



**Somos calidad,
somos USC**

Estudio de la germinación y desarrollo de semillas de cacao (*Theobroma cacao*) tratadas con los hongos *Trichoderma harzianum* y *Metarhizium anisopliae*

**Autor
Santiago Portilla Riascos**

**Título por el que opta
Microbiólogo**

**Director
Julián Alfonso Rojas Barreto, PhD Director
Carlos Andrés Martínez Garay, PhD**

**Grupo de Investigación
GIMIA**

**Línea de Investigación
Microbiología ambiental**

**Ciencias básicas
Microbiología
Universidad Santiago de Cali
Santiago de Cali - Colombia 2025**

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Científico	<ul style="list-style-type: none">•Trabajo de grado aprobado para optar por el título de microbiólogo•Generación de nuevo conocimiento.	Grupo de investigación de la Universidad Santiago de Cali

Estudio de la germinación y desarrollo de semillas de cacao (*Theobroma cacao*) tratadas con los hongos *Trichoderma harzianum* y *Metarhizium anisopliae*

Santiago Portilla Riascos¹, Julián Alfonso Rojas Barreto, PhD², Carlos Andrés Martínez Garay PhD,³

¹Semillero de Biotecnología del grupo GIMIA. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia

RESUMEN

El uso de fertilizantes químicos ha contribuido al aumento de la producción de alimentos para una población que sigue creciendo. No obstante, el uso de estos produce un gran impacto en la medida que deterioran el ambiente, por lo que es necesario buscar prácticas agrícolas sostenibles. Uno de los cultivos con mayor exportación por parte de Colombia es el cacao, siendo este de gran calidad a nivel mundial, pero sin ser rentable por los insumos usados para su comercialización. Con base a lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo encontrar un equilibrio entre la demanda de alimentos y una agricultura sostenible. Para ello se evaluó el potencial de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Metharrizium anisopliae* como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) sobre la germinación y el crecimiento en semillas y plantas de cacao a través de la observación y el registro diario de estas. Los resultados evidenciaron un aumento del 10% en el porcentaje de germinación y una aceleración en la velocidad de crecimiento de las semillas alcanzando 5.3 semillas/día con el hongo *T. harzianum* en comparación al control en laboratorio. Asimismo, se obtuvo un mayor número de raíces secundarias al ser tratadas con los hongos *T. harzianum* y *M. anisopliae*. Se concluye que, si bien estos hongos promueven mejoras en las semillas del cacao, es recomendable continuar con investigaciones, especialmente en cepas silvestres, con el fin de validar los datos obtenidos.

Palabras clave: Promotor de crecimiento, Cultivos, Auxinas, Solubilizador de fosfatos, características agronómicas.

Study of germination and development of cocoa seeds (*Theobroma cacao*) treated with the fungi *Trichoderma harzianum* and *Metarhizium anisopliae*

ABSTRACT

The use of chemical fertilizers has contributed to increased food production for a growing population. However, their use has a significant impact on the environment, making it necessary to seek sustainable agricultural practices. One of Colombia's largest export crops is cacao, which is of high quality worldwide, but its production is not profitable due to the inputs used in its marketing. Based on this, this study aimed to find a balance between food demand and sustainable agriculture. To this end, the potential of the fungi *Trichoderma harzianum* and *Metarhizium anisopliae* as plant growth-promoting microorganisms (PGMs) on germination and growth in cacao seeds and plants was evaluated through daily observation and recording. The results showed a 10% increase in the germination percentage and an acceleration in seed growth rate, reaching 5.3 seeds/day with the fungus *T. harzianum* compared to the laboratory control. Furthermore, a greater number of secondary roots were obtained when treated with the fungi *T. harzianum* and *M. anisopliae*. It is concluded that, although these fungi promote improvements in cacao seeds, further research is recommended, especially in wild strains, to validate the data obtained.

Keywords: Growth promoter, Crops, Auxins, Phosphate solubilizer, agronomic characteristics.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura intensiva ha desempeñado un papel fundamental en la obtención de alimentos al introducir técnicas y prácticas que potencian la producción agrícola como el uso de agroquímicos, el monocultivo y la mecanización de la agricultura. Sin embargo, a medida que la demanda de productos de alta calidad aumenta, también lo hacen los desafíos asociados con la sostenibilidad de los suelos y el impacto ambiental de este tipo de prácticas. Al respecto, en los últimos años ha aumentado el uso de insumos químicos como fertilizantes y pesticidas lo que ha generado efectos adversos en el equilibrio ecológico [1]. Este tipo de insumos contienen sustancias como el amoníaco y el dióxido de carbono, las cuales han provocado cambios irreversibles en la tierra, tales como variaciones en el pH y la pérdida de biodiversidad microbiana. A su vez, estos productos pueden infiltrar cuerpos de agua, ocasionando toxicidad en fuentes subterráneas y superficiales, lo que impacta tanto la calidad del agua como la salud humana y animal. En el aire, la liberación de gases como el metano y el amoníaco contribuye significativamente a la contaminación atmosférica y al cambio climático [2].

Numerosos estudios han documentado los efectos negativos de la agricultura intensiva sobre la salud del suelo y la biodiversidad. Por ejemplo, se ha señalado que el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados ha incrementado la eutrofización de ecosistemas acuáticos y la degradación del suelo, lo que compromete su fertilidad a largo plazo [3]. Por otro lado, los pesticidas químicos han sido asociados con la disminución de polinizadores esenciales, como abejas y mariposas, lo que reduce la productividad agrícola y amenazando la seguridad alimentaria [4]. Además, la conversión de suelos forestales en tierras de cultivo ha intensificado la emisión de carbono a la atmósfera, contribuyendo al cambio climático [5].

Ante estos problemas, es imperativo encontrar soluciones sostenibles que mitiguen los daños causados por agroquímicos como pesticidas y fertilizantes. En este contexto, los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) han surgido como una alternativa viable. Estos microorganismos incluyen una amplia variedad de bacterias y hongos con la capacidad de mejorar la salud y el desarrollo de las plantas a través de diversos mecanismos biológicos [6]. Los mecanismos de acción de los MPCV se clasifican en extracelulares, que ocurren en la rizosfera, e intracelulares, que actúan dentro de los tejidos de la planta [7]. Entre los efectos directos de estos microorganismos se encuentran la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de minerales esenciales como el fósforo y la síntesis de fitohormonas como las auxinas. Por otro lado, sus efectos indirectos incluyen la producción de compuestos antibacterianos, la inducción de resistencia sistémica y el biocontrol de fitopatógenos [8].

Entre los MPCV con mayor interés biotecnológico y ambiental se encuentra el hongo *Trichoderma harzianum*, ampliamente reconocido por su capacidad para colonizar diversos ambientes y mejorar el desarrollo de las plantas. Este microorganismo ejerce efectos beneficiosos en la rizosfera mediante procesos de biocontrol como la antibiosis, la competencia por nutrientes y la inducción de tolerancia al estrés. Investigaciones previas han demostrado que *T. harzianum* puede desarrollar tolerancia al estrés, evitando que se marchite, lo que mejora el crecimiento de la raíz y la planta [9]. En el trigo, la interacción con este hongo ha resultado en un incremento del tamaño de la raíz principal y lateral, lo que mejora la absorción de nutrientes y, por ende, el crecimiento vegetal. Además, *T. harzianum* contribuye a la biorremediación de suelos al favorecer la descomposición de materia orgánica y la regeneración de ecosistemas degradados [10].

Otro microorganismo con potencial biotecnológico es el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, el cual es utilizado como alternativa a los pesticidas químicos en el control biológico de enfermedades vegetales. Este hongo ha demostrado ser eficaz en la protección de cultivos como el tomate y el melón [11, 12]. Estudios recientes han evidenciado que su presencia en la rizosfera favorece la altura de la planta, el desarrollo radicular y la acumulación de biomasa [13]. Además, *M. anisopliae* genera mecanismos de defensa adicionales, como la producción de compuestos antifúngicos y la parasitación de insectos fitófagos, lo que incrementa la resistencia de los cultivos a diversas amenazas bióticas. Este hongo también ha demostrado mejorar la respuesta antioxidante en plantas como soja, café y maíz, lo que contribuye a su adaptación a condiciones de estrés ambiental [14].

Uno de los cultivos de mayor relevancia económica y social a nivel global es el cacao, materia prima esencial en la producción de chocolate. En Colombia, este cultivo se encuentra principalmente en departamentos como Santander, Huila y Tolima, donde se ha posicionado como un producto de alta calidad en el mercado internacional [15]. En 2022, Colombia ocupó el puesto 27 en exportaciones de cacao y contaba con más de 7 millones de hectáreas potenciales para su cultivo [16]. Sin embargo, la producción de cacao enfrenta numerosos desafíos, como el alto costo del material de siembra y la susceptibilidad a enfermedades fúngicas e insectos plaga. Entre los principales agentes fitopatógenos que afectan a este cultivo se encuentran *Monilium dissimulatum*, *Monilophthora roreri* y *Phytophthora spp.*, los cuales reducen significativamente la calidad y cantidad de la producción [17].

Por lo anterior, el uso de MPCV como *T. harzianum* y *M. anisopliae* representa una estrategia sostenible para mejorar la productividad del cacao sin recurrir al uso excesivo de insumos químicos. Estudios han demostrado que la aplicación de estos hongos no solo mejora la germinación de semillas y el crecimiento radicular, sino que también fortalece la resistencia del cacao frente a patógenos como *Phytophthora palmivora* [18]. A partir de lo anterior, este estudio plantea saber la eficacia de los hongos *T. harzianum* y *M. anisopliae* en el desarrollo de las plantas de cacao, donde se propone el objetivo de evaluar el porcentaje de germinación y la velocidad de crecimiento en semillas de cacao tratadas con estos hongos, así como determinar sus efectos sobre el desarrollo de las plantas. Con esta investigación, se busca proporcionar una solución biotecnológica que optimice las prácticas agrícolas y contribuya a la sostenibilidad del sector cacaotero.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las semillas de cacao se adquirieron en la Asociación de productores de Cacao del centro del Valle del Cauca, que se encuentra en la ciudad de Tuluá, Valle del Cauca. Se obtuvieron las soluciones de las esporas de *T. harzianum* del producto comercial BIODERMA (BIOTROPICAL S.A) el cual contiene una concentración de 1×10^{10} esporas/ gramo. Para el hongo *M. anisopliae* se utilizó el producto comercial RAXTER (BIO-CROP) que está a una concentración de 2×10^8 esporas/gramo.

2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE ESPORAS DE LOS HONGOS

La preparación de soluciones de esporas de los hongos se realizó en agua destilada estéril donde se obtuvo la concentración de esporas de los hongos usadas para el ensayo en el laboratorio y en vivero, como se observa en la tabla 1. Se generaron diferentes concentraciones para sembrar las semillas en el laboratorio y vivero, debido a un intervalo de tiempo de un mes de siembra, para una mejor obtención de datos, por lo que se prepararon nuevamente las soluciones para ser utilizadas en el vivero. Primero se sembraron las semillas en el laboratorio, posteriormente se llevó a cabo la siembra de las semillas en el vivero, para obtener mejor recolección de datos y se verificaron las concentraciones de las soluciones con la cámara de Neubauer.

Tabla 1. Concentraciones de hongos usadas para la inoculación de semillas para laboratorio y vivero

Tratamiento	Concentración usada en laboratorio	Concentración usada en vivero	Número semillas usadas en laboratorio	Número semillas usadas en vivero
<i>T. harzianum</i>	5×10^9 esporas/mL	5.5×10^9 esporas/ mL	40	40
<i>M. anisopliae</i>	$1,9 \times 10^9$ esporas/mL	$1,2 \times 10^9$ esporas/ mL	40	40
Control	Agua destilada	Agua destilada	40	40

2.3 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS DE CACAO E INOCULACIÓN CON LAS ESPORAS DE LOS HONGOS

Se usaron un total de 240 semillas de cacao, las cuales se desinfectaron sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 1%, durante 10 minutos. Pasado este tiempo, las semillas se lavaron con agua destilada estéril 5 veces. Seguidamente se usaron 120 semillas para el ensayo en laboratorio y en 120 para la prueba en vivero, en donde 80 semillas se usaron para el tratamiento con *T. harzianum*, 80 para *M. anisopliae*, las cuales se sumergieron en las soluciones de esporas respectivas por 10 minutos. Las 80 semillas restantes se usaron para el control donde se utilizó agua destilada estéril (Tabla 1).

2.4 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CACAO EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y VIVERO

Se realizó el ensayo en laboratorio con 120 semillas que se dividieron para cada tratamiento, las cuales se ubicaron sobre papel filtro estéril, colocando 4 semillas por caja Petri previamente esterilizada. Se incubaron a una temperatura de 20-25°C, manteniendo diariamente las condiciones de humedad con un gotero con el cual se aplicó agua destilada estéril cada 12 horas. Se evaluó el porcentaje de germinación para definir la cantidad de semillas viables con respecto al número de semillas totales sembradas con la ecuación 1. Se realizó el seguimiento de las semillas durante 8 días.

$$\text{Ecuación 1: \% de germinación} = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{total de semillas}} * 100$$

2.5 TIEMPO DE CRECIMIENTO Y MEDICIONES DE LAS PLANTAS DE CACAO EN VIVERO

Para el ensayo en vivero se utilizaron 120 semillas de cacao, distribuidas equitativamente para cada ensayo. Estas fueron sembradas en bolsas de semillero, depositando dos semillas por bolsa en un sustrato compuesto por tierra y cascarilla de arroz, a una profundidad de un centímetro. Para mantener la humedad del sustrato, se regaron cada tres días. Se monitoreó el porcentaje (velocidad) de crecimiento de las plantas, revisándolas cada 24 horas y registrando los datos de aquellas que presentaban desarrollo.

Las mediciones de las plantas de cacao se realizaron tres semanas después de la siembra, dado que, a partir de este período, el crecimiento radicular requiere su trasplante al suelo, para evitar restricciones en su desarrollo.

2.6 DETERMINACION DE VELOCIDAD DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CACAO

Se calculó la velocidad de germinación de las semillas de cacao para conocer la rapidez en la que las semillas emergen y se desarrollan en el laboratorio y en vivero. Para la prueba en laboratorio se examinaron transcurridos 8 días desde la siembra, y en vivero se realizó esta medición por 10 días, el tiempo en que empezó la generación de cotiledones. Para ambas pruebas se evaluó con la ecuación 2.

$$\text{Ecuación 2: Velocidad de germinación} = \frac{\sum \# \text{ semillas germinadas en el intervalo de tiempo}}{\sum \# \text{ días después de la siembra}}$$

2.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS HONGOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE CACAO

Se midieron diferentes características de la planta para determinar el crecimiento en condiciones de vivero usando los diferentes tratamientos después de tres semanas desde la siembra debido a que posterior a ese tiempo se deben trasplantar al suelo para seguir con su proceso de crecimiento. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

2.7.1 Longitud de la raíz primaria (cm)

Se colocó la raíz de la planta de cacao sobre una hoja de papel milimetrada. La longitud se determinó midiendo desde la división del tallo de la planta a la raíz principal.

2.7.2 Número de raíces secundarias

Se contaron manualmente la cantidad de raíces secundarias que se originaron a partir la raíz principal de cada planta de cacao.

2.7.3 Elongación del tallo (cm)

Se midió el tallo de la planta de cacao, sobre una hoja papel milimetrada, desde donde empieza la división de la raíz de la planta hasta la yema terminal.

2.7.4 Área de la hoja 1 y hoja 2 (cm²)

Se colocó la primera hoja (hoja 1) que crece de la planta de cacao en una hoja papel milimetrada para medir el largo y el ancho de la planta, seguido de la hoja que crece después de la primera (hoja 2) para determinar los mismos factores, calculando el área de ambas hojas con la ecuación 3.

2.7.5 Biomasa seca (g)

Después de medir las variables anteriores, se colocó cada planta completa en una balanza analítica, para determinar el peso húmedo, posteriormente se trasladó cada planta de los tratamientos de los hongos y control a una bolsa de papel, llevándolas a un horno a una temperatura de 180°C por 24 horas, donde se determinó el peso seco de la planta en la balanza analítica y se calculó usando la ecuación 4.

$$\text{Ecuación 3: Área de la hoja} = \text{largo de la hoja} * \text{ancho de la hoja}$$

$$\text{Ecuación 4: Biomasa seca} = \text{peso húmedo de la muestra} - \text{peso seco en el horno}$$

2.8 AISLAMIENTO DE LOS HONGOS PARA ANALISIS DE CAPACIDAD SOLUBILIZADORA DE FOSFATOS Y DETERMINACION DE ACIDO INDOL ACETICO

Se utilizó el producto BIODERMA y el producto RAXTER, en donde se sembraron las esporas de los hongos por punción en medio PDA (Extracto de patata (4 g/L) Dextrosa (20 g/L), Agar-agar (15 g/L), se incubaron por 8 días a una temperatura de 25°C.

2.9 ANÁLISIS CAPACIDAD SOLUBILIZADORA DE FOSFATOS DE LOS HONGOS

Para este proceso se sembró el hongo en medio Pikovskaya (extracto de levadura 0.5g/L, dextrosa 10 g/L, fosfato de calcio 5 g/L, sulfato de amonio 0.5g/L, cloruro de potasio 0.2 g/L, sulfato de magnesio 0.1g/L, sulfato de manganeso 0.0001 g/L, sulfato férrico 0.0001 g/L, agar bacteriológico 15 g/L) usado para determinar la capacidad de solubilización de fosfato del hongo por su alta eficiencia al seleccionar los microorganismos capaces de esto, ya que el extracto de levadura proporciona el nitrógeno necesario para ayudar al crecimiento de los hongos, y la dextrosa es utilizada como fuente de energía, lo que logra la obtención de diferentes sales que generan los metabolitos secundarios que le ayudaran a seguir creciendo formando una zona clara alrededor de la colonia. Se incubó el hongo a una temperatura de 25° C por 8 días, posteriormente se observó y midió la generación de un halo alrededor de la colonia.

2.10 ANÁLISIS ESTADISTICO

Se evaluaron los datos del efecto de los hongos sobre el crecimiento de las plantas de cacao en el programa RStudio, donde se realizó el análisis Shapiro para determinar la normalidad de los datos; posteriormente se hizo la prueba Barlett para comprobar la homogeneidad de la varianza. Para los datos que no tuvieron una distribución normal se analizaron con la prueba Kruskal-Wallis ($p \text{ value} < 0.05$) y los datos que cumplían características de normalidad y homogéneas fueron sometidos a ANOVA, con una diferencia mínima significativa ($p \text{ value} > 0.05$). Para los análisis que dieron diferencias significativas usando la prueba Kruskal-Wallis se utilizó la prueba Post-Hoc MANN WHITNEY WILCOXON, mientras que para ANOVA la prueba Tukey.

3 RESULTADOS

3.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CACAO

Se comparó la cantidad total de semillas que germinaron con los hongos *T. harzianum*, *M. anisopliae* y el control con respecto al total de semillas sembradas en el laboratorio y en el vivero donde se determinó la cantidad de semillas que crecieron al finalizar los ensayos, como se evidencia en la tabla 2. Las semillas inoculadas en el laboratorio con hongos alcanzaron un porcentaje de germinación del 87.5% al finalizar el período de siembra, en comparación con un 77.5% para las semillas que no recibieron ningún tratamiento.

Para las semillas tratadas en condiciones de vivero se obtuvo un 100% de germinación con los tratamientos de los hongos, mientras que para las semillas con el control su porcentaje fue de 97.5%.

Tabla 2. Porcentaje de germinación de cada tratamiento de las semillas de cacao

Tratamiento	Porcentaje de germinación en laboratorio (n=40)	Porcentaje germinación en vivero (n=40)
<i>Trichoderma harzianum</i>	87.5%	100%
<i>Metarhizium anisopliae</i>	87.5%	100%
Control	77.5%	97.5%

3.2 VELOCIDAD DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CACAO

Para el tiempo transcurrido desde el momento en que se sembraron las semillas en las cajas Petri en el laboratorio se obtuvo una mayor velocidad de germinación en las semillas con *T. harzianum*, comparado con los otros dos tratamientos, teniendo un crecimiento de 29.9 semillas germinadas/día en relación con el control que tuvo una velocidad de 24.6 germinadas/día, mientras que el control con el hongo *M. anisopliae* se generó un crecimiento de 28.5 semillas germinadas/día como se registra en la tabla 3. Para la velocidad de germinación en el vivero, el tratamiento con el hongo *M. anisopliae* mostró una mayor velocidad de 3.06 semillas germinada/día, superando a los otros dos tratamientos donde obtuvieron una velocidad de 3.05 semillas germinadas/día (Tabla 3).

Tabla 3. Velocidad de germinación de cada tratamiento de las semillas de cacao

Tratamiento	Velocidad de germinación en laboratorio (semilla germinada/día)	Velocidad de germinación en vivero (semilla germinada/día)	Cambio relativo de la velocidad de germinación en laboratorio ^a	Cambio relativo de la velocidad de germinación en vivero ^a
<i>Trichoderma harzianum</i>	29.9	3.05	1.21	1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	28.5	3.06	1.15	1.003
Control	24.6	3.05		

^a Para medir el cambio relativo en la velocidad de germinación se obtuvo la razón entre la velocidad de germinación con cada tratamiento y la velocidad de germinación del control.

Para cada tratamiento realizado en el laboratorio se observó crecimiento de los hongos al cabo de 8 días. Las semillas están recubiertas casi en su totalidad por un hongo blanco, con tonos verdes, de textura de algodón, con la germinación de la raíz para tratar de seguir su crecimiento como se observa en la figura 1(A); las semillas con el tratamiento de *M. anisopliae* después de 8 días de tratamiento, estaban recubiertas por un hongo de color verde, de textura esponjosa, con parte de la raíz germinando expuestas en la figura 1 (B), por último, las semillas control no poseían ningún hongo, y 2 de las 4 semillas germinaron, reflejadas en la figura 1.

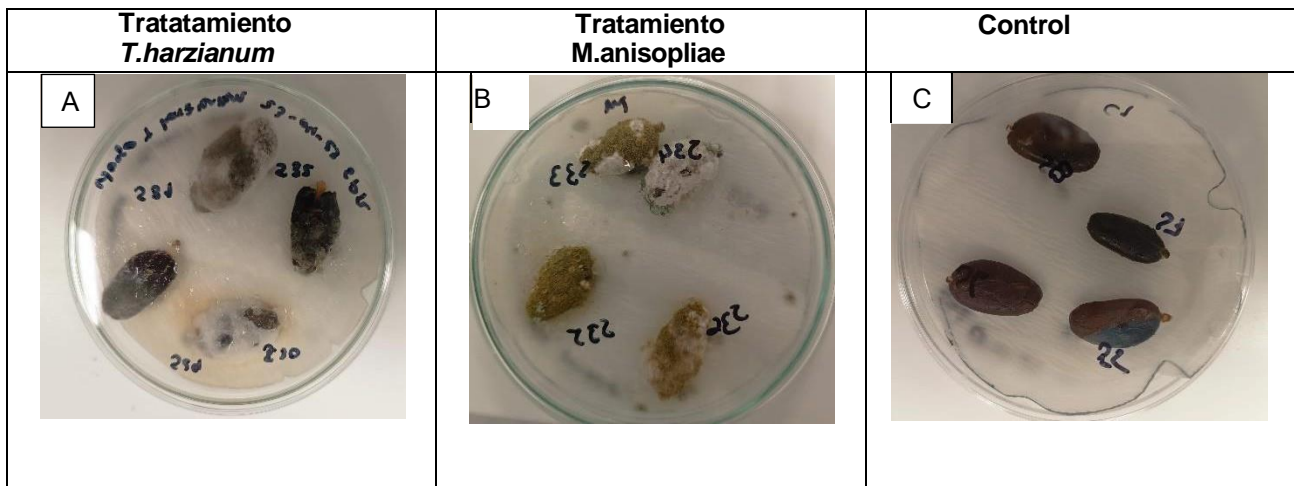


Figura 1. (A) Tratamiento de *T. harzianum* en semillas de cacao en caja Petri. (B) Tratamiento de *M. anisopliae* en semillas de cacao en caja Petri. (C) Tratamiento control de semillas de cacao en caja Petri.

Para los tratamientos en condiciones de vivero se observa en la figura 2 (A) las semillas germinadas inoculadas con el hongo *T. harzianum* después de 14 días, evidenciando sus primeras hojas. En la figura 2 (B), las semillas generaron sus primeras hojas, después de 14 días de siembra. Por último, en la figura 2 (C), las semillas control se evidencia crecimiento de las semillas, con sus respectivas hojas después de 2 semanas.

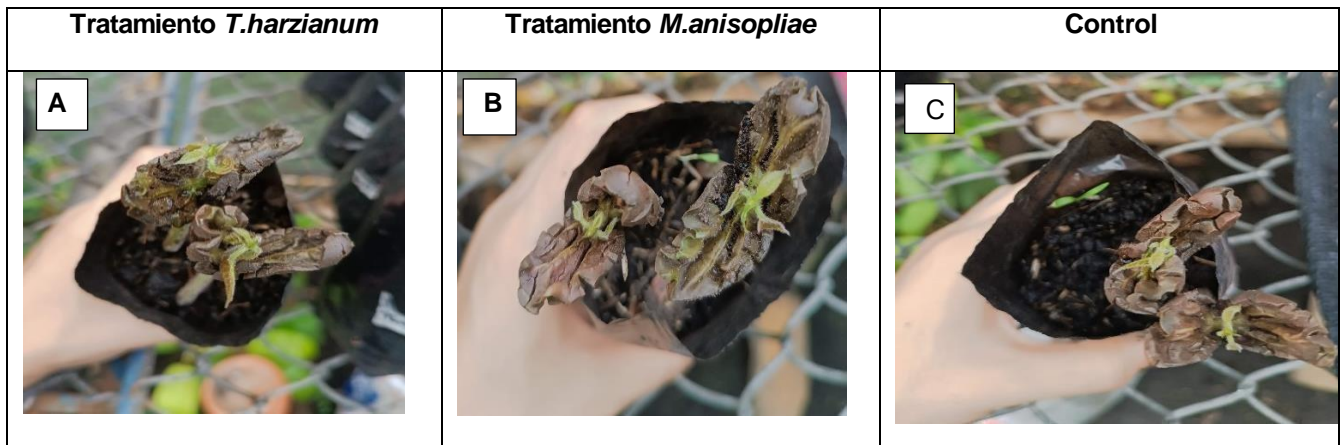


Figura 2. (A) Tratamiento con el hongo *T. harzianum* en plántula de cacao en vivero. (B) Tratamiento con el hongo *M. anisopliae* en plántula de cacao en vivero. (C) Tratamiento control en plántula de cacao en vivero.

Finalmente, en la figura 3 se presentan las plantas de cacao después de 3 semanas de siembra, donde se llevaron a cabo las mediciones de la elongación del tallo, la longitud de la raíz primaria, el número de raíces secundarias, el área de las hojas 1 y 2 y la biomasa seca (Tabla 4).



Figura 3. Plantas de cacao después de 21 días de crecimiento

3.3 EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS DE CACAO

Se tomaron los datos de las diferentes características de las plantas que se analizaron, donde se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la tabla 4.

Tabla No 4. Resultados de características de las plantas de cacao

Tratamiento	Elongación tallo (cm)	Longitud raíz primaria (cm)	Numero raíces secundarias	Área hoja 1 (cm ²)	Área hoja 2 (cm ²)	Biomasa seca (g)
<i>T. harzianum</i>	19,55±2,86	7,00±2,06	80,65±17,57a	30,83±14,75a	24,06±15,05a	2,68 ±0,44a
<i>M. anisopliae</i>	20,40±2,51	7,67±1,82	86,53±13,30a	37,10±17,08a	28,48±14,44a	2,93±0,48a
Control	20,09±1,93	7,55 ±2,05	69,73±13,72ab	43,97±12,90b	38,15±13,67b	2,98±0,34b

*Tratamientos con letras diferentes representan diferencias significativas (p value < 0.05)

El tratamiento con el hongo *M. anisopliae* obtuvo el mayor promedio de elongación del tallo; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos con el hongo *T. harzianum* y el control (ANOVA p value = 0.292 > 0.05) reflejados en la tabla 4 y en la figura 4(A).

En la longitud de la raíz primaria se indica que la planta con el hongo *M. anisopliae* mostró una mayor longitud con respecto a los otros dos tratamientos en el que hubo una diferencia de 0.67 cm con respecto al tratamiento de *T. harzianum* y con el control una diferencia de 0,12 cm, pero no se encontró una diferencia significativa en esta característica por lo que los hongos no ayudaron a incrementar la longitud de la raíz (ANOVA p value =0,268>0,05) (tabla 4, figura 4(B)).

En el número de raíces secundarias se observa una mayor cantidad de raíces en las plántulas de cacao tratadas con el hongo *M. anisopliae*, con una diferencia de 16.8 raíces secundarias frente al control, teniendo una diferencia significativa (Kruskal-Wallis p value= 5.785x10⁻⁶ < 0.05C) (tabla 4, figura (C)). De igual manera el hongo *T. harzianum* generó un promedio mas alto que el control, con una diferencia de 11.52 cm, de igual manera hay diferencias significativas.

En el área de la hoja 1, se evidenció una diferencia significativa (ANOVA p value = 0.000989 < 0.05) entre el promedio del grupo control y los tratamientos con hongos. El tratamiento más bajo correspondió a *T. harzianum*, que presentó una diferencia de 13.14 cm² respecto al área foliar mayor del control (tabla 4 figura 4(D)). El análisis del área foliar en la hoja 2 reveló una diferencia significativa en el grupo de control (ANOVA p value= 0.000119 < 0.05), destacándose sobre los tratamientos realizados con los dos hongos. El tratamiento control tuvo una diferencia de 9.67 cm² con respecto al hongo *M. anisopliae* el segundo valor más alto, mientras que con el tratamiento del hongo *T. harzianum* la diferencia es de 14.06 cm², como se observa en la tabla 4 y la Figura 4(E).

Por último, en la biomasa seca, en el control se generó mayor biomasa seca en relación con los hongos siendo significativa (ANOVA p value = 0.0042<0,05), donde el control tiene una diferencia de 0.3 g con respecto al hongo *M. anisopliae*, dispuestos en la tabla 4, figura 4(F).

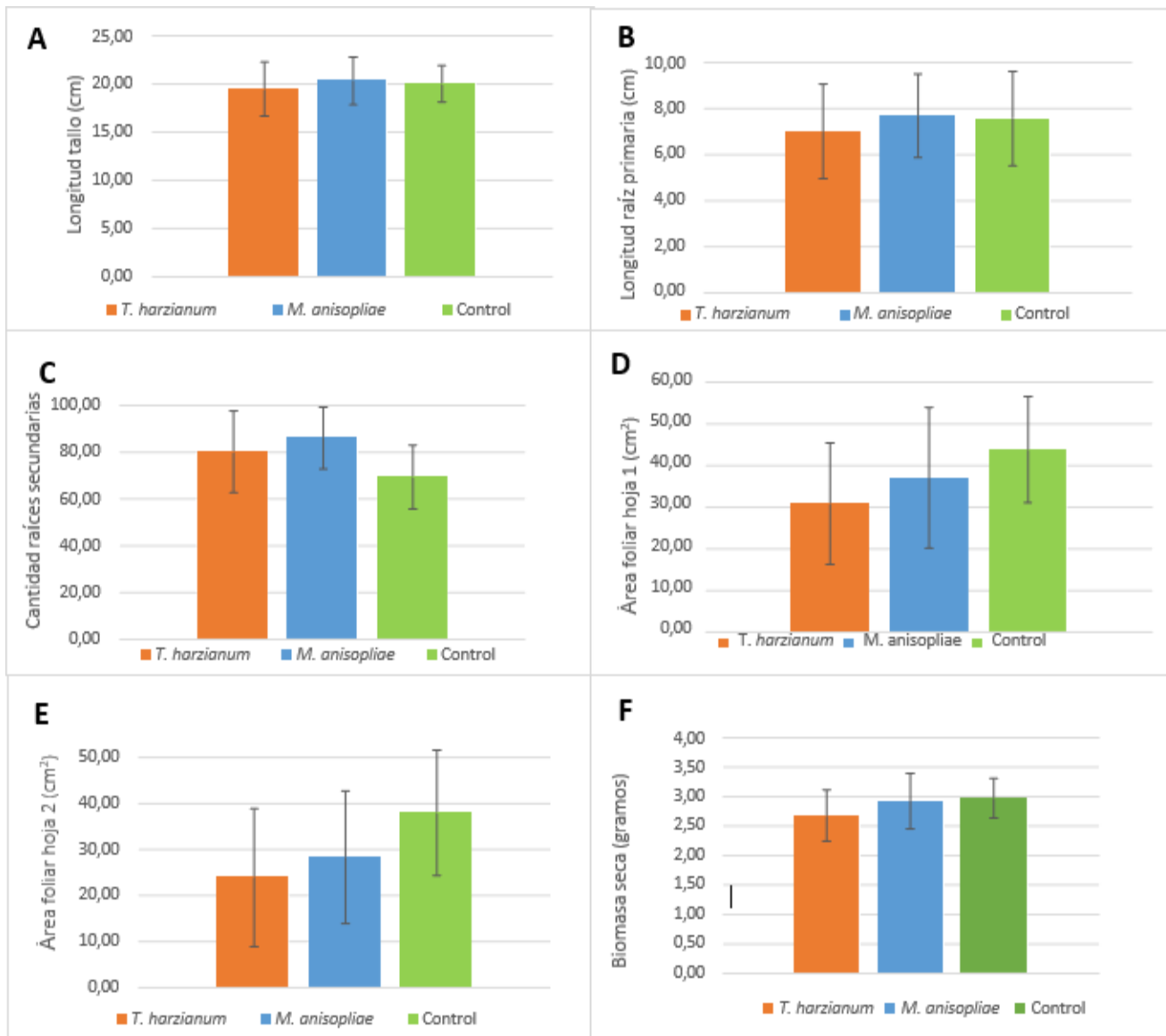


Figura 4. Variables de las plántulas de cacao sometidas a los tratamientos en condiciones de vivero. **(A)** Medición de la longitud del tallo. **(B)** Medición de la longitud de la raíz primaria. **(C)** Cantidad de raíces secundarias. **(D)** Área foliar de la hoja 1. **(E)** Área foliar de la hoja 2. **(F)** Biomasa seca.

3.4 ANÁLISIS CAPACIDAD SOLUBILIZADORA DE FOSFATOS DE LOS HONGOS

El resultado de la capacidad solubilizadora de fosfatos se realizó para el hongo *T. harzianum* en la que no se evidenció halo en el medio como se muestra en la figura 10. La capacidad de solubilización de fosfatos no se determinó en el hongo *M. anisopliae* debido a que no se consiguió aislar.

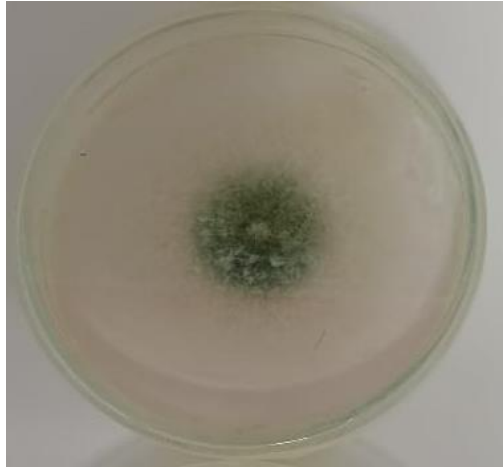


Figura 10. Medio Pikovskaya con hongo *T. harzianum* sin halo

3.5 DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE ACIDO INDOL ACETICO (AIA)

Para la producción de AIA, para el hongo *T. harzianum* suplementado con L-triptofano y sin suplementar, el hongo no produjo esta hormona. Mientras que para el hongo *M. anisopliae* no se logró aislar por lo que no se pudo determinar la producción de AIA.

4 DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

La evaluación de la germinación de las semillas de cacao en vivero y laboratorio mostró que las semillas tratadas con *T. harzianum* obtuvieron un mayor porcentaje de germinación en comparación con las semillas control. Aunque no se encontraron estudios recientes sobre la aplicación de *T. harzianum* en semillas de cacao en condiciones de laboratorio, investigaciones previas en césped (*Lolium multiflorum*) reportaron un porcentaje de germinación del 90.7% [19], por lo que en este estudio (87.5%) coincide con la tasa de entre el 87 al 90%, ayudando a germinar gran parte de las semillas. En el vivero, se observó que *T. harzianum* promovió un 100% de germinación, lo que concuerda con investigaciones previas en las que se reportó que el uso de *Trichoderma asperellum* en cacao, tuvo como resultado tasas de germinación entre 95 y 98% en semillas de cacao [20], demuestra que el hongo de género *Trichoderma* respalda un efecto beneficioso para la planta sobre los controles. Estos resultados demuestran que el hongo ayuda las etapas iniciales del crecimiento de las semillas, colonizando su superficie, así la planta invierte sus recursos y energía en crecer, ayudando a obtener más nutrientes y espacio, gracias a que el hongo le brinda defensas contra plagas, evitando así la competencia de la semilla por estos recursos.

Con respecto a *M. anisopliae*, existen pocas investigaciones recientes sobre el porcentaje de germinación en semillas. Uno de los estudios disponibles evaluó su impacto en el pimiento (*Capsicum annum*), donde se registró un porcentaje de germinación de 98.5% [21]. En esta investigación, se obtuvo un valor de 87.5% de germinación en el cacao, en condiciones de laboratorio. Esto sugiere que el *M. anisopliae* puede contribuir a una alta eficacia, ya que, en comparación con el grupo de control, se observó una diferencia del 10% de germinación durante el crecimiento del cacao. Del mismo modo, no se encuentran referencias que soporten la velocidad de crecimiento en plantas tratadas con el hongo *M. anisopliae*. En esta investigación, se observó una mayor velocidad de crecimiento en comparación con el grupo control. Los resultados plantean que el uso de esta cepa contribuye a una germinación del cacao más rápida y exitosa al favorecer el crecimiento de la semilla, ya que el hongo evita que se alimenten de esta, lo que favorece a la semilla a la obtención de recursos. Esto permitiría obtener plantas en menor tiempo, lo que contribuye a la reducción de costos asociados al uso de recursos como agua, energía e insumos agrícolas. Además, facilitaría una producción más oportuna para satisfacer la demanda del mercado y mejorar su comercialización.

Para el análisis de las plantas de cacao evaluadas en el vivero respecto a los diferentes tratamientos realizados, mostró que no había diferencias significativas en la elongación del tallo ($p= 0.292>0.05$) y la longitud de la raíz primaria ($p= 0.268>0.05$) con respecto al control. Esto contrasta con investigaciones en plantas como en la cresta de gallo (*Celosia cristata*) y el tomate tratado con *T. harzianum* que generó un porcentaje mayor de crecimiento mejorando la altura del tallo [22][23]. De misma manera, se observó este crecimiento con el hongo *M. anisopliae* induciendo un mayor tamaño en el tallo de la planta del chile [24]. El resultado de este estudio sugiere que el hongo al no generar AIA, la cual está ligada a la elongación de tallo y raíz primaria, genera un mecanismo de crecimiento alternativo, enfocado en el crecimiento lateral de la planta manifestada en el crecimiento de raíces secundarias, por lo que genera una inversión de energía diferente de la planta.

Por otro lado, para el número de raíces secundarias hubo una diferencia significativa con los hongos *T. harzianum* ($p=0.014$) y *M. anisopliae* con respecto al control ($p= 5.785 \times 10^{-6} < 0.05$). Lo anterior indica que este producto favoreció el desarrollo de más raíces en la planta, dando como resultado que este crecimiento radicular genera una inversión que se evidenciaría en un periodo de tiempo prolongado, ya que al tener mayor cantidad de raíces secundarias le otorga una mayor estabilidad y mejora su capacidad de absorber los nutrientes desde distintas zonas del sustrato, generando un mayor tamaño del árbol y aportando a que la cosecha de los frutos sea de mejor calidad. Por lo que podría explicar la superioridad en la tasa de velocidad de crecimiento, como el porcentaje de germinación superior al del control en vivero [25][26], esto ayudaría a la planta a estar mejor adaptada a un traslado y poder sembrarla en campo.

Para finalizar los aspectos evaluados en las plantas de cacao, estas presentaron diferencias significativas mostrando que en la hoja 1 ($p= 0.000989 < 0.05$), la hoja 2 ($p= 0.000119 < 0.05$) y la biomasa seca ($p= 0.00426 < 0.05$), los tamaños fueron menores con los hongos en comparación con el control. Por lo que este patrón de crecimiento contrasta con resultados donde los hongos actúan como MPCV aumentando estas características [26][27]. En esta evaluación, la planta tal como se describió en la elongación del tallo y longitud de raíz primaria, desvía sus recursos del crecimiento aéreo, al no generar una producción de AIA, dando un déficit a corto plazo, que espera ser superior en un lapso mayor de tiempo, gracias a invertir sus recursos a tener una mayor cantidad de raíces secundarias. Esto sugiere la necesidad de realizar estudios de seguimiento por un tiempo prolongado para identificar como y cuando las plantas inoculadas sobrepasan el déficit inicial de estos factores, y evidencian una mejora en la formación de la planta.

Una posible explicación en el caso de que *T. harzianum* no ayudara a mejorar el desarrollo de la plántula de cacao, fue la prueba en laboratorio, donde la ausencia del halo en el medio de cultivo, indica que la cepa usada del microorganismo no logra la solubilización efectiva de fosfatos, lo que sugiere que el hongo usado está enfocado como biocontrol de patógenos y no actúa como un MPCV en un lapso de tiempo corto para mejorar el crecimiento de la planta. Esta falta de evidencia puede indicar las limitaciones de la actividad biológica del microorganismo usado, ya que no logró solubilizar el fósforo presente en la cascarilla de arroz, por lo que la planta de cacao no lo pudo adquirir de una forma adecuada; En comparación con otro estudio en el cual el hongo aislado de una cepa ATCC incrementó la absorción de fosfatos ayudando al crecimiento de las plantas de tomate investigadas [28]. Por ende, para determinar de mejor manera este estudio, es recomendable intentar la prueba con una cepa silvestre, ya que esta adaptada a estar en condiciones ambientales genera que el hongo deba competir para su supervivencia por los nutrientes lo que generaría la solubilización para lograr tener resultados satisfactorios.

Para la producción de AIA por parte de nuestra cepa del hongo *T. harzianum*, no se generaron concentraciones de AIA en el laboratorio para determinar que este producto comercial del hongo ayudara a la obtención de este metabolito secundario. Por el contrario, una de las investigaciones realizadas, examinaron cepas silvestres de suelo, donde generaron valores altos de AIA, lo que ayudó a un aumento del crecimiento de las plantas de tomate, produciendo mayor área foliar en comparación con los controles [29]. La producción de metabolitos secundarios puede ser un proceso muy complejo que se vincula al desarrollo del hongo sobre todo en condiciones naturales, por lo que los microorganismos en el suelo tienden a generar estos metabolitos para asegurar su supervivencia para competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos que habitan en su ecosistema [24][27]. A diferencia de las cepas comerciales que se potencian para el biocontrol y la colonización rápida de las semillas, por lo que pudo haber perdido o reducido en gran parte, la capacidad de generar AIA, por lo que se recomienda enfocar el uso de cepas silvestres para demostrar el potencial de este hongo en el crecimiento del cacao.

Para el aislamiento del hongo *M. anisopliae* se intentó aislar las esporas del hongo del producto RAXTER, por diversos métodos, primeramente, por punción en medio PDA y en medio Sabouraud suplementado con cloranfenicol donde se incubó por 8 días a 25 °C, en el cual no hubo crecimiento del hongo. Otro método usado fue adicionar el producto RAXTER en agua destilada estéril y en agua peptona estéril, que se incubó por 8 días a una temperatura de 25°C, en la que se generó el hongo *Aspergillus* que domina rápidamente el medio e impide la proliferación del hongo objetivo; por ello, para

este tipo de casos, se recomienda minimizar la interferencia de otros microorganismos aplicando tratamientos como usar medios selectivos con fungicidas que permitan el crecimiento exclusivo del hongo en cuestión. Por último, se agregó el producto RAXTER en agua peptona estéril, incubando en agitación constante, para ser agregados en eppendorf estériles, y pasar por baño María, para evitar crecimiento de levaduras, finalmente se sembró en una caja de medio PDA, seguidamente se inoculó una caja con agar Sabouraud, en el cual no se evidenciaron microorganismos.

En otras investigaciones, las cepas de *M. anisopliae* han sido aisladas de forma silvestre a partir de muestras de suelo usando diluciones seriadas. Posteriormente, se inocularon 100 microlitros en cajas con agar PDA y tras ocho días de incubación se observaron los hongos que poseían características parecidas a las requeridas [30]. Asimismo, se han usado larvas criadas en laboratorio para obtener el hongo. Por ejemplo, en una investigación las larvas se colocaron en 500 g de tierra, y aquellas que presentaban signos de infección después de siete días se colocaron en una cámara húmeda. Los hongos se aislaron en una cabina de flujo laminar y los conidios se transfirieron a tubos de ensayo con agar Sabouraud suplementado con cloranfenicol. Finalmente, se procedió a su identificación mediante técnicas de coloración y observación al microscopio [31].

En esta investigación no fue posible aislar el hongo *M. anisopliae* del producto comercial utilizado, por lo que no fue posible determinar la capacidad solubilizadora de fosfatos y su producción de auxinas, pero analizando los resultados que se obtuvieron, es posible no que produjera AIA y no fuera capaz de solubilizar fosfatos, por lo que el producto se vende como control de patógenos y no se especifica formalmente como MPCV en la ficha técnica.

Por último, se evidencio que las plantas control estaban siendo depredadas por insectos como se ilustra en la figura 5; mientras que las plantas con los tratamientos de los hongos no mostraron ninguna señal de depredación, concordando con lo que se especifica en sus fichas técnicas respecto a ser control de plagas.



Figura 5. Planta control de cacao con daños en sus hojas.

5 CONCLUSIONES

El presente estudio permitió determinar los efectos que poseen los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma harzianum* como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) en las plantas de cacao (*Theobroma cacao*), evidenciando diferencias significativas en diversos parámetros de desarrollo vegetal. De esta forma, se encontró que ambos tratamientos influyeron positivamente en la germinación y velocidad de crecimiento de las plántulas en vivero con respecto a los controles, lo que sugiere su potencial para mejorar la etapa inicial del establecimiento del cultivo.

El tratamiento con *M. anisopliae* y *T. harzianum* presentó un efecto positivo en la formación de raíces secundarias, mostrando un crecimiento significativamente mayor en comparación con el control y el tratamiento. No obstante, no se logró aislar la cepa de *M. anisopliae* en laboratorio, lo que impidió evaluar directamente su capacidad solubilizadora de fosfatos y su producción de ácido indolacético (AIA), mecanismos comúnmente asociados a la promoción del crecimiento vegetal. A pesar de esta limitación, el comportamiento observado en la germinación y desarrollo radicular sugiere que los hongos podrían estar facilitando otros procesos biológicos que contribuyen al crecimiento de la planta, como la mejora en la absorción de nutrientes o la producción de metabolitos secundarios

con actividad bioestimulante. Esto plantea la necesidad de futuras investigaciones para esclarecer su mecanismo de acción y optimizar su aplicación en la agricultura.

Por otro lado, el hongo *T. harzianum* no evidenció capacidad de producción de AIA ni solubilización de fosfatos en las pruebas realizadas, lo que sugiere que su efecto en el crecimiento del cacao no se debe a estos mecanismos fisiológicos. Sin embargo, su capacidad para incrementar la germinación podría estar relacionada con otros procesos biológicos no evaluados en este estudio, como la mejora en la disponibilidad de ciertos nutrientes, la inducción de respuestas de defensa en la planta o la competencia con microorganismos fitopatógenos presentes en el sustrato. En esencia, aunque su aplicación no se recomienda como MPCV en el cacao, sin una caracterización más profunda de sus efectos, su potencial como agente biológico sigue siendo de interés y requiere mayor exploración.

Adicionalmente, es importante considerar que el entorno del vivero puede modificar la disponibilidad de nutrientes en el sustrato, lo que influye en la respuesta de las plantas a los tratamientos con microorganismos. La presencia de otros hongos o bacterias en el suelo, así como las condiciones ambientales como la humedad y la temperatura pueden afectar la interacción entre los hongos evaluados y las plántulas de cacao, esto resalta la importancia de realizar estudios en condiciones de campo para validar la eficacia de estos tratamientos en escenarios de producción real.

6 RECOMENDACIONES

Este estudio aporta evidencia sobre el potencial de *M. anisopliae* y *T. harzianum* como herramientas biotecnológicas para la producción de plántulas de cacao, pero también destaca la necesidad de realizar investigaciones adicionales para comprender mejor los mecanismos biológicos involucrados en su acción. Futuras investigaciones deberían enfocarse en la caracterización molecular y funcional de las cepas utilizadas, la evaluación de su impacto en el microbiota del suelo y su efecto en la resistencia de las plantas a factores abióticos y bióticos. Asimismo, sería pertinente estudiar la combinación de estos hongos con otras estrategias de biofertilización o biocontrol para maximizar su efectividad y promover sistemas agrícolas más sostenibles y eficientes en el cultivo de cacao.

7 AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer a Dios por darme salud para poder completar mis estudios, fortaleza para seguir adelante y la capacidad para tener las cosas claras y tomarlas con la madurez necesaria, a la Universidad Santiago de Cali y a sus profesores por la paciencia, la sabiduría y enseñanzas mostrada en estos 10 semestres, que me permitieron seguir creciendo como profesional y sobre todo como persona, Gracias a mis tutores de tesis Carlos Garay y Julián Rojas por las enseñanzas, la tranquilidad y consejos para salir adelante con este trabajo.

A mis padres por brindarme la oportunidad de estudiar, también es un logro de y para ellos, a mi hermana Isabella por recargarme con su buena energía para salir adelante en momentos complicados, a mi familia en Cali, mi primo Nicolás por ser como un hermano mayor que me aconsejó, me enseñó Cali y siempre estuvo para tenderme una mano, mis tíos por acompañarme en estos 5 años y brindarme un hogar, a mis amigos de colegio Juan David, Leonardo y Camilo por los consejos, la diversión, y seguir a mi lado en cada situación que les comentaba, igualmente a mis amigos de la carrera por los momentos juntos, apoyándonos en estudios para exámenes, talleres y sobre todo para no desfallecer en ningún momento y llegar a este punto que es un orgullo para mí, uno de muchos logros que espero alcanzar con la compañía de personas que me quieren, apoyan y ayudan a hacer más fácil el camino de la vida.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] H. Ritchie, M. Roser y P. Rosado, "Fertilizers". 2022. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://ourworldindata.org/fertilizers#explore-data-on-fertilizers>

[2] J. Naamala y D. L. Smith, "Relevance of Plant Growth Promoting Microorganisms and Their Derived Compounds, in the Face of Climate Change", *Agronomy*, vol. 10, n.º 8, p. 1179, Agosto de 2020. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3390/agronomy10081179>

- [3] D. Tilman, C. Balzer, J. Hill, y B. L. Befort, "Global food demand and the sustainable intensification of agriculture", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, núm. 50, pp. 20260-20264, 2011. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>
- [4] S. G. Potts, J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger, and W. E. Kunin, The assessment report on pollinators, pollination and food production, Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES), 2016. Accedido el 7 de abril de 2025. Disponible: <https://www.ipbes.net/assessment-reports/pollinators>
- [5] R. Lal, "Restoring soil quality to mitigate soil degradation", *Sustainability*, vol. 7, núm. 5, pp. 5875-5895, 2015. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3390/su7055875>
- [6] C. E. Guardiola-Márquez *et al.*, "Identification and Characterization of Beneficial Soil Microbial Strains for the Formulation of Biofertilizers Based on Native Plant Growth-Promoting Microorganisms Isolated from Northern Mexico", *Plants*, vol. 12, n.º 18, p. 3262, septiembre de 2023. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3390/plants12183262>
- [7] F. Dhawi, "The Role of Plant Growth-Promoting Microorganisms (PGPMs) and Their Feasibility in Hydroponics and Vertical Farming", *Metabolites*, vol. 13, n.º 2, p. 247, Febrero de 2023. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3390/metabo13020247>
- [8] N. J. Ochoa Zapata, "Efectos del uso de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (mpcv) en un cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad comercial cargamanto rojo", Trabajo de grado, Univ. Libre, Pereira, 2023. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/27997/Trabajo%20de%20grado%20Nasly%20pdf.pdf?squence=2&isAllowed=y>
- [9] Y. Martinez, J. Ribera, F. W. M. R. Schwarze y K. De France, "Biotechnological development of Trichoderma-based formulations for biological control", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, julio de 2023. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12687-x>
- [10] I. A. Morinigo-Villan, G. D. Vega-Britez, N. D. Lesmo-Duarte, J. A. Velázquez-Duarte, K. H. Gennaro-Campos y J. D. Alvarenga-Serafini, "Efecto del formulado comercial de *Trichoderma harzianum* en semillas de trigo", *Intropica*, pp. 104-111, julio de 2019. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/3095/2295>
- [11] M. S. Sarven *et al.*, "Biological Control of Tomato Gray Mold Caused by *Botrytis Cinerea* with the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae*", *Pathogens*, vol. 9, n.º 3, p. 213, marzo de 2020. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3390/pathogens9030213>
- [12] S. K. Onsongo, S. A. Mohamed, K. S. Akutse, B. M. Gichimu y T. Dubois, "The Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for Management of the Melon Fly *Zeugodacus cucurbitae*: Pathogenicity, Horizontal Transmission, and Compatibility with Cuelure", *Insects*, vol. 13, n.º 10, p. 859, septiembre de 2022. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3390/insects13100859>
- [13] G. J. Elena, P. J. Beatriz, P. Alejandro, and E. L. Roberto, "Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin Promotes Growth and Has Endophytic Activity in Tomato Plants," Institute of Agricultural Microbiology and Zoology, National Institute of Agricultural Technology, IMYZA- INTA, Jan. 2011. Accedido el el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: [http://www.idosi.org/abr/5\(1\)/3.pdf](http://www.idosi.org/abr/5(1)/3.pdf)
- [14] E. Mesquita, S. Hu, T. B. Lima, P. S. Golo y M. J. Bidochka, "Utilization of *Metarhizium* as an insect biocontrol agent and a plant bioinoculant with special reference to Brazil", *Frontiers Fungal Biol.*, vol. 4, diciembre de 2023. Accedido el 7 de abril de 2025 [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1276287>
- [15] F. Rojas, O. Darío Ramírez "Mejoramiento de 5.000 hectáreas de cacao improductivas" en COLOMBIA CACAOTERA". (2024 enero). Periódico de Fedecacao, (75), p 10-12. https://5d76f438-4d40-4d21-be7c-8e390e5f67eb.usfiles.com/ugd/5d76f4_ee19b64f0ca04fb2baafd2befb564245.pdf

- [16] Q. R. M. Liliana and D. M. K. Marisabel, "El mercado mundial del cacao." https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542004000100004
- [17] C. A. Riera Ruiz, "Contribución al conocimiento de plagas del cacao: situación actual y mecanismos de antixenosis sobre *Monalonion dissimulatum distant*," tesis de grado, ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL, 2012. [Online]. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/21616>
- [18] A. Drenth y D. I. Guest, "Fungal and Oomycete diseases of tropical tree fruit crops", *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 54, pp. 373-395, 2016. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-phyto-080615-095944>
- [19] N. Banjac, R. Stanisavljević, I. Dimkić, N. Veljjević, M. Soković y A. Ćirić, "Trichoderma harzianum IS005-12 promotes germination, seedling growth and seedborne fungi suppression in Italian ryegrass forage", *Plant, Soil Environ.*, vol. 67, No. 3, pp. 130-136, marzo de 2021. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://pse.agriculturejournals.cz/pdfs/pse/2021/03/02.pdf>
- [20] W. N. de Sousa, N. F. Brito, C. A. Felsemburgh, T. A. Vieira, y D. C. Lustosa, "Evaluation of Trichoderma spp. Isolates in cocoa seed treatment and seedling production", *Plants*, vol. 10, núm. 9, p. 1964, 2021. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3390/plants10091964>
- [21] K. A. Diniz, P. de A. Silva, J. A. Oliveira, y J. R. E. Evangelista, "Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micronutrients, aminoacids and plant growth regulators", *Sci. Agric.*, vol. 66, núm. 3, pp. 293-297, 2009. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1590/s0103-90162009000300002>
- [22] X.-Y. Hou *et al.*, "A native Trichoderma harzianum strain Th62 displays antagonistic activities against phytopathogenic fungi and promotes the growth of *Celosia cristata*", *Hortic. Environ. Biotechnol.*, vol. 62, núm. 2, pp. 169-179, 2021. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1007/s13580-020-00307-w>
- [23] S. Domínguez *et al.*, "Nitrogen metabolism and growth enhancement in tomato plants challenged with Trichoderma harzianum expressing the Aspergillus nidulans acetamidase amdS gene", *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 1182, 2016. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01182>
- [24] M. Yadav *et al.*, "Plant growth promotion and differential expression of defense genes in chilli pepper against Colletotrichum truncatum induced by Trichoderma asperellum and T. harzianum", *BMC Microbiol.*, vol. 23, núm. 1, p. 54, 2023. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02789-x>
- [25] Y. Liu, Y. Yang, y B. Wang, "Entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter", *Sci. Rep.*, vol. 12, núm. 1, p. 15706, 2022. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19899-7>
- [26] A. N. Bader, G. L. Salerno, F. Covacevich, y V. F. Consolo, "Native Trichoderma harzianum strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.)", *J. King Saud Univ. Sci.*, vol. 32, núm. 1, pp. 867-873, 2020. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>
- [27] N. Ortuño, C. Miranda, y M. Claros, "Selección de cepas de Trichoderma spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas", *J. Selva Andina Biosph.*, vol. 1, núm. 1, pp. 16-32, 2013. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2013.010100016>
- [28] R.-X. Li, F. Cai, G. Pang, Q.-R. Shen, R. Li, y W. Chen, "Solubilisation of phosphate and micronutrients by Trichoderma harzianum and its relationship with the promotion of tomato plant growth", *PLoS One*, vol. 10, núm. 6, p. e0130081, 2015. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130081>

- [29] N. A. Zin y N. A. Badaluddin, "Biological functions of Trichoderma spp. for agriculture applications", *Ann. Agricultural Sci.*, vol. 65, n.º 2, pp. 168-178, diciembre de 2020. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>
- [30] S. B. Valle-Ramírez, R. Torres-Gutiérrez, W. O. Caicedo-Quinche, R. V. Abril-Saltos, and D. J. Sucoshañay-Villalba, "Aislamiento y caracterización de *Metarhizium* spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra *Mahanarva* andigena (Hemiptera: Cercopidae)," *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, vol. 23, no. 1, Jan. 2022, http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062022000100019
- [31] V. M. Hernández-Velázquez, Z. Cervantes Espíndola, F. J. Villalobos, L. Lina García, y G. Peña Chora, "Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz", *Acta Zool. Mex.*, vol. 27, núm. 3, 2011. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://azm.ojs.inecol.mx/index.php/azm/article/view/777/944>
- [32] V. A. Aguilera-Cogley, M. Jaén-Torrijos, L. Y. Ávila-Rodríguez, J. Á. Herrera-Vásquez, J. N. Jaén-Sanjur, y A. A. Barba-Alvarado, "Identificación y virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) como agente de control biológico de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) en Panamá", *Idesia (Arica)*, vol. 38, núm. 1, pp. 59-65, 2020. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292020000100059>
- [33] Q. Hao *et al.*, "Endophytic *Metarhizium anisopliae* is a potential biocontrol agent against wheat Fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum*", *J. Plant Pathol.*, vol. 103, núm. 3, pp. 875-885, 2021. Accedido el 7 de abril de 2025. [En línea]. Disponible: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-06-21-1253-RE>