Trichoderma* spp., in Puebla, Mexico. *Plants*, 10(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants10122630>
- Mazzola, M., & Freilich, S. 2017. Prospects for Biological Soilborne Disease Control: Application of Indigenous Versus Synthetic Microbiomes. *Phytopathology*®, 107(3), 256–263. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0330-RVW>
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Bael, S. Van, Arnold, A. E., Hebbar, P., Samuels, G. J., Robbins, N., & Herre, E. A. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>
- Migheli, Q., Balmas, V., Komoń-Zelazowska, M., Scherm, B., Fiori, S., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. 2009. Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology*, 11(1), 35–46. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01736.x>
- Mohiddin, F. A., Padder, S. A., Bhat, A. H., Ahanger, M. A., Shikari, A. B., Wani, S. H., Bhat, F. A., Nabi, S. U., Hamid, A., Bhat, N. A., Sofi, N. R., Waza, S. A., Hamid, B., Parveen, S., Hussain, A., Bhat, A. N., Ali, O. M., Dar, M. S., & Abdel Latef, A. A. H. 2021. Phylogeny and Optimization of *Trichoderma harzianum* for Chitinase Production: Evaluation of Their Antifungal Behaviour against the Prominent Soil Borne Phyto-Pathogens of Temperate India. *Microorganisms*, 9(9), 1962. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091962>

- Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 4(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s101230100001>
- Mont, KR. 2002. Manual Técnico: Manejo Integrado de Enfermedades de las plantas. SENASA Lima, Perú. 71 p.
- Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Heath, M., & Lanaud, C. 2003. Cacao domestication II: Progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity*, 91(3), 322–330. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800298>
- Motamayor, Juan C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- Motamayor, Juan C, Lachenaud, P., Wallace, J., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, S., & Schnell, R. J. 2008. *Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (Theobroma cacao L)*. 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- Mordor Intelligence. 2022. Aumento de la demanda de chocolate de origen único y certificado. <https://mordorintelligence.com/industry-reports/premium-chocolate-market>
- Misevic, P. , Volarevic, H. , Peric, M. 2020. The trend analysis of less sugar chocolate confectionery markets. In: Proceedings of the Economic and Social Development (Book of Proceedings), 52nd International Scientific Conference on Economic and Social Development , p. 654.
- Ministerio de la Agricultura y Riego. 2019. Observatorio Commodities: Cacao. <http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/index.php/e-economia-desarrollo-y-sociologia-rural/e71-comercio-internacional/911-observatorio-de-commodities-cacao-abril-junio>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. 2020. Producción nacional de cacao en grano creció en la última década a un promedio de 12.6 por ciento al año. <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/305143-produccion-nacional-de-cacao-en-grano-crecio-en-la-ultima-decada-a-un-promedio-de-12-6-al-ano>
- Nelson, P. E., Marasas, W. F. O., & Toussoun, T. A. 1983. *Fusarium* species an illustrates manual for identification Title. *Pennsylvania The Pennsylvania State University Press* ;

University Park and London.

- Notarnicola B, Sala S, Anton A, McLaren SJ, Saouter E, Sonesson U. 2017. The role of life cycle assessment in supporting sustainable agri-food systems: A review of the challenges. *J Clean Prod* (140) :399-409.
- Ogata, N., Gómez-Pompa, A., and Taube, K. A. 2006. The domestication and distribution of *Theobroma cacao* L. in the neotropics. Pages 70-89 in: *Chocolate in Mesoamerica: A Cultural History of Cacao*. C. L. McNeil, ed. University Press of Florida, Gainesville
- Olmes, K. a H., Chroers, H. S., Homas, S. E. T., Vans, H. C. E., & Amuels, J. S. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of. *Mycological Progress*, 3(August), 199–210. <http://cocoaschool.org/scientific-research/research-library/documents/Holmes2004.pdf>
- Osorio, R. A. 2010. Estudio del efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* en la provincia de Esmeraldas [Escuela Politecnica Nacional]. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2339/1/CD-3088.pdf>
- Ozlem, Z., Atanasova, M., Boyunegmez, T., Caruso, G., Antika, G., Sharma, S., & Sharifi-Rad, J. 2021. Cocoa and cocoa bean shells role in human health : An updated review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103(January). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104115>
- Organización Internacional del Cacao. 2021. Características del mercado de cacao Fino o de Aroma. <https://www.icco.org/fine-or-flavor-cocoa/>
- Organización Internacional del Cacao. 2019. Observatorio del Cacao Fino y de Aroma para América Latina, 5. [https://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1408/Iniciativa por ciento20Latinoamerica por ciento20del por ciento20Cacao- Bolet por cientoC3 por cientoADn por ciento205.pdf?sequence=2](https://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1408/Iniciativa%20por%20Latinoamerica%20por%20del%20por%20Cacao-Bolet%20por%20C3%20por%20ADn%20por%20205.pdf?sequence=2)
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23(1), 23–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000323>
- Paredes, M. 2003. *Manual De Cultivo Del Cultivo Del Cacao* (p. 100). <https://repositorio.midagri.gob.pe/bitstream/20.500.13036/372/1/cacao - copia.pdf>
- Park, M. S., Seo, G. S., Lee, K. H., Bae, K. S., & Yu, S. H. 2005. Morphological and Cultural Characteristics of *Trichoderma* spp. Associated with Green Mold of Oyster Mushroom in

- Korea. *The Plant Pathology Journal*, 21(3), 221–228.  
<https://doi.org/10.5423/PPJ.2005.21.3.221>
- Pérez, E., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Bettioli, W., Monte, E., & Hermosa, R. 2015. The importance of chorismate mutase in the biocontrol potential of *Trichoderma parareesei*. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01181>
- Phillips-Mora, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Monilophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence [The University of Reading]. In *Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences*.  
[http://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/Origin,\\_biogeography,\\_genetic\\_diversity\\_and\\_taxonomic\\_affinities\\_of\\_the\\_cacao.pdf](http://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/Origin,_biogeography,_genetic_diversity_and_taxonomic_affinities_of_the_cacao.pdf)
- Phillips-Mora, W., Baqueros, F., Melnick, R. L., & Bailey, B. A. 2015. First report of frosty pod rot caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Bolivia. *New Disease Reports*, 31(1), 29–29. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.031.029>
- Pineo, R. F. 1988. Reinterpreting Labor Militancy: The Collapse of the Cacao Economy and the General Strike of 1922 in Guayaquil, Ecuador. *Hispanic American Historical Review*, 68(4), 707–736. <https://doi.org/10.1215/00182168-68.4.707>
- Plessis, I. L. D., Druzhinina, I. S., Atanasova, L., Yarden, O., & Jacobs, K. 2018. The diversity of *Trichoderma* species from soil in south africa, with five new additions. *Mycologia*, 110(3), 559–583. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1463059>
- Ploetz, R. 2007. Cacao Diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide. *Phytopathology*, 97, 1634–1639. <https://doi.org/10.1094 /PHYTO-97-12-1634>
- Poveda, J. 2020. *Trichoderma parareesei* Favors the Tolerance of Rapeseed (*Brassica napus* L.) to Salinity and Drought Due to a Chorismate Mutase. *Agronomy*, 10(1), 118. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010118>
- Poveda, J. 2021. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests : *New uses for a mycoparasite*. 159. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104634>
- Prahl, KC, Klink, H., Hasler, M., Hagen, S., Verreet, J.-A. y Birr, T. 2022. ¿Pueden los sistemas de apoyo a la toma de decisiones ayudar a mejorar el uso sostenible de fungicidas en el

- trigo? Sostenibilidad , 14 (23), 15599. MDPI AG. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.3390/su142315599>
- Quiñones, M., Espinoza, E., Yovera, F., Cuchilla, Y., & Castro, D. 2018. Identification, georeferencing and morphological characteristics of upper trees of *Theobroma cacao* L. 1753 cultivar white cocoa of piura, Peru. *The Biologist (Lima)*, 16(1), 105–117. <https://doi.org/10.24039/rtb2018161225>
- Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., La Cruz, M. T. De, Lagunes-Espinoza, L. D. C., & Valdovinos-Ponce, G. 2016. Especies de *Trichoderma* del agroecosistema cacao con potencial de biocontrol sobre *Moniliophthora roreri*. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 22(2), 149–163. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.08.036>
- Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., Torres-de la Cruz, M., Lagunes-Espinoza, L. D. C., & Valdovinos-Ponce, G. 2016. *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora roreri*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, XXII(2), 149–163. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.08.036>
- Rios-Ruiz, R. A. 2004. Epidemiologia e manejo da monilíase do cacauero no Peru [Universidade Federal de Viçosa]. <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/10162/1/texto completo.pdf>
- Rubio, M. B., Quijada, N. M., Pérez, E., Domínguez, S., Monte, E., & Hermosa, R. 2014. Identifying Beneficial Qualities of *Trichoderma parareesei* for Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1864–1873. <https://doi.org/10.1128/AEM.03375-13>
- Ryan, M., & Smith, D. 2012. Cryopreservation. In *Conservation of Tropical Plant Species*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3776-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3776-5_6)
- Samuels, G. J., Pardo-Schultheiss, R., Hebbar, K. P., Lumsden, R. D., Bastos, C. N., Costa, J. C., & Bezerra, J. L. 2000. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research*, 104(6), 760–764. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001938>
- Samuels, Gary J. 2014. Proposals to conserve the names *Trichoderma catoptron* against *Hypocrea catoptron*, *H. sulfurella*, and *H. flavovirens*; *T. citrinoviride* against *Sphaeria schweinitzii* (*H. schweinitzii*), *S. contorta*, *H. Taxon*, 63(4), 936–938. <https://doi.org/10.12705/634.24>
- Samuels, Gary J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A., & Petrini, O. 2002. *Trichoderma*



- species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, *94*(1), 146–170. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833257>
- Samuels, Gary J., Ismaiel, A., Bon, M.-C., De Respinis, S., & Petrini, O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, *102*(4), 944–966. <https://doi.org/10.3852/09-243>
- Samuels, Gary J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., & Jaklitsch, W. M. 2012. The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: A revision with new species. *Fungal Diversity*, *55*, 77–108. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0152-2>
- Samuels, Gary J., Suarez, C., Solis, K., Holmes, K. A., Thomas, S. E., Ismaiel, A., & Evans, H. C. 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological Research*, *110*(4), 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.01.009>
- Sanchez, J. 1982. *Reacción de cultivares de cacao a la inoculación artificial con Monilia roreri* [Universidad de Costa Rica]. <https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/10520/A2084e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Cano-Lira, J. F., Gene, J., Fothergill, A. W., Wiederhold, N. P., & Guarro, J. 2014. Phylogeny of the Clinically Relevant Species of the Emerging Fungus *Trichoderma* and Their Antifungal Susceptibilities. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(6), 2112–2125. <https://doi.org/10.1128/JCM.00429-14>
- Sarandón, S. J. 2002. El desarrollo y uso de indicadores para evaluar la sustentabilidad de los agroecosistemas. In *Agroecología: El camino para una agricultura sustentable* (pp. 393–414). <http://wp.ufpel.edu.br/consagro/files/2010/10/SARANDON-cap-20-tentabilidad.pdf>
- Sarria, G., Garcia, A., Mestizo, Y., Medina, C., Varón, F., Mesa, E., & Hernandez, S. 2021. Antagonistic interactions between *Trichoderma* spp. and *Phytophthora palmivora* (Butler) from oil palm in Colombia. *European Journal of Plant Pathology*, *161*(4), 751–768. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02363-z>
- Sawant, I. S., Wadkar, P. N., Ghule, S. B., Rajguru, Y. R., Salunkhe, V. P., & Sawant, S. D. 2017. Enhanced biological control of powdery mildew in vineyards by integrating a strain of *Trichoderma afroharzianum* with sulphur. *Biological Control*, *114*, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.011>

- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E., & Kubicek, C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4364–4370. <https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4364-4370.1994>
- Schmoll, M., & Schuster, A. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 787–799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- Sharon, E., Chet, I., & Spiegel, Y. 2011. *Trichoderma* as a Biological Control Agent. In *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*: (pp. 183–201). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9648-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9648-8_8)
- Soberanis, W., Ríos, R., Arévalo, E., Zúñiga, L., Cabezas, O., & Krauss, U. 1999. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. *Crop Protection*, 18(10), 677–685. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00073-3)
- Suárez, C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri* Cif. & Par. en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Ing Agr Thesis, Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- Suárez, C. 1972. Mecanismo de penetración y proceso de infección de *Monilia roreri* Ciferri & Parodi en frutos de cacao. Report, Fourth International Cacao Research Conference, Trinidad & Tobago, pp. 506–510.
- Ten Hoopen, G. M., & Krauss, U. 2016. Biological Control of Cacao Diseases. In *Cacao Diseases* (pp. 511–566). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3->
- Ten Hoopen, G. Martijn, Rees, R., Aisa, P., Stirrup, T., & Krauss, U. 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycological Research*, 107(5), 587–596. <https://doi.org/10.1017/S095375620300772X>
- Thomas, E., van Zonneveld, M., Loo, J., Hodgkin, T., Galluzzi, G., & van Etten, J. 2012. Present Spatial Diversity Patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. *PLoS*

- ONE, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047676>
- Torres-De La Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & De La Cruz-Pérez, A. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 947–961. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- Torres de la Cruz, M., Ortiz García, C. F., Téliz Ortiz, D., Mora Aguilera, A., & Nava Díaz, C. 2011. Temporal progress and integrated management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) of cocoa in Tabasco, Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 93(1), 31–36. <https://doi.org/10.1400/169646>
- Torres, E., & González, J. 2018. Caracterización de productores en la cadena de valor del cacao fino de aroma de Amazonas Characterization of producers in the value chain of fine aroma cocoa from Amazonas Caracterização de produtores na cadeia de valor do aroma fino de cacau do Amazonas. *Conocimiento Para El Desarrollo*, 9(1), 113–120. <https://repositorio.midagri.gob.pe/bitstream/20.500.13036/372/1/cacao-copia.pdf>
- Thomaziello, RA; Fazuoli, LC; Pezzopane, JRM; Fahl, JI; Carelli, MLC. 2000. Café Arábica: Cultura e Técnica de Produção. Campinas. IAC. 82 p. Boletim Técnico, 187).
- Umar, A. 2021. Screening and evaluation of laccase produced by different *Trichoderma* species along with their phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4319–4327. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02420-5>
- Vey, A., Hoagland, R. E., & Butt, T. M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (pp. 311–346). CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0311>
- Vidal, J. P. 2014. Las ocho regiones naturales del Perú. *Terra Brasilis*, 3. <https://doi.org/10.4000/terrabrasilis.1027>
- Villamil Carvajal, J. E., Viteri Rosero, S. E., & Villegas Orozco, W. L. 2015. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7441–7450. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47830>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>

- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., & Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(11), 863–873. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01198-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01198-0)
- Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I., Fouet, O., Argout, X., Guichoux, E., Salin, F., Solorzano, R. L., Bouchez, O., Vignes, H., Severts, P., Hurtado, J., & Yopez, A. 2018. The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*, 2, 1879–1888. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0697-x>
- Zeilinger, S., Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Kubicek, C. P., & Lorito, M. 2003. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current Genetics*, 43(4), 289–295. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0399-y>
- Zhang, D., Martínez, W. J., Johnson, E. S., Somarriba, E., Phillips-Mora, W., Astorga, C., Mischke, S., & Meinhardt, L. W. 2012. Genetic diversity and spatial structure in a new distinct *Theobroma cacao* L. population in Bolivia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(2), 239–252. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9680-y>
- Zhang, G.-Z., Yang, H.-T., Zhang, X.-J., Zhou, F.-Y., Wu, X.-Q., Xie, X.-Y., Zhao, X.-Y., & Zhou, H.-Z. 2022. Five new species of *Trichoderma* from moist soils in China. *MycoKeys*, 87, 133–157. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.87.76085>
- Zhu, Z. X., Xu, H. X., Zhuang, W. Y., & Li, Y. 2017. Two new green-spored species of *Trichoderma* (Sordariomycetes, Ascomycota) and their phylogenetic positions. *MycoKeys*, 26, 61–75. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.26.14919>
- Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>

## **VIII. ANEXOS**

**Anexo 1. Identificación molecular de cepas del género *Trichoderma* aislados del agroecosistema de cacao nativo, basado en la comparación de similitud por pares de ITS, rpb2 y tef1. Los códigos (COD/CEPA) son representativos para 14 especies correctamente identificadas, de un total de 234 aislados**

COD/CEPA	CEPA DE REFERENCIA	Estándar Similitud con cepa de referencia						Concordancia filogenética	ESPECIES IDENTIFICADAS
		Género/ ITS (≥ 76%)		Especie/ RPB2 (≥ 99%)		Especie/TEF1 (≥ 97%)			
		Accesion	% Ident	Accesion	Per Ident	Accesion	Per Ident		
UYF1_C1	<i>T afroharzianum</i>	FJ442671.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	97.70%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UJF3_C4	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	99.80%	JN175522.1	99.75%	EU401581.1	97.66%	Si	<i>T orientale</i>
UJF3_C2	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	99.82%	JQ685884.1	99.14%	EU401581.1	98.22%	Si	<i>T orientale</i>
UJF2_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.50%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.59%	Si	<i>T parareesei</i>
UJF2_C1	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.50%	HM182963.1	99.87%	GQ354353.1	99.76%	Si	<i>T parareesei</i>
UJF1_C1	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	97.86%	JQ685884.1	98.28%	EU401581.1	97.56%	No	<i>Ambigua</i>
UJF1_C1	<i>T longibrachiatum</i>	JQ685873.1	98.74%	DQ087242.1	99.38%	AY937412.1	96.86%	No	<i>Sp</i>
UJF1_C1	<i>T aethiopicum</i>	JQ685873.1	99.84%	HM182986	98.25%	EU401616.1	90.28%	No	<i>Sp</i>
UCPF4_C3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.09%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCPF4_C2	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.82%	DQ087242.1	100.00%	EU401591.1	100.00%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCPF2_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	90.16%	HM182969.1	99.74%	AF401004.1	86.27%	Ambigua	<i>Ambigua</i>
UCMF2_C4	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	98.69%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
UCMF2_C3	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.82%	HQ260615.1	99.31%	EU401591.1	99.88%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCPF3_C1	<i>T inhamatum</i>	FJ442259.1	96.19%	FJ442725.1	99.26%	AF348099.1	99.16%	Ambigua	<i>Ambigua</i>
UCPF2_C3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.15%	FJ442691.1	99.75%	KP008851.1	97.29%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCPF1_C1	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.82%	DQ087242.1	99.73%	EU401591.1	99.07%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCMF3_C1	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	100.00%	DQ087242.1	99.87%	EU401591.1	100.00%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCMF2_C1	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.68%	JQ685884.1	98.99%	EU401581.1	97.98%	No	<i>T orientale</i>
UCM2_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	99.48%	Si	<i>T reesei</i>
UCMF21_M2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.26%	KP008851.1	99.75%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF21_M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	KP008851.1	97.55%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF21_C1	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	100.00%	DQ087242.1	99.87%	EU401591.1	97.22%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCF20_M3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	KP008851.1	100.00%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF20_M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.71%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	98.29%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF19A_C2	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	98.22%	DQ087242.1	98.41%	EU401581.1	96.44%	Ambigua	<i>Ambigua</i>
UCF19A_C1	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.51%	JQ685884.1	99.02%	JQ685868	95.24%	Ambigua	<i>Ambigua</i>
UCF19_M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.26%	FJ463301.1	98.01%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF18A_C3	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.84%	JQ685884.1	99.02%	JN175573	99.81%	Si	<i>T orientale</i>
UCF18A_C1	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	98.59%	JQ685884.1	99.02%	EU401581.1	97.31%	Si	<i>T orientale</i>
UCF18_M3	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.66%	Si	<i>T parareesei</i>
UCF17_M4	<i>T longibrachiatum</i>	EU401556.1	90.28%	DQ087242.1	99.73%	EU401591.1	99.59%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCF17_M1	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.67%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.76%	Si	<i>T parareesei</i>
UCF16_M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	98.02%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF14_C1	<i>T longibrachiatum</i>	EU401556.1	96.33%	DQ087242.1	99.87%	AY937412.1	98.79%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCF13_M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.27%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF12_M3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.02%	FJ463301.1	98.32%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF10A_C1	<i>T longibrachiatum</i>	EU401556.1	99.10%	DQ087242.1	100.00%	AY937412.1	99.76%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCF10_M5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF10_M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	90.76%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.27%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF8_M5	<i>T asperelloides</i>	JQ685873.1	97.00%	GU248411.1	99.75%	GU248412.1	99.53%	Si	<i>T asperelloides</i>
UCF7_M5	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.82%	DQ087242.1	99.87%	AY937412.1	97.56%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCF7_M4	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.67%	HM182963.1	99.87%	GQ354353.1	99.76%	Si	<i>T parareesei</i>
UCF7_M2	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.08%	AF401004.1	100.00%	Si	<i>T reesei</i>
UCF6_M5	<i>T asperelloides</i>	NR_137304.1	89.00%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	99.30%	Si	<i>T asperelloides</i>
UCF5A_C2	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	98.88%	DQ087242.1	99.87%	AY937412.1	97.84%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCF5A_C1	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	98.72%	DQ087242.1	99.87%	EU401591.1	100.00%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
UCF5_M5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.27%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF5_M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.31%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	98.02%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF5_M1	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.32%	FJ442749.1	99.63%	FJ463379.1	100.00%	Si	<i>T lentiforme</i>
UCF3_M5	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	100.00%	FJ442749.1	99.51%	FJ463379.1	97.06%	Si	<i>T Lentiforme</i>
UCF2_M2	<i>T asperelloides</i>	JQ685832.1	99.70%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	99.53%	Si	<i>T asperelloides</i>
UCF1A_C2	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.84%	JQ685884.1	99.02%	EU401581.1	98.28%	Si	<i>T orientale</i>
UCF1_M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.27%	Si	<i>T afroharzianum</i>
UCF1_C1	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.28%	JQ685884.1	98.28%	JN175573	98.79%	No	<i>Sp</i>
UCF1_C1	<i>T aethiopicum</i>	JQ685873.1	92.33%	HM182986.1	98.25%	EU401616.1	90.28%	No	<i>Sp</i>
UCF1_C1	<i>T longibrachiatum</i>	JQ685873.1	94.32%	DQ087242.1	97.61%	AY937412.1	90.05%	No	<i>Sp</i>

UBGF2_C1	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	91.10%	FJ442725.1	99.51%	AF348099.1	97.34%	Si	<i>T inhamatum</i>
UBGF1_C1	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.82%	DQ087242.1	99.73%	AY937412.1	98.32%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
IP3M4_C2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	98.63%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	98.32%	Si	<i>T afroharzianum</i>
IP3M4_C1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	98.05%	Si	<i>T afroharzianum</i>
IP3M3_C3	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.84%	FJ442725.1	99.51%	FJ463301.1	99.26%	Si	<i>T inhamatum</i>
IP3M3_C2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.49%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.26%	Si	<i>T afroharzianum</i>
IP3M3_C1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.31%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.17%	Si	<i>T afroharzianum</i>
IP3M2_C4	<i>T lentiforme</i>	MH859229.1	95.76%	FJ442749.1	99.63%	FJ463379.1	100.00%	Si	<i>T lentiforme</i>
IP3M2_C3	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.66%	FJ442749.1	99.88%	FJ463379.1	98.31%	Si	<i>T lentiforme</i>
IP3M1_C4	<i>T afarasin</i>	EU330955.1	91.73%	FJ442778.1	98.03%	AF348093.1	96.55%	Ambigua	<i>Ambigua</i>
IP3M1_C3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
IP3M1_C2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F21M5	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.82%	DQ087242.1	99.87%	AY937412.1	98.08%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
F21M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	97.82%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F21M3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.82%	FJ442691.1	99.26%	FJ463301.1	98.32%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F21M2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	98.32%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F21M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.26%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F20M5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	90.88%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	86.24%	Ambigua	<i>Ambigua</i>
F20M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F20M3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	98.01%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F20M2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	97.82%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F20M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	97.82%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F19M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	98.32%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F19M3	<i>T asperelloides</i>	MH859229.1	99.40%	GU248411.1	99.75%	GU248412.1	99.53%	Si	<i>T asperelloides</i>
F19M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.26%	FJ463301.1	98.32%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F18M5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	90.86%	FJ442691.1	99.80%	FJ463301.1	99.42%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F18M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.48%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.02%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F18M2	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.82%	DQ087242.1	99.87%	AY937412.1	98.30%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
F18M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F17M4	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.82%	DQ087242.1	99.73%	AY937412.1	98.08%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
F16M3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.19%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F16M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	97.82%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F15M5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F14M5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	97.26%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	97.96%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F14M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F14M3	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.65%	DQ087242.1	99.87%	AY937412.1	100.00%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
F13M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.32%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F12M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.26%	FJ463301.1	98.02%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F12M3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	90.89%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	98.01%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F12M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F10M5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F10M2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F10M1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F9M4	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.67%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	98.95%	Si	<i>T parareesei</i>
F9M3	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.67%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.73%	Si	<i>T parareesei</i>
F8M5	<i>T asperelloides</i>	FJ442615.1	100.00%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	99.54%	Si	<i>T asperelloides</i>
F8M2	<i>T asperelloides</i>	FJ442615.1	98.90%	GU248411.1	99.75%	GU248412.1	99.68%	Si	<i>T asperelloides</i>
F7M3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	100.00%	FJ463301.1	99.27%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F7M2	<i>T reesei</i>	MH861154.1	90.27%	HM182969.1	99.52%	AF401004.1	99.38%	Si	<i>T reesei</i>
F6M5	<i>T asperelloides</i>	EU330955.1	96.81%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	99.54%	Si	<i>T asperelloides</i>
F5M5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.26%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F5M4	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	90.97%	FJ442749.1	100.00%	FJ463379.1	97.92%	Si	<i>T lentiforme</i>
F5M3	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F4M3	<i>T ghanense</i>	NR_120299.1	99.84%	JN175559.1	99.75%	AY937423.1	99.53%	Si	<i>T ghanense</i>
F3M5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.81%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	98.32%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F3M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F2M5	<i>T zelobreve</i>	MN594474.1	99.31%	MN605872.1	99.63%	MN605883.1	99.22%	Si	<i>T zelobreve</i>
F2M4	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.49%	FJ442749.1	98.40%	FJ463379.1	90.52%	No	<i>No identificada</i>
F2M4	<i>T afarasin</i>	FJ442665.1	99.34%	FJ442778.1	98.15%	AF348093.1	99.03%	No	<i>No identificada</i>
F2M4	<i>T rifaii</i>	FJ442621.1	99.32%	FJ442720.1	98.03%	FJ463321.1	94.47%	No	<i>No identificada</i>

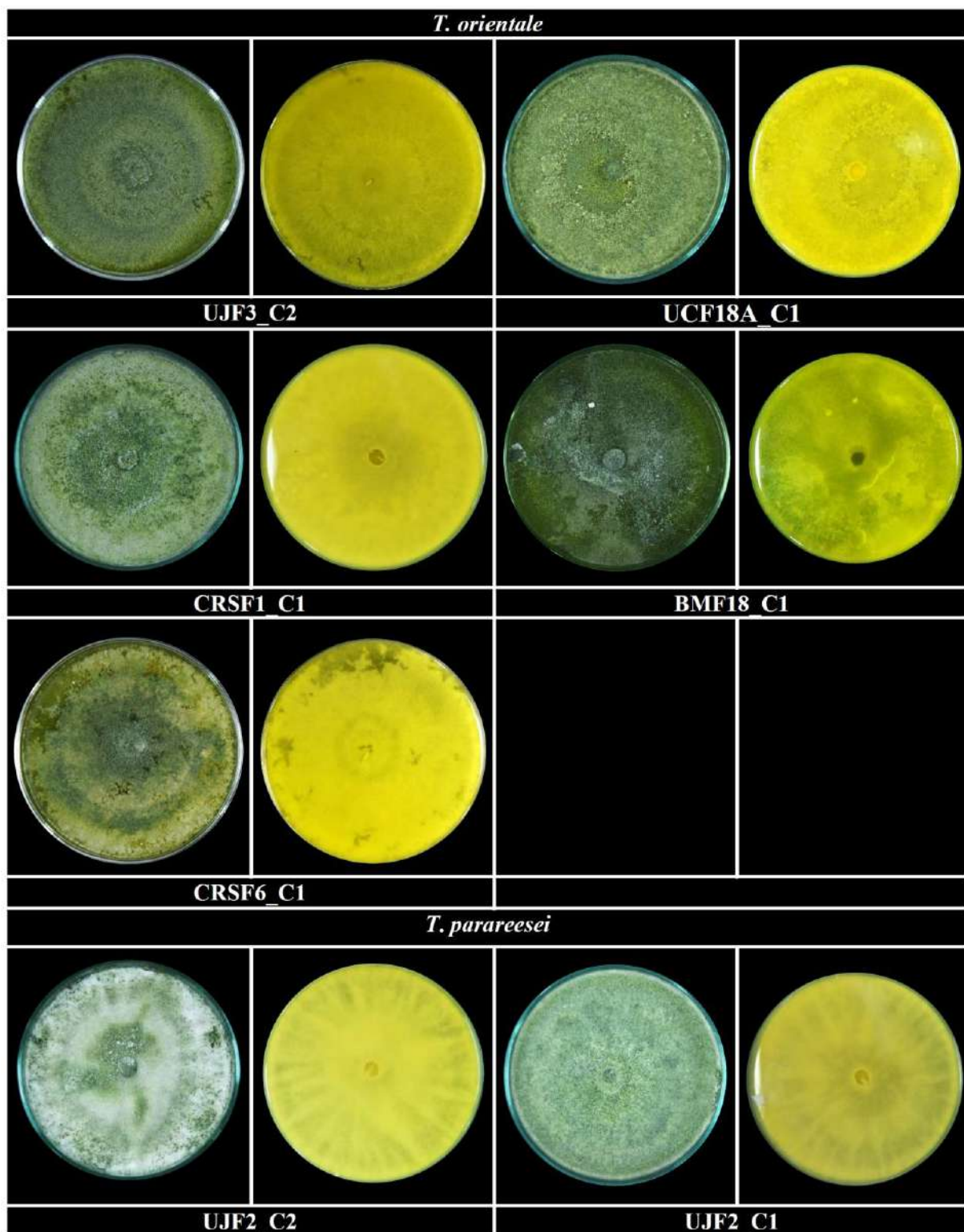
F1M4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	100.00%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
F1M3	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	99.82%	DQ087242.1	99.87%	AY937412.1	97.86%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
F1M2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
CTN3_C3	<i>T virens</i>	EU330955.1	92.47%	AF545547.1	98.15%	AY750891.1	96.51%	No	<i>No identificada</i>
CTN3_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.74%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
CRSF6_C1	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	99.29%	JN175522.1	98.28%	EU401581.1	97.56%	No	<i>Sp</i>
CRSF6_C1	<i>T aethiopicum</i>	NR_111317.1	99.32%	HM182986.1	98.50%	EU401616	90.28%	No	<i>Sp</i>
CRSF6_C1	<i>T longibrachiatum</i>	EU401556.1	99.31%	DQ087242.1	97.88%	AY937412.1	97.88%	No	<i>Sp</i>
CRSF6_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	89.00%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
CRSF5_C1	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.82%	FJ442749.1	99.26%	FJ463379.1	93.53%	Ambigua	<i>Ambigua</i>
CRSF3_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.84%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
CRSF2_C3	<i>T reesei</i>	MH861154.1	99.82%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	100.00%	Si	<i>T reesei</i>
CRSF1_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.81%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.28%	Si	<i>T parareesei</i>
CRSF1_C5	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.49%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.28%	Si	<i>T parareesei</i>
CRSF1_C4	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
CRSF1_C3	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.52%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
CRSF1_C1	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	98.39%	JN175522.1	100.00%	EU401581.1	97.56%	Si	<i>T orientale</i>
CNF21_C2	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.32%	FJ442749.1	99.63%	FJ463379.1	100.00%	Si	<i>T lentiforme</i>
CNF20_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	99.82%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	97.92%	Si	<i>T reesei</i>
CNF16_C2	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	91.22%	JN175522.1	99.14%	EU401581.1	98.29%	Si	<i>T orientale</i>
CNF16_C1	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.74%	Si	<i>T parareesei</i>
CNF15_C4	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
CNF12_C2	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.66%	FJ442749.1	100.00%	FJ463379.1	99.21%	Si	<i>T lentiforme</i>
CNF12_C1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.02%	Si	<i>T afroharzianum</i>
CNF10_C3	<i>T virens</i>	EU330955.1	96.73%	AF545547.1	98.17%	AY750891.1	96.89%	No	<i>No identificada</i>
CNF10_C2	<i>T virens</i>	EU330955.1	100.00%	AF545547.1	98.25%	AY750891.1	97.09%	No	<i>No identificada</i>
CNF10_C1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.27%	Si	<i>T afroharzianum</i>
CNF8_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	99.48%	Si	<i>T reesei</i>
CNF7_C3	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.67%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.63%	Si	<i>T parareesei</i>
CNF7_C2	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	99.63%	JN175522.1	98.28%	EU401581.1	97.07%	NO	<i>No identificada</i>
CNF7_C2	<i>T longibrachiatum</i>	NR_111317.1	94.32%	DQ087242.1	98.01%	AY937412.1	89.55%	No	<i>Sp</i>
CNF7_C2	<i>T aethiopicum</i>	NR_111317.1	99.54%	HM182986.1	98.37%	EU401616.1	89.76%	No	<i>Sp</i>
CNF7_C1	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.67%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.76%	Si	<i>T parareesei</i>
CNF5_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
CNF4_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	99.74%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
CNF4_C1	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	100.00%	HM182963.1	99.74%	GQ354353.1	99.76%	Si	<i>T parareesei</i>
CNF3_C1	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	98.94%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
CNF1_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	98.68%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.70%	Si	<i>T parareesei</i>
CNF1_C1	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	98.45%	JN175522.1	99.83%	JN175573.1	97.07%	Si	<i>T orientale</i>
CMF1_C1	<i>T parareesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182963.1	99.60%	GQ354353.1	97.93%	Si	<i>T parareesei</i>
CMBF1_C1	<i>T orientale</i>	MH861154.1	100.00%	JN175522.1	99.75%	EU401581.1	97.07%	Si	<i>T orientale</i>
CCF6_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	99.82%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	100.00%	Si	<i>T reesei</i>
CCF5_C5	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	97.03%	Si	<i>T parareesei</i>
CCF5_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.74%	Si	<i>T parareesei</i>
CCF4_C1	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.83%	JQ685884.1	98.89%	EU401581.1	97.29%	No	<i>No identificada</i>
CCF4_C1	<i>T longibrachiatum</i>	EU401556.1	98.26%	DQ087242.1	98.14%	AY937412.1	90.02%	No	<i>Sp</i>
CCF4_C1	<i>T aethiopicum</i>	EU401556.1	94.59%	HM182986.1	98.50%	EU401616.1	90.00%	No	<i>Sp</i>
CCF3_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
CCF2_C2	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.19%	JQ685884.1	98.77%	EU401581.1	99.61%	Ambigua	<i>Ambigua</i>
CB04_C2	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	100.00%	Si	<i>T reesei</i>
CB04_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.15%	AF401004.1	99.48%	Si	<i>T reesei</i>
BPF3_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	99.47%	HM182969.1	99.60%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
BMF19_C4	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.84%	HM182963.1	99.87%	GQ354353.1	97.03%	Si	<i>T parareesei</i>
BMF19_C2	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	99.62%	JN175522.1	99.63%	JN175573.1	97.06%	Si	<i>T orientale</i>
BMF18_C1	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	99.45%	JN175522.1	99.14%	EU401581.1	99.59%	Si	<i>T orientale</i>
BMF15_C5	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
BMF2_C2	<i>T zelobreve</i>	MN594474.1	99.46%	MN605872.1	99.63%	MN605883.1	99.67%	Si	<i>T zelobreve</i>
BMF2_C1	<i>T koningiopsis</i>	NR_131281.1	100.00%	EU241506.1	99.02%	DQ284966.1	96.95%	Si	<i>Koningsiopsis</i>
BMF1_C1	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
BLPF4_C3	<i>T orientale</i>	NR_111317.1	99.81%	JQ685884.1	98.89%	EU401581.1	97.56%	No	<i>No identificada</i>

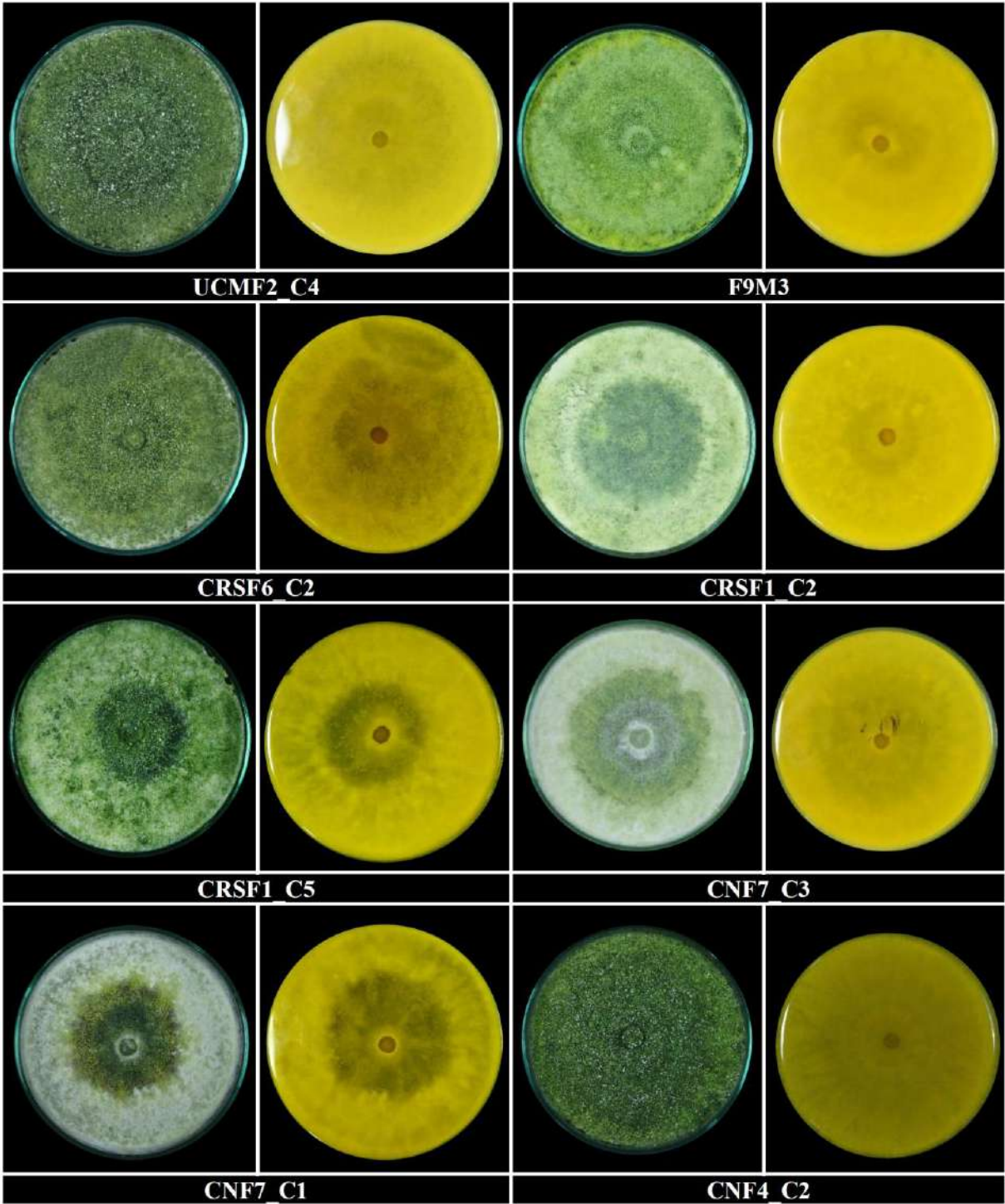


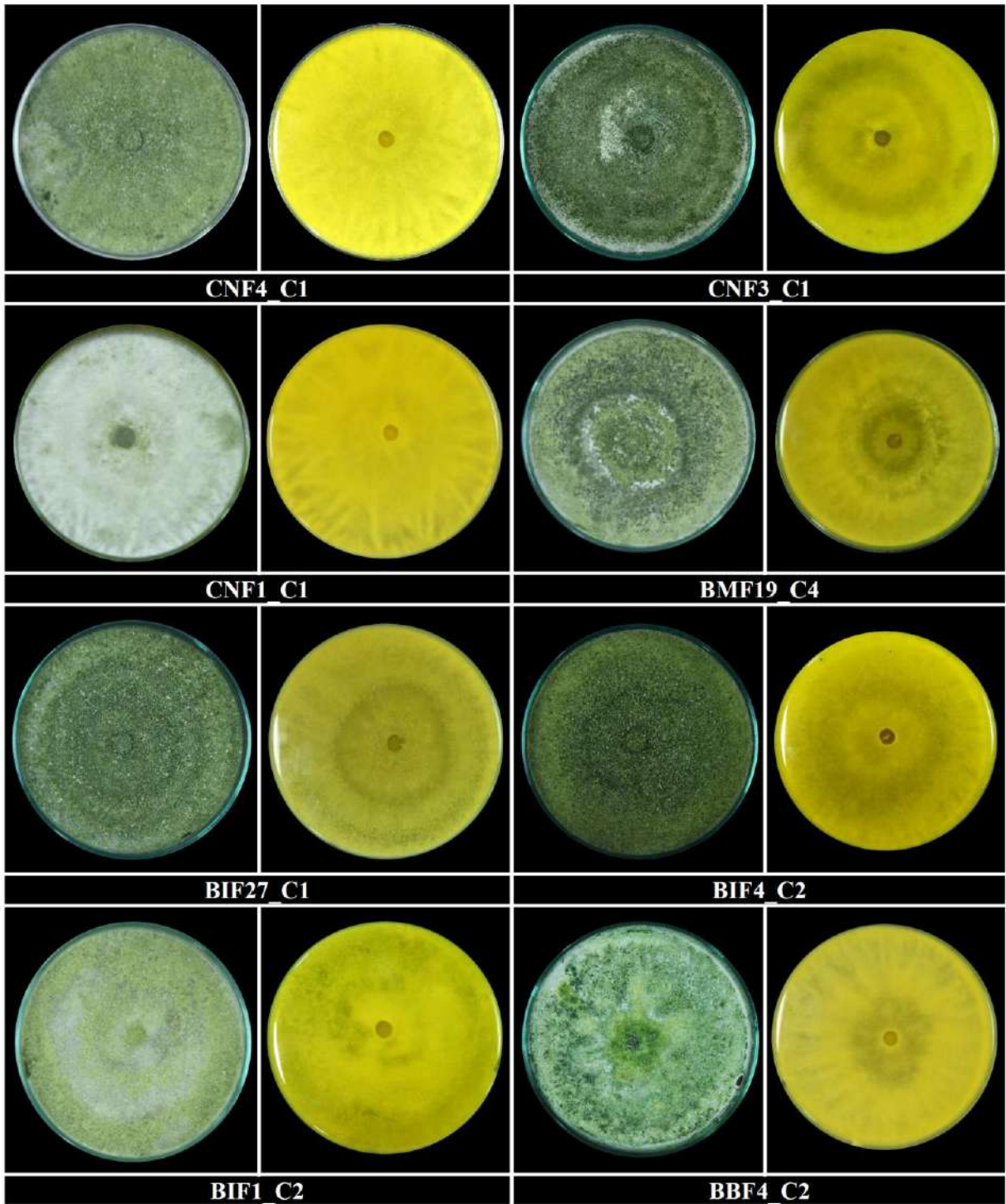
BLPF4_C3	<i>T longibrachiatum</i>	NR_111317.1	96.61%	DQ087242.1	98.14%	AY937412.1	92.52%	No	<i>Sp</i>
BLPF4_C3	<i>T aethiopicum</i>	NR_111317.1	97.51%	HM182986.1	98.75%	EU401616.1	90.28%	No	<i>Sp</i>
BLPF4_C2	<i>T ghanense</i>	NR_120299.1	99.84%	JN175559.1	99.75%	AY937423.1	99.52%	Si	<i>T ghanense</i>
BLPF4_C1	<i>T asperelloides</i>	FJ442615.1	99.56%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	99.30%	Si	<i>T asperelloides</i>
BLPF3_C1	<i>T asperelloides</i>	NR_137304.1	98.70%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	99.53%	Si	<i>T asperelloides</i>
BLPF2_C2	<i>T lentiforme</i>	NR_144868.1	99.64%	FJ442749.1	100.00%	FJ463379.1	100.00%	Si	<i>T lentiforme</i>
BLPF2_C1	<i>T breve</i>	FJ442615.1	97.90%	KY687983.1	100.00%	KY688045.1	99.68%	Si	<i>T breve</i>
BLPF1_C4	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.83%	JQ685884.1	98.77%	EU401581.1	97.56%	No	<i>No identificada</i>
BLPF1_C4	<i>T longibrachiatum</i>	JQ685873.1	94.23%	DQ087242.1	98.01%	AY937412.1	90.99%	No	<i>Sp</i>
BLPF1_C4	<i>T aethiopicum</i>	JQ685873.1	93.51%	HM182986.1	98.62%	EU401616.1	90.28%	No	<i>Sp</i>
BLPF1_C3	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.89%	JQ685884.1	98.89%	EU401581.1	97.56%	No	<i>No identificada</i>
BLPF1_C3	<i>T longibrachiatum</i>	JQ685873.1	99.35%	DQ087242.1	98.14%	AY937412.1	90.05%	No	<i>Sp</i>
BLPF1_C2	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.84%	JQ685884.1	98.40%	JN175573.1	96.38%	No	<i>Sp</i>
BLPF1_C2	<i>T aethiopicum</i>	JQ685873.1	99.43%	HM182986.1	98.37%	EU401616.1	90.71%	No	<i>Sp</i>
BIF28_C3	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.67%	FJ442725.1	99.75%	AF348099.1	98.50%	Si	<i>T inhamatum</i>
BIF28_C2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF28_C1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF27_C2	<i>T rifaii</i>	FJ442621.1	99.66%	FJ442720.1	98.65%	FJ463321.1	90.79%	ambigua	<i>Ambigua</i>
BIF27_C1	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.67%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
BIF26_C1	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.34%	FJ442725.1	99.63%	AF348099.1	96.42%	No	<i>No identificada</i>
BIF26_C1	<i>T harzianum</i>	EU280079.1	99.68%	AF545549	97.42%	AF348100.1	95.96%	No	<i>No identificada</i>
BIF25_M2	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.66%	FJ442749.1	99.88%	FJ463379.1	98.32%	Si	<i>T lentiforme</i>
BIF22_C2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.88%	FJ463301.1	99.01%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF20_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.65%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.76%	Si	<i>T parareesei</i>
BIF20_C1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF18_C2	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.67%	FJ442725.1	99.63%	AF348099.1	97.65%	Si	<i>T inhamatum</i>
BIF18_C1	<i>T virens</i>	EU330955.1	100.00%	AF545547.1	98.10%	AY750891.1	97.09%	No	<i>No identificada</i>
BIF17_C3	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.83%	JQ685884.1	99.40%	EU401581.1	98.70%	Si	<i>T orientale</i>
BIF17_C2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.63%	FJ463301.1	99.27%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF17_C1	<i>T asperelloides</i>	NR_137304.1	99.87%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	99.53%	Si	<i>T asperelloides</i>
BIF16_C2	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.67%	FJ442725.1	99.75%	AF348099.1	98.43%	Si	<i>T inhamatum</i>
BIF16_C1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF15_C2	<i>T zelobreve</i>	MN594474.1	99.29%	MN605872.1	99.63%	MN605883.1	98.34%	Si	<i>T zelobreve</i>
BIF15_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	98.39%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
BIF14_C3	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.83%	FJ442725.1	99.75%	AF401015.1	100.00%	Si	<i>T inhamatum</i>
BIF14_C2	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.67%	FJ442725.1	99.75%	AF401015.1	97.95%	Si	<i>T inhamatum</i>
BIF14_C1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.64%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF13_C2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	98.14%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	99.18%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF13_C1	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	90.39%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	98.32%	Si	<i>T parareesei</i>
BIF12_C3	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.64%	FJ442725.1	99.63%	AF348099.1	98.43%	Si	<i>T inhamatum</i>
BIF12_C2	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	90.05%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	97.82%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF12_C1	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	90.48%	FJ442749.1	100.00%	FJ463379.1	100.00%	Si	<i>T lentiforme</i>
BIF11_C4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	100.00%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.01%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF11_C3	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.67%	FJ442725.1	99.63%	AF348099.1	98.00%	Si	<i>T inhamatum</i>
BIF11_C2	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.82%	FJ442749.1	100.00%	FJ463379.1	100.00%	Si	<i>T lentiforme</i>
BIF11_C1	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.82%	FJ442749.1	100.00%	FJ463379.1	100.00%	Si	<i>T lentiforme</i>
BIF10_C2	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.29%	FJ442683.1	99.51%	FJ851880.1	97.49%	Si	<i>T lentiforme</i>
BIF9_C1	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.34%	FJ442725.1	99.63%	AF348099.1	97.30%	Si	<i>T inhamatum</i>
BIF8_C2	<i>T reesei</i>	MH861154.1	90.21%	HM182969.1	99.74%	AF401004.1	100.00%	Si	<i>T reesei</i>
BIF8_C1	<i>T inhamatum</i>	MH861134.1	99.51%	FJ442725.1	99.75%	AF348099.1	98.11%	Si	<i>T inhamatum</i>
BIF7_C3	<i>T longibrachiatum</i>	EU401556.1	90.28%	HQ260615.1	99.88%	AY937412.1	100.00%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
BIF7_C2	<i>T virens</i>	EU330955.1	97.09%	AF545547.1	98.15%	AY750891.1	96.73%	No	<i>No identificada</i>
BIF7_C1	<i>T asperelloides</i>	NR231451	96.54%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	98.70%	Si	<i>T asperelloides</i>
BIF5_C4	<i>T reesei</i>	MH861154.1	90.09%	HM182969.1	99.74%	AF401004.1	100.00%	Si	<i>T reesei</i>
BIF5_C3	<i>T orientale</i>	JQ685873.1	99.83%	JQ685884.1	99.14%	EU401581.1	82.75%	Ambiguo	<i>Ambiguo</i>
BIF4_C4	<i>T zelobreve</i>	MN594474.1	99.47%	MN605872.1	99.39%	MN605883.1	99.67%	Si	<i>T zelobreve</i>
BIF4_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	90.73%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.76%	Si	<i>T parareesei</i>
BIF4_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.21%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
BIF3_C2	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.34%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
BIF3_C1	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.74%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>

BIF2_C5	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	89.37%	FJ442691.1	99.38%	FJ463301.1	97.80%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF2_C4	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	97.48%	FJ442691.1	99.75%	FJ463301.1	99.56%	Si	<i>T afroharzianum</i>
BIF2_C3	<i>T reesei</i>	MH861154.1	100.00%	HM182969.1	99.74%	AF401004.1	99.32%	Si	<i>T reesei</i>
BIF2_C2	<i>T lentiforme</i>	FJ442221.1	99.38%	FJ442683.1	99.29%	AF443931.1	96.97%	Ambigua	Ambigua
BIF1_C4	<i>T lentiforme</i>	FJ442221.1	100.00%	FJ442749.1	100.00%	AF443931.1	97.18%	Si	<i>T lentiforme</i>
BIF1_C3	<i>T afarasin</i>	FJ442259.1	99.33%	FJ442778.1	99.75%	AF348093.1	98.55%	Si	<i>T afarasin</i>
BIF1_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	99.76%	Si	<i>T parareesei</i>
BBF4_C4	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.83%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	98.02%	Si	<i>T parareesei</i>
BBF4_C2	<i>T parareesei</i>	MH863773.1	99.66%	HM182963.1	100.00%	GQ354353.1	100.00%	Si	<i>T parareesei</i>
BBF3_C1	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	100.00%	HQ260615.1	99.75%	EU401597.1	99.03%	Si	<i>T longibrachiatum</i>
BBF1_C3	<i>T brevicompactum</i>	EU330955.1	93.73%	EU338314.1	99.51%	EU338299.1	97.44%	Si	<i>T brevicompactum</i>
BBF1_C2	<i>T longibrachiatum</i>	MH859229.1	100.00%	HQ260615.1	99.38%	EU401597.1	98.55%	sl	<i>Longibrachiatum</i>
BBF1_C1	<i>T asperelloides</i>	FJ442615.1	99.67%	GU248411.1	99.88%	GU248412.1	99.30%	No	<i>T longibrachiatum</i>
AP2M2_C1	<i>T afroharzianum</i>	NR_137304.1	99.83%	FJ442691.1	99.38%	KP008851.1	100.00%	Si	<i>T afroharzianum</i>
AP2M1_C2	<i>T afarasin</i>	FJ442778	99.33%	FJ442778.1	99.75%	AF348093	97.10%	Si	<i>T afarasin</i>
AP1M5_C1	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.83%	FJ442749.1	99.63%	FJ463379.1	98.42%	Si	<i>T lentiforme</i>
AP1M4_C1	<i>T lentiforme</i>	FJ442615.1	99.83%	FJ442683.1	99.51%	FJ851880.1	97.40%	Si	<i>T lentiforme</i>

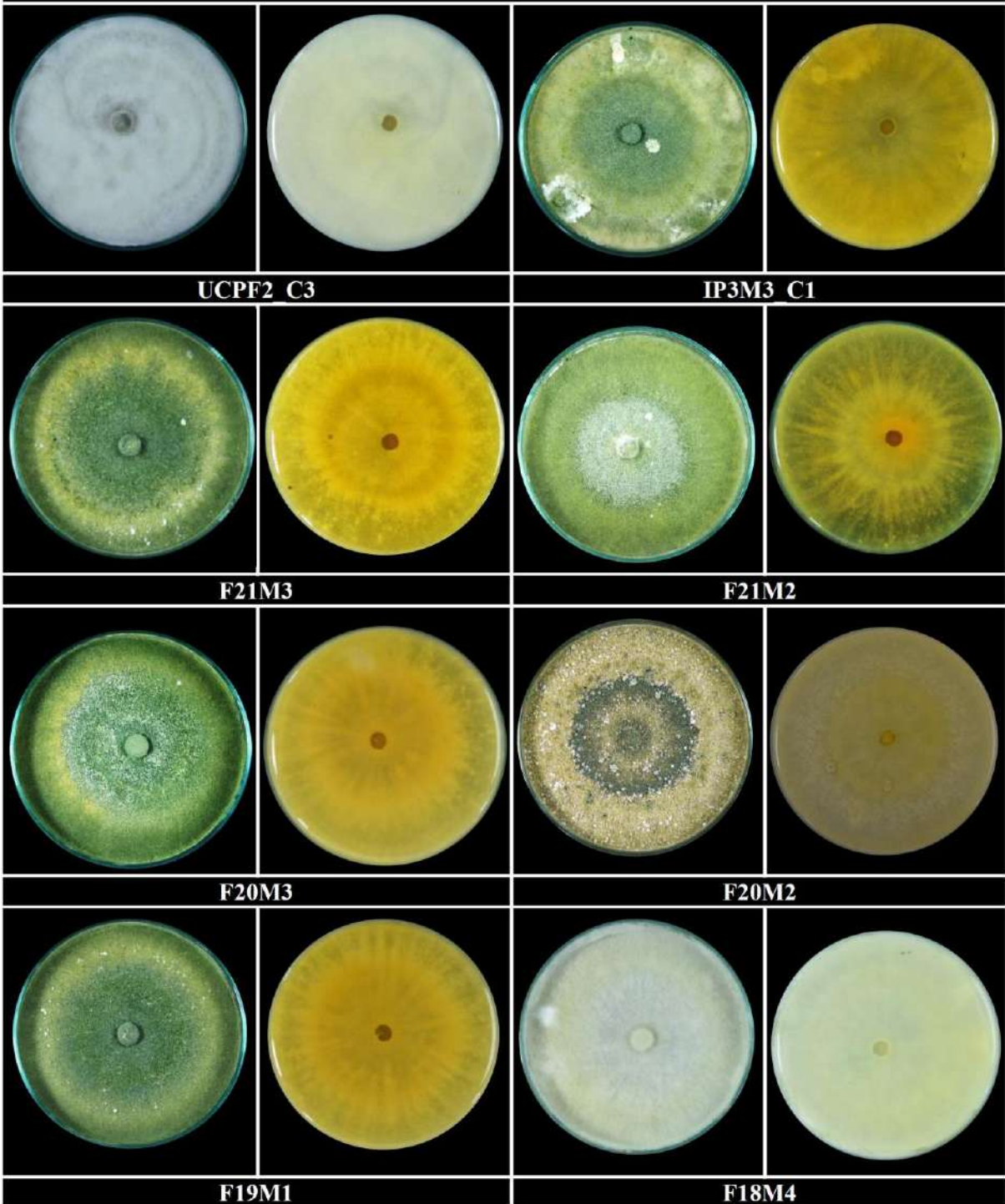
Anexo 2A. Características morfológicas en placa petri (especies agrupadas con caracteres similares (color de cepa, color de pigmentación en reverso y anverso))

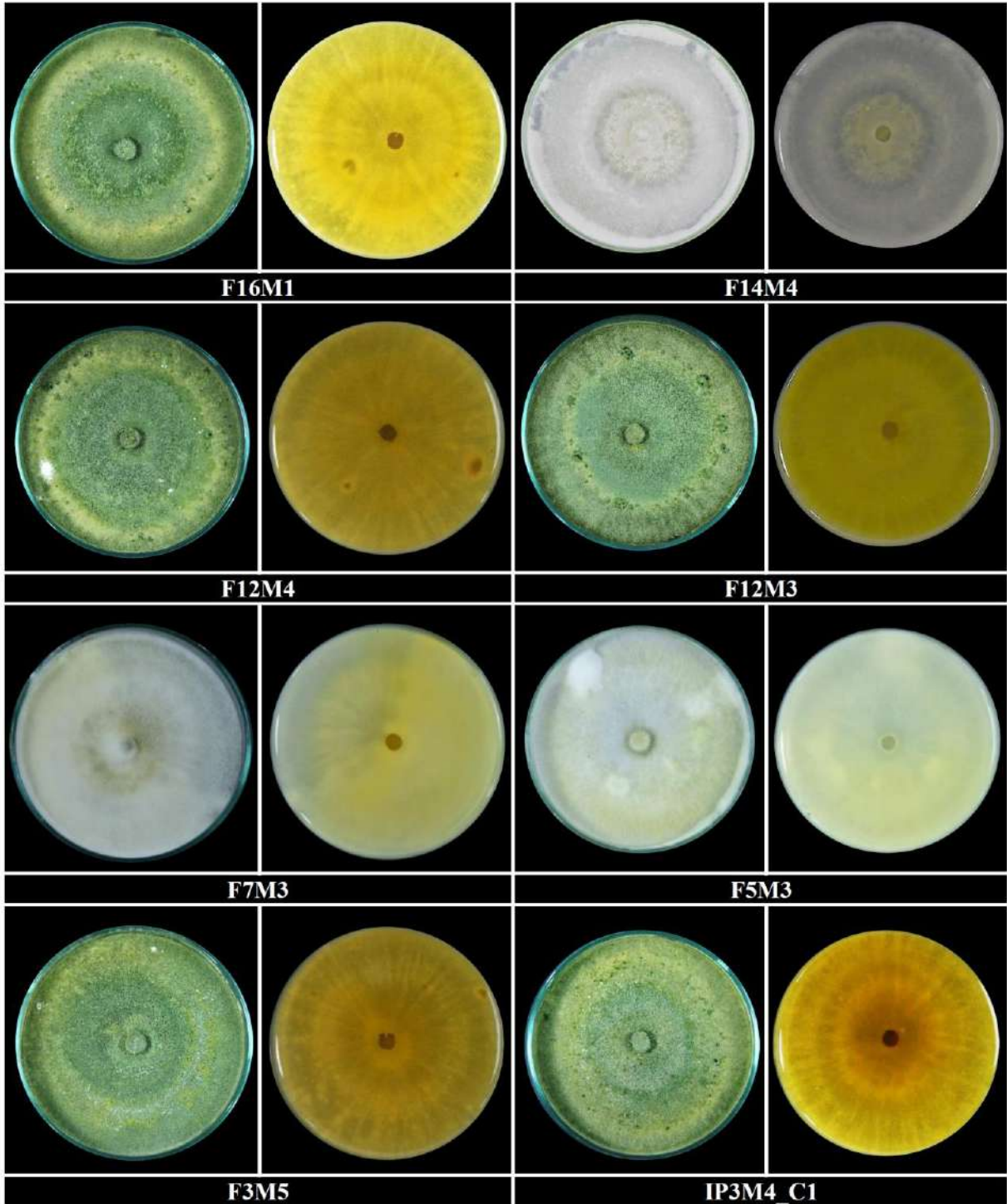


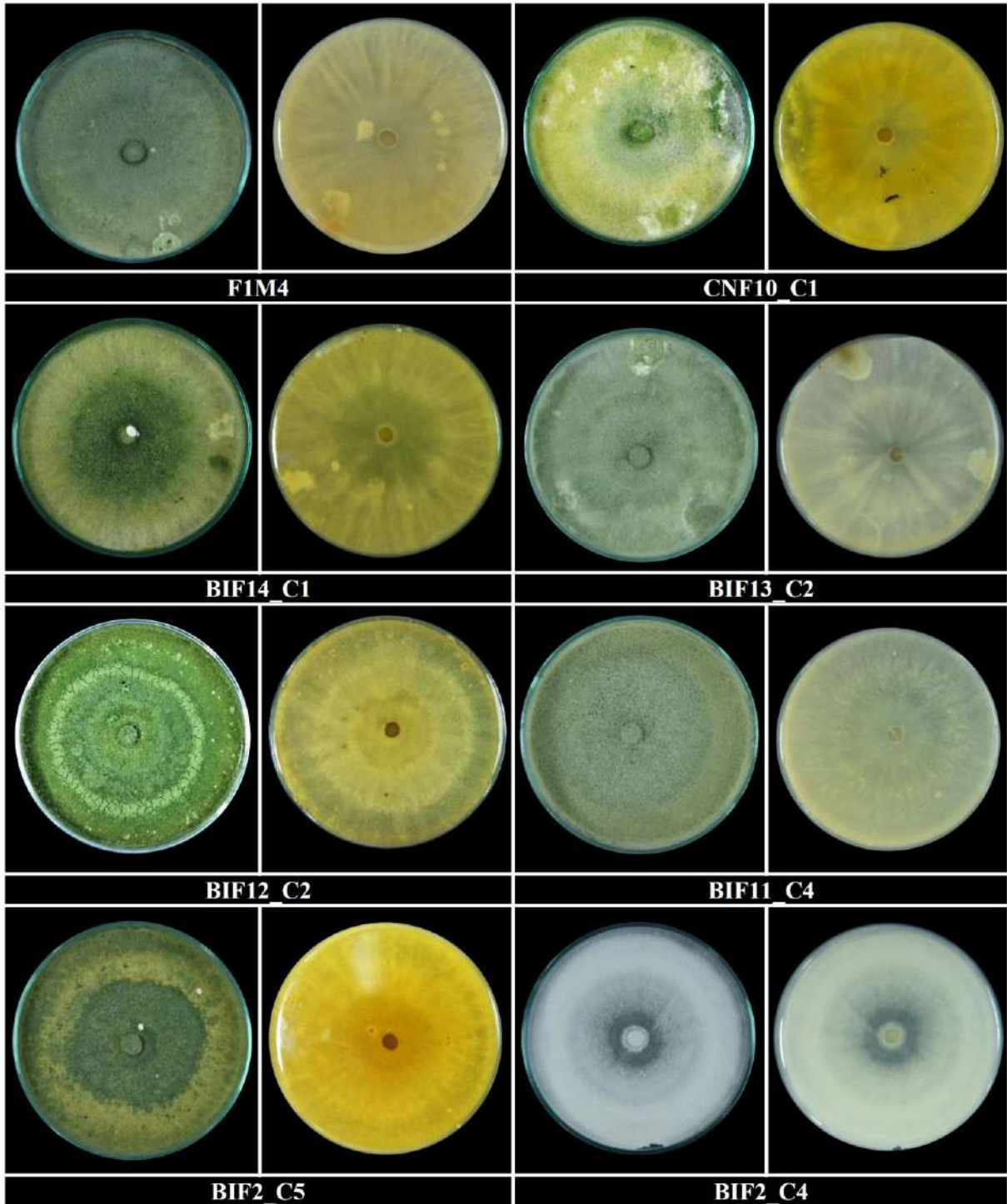




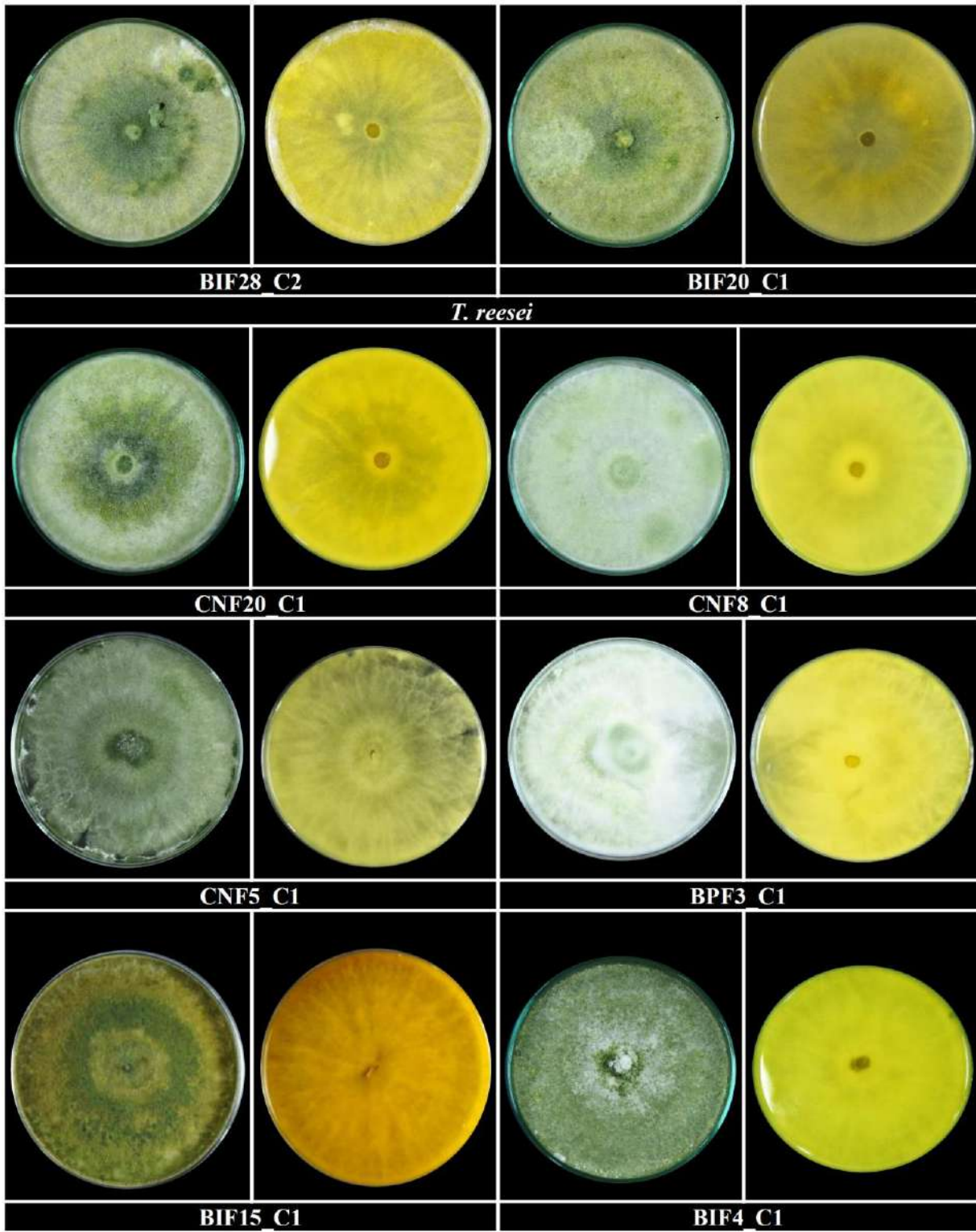
*T. afroharzianum*

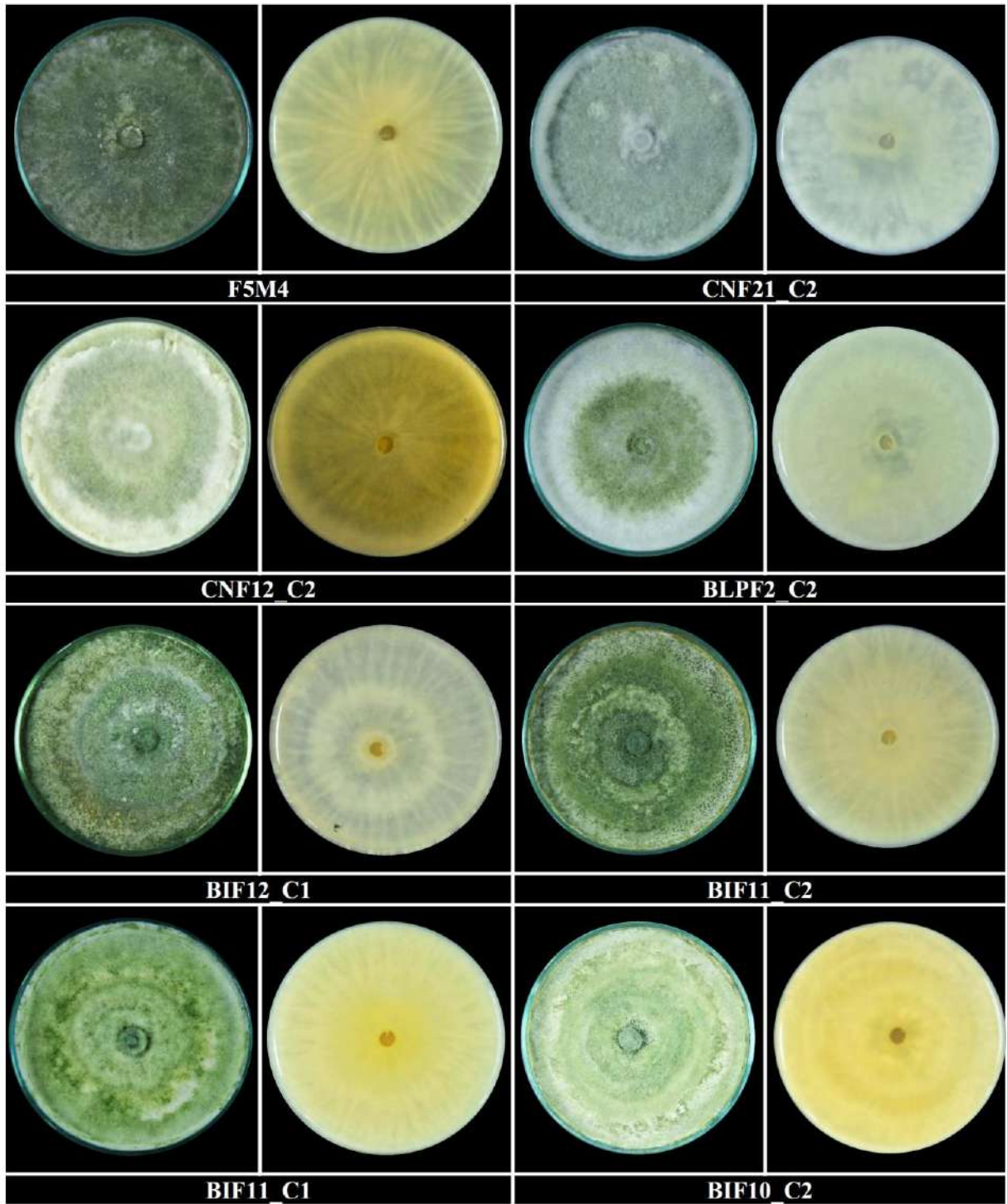


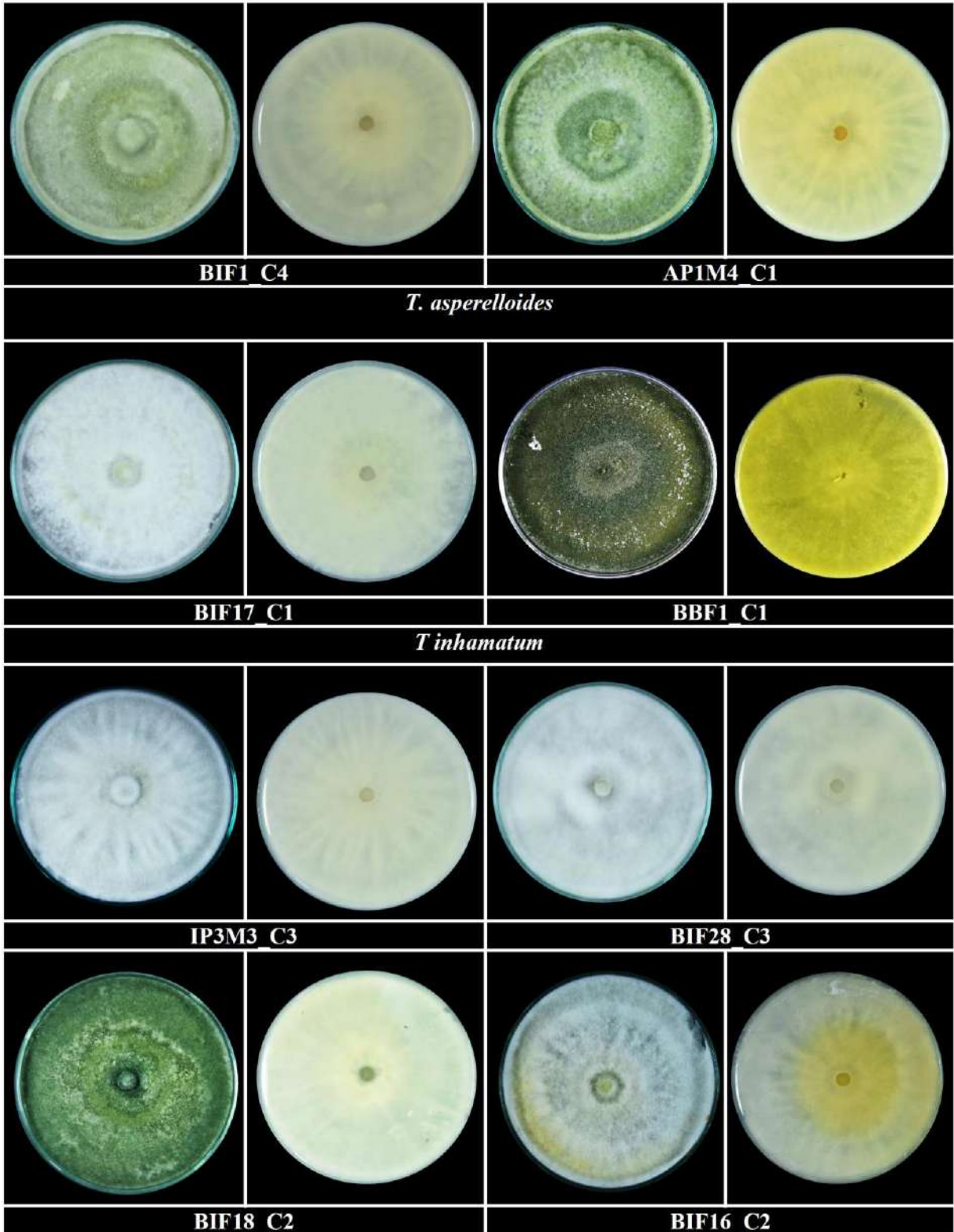


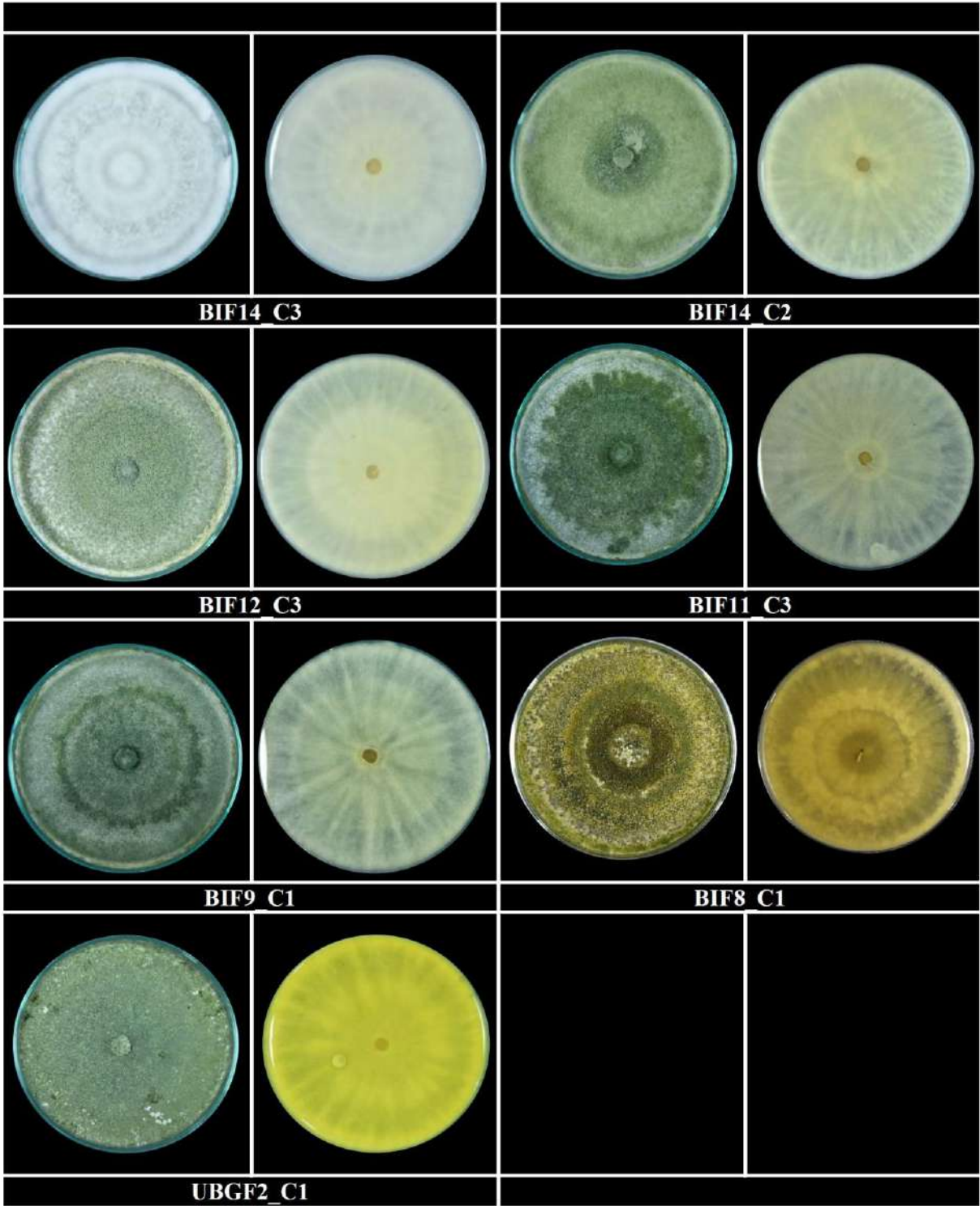




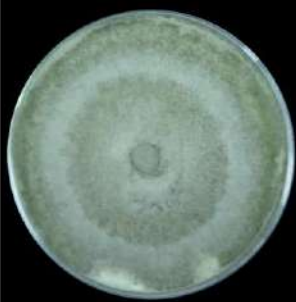






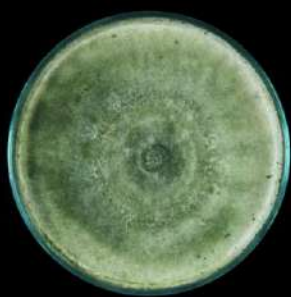


*Trichoderma sp*



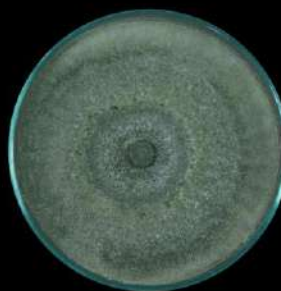
BBF1\_C2

*Trichoderma sp*



BBF1\_C3

*Trichoderma sp*

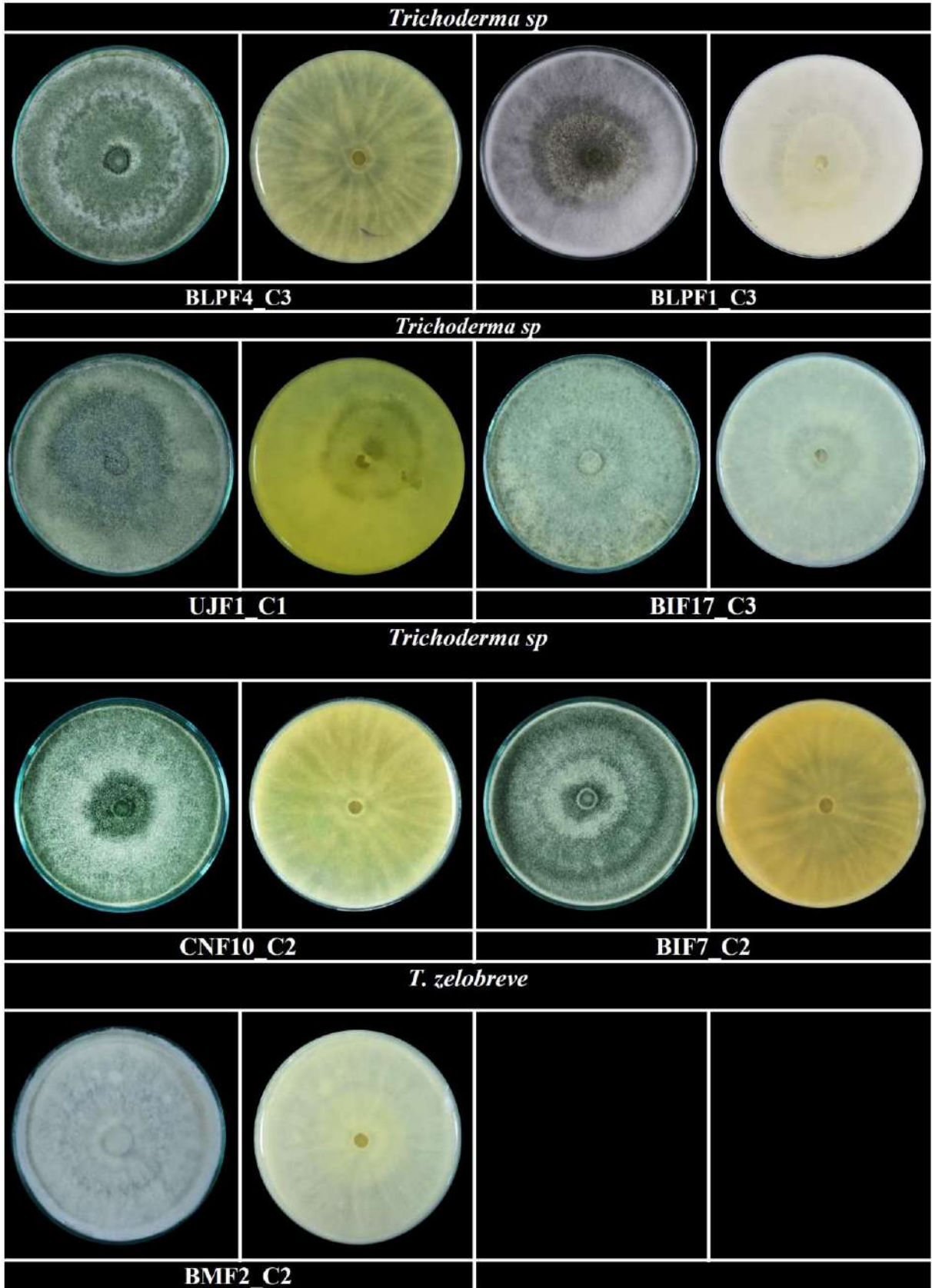


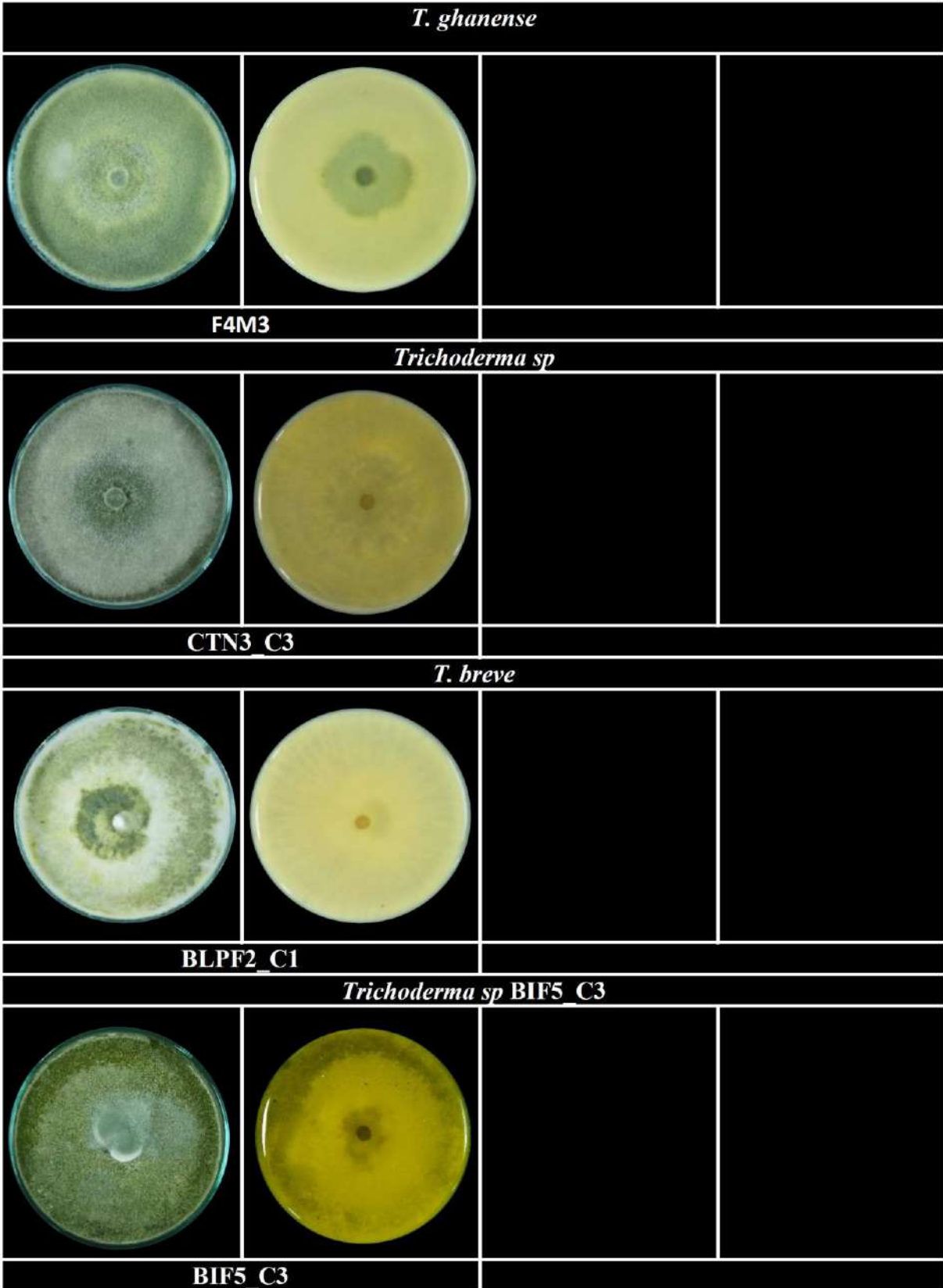
CRSF5\_C1

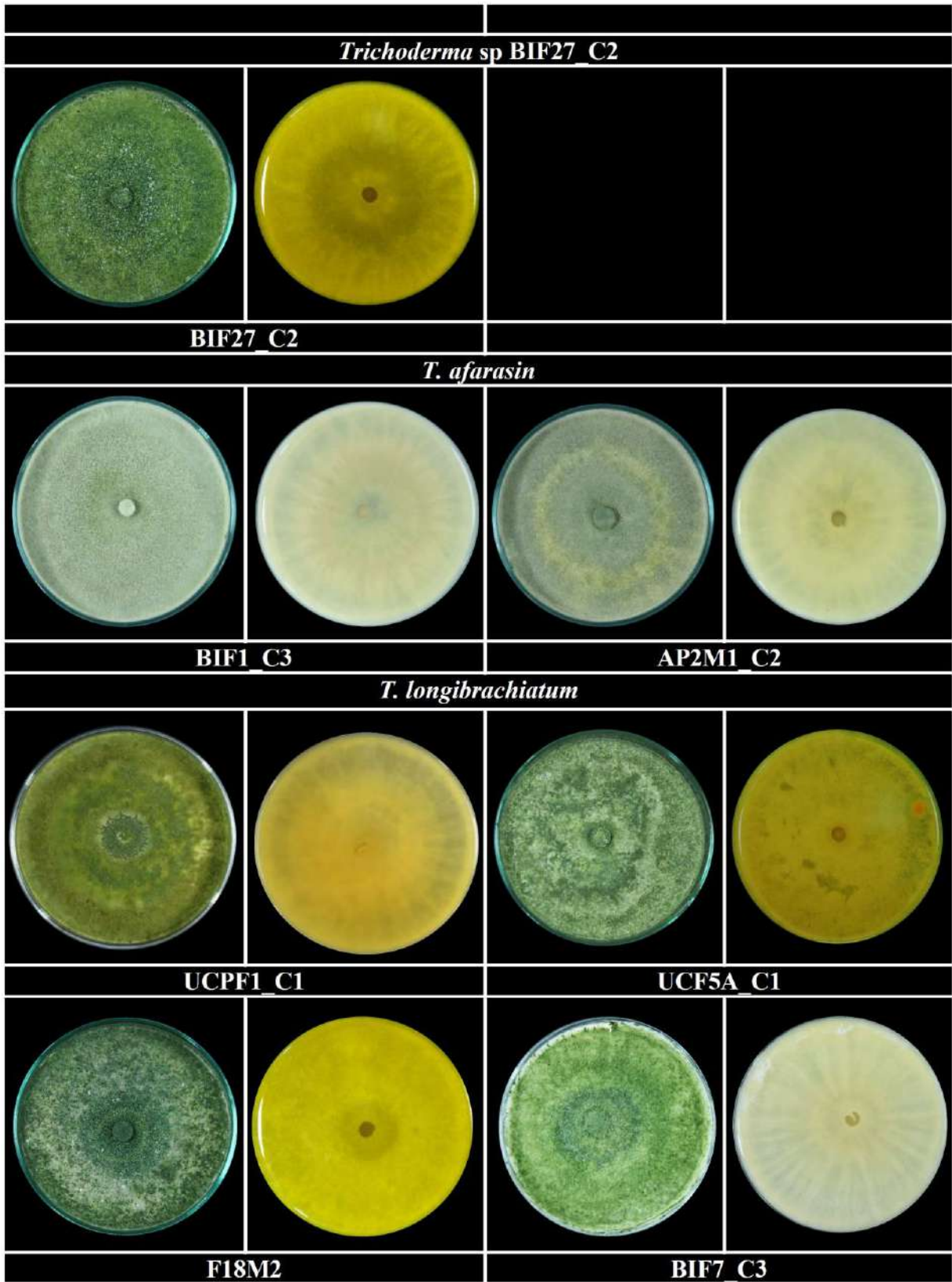
F2M4



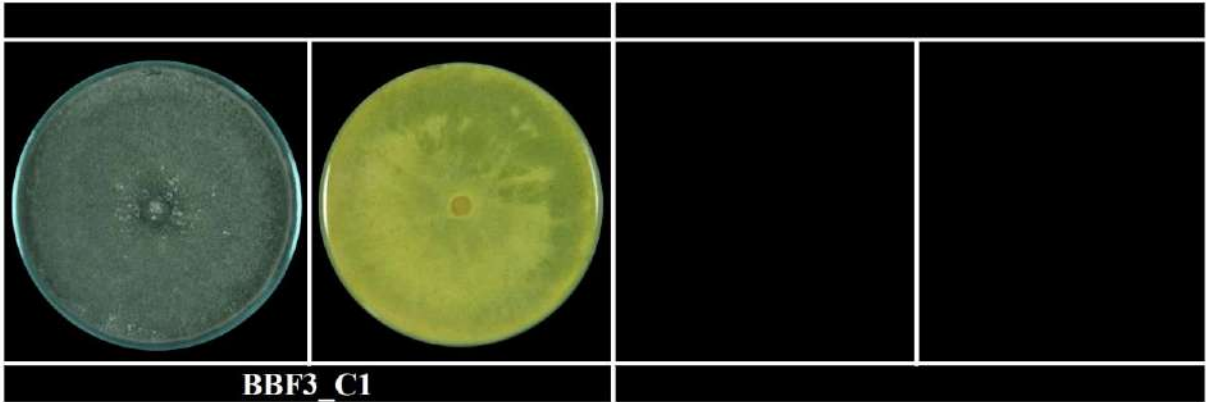
CRSF5\_C1



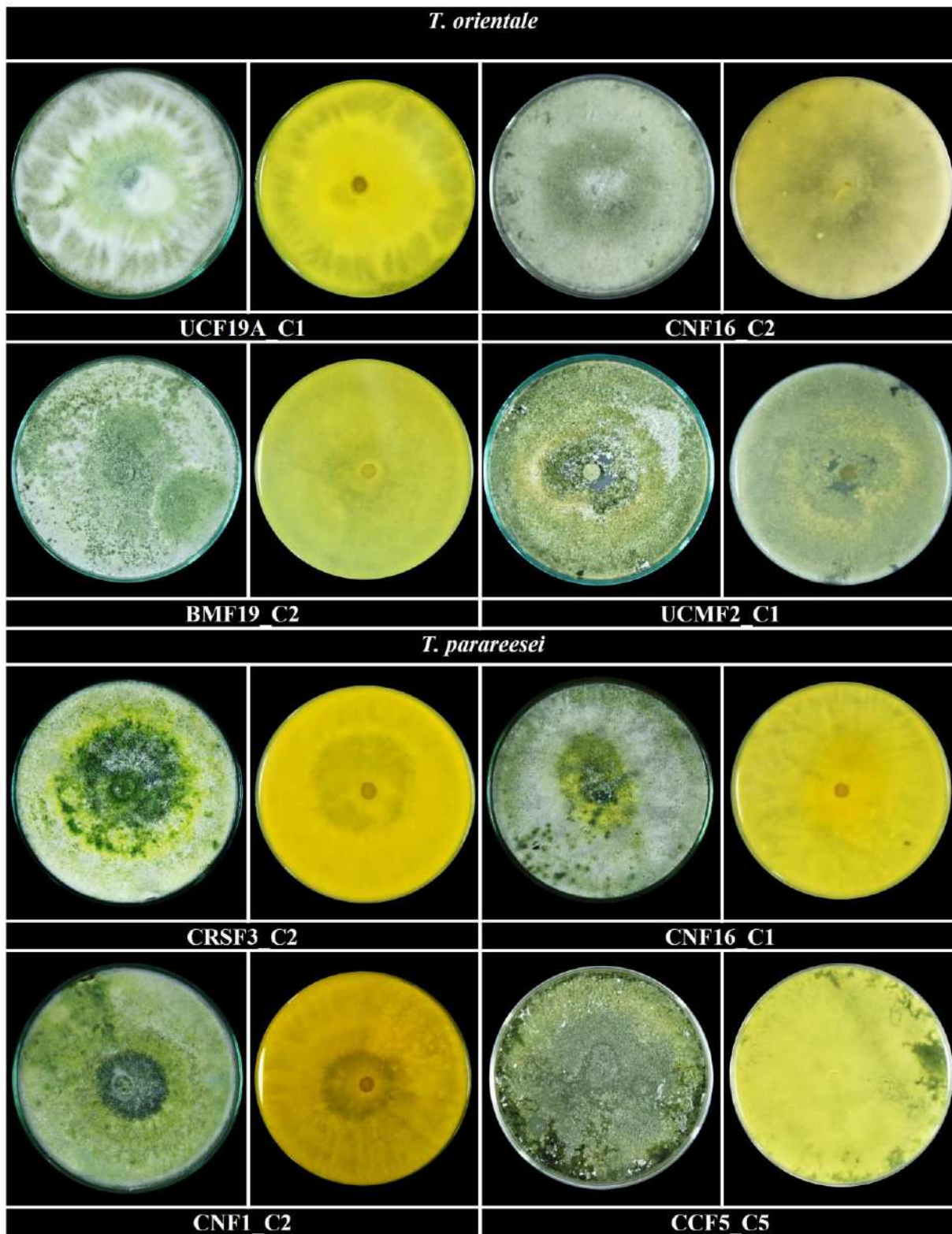


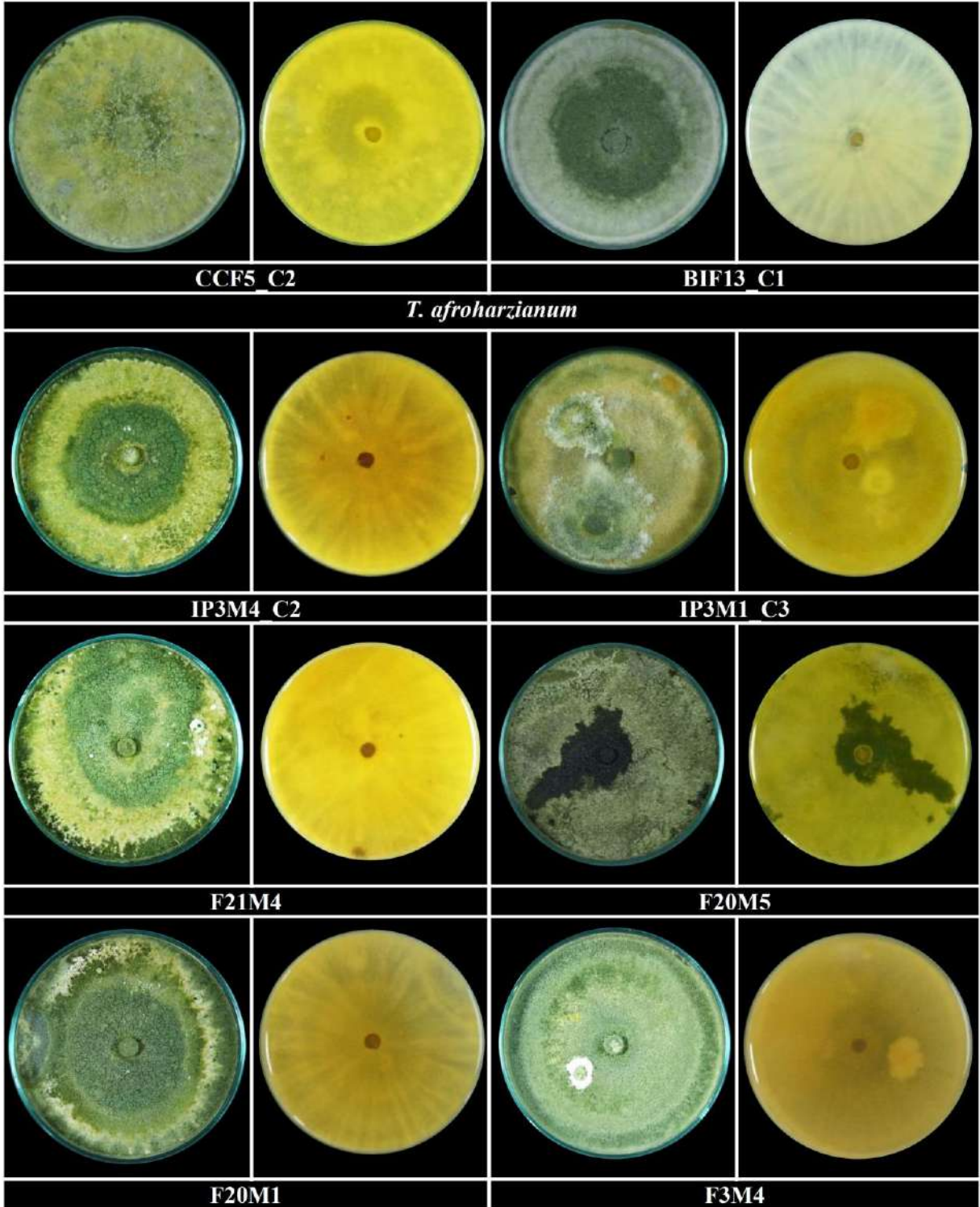


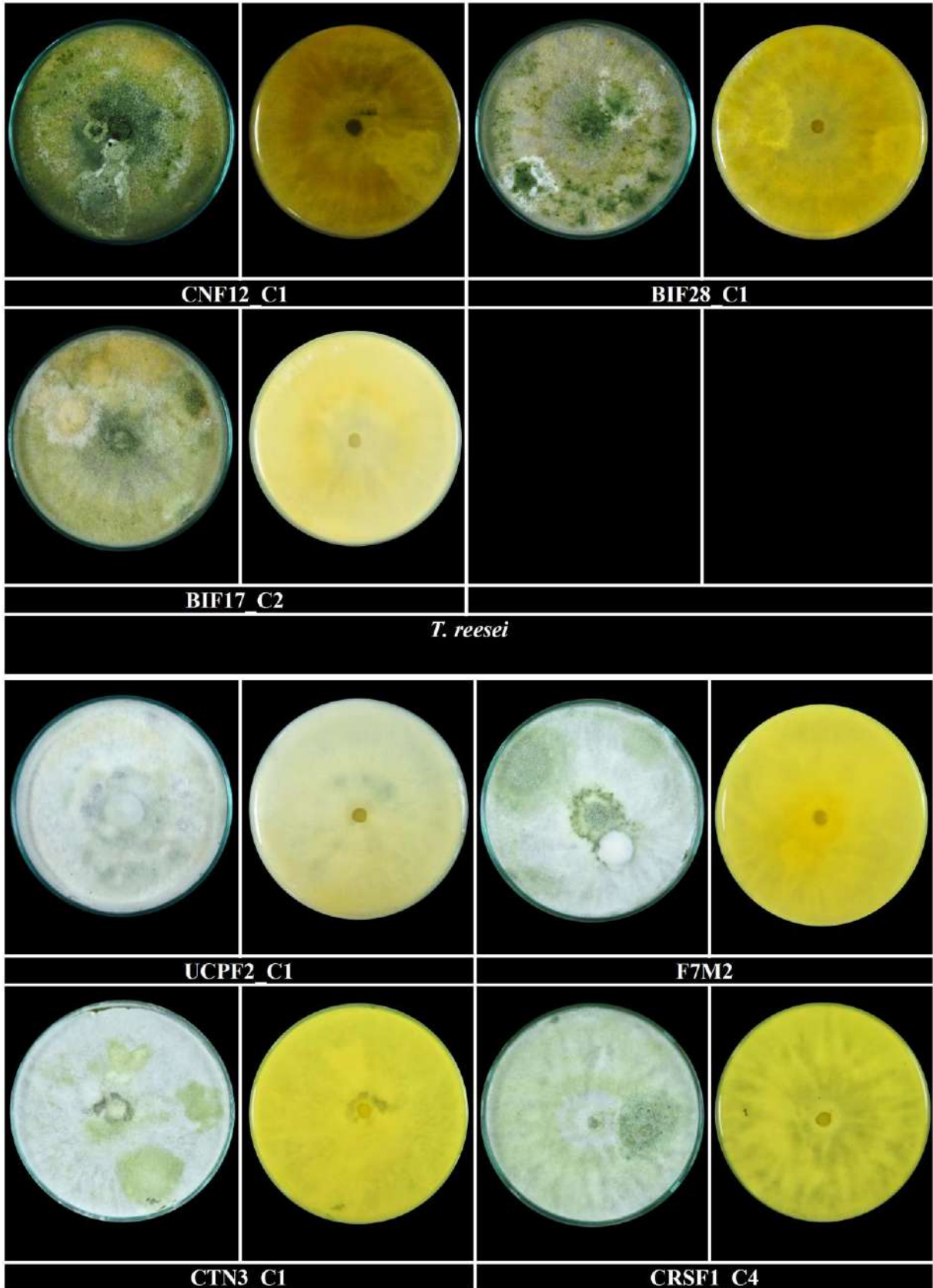


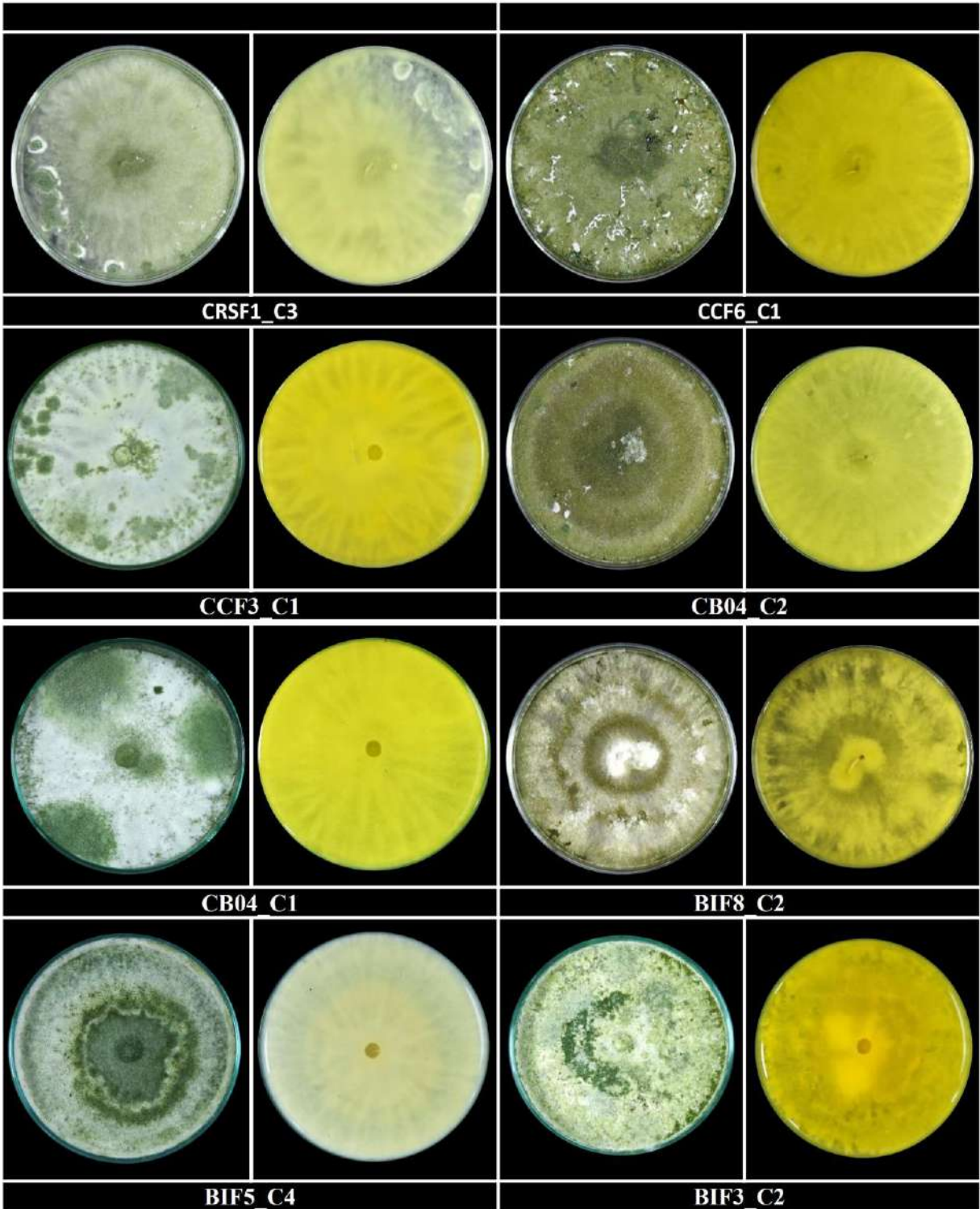


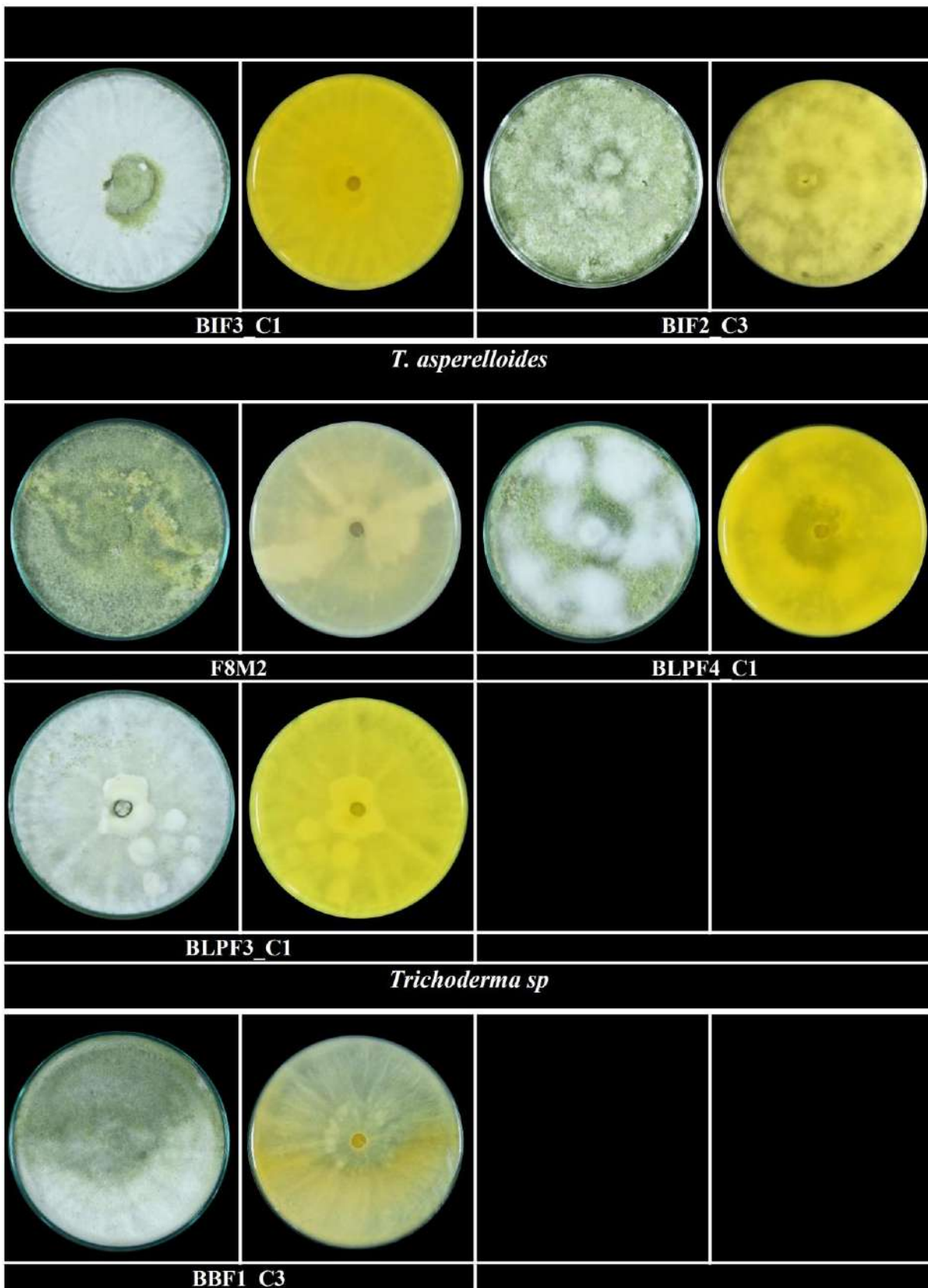
Anexo 2B. Características morfológicas en placa petri (especies agrupadas con caracteres diferentes (color de cepa, color de pigmentación en reverso y anverso))

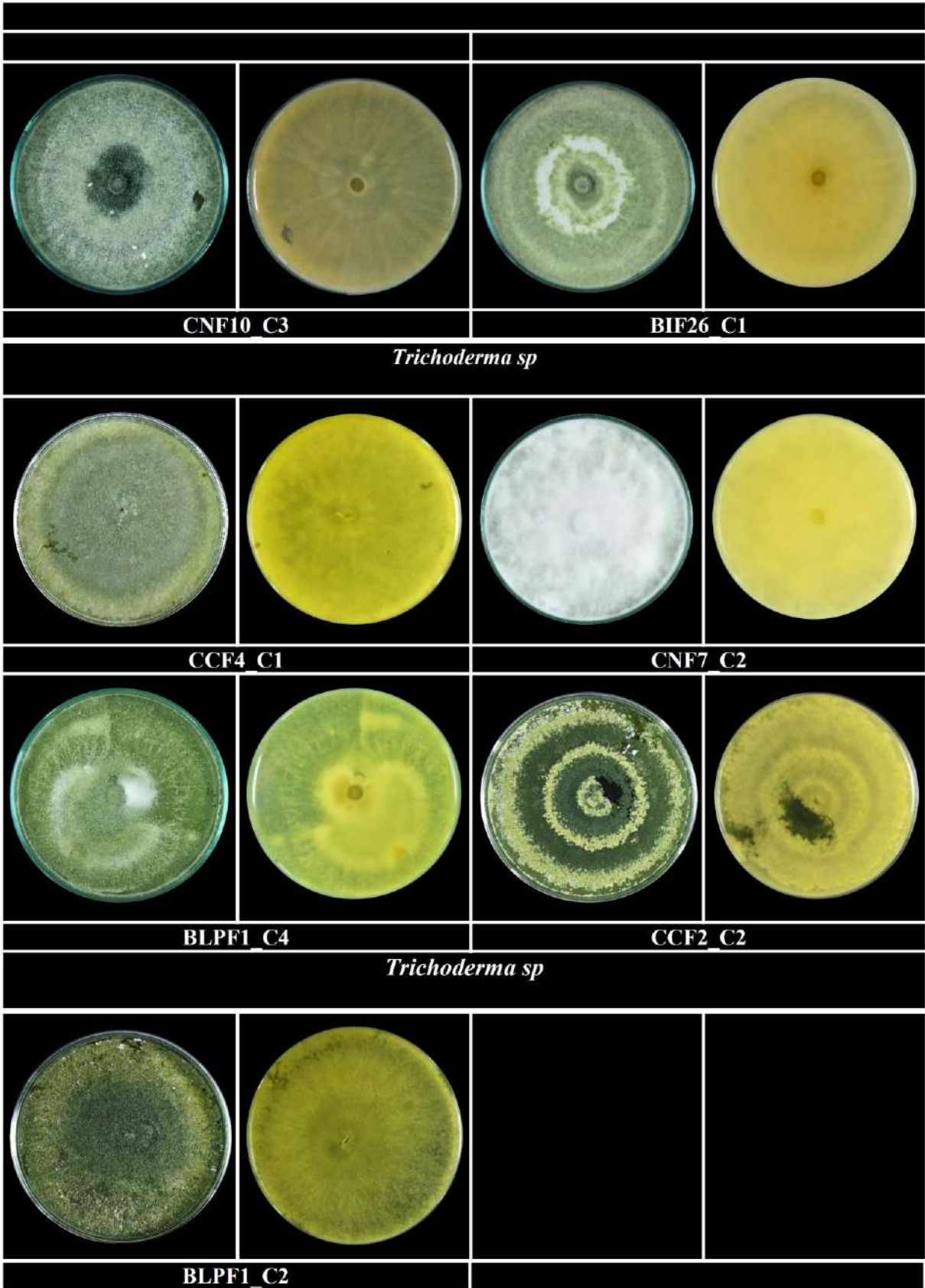


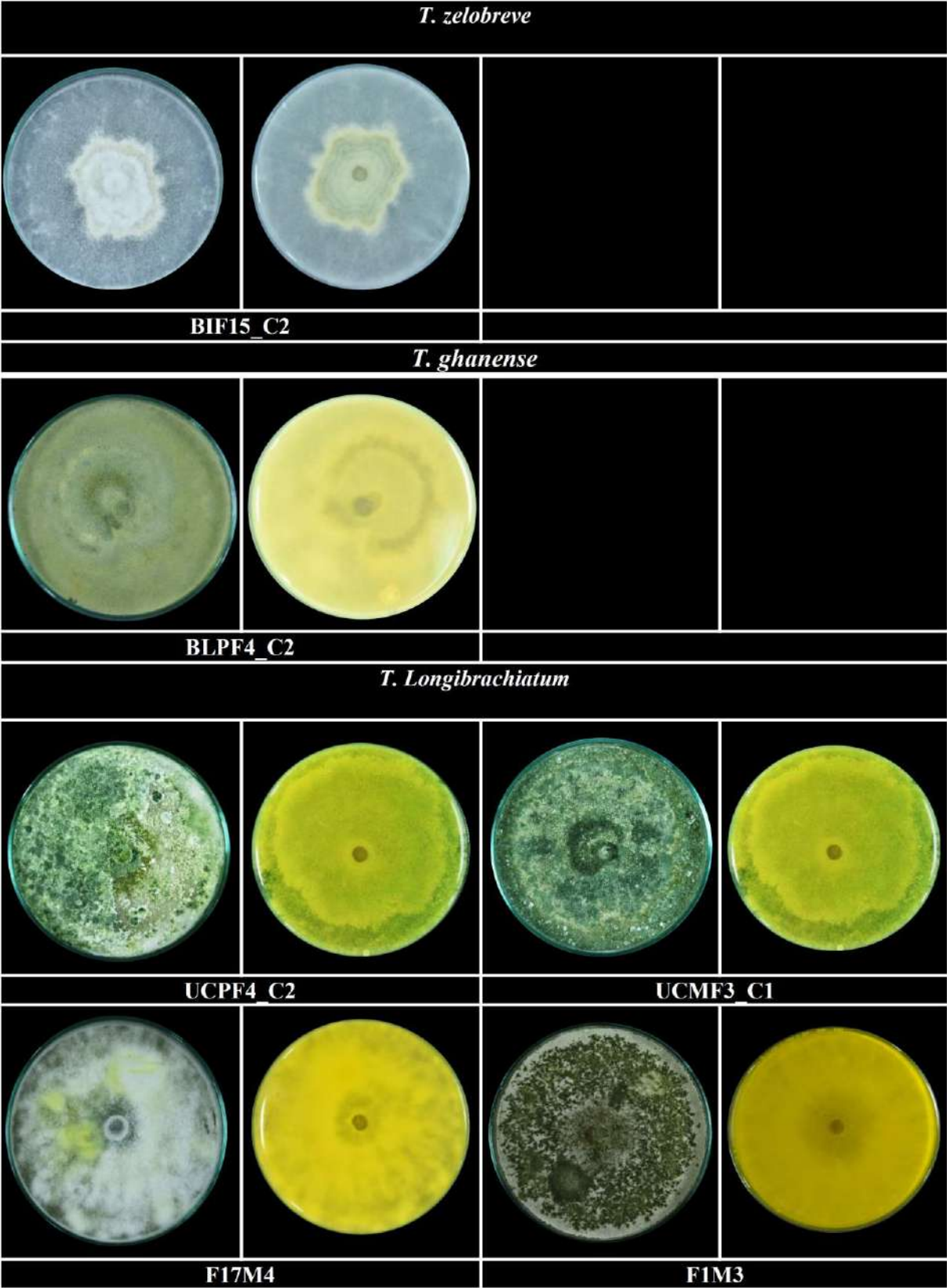




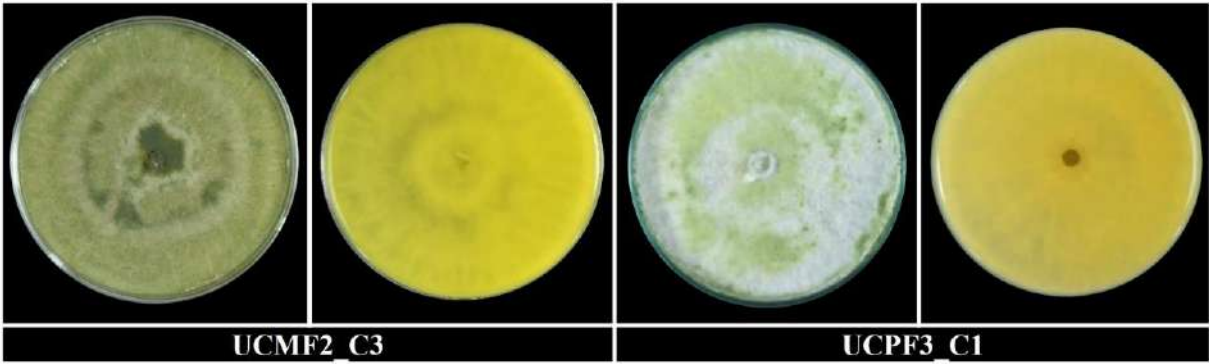




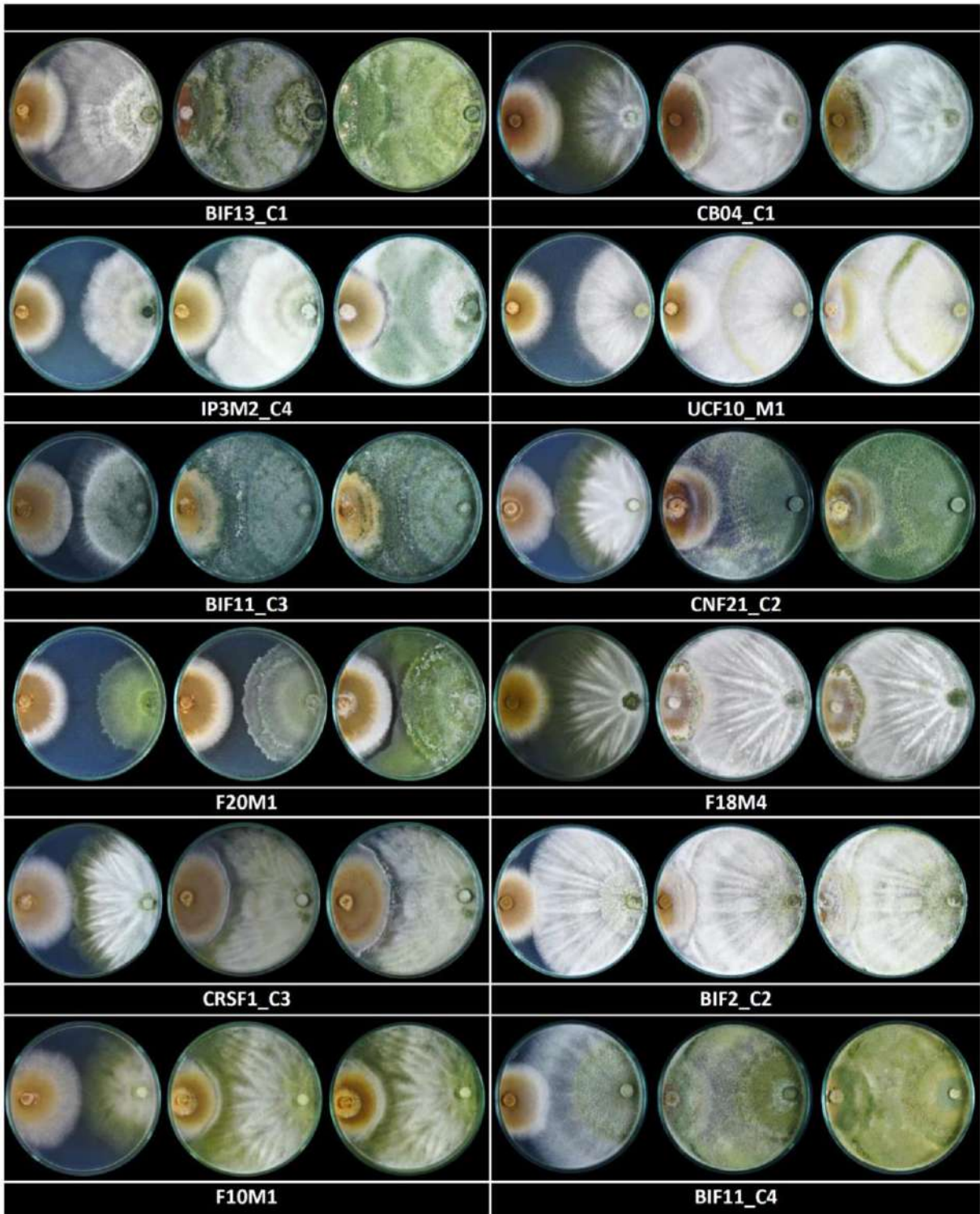


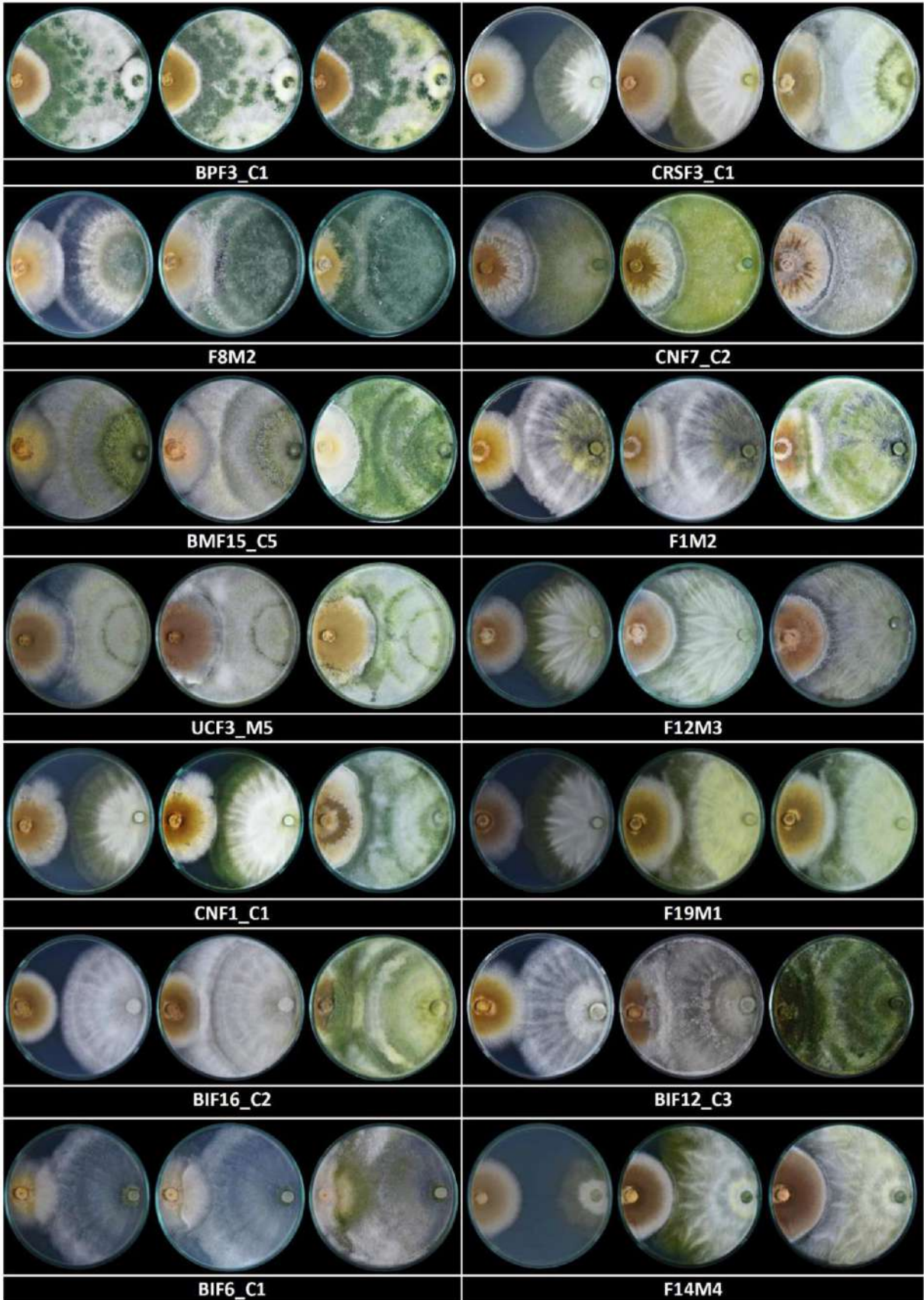


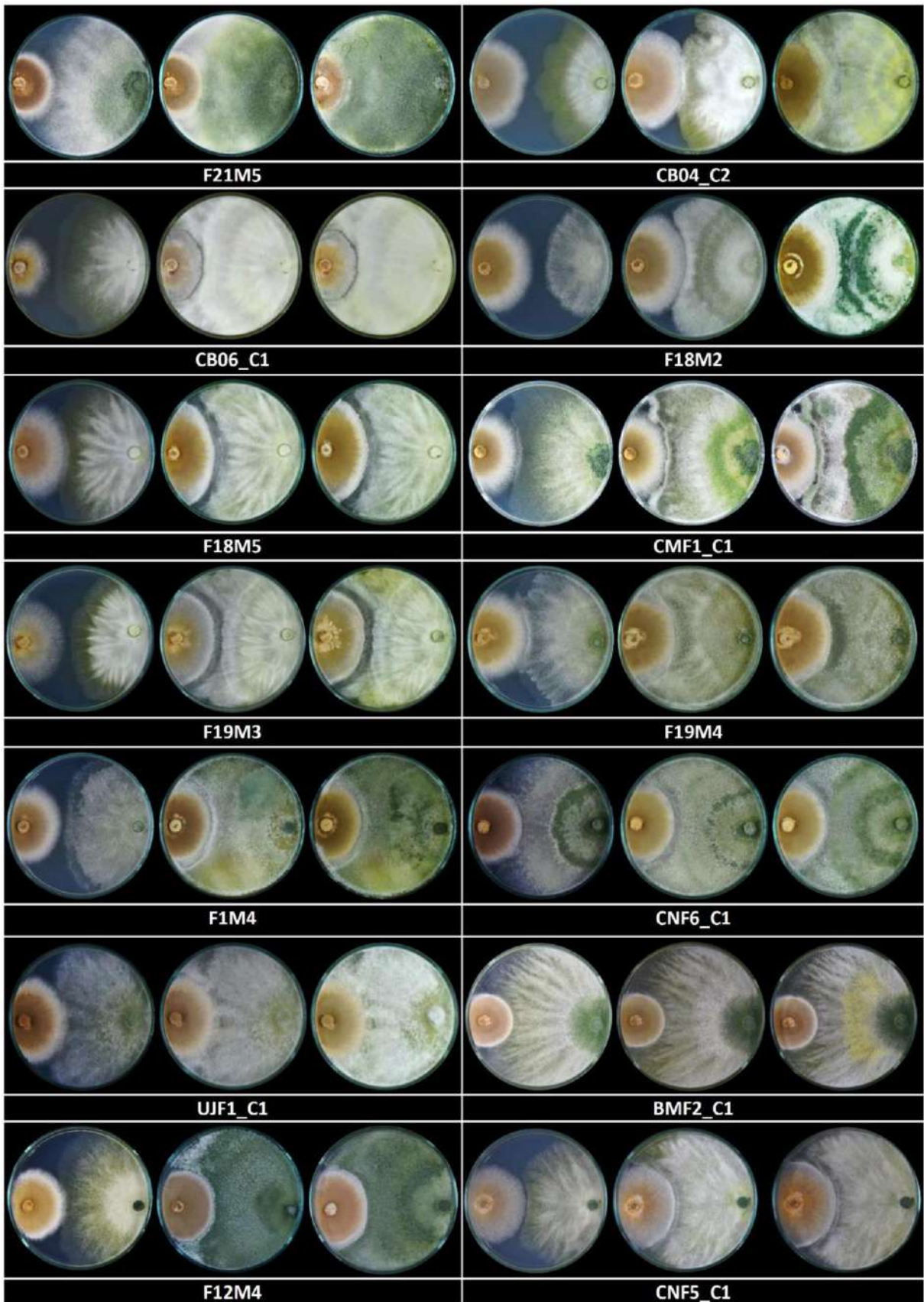


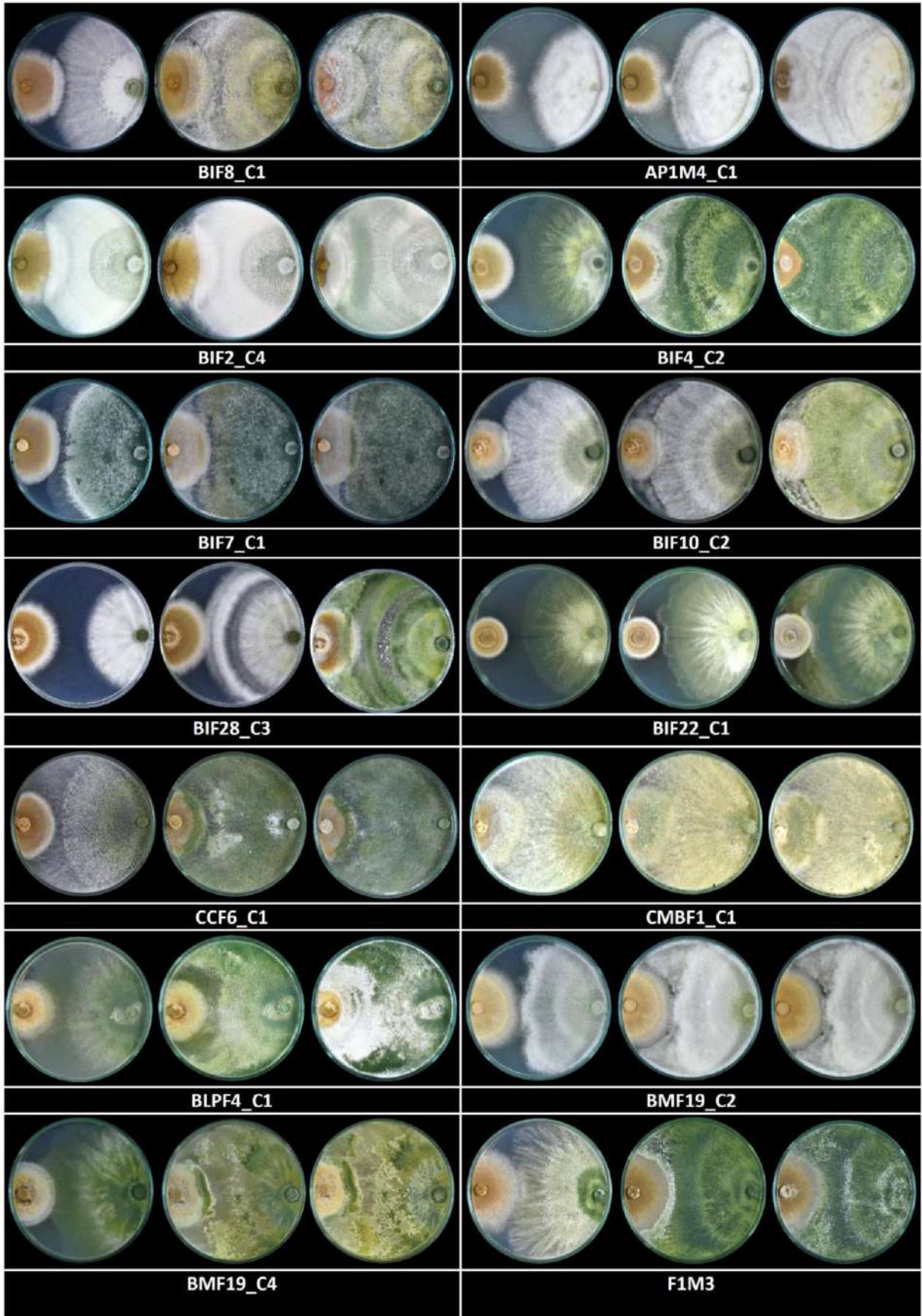


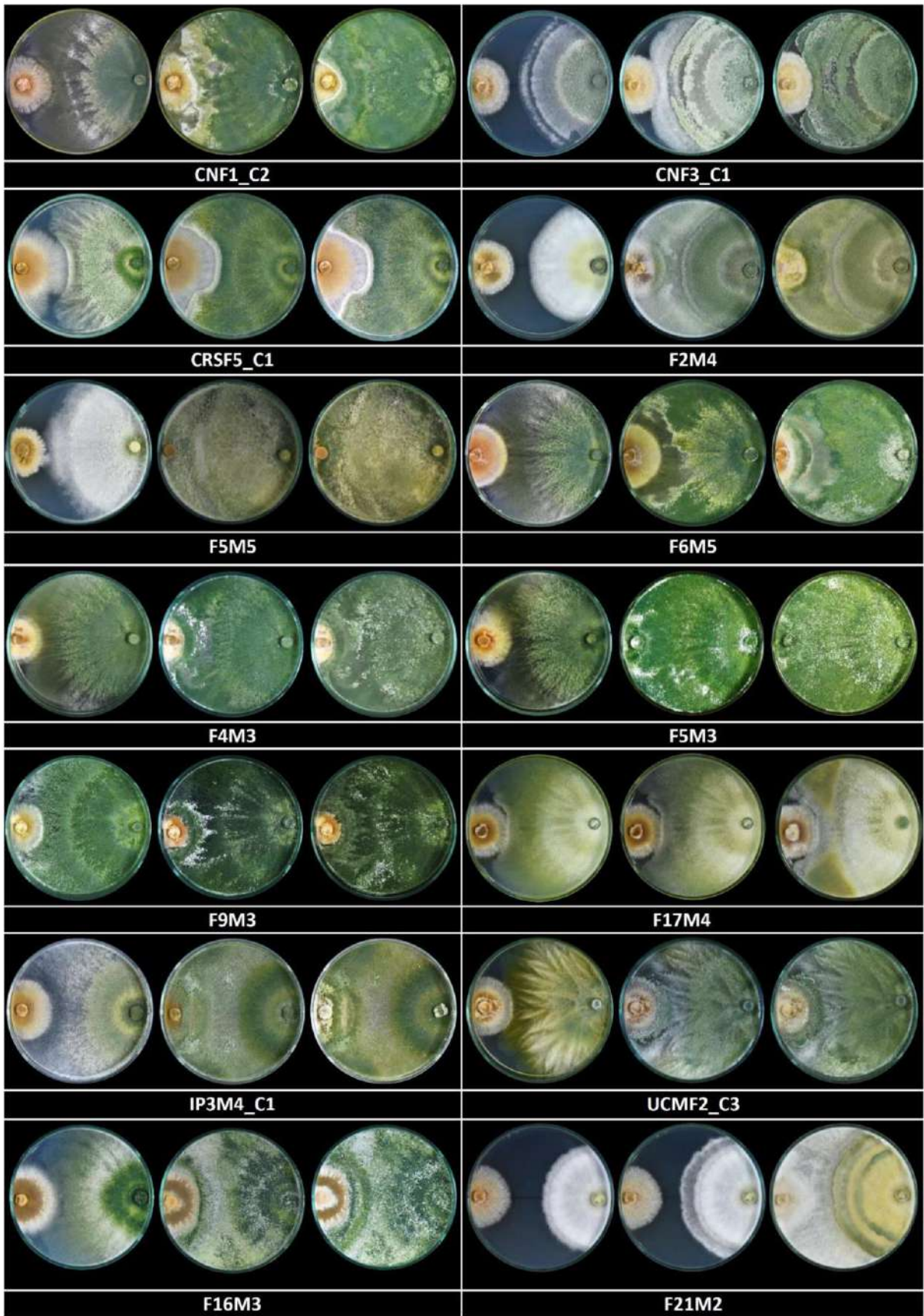
**Anexo 3. Antagonismo de 234 aislados sobre *M. royeri* Correspondiente a 19 especies del género *Trichoderma*, presentes en el Agroecosistema de cacao. Amazonas 2022**

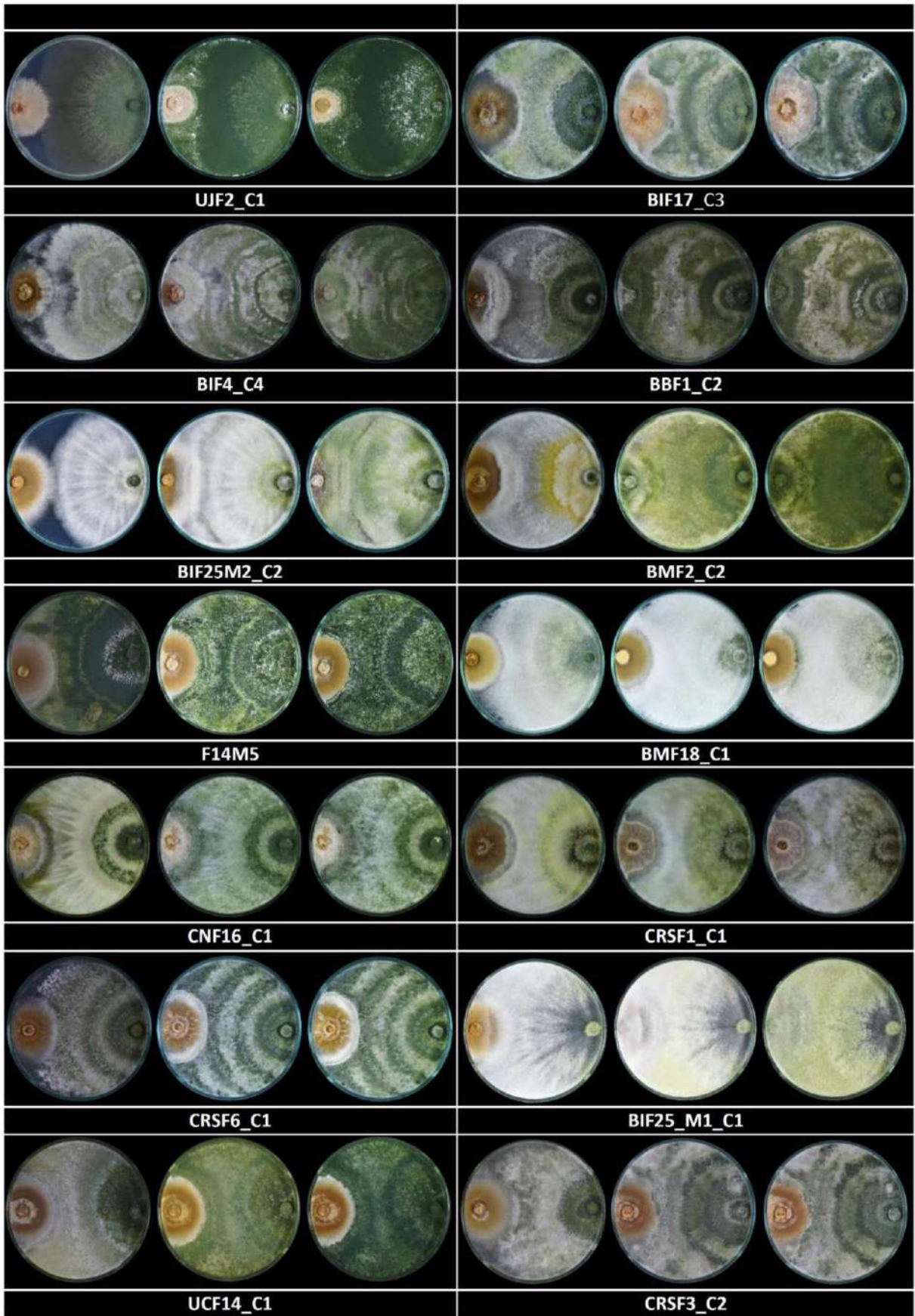


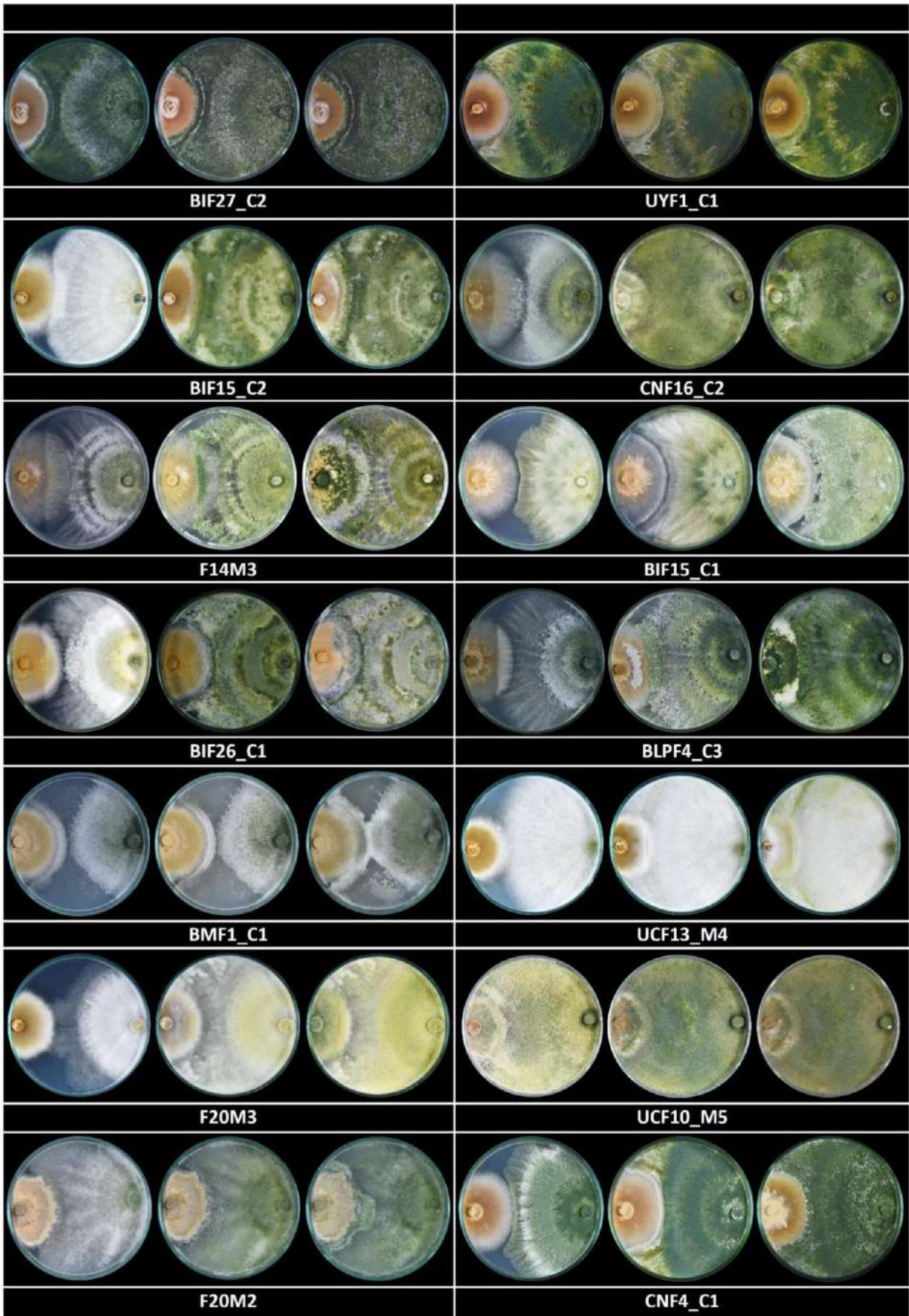




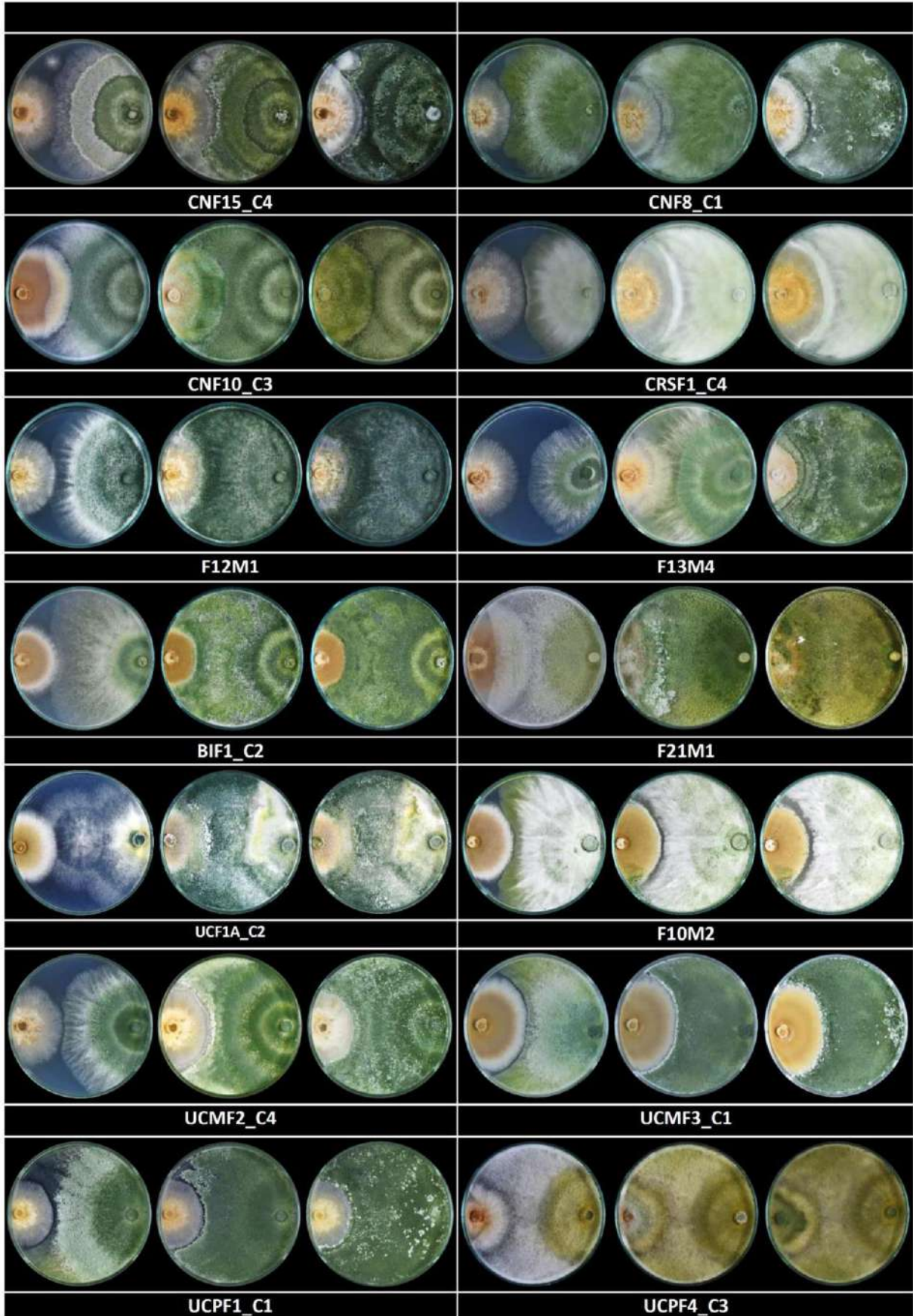


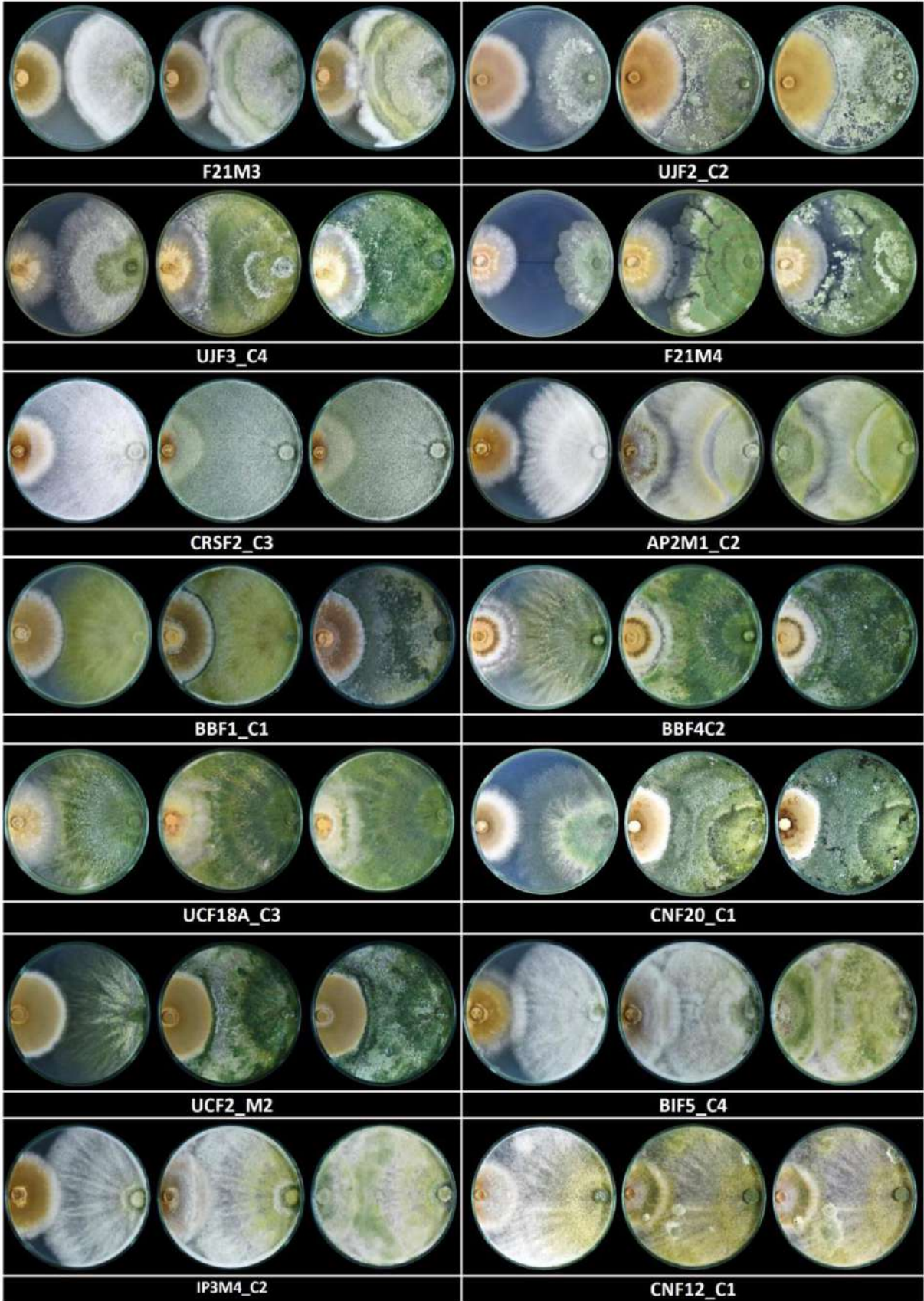


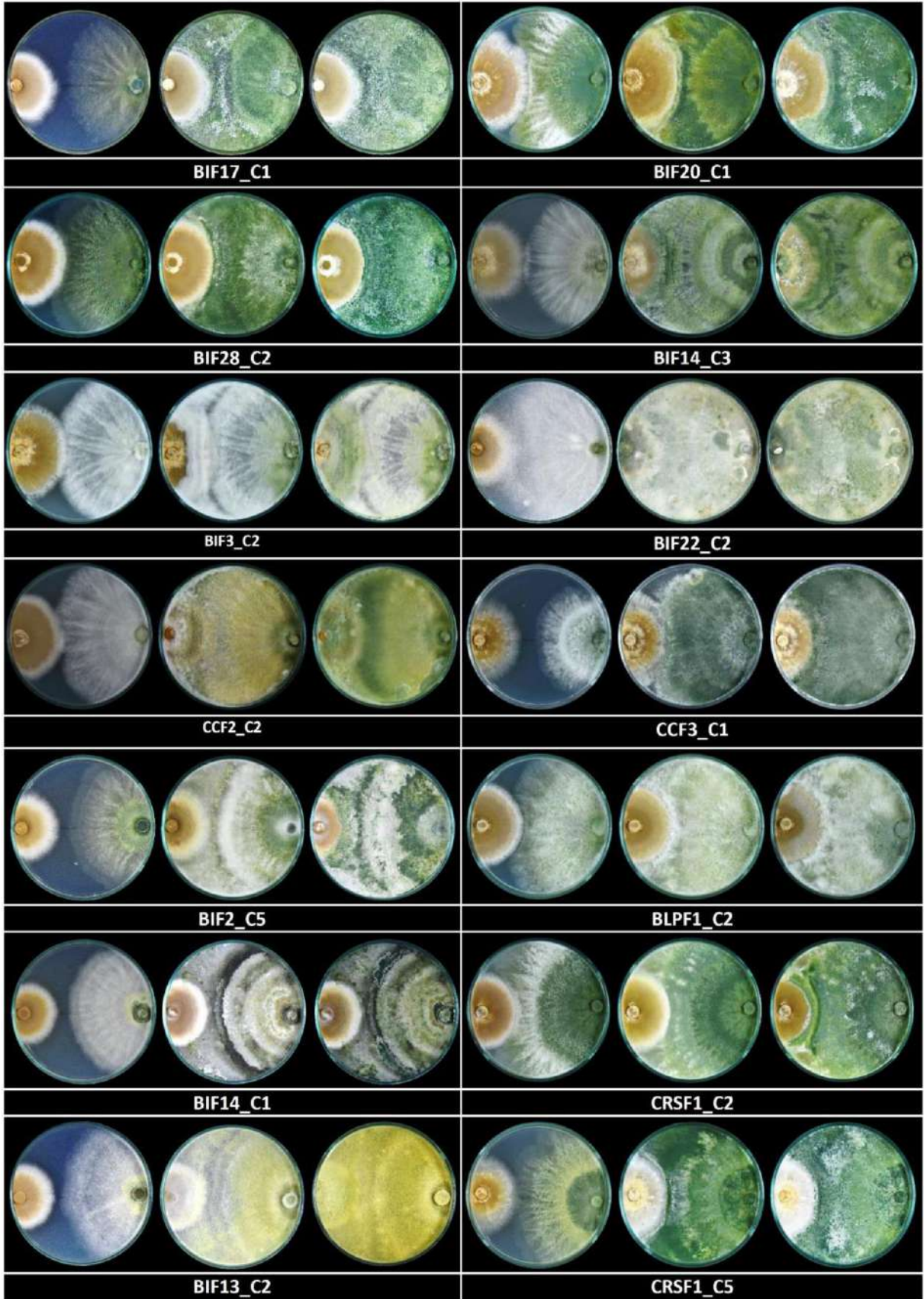


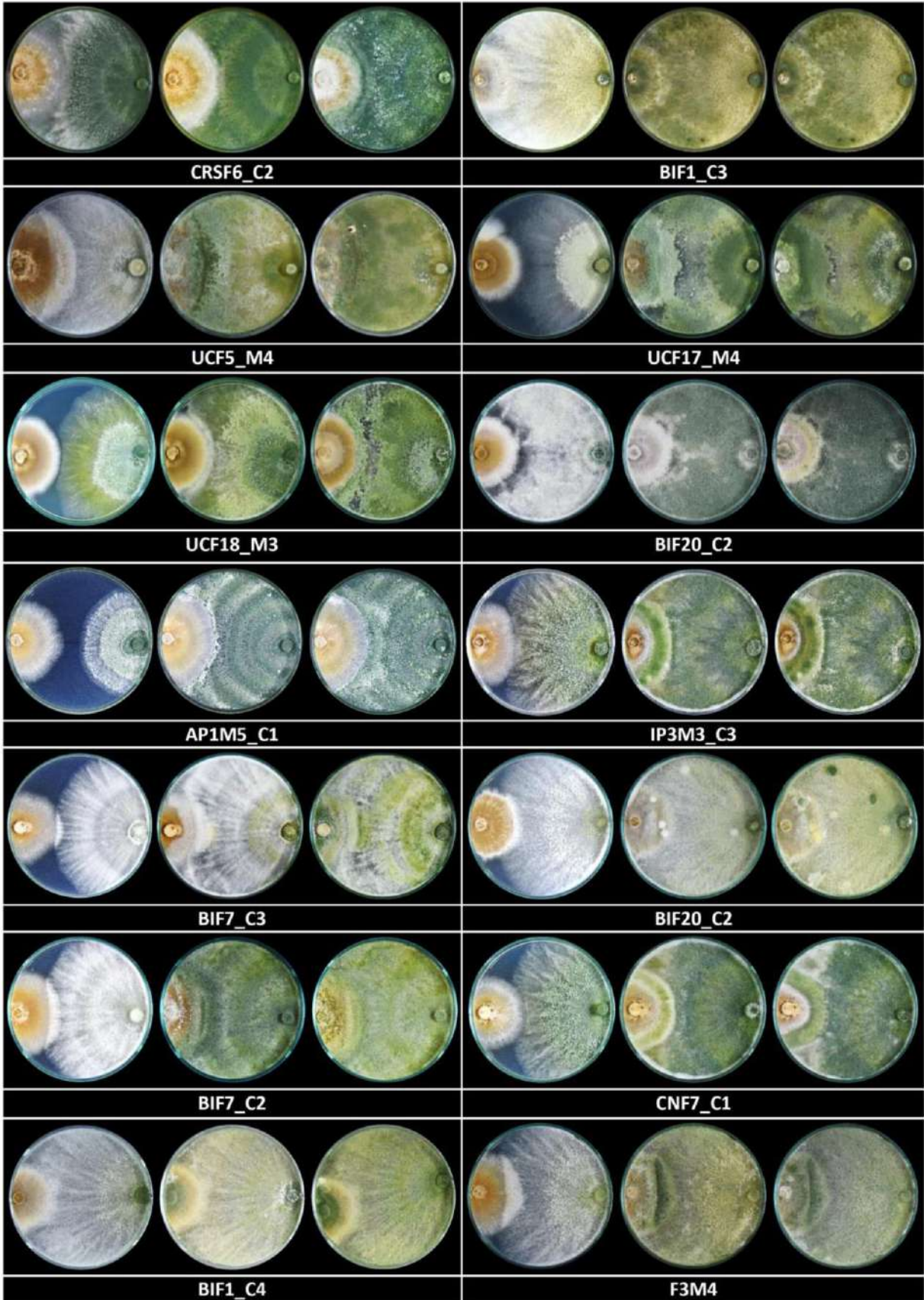


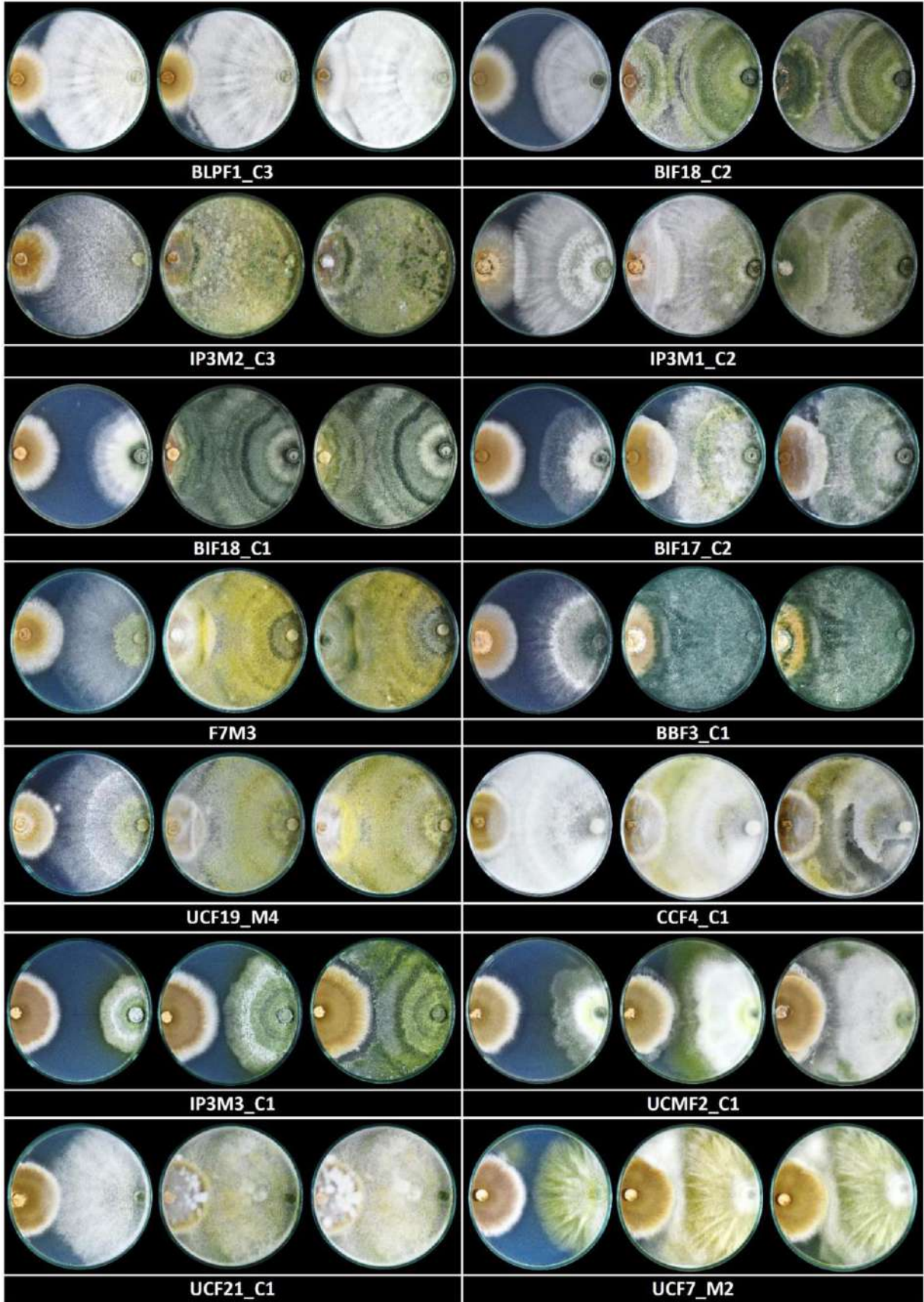


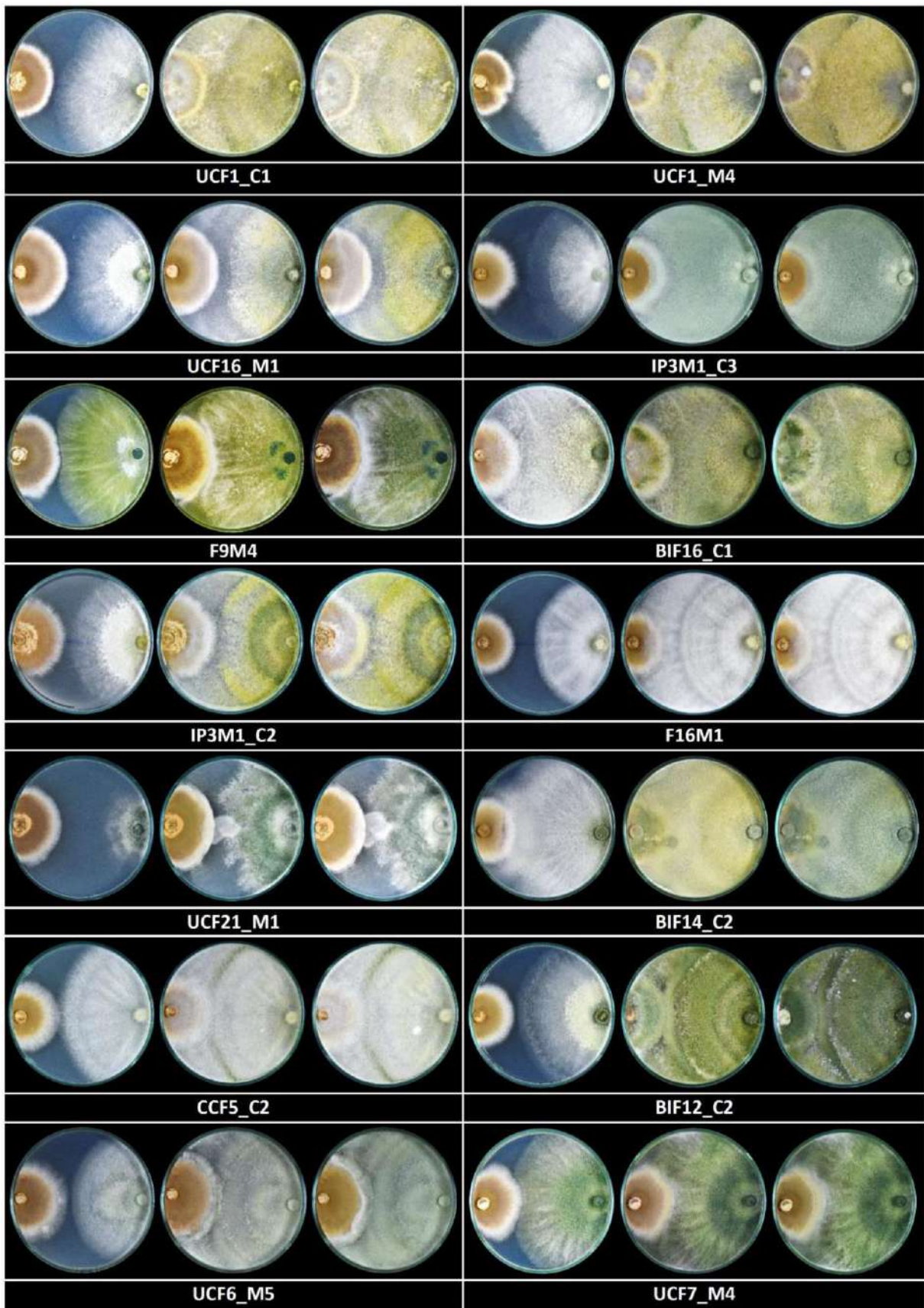


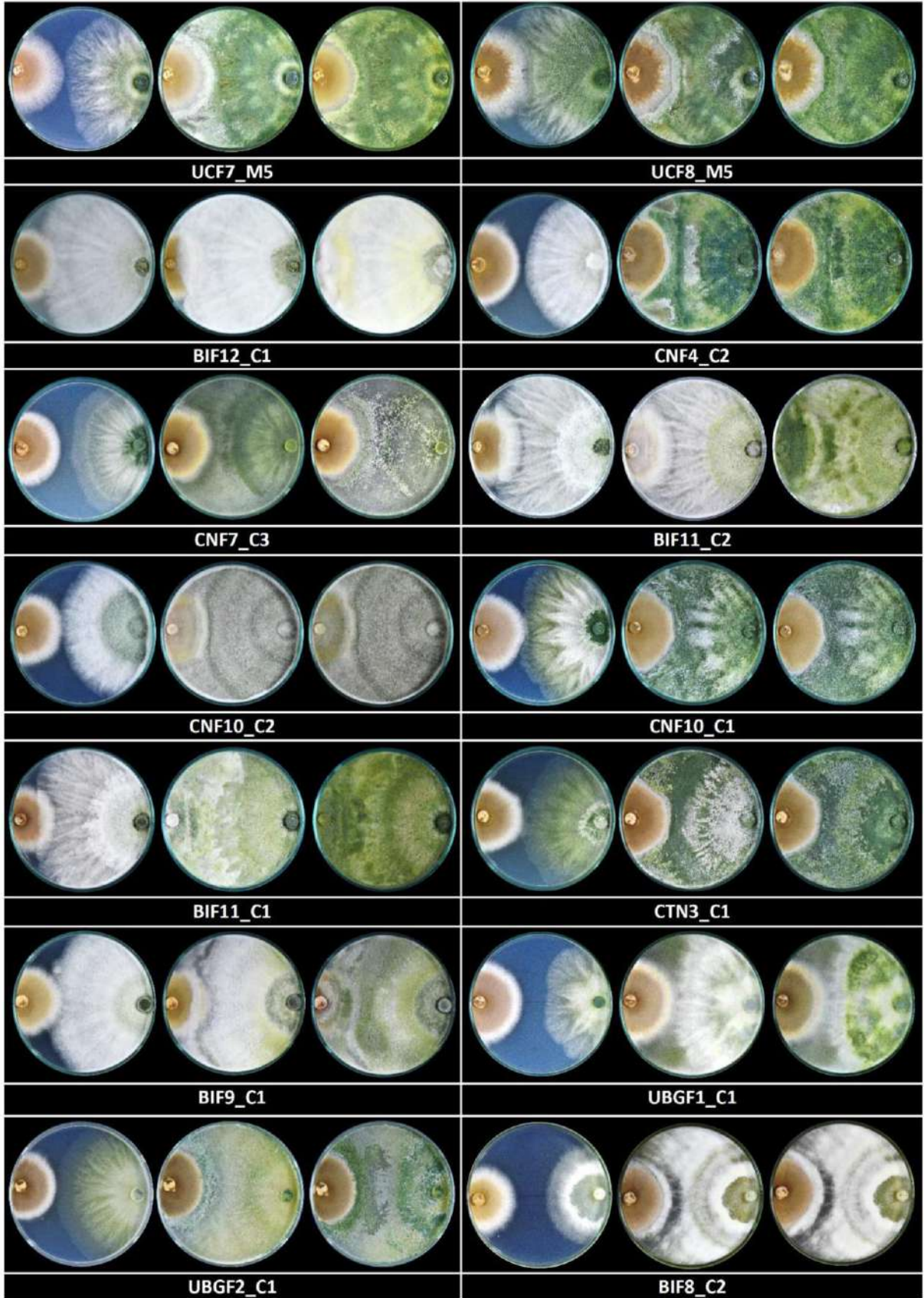


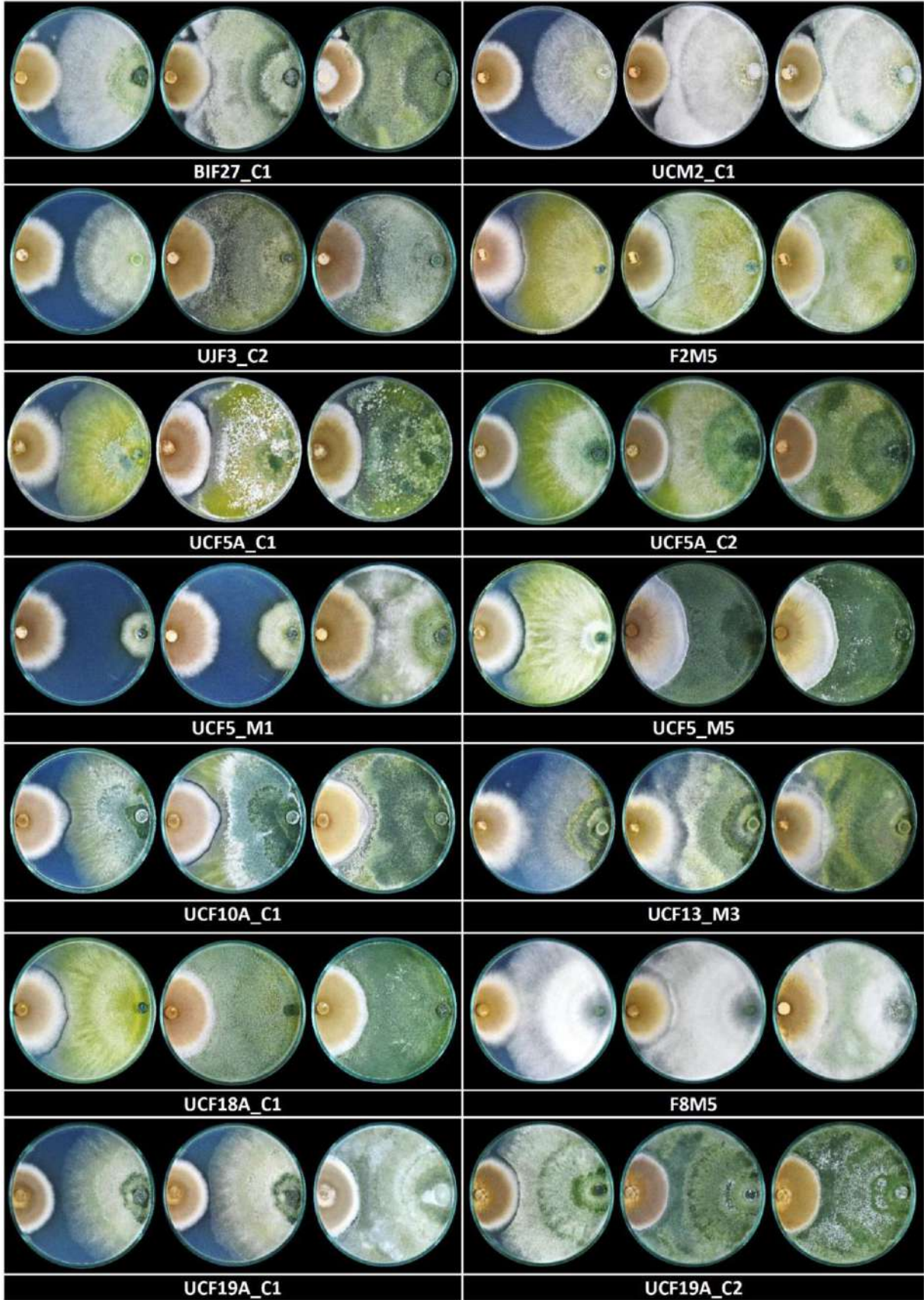




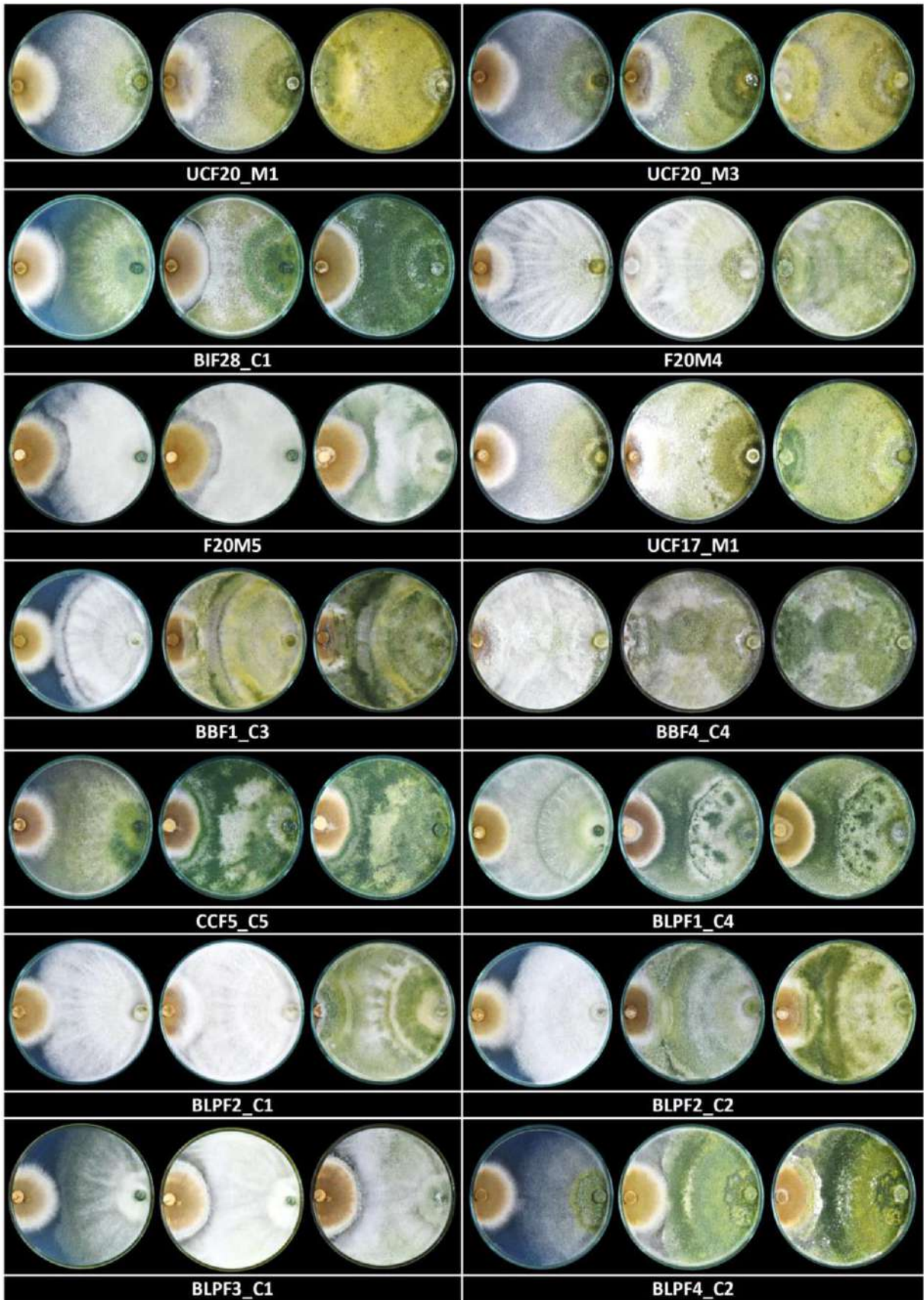


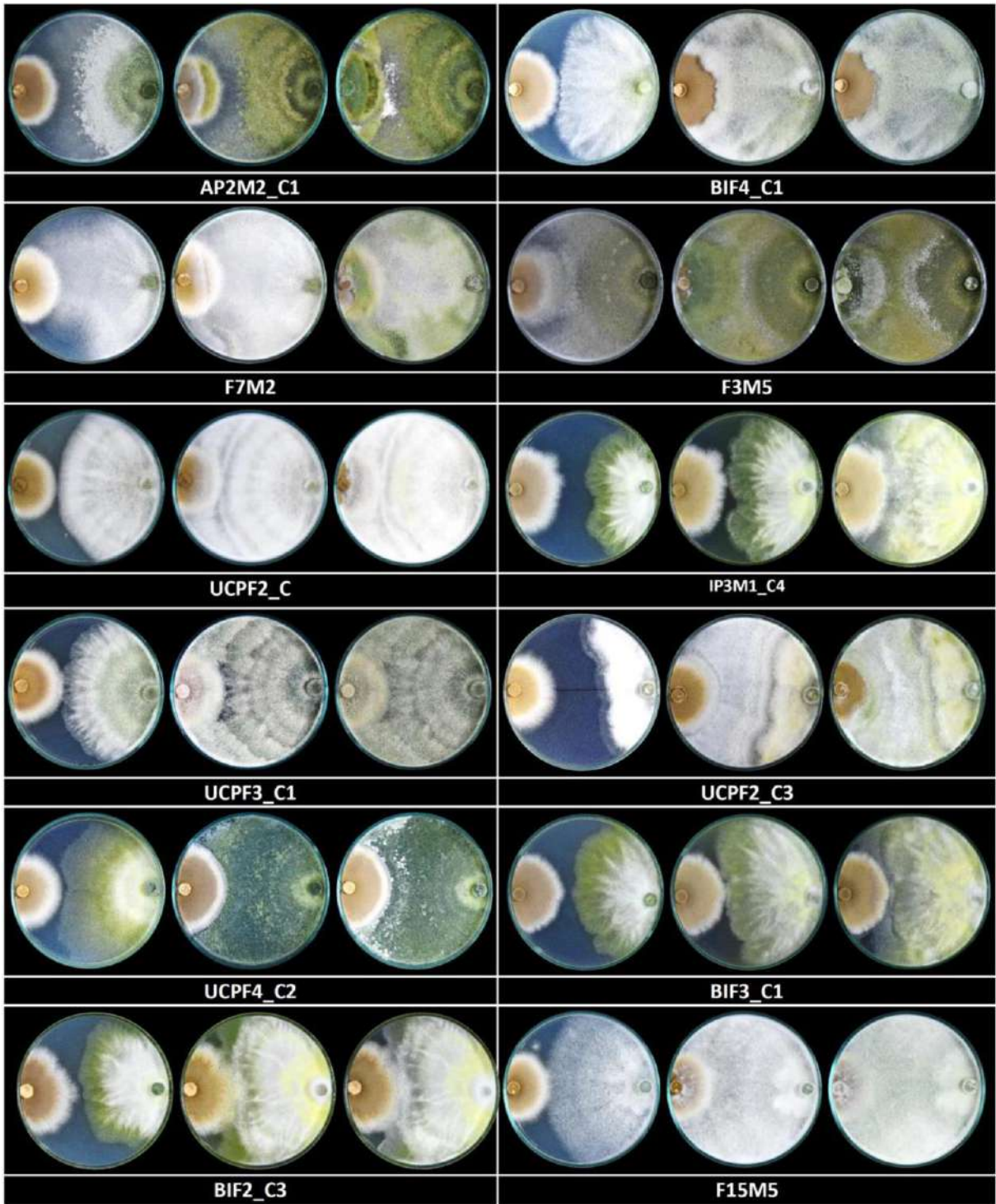




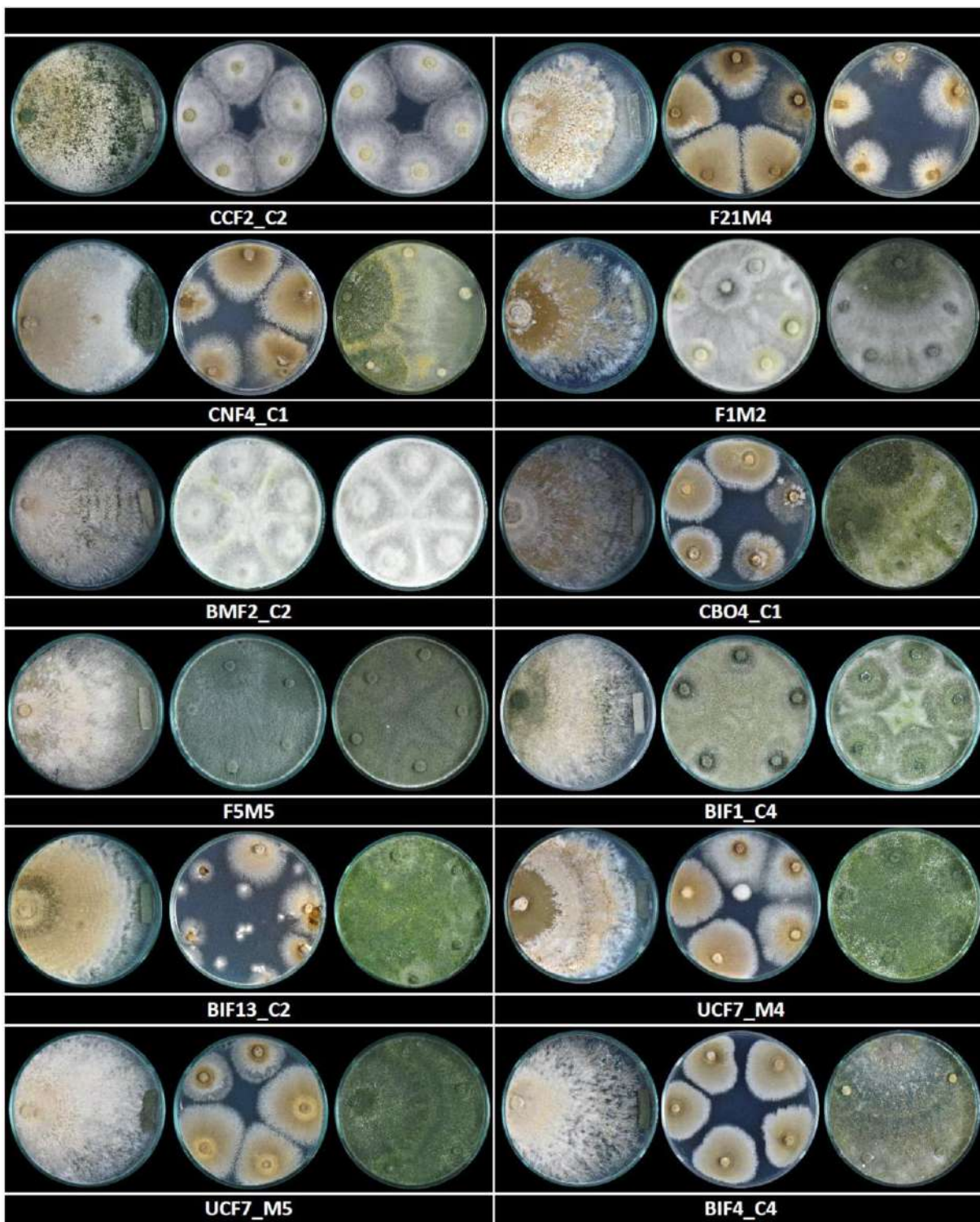


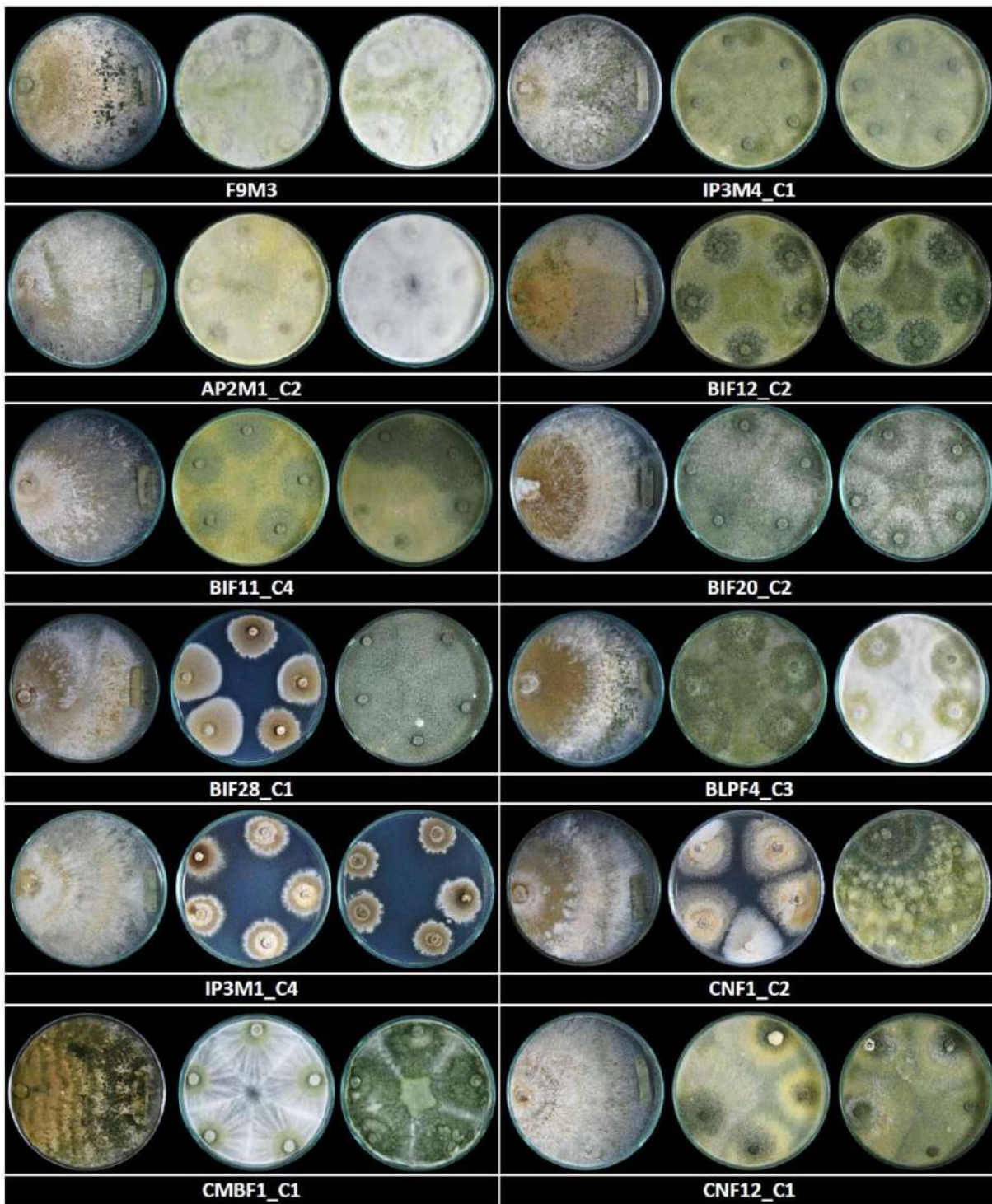


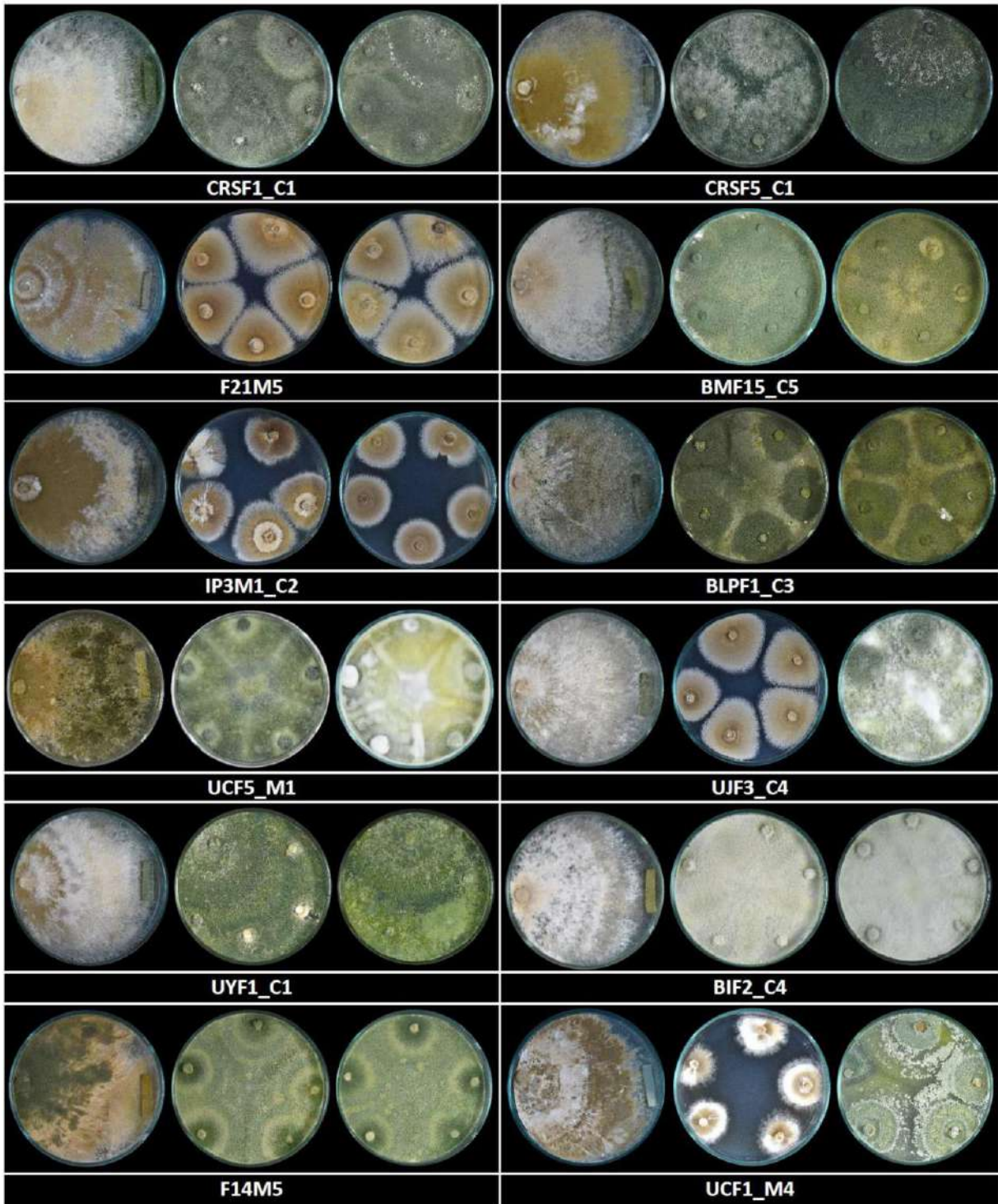




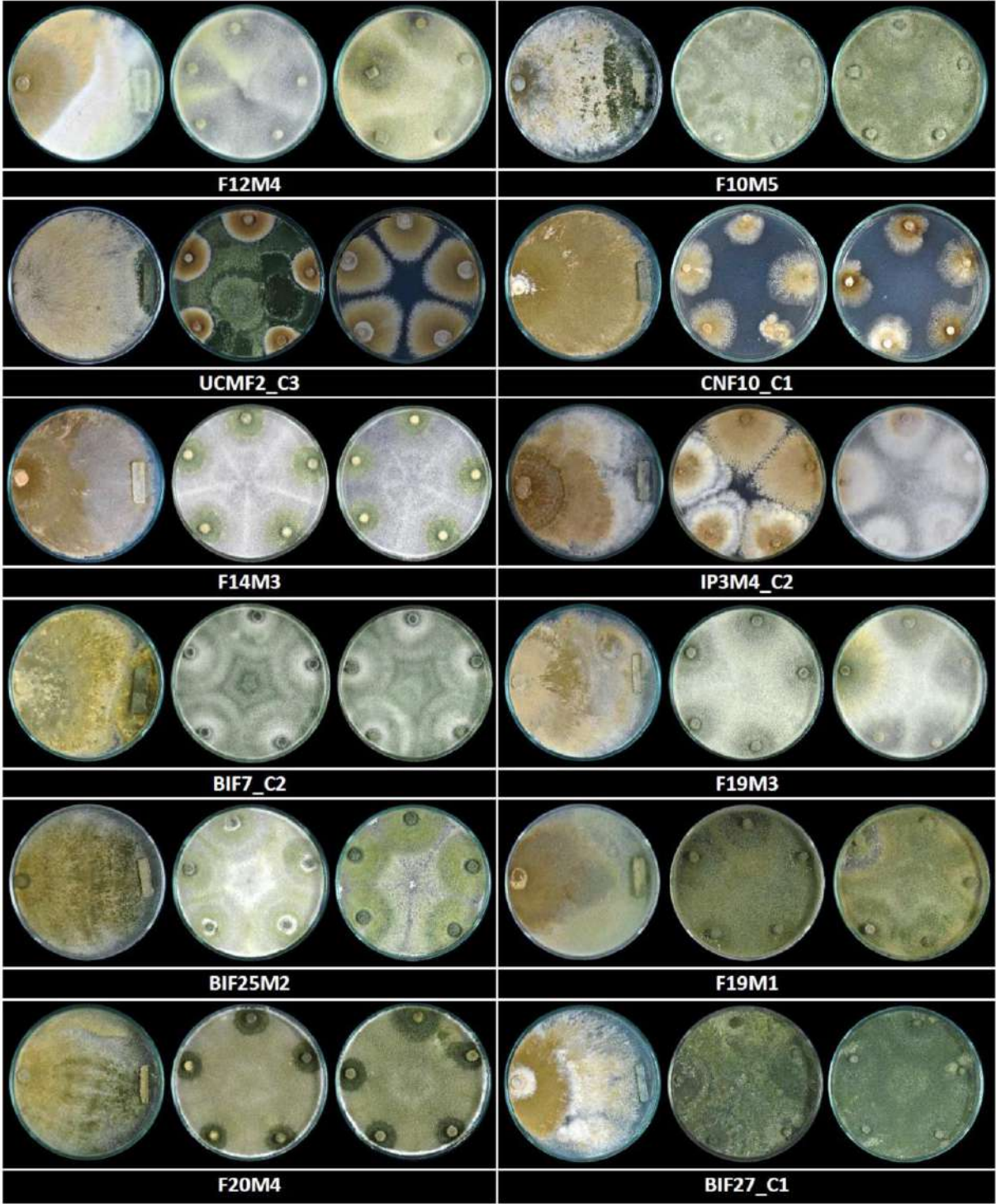
Anexo 4. Imágenes fotográficas para los niveles de micoparasitismo de 234 aislados del género *Trichoderma*, correspondiente a 19 especies del agroecosistema de cacao. Amazonas, Perú. (Placas precolonizadas, evaluadas 21 días después de colonización)

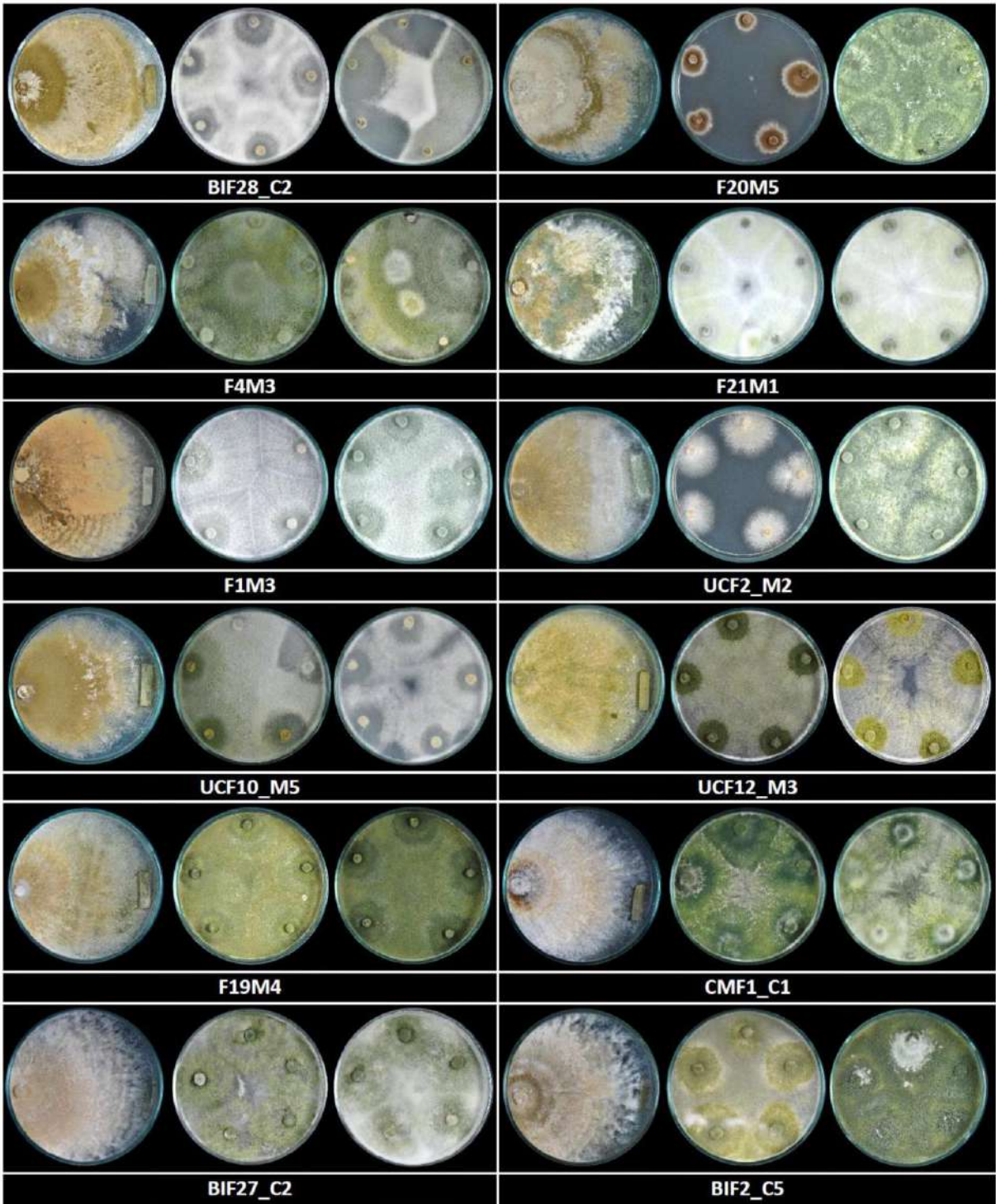








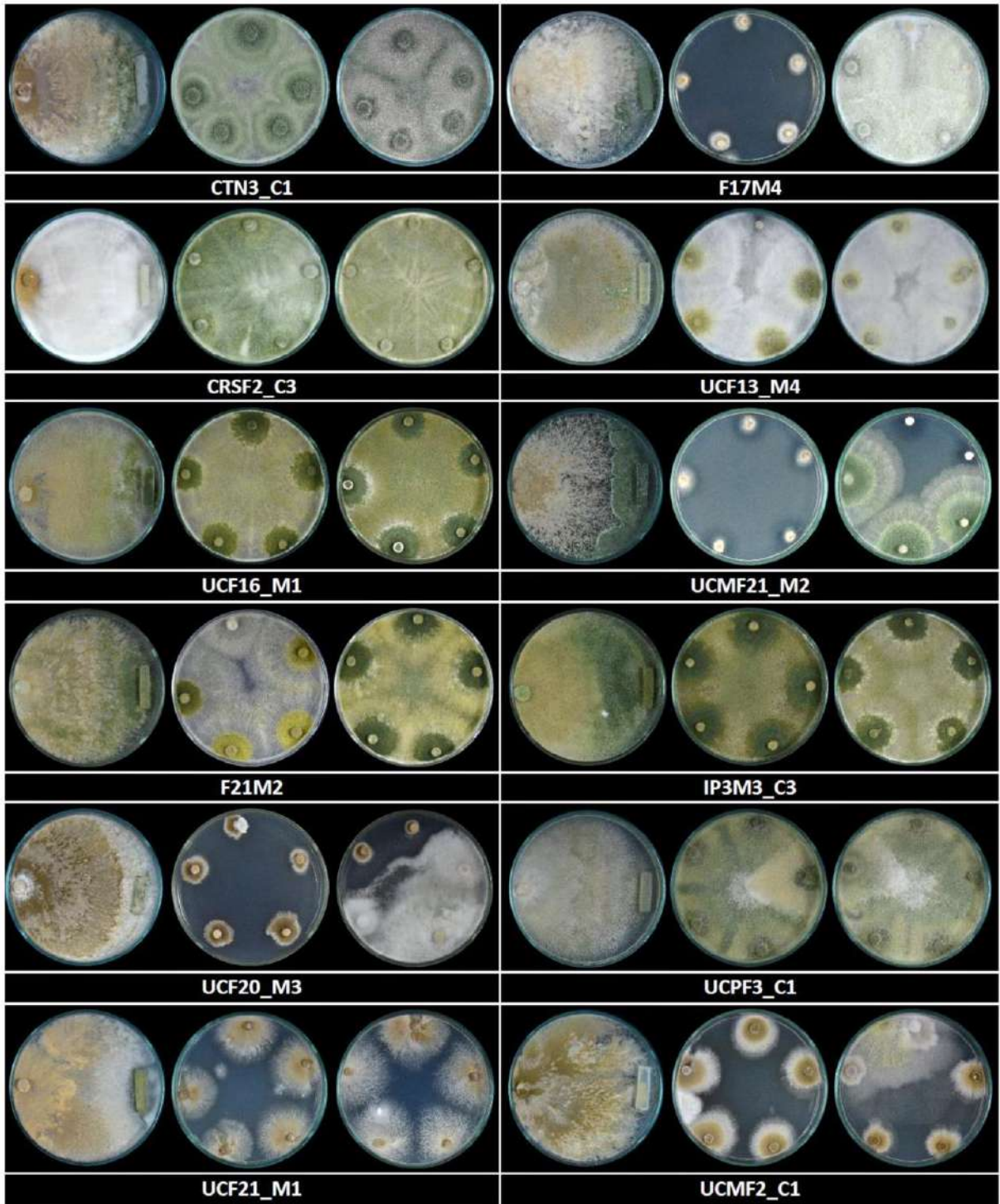










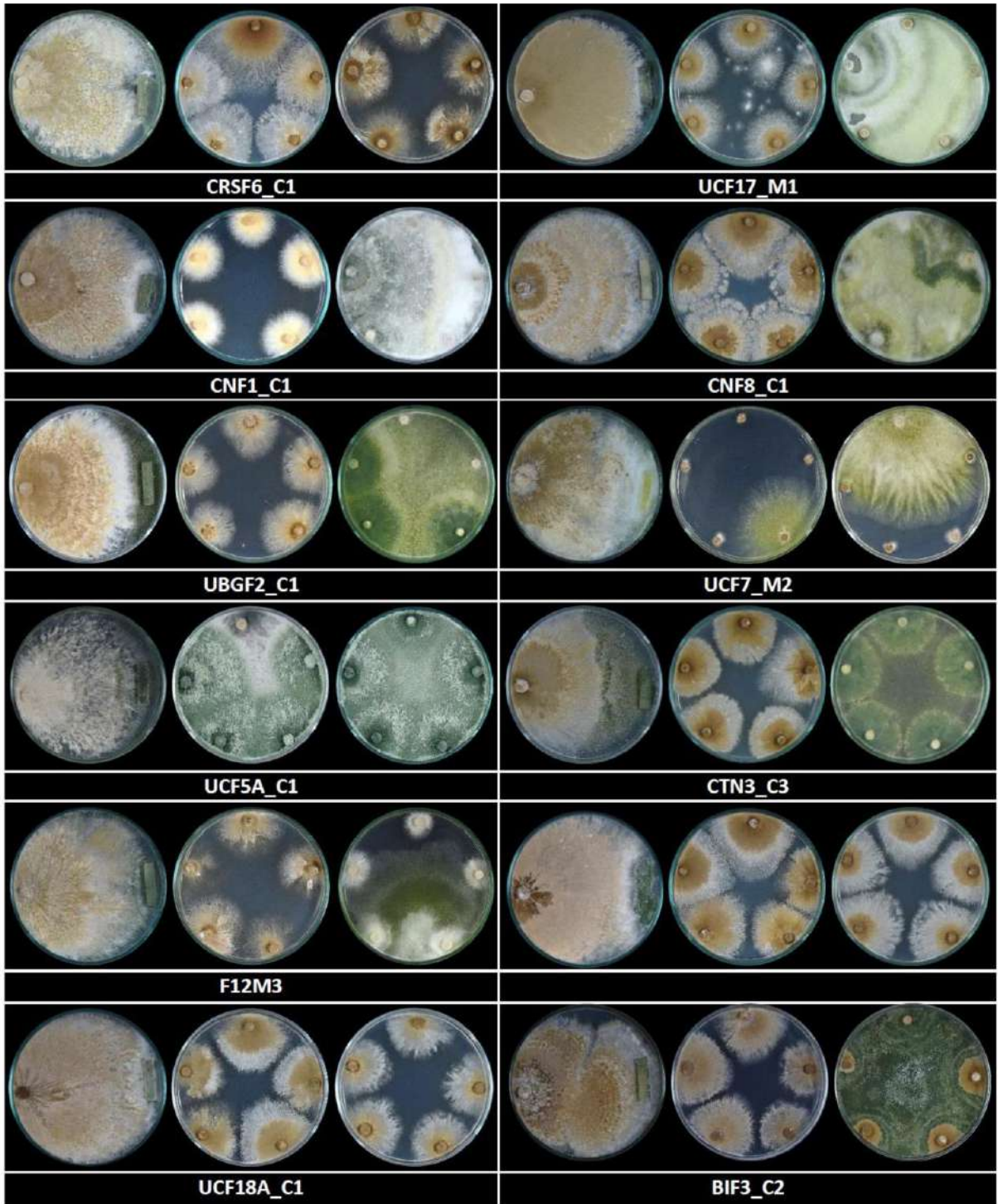




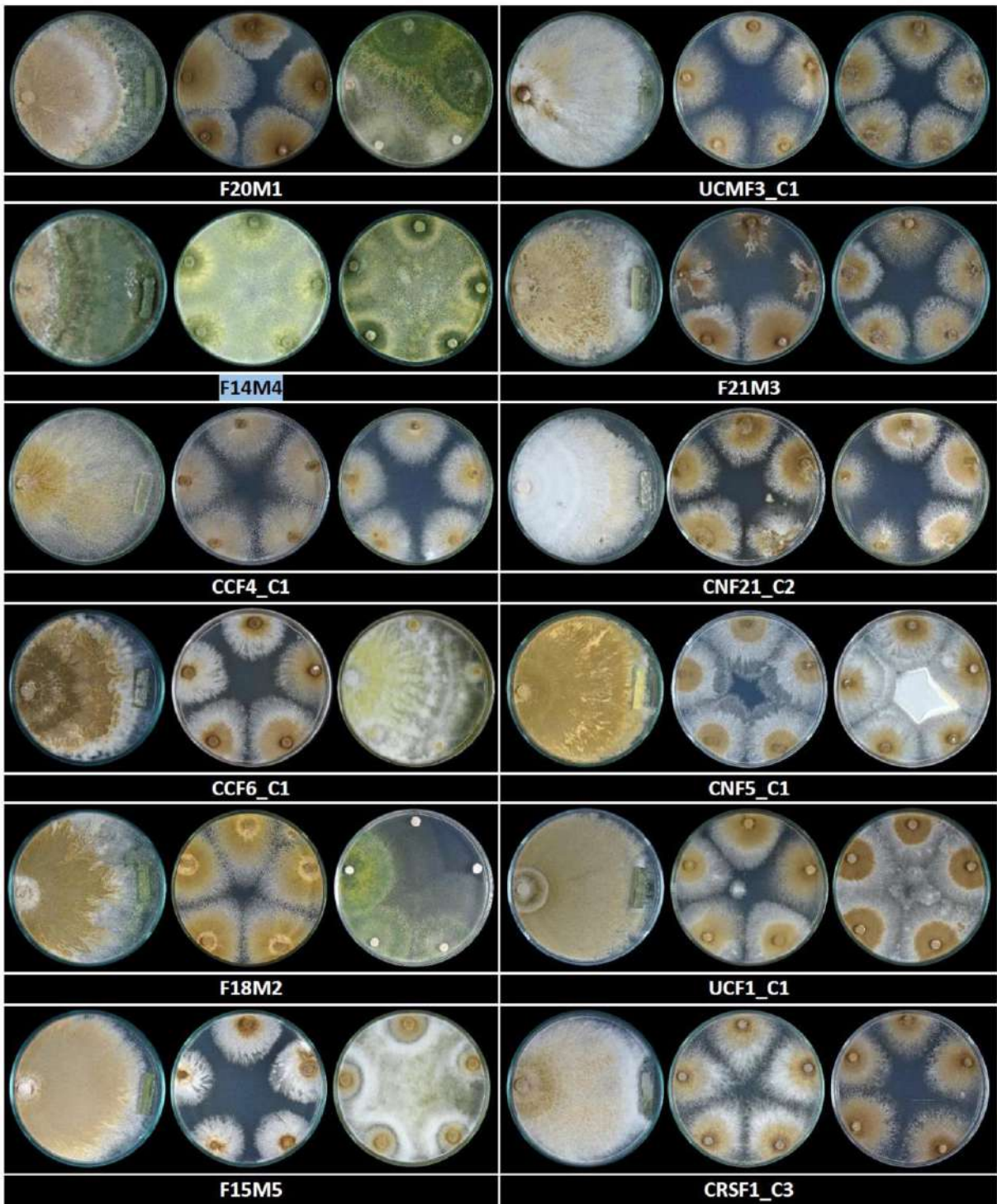


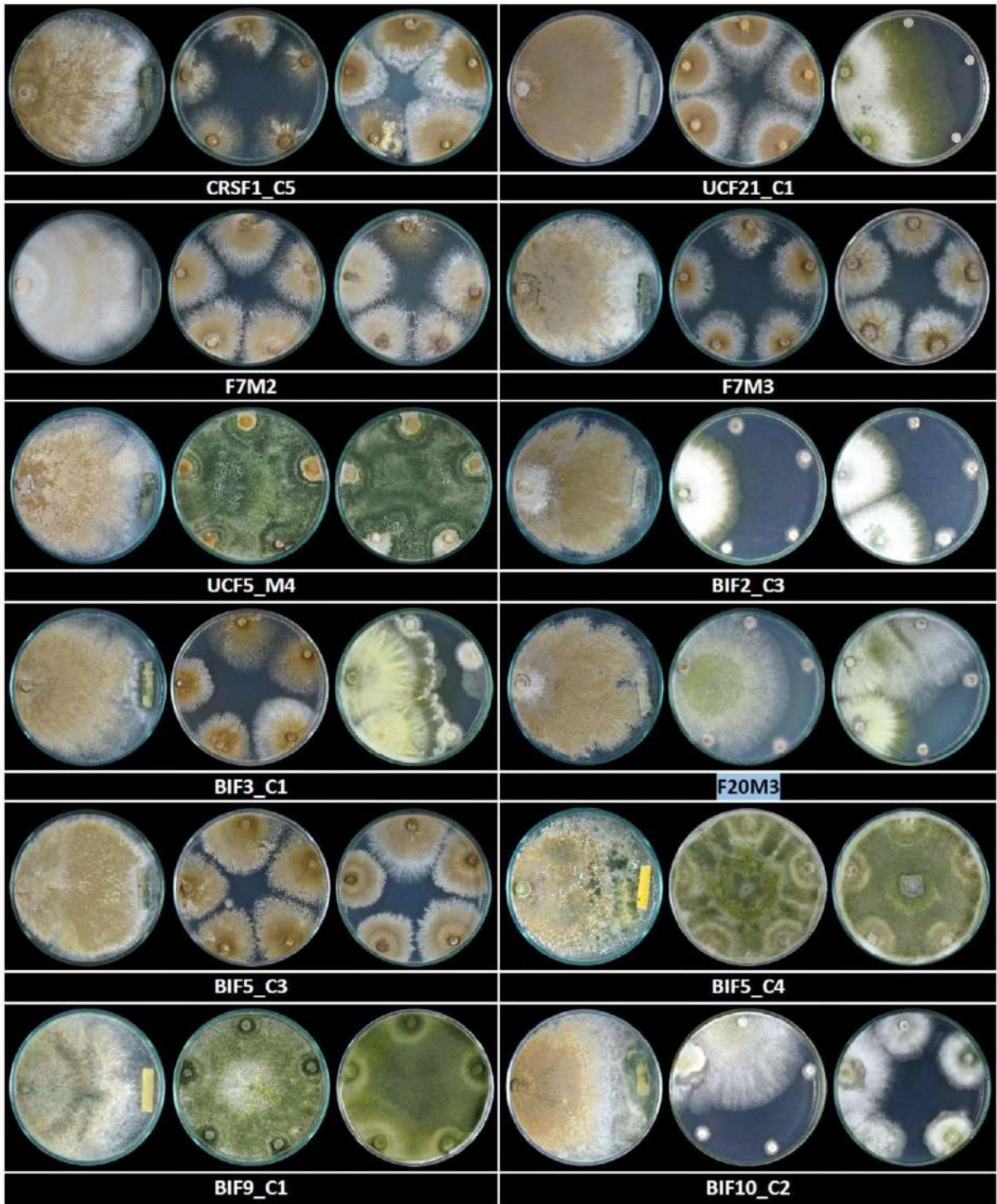


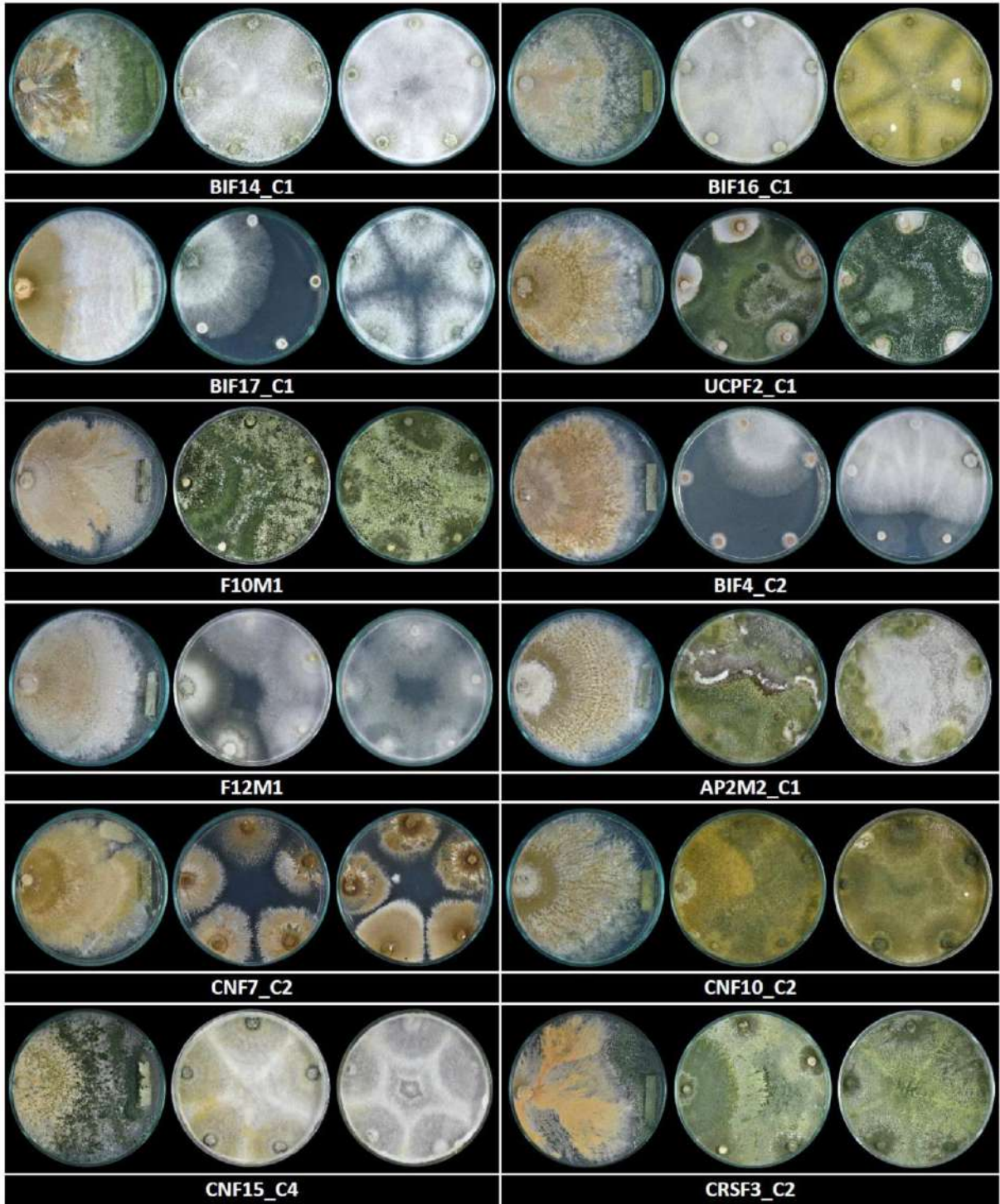


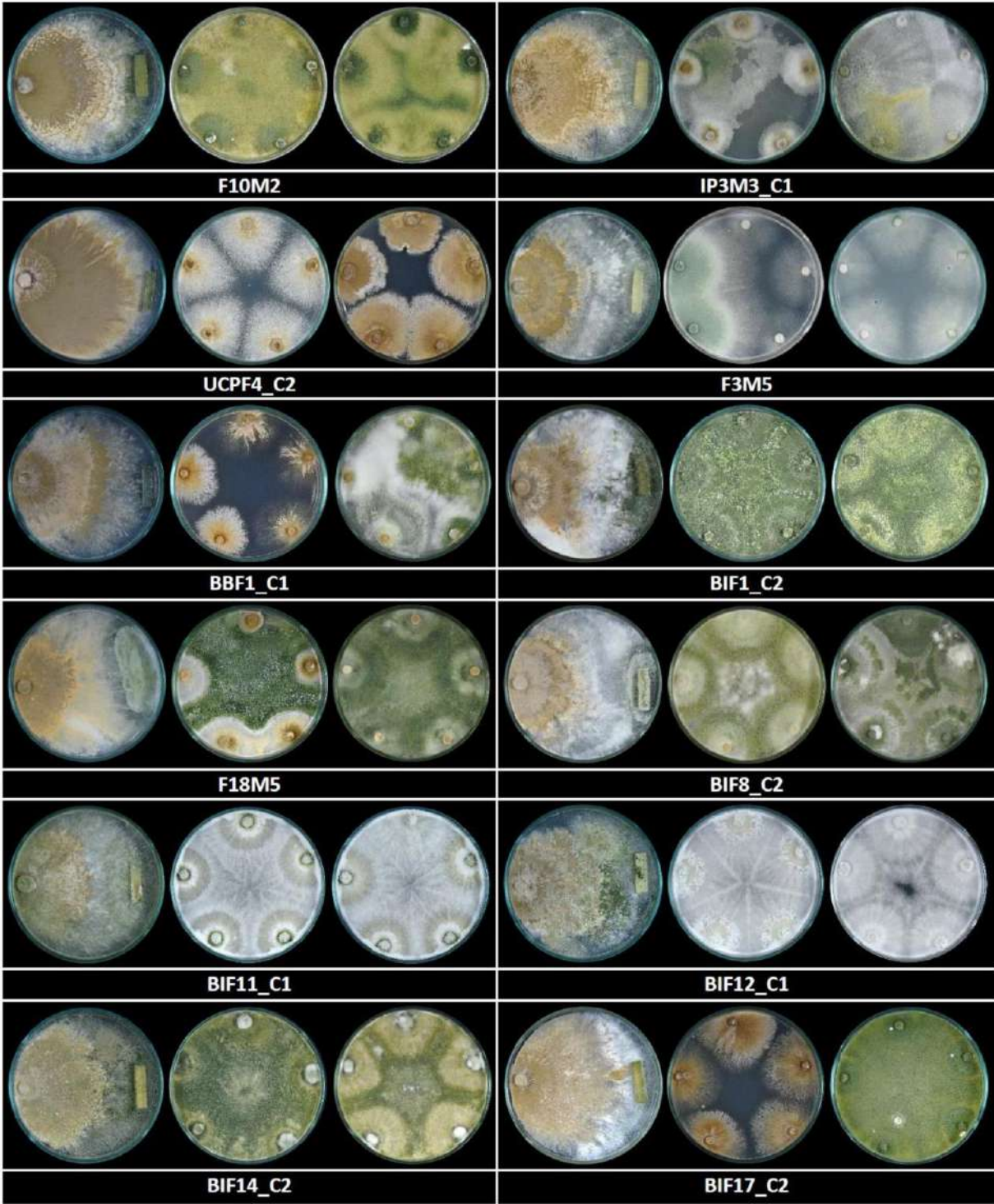


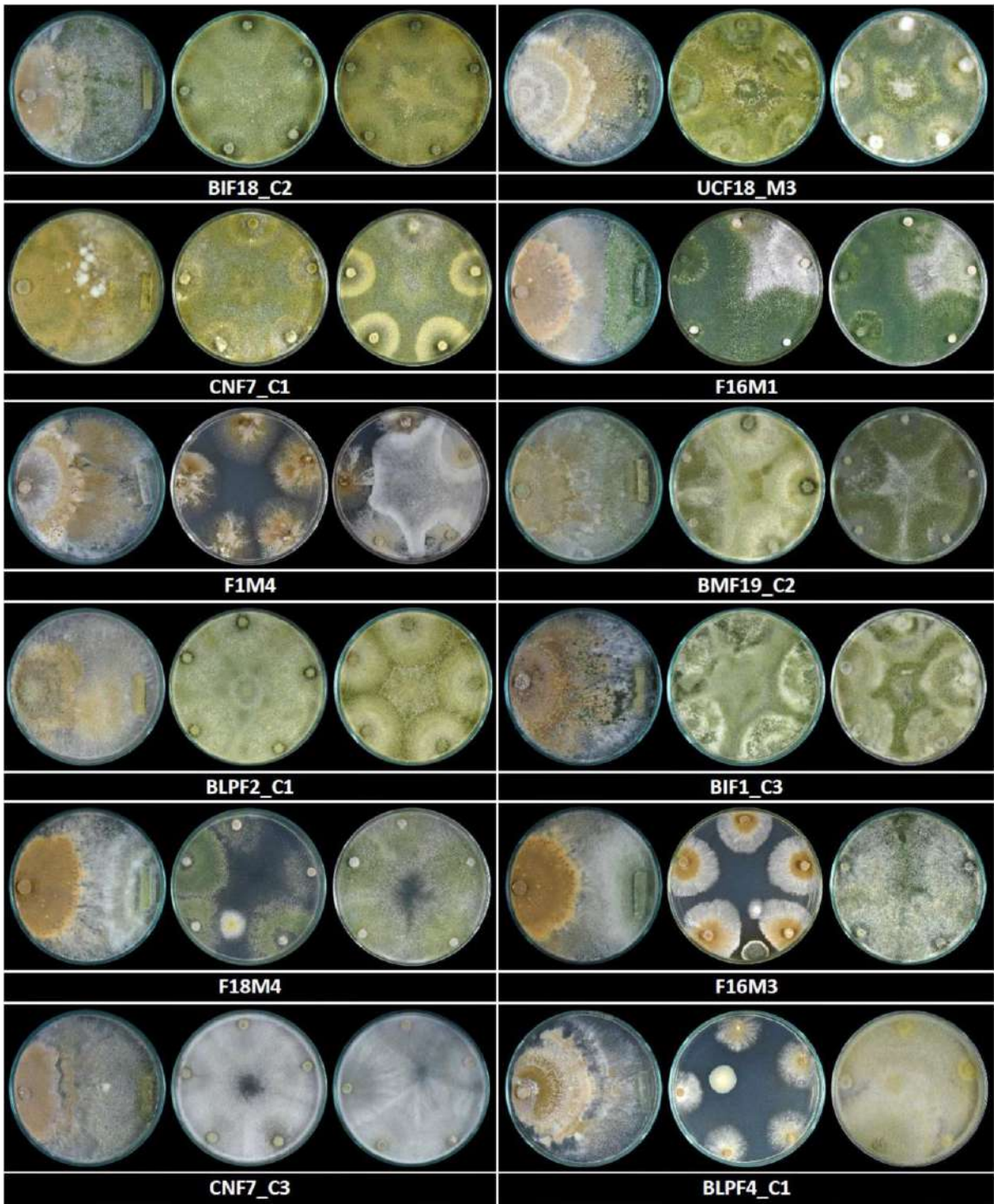


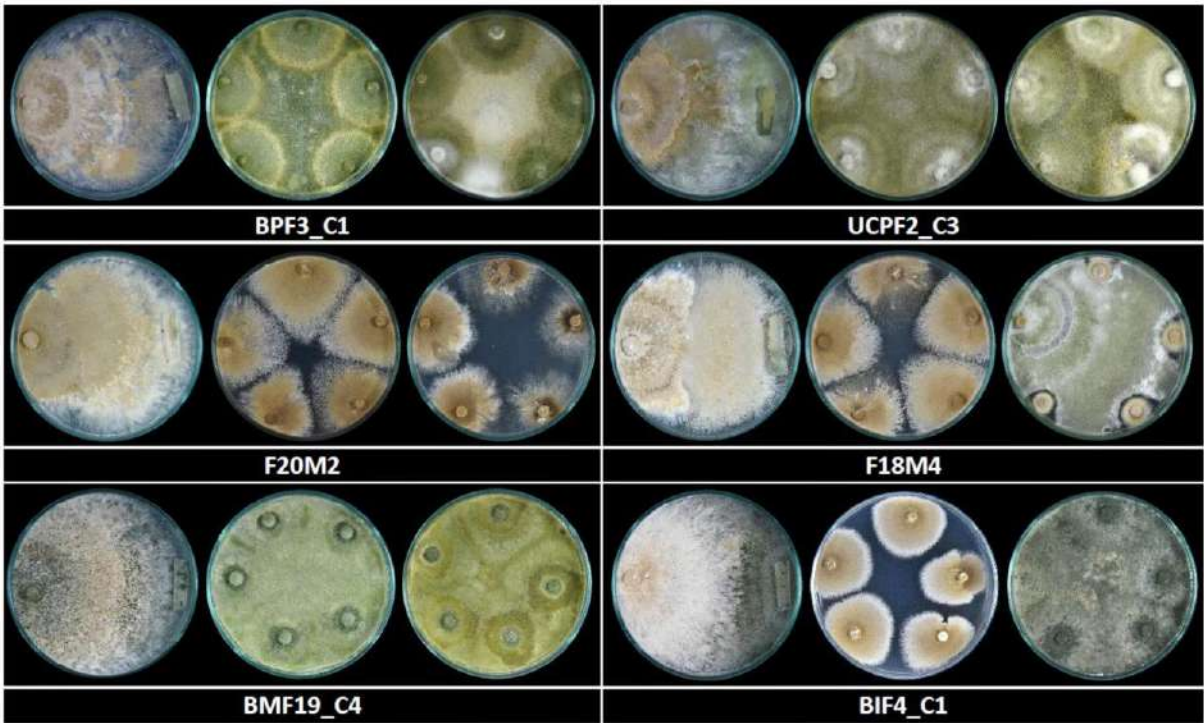












**Anexo 5. Cepas de referencia (types) para la identificación de especies del género *Trichoderma* protocolo de comparación de similitud por pares (Cai & Drizhinina 2021)**

Genus	Species_name	Authors	Year	Collection_name	Collection_code
<i>T.</i>	<i>protrudens</i>	Samuels & Chaverri	2008	CBS	121320
<i>T.</i>	<i>arundinaceum</i>	Zafari, Grunthan & Samuels	2008	CBS	119575
<i>H.</i>	<i>subcitrina</i>	Kalchbr. & Cooke	1880	J.A.C.	14420
<i>T.</i>	<i>brevicomactum</i>	Kraus, Kubicek & Gams	2004	CBS	109720
<i>T.</i>	<i>cornu-damae</i>	(Pat.) Zhu & Zhuang	2014	G.J.S.	6-Mar
<i>T.</i>	<i>turrialbense</i>	Samuels, Degenkolb, Nielsen & Gr	2008	CBS	112445
<i>T.</i>	<i>limonium</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	248751
<i>T.</i>	<i>grande</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	248749
<i>T.</i>	<i>rodmanii</i>	(Samuels & Chaverri) Jaklitsch & V	2014	CBS	120895
<i>T.</i>	<i>margaretense</i>	Jaklitsch	2011	CBS	120540
<i>T.</i>	<i>auranteffusum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	119284
<i>T.</i>	<i>aurantioeffusum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	119284
<i>T.</i>	<i>taxi</i>	Zhang, Lin & Kubicek	2007	CGMCC	1672
<i>T.</i>	<i>rubi</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	127380
<i>T.</i>	<i>hypoxylon</i>	Sun, Liu & Hyde	2016	CGMCC	3.17906
<i>T.</i>	<i>placentula</i>	Jaklitsch	2011	CBS	120924
<i>T.</i>	<i>foliicola</i>	(Jaklitsch & Voglmayr) Jaklitsch &	2014	CBS	130008
<i>T.</i>	<i>bavaricum</i>	Jaklitsch	2011	WU	29196a
<i>T.</i>	<i>atlanticum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	120632
<i>T.</i>	<i>europaeum</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	121276
<i>T.</i>	<i>mediterraneum</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	136469
<i>T.</i>	<i>minutisporum</i>	Bissett	1992	CBS	341.93
<i>T.</i>	<i>lacuwombatense</i>	(Lu, Druzhin. & Samuels) Jaklitsch	2014	CBS	122668
<i>T.</i>	<i>alutaceum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	120535
<i>T.</i>	<i>pachypallidum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	122126
<i>H.</i>	<i>coprosmae</i>	Dingley	1952	PDD	10453
<i>H.</i>	<i>pachybasioides</i>	Doi	1972	CBS	820.68
<i>T.</i>	<i>album</i>	Preuss	1851		
<i>T.</i>	<i>croceum</i>	Bissett	1992		
<i>T.</i>	<i>sporulosum</i>	(Link) Hughes	1958		
<i>T.</i>	<i>stellatum</i>	(Lu, Druzhin. & Samuels) Jaklitsch	2014		
<i>T.</i>	<i>polysporum</i>	(Link) Rifai	1969	CBS	820.68
<i>T.</i>	<i>sinoluteum</i>	Zhu & Zhuang	2015	HMAS	252868
<i>T.</i>	<i>pruinsum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	247217
<i>T.</i>	<i>parapiluliferum</i>	(Lu, Druzhin. & Samuels) Jaklitsch	2014	CBS	112771
<i>T.</i>	<i>piluliferum</i>	Webster & Rifai	1969	CBS	120927
<i>T.</i>	<i>luteffusum</i>	Jaklitsch	2011		
<i>T.</i>	<i>luteoeffusum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	120537
<i>T.</i>	<i>seppoi</i>	Jaklitsch	2008	CBS	122498
<i>T.</i>	<i>nybergianum</i>	(Ulvinen & Chamb.) Jaklitsch & Vo	2014	CBS	122500
<i>T.</i>	<i>leucopus</i>	Jaklitsch	2011	CBS	122499

<i>T.</i>	<i>medusae</i>	Samuels	2012	CBS	125719
<i>T.</i>	<i>caesareum</i>	Samuels	2012	CBS	124369
<i>T.</i>	<i>stromaticum</i>	Samuels & Pardo-Schulth.	2000	CBS	101875
<i>T.</i>	<i>lanuginosum</i>	Samuels	2012	CBS	125718
<i>T.</i>	<i>rossicum</i>	Bissett, Kubicek & Szakacs	2003	ATCC	MYA-4839
<i>T.</i>	<i>dimorphum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	247199
<i>T.</i>	<i>sichuanense</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248737
<i>T.</i>	<i>verticillatum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248740
<i>T.</i>	<i>hebeiense</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248743
<i>T.</i>	<i>vermipilum</i>	Samuels	2012	CBS	127103
<i>T.</i>	<i>barbatum</i>	Samuels	2012	CBS	125733
<i>T.</i>	<i>ivoriense</i>	Samuels	2012	CBS	125734
<i>T.</i>	<i>floccosum</i>	Samuels	2011	CBS	124372
<i>T.</i>	<i>hainanense</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248837
<i>T.</i>	<i>silvae-virgineae</i>	Jaklitsch	2011	CBS	120922
<i>T.</i>	<i>chlamydosporum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248850
<i>T.</i>	<i>chlamydosporicum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248850
<i>T.</i>	<i>tibetense</i>	Chen & Zhuang	2016	HMAS	245010
<i>T.</i>	<i>angustum</i>	Qin & Zhuang	2017	HMAS	273784
<i>T.</i>	<i>fasciculatum</i>	Bissett	1992		
<i>T.</i>	<i>strictipilis</i>	Bissett	1992		
<i>T.</i>	<i>strictipile</i>	Bissett	1992	CBS	347.93
<i>T.</i>	<i>gregarium</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248887
<i>T.</i>	<i>shennongjianum</i>	Chen & Zhuang	2016	HMAS	245009
<i>T.</i>	<i>longipilum</i>	Bissett	1992		
<i>T.</i>	<i>longipilis</i>	Bissett	1992		
<i>T.</i>	<i>cuenisporum</i>	Chaverri & Samuels	2003		
<i>T.</i>	<i>longipile</i>	Bissett	1991	CBS	120953
<i>T.</i>	<i>crystalligenum</i>	Qin & Zhuang	2017	HMAS	273783
<i>T.</i>	<i>tropicosinense</i>	(Liu) Zhu & Zhuang	2015	HMAS	252546
<i>T.</i>	<i>parestonicum</i>	Jaklitsch	2009	CBS	120636
<i>T.</i>	<i>ceramicum</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114576
<i>T.</i>	<i>estonicum</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	111147
<i>T.</i>	<i>ganodermais</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248856
<i>H.</i>	<i>dichromospora</i>	Doi	1968	CBS	337.69
<i>T.</i>	<i>phyllostachydis</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114071
<i>T.</i>	<i>bomiense</i>	Zhang & Zhuang	2019	W.Z.	2018a
<i>T.</i>	<i>polypori</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248855
<i>T.</i>	<i>stramineum</i>	Chaverri & Samuels	2003	BPI	843667
<i>T.</i>	<i>longifialidicum</i>	Montoya, Meirelles, Chaverri & R	2016	CBS	139785
<i>T.</i>	<i>velutinum</i>	Bissett, Kubicek & Szakacs	2003	DAOM	230013
<i>T.</i>	<i>cinnamomeum</i>	Chaverri & Samuels	2003	G.J.S.	97-237
<i>T.</i>	<i>pinicola</i>	Oh, Park, & Lim	2019	KACC	48486
<i>T.</i>	<i>simplex</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248842
<i>T.</i>	<i>catoptron</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114232
<i>T.</i>	<i>pseudogelatinosa</i>	(Komatsu & Doi) Kim	2012		
<i>T.</i>	<i>pseudogelatinosur</i>	(Komatsu & Doi) Kim	2017	TUFC	60186



T.	<i>hirsutum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248834
T.	<i>hausknechtii</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	133493
T.	<i>ceraceum</i>	Chaverri & Samuels	2003	BPI	843654
T.	<i>peberdyi</i>	Valadares-Inglis & Inglis	2020	CEN	1426
T.	<i>cerinum</i>	Bissett, Kubicek & Szakonyi	2003	DAOM	230012
T.	<i>linzhiense</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248846
T.	<i>viridulum</i>	Qin & Zhuang	2017	HMAS	273865
T.	<i>koreanum</i>	Oh, Park & Lim	2019	SFC	20131005-S066
T.	<i>tomentosum</i>	Bissett	1992	CBS	349.93
T.	<i>rugulosum</i>	Park, Oh & Lim	2019	SFC	20180301-001
T.	<i>inhamatum</i>	Veerkamp & Gams	1983	CBS	273.78
T.	<i>rifaii</i>	Rocha, Chaverri & Samuels	2015	CBS	130746
T.	<i>pyramidale</i>	Jaklitsch & Chaverri	2015	CBS	135574
T.	<i>atrobrunneum</i>	Rocha, Chaverri & Jaklitsch	2015	CBS	548.92
T.	<i>corneum</i>	(Pat.) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	100541
T.	<i>lentiforme</i>	(Rehm) Chaverri, Samuels & Rocha	2015	CBS	100542
T.	<i>breve</i>	Chen & Zhuang	2017	CGMCC	3.18398
T.	<i>bannaense</i>	Chen & Zhuang	2017	CGMCC	3.18394
T.	<i>zeloharzianum</i>	Yu & Du	2018	CGMCC	3.19082
T.	<i>afarasin</i>	Chaverri & Rocha	2015	CBS	130755
T.	<i>endophyticum</i>	(Jaklitsch, Párdmaa & Samuels) Ja	2015	CBS	130729
T.	<i>azevedoi</i>	Valadares-Inglis & Inglis	2020	CEN	1422
T.	<i>pollinicola</i>	Liu & Cai	2018	CGMCC	3.18781
T.	<i>lixii</i>	(Pat.) Chaverri	2015	CBS	110080
T.	<i>guizhouense</i>	Li, McKenzie & Wang	2012	CBS	131803
T.	<i>camerunense</i>	Chaverri & Samuels	2015	CBS	138272
T.	<i>simmonsii</i>	Chaverri, Rocha, Samuels, Degenk	2015	CBS	130431
T.	<i>albocorneum</i>	(Doi) Jaklitsch & Voglmayr	2014	G.J.S.	97-28
T.	<i>afroharzianum</i>	Chaverri, Rocha, Degenkolb & Dru	2015	CBS	124620
T.	<i>fomitopsis</i>	(Liu & Doi) Liu, Zhu & Zhuang	2014	HKAS	26205
T.	<i>harzianum</i>	Rifai	1969	CBS	226.95
T.	<i>tenue</i>	Qin & Zhuang	2017	HMAS	273785
T.	<i>rufobrunneum</i>	Zhu & Zhuang	2015	HMAS	252547
T.	<i>priscilae</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	131487
T.	<i>purpureum</i>	Qin & Zhuang	2017	HMAS	273787
T.	<i>ingratum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248822
T.	<i>italicum</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	132567
T.	<i>parepimyces</i>	Jaklitsch	2009	CBS	122769
T.	<i>compactum</i>	Yu & Zhang	2007	CBS	121218
T.	<i>aggregatum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248863
T.	<i>epimyces</i>	Jaklitsch	2008	CBS	120534
T.	<i>alpinum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248821
T.	<i>concentricum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248833
T.	<i>pseudodensum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248828
T.	<i>alni</i>	Jaklitsch	2008	CBS	120633
T.	<i>subalni</i>	Zhang & Zhuang	2018	HMAS	247267
T.	<i>zayuense</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248835

<i>T. christiani</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	132572
<i>T. christianii</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015		
<i>T. perviride</i>	Qin & Zhuang	2017	HMAS	273786
<i>T. solum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248848
<i>T. hengshanicum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248852
<i>T. liberatum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248831
<i>T. globoides</i>	Qin & Zhuang	2017	HMAS	248747
<i>T. aggressivum</i>	Samuels & Gams	2002	DAOM	222156
<i>T. amazonicum</i>	Chaverri & Gazis	2011	CBS	126898
<i>T. ceratophylli</i>	Yu	2019	YMF	1.04621
<i>T. confertum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248896
<i>T. pleurotum</i>	Yu & Park	2006		
<i>T. pleuroti</i>	Yu & Park	2006	CBS	124387
<i>T. pleurotica</i>	Yu & Park	2006	CBS	124383
<i>T. tawa</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114233
<i>T. brunneoviride</i>	Jaklitsch	2008	CBS	121130
<i>T. atrogelatinosum</i>	(Dingley) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	237.63
<i>T. dacrymycellum</i>	Jaklitsch	2009	WU	29042a
<i>T. neocrassum</i>	Samuels	2015	CBS	114230
<i>T. crassum</i>	Bissett	1992	CBS	336.93
<i>T. flavofuscum</i>	(Mill., Giddens & Foster) Bissett	1992		
<i>T. virens</i>	(Mill., Giddens & Foster) Arx	1987	CBS	249.59
<i>T. cyanodichotomus</i>	Li & Chen	2018		CK-2016a
<i>T. helicixii</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	133499
<i>T. spirale</i>	Bissett	1992	CBS	346.93
<i>T. hunanense</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248841
<i>T. longisporum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248843
<i>T. gelatinosum</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114246
<i>T. gliocladium</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	130009
<i>T. mienum</i>	Kim, Nakagiri & Maek.	2012	CBS	132690
<i>T. changbaiense</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	247198
<i>T. fassatae</i>	Nováková Kubíčková Valinová H	2015	PRM	933821
<i>T. oblongisporum</i>	Bissett	1992	CBS	343.93
<i>T. fertile</i>	Bissett	1992	CBS	339.93
<i>T. moravicum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	120539
<i>T. fomiticola</i>	Jaklitsch	2009	CBS	121136
<i>T. hunua</i>	(Dingley) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	238.63
<i>T. semiorbis</i>	(Berk.) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	130716
<i>T. pseudonigrovirens</i>	Minnis, Samuels & Chaverri	2009	G.J.S.	99-64
<i>T. byssinum</i>	Chen & Zhuang	2017	CGMCC	3.18393
<i>T. helicum</i>	Bissett, Kubicek & Szakacs	2003	DAOM	230022
<i>T. undatipilosum</i>	Chen & Zhuang	2017		
<i>T. undatipile</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248854
<i>T. stipitatum</i>	Zhu & Zhuang	2015	HMAS	266613
<i>T. viridicollare</i>	Zhang & Zhuang	2019	W.Z.	2018b
<i>T. sulawesense</i>	(Doi) Jaklitsch & Voglmayr	2014	GJS	85-228
<i>T. chromospermum</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114577

T.	<i>cremeum</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	111146
T.	<i>surrotundum</i>	Chaverri & Samuels	2003	BPI	843668
T.	<i>cremeoides</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015		S112
T.	<i>brevicrassum</i>	Chen & Zhuang	2017	CGMCC	3.18407
T.	<i>sinuosum</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114247
T.	<i>chlorosporum</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114231
T.	<i>thelephoricola</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114237
T.	<i>rosulatum</i>	Zhu & Zhuang	2015	HMAS	244906
T.	<i>zonatum</i>	Zhu, Zhuang & Li	2017	CGMCC	3.18758
T.	<i>costaricense</i>	(Chaverri & Samuels) Chaverri, Jak	2014	P.C.	21
T.	<i>thailandicum</i>	Chaverri & Samuels	2003	CBS	114234
T.	<i>virescentiflavum</i>	(Speg.) Jaklitsch & Voglmayr	2014	P.C.	278
T.	<i>fujianense</i>	Zhu, Zhuang & Li	2017	HMJAU	34830
T.	<i>candidum</i>	Chaverri & Samuels	2003		
T.	<i>pseudocandidum</i>	Minnis, Samuels & Chaverri	2009	BPI	843652
T.	<i>aureoviride</i>	Rifai	1969	CBS	120536
T.	<i>albolutescens</i>	Jaklitsch	2011	CBS	119286
T.	<i>lycogaloides</i>	(Berk. & Broome) Jaklitsch, Lechat	2014	CBS	123493
T.	<i>spinulosum</i>	(Fuckel) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	311.5
T.	<i>danicum</i>	(Jaklitsch) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	121273
H.	<i>mikurajimensis</i>	Doi	2001	JCM	12018
T.	<i>britannicum</i>	(Rifai & Webster) Jaklitsch & Vogl	2014	CBS	253.62
T.	<i>aerugineum</i>	Jaklitsch	2009	CBS	120541
T.	<i>hispanicum</i>	(Jaklitsch & Voglmayr) Jaklitsch &	2014	CBS	130540
T.	<i>samuelsii</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2012	CBS	130537
T.	<i>vinosum</i>	Samuels	2006	CBS	119087
T.	<i>adaptatum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248800
T.	<i>scalesiae</i>	Samuels & Evans	2006	CBS	120069
T.	<i>beijingense</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248804
T.	<i>valdunense</i>	Jaklitsch	2011	CBS	120923
T.	<i>martiale</i>	Samuels	2008	CBS	123052
T.	<i>paratroviride</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	136489
T.	<i>gamsii</i>	Samuels & Druzhin.	2006	CBS	120075
T.	<i>neotropicale</i>	Chaverri & Rocha	2015	CBS	130633
T.	<i>neokoningii</i>	Samuels & Soberanis	2006	CBS	120070
T.	<i>nothescens</i>	Samuels & Jaklitsch	2013	CBS	134882
T.	<i>viridescens</i>	(Horne & Will.) Jaklitsch & Samuel	2006	CBS	433.34
T.	<i>viridarium</i>	Jaklitsch, Samuels & Voglmayr	2013	CBS	132568
T.	<i>viridialbum</i>	Jaklitsch, Samuels & Voglmayr	2013	CBS	133495
T.	<i>sempervirentis</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2013	CBS	133498
T.	<i>aestuarinum</i>	Goncalves & Alves	2019	MUM	H-19.05
T.	<i>paraviridescens</i>	Jaklitsch, Samuels & Voglmayr	2013	CBS	119321
T.	<i>trixiae</i>	Samuels & Jaklitsch	2013	CBS	134702
T.	<i>appalachiense</i>	Samuels & Jaklitsch	2013	CBS	133558
T.	<i>olivascens</i>	Jaklitsch, Samuels & Voglmayr	2013	CBS	132574
T.	<i>neosinense</i>	Samuels & Jaklitsch	2013	CBS	134884
T.	<i>composticola</i>	Samuels & Jaklitsch	2013	CBS	133497

T.	<i>virilente</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2013	CBS	132569
T.	<i>laevisporum</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	273756
T.	<i>atroviride</i>	Bissett	1984		
T.	<i>atroviride</i>	Karst.	1892	IMI	206040
H.	<i>muroiana</i>	Hino & Katum.	1958	NBRC	31293
T.	<i>viride</i>	Schumach.	1803		
T.	<i>viride</i>	Pers.	1794		
T.	<i>viride*</i>	Pers.	1832	CBS	119325
T.	<i>subviride</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	273761
T.	<i>junci</i>	Jaklitsch	2011	WU	29229a
T.	<i>speciosum</i>	Yu & Du	2018	CGMCC	3.19079
T.	<i>sphaerosporum</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	273763
T.	<i>stilbohypoxyli</i>	Samuels & Schroers	2006	CBS	992.97
T.	<i>erinaceum</i>	Bissett, Kubicek & Szakonyi	2003	DAOM	230018
T.	<i>songyi</i>	Park, Seung Oh & Lim	2014	CBS	138099
T.	<i>panacis</i>	Liu, Zhang, Yu & Zhang	2020	CGMCC	3.18297
T.	<i>ovalisporum</i>	Samuels & Schroers	2004	CBS	113299
T.	<i>koningiopsis</i>	Samuels, Carm. Suárez & Evans	2006	CBS	119075
T.	<i>dorothopsis</i>	Tomah & Zhang	2020	HMAS	248251
T.	<i>arenarium</i>	Cai, Ding & Druzhin.	2020	CGMCC	19611
T.	<i>taiwanense</i>	Samuels & Wu	2006	CBS	119058
T.	<i>caribbaeum</i>	Samuels & Schroers	2006	CBS	119093
T.	<i>istrianum</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	130539
T.	<i>petersenii</i>	Samuels, Dodd & Schroers	2006	G.J.S.	91-99
T.	<i>dorotheae</i>	Samuels & Dodd	2006	CBS	119089
T.	<i>texanum</i>	Montoya, Meirelles, Chaverri & R	2016	CBS	139784
T.	<i>albofulvopsis</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	273760
T.	<i>ochroleucum</i>	(Berk. & Ravenel) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	119502
T.	<i>intricatum</i>	Samuels & Dodd	2006	CBS	119059
T.	<i>albofulvum</i>	(Berk. & Broome) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	114787
T.	<i>dingleyae</i>	Samuels & Dodd	2006	CBS	119056
T.	<i>koningii</i>	Oudem.	1902	G.J.S.	96-117
T.	<i>tardum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248798
T.	<i>bifurcatum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248795
T.	<i>caerulescens</i>	(Jaklitsch & Voglmayr) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	130011
T.	<i>strigosellum</i>	López-Quint., Gams, Boekhout & Dr	2013	CBS	102817
T.	<i>strigosum</i>	Bissett	1992	CBS	348.93
T.	<i>vulgatum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248796
T.	<i>rogersonii</i>	Samuels	2006	G.J.S.	94-115
T.	<i>cerebriforme</i>	(Berk.) Samuels	2015	G.J.S.	85-245
T.	<i>austrokoningii</i>	Samuels & Druzhin.	2006	CBS	119092
T.	<i>sinokoningii</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	271397
T.	<i>pararogersonii</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	133496
T.	<i>mangshanicum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248810
T.	<i>sparsum</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	273759
T.	<i>subeffusum</i>	Jaklitsch	2011	W.M.J.	2009-17
T.	<i>flavipes</i>	(Peck) Seifert, Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	123070

<i>T.</i>	<i>evansii</i>	Samuels	2009	CBS	123079
<i>T.</i>	<i>pubescens</i>	Bissett	1992	CBS	345.93
<i>T.</i>	<i>shaoguanicum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	248809
<i>T.</i>	<i>hamatum</i>	(Bonord.) Bainier	1906	CBS	102160
<i>T.</i>	<i>eijii</i>	Kim & Maek.	2013	CBS	133190
<i>T.</i>	<i>acremoniooides</i>	Zhang & Zhuang	2018	HMAS	279611
<i>T.</i>	<i>paucisporum</i>	Samuels, Carm. Suñez & Solis	2006	CBS	118645
<i>T.</i>	<i>theobromicola</i>	Samuels & Evans	2006	CBS	119120
<i>T.</i>	<i>kunmingense</i>	Yu & Li	2018	YMF	1.02659
<i>T.</i>	<i>poronioideum</i>	(Müller) Samuels	2015	CBS	139046
<i>T.</i>	<i>asperellum</i>	Samuels, Lieckf. & Nirenberg	1999	CBS	433.97
<i>T.</i>	<i>matsushimae</i>	(Webster) Yamag., Tsurumi, Chuas	2012	IMI	266915
<i>T.</i>	<i>glaucum</i>	Abbott	1927		
<i>T.</i>	<i>yunnanense</i>	Yu & Zhang	2007	CBS	121219
<i>T.</i>	<i>asperelloides</i>	Samuels	2010	CBS	125938
<i>T.</i>	<i>lieckfeldtia</i>	Samuels	2009	CBS	123049
<i>T.</i>	<i>aeroaquaticum</i>	Yamag., Tsurumi, Chuaseehar. & N	2012	NBRC	108034
<i>T.</i>	<i>densum</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	273758
<i>T.</i>	<i>neorufum</i>	(Samuels, Dodd & Lieckf.) Jaklitsch	2014	CBS	111144
<i>T.</i>	<i>neorufoides</i>	Jaklitsch	2011	CBS	119506
<i>T.</i>	<i>restrictum</i>	du Plessis & Jacobs	2018	PPRI	19367
<i>T.</i>	<i>pezizoides</i>	(Berk. & Broome) Samuels, Jaklitsch	2014	G.J.S.	01-257
<i>T.</i>	<i>voglmayrii</i>	Jaklitsch	2006	CBS	117711
<i>T.</i>	<i>attinorum</i>	Montoya, Meirelles, Chaverri & R	2016	CBS	139783
<i>T.</i>	<i>citrinella</i>	(Ellis) Zhuang & Zeng	2017		
<i>T.</i>	<i>hongkongensis</i>	(Zhu & Zhuang) Zeng & Zhuang	2017	HMAS	75530
<i>T.</i>	<i>oligosporum</i>	Zhu & Zhuang	2015	HMAS	252870
<i>T.</i>	<i>calamagrostidis</i>	Jaklitsch	2011	WU	29198a
<i>T.</i>	<i>crystalligenum</i>	Jaklitsch	2006	CBS	118980
<i>T.</i>	<i>balearicum</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	133222
<i>T.</i>	<i>rhododendri</i>	(Jaklitsch) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	119288
<i>H.</i>	<i>splendens</i>	Phillips & Plowr.	1885	CBS	336.69
<i>T.</i>	<i>psychrophilum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	119129
<i>T.</i>	<i>megalocitrinum</i>	(Doi) Jaklitsch & Voglmayr	2014	B.E.O.	00-09
<i>T.</i>	<i>ceciliae</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	130010
<i>T.</i>	<i>hubeiense</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	252888
<i>T.</i>	<i>yui</i>	Zhu & Zhuang	2015	HMAS	266633
<i>T.</i>	<i>melanomagnum</i>	Chaverri & Samuels	2003	G.J.S.	99-153
<i>T.</i>	<i>deliquescens</i>	(Sopp) Jaklitsch	2011	CBS	121131
<i>T.</i>	<i>luteocrystallinum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	123828
<i>T.</i>	<i>victoriense</i>	(Overton) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	140064
<i>T.</i>	<i>austriacum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	122494
<i>T.</i>	<i>sulphureum</i>	(Schwein.) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	119929
<i>T.</i>	<i>subsulphureum</i>	(Syd. & Syd.) Jaklitsch & Voglmayr	2014		M-141
<i>T.</i>	<i>microcitrinum</i>	(Doi) Jaklitsch & Voglmayr	2014	G.J.S.	91-61
<i>T.</i>	<i>phellinicola</i>	Jaklitsch	2011	CBS	119283
<i>T.</i>	<i>pulvinatum</i>	(Fuckel) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	121279

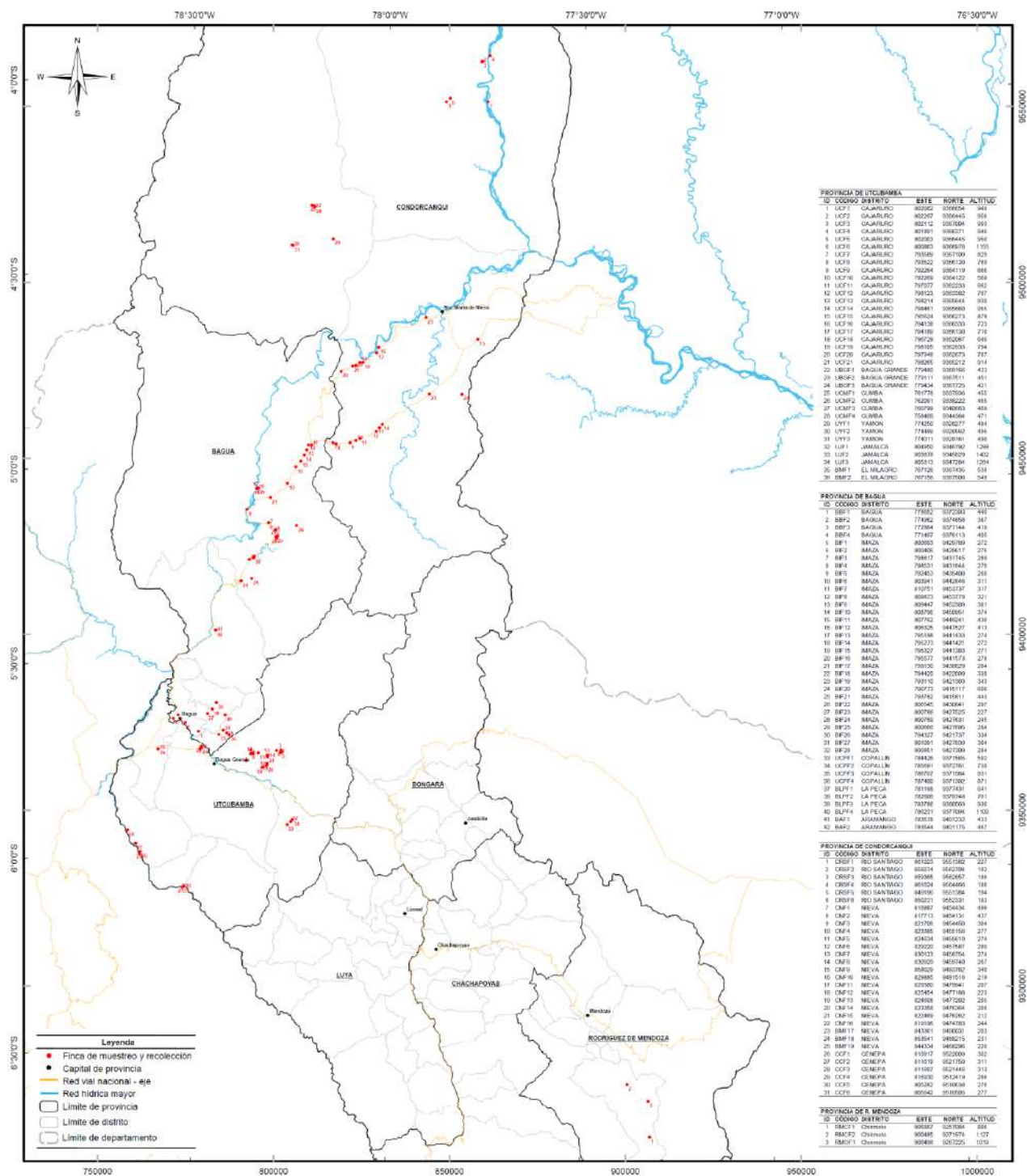
<i>T.</i>	<i>americanum</i>	(Canham) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	976.69
<i>T.</i>	<i>protopulvinatum</i>	(Doi) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	739.83
<i>T.</i>	<i>lacteum</i>	Bissett	1992		
<i>T.</i>	<i>citrinum</i>	(Pers.) Jaklitsch, Gams & Voglmayr	2014	CBS	894.85
<i>T.</i>	<i>stercorarium</i>	(Barrasa, Martínez & Moreno) Jaklitsch	2015	CBS	148.85
<i>T.</i>	<i>decepiens</i>	(Jaklitsch, Pöschl & Samuels) Jaklitsch	2014	G.J.S.	97-207
<i>T.</i>	<i>pseudostraminea</i>	(Doi) Kim	2012		
<i>T.</i>	<i>pseudostramineum</i>	(Doi) Kim	2012	TUFC	60104
<i>T.</i>	<i>confluens</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	244993
<i>T.</i>	<i>applanatum</i>	Zhu & Zhuang	2015	HMAS	245081
<i>T.</i>	<i>tiantangzhaiense</i>	Zhu & Zhuang	2015	HMAS	252872
<i>T.</i>	<i>euorticioides</i>	(Overton) Jaklitsch & Voglmayr	2014	G.J.S.	99-61
<i>T.</i>	<i>pseudolacteum</i>	Kim & Maek.	2013	CBS	133191
<i>T.</i>	<i>leguminosarum</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	130014
<i>T.</i>	<i>asterineum</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	271353
<i>T.</i>	<i>undulatum</i>	du Plessis & Jacobs	2018	PPRI	19365
<i>T.</i>	<i>delicatulum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	120631
<i>T.</i>	<i>avellaneum</i>	(Rogerson & Carey) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	121667
<i>H.</i>	<i>ampulliformis</i>	Doi & Yamat.	1989	JCM	11982
<i>T.</i>	<i>britdaniae</i>	(Jaklitsch & Voglmayr) Jaklitsch & Voglmayr	2014	WU	31610
<i>T.</i>	<i>pseudobritdaniae</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	271355
<i>T.</i>	<i>henanense</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	252891
<i>T.</i>	<i>odoratum</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	271354
<i>T.</i>	<i>sambuci</i>	(Jaklitsch & Voglmayr) Jaklitsch & Voglmayr	2014	WU	29467
<i>T.</i>	<i>tremelloides</i>	Jaklitsch	2011	CBS	121140
<i>T.</i>	<i>reesei</i>	Simmons	1977	CBS	383.78
<i>T.</i>	<i>parareesei</i>	Atan., Jaklitsch, KomoDjuzel., Kubicek	2010	CBS	125925
<i>T.</i>	<i>rugosum</i>	Zhang & Zhuang	2018	HMAS	254548
<i>T.</i>	<i>thermophilum</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	252912
<i>T.</i>	<i>beinartii</i>	du Plessis, Druzhin., Atan., Yarden	2018	PPRI	19281
<i>T.</i>	<i>pinnatum</i>	Samuels	2012	CBS	131292
<i>T.</i>	<i>xanthum</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	247202
<i>T.</i>	<i>longibrachiatum</i>	Rifai	1969	CBS	816.68
<i>T.</i>	<i>bissettii</i>	Sand.-Den. & Guarro	2014	CBS	137447
<i>T.</i>	<i>caeruleimontis</i>	du Plessis & Jacobs	2018	PPRI	23903
<i>T.</i>	<i>orientale</i>	(Samuels & Petrini) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	130428
<i>T.</i>	<i>aethiopicum</i>	Mulaw, Kubicek & Samuels	2012	CBS	130628
<i>T.</i>	<i>solani</i>	Samuels	2012	CBS	130506
<i>T.</i>	<i>gracile</i>	Samuels & Szak	2012	CBS	130714
<i>T.</i>	<i>capillare</i>	Samuels & Kubicek	2012	CBS	130629
<i>T.</i>	<i>centrosinicum</i>	Qin & Zhuang	2016	HMAS	252910
<i>T.</i>	<i>flaviconidium</i>	(Chaverri, Druzhin. & Samuels) Jaklitsch	2014	CBS	130688
<i>T.</i>	<i>virgatum</i>	Cserjesi & Johnson	1972	ATCC	24961
<i>T.</i>	<i>citrinoviride</i>	Bissett	1984	CBS	258.85
<i>T.</i>	<i>flavescens</i>	Zhu, Zhuang & Li	2017	HMJAU	34730
<i>T.</i>	<i>kunigamense</i>	Yabuki & Okuda	2014	TNS-F	38436
<i>T.</i>	<i>tsugareense</i>	Yabuki & Okuda	2014	NBRC	109641

<i>T. pseudokoningii</i>	Rifai	1969	CBS	408.91
<i>T. flagellatum</i>	Mulaw, Kubicek & Samuels	2012	CBS	130626
<i>T. todica</i>	Sokoloff & Toda	1967		
<i>T. paraceramosum</i>	Bissett	1992		
<i>T. parceramosum</i>	Bissett	1992		
<i>T. ghanense</i>	Doi, Abe & Sugiy.	1987	ATCC	208858
<i>T. saturnisporum</i>	Hammill	1970	CBS	330.7
<i>T. effusum</i>	Bissett, Kubicek & Szakacs	2003	DAOM	230007
<i>T. euskadiense</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2015	CBS	130013
<i>T. chetii</i>	du Plessis, Druzhin., Atan., Yarden	2018	PPRI	19363
<i>T. andinense</i>	(Samuels & Petrini) Samuels, Jaklit	2014	CBS	345.97
<i>T. saturnisporopsis</i>	Samuels & Jaklitsch	2012	CBS	128829
<i>T. novae-zelandiae</i>	(Samuels & Petrini) Jaklitsch & Vog	2014	CBS	639.92
<i>T. alboviride</i>	Chen & Zhuang	2017	HMAS	247224
<i>T. patellotropicum</i>	Samuels	2015	CBS	110084
<i>T. patella</i>	(Cooke & Peck) Jaklitsch & Voglma	2014	CBS	110081
<i>T. konilangbra</i>	Samuels, Petrini & Kubicek	1998	CBS	100808
<i>T. sinensis</i>	Bissett, Kubicek & Szakacs	2003		
<i>T. sinense</i>	Bissett, Kubicek & Szakacs	2003	DAOM	230004
<i>T. gillesii</i>	Samuels	2012	CBS	130435
<i>T. subiculoides</i>	Zeng & Zhuang	2019	HMAS	254600
<i>T. subalpinum</i>	Jaklitsch	2011	CBS	119128
<i>T. peltatum</i>	(Berk.) Samuels, Jaklitsch & Voglm	2014	G.J.S.	08-207
<i>T. parmastoi</i>	(Overton) Jaklitsch & Voglmayr	2014	TFC	97-143
<i>T. polyalthiae</i>	Nuankaew & Boonlue	2018	TBRC	8737
<i>T. alcalifuscescens</i>	(Overton) Jaklitsch & Voglmayr	2014	CBS	122303
<i>T. caesium</i>	Pers.	1794		
<i>T. nigrescens</i>	Pers.	1794		
<i>T. roseum</i>	Pers.	1794		
<i>T. tuberculatum</i>	Pers.	1795		
<i>T. aureum</i>	Pers.	1796		
<i>T. laeve</i>	Pers.	1796		
<i>T. dubium</i>	Pers.	1801		
<i>T. fuliginoides</i>	Pers.	1801		
<i>T. pyrenium</i>	Pers.	1801		
<i>T. brassicae</i>	Schumach.	1803		
<i>T. carneum</i>	Schumach.	1803	DAOM	230012
<i>T. fuscum</i>	Schumach.	1803		
<i>T. laeve</i>	Schumach.	1803		
<i>T. pedunculatum</i>	Schumach.	1803		
<i>T. pyrenium</i>	Schumach.	1803		
<i>T. candidum</i>	Alb. & Schwein.	1805		
<i>T. dubium</i>	Alb. & Schwein.	1805		
<i>T. guttatum</i>	Alb. & Schwein.	1805		
<i>T. aeruginosum</i>	Link	1816		
<i>T. varium</i>	Ehrenb.	1818		
<i>T. globosum</i>	Schwein.	1822		

<i>T.</i>	<i>mycophilum</i>	(Pers.) Schwein.	1822		
<i>T.</i>	<i>spadiceum</i>	Schwein.	1822		
<i>T.</i>	<i>flavum</i>	Sommerf.	1826		
<i>T.</i>	<i>rubropallens</i>	Schwein.	1832		
<i>T.</i>	<i>cinnabarinum</i>	Wallr.	1833		
<i>T.</i>	<i>penicillatum</i>	Wallr.	1833		
<i>T.</i>	<i>pezizoideum</i>	Wallr.	1833		
<i>T.</i>	<i>granulosum</i>	Fuckel	1870		
<i>T.</i>	<i>lignorum</i>	(Tode) Harz	1872		
<i>T.</i>	<i>vulpinum</i>	Fuckel	1874		
<i>T.</i>	<i>lateritio-roseum</i>	Lib. ex Cooke	1880		
<i>T.</i>	<i>collae</i>	(Schwein.) Sacc.	1886		
<i>T.</i>	<i>racemosum</i>	McAlpine	1902		
<i>T.</i>	<i>violaceum</i>	Oudem.	1904		
<i>T.</i>	<i>minutum</i>	Bainier	1906		
<i>T.</i>	<i>corfecianum</i>	Sacc.	1911		
<i>T.</i>	<i>varians</i>	Sartory & Bainier	1912		
<i>T.</i>	<i>desrochii</i>	Sartory & Bainier	1913		
<i>T.</i>	<i>nigrovirens</i>	Goddard	1913		
<i>T.</i>	<i>cordobense</i>	Speg.	1926		
<i>T.</i>	<i>narcissi</i>	(Tochinai & Shimada) Tochinai & S	1931		
<i>T.</i>	<i>nunbergii</i>	Svilv.	1932		
<i>T.</i>	<i>sympodianum</i>	Kulik	1960		
<i>T.</i>	<i>minima</i>	(Speg.) Gunth. Mll.	1965		
<i>T.</i>	<i>minimum</i>	(Speg.) Gunth. Mll.	1965		
<i>T.</i>	<i>arachnoidea</i>	Kuritzina & Sizova	1967		
<i>T.</i>	<i>arachnoideum</i>	Kuritzina & Sizova	1967		
<i>T.</i>	<i>nigrovirens</i>	Chaverri & Samuels	2001	G.J.S.	99-64
<i>T.</i>	<i>cuneisporum</i>	Chaverri & Samuels	2003		
<i>T.</i>	<i>nigrovirens</i>	Chaverri & Samuels	2003		
<i>T.</i>	<i>fragile</i>	(Doi) Jaklitsch & Voglmayr	2014		
<i>T.</i>	<i>hexasporum</i>	(Boedijn) Jaklitsch & Voglmayr	2014		
<i>T.</i>	<i>izawae</i>	(Doi) Jaklitsch & Voglmayr	2014		
<i>T.</i>	<i>rosellum</i>	Jaklitsch & Voglmayr	2014		
<i>T.</i>	<i>sinoaustrale</i>	Zhu & Zhuang	2014	HMAS	23403
<i>T.</i>	<i>sordidum</i>	(Doi) Jaklitsch & Voglmayr	2014		
<i>T.</i>	<i>subtrachycarpum</i>	(Doi) Jaklitsch & Voglmayr	2014		
<i>T.</i>	<i>succisum</i>	(Rifai) Jaklitsch & Voglmayr	2014		
<i>T.</i>	<i>trachycarpum</i>	(Syd.) Jaklitsch & Voglmayr	2014		
<i>T.</i>	<i>viridiflavum</i>	Zhu & Zhuang	2014	HMAS	252549
<i>T.</i>	<i>corrugatum</i>	(Doi, Liu & Tamura) Liu, Zhu & Zhu	2014		
<i>T.</i>	<i>brevipes*</i>	(Mont.) Samuels	2015	CBS	139044
<i>T.</i>	<i>latizonatum</i>	(Peck) Samuels	2015		
<i>T.</i>	<i>virgineum</i>	Zhang & Zhuang	2017	HMAS	275664
<i>T.</i>	<i>fruticola</i>	Zhang & Zhuang	2017	HMAS	275663
<i>T.</i>	<i>medogense</i>	Zhang & Zhuang	2017	HMAS	254526
<i>T.</i>	<i>palidulum</i>	Zhang & Zhuang	2017	HMAS	275665



# Anexo 6. Mapa regional de puntos de muestreo



## Anexo 7. Ubicación de los puntos de muestreo

DISTRITO - PROVINCIA	N° FINCA	CEPA	ESPECIE	COORDENADAS UTM		ALTITUD	ESTRATO
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 1	F1M2	<i>T harzianum</i>	802082	9366654	948	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 1	F1M3	<i>T longibrachiatu</i>	802082	9366654	948	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 1	F1M4	<i>T afroharzianum</i>	802082	9366654	948	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 2	F2M5	<i>T zelobreve</i>	802267	9366445	956	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 3	F3M4	<i>T harzianum</i>	802112	9367004	993	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 3	F3M5	<i>T afroharzianum</i>	802112	9367004	993	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 4	F4M3	<i>T ghanense</i>	801891	9366371	946	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 5	F5M3	<i>T harzianum</i>	802003	9366445	950	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 5	F5M4	<i>T harzianum</i>	802003	9366445	950	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 5	F5M5	<i>T harzianum</i>	802003	9366445	950	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 6	F6M5	<i>T asperelloides</i>	800863	9366976	1155	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 7	F7M2	<i>T reesei</i>	793589	9367109	829	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 7	F7M3	<i>T afroharzianum</i>	793589	9367109	829	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 8	F8M2	<i>T asperelloides</i>	793522	9366130	769	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 8	F8M5	<i>T asperelloides</i>	793522	9366130	769	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 9	F9M3	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	792264	9364119	666	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 9	F9M4	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	792264	9364119	666	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 10	F10M1	<i>T harzianum</i>	792269	9364122	569	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 10	F10M2	<i>T harzianum</i>	792269	9364122	569	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 10	F10M5	<i>T harzianum</i>	792269	9364122	569	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 12	F12M1	<i>T afroharzianum</i>	798123	9363382	767	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 12	F12M3	<i>T harzianum</i>	798123	9363382	767	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 12	F12M4	<i>T harzianum</i>	798123	9363382	767	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 13	F13M4	<i>T afroharzianum</i>	798214	9365644	930	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 14	F14M3	<i>T longibrachiatu</i>	798461	9365660	955	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 14	F14M4	<i>T harzianum</i>	798461	9365660	955	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 14	F14M5	<i>T harzianum</i>	798461	9365660	955	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 15	F15M5	<i>T harzianum</i>	795624	9366273	879	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 16	F16M1	<i>T afroharzianum</i>	794138	9366333	723	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 16	F16M3	<i>T afroharzianum</i>	794138	9366333	723	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 17	F17M4	<i>T longibrachiatu</i>	794189	9366130	710	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 18	F18M1	<i>T harzianum</i>	796729	9362087	640	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 18	F18M2	<i>T longibrachiatu</i>	796729	9362087	640	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 18	F18M4	<i>T harzianum</i>	796729	9362087	640	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 18	F18M5	<i>T afroharzianum</i>	796729	9362087	640	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 19	F19M1	<i>T harzianum</i>	798105	9362933	794	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 19	F19M3	<i>T asperelloides</i>	798105	9362933	794	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 19	F19M4	<i>T harzianum</i>	798105	9362933	794	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 20	F20M1	<i>T harzianum</i>	797948	9362673	787	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 20	F20M2	<i>T harzianum</i>	797948	9362673	787	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 20	F20M3	<i>T harzianum</i>	797948	9362673	787	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 20	F20M4	<i>T harzianum</i>	797948	9362673	787	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 20	F20M5	<i>T afroharzianum</i>	797948	9362673	787	2
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 21	F21M1	<i>T harzianum</i>	798265	9365212	914	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 21	F21M2	<i>T harzianum</i>	798265	9365212	914	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 21	F21M3	<i>T harzianum</i>	798265	9365212	914	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 21	F21M4	<i>T harzianum</i>	798265	9365212	914	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 21	F21M5	<i>T longibrachiatu</i>	798265	9365212	914	3

CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 22	UCF1_C1	<i>T longibrachiatu</i>	794342	9365123	823	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 22	UCF1_M4	<i>T harzianum</i>	794342	9365123	802	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 23	UCF10_M1	<i>T harzianum</i>	794043	9363222	876	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 23	UCF10_M5	<i>T harzianum</i>	794043	9363222	876	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 23	UCF10A_C1	<i>T longibrachiatu</i>	794232	9364365	876	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 25	UCF12_M3	<i>T harzianum</i>	797342	9376332	882	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 26	UCF13_M4	<i>T harzianum</i>	795366	9375143	914	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 27	UCF14_C1	<i>T longibrachiatu</i>	795049	9365456	876	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 28	UCF16_M1	<i>T harzianum</i>	794342	9365123	900	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 29	UCF17_M1	<i>T reesei QM6a</i>	794789	9365078	859	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 29	UCF17_M4	<i>T longibrachiatu</i>	794789	9365078	859	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 30	UCF18_M3	<i>T reesei QM6a</i>	795342	9366364	899	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 30	UCF18A_C1	<i>T longibrachiatu</i>	795342	9366364	899	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 30	UCF18A_C3	<i>T longibrachiatu</i>	795342	9366364	899	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 33	UCF19_M4	<i>T harzianum</i>	794944	9364654	903	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 33	UCF19A_C1	<i>T longibrachiatu</i>	794944	9364654	903	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 33	UCF19A_C2	<i>T longibrachiatu</i>	794944	9364654	903	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 34	UCF1A_C2	<i>T longibrachiatu</i>	795987	9366549	876	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 35	UCF2_M2	<i>T asperelloides</i>	795900	9366849	854	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 36	UCF20_M1	<i>T harzianum</i>	794213	9364456	900	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 36	UCF20_M3	<i>T harzianum</i>	794213	9364456	900	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 37	UCF21_C1	<i>T longibrachiatu</i>	794242	9364693	841	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 37	UCF21_M1	<i>T harzianum</i>	794242	9364693	841	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 37	UCF21_M2	<i>T harzianum</i>	794242	9364693	841	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 37	UCF21A_C3	<i>T longibrachiatu</i>	794242	9364693	841	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 38	UCF3_M5	<i>T harzianum</i>	794428	9365471	859	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 39	UCF5_M1	<i>T harzianum</i>	794399	9365398	910	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 39	UCF5_M4	<i>T afroharzianum</i>	794399	9365398	910	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 39	UCF5_M5	<i>T harzianum</i>	794399	9365398	910	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 39	UCF5A_C1	<i>T longibrachiatu</i>	794399	9365398	910	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 39	UCF5A_C2	<i>T longibrachiatu</i>	794399	9365398	910	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 40	UCF6_M5	<i>T asperelloides</i>	795821	9363444	823	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 41	UCF7_M2	<i>T reesei QM6a</i>	795855	9363561	850	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 41	UCF7_M4	<i>T reesei QM6a</i>	795855	9363561	850	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 41	UCF7_M5	<i>T longibrachiatu</i>	795855	9363561	850	3
CAJARURO - UTCUBAMBA	Finca 42	UCF8_M5	<i>T asperelloides</i>	795067	9364227	909	3
JAMALCA - UTCUBAMBA	Finca 43	UJF1_C1	<i>T longibrachiatu</i>	804950	9346792	1299	3
JAMALCA - UTCUBAMBA	Finca 44	UJF2_C1	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	803878	9345829	1402	3
JAMALCA - UTCUBAMBA	Finca 44	UJF2_C2	<i>T parareesei</i>	803878	9345829	1402	3
JAMALCA - UTCUBAMBA	Finca 45	UJF3_C2	<i>T longibrachiatu</i>	805313	9347284	1264	3
JAMALCA - UTCUBAMBA	Finca 45	UJF3_C4	<i>T longibrachiatu</i>	805313	9347284	1264	3
AGUA GRANDE -UTCUBAMBA	Finca 46	UBGF1_C1	<i>T longibrachiatu</i>	779480	9368166	423	1
AGUA GRANDE -UTCUBAMBA	Finca 47	UBGF2_C1	<i>T harzianum</i>	779111	9367511	451	1
EL MILAGRO - BAGUA	Finca 48	BMF1_C1	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	767126	9367435	538	2
EL MILAGRO - BAGUA	Finca 49	BMF2_C2	<i>T zelobreve</i>	767156	9367308	549	2
EL MILAGRO - BAGUA	Finca 49	BMF2_C1	<i>T koningiopsis</i>	767156	9367123	456	2
EL MILAGRO - BAGUA	Finca 50	BMF1_C1	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	767111	9367432	490	1
EL MILAGRO - BAGUA	Finca 51	BMF15_C5	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	767127	9367745	421	1
EL MILAGRO - BAGUA	Finca 52	BMF18_C1	<i>T orientale</i>	767146	9367111	432	1
EL MILAGRO - BAGUA	Finca 53	BMF19_C2	<i>T longibrachiatu</i>	767143	9367276	425	1
EL MILAGRO - BAGUA	Finca 54	BPF3_C1	<i>T reesei QM6a</i>	767113	9367344	512	2
EL MILAGRO - BAGUA	Finca 55	BMF19_C4	<i>T reesei QM6a</i>	767156	9367321	502	2

CUMBA - UTCUBAMBA	Finca 56	UCM2_C1	<i>T reesei QM6a</i>	762091	9338222	465	1
CUMBA - UTCUBAMBA	Finca 56	UCMF2_C1	<i>T orientale</i>	762091	9338222	465	1
CUMBA - UTCUBAMBA	Finca 56	UCMF2_C3	<i>T longibrachiatu</i>	762091	9338222	465	1
CUMBA - UTCUBAMBA	Finca 56	UCMF2_C4	<i>T reesei QM6a</i>	762091	9338222	465	1
CUMBA - UTCUBAMBA	Finca 57	UCMF3_C1	<i>T longibrachiatu</i>	760799	9340663	469	1
YAMON - UTCUBAMBA	Finca 58	UYF1_C1	<i>T harzianum</i>	774250	9328277	484	1
BAGUA - BAGUA	Finca 59	BBF1_C1	<i>T asperelloides</i>	778652	9372393	440	1
BAGUA - BAGUA	Finca 59	BBF1_C2	<i>T longibrachiatu</i>	778652	9372393	440	1
BAGUA - BAGUA	Finca 59	BBF1_C3	<i>T sp. 1 WYZ-2016</i>	778652	9372393	440	1
BAGUA - BAGUA	Finca 60	BBF3_C1	<i>T longibrachiatu</i>	772864	9377144	419	1
BAGUA - BAGUA	Finca 61	BBF4_C4	<i>T reesei</i>	771497	9376113	405	1
BAGUA - BAGUA	Finca 61	BBF4_C2	<i>T reesei</i>	771497	9376113	405	1
COPALLIN - BAGUA	Finca 62	UCPF2_C1	<i>T reesei QM6a</i>	185691	9372761	730	2
COPALLIN - BAGUA	Finca 62	UCPF2_C3	<i>T harzianum</i>	185691	9372761	730	2
COPALLIN - BAGUA	Finca 63	UCPF3_C1	<i>T harzianum</i>	786707	9371984	931	3
COPALLIN - BAGUA	Finca 64	UCPF4_C2	<i>T longibrachiatu</i>	787400	9371392	871	3
COPALLIN - BAGUA	Finca 64	UCPF4_C3	<i>T harzianum</i>	787400	9371392	871	3
COPALLIN - BAGUA	Finca 63	UCPF3_C1	<i>T harzianum</i>	786707	9371984	931	3
LA PECA - BAGUA	Finca 65	BLPF1_C3	<i>T longibrachiatu</i>	781198	9377431	641	2
LA PECA - BAGUA	Finca 65	BLPF1_C4	<i>T orientale</i>	781198	9377431	641	2
LA PECA - BAGUA	Finca 66	BLPF2_C1	<i>T breve</i>	782606	9378748	761	2
LA PECA - BAGUA	Finca 66	BLPF2_C2	<i>T harzianum</i>	782606	9378748	761	2
LA PECA - BAGUA	Finca 67	BLPF3_C1	<i>T asperelloides</i>	783786	9380563	930	3
LA PECA - BAGUA	Finca 68	BLPF4_C1	<i>T asperelloides</i>	786231	9377094	1109	3
LA PECA - BAGUA	Finca 68	BLPF4_C2	<i>T ghanense</i>	786231	9377094	1109	3
LA PECA - BAGUA	Finca 68	BLPF4_C3	<i>T longibrachiatu</i>	786231	9377094	1109	3
ARAMANGO - BAGUA	Finca 69	AP1M4_C1	<i>T rifaii</i>	783578	9401232	433	1
ARAMANGO - BAGUA	Finca 69	AP1M5_C1	<i>T harzianum</i>	783578	9401232	433	1
ARAMANGO - BAGUA	Finca 70	AP2M1_C2	<i>T harzianum</i>	783544	9401175	467	1
ARAMANGO - BAGUA	Finca 70	AP2M2_C1	<i>T harzianum</i>	783544	9401175	467	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 71	BIF1_C2	<i>T reesei</i>	800693	9429789	272	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 71	BIF1_C3	<i>T harzianum</i>	800693	9429789	272	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 71	BIF1_C4	<i>T lentiforme</i>	800693	9429789	272	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 72	BIF2_C2	<i>T rifaii</i>	800406	9429617	276	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 72	BIF2_C3	<i>T reesei QM6a</i>	800406	9429617	276	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 72	BIF2_C5	<i>T harzianum</i>	800406	9429617	276	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 73	BIF3_C1	<i>T reesei QM6a</i>	798617	9431745	269	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 73	BIF3_C2	<i>T reesei QM6a</i>	798617	9431745	269	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 74	BIF4_C1	<i>T reesei QM6a</i>	798531	9431644	270	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 74	BIF4_C2	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	798531	9431644	270	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 74	BIF4_C3	<i>T brevicompactu</i>	798531	9431644	270	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 74	BIF4_C4	<i>T lentiforme</i>	792453	9435408	268	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 75	BIF5_C3	<i>T longibrachiatu</i>	792453	9435408	268	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 75	BIF5_C4	<i>T reesei</i>	792453	9435408	268	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 76	BIF6_C1	<i>T brevicompactu</i>	803941	9442846	311	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 77	BIF7_C1	<i>T asperelloides</i>	810751	9453737	317	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 77	BIF7_C2	<i>T virens</i>	810751	9453737	317	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 77	BIF7_C3	<i>T longibrachiatu</i>	810751	9453737	317	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 78	BIF8_C1	<i>T harzianum</i>	809873	9453778	321	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 78	BIF8_C2	<i>T reesei QM6a</i>	809873	9453778	321	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 79	BIF9_C1	<i>T inhamatum</i>	809447	9452309	381	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 80	BIF10_C2	<i>T rifaii</i>	808796	9450951	374	1

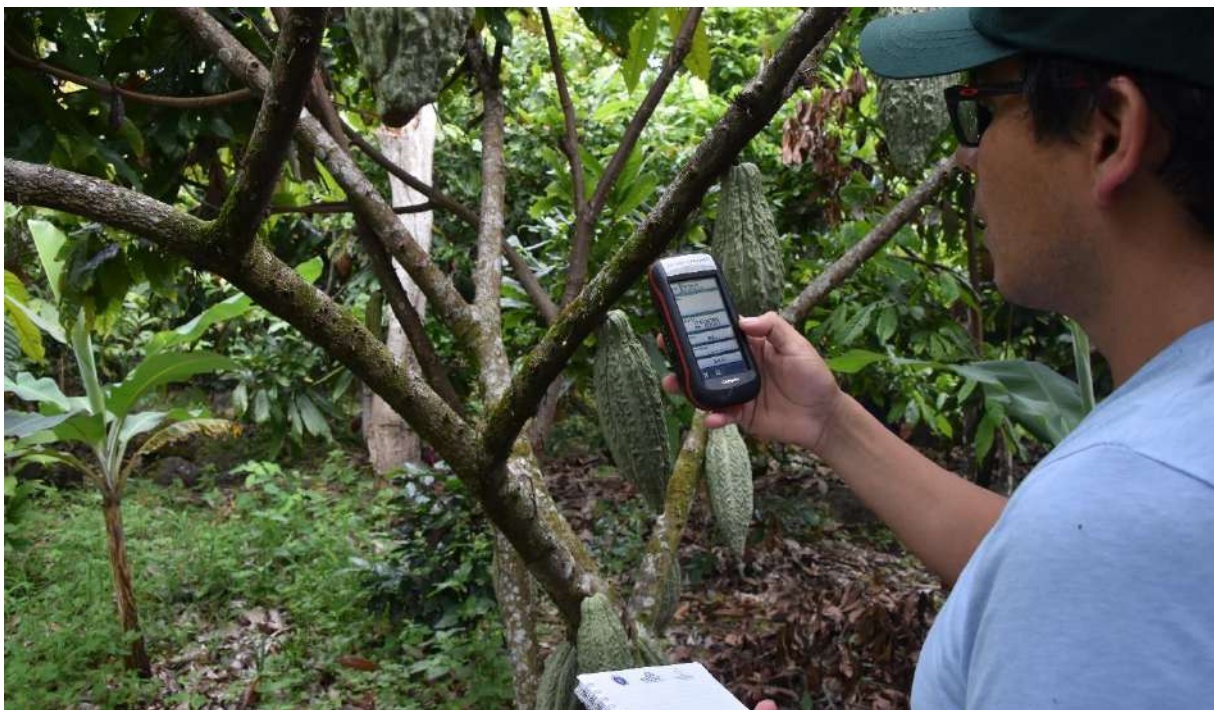
IMAZA-BAGUA -	Finca 81	BIF11_C1	<i>T lentiforme</i>	807762	9449241	430	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 81	BIF11_C2	<i>T harzianum</i>	807762	9449241	430	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 81	BIF11_C3	<i>T harzianum</i>	807762	9449241	430	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 81	BIF11_C4	<i>T afroharzianum</i>	807762	9449241	430	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 82	BIF12_C1	<i>T harzianum</i>	806325	9447527	413	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 82	BIF12_C2	<i>T harzianum</i>	806325	9447527	413	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 82	BIF12_C3	<i>T harzianum</i>	806325	9447527	413	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 83	BIF13_C1	<i>T reesei QM6a</i>	795198	9441433	274	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 83	BIF13_C2	<i>T afroharzianum</i>	795198	9441433	274	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 84	BIF14_C1	<i>T afroharzianum</i>	795273	9441421	272	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 84	BIF14_C2	<i>T harzianum</i>	795273	9441421	272	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 84	BIF14_C3	<i>T harzianum</i>	795273	9441421	272	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 85	BIF15_C1	<i>T reesei QM6a</i>	795327	9441383	271	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 85	BIF15_C2	<i>T zelobreve</i>	795327	9441383	271	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 86	BIF16_C1	<i>T afroharzianum</i>	795577	9441573	278	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 86	BIF16_C2	<i>T harzianum</i>	795577	9441573	278	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 87	BIF17_C1	<i>T asperelloides</i>	799130	9438829	264	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 87	BIF17_C2	<i>T harzianum</i>	799130	9438829	264	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 87	BIF17_C3	<i>T longibrachiatu</i>	799130	9438829	264	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 88	BIF18_C1	<i>T virens</i>	794420	9422099	330	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 88	BIF18_C2	<i>T inhamatum</i>	794420	9422099	330	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 89	BIF19_C1	<i>T parareesei</i>	793110	9421303	343	1
IMAZA-BAGUA -	Finca 90	BIF20_C1	<i>T harzianum</i>	790773	9415117	606	2
IMAZA-BAGUA -	Finca 90	BIF20_C2	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	790773	9415117	606	2
IMAZA-BAGUA -	Finca 91	BIF22_C2	<i>T harzianum</i>	806545	9430841	297	1
IMAZA- BAGUA	Finca 92	BIF25_M2	<i>T harzianum</i>	800666	9427695	259	1
IMAZA- BAGUA	Finca 93	IP3M1_C2	<i>T harzianum</i>	800666	9427695	284	1
IMAZA- BAGUA	Finca 93	IP3M1_C3	<i>T harzianum</i>	800666	9427695	284	1
IMAZA- BAGUA	Finca 93	IP3M1_C4	<i>T harzianum</i>	800666	9427695	284	1
IMAZA- BAGUA	Finca 94	IP3M2_C3	<i>T harzianum</i>	800666	9427695	248	1
IMAZA- BAGUA	Finca 94	IP3M2_C4	<i>T harzianum</i>	800666	9427695	248	1
IMAZA- BAGUA	Finca 95	IP3M3_C2	<i>T harzianum</i>	800666	9427695	256	1
IMAZA- BAGUA	Finca 95	IP3M3_C3	<i>T inhamatum</i>	800666	9427695	256	1
IMAZA- BAGUA	Finca 96	IP3M4_C1	<i>T harzianum</i>	800666	9427695	264	1
IMAZA- BAGUA	Finca 97	BIF26_C1	<i>T harzianum</i>	794327	9421737	334	1
IMAZA- BAGUA	Finca 98	BIF27_C1	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	801091	9427839	304	1
IMAZA- BAGUA	Finca 98	BIF27_C2	<i>T rifaii</i>	801091	9427839	304	1
IMAZA- BAGUA	Finca 99	BIF28_C1	<i>T afroharzianum</i>	800851	9427309	284	1
IMAZA- BAGUA	Finca 99	BIF28_C2	<i>T afroharzianum</i>	800851	9427309	284	1
IMAZA- BAGUA	Finca 99	BIF28_C3	<i>T harzianum</i>	800851	9427309	284	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 100	CCF2_C2	<i>T orientale</i>	811619	9521750	311	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 101	CCF3_C1	<i>T reesei QM6a</i>	811697	9521446	313	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 102	CCF4_C1	<i>T longibrachiatu</i>	816930	9512419	286	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 103	CCF5_C2	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	805282	9510638	276	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 103	CCF5_C5	<i>T reesei QM6a</i>	805282	9510638	276	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 106	CCF6_C1	<i>T reesei QM6a</i>	805542	9510505	277	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 107	CTN3_C1	<i>T reesei QM6a</i>	805432	9511258	259	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 107	CTN3_C3	<i>T virens</i>	805432	9511258	259	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 108	CBO4_C1	<i>T reesei</i>	805554	9526841	287	1
CENEPA - CONDORCANQUI	Finca 108	CBO4_C2	<i>T reesei QM6a</i>	805554	9526841	287	1
SANTIAGO - CONDORCANQUI	Finca 109	CRSF1_C1	<i>T orientale</i>	814721	9551588	227	1
SANTIAGO - CONDORCANQUI	Finca 109	CRSF1_C3	<i>T reesei</i>	814721	9551588	227	1

SANTIAGO - CONDORCANC	Finca 109	CRSF1_C4	<i>T reesei QM6a</i>	814721	9551588	227	1
SANTIAGO - CONDORCANC	Finca 109	CRSF1_C5	<i>T sp. 4</i>	814721	9551588	227	1
SANTIAGO - CONDORCANC	Finca 110	CRSF2_C3	<i>T reesei QM6a</i>	812980	9563046	186	1
SANTIAGO - CONDORCANC	Finca 111	CRSF3_C2	<i>T sp. 4</i>	812980	9563046	186	1
SANTIAGO - CONDORCANC	Finca 112	CRSF5_C1	<i>T harzianum</i>	812899	9551503	194	1
SANTIAGO - CONDORCANC	Finca 113	CRSF6_C1	<i>T longibrachiatu</i>	813927	9552457	183	1
SANTIAGO - CONDORCANC	Finca 113	CRSF6_C2	<i>T reesei QM6a</i>	813927	9552457	183	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 114	CNF1_C1	<i>T sp. 3</i>	816887	9454434	499	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 114	CNF1_C2	<i>T sp. 3</i>	816887	9454434	499	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 115	CNF3_C1	<i>T reesei QM6a</i>	821706	9454450	304	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 116	CNF4_C1	<i>T sp. 3</i>	823385	9455156	277	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 116	CNF4_C2	<i>T sp. 3</i>	823385	9455156	277	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 117	CNF5_C1	<i>T reesei QM6a</i>	824634	9455610	256	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 118	CNF7_C2	<i>T longibrachiatu</i>	830123	9458754	274	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 119	CNF7-C3	<i>T reesei QM6a</i>	830123	9458754	274	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 120	CNF8_C1	<i>T reesei QM6a</i>	830929	9459740	267	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 121	CNF10_C1	<i>T harzianum</i>	829885	9481516	219	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 122	CNF10_C2	<i>T virens</i>	829885	9481516	219	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 122	CNF10_C3	<i>T virens</i>	829885	9481516	219	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 123	CNF12_C1	<i>T harzianum</i>	825454	9477188	223	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 123	CNF12_C2	<i>T harzianum</i>	825454	9477188	223	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 124	CNF15_C4	<i>T reesei QM6a</i>	822469	9476262	212	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 125	CNF16_C1	<i>T sp. 2 WYZ-2016</i>	819196	9474783	244	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 125	CNF16_C2	<i>T orientale</i>	819196	9474783	244	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 126	CNF20_C1	<i>T reesei QM6a</i>	818678	9464345	228	1
NIEVA - CONDORCANQUI	Finca 127	CNF21_C2	<i>T harzianum</i>	818078	9464245	276	1

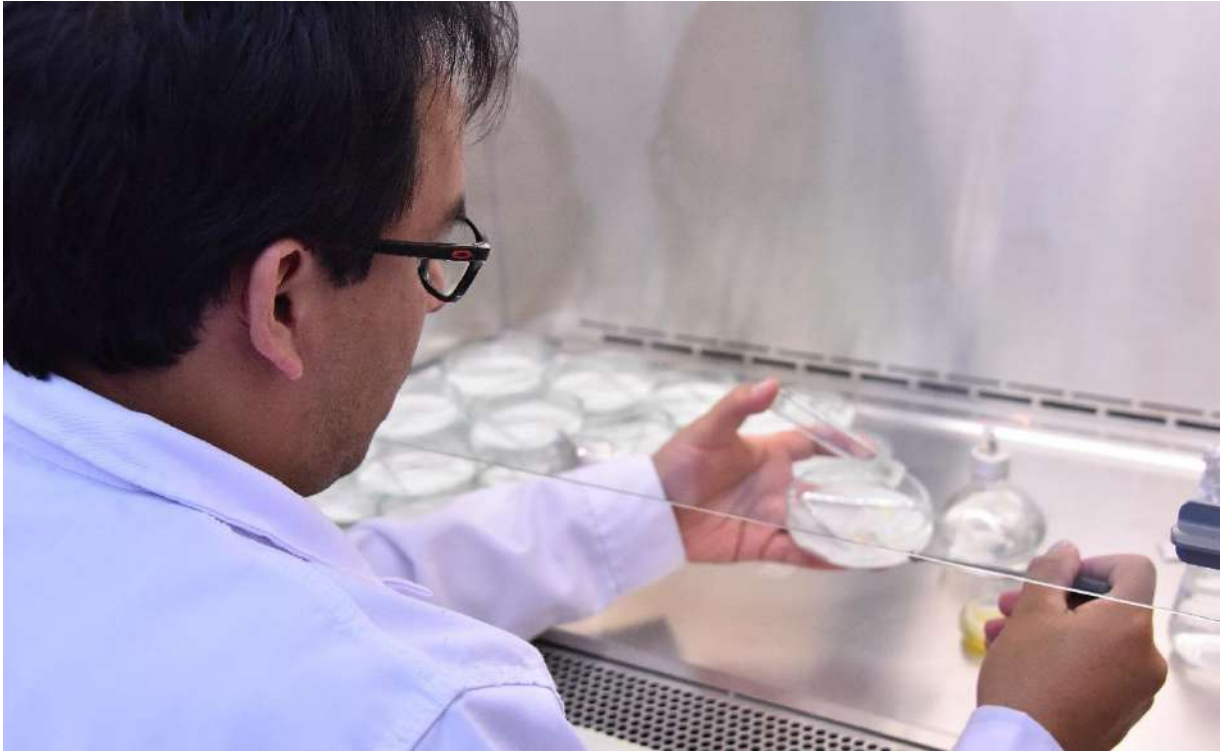
## Anexo 8. Panel fotográfico



**Foto 1.** Imagen que corresponde al proceso de recolección de muestras de suelo para la recuperación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. Amazonas, marzo del 2019.



**Foto 2.** Durante la recolección de muestras, se registraron datos referidos a las coordenadas UTM y altitud, de la parcela de cacao, principalmente. Amazonas, marzo del 2019.



**Foto 3.** Trabajos de cultivo *in-vitro* para la caracterización microscópica de los aislados nativos de *Trichoderma* spp. Amazonas, agosto del 2019.



**Foto 4.** Imagen que corresponde a la caracterización morfológica (características macroscópicas de cultivo monospóricas de aislado de trichoderma). Amazonas, octubre del 2019.





**Foto 5.** Conformación de grupos conformados por rasgos morfológicos macroscópicos (pigmentación en placa y coloración de colonia. En la imagen (izquierda) Dr. Magdiel Torres de la Cruz, especialista de la Universidad Autónoma de Tabasco – México.



**Foto 6.** Proceso de fotografiado microscópico (microscopio invertido Olympus IX83) como parte de la caracterización microscópica de las especies del género *Trichoderma*. Amazonas, octubre de 2019



**Foto 7.** Imagen que muestra el momento de extracción de secciones de PDA con posibles colonias de *Trichoderma* colonizando a *M. roreri*. Amazonas enero 2020.



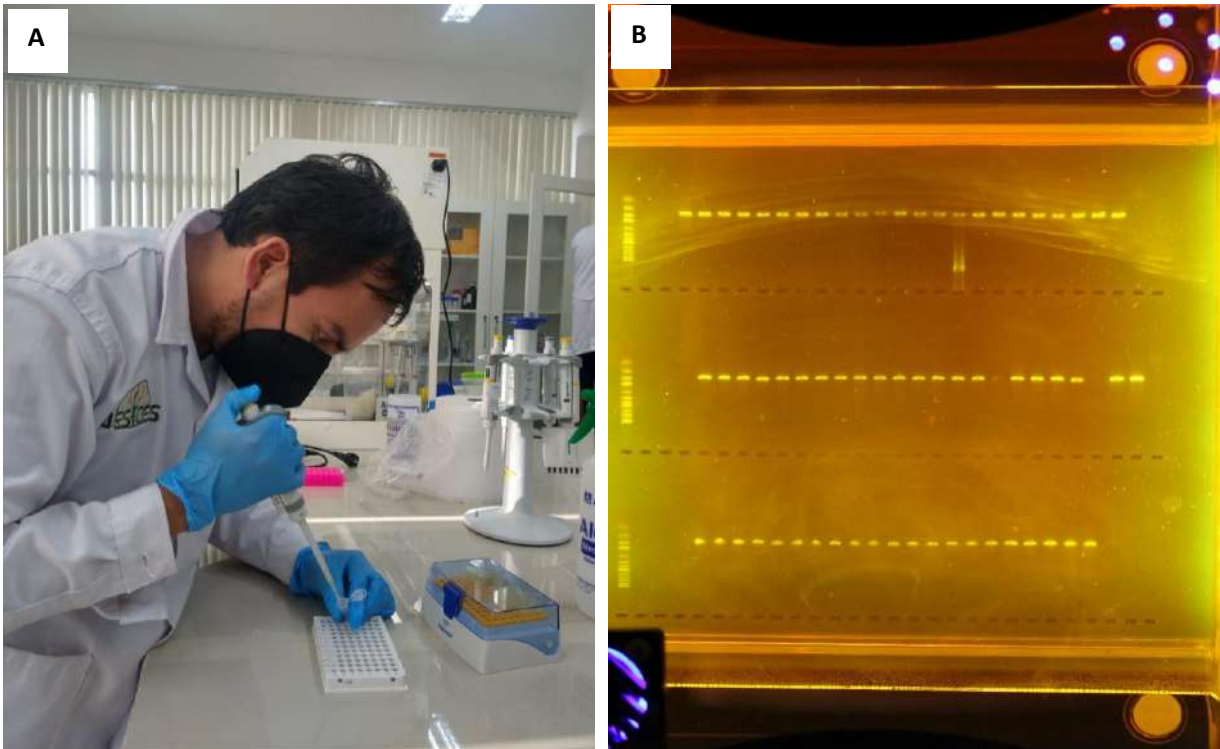
**Foto 8.** Imagen que muestra una placa petri de 90 mm conteniendo colonias de *M. roreri* y *Trichoderma* spp (lado derecho). Amazonas, marzo de 2020



**Foto 9.** Procesos de conteo de esporas, como parte de la propagación masiva de *Trichoderma* spp. Amazonas, julio de 2020



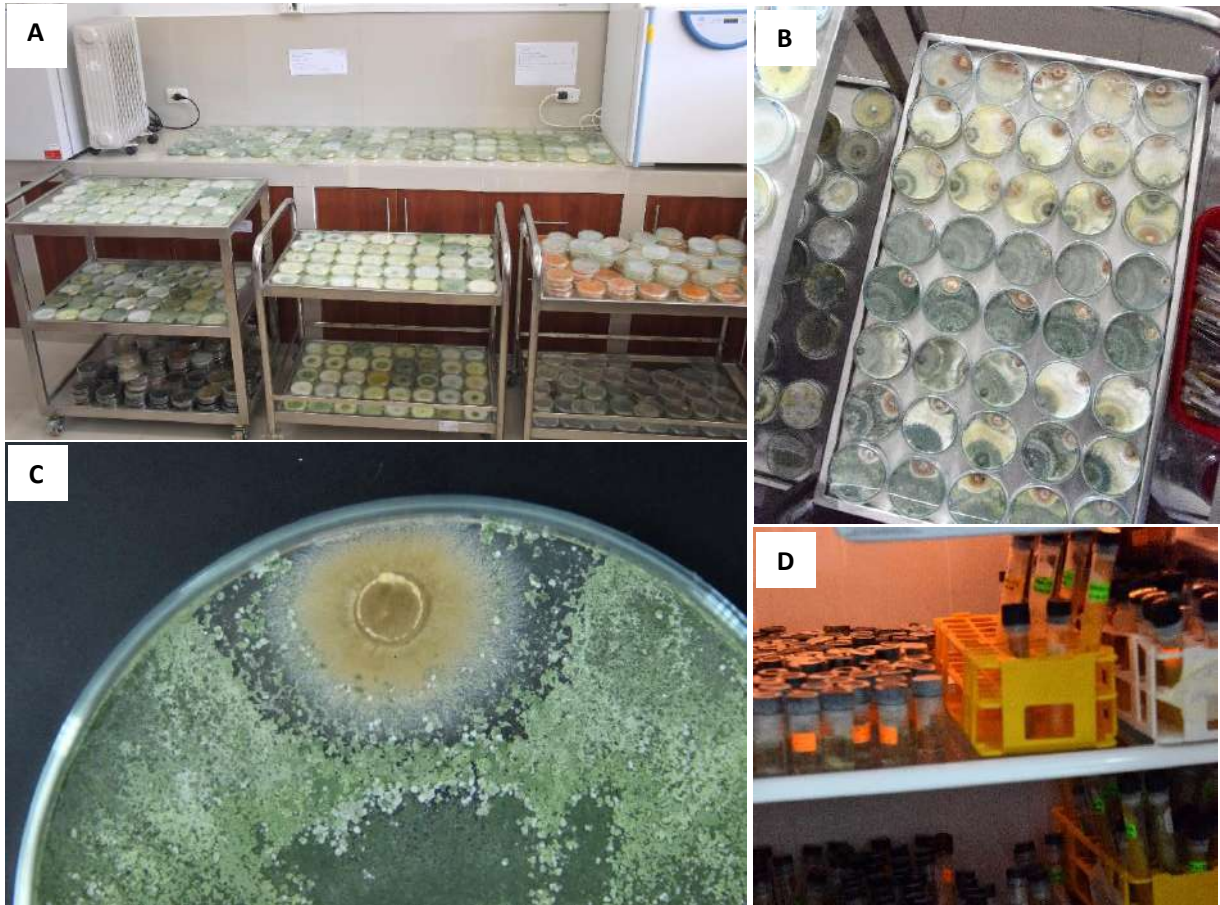
**Foto 10.** Preparación del caldo biofungicida a base de *Trichoderma* sp. Como parte del proceso de aplicación en campo definitivo para el control de la MC, Amazonas, enero de 2021.



**Foto 11.** Imagen que corresponde al proceso de extracción de ADN, como parte de la identificación molecular de especies de *Trichoderma*. A: Extracción; B: Electroforesis, Amazonas, marzo de 2020.



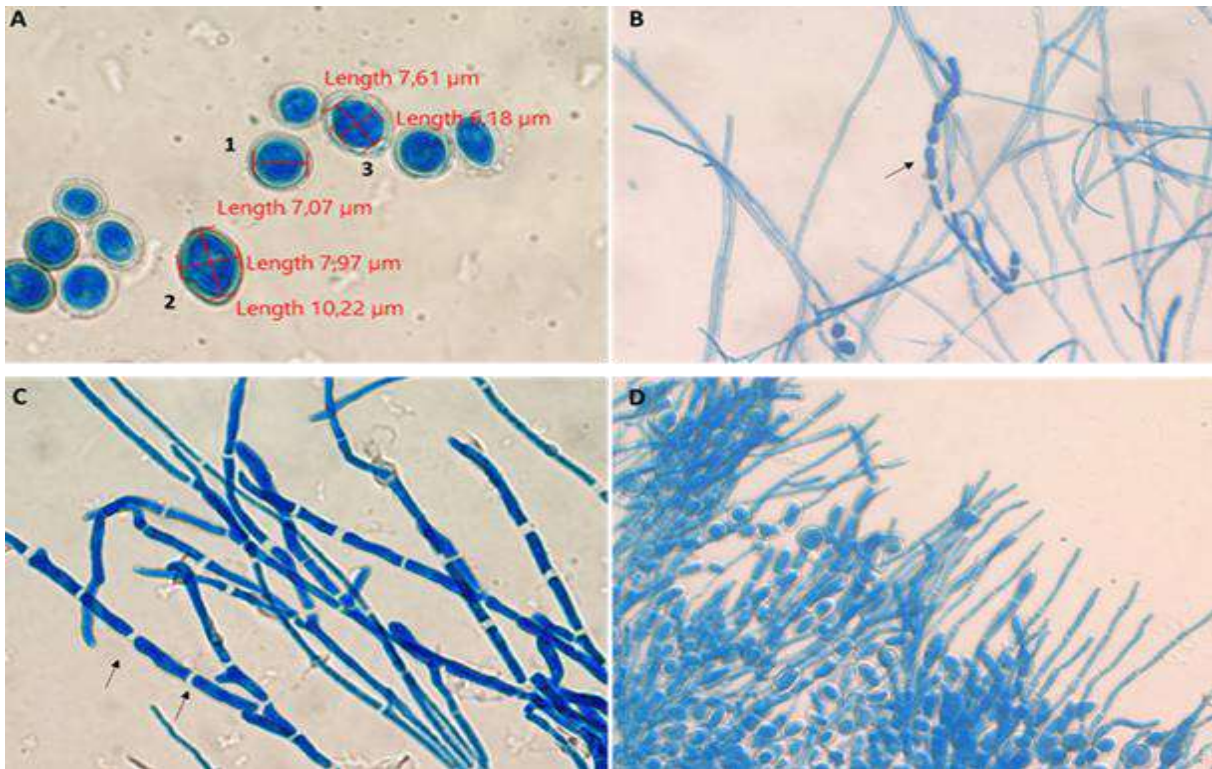
**Foto 12.** A: Tubos de PCR de 1.5 mL, conteniendo ADN de *Trichoderma* spp.; B: Preparación de muestras para PCR. Laboratorio de Sanidad Vegetal UNTRM, Amazonas, 2020.



**Foto 13.** A: Placas Petri en proceso de antibiosis; BC: Micoparasitismo; D: Conservación de aislados de *Trichoderma* en PDA y Glicerol. Laboratorio de Sanidad Vegetal –UNTRM. 2019 – 2022.



**Foto 14.** Laminas porta objetos con montaje de estructuras microscópicas de especies de *Trichoderma* spp. Laboratorio de Sanidad Vegetal –UNTRM. 2019 - 2022



**Foto 15.** Estructuras morfológicas como parte de la caracterización de aislado de *Moniliophthora roreri* cepa MBG\_1, recuperada de frutos de cacao de la localidad de quebrada seca (primer reporte de moniliasis en el Perú). A: conidios; B: conidióforos; C: hifas septadas; D: micelio.



**Foto 16.** Moniliasis del cacao causado por *M. roreri* en frutos del cacao de la región Amazonas, publicado por la sociedad Americana de Fitopatología <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>



**Foto 17.** Identificación y codificación, mediante cintas de colores diferentes a siete generaciones sucesivas de frutos de cacao. Ensayo experimental en campo. Amazonas, 2021



**Foto 18.** Evaluación de incidencia y severidad externa de los daños causados por la moniliasis del cacao. Bagua Grande - Amazonas, 2020 - 2021.



**Foto 19.** Ensayo experimental de control biológico de la MC *in-vivo* instalado en Quebrada Seca, Bagua Grande - Amazonas, marzo del 2021.



**Foto 20.** Aplicación del caldo Biofungicida a base de Trichoderma como parte del proceso de evaluación de eficacia del control de la moniliasis del cacao. Amazonas 2020 -2021.





**Foto 21.** Proceso de evaluación de incidencia, severidad externa e interna al momento de la cosecha de frutos (séptima generación). Amazonas 2020 -2021.



**Foto 22.** Proceso de evaluación y pesaje de frutos de cacao provenientes del tratamiento CP24\_6 (*Trichoderma afroharzianum*). Cosecha de ensayo Llunchicate. Amazonas 2020 -2021.



**Foto 23.** Frutos de cacao provenientes del tratamiento F14\_M3 (*Trichoderma longibrachiatum*). Cosecha de ensayo Quebrada Seca. Bagua Grande, Amazonas 2020 -2021.



**Foto 24.** De Pie y izquierda a derecha: Beimer Chuquibala, Gian Rabanal, Antony Chavez, Elgar Hernández, Marco Centurión (propietario de la parcela Llunchicate); sentados: Oswaldo Ananco, Santos Leiva y Agustín Quispe. Cosecha y pesaje del cacao. Amazonas, 2021.