



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL MICROBIANO PARA EL BIOCONTROL
PATOGÉNICO EN EL CULTIVO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*)**

*Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniero (a) en Biotecnología*

AUTORES:

LOURDES GERALDINE PINEDA GAMBOA

LENIN EZEQUIEL VILLÓN ALEXANDRE

TUTORA:

MSc. ANGELA VANESSA PACHECO FLORES DE VALGAZ

GUAYAQUIL - ECUADOR

2025

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, **Lourdes Geraldine Pineda Gamboa** con documento de identificación N° 0958284713 y **Lenin Ezequiel Villón Alexandre** con documento de identificación N° 0950683300; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

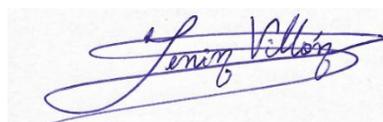
Guayaquil, 10 de febrero del año 2025

Atentamente,



Lourdes Geraldine Pineda Gamboa

CI: 0958284713



Lenin Ezequiel Villón Alexandre

CI: 0950683300

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, **Lourdes Geraldine Pineda Gamboa** con documento de identificación N° 0958284713 y **Lenin Ezequiel Villón Alexandre** con documento de identificación N° 0950683300, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL MICROBIANO PARA EL BIOCONTROL PATOGENICO EN EL CULTIVO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*)**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero (a) en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

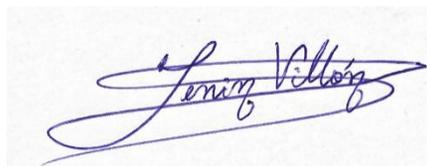
Guayaquil, 10 de febrero del año 2025

Atentamente,



Lourdes Geraldine Pineda Gamboa

CI: 0958284713



Lenin Ezequiel Villón Alexandre

CI: 0950683300

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Angela Vanessa Pacheco Flores de Valgaz** con documento de identificación N° 0930726112, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL MICROBIANO PARA EL BIOCONTROL PATOGENICO EN EL CULTIVO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*)**, realizado por Lourdes Geraldine Pineda Gamboa con documento de identificación N° 0958284713 y por Lenin Ezequiel Villón Alexandre con documento de identificación N° 0950683300, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 10 de febrero del año 2025

Atentamente,



Angela Vanessa Pacheco Flores de Valgaz

CI: 0930726112

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **María Gabriela Maridueña Zavala** con documento de identificación N° 0923210884, investigadora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL MICROBIANO PARA EL BIOCONTROL PATOGENICO EN EL CULTIVO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*)**, realizado por Lourdes Geraldine Pineda Gamboa con documento de identificación N° 0958284713 y Lenin Ezequiel Villón Alexandre con documento de identificación N° 0950683300, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 10 de febrero del año 2025

Atentamente,



María Gabriela Maridueña Zavala

CI: 0923210884

Dedicatoria

A Dios por haberme permitido tener un magnífico hogar que me ha criado, en especial a mi papá que me ha apoyado en el transcurso de todos estos años, al demostrarme que puedo ser capaz de muchas cosas, por enseñarme que en la vida hay que dar lo mejor de un mismo sin rendirse a pesar de las dificultades. A mi mamá por haberme dado los ánimos suficientes en cada etapa que he pasado como estudiante, por brindarme su amor incondicional que me ha hecho seguir adelante en cada adversidad. Agradecer a mis hermanos por hacerme feliz en los momentos de tristeza. Gracias Kenneth, eres el hermano mayor que cualquier hermanito hubiera deseado tener. Gracias Elvia, por ser la princesita que siempre quise tener como hermanita, por ayudarme y consolarme en mis momentos más difíciles.

A mis abuelos “Papi Siko y Mami Sika”, por haberme ayudado de todas las maneras posibles, dando ánimos con el tiempo de calidad junto a ellos, siendo cada uno de ellos un ejemplo de superación que los tomo como mi inspiración. A mis tíos, Johanna, Elvis, Henry, Erick, por ser las personas que me han ayudado a seguir sus ejemplos de vida, demostrando que siempre hay una felicidad a final del túnel y que todos SIEMPRE tienen su momento especial.

A mi mami Santa, que me ha enseñado a ser feliz, a ver la vida diferente, su amor puro, su apoyo desde muy pequeño, por ser su mimado hasta el día de hoy. A mis tíos, Mónica, Toñito, Manuco, Cecilia, Ramón y María. A mis primos, en especial a Bolivar, que lo considero como un hermano y sin duda alguna a mi sobrina Polly, por ser la alegría de mi vida desde que nació.

A todas las personas que en su momento han estado para mí, que me dieron ánimos de levantarme y seguir luchando por este sueño. Gracias a Geraldine Pineda, por enseñarme y demostrarme muchas cosas que para mí son nuevas y me han permitido mejorar desde que está en mi vida, gracias, por haber estado desde el inicio hasta ahora.

Gracias a cada uno de ustedes, los admiro y los amo con todo mi corazón.

Lenin Villón

Dedicatoria

A mi familia por guiarme, por su amor y enseñanza. Estoy completamente agradecida con cada uno de ellos por ser el apoyo que he necesitado a lo largo de mi vida y en este proceso universitario.

En especial, quiero dedicarle y agradecerle a mi hermana Joselin este trabajo por sus enseñanzas, consejos, por estar siempre para mí y por guiarme. Es una de las personas que más admiro.

A MJ, SPN y TDG por ser mi fuente de inspiración.

A mis amigos por ser parte de mi vida desde hace diez años y a Lenin, son parte de mi alegría.

Geraldine Pineda

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana por brindarnos conocimientos en el transcurso de estos 4 años, permitiéndonos amar y tener pasión por lo que estudiamos.

Agradecemos a nuestra tutora de tesis, Angela Pacheco MSc, por su paciencia, su guía, su enseñanza y su apoyo que nos permitieron tener los conocimientos necesarios para culminar este trabajo académico.

Agradecemos al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por brindarnos la oportunidad de realizar este trabajo en sus instalaciones, que nos aportan mucho para nuestra vida profesional, adentrándonos a mejorar y aprender sobre nuestra carrera. En especial, a nuestra cotutora Gabriela Maridueña MSc, por brindarnos la oportunidad de trabajar junto a ella en esta investigación, gracias por compartir sus conocimientos y su desempeño en la biotecnología, nos ha permitido realizar este estudio.

Finalmente, agradecemos a todos los docentes de la carrera de Biotecnología por su dedicación y compromiso en la enseñanza.

Resumen

El biocontrol microbiano surge como una alternativa sostenible para combatir enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*). Esta investigación evaluó el potencial biocontrolador de 61 microorganismos promisorios provenientes de tres fuentes: fermentados de cacao, bosque seco tropical y suelos de la Antártida, contra los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia theobromae* y *Moniliophthora roreri*. Se empleó un diseño experimental exploratorio, que inició con un ensayo *in vitro* de confrontación dual entre los microorganismos promisorios contra los patógenos, culminando con un ensayo de confrontación directa para identificar microorganismos con actividad antagónica. Los ensayos *in vitro* junto al análisis estadístico revelaron que bacterias del género *Acetobacter* y *Bacillus* provenientes del fermentado de cacao junto a los hongos endófitos provenientes del bosque seco tropical *Trichoderma inhamatum* y *Trichoderma spirale*, mostraron potencial como biocontroladores de patógenos provenientes de los cultivos de cacao. También hay que resaltar otras cepas bacterianas que tuvieron actividad antagónica como *Lactiplantibacillus fabifermentans*, *Ralstonia* sp. y *Priestia megaterium*. Las bacterias de suelos antárticos no presentaron actividad antagónica, por lo que se debería considerar el uso de consorcios microbianos en las cepas que tuvieron menor actividad antagónica para potenciar su efecto biocontrolador contra patógenos. Finalmente, esta investigación contribuye al estudio de microorganismos promisorios como agentes de control biológico, aportando alternativas para futuras investigaciones que impulsen el avance tecnológico de la industria agrícola.

Palabras clave

Microorganismos promisorios, biocontrol microbiano, capacidad antagónica, fitopatógenos.

Abstract

Microbial biocontrol emerges as a sustainable alternative to combat diseases in cocoa crops (*Theobroma cacao*). This research evaluated the biocontrol potential of 61 promising microorganisms from three sources: cocoa ferments, tropical dry forests and Antarctic soils, against the phytopathogenic fungi *Lasiodiplodia theobromae* and *Moniliophthora roreri*. An exploratory experimental design was used, which began with an *in vitro* dual confrontation test between the promising microorganisms against the pathogens, culminating in a direct confrontation test to identify microorganisms with antagonistic activity. The *in vitro* tests together with the statistical analysis revealed that bacteria of the *Acetobacter* and *Bacillus* genera from cocoa fermentation together with the endophytic fungi from the tropical dry forest *Trichoderma inhamatum* and *Trichoderma spirale*, showed potential as biocontrollers of pathogens from cocoa crops. Other bacterial strains that had antagonistic activity should also be highlighted, such as *Lactiplantibacillus fabifermentans*, *Ralstonia* sp. and *Priestia megaterium*. Bacteria from Antarctic soils did not present antagonistic activity, so the use of microbial consortia in strains that had less antagonistic activity should be considered to enhance their biocontrol effect against pathogens. Finally, this research contributes to the study of promising microorganisms as biological control agents, providing alternatives for future research that promote technological advancement in the agricultural industry.

Key words

Promising microorganisms, microbial biocontrol, antagonistic capacity, phytopathogens.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	1
1.1 Problemática	3
1.2 Justificación	4
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo General	5
1.3.2 Objetivos específicos	6
1.4 Hipótesis	6
2. Marco teórico	6
2.1 Importancia del cultivo de cacao en Ecuador	6
2.2 Principales patógenos que afectan al cacao	7
2.3 Tratamientos comunes para el control de patógenos de cacao	10
2.4 Consecuencias del mal uso de fungicidas en el ambiente y seres vivos	11
2.5 Microorganismos benéficos antagonistas de patógenos del cacao	12
2.6 Antagonismo microbiano	13
2.6.1 Mecanismo de acción	13
2.7 Fuentes de microorganismos antagonistas	14
2.7.1 Microorganismos bacterianos de la Antártida	14
2.7.2 Microorganismos bacterianos de fermentación de cacao	15
2.7.3 Microorganismos fúngicos del Bosque Protector La Prosperina	15
2.8 Medios de cultivo	16
2.8.1 Trypto-Casein Soy Agar (TSA)	16
2.8.2 Potato dextrosa agar (PDA)	17
2.8.3 Luria Broth (LB)	18
2.9 Métodos de confrontaciones antagonistas	19
2.9.1 Confrontación dual	19
2.9.2 Confrontación directa	19
3. Materiales y métodos	20
3.1 Diseño experimental	21
3.1.1 Pruebas antagonistas tipo dual	22
3.1.2 Selección de microorganismos para confrontación directa	24
3.1.3 Evaluación directa de los microorganismos con potencial biocontrolador	26

3.1.4	Análisis estadístico.....	28
4.	Resultados y discusión.....	29
4.1	Evaluación preliminar de microorganismos promisorios	29
4.1.1	Selección de bacterias de fermentados de cacao contra hongos fitopatógenos	31
4.1.2	Selección de bacterias de Antártida contra hongos fitopatógenos.....	33
4.1.3	Selección de hongos del bosque seco tropical contra hongos fitopatógenos.....	34
4.2	Confrontación directa de microorganismos promisorios contra patógenos.....	36
4.2.1	Ensayo antagónico de bacterias de fermentados de cacao.....	36
4.2.2	Ensayo antagónico de microorganismos de Antártida.....	45
4.2.3	Ensayo antagónico de hongos del bosque protector	50
5.	Conclusiones y recomendaciones	53
5.1	Conclusiones	53
5.2	Recomendaciones	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Moniliophthora roreri</i>	8
Figura 2. <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	9
Figura 3. Medio TSA.....	17
Figura 4. Medio LB.....	18
Figura 5. Esquema del método de confrontación dual.....	19
Figura 6. Esquema del método de confrontación directa.....	20
Figura 7. Esquema de medición para ensayo dual (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>).....	23
Figura 8. Esquema de medición para ensayo dual (<i>Moniliophthora roreri</i>).....	24
Figura 9. Criterios de selección de bacterias promisorias para confrontación directa.....	25
Figura 10. Criterios de selección de hongos promisorios para confrontación directa.....	26
Figura 11. Esquema de la fase final empleada para la evaluación de bacterias promisorias frente a fitopatógenos.....	27
Figura 12. Esquema de la fase final empleada para la evaluación de hongos promisorios frente a fitopatógenos.....	27
Figura 13. Bacterias de fermentado de cacao que inhibieron al hongo fitopatógeno <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	31
Figura 14. Bacterias promisorias de fermentado de cacao contra <i>M. roreri</i> en confrontación dual.....	32
Figura 15. Bacterias promisorias de Antártida contra <i>M. roreri</i> en confrontación dual.....	34
Figura 16. Hongos benéficos de bosque protector contra <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en confrontación dual.....	35
Figura 17. Hongos promisorios de bosque protector contra <i>M. roreri</i> confrontación dual.....	36
Figura 18. Gráfica de diferencias de medias de bacterias de fermentados de cacao con mayor crecimiento y con menor crecimiento realizada con prueba de Tukey (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>).....	39
Figura 19. Gráfica de diferencias de medias de bacterias de fermentados de cacao con mayor crecimiento y con menor crecimiento realizada con prueba de Tukey (<i>M. roreri</i>).....	43
Figura 20. Bacterias promisorias de fermentados de cacao que inhibieron al patógeno <i>Moniliophthora roreri</i>	44
Figura 21. Gráfica de diferencias de medias de bacterias de Antártida con mayor crecimiento y con menor crecimiento realizada con prueba de Tukey (<i>M. roreri</i>).....	48

Figura 22. Bacterias promisorias de Antártida que inhibieron al patógeno <i>Moniliophthora roreri</i>	50
Figura 23. Hongos benéficos que inhibieron al patógeno <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	51
Figura 24. Hongos benéficos que inhibieron al patógeno <i>Moniliophthora roreri</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño de experimento.....	21
Tabla 2. Microorganismos promisorios seleccionados en la confrontación dual del patógeno <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	29
Tabla 3. Microorganismos promisorios seleccionados en la confrontación dual del patógeno <i>Moniliophthora roreri</i>	30
Tabla 4. Resultados de la prueba de Levene para los datos de crecimiento diario de las bacterias de fermentados de cacao frente a <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	36
Tabla 5. Prueba de Kruskal-Wallis con nivel de confianza del 90% en bacterias de fermentados de cacao contra <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	37
Tabla 6. Prueba de Tukey con nivel de confianza del 90% en bacterias de fermentados de cacao contra <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	38
Tabla 7. Resultados de la prueba de Levene para los datos de crecimiento diario de las bacterias de fermentados de cacao frente a <i>Moniliophthora roreri</i>	41
Tabla 8. Prueba de Kruskal-Wallis con nivel de confianza del 90% con bacterias de fermentados de cacao y <i>Moniliophthora roreri</i>	41
Tabla 9. Prueba de Tukey con nivel de confianza del 90% en las bacterias de fermentados de cacao y <i>Moniliophthora roreri</i>	42
Tabla 10. Resultados de la prueba de Levene para los datos de crecimiento diario de las bacterias de fermentados de cacao frente a <i>Moniliophthora roreri</i>	45
Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis con nivel de confianza del 90% en bacterias de Antártida y <i>Moniliophthora roreri</i>	45
Tabla 12. Prueba de Tukey con nivel de confianza del 90% en las bacterias de Antártida y <i>Moniliophthora roreri</i>	47

Capítulo 1

1. Introducción

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) es un pilar fundamental para la economía de diversas regiones tropicales, representando una fuente significativa de ingresos en países de América Latina, África y Asia (FAO, 2021). En Ecuador, el cacao fino de aroma ha alcanzado reconocimiento internacional por su calidad excepcional, posicionándose como uno de los principales productos agrícolas de exportación. Sin embargo, la producción de cacao enfrenta múltiples desafíos, debido a su alta susceptibilidad a diversas enfermedades causadas por patógenos, que provocan pérdidas económicas considerables y afectan la sostenibilidad del sector agrícola (Delgado et al., 2023).

Entre los patógenos más prevalentes que afectan las plantaciones de cacao en Ecuador, destacan *Moniliophthora perniciosa*, causante de la "escoba de bruja" y *Moniliophthora roreri* responsable de la moniliasis. Ambas enfermedades generan pérdidas significativas en la producción, afectando no solo el rendimiento de las cosechas, sino también comprometiendo la calidad del cacao, lo que reduce su valor comercial y dificulta su exportación y procesamiento industrial (Maridueña-Zavala et al., 2019). Adicionalmente, *Lasiodiplodia theobromae* ha emergido como una amenaza significativa en ciertas regiones, provocando pudrición de frutos y muerte regresiva de ramas, lo que agrava aún más la situación fitosanitaria del cultivo.

La falta de capacitación adecuada entre agricultores y el limitado acceso a tecnologías avanzadas ha llevado a una dependencia excesiva de agroquímicos para el control de estas enfermedades. Sin embargo, el uso inadecuado de estos productos ha

generado resistencia en los patógenos y ha tenido repercusiones negativas tanto en el medio ambiente como en la salud humana (FAO, 2021). En el caso de *M. royeri*, las pérdidas pueden superar el 90% de la cosecha si no se implementa un manejo adecuado (Delgado et al., 2023). Esta situación resalta la necesidad urgente de explorar alternativas más sostenibles y efectivas para el manejo de enfermedades en el cultivo de cacao.

En este contexto, el biocontrol microbiano emerge como una alternativa sostenible para el manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. Los microorganismos biocontroladores, como bacterias y hongos antagonistas, son una alternativa sostenible al controlar patógenos mediante mecanismos, como la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por nutrientes y la inducción de resistencia en las plantas (Compant et al., 2020). Microorganismos antagonistas como *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. han demostrado eficacia en la reducción de la incidencia de enfermedades y en la mejora de la salud general del cultivo, sin los efectos adversos asociados a los agroquímicos (Maridueña-Zavala et al., 2023).

Además, investigaciones recientes han explorado el potencial de microorganismos provenientes de ambientes extremos como los suelos antárticos, que producen compuestos antifúngicos y antibacterianos con propiedades únicas. Esta línea de investigación abre nuevas perspectivas para el manejo fitosanitario del cacao y sugiere un camino prometedor hacia prácticas agrícolas más sostenibles y resilientes (Santos et al., 2020).

Es fundamental que se realicen más estudios de bioprospección de microorganismos bacterianos y fúngicos, así como la evaluación de su capacidad antagónica frente a los patógenos que afectan el cultivo de cacao. La implementación de estrategias de biocontrol no solo puede contribuir a la reducción de pérdidas económicas,

sino que también puede mejorar la calidad del cacao producido en Ecuador, garantizando así su competitividad en el mercado internacional. A medida que se avanza en la investigación y se desarrollan nuevas tecnologías, es posible que se logren soluciones efectivas que beneficien tanto a los agricultores como al medio ambiente, promoviendo un futuro más sostenible para la producción de cacao en el país (Darmawan , 2023).

1.1 Problemática

El cultivo de cacao ha sido una fuente de sustento para la humanidad a lo largo de la historia, y en el contexto ecuatoriano, se ha convertido en un elemento vital para la economía del país, especialmente para los medianos y grandes productores. No obstante, se ve afectado de manera grave debido a su susceptibilidad a enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, como *Lasiodiplodia theobromae* y *Moniliophthora roreri*. Estas enfermedades generan pérdidas significativas, con afectaciones que pueden alcanzar hasta un 90% de la producción en casos severos (Delgado et al., 2023).

Ante la ausencia de productos innovadores y el bajo acceso a tecnologías avanzadas, la mayoría de los agricultores dependen de pesticidas sintéticos, recurriendo a la intensificación de los mismos para el mantenimiento de los rendimientos productivos. Esta situación, refleja una problemática a nivel global, dado que las plantas del cacao están constantemente expuestas a patógenos como hongos y bacterias, que pueden causar pérdidas de rendimiento anuales que oscilen entre el 20% y el 40% (ICCO, 2022). Aunque los pesticidas químicos han demostrado ser eficaces en el control de estas enfermedades, su uso excesivo ha generado efectos adversos para el medio ambiente y la salud humana. Como resultado, se ha promovido un cambio hacia estrategias ecológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de cacao (FAO, 2021).

En respuesta a esta problemática, se ha investigado el uso de biocontroladores microbianos procedentes de diversos nichos ecológicos, como semillas de cacao fermentadas, Antártida y bosque seco tropical, con el fin de buscar una alternativa sostenible. Estos microorganismos, como bacterias y hongos antagonistas, ofrecen una solución ecológica al controlar patógenos mediante diversos mecanismos, como la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por recursos y la inducción de resistencia en las plantas (Compant et al., 2020). La opción de tener agentes de biocontrol en el manejo de enfermedades en el cacao es una oportunidad para reducir la dependencia de agroquímicos que hoy en día es muy habitual en los agricultores, logrando proteger la biodiversidad del suelo y asegurar la sostenibilidad del sistema agrícola (Muhammad, 2023).

1.2 Justificación

El biocontrol microbiano es una estrategia clave para el manejo sostenible de enfermedades agrícolas, destacando los consorcios microbianos por su eficacia frente a los microorganismos individuales, gracias a las interacciones sinérgicas entre las especies, lo que facilita el control biológico de los patógenos (Viera-Arroyo et al., 2020). Esta sinergia se traduce en una mayor eficacia en la ocupación de nichos ecológicos, producción de metabolitos secundarios y, en última instancia, en el control de enfermedades de los cultivos.

A pesar de que algunos géneros de microorganismos ya han sido ampliamente estudiados para biocontrol, la exploración continua de estos microorganismos sigue siendo relevante debido a la posible identificación de cepas con mejores capacidades de biocontrol. En muchos casos, las cepas que han sido previamente identificadas pueden

tener propiedades no descubiertas que son cruciales para mejorar la eficiencia de los tratamientos biológicos (García & Comstock, 2019).

En Ecuador, los microorganismos utilizados en biocontrol provienen principalmente de especies nativas, debido a su mayor adaptación a las condiciones climáticas del país. Microorganismos extremófilos de sitios como la Antártida aportan un potencial complementario y prometedor, ya que están adaptados a condiciones severas, como bajas temperaturas, alta radiación UV y escasez de nutrientes. Estas características les permiten producir metabolitos secundarios con potentes propiedades antifúngicas y antibacterianas, lo que los convierte en candidatos innovadores para el control de patógenos (García & Comstock, 2019).

La finalidad de esta investigación es evaluar el potencial biocontrolador de cepas microbianas provenientes de diferentes nichos ecológicos previamente caracterizadas y depositadas en el cepario del CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador) con el fin de que tengan propiedades beneficiosas para controlar plagas y enfermedades en el cultivo de cacao. Una vez identificadas, estas cepas se propondrían para desarrollar productos biotecnológicos, como biofertilizantes o biofungicidas, que protejan al cacao de manera natural, disminuyendo la necesidad de pesticidas o químicos artificiales (Chaudhary et al., 2024).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el potencial de distintas cepas de suelos antárticos, fermentados de cacao y del bosque protector para el control biológico de patógenos que afectan al cultivo de cacao.

1.3.2 Objetivos específicos

- Realizar pruebas antagonistas en cajas Petri para identificar cepas con potencial inhibitorio de los patógenos de cacao: *Moniliophthora roreri* y *Lasiodiplodia theobromae*.
- Cuantificar el efecto inhibitorio mediante ensayos antagonistas *in vitro* de las cepas benéficas mediante enfrentamientos con los patógenos de estudio.

1.4 Hipótesis

Los microorganismos de suelos antárticos, fermentados de cacao y bosque protector tienen potencial para inhibir el crecimiento de patógenos que afectan al cultivo de cacao.

Capítulo 2

2. Marco teórico

2.1 Importancia del cultivo de cacao en Ecuador

Según la FAO (2021), Ecuador es uno de los países más representativos en el cultivo del cacao, ocupando el cuarto lugar a nivel mundial y alcanzando una producción alrededor de 453.872 toneladas. Este cultivo es de gran importancia para el país, ya que ha logrado tener un crecimiento del 24,38% en la exportación de cacao en comparación al 2022, y se estima que continúe aumentando en los próximos años (Anecacao, 2023).

El cultivo de cacao contribuye de manera significativa en la economía de casi todo el territorio sudamericano, resaltando países como Ecuador que, al tener una ubicación geográfica favorable, permite que las producciones de este cultivo sean a gran escala,

contribuyendo en su economía externa e interna por medio de la producción y exportación, señalando un progreso sostenible (Chamba et al., 2024).

El Ministerio de Agricultura y Ganadería señala que las zonas costeras del país producen alrededor del 80% del cacao nacional. Según el Banco Central del Ecuador (2024), las exportaciones de cacao aumentaron un 30% respecto al año anterior, lo que sugiere un impacto significativo para los grandes y pequeños productores, consolidando al cacao como “la pepa de oro” del país. Sin embargo, el crecimiento exponencial de su producción y comercio internacional también incrementa la probabilidad de que los cultivos se vean afectados por enfermedades patógenas. Por ello, es crucial mantener condiciones óptimas para su crecimiento, lo que favorece la producción y exportación de este cultivo a nivel internacional asegurando que el cacao ecuatoriano cumpla con estándares de calidad elevados.

2.2 Principales patógenos que afectan al cacao

El cultivo de cacao enfrenta grandes desafíos debido a su susceptibilidad a enfermedades causadas por patógenos fúngicos, las cuales pueden causar pérdidas considerables alrededor del 80% del cultivo si no son tratadas a tiempo (INIAP, 2021). Por ende, esto afecta tanto en la cantidad como la calidad de las cosechas. En el año 2022, un pequeño productor perdió alrededor de USD 1.042,14 debido al ataque de la escoba de bruja y la moniliasis, lo que presentó una disminución del 35,9% de la producción total y de los ingresos en ese año (Peralta et al., 2023).

Las principales enfermedades causadas por hongos patógenos que afectan al cacao son la escoba de bruja y la moniliasis. *Moniliophthora roreri* (Figura 1) prospera en

condiciones de alta humedad relativa, superior al 85% y temperaturas mayores a 25°C. Sus esporas se diseminan a través de la lluvia, insectos y el viento, infectando plantaciones cercanas (Carvajal et al., 2024).



Figura 1. *Moniliophthora roreri*. Colonias con desarrollo micelial denso, pigmentación café y zonas de esporulación.

Lasiodiplodia theobromae (Figura 2) es un hongo necrótrofo causante de graves daños en diferentes plantaciones a nivel mundial, por lo cual se considera un patógeno peligroso que puede causar el tizón de la hoja y pudrición de la raíz. Otras enfermedades que están presentes en los cultivos de cacao son la pudrición de la mazorca y muerte regresiva, ambas causadas por este hongo patógeno (Moreira-Morrillo et al., 2021). Estos daños han aumentado en los últimos años, lo que ha hecho que se tenga más interés en el estudio de esta patología. *L. theobromae* pasó de ser un hongo con actividad endófito a ser un patógeno oportunista, por lo que es considerado una amenaza para las plantaciones de cacao (Lahlali et al., 2022).

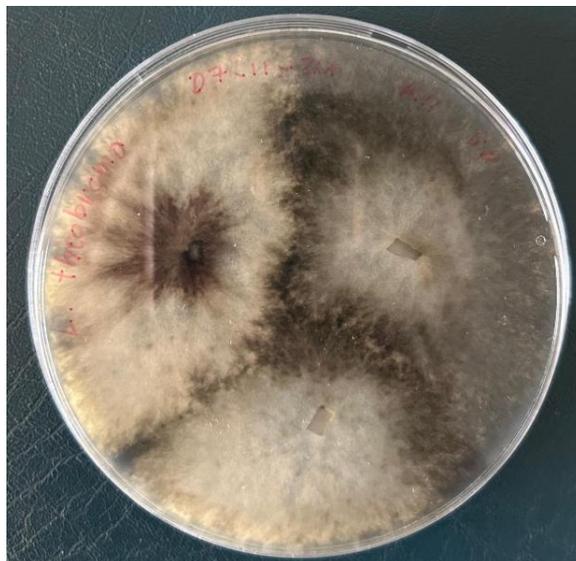


Figura 2. *Lasiodiplodia theobromae*. Colonias con crecimiento micelial radial, esporulación central pigmentada con textura algodonosa.

La mayoría de los agricultores de cacao dependen de métodos convencionales de manejo, incluyendo el uso de agroquímicos. No obstante, estos métodos presentan varias limitaciones: generan residuos en el ambiente, pueden afectar la salud humana y su efectividad puede reducirse con el tiempo debido a la resistencia de los patógenos (Suraj et al., 2023). Esto resalta la necesidad de alternativas más sostenibles y efectivas como el uso de biocontroladores.

El cambio climático es otra de las causas que afecta drásticamente el cultivo de cacao, alterando la distribución de las lluvias y aumentando las temperaturas, lo que provoca estrés por sequía y afecta a los rendimientos. El cacao requiere un suministro continuo de agua, ya que la falta de disponibilidad hídrica puede reducir los días de producción y deteriorar las condiciones de crecimiento, por lo que afecta significativamente al cultivo del cacao (Fog et al., 2023).

2.3 Tratamientos comunes para el control de patógenos de cacao

Los fungicidas son productos diseñados para eliminar o frenar el desarrollo de hongos y sus esporas, los cuales pueden causar graves daños o incluso destruir un cultivo completo. Estos funcionan a través de diferentes mecanismos, como afectar la membrana celular de los hongos o interrumpir su proceso reproductivo. El uso de fungicidas químicos sigue siendo la estrategia más utilizada, ya que ofrece diversas opciones según las necesidades. Aunque su efectividad ha disminuido con el paso del tiempo, depende de factores como la forma de aplicación, la dosis utilizada la estación del año (Duke et al., 2023).

El uso continuo de pesticidas y fungicidas ha aumentado de forma exponencial, del mismo modo que ha crecido la producción agrícola. Este incremento ha llevado a que el tratamiento de ciertos patógenos con estos compuestos sea una práctica común. No obstante, el uso inadecuado y el manejo deficiente de estos productos pueden generar efectos adversos significativos en los cultivos, afectando la producción de cacao y comprometiendo su sostenibilidad a largo plazo (Faruque et al., 2024).

Algunos tratamientos emplean fungicidas como el tebuconazol y azoxistrobina en contra de patógenos como *Moniliophthora roreri* con resultados favorables para el control de estos patógenos. El tebuconazol es un inhibidor de la desmetilación que interfiere con la biosíntesis de ergosterol fúngico. Inhibe la 14 α -desmetilasa, que es necesaria para la desmetilación oxidativa dependiente del citocromo P450 del 24-metilen-24,25-dihidrolanosterol, un precursor del ergosterol, un esteroles importante en los hongos filamentosos (Odintsova et al., 2020).

El empleo de los agroquímicos difeconazol, tebuconazol, mancozeb, azufre, piraclostrobina, fosetil-Al y azoxistrobina reducen significativamente el crecimiento micelial en más de un 90% en contra de la muerte regresiva (Rusin et al., 2020).

Moniliophthora roreri mostró sensibilidad a varios fungicidas sistémicos, como la azoxistrobina, trifloxistrobina, tebuconazol y propiconazol. Asimismo, reaccionó de manera similar a los fungicidas protectores, incluyendo sulfato de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso, oxiclорuro de cobre y polisulfuro de calcio. En pruebas *in vivo*, el uso de azoxistrobina, trifloxistrobina, tebuconazol o propiconazol a una dosis de 0,8 g/L, combinado con hidróxido de cobre, resultó en una reducción significativa de la incidencia de la enfermedad (Magdiel et al., 2019).

2.4 Consecuencias del mal uso de fungicidas en el ambiente y seres vivos

El escenario actual del uso de pesticidas no parece ser satisfactorio a diferencia de nuevas estrategias controladoras de patógenos. Los llamados pesticidas seguros están mostrando sus efectos nocivos como la bioacumulación, ya que podrían presentar contaminación del agua filtrándose en el suelo y movilizándose a los sistemas acuáticos próximos. Asimismo, su uso excesivo puede afectar directamente a microorganismos benéficos en donde en algunos pesticidas, en especial los triazoles y derivados de cobre pueden acumularse en las cadenas tróficas (Kumar et al., 2024).

Si bien se sabe que también el uso excesivo de estos productos químicos puede conllevar a tener efectos secundarios, no solo en la salud humana, sino también en el ecosistema y medio en el que están rodeados los cultivos, los que pueden conllevar a resistencia a plagas causando una gran controversia, ya que pueden provocar un exceso de

residuos provenientes de los pesticidas utilizados, por lo cual afecta la seguridad y la comerciabilidad del producto en caso de exportaciones (Buch et al., 2023).

En consecuencia, se ha determinado buscar soluciones que favorezcan a los cultivos a corto, mediano y largo plazo. El uso de pesticidas sintéticos se ha relacionado con varios efectos adversos para la salud de los seres humanos como problemas respiratorios, irritaciones de la piel e incluso problemas de salud prolongados, como el cáncer. Además, estas sustancias químicas pueden provocar la degradación ambiental y afectar la salud del suelo, la calidad del agua y la biodiversidad (Majumder, 2024).

2.5 Microorganismos benéficos antagonistas de patógenos del cacao

Existen diversas estrategias para biocontrolar patógenos que afectan al cultivo de cacao, y el uso de microorganismos benéficos ofrece una solución biotecnológica efectiva para el manejo de estas enfermedades. *Trichoderma* y *Bacillus*, microorganismos ampliamente utilizados en la industria de biofertilizantes, han contribuido significativamente al desarrollo de productos biofungicidas, desde su selección hasta su comercialización (Lahlali et al., 2022).

El biocontrol de enfermedades en plantaciones de cacao se basa en el uso de diversos microorganismos benéficos extraídos de distintos nichos ecológicos, que actúan como agentes fitosanitarios y antagonistas de patógenos. Esto permite a los agricultores obtener cosechas más sanas y respetuosas con el medio ambiente ofreciendo productos más seguros a los consumidores (Morais et al., 2022).

Los microorganismos con potencial de ser biocontroladores compiten con los patógenos por nutrientes y espacio, invadiendo y eliminando el micelio del patógeno en el

proceso (Valenzuela et al., 2023). En condiciones óptimas, estos microorganismos generan metabolitos específicos, evitando que el patógeno obtenga ventaja competitiva sobre el microorganismo de control a tal punto de neutralizar al patógeno.

2.6 Antagonismo microbiano

Los microorganismos antagonistas, que incluyen bacterias, levaduras y hongos, tienen la capacidad de ser biocontroladores sobre diversos patógenos y se han empleado con éxito para el manejo de enfermedades en plantas. Para su selección, estos microorganismos deben demostrar varias características clave: la habilidad de colonizar rápidamente la superficie de los frutos y de persistir en ella de manera efectiva, una mayor competencia que el patógeno para la adquisición de nutrientes, y la capacidad de sobrevivir en diversas condiciones ambientales (Wisniewski & Wilson, 1992).

Se deben considerar otras propiedades como su estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, no exigente en requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivir a las condiciones climáticas adversas. También, debe mostrar efectividad contra un amplio rango de microorganismos patógenos en una variedad de especies, capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos, que se mantenga en una formulación durante un largo período de vida. Deben ser fácil de aplicar sin producción de metabolitos secundarios que causen daños a la salud humana, resistente a los fungicidas y compatible con los procedimientos comerciales y no patogénico sobre el hospedero (Wilson y Wisniewski, 1989).

2.6.1 Mecanismo de acción

Es fundamental comprender el mecanismo de acción de los microorganismos antagonistas para optimizar su uso y facilitar la selección de nuevos biocontroladores

efectivos. Estos conocimientos sobre los mecanismos de acción involucran: la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia. En general, se debe resaltar que más de un mecanismo puede estar implicado en el efecto de biocontrol (Dheeman et al., 2023).

2.7 Fuentes de microorganismos antagónicos

Los microorganismos antagonistas se localizan en una variedad de nichos ecológicos, como suelos agrícolas, ambientes acuáticos y rizosferas, debido a las condiciones específicas que promueven su desarrollo y actividad biológica. Estos ambientes proporcionan factores esenciales, como nutrientes y competencia microbiana, que favorecen la evolución de estrategias adaptativas en estos organismos. Entre dichas estrategias, destaca la producción de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas y antifúngicas. A continuación, se presentan las principales fuentes de estos microorganismos y sus características específicas.

2.7.1 Microorganismos bacterianos de la Antártida

Debido a las características extremas de la Antártida, tales como temperaturas bajo cero, radiación intensa y escasez de nutrientes, es una fuente prometedora de microorganismos que sintetizan metabolitos secundarios con propiedades únicas. A pesar de que el ecosistema antártico todavía presenta una biodiversidad microbiana inexplorada, existen varias publicaciones que han informado que estos microorganismos son una fuente potencial de compuestos antimicrobianos (Núñez-Montero et al., 2019).

Las bacterias que viven en condiciones ambientales adversas como la Antártida, muestran estrategias de supervivencia atípicas, como la actividad antagónica que reduce la presencia de microorganismos, con el fin de lograr ventajas competitivas. Las cepas

antárticas representan una fuente valiosa y casi inexplorada de moléculas bioactivas para el biocontrol de enfermedades de las plantas (Orella et al., 2023).

2.7.2 Microorganismos bacterianos de fermentación de cacao

Las semillas de cacao fermentadas contienen una microbiota diversa que incluye bacterias ácido-lácticas. Estas bacterias son conocidas por su capacidad de producir compuestos antimicrobianos y enzimas útiles en diversos procesos biotecnológicos (Wijaya et al., 2023). La fermentación del cacao es una etapa indispensable, en la cual la pulpa que envuelve las semillas es metabolizada por microorganismos que producen compuestos como el etanol y ácido acético, los cuales promueven cambios fisicoquímicos importantes en las almendras (Solórzano et al., 2021).

La planta de cacao se presenta como un huésped potencial para estas bacterias endofíticas debido a su resistencia natural a patógenos y plagas, así como a la calidad de sus granos de cacao. Una alternativa viable para abordar este problema es el uso de agentes de biocontrol basados en bacterias endofíticas. Estas bacterias residen dentro de los tejidos vegetales sin causar daño a la planta, e incluso pueden aportar beneficios tanto al huésped como al entorno, como la producción de antibióticos naturales y enzimas degradantes que inhiben el desarrollo de patógenos (Tigrero-Vaca et al., 2022). En los últimos años, varios estudios han explorado el uso de bacterias endofíticas como agentes de biocontrol contra patógenos fúngicos productores de micotoxinas.

2.7.3 Microorganismos fúngicos del Bosque Protector La Prosperina

El Bosque Protector La Prosperina es una fuente importante de hongos con actividad biológica, ya que su biodiversidad permite la obtención de microorganismos

como *Trichoderma* sp., ampliamente conocidos por su capacidad para inhibir patógenos de interés agrícola.

Este bosque tiene un clima seco tropical que favorece el crecimiento de microbiota de suelo rica en consorcios de hongos, como micorrízicos, ectomicorrízicos, micorrízicos arbusculares, patógenos, bacterias y levaduras. Entre los hongos filamentosos predominantes en suelos forestales se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*, los cuales poseen aplicaciones en biocontrol de fitopatógenos, regeneración de suelos degradados y producción sostenible de bienes como alimentos, fármacos y combustibles (Carreño-Bulgarin et al., 2023).

La importancia de los microorganismos fúngicos del bosque tropical seco resalta como un recurso invaluable que merece mayor atención científica. Este ecosistema no solo es un refugio de biodiversidad, sino también un potencial generador de soluciones biotecnológicas innovadoras. Además, la interacción única de estos hongos con las condiciones del clima seco tropical podría ofrecer propiedades aún no descubiertas, lo que subraya la necesidad de más investigaciones en este entorno. Siendo una fuente estratégica para el desarrollo de tecnologías sostenibles que pueden beneficiar tanto a la región como a sectores clave de la economía.

2.8 Medios de cultivo

2.8.1 Trypto-Casein Soy Agar (TSA)

El agar de triptona y soja es un medio utilizado para aislar y cultivar una amplia variedad de microorganismos como bacterias, levaduras y mohos. Contiene caseína y peptonas de soja, que aportan los compuestos nitrogenados esenciales (aminoácidos y péptidos) necesarios para el crecimiento bacteriano (Merck, s.f.).

Debido a su excelente valor nutritivo, puede ser utilizado para el crecimiento y aislamiento de bacterias aeróbicas y anaeróbicas para favorecer el desarrollo de la mayoría de los microorganismos exigentes (BioSer, s.f.).

En esta investigación, este medio de cultivo será utilizado para las bacterias provenientes de semillas de fermentaciones de cacao y de la Antártida.

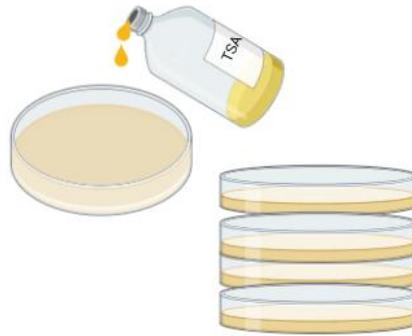


Figura 3. Medio TSA.

2.8.2 Potato dextrosa agar (PDA)

Es un medio de cultivo diseñado para el análisis morfológico de hongos miceliados y levaduras. Esta fórmula también es adecuada para el mantenimiento de cultivos y la diferenciación de ciertos dermatofitos en función de la producción de pigmentos. El extracto de papas proporciona una gran cantidad de nutrientes esenciales, incluyendo carbohidratos complejos y sales minerales, que son fundamentales para el crecimiento de los hongos, facilitando la producción de pigmentos y estructuras que son útiles para la identificación de especies (Valtek S.A., s.f.).

La glucosa sirve como fuente de energía para el metabolismo de los hongos, mientras que el agar actúa como un agente gelificante, garantizando un recuento colonial

más preciso. La adición de antibiótico cloranfenicol y el pH ligeramente ácido del medio ayudan a inhibir el crecimiento de diversas especies bacterianas (Valtek S.A., s.f.). Estas modificaciones crean un entorno que favorece a los hongos y levaduras, al tiempo que inhiben la proliferación de bacterias competidoras.

Organizaciones como la APHA y la FDA recomiendan el agar PDA para el recuento de levaduras y mohos en alimentos, y productos lácteos. Además, este medio es valioso para mantener cultivos de dermatofitos y diferenciar variedades en función de su producción de pigmentos, lo que lo convierte en una herramienta esencial en laboratorios de microbiología. Este medio de cultivo ayudará en esta investigación para sembrar hongos fitopatógenos como *Lasiodiplodia theobromae* y *Moniliophthora roreri*, también será utilizado para la siembra de los hongos antagonistas provenientes del bosque tropical seco.

2.8.3 Luria Broth (LB)

El caldo LB es uno de los más usados para el cultivo de varias especies bacterianas, debido a que es rico en nutrientes, de fácil elaboración y permite el crecimiento de una gran variedad de cepas. Está constituido por tres componentes, de los cuales uno es mineral, el NaCl, y dos son orgánicos: triptona o peptona, y el extracto de levadura (Probiotek, s.f.). Este caldo nutritivo ayudará en esta investigación para sembrar las bacterias provenientes de suelos antárticos y de fermentaciones de cacao.



Figura 4. Medio LB.

2.9 Métodos de confrontaciones antagonistas

2.9.1 Confrontación dual

El método de confrontación dual se utiliza para analizar la interacción entre posibles antagonistas y hongos patógenos. Este enfoque tiene como objetivo evaluar el crecimiento microbiano que podría inhibir el desarrollo micelial del patógeno, utilizando microorganismos seleccionados previamente en función de su identidad y fuente de obtención. A través de este análisis, se busca determinar la eficacia de los microorganismos en la inhibición del hongo patógeno, lo que permitirá seleccionar y evaluar posteriormente estos antagonistas en una confrontación directa (Blanco et al., 2021).

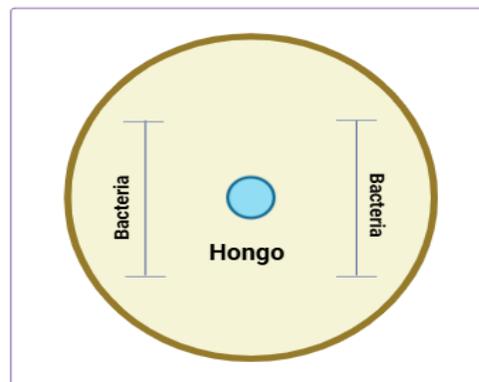


Figura 5. Esquema del método de confrontación dual.

2.9.2 Confrontación directa

Este método se emplea después de haber seleccionado las bacterias con capacidad para antagonizar al patógeno. El objetivo es evaluar el crecimiento microbiano y la acción antagónica de la bacteria contra el fitopatógeno. Durante el proceso, se realizan mediciones del halo en los días 1, 3, 5 y 7, junto con tres controles del hongo patógeno. Se realiza 3 réplicas por bacteria seleccionada, entre las cuales se hace una media de crecimiento entre

los días con las réplicas con el fin de poder ver el área de inhibición del microorganismo antagónico en contra del patógeno (Harris et al., 2020).

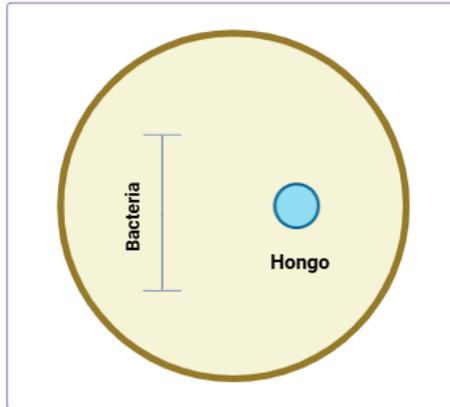


Figura 6. Esquema del método de confrontación directa.

Capítulo 3

3. Materiales y métodos

Reactivación de microorganismos de estudio

Para el estudio antagónico se emplearon cepas conservadas de Colección de Cultivos Microbianos del CIBE (Bionatura, 2021). En total, se emplearán 55 bacterias y 6 hongos provenientes de diferentes nichos ecológicos: fermentados de cacao, Antártida y bosque seco tropical. Los 61 microorganismos a evaluar tienen la siguiente procedencia: 30 microorganismos provenientes de fermentados de cacao, 25 de Antártida y 6 provenientes del bosque seco tropical. Además, se seleccionaron 2 fitopatógenos de relevancia del cultivo de cacao, como *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis y *Lasiodiplodia theobromae* también conocida como “muerte súbita”.

Todas las cepas microbianas están almacenadas bajo condiciones de criopreservación a -80°C , las cepas bacterianas se centraban medio LB con glicerol 20%,

mientras que las cepas fúngicas están conservadas en PDB con glicerol al 20% (Guo et al., 2020).

Para la reactivación, se emplearon los protocolos internos de la colección (Flores & Fernández, 2016), en la que las cepas se inocularon en cajas Petri con TSA, usando la técnica de estriado con un asa y después se incubaron. Considerando las condiciones óptimas de crecimiento, las bacterias provenientes de suelos de cacao se desarrollan a una temperatura de 28°C - 30°C, mientras que las bacterias de origen antártico a 4°C, en un período aproximado de 5 días (Maridueña et al., 2019).

En el caso de los hongos fitopatógenos y antagonistas, se sembraron en cajas Petri con medio PDA más antibióticos (Cloranfenicol 10 mg/mL y estreptomicina 40 mg/mL). Utilizando un sacabocado, se extrae una muestra y se coloca en la caja Petri para ser incubados a 28°C aproximadamente durante 1 semana (Villavicencio-Vasquez et al., 2018).

3.1 Diseño experimental

Tabla 1. Diseño de experimento.

Tipo de diseño	Exploratorio	
Fases de evaluación	Enfrentamientos preliminares y finales	
Procedencia de microorganismos	Antártida	
	Bosque seco tropical	
	Fermentados de cacao	
Hongos fitopatógenos por evaluar	Cultivo asociado	
<i>Moniliophthora roreri</i>	<i>Theobroma cacao</i>	
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Theobroma cacao</i>	

3.1.1 Pruebas antagónicas tipo dual

En la fase inicial, se realizará la prueba antagónica dual empleada por Herrera et al. (2023), donde se evaluarán los 61 microorganismos de los diferentes nichos ecológicos contra los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia theobromae* y *Moniliophthora roreri*. En esta primera fase no se toman mediciones, ya que se pretende seleccionar los microorganismos a base de su crecimiento contra el patógeno, luego llevarlo a la confrontación directa en donde sí se toman medidas de crecimiento por una semana.

Fermentados de cacao

Las bacterias de fermentados de cacao fueron previamente inoculadas en medio LB aproximadamente por 5 días para su crecimiento. En el centro de una caja Petri de 9 cm que contenía PDA, se colocó un hongo patógeno con ayuda de un sacabocado de 8 mm de diámetro. Después, se sembraron dos cepas bacterianas con la técnica de estriado, a una distancia de 1,5 cm entre ellos (Figura 5), y luego se incubó a una temperatura de 28-30°C alrededor de 7 días. Para esta prueba, se realizaron 3 réplicas por confrontación dual y controles del hongo patógeno *Lasiodiplodia theobromae*.

Bacterias antártidas

Las bacterias de Antártida se cultivaron en medio LB durante aproximadamente 7 días, adaptándose a sus condiciones óptimas de crecimiento, que se encuentran entre 7 y 10°C. En el centro de una caja Petri de 9 cm que contenía PDA, se colocó un hongo patógeno con ayuda de un sacabocado de 8 mm de diámetro. Después, se sembraron dos cepas bacterianas con la técnica de estriado, a una distancia de 1,5 cm entre ellos, y luego

se incubó a una temperatura de 20°C alrededor de 7 días. Para esta prueba, se realizaron 3 réplicas por confrontación dual y controles del patógeno *Lasiodiplodia theobromae*.

En el caso de las pruebas de las bacterias provenientes de fermentados de cacao y Antártida frente al fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, se siguió y adaptó la metodología propuesta por Maridueña-Zabala et al. (2022). En el centro de una caja Petri de 9 cm que contenía PDA, se colocó un hongo patógeno con ayuda de un sacabocado de 8 mm de diámetro. Después, se sembraron cuatro cepas bacterianas con la técnica de estriado, a una distancia de 2 cm en los extremos superior, inferior, derecho e izquierdo (Figura 7), y luego se incubó a una temperatura de 28-30°C para las bacterias de fermentados de cacao y 17-20°C para las bacterias antártidas, alrededor de 7 días. Para esta prueba, se realizaron 3 réplicas por confrontación dual y controles del hongo patógeno *M. roreri*. Este método, al igual que el descrito por Herrera et al. (2023), garantiza que los microorganismos promisorios puedan inhibir al patógeno de la misma manera.

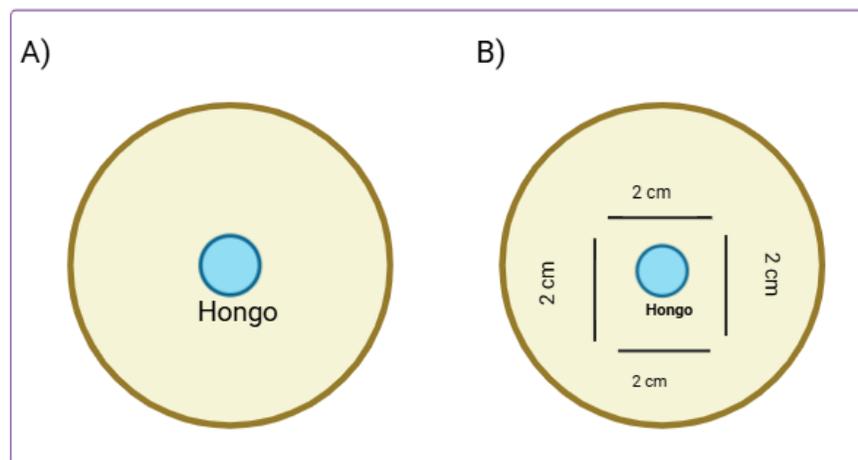


Figura 7. Esquema de la fase preliminar empleada para la evaluación de bacterias promisorias frente a fitopatógenos. A) Tratamiento control. B) Ensayo dual del biocontrolador y el patógeno.

Bosque protector

Para la evaluación antagónica de los hongos del bosque protector con los hongos patógenos, se empleó una prueba de micoparasitismo (Condori et al., 2016). Se colocó un hongo del bosque seco tropical en cada extremo de la caja Petri que contenía PDA más antibióticos (Cloranfenicol 10 mg/mL y estreptomicina 40 mg/mL), a una distancia de 1,5 cm entre ellos. Seguido, el hongo patógeno se ubicó en el centro de la caja Petri, y finalmente se incubó a 27°C por 7 días (Figura 8). Para esta prueba, se realizaron 3 réplicas por confrontación dual y controles de los patógenos *Lasiodiplodia theobromae* y *Moniliophthora roreri*.

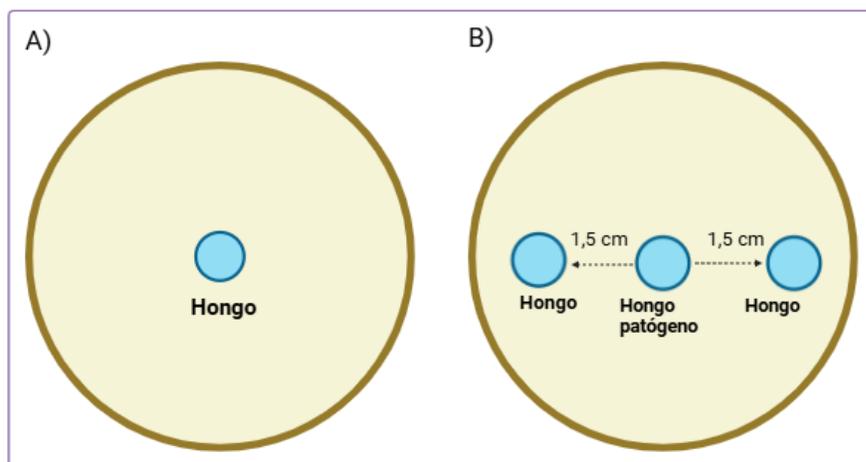


Figura 8. Esquema de la fase preliminar empleada para la evaluación de hongos promisorios frente a fitopatógenos. A) Tratamiento control. B) Ensayo dual del biocontrolador y el patógeno.

3.1.2 Selección de microorganismos para confrontación directa

Una vez que se realizó la confrontación dual de todos los microorganismos promisorios con los patógenos, se seleccionaron aquellos con mayor potencial

antimicrobiano para el biocontrol patogénico del cultivo de cacao. Posteriormente, se realizó una confrontación directa de manera exploratoria, midiendo el crecimiento entre el microorganismo y el patógeno durante un período de 7 días.

Para la selección de bacterias a evaluar, se tomaron en cuenta cuatro criterios de acuerdo con su potencial de biocontrol (Figura 9). En la que, de acuerdo con su crecimiento, se determinó: Criterio 1) Las bacterias impiden el crecimiento del patógeno, por ende, son seleccionadas para la confrontación final. Criterio 2) Una bacteria fue capaz de impedir el crecimiento del fitopatógeno, por lo cual, solo esa es seleccionada. Criterio 3) El patógeno cubre toda la superficie de la placa, por lo que ninguna es seleccionada. Criterio 4) El patógeno cubre una bacteria por completo en la placa, no obstante, hay un microorganismo seleccionado que impide el crecimiento micelial.

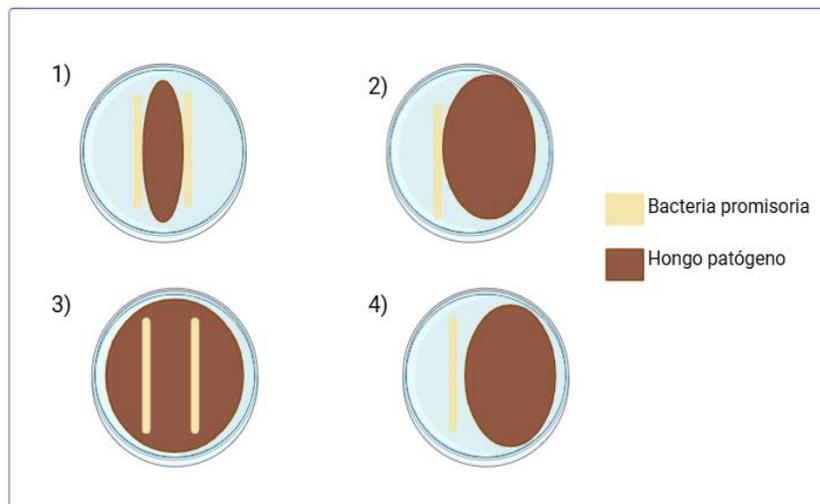


Figura 9. Criterios de selección de bacterias promisorias para confrontación directa.

Para la selección de hongos a evaluar, se tomaron en cuenta cuatro criterios de acuerdo con su potencial de biocontrol (Figura 10). En la que, de acuerdo con su

crecimiento, se determinó: Criterio 1) Los hongos promisorios inhibieron al patógeno. Criterio 2) Un hongo antagonico presenta micoparasitismo. Sin embargo, la otra cepa no, por lo que se la descarta. Criterio 3) Los hongos no pudieron frenar el crecimiento patogénico, lo que significa que hubo poco crecimiento, pero no son seleccionados. Criterio 4) El patógeno cubre toda la placa, por lo que ningún hongo promisorio pudo ser seleccionado.

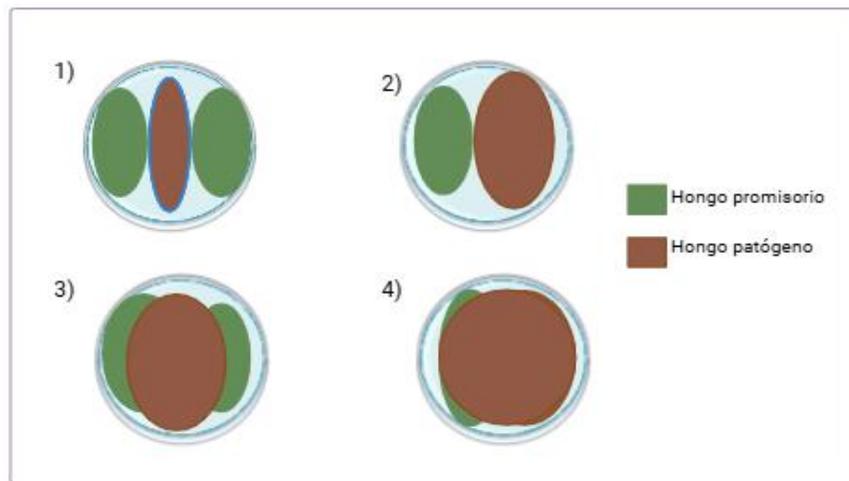


Figura 10. Criterios de selección de hongos promisorios para confrontación directa.

3.1.3 Evaluación directa de los microorganismos con potencial biocontrolador

Los ensayos se llevaron a cabo de manera *in vitro*, utilizando una metodología adaptada de Cubilla-Ríos et al. (2019). Para esta segunda fase, se seleccionaron los microorganismos con potencial biocontrolador y se evaluaron de manera individual con los patógenos. Se realizaron tres réplicas para cada posible biocontrolador y tres réplicas para el control del patógeno.

Se midió el crecimiento de los halos de inhibición con la ayuda de una regla graduada, lo que permitió identificar las cepas bacterianas o fúngicas con capacidad de

controlar al patógeno, así como evaluar el crecimiento de las cepas en las condiciones de control. La distancia entre el microorganismo benéfico y el patógeno fue modificada ligeramente. En el caso de bacteria-hongo, la distancia entre extremos fue de 3 cm (Figura 11), mientras que para el enfrentamiento hongo-hongo fue de 1,5 cm (Fig. 12).

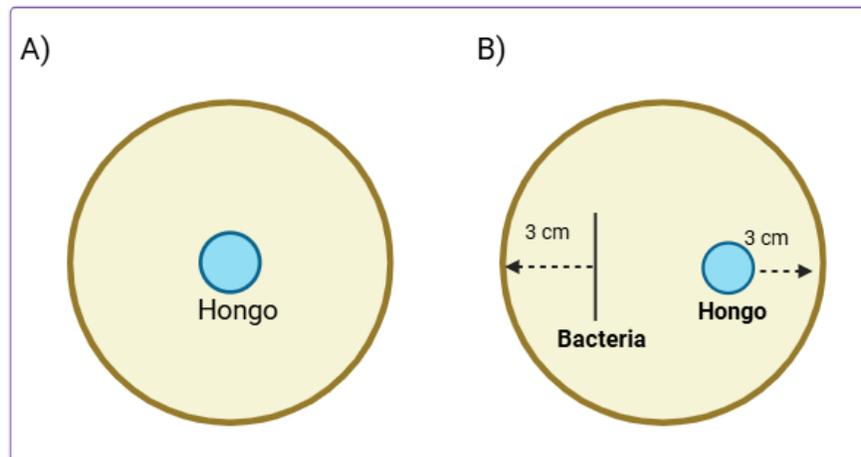


Figura 11. Esquema de la fase final empleada para la evaluación de bacterias promisorias frente a fitopatógenos. A) Tratamiento control. B) Ensayo directo del biocontrolador y el patógeno.

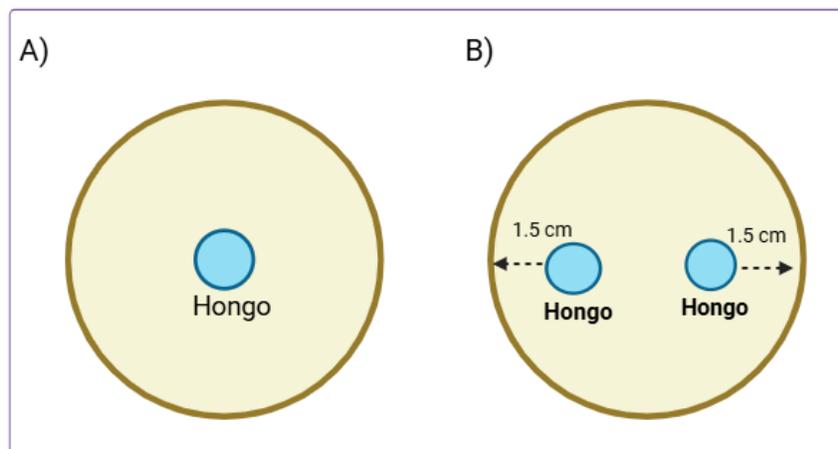


Figura 12. Esquema de la fase final empleada para la evaluación de hongos promisorios frente a fitopatógenos. A) Tratamiento control. B) Ensayo directo del biocontrolador y el patógeno.

Posteriormente, se sembraron las bacterias previamente de los fermentados de cacao (cultivadas durante 5 días a 27°C) y de la Antártida (cultivadas durante 7 días a 10°C)

en medio LB para favorecer su crecimiento. Luego, estas se inocularon en medio PDA junto al patógeno. Con ayuda de un sacabocado de 8 mm de diámetro, se colocó el patógeno en un extremo de la placa a una distancia de 3 cm, mientras que el microorganismo benéfico se colocó en el extremo opuesto, manteniendo la misma distancia.

Para el enfrentamiento directo entre los hongos del bosque seco tropical y los patógenos, se siguió el mismo protocolo utilizado por Cubilla-Ríos et al. (2019), en el que ambos se inoculan a una distancia de 3 cm entre extremos. En este caso, se utilizó PDA más antibióticos (Cloranfenicol y estreptomicina) para evitar el crecimiento de bacterias, lo que permite realizar la evaluación de manera más adecuada.

Una vez realizada la confrontación directa, las mediciones del halo de inhibición se realizaron en intervalos de 1, 3, 5 y 7 días, evaluando el crecimiento radial del patógeno en presencia del microorganismo promisorio. Al final, se calculó el promedio de todos estos datos. El halo de inhibición bacteriano se definió como la distancia entre el punto de inoculación de la bacteria y el límite de crecimiento del hongo patógeno, según el protocolo descrito por Blanco et al. (2021).

3.1.4 Análisis estadístico

Se utilizó ANOVA o Kruskal-Wallis dependiendo si los datos son paramétricos o no paramétricos para evaluar las diferencias de crecimiento antagónico entre los grupos de microorganismos por cada patógeno *Lasiodiplodia theobromae* y *Moniliophthora roreri*. En el cual, se aplicará la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, con el fin de determinar qué microorganismo presentó la mayor capacidad inhibitoria frente al patógeno (Statgraphics Centurion, 2024).

Los datos obtenidos de cada microorganismo promisorio, junto con los patógenos evaluados, se analizan utilizando el programa Statgraphics (Statgraphics Centurion, 2024). Este programa nos permite observar en detalle las medias y, a través de gráficos, visualizar el crecimiento antagónico de los microorganismos. De esta manera, es posible seleccionar de la forma más precisa qué bacterias y hongos muestran un mayor impacto en el crecimiento de los hongos patógenos.

Capítulo 4

4. Resultados y discusión

4.1 Evaluación preliminar de microorganismos promisorios

De las evaluaciones realizadas de las bacterias de fermentados de cacao, Antártida y hongos del bosque seco tropical, se obtuvo un total de 22 microorganismos con actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae* (Tabla 2) y un total de 22 microorganismos entre fermentados de cacao, Antártida y hongos del bosque seco tropical contra el patógeno *Moniliophthora roreri* (Tabla 3).

Tabla 2. Microorganismos promisorios seleccionados en la confrontación dual del patógeno *Lasiodiplodia theobromae*.

Procedencia	Identificación
Fermentados de cacao	<i>Acetobacter ghanensis</i>
	<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	<i>Acetobacter oryzoeni</i>
	<i>Bacillus velezensis</i>
	<i>Acetobacter tropicalis</i>
	<i>Paenibacillus vulneris</i>
	<i>Ralstonia</i> sp.
	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Levilactobacillus brevis</i>
	<i>Priestia megaterium</i>
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>

	<i>Bacillus siamensis</i>
	<i>Liquorilactobacillus mali</i>
	<i>Acetobacter</i> sp.
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Bacillus altitudinis</i>
	<i>Acetobacter papayae</i>
Bosque protector	<i>Trichoderma inhamatum</i>
	<i>Trichoderma spirale</i>

Tabla 3. Microorganismos promisorios seleccionados en la confrontación dual del patógeno *Moniliophthora roreri*.

Procedencia	Identificación
Fermentados de cacao	<i>Priestia megaterium</i>
	<i>Bacillus paramycooides</i>
	<i>Acetobacter oryzoeni</i>
	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Acetobacter tropicalis</i>
	<i>Leuconostoc pseudomesentorioides</i>
	<i>Sphingomonas panni</i>
	<i>Bacillus velezensis</i>
	<i>Bacillus siamensis</i>
	<i>Brevibacillus formosus</i>
	<i>Acetobacter papayae</i>
Antártida	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Pseudomonas kitaguniensis</i>
	<i>Janthinobacterium tructae</i>
	<i>Filibacter</i> sp.
	<i>Pseudomonas yamanorum</i>
	<i>Streptomyces nojiriensis</i>
	<i>Chryseobacterium</i> sp.
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	
Bosque protector	<i>Trichoderma inhamatum</i>
	<i>Trichoderma spirale</i>
	<i>Gongronella butleri</i>

Estos microorganismos promisorios fueron seleccionados por su capacidad de inhibir a los hongos patógenos en la confrontación dual. A continuación, se describen los resultados de esta prueba preliminar por cada fuente de microorganismo promisorio.

4.1.1 Selección de bacterias de fermentados de cacao contra hongos fitopatógenos

En la figura 13, se observaron durante 7 días algunas cepas promisorias con mejor crecimiento de las 20 bacterias seleccionadas de fermentados que inhibieron al patógeno *L. theobromae*, donde se observó que la mayor parte de los microorganismos seleccionados tuvieron un antagonismo en contra del patógeno, destacando a las bacterias del género *Acetobacter*. Además, resaltando bacterias que no han sido mencionadas en otras investigaciones como las bacterias *Liquorilactobacillus mali*, *Lactobacillus plantarum* y *Paenibacillus vulneris*, que representan atributos antifúngicos para biocontrolar al patógeno, posiblemente gracias a la producción de enzimas antagónicas o metabolitos secundarios (Wijaya et al., 2023).

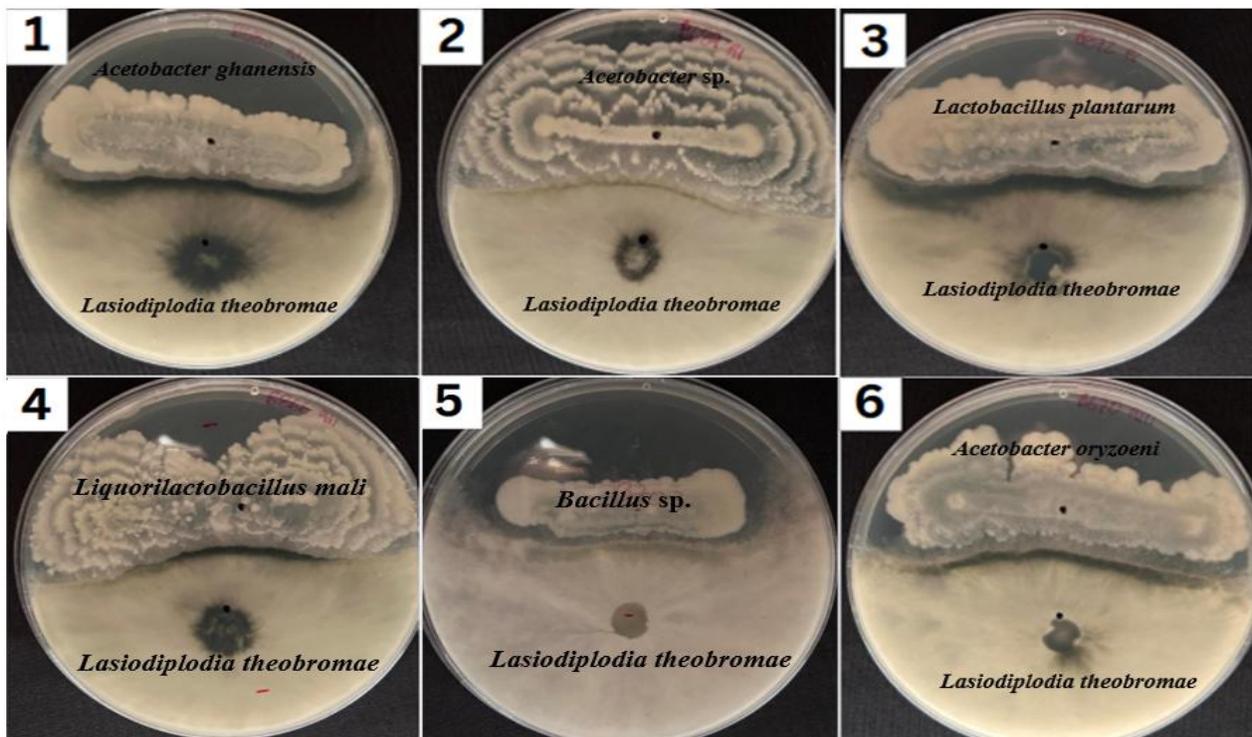


Figura 13. Microorganismos que inhibieron al hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae* en el día 7 de evaluación.

Acerca de la interacción entre las bacterias de fermentados de cacao y el patógeno *Moniliophthora roreri*, se identificaron 12 cepas promisorias a través de confrontaciones duales (Figura 14), por lo que este hallazgo sugiere que existe un potencial biocontrolador en las cepas seleccionadas, destacando nuevos microorganismos con posible potencial biocontrolador.

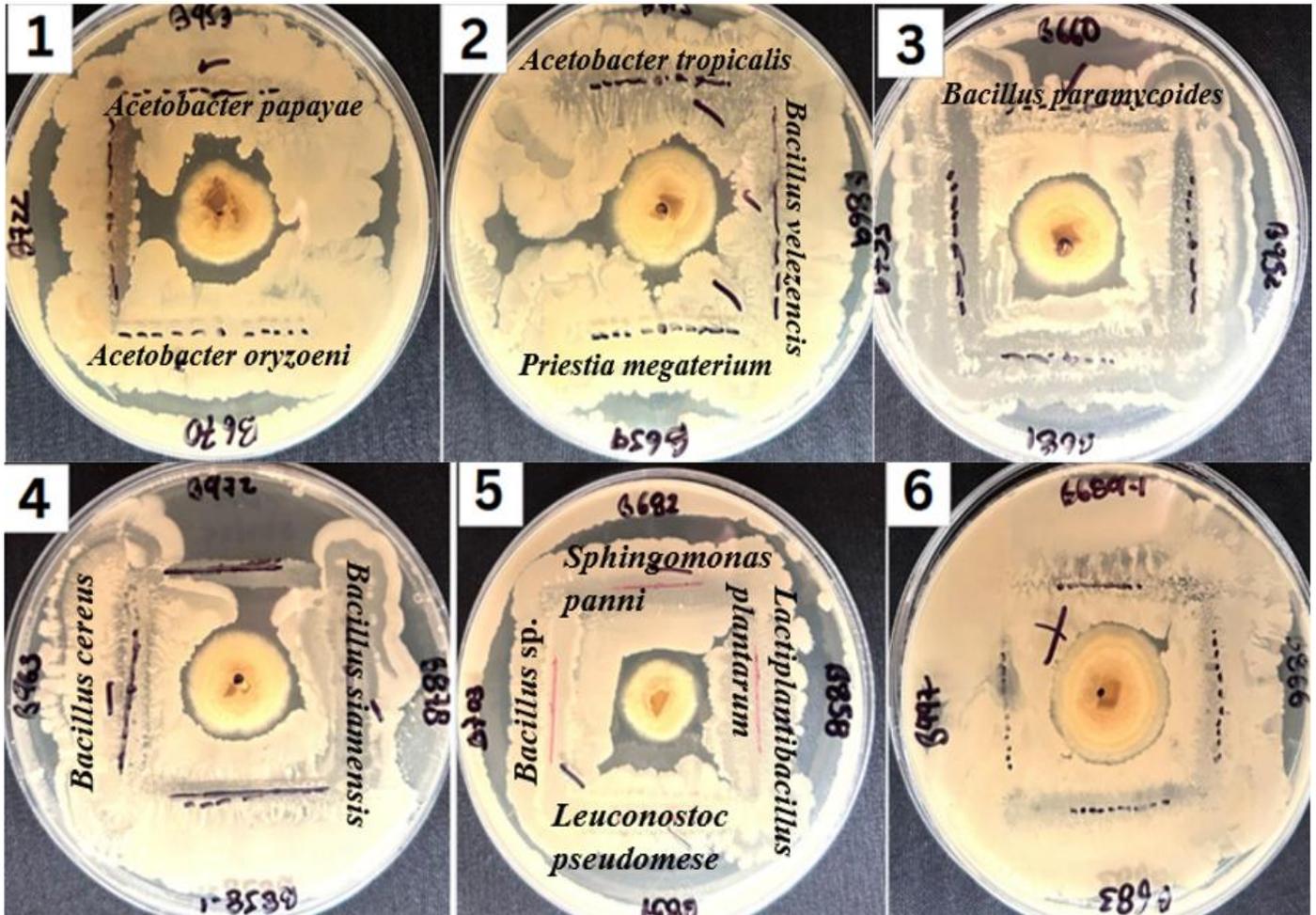


Figura 14. Bacterias promisorias de fermentados de cacao contra *M. roreri* en confrontación dual al día 7.

Se identificó el crecimiento de 8 cepas bacterianas promisorias en común frente a ambos fitopatógenos, lo que sugiere que estas cepas pueden tener un potencial biocontrolador patogénico generalista o de amplio espectro. Su relevancia en esta investigación sugiere que deben ser consideradas para futuras aplicaciones en el control biológico de fitopatógenos. Se resalta la

importancia de bacterias que no han sido estudiadas donde se observa que tienen competencia directa por espacio y nutrientes contra patógenos, como *Sphingomonas panni* y *Priestia megaterium* (Dheeman et al., 2023).

4.1.2 Selección de bacterias de Antártida contra hongos fitopatógenos

No hubo crecimiento de bacterias de Antártida frente a *Lasiodiplodia theobromae*, ya que fueron inhibidas completamente por el patógeno en la confrontación dual, por lo que quedan descartadas para la prueba de confrontación directa. No pudieron crecer debido a la falta de condiciones óptimas de crecimiento, lo que significa que se debería considerar los consorcios microbianos para potenciar su efecto biocontrolador contra patógenos, ya que posiblemente no contaron con una interacción sinérgica o el apoyo de otros microorganismos que podrían haber favorecido su crecimiento o actividad (Viera-Arroyo et al., 2020).

En la figura 15, se observan los enfrentamientos duales de las bacterias de Antártida frente al patógeno *Moniliophthora roreri*. Se especula que, debido a la influencia de la temperatura, el crecimiento del patógeno fue lento. En consecuencia, se hicieron ensayos adicionales en los que se probó el efecto de la temperatura en el crecimiento de 7 cepas y el patógeno, lo que nos permitió identificar una temperatura óptima para ambos microorganismos que es de 22°C.

Se evidencia un crecimiento micelial reducido a partir del día 5. Durante esta fase de crecimiento, existe una competencia mutua por el aprovechamiento de nutrientes, lo que resulta en un desarrollo más lento a diferencia del ensayo de las bacterias de fermentados de cacao (Santos et al., 2020).

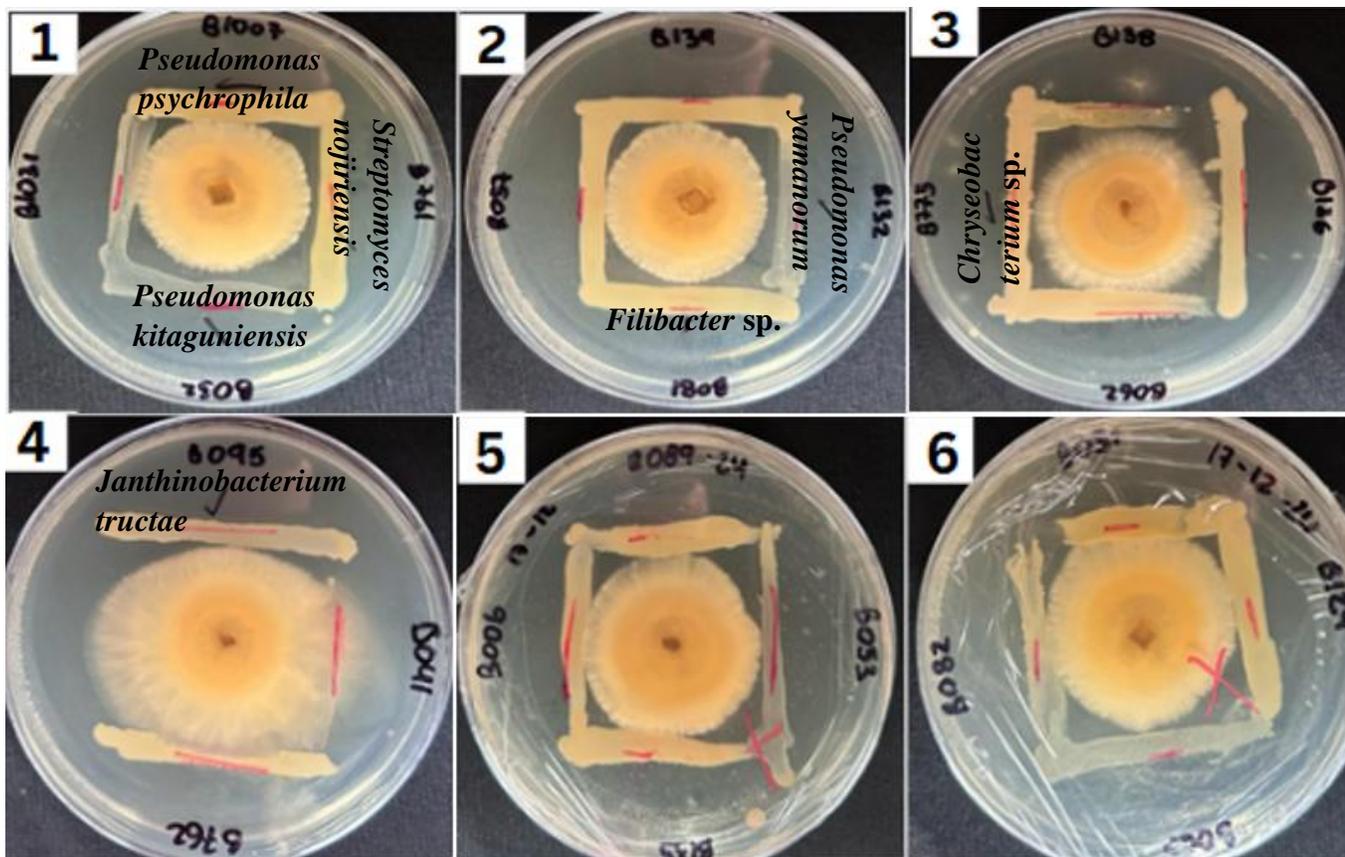


Figura 15. Bacterias promisorias de Antártida contra *M. roreri* en confrontación dual al día 7 de evaluación.

4.1.3 Selección de hongos del bosque seco tropical contra hongos fitopatógenos

Se realizó la confrontación dual de los 6 hongos del bosque seco tropical contra el fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*, para seleccionar los hongos promisorios que podrían inhibir al fitopatógeno (Figura 16).

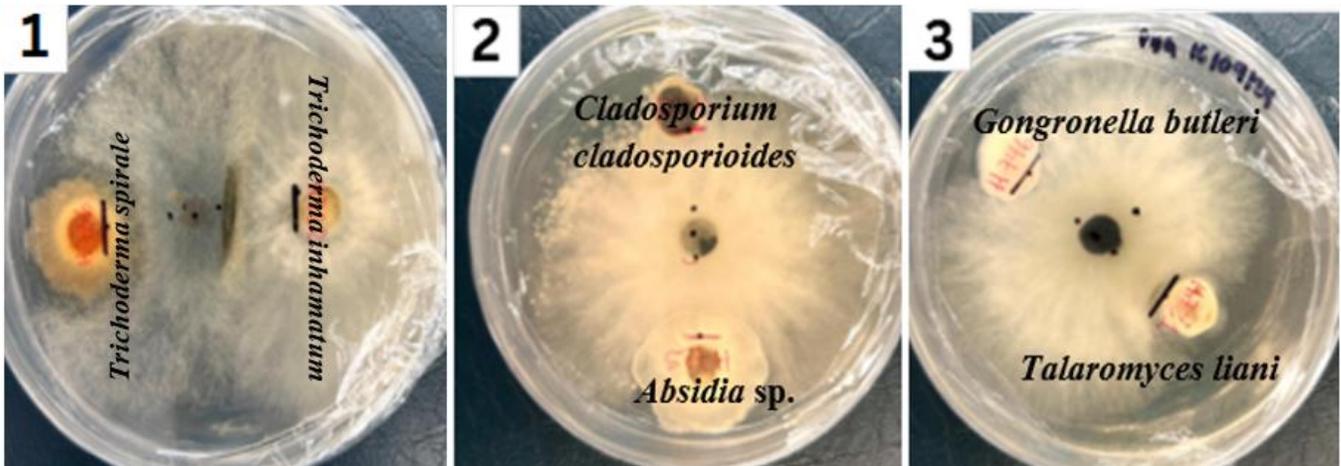


Figura 16. Hongos benéficos de bosque protector contra *L. theobromae* en confrontación dual en el día 7 de evaluación. 1) Dos hongos promisorios seleccionados por inhibir al patógeno. 2) Hongos descartados por no presentar halos de inhibición. 3) Mayor crecimiento del hongo patógeno en la placa Petri.

Los primeros días de la prueba antagonica, se observó la competitividad fúngica entre hongo con potencial benéfico contra hongo patógeno. No obstante, a partir del tercer día, la interacción antagonista entre ambos hongos comienza a ser influenciada por el hongo promisorio (Fig. 16). Considerando que los hongos *Trichoderma spirale* y *Trichoderma inhamatum* fueron seleccionados por su capacidad antagonica al ser expuestos con el patógeno, ya que demostraron mayor crecimiento micelial o micoparasitismo (Carvajal et al., 2024).

Se realizó el ensayo de confrontación dual de los 6 hongos promisorios contra el fitopatógeno *Moniliophthora roreri*. Al quinto día, se pudo observar que solo tres hongos promisorios: *Trichoderma spirale*, *Trichoderma inhamatum* y *Gongronella butleri* inhibieron a *M. roreri* (Figura 17).

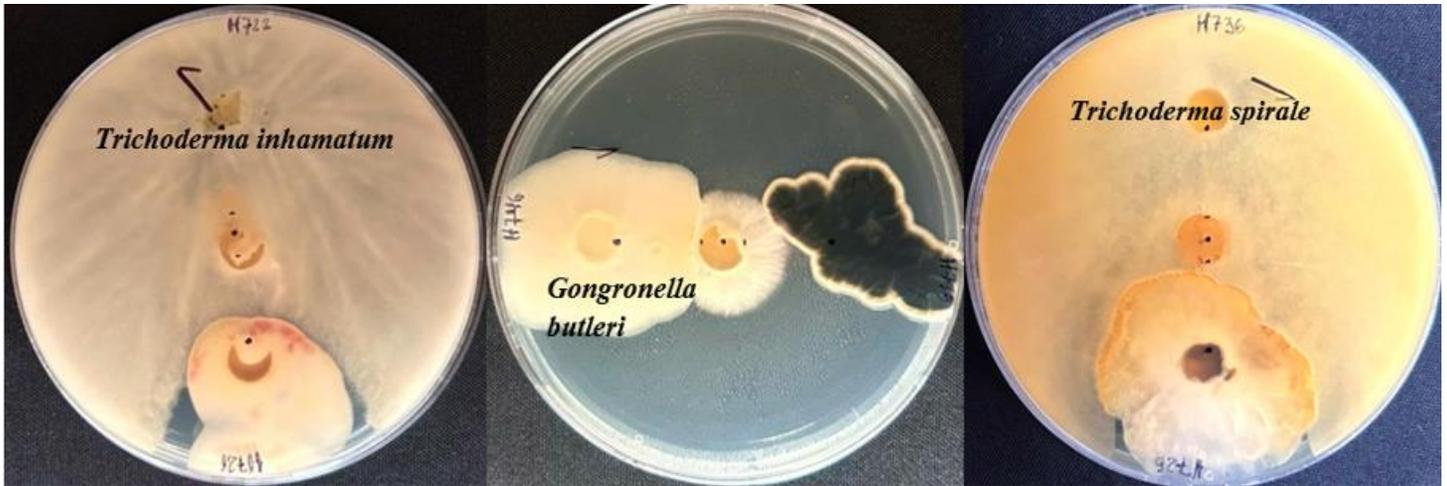


Figura 17. Hongos promisorios contra *M. royeri* en confrontación dual en el día 7 de evaluación.

A cabo del día 5, se observó un mayor crecimiento micelial de hongos promisorios en contra de *M. royeri*, destacando que estos hongos provenientes del bosque seco tropical tienen el potencial de ser antagonistas contra este patógeno (Carreño-Bulgarin et al., 2023). *Gongronella butleri* al no ser estudiada por otros investigadores, se considera una alternativa novedosa para el control de este patógeno.

4.2 Confrontación directa de microorganismos promisorios contra patógenos

4.2.1 Ensayo antagónico de bacterias de fermentados de cacao

En el anexo 2, se presentan las mediciones de crecimiento diarias de las bacterias de fermentados de cacao en interacción con el hongo *Lasiodiplodia theobromae*. Con los datos obtenidos de las mediciones del anexo 2, se realizó una prueba de homocedasticidad por medio de la prueba de Levene (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la prueba de Levene para los datos de crecimiento diario de las bacterias de fermentados de cacao frente a *Lasiodiplodia theobromae*.

Prueba de varianza	Prueba	Valor p
Levene	2,05421	0,0073

El valor p de la prueba de Levene es menor a 0,05, indicando que hay evidencia suficiente para rechazar la homogeneidad de varianza. Se sugiere realizar datos no paramétricos, por ende, se realizará un Kruskal-Wallis obtenido con el programa Statgraphics detallado en la tabla 5.

Tabla 5. Prueba de Kruskal-Wallis con nivel de confianza del 90% con bacterias de fermentados de cacao contra *Lasiodiplodia theobromae*.

Prueba de Kruskal-Wallis	
Bacterias de fermentados de cacao	Rango promedio
<i>Acetobacter ghanensis</i>	163,125
<i>Acetobacter oryzoeni</i>	147,208
<i>Acetobacter papayae</i>	157,583
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	161,833
<i>Acetobacter</i> sp.	112,792
<i>Acetobacter tropicalis</i>	148,625
<i>Bacillus altitudinis</i>	50,3333
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	142,792
<i>Bacillus cereus</i>	150,292
<i>Bacillus licheniformis</i>	51,375
<i>Bacillus siamensis</i>	124,417
<i>Bacillus</i> sp.	132,917
<i>Bacillus velezensis</i>	120,708
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	138,417
<i>Lactobacillus plantarum</i>	130,5
<i>Levilactobacillus brevis</i>	36,0833
<i>Liquorilactobacillus mali</i>	126,292
<i>Paenibacillus vulneris</i>	38,1667
<i>Priestia megaterium</i>	128,625
<i>Ralstonia</i> sp.	147,917

Prueba estadística: 82,4602 **Valor p:** 6,97881E-10

Nota. Las bacterias resaltadas fueron inhibidas por el hongo patógeno.

Como el valor p de la prueba es menor, hay diferencia estadísticamente significativa entre el crecimiento de bacterias promisorias en presencia del patógeno, representando que la mayor parte de las cepas bacterianas tuvieron mayor resistencia y tolerancia al patógeno de estudio.

En consecuencia, la mayor parte de microorganismos con potencial benéfico pudieron controlar su crecimiento, descartando la opción de que no exista la posibilidad de bacterias capaces de biocontrolar el patógeno *Lasiodiplodia theobromae*. 16 bacterias promisorias fueron capaces de inhibir el crecimiento micelial.

Para verificar qué bacterias lograron inhibir a los patógenos por completo y cuáles no lograron crecer, se realiza la prueba de Tukey (Tabla 6), que permite agrupar a las bacterias con antagonismo para saber qué grupos de bacterias son diferentes entre sí.

Tabla 6. Prueba de Tukey con nivel de confianza del 90% en las bacterias de fermentados de cacao frente a *Lasiodiplodia theobromae*.

Tabla de medias por el método Tukey HSD			
Bacterias de fermentados de cacao	Media	Límite inferior	Límite superior
<i>Acetobacter ghanensis</i>	1,20833	0,542012	1,87465
<i>Acetobacter oryzoeni</i>	1,14167	0,475346	1,80799
<i>Acetobacter papayae</i>	1,175	0,508679	1,84132
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1,26667	0,600346	1,93299
<i>Acetobacter</i> sp.	0,829167	0,162846	1,49549
<i>Acetobacter tropicalis</i>	1,65	0,983679	2,31632
<i>Bacillus altitudinis</i>	0,266667	-0,399654	0,932988
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,08333	0,417012	1,74965
<i>Bacillus cereus</i>	1,09167	0,425346	1,75799
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,279167	-0,387154	0,945488
<i>Bacillus siamensis</i>	0,958333	0,292012	1,62465
<i>Bacillus</i> sp.	1,04167	0,375346	1,70799
<i>Bacillus velezensis</i>	1,51667	0,850346	2,18299
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	1,04167	0,375346	1,70799
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,625	0,958679	2,29132
<i>Levilactobacillus brevis</i>	0,175	-0,491321	0,841321
<i>Liquorilactobacillus mali</i>	0,975	0,308679	1,64132
<i>Paenibacillus vulneris</i>	0,183333	-0,482988	0,849654
<i>Priestia megaterium</i>	0,983333	0,317012	1,64965
<i>Ralstonia</i> sp.	1,13333	0,467012	1,79965

Nota. Las bacterias resaltadas fueron inhibidas por el hongo patógeno.

Se pudo verificar que las bacterias seleccionadas tuvieron mayor índice de crecimiento, aunque algunas fueron inhibidas por completo por el hongo patógeno como se indica en la tabla 6. Con la prueba de Kruskal-Wallis por rango promedio, se verificó que *Paenibacillus vulneris*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus altitudinis* y *Levilactobacillus plantarum* no ejercen antagonismo.

El resto de las bacterias tuvieron un crecimiento normal indicando que existen diferencias entre los grupos de bacterias seleccionadas, a diferencia de las que tuvieron mayor rango, es decir *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter papayae* por lo que inhibieron al patógeno. Esto sugiere que el género *Acetobacter* tiene un potencial considerable como biocontroladores de *L. theobromae*. Además, se constató que algunas bacterias del fermentado de cacao lograron crecer de manera óptima en presencia del patógeno, mientras que otras no mostraron capacidad de inhibición, evidenciando la variabilidad en la respuesta de las cepas bacterianas ante el desafío del fitopatógeno.

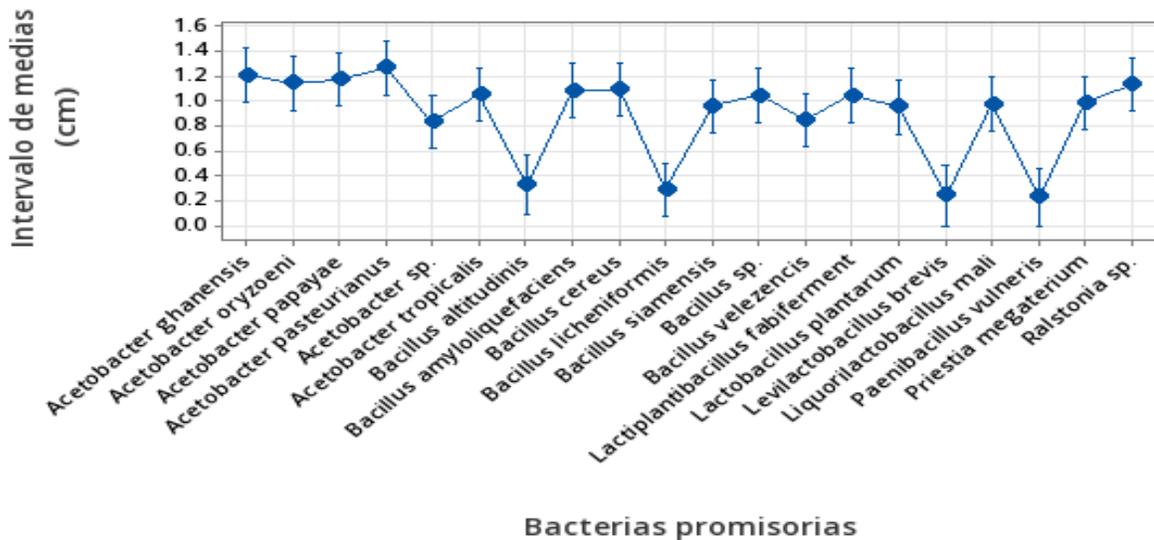


Figura 18. Gráfica de diferencias de medias de bacterias de fermentados de cacao con mayor crecimiento y con menor crecimiento realizada con prueba de Tukey (*L. theobromae*). Los puntos de color azul hacen referencia al promedio de los valores obtenidos en la prueba Tukey de los microorganismos.

El contraste de crecimiento acelerado del control del patógeno a partir del día 3 versus las pruebas directas contribuyó en la comparación del efecto de las bacterias promisorias en la inhibición del crecimiento micelial de *L. theobromae*. Esta comparación permitió identificar la capacidad de varios microorganismos para frenar el desarrollo del patógeno.

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis y Tukey se confirma que la mayor parte bacterias de fermentados de cacao presentan antagonismo contra el patógeno. No todos los microorganismos promisorios lograron inhibir al hongo patógeno, resaltando que en esta ocasión las bacterias de género *Acetobacter* y *Bacillus* que tienen mayor antagonismo, por lo que se puede concordar con otros autores, que estas especies pueden secretar compuestos antifúngicos capaces de biocontrolar a patógenos (Wang et al., 2023). Aunque también existieron otras cepas bacterianas que destacaron por su antagonismo en la investigación como *Lactiplantibacillus fabifermentans*, *Ralstonia* sp. y *Priestia megaterium*, siendo posibles nuevas alternativas de biocontroladores contra el patógeno. Algunos autores sugieren que se debe a la secreción de metabolitos que inhiben al patógeno (Rusin et al., 2020).

Mediante la evaluación de las placas Petri, se observó que las bacterias provenientes del fermentado de cacao demostraron un alto potencial biocontrolador del patógeno *Moniliophthora roreri* (Tabla 3), seguidas por los hongos del bosque seco tropical, mientras que las bacterias de la Antártida mostraron un desempeño significativamente menor. Con ayuda de los datos del anexo 4, se obtuvieron los datos necesarios para realizar la prueba de homocedasticidad por medio de Levene.

El valor p de la prueba de Levene es menor de 0,05, asegurando que no sigue ninguna homocedasticidad, ya que no es paramétrico.

Tabla 7. Resultados de la prueba de Levene para los datos de crecimiento diario de las bacterias de fermentados de cacao frente a *Moniliophthora roreri*.

Prueba de varianza	Prueba	Valor p
Levene	2,62606	0,0046

Se realiza un análisis de Kruskal-Wallis (Tabla 8) para determinar el crecimiento de cada bacteria por medio de sus rangos. Lo que indica que las 12 bacterias seleccionadas tienen un crecimiento similar, a diferencia de tres cepas *Bacillus* sp., *Brevibacillus formosus* y *Bacillus siamensis*, que tuvieron mayor antagonismo dentro de las confrontaciones directas.

Tabla 8. Prueba de Kruskal-Wallis con nivel de confianza del 90% con bacterias de fermentados de cacao y *Moniliophthora roreri*.

Prueba de Kruskal-Wallis	
Bacterias de fermentados de cacao	Rango promedio
<i>Acetobacter oryzoeni</i>	63,9583
<i>Acetobacter papayae</i>	70,375
<i>Acetobacter tropicalis</i>	56,8333
<i>Bacillus cereus</i>	50,7083
<i>Bacillus paramycoides</i>	84,5
<i>Bacillus siamensis</i>	91,125
<i>Bacillus</i> sp.	98,0417
<i>Bacillus velezensis</i>	45,2083
<i>Brevibacillus formosus</i>	90,25
<i>Leuconostoc pseudomesentorioides</i>	63,875
<i>Priestina megaterium</i>	72,2083
<i>Sphingomonas panni</i>	82,9167

Prueba estadística: 22,0327 **Valor p:** 0,0241214

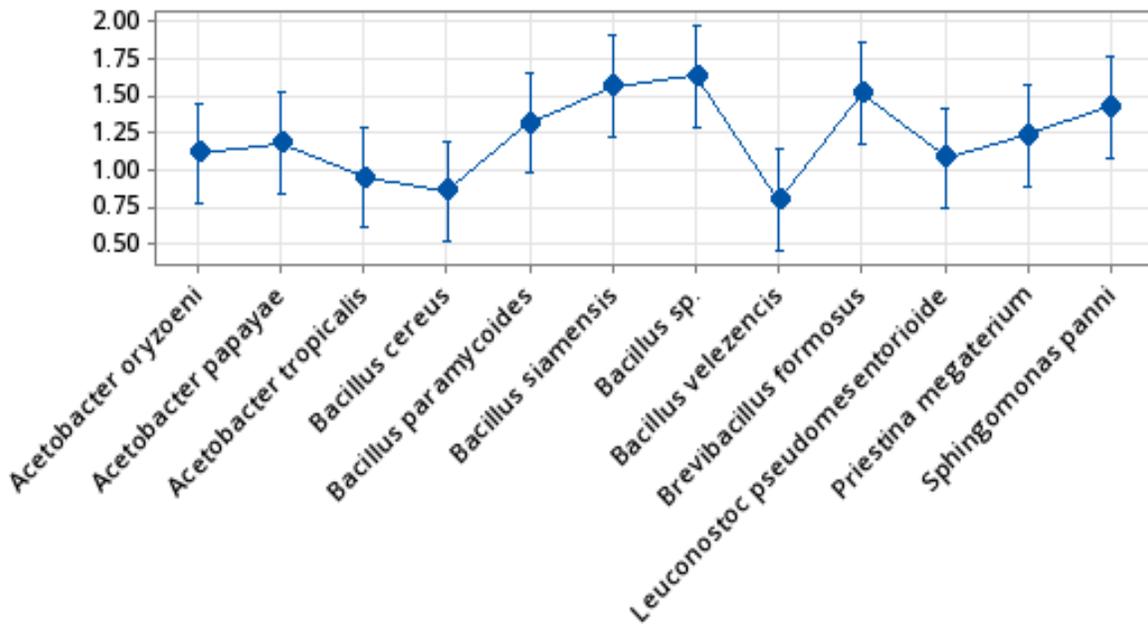
Se encontraron resultados estadísticamente significativos entre los grupos de este análisis, ya que el valor p es menor al nivel de significancia que es 0,05, dando a entender que la mayor parte de las bacterias de fermentados de cacao fueron capaces de inhibir el crecimiento micelial del hongo patógeno.

Para poder verificar las cepas que tuvieron mayor potencial biocontrolador del patógeno *Moniliophthora roreri*, se realizó la prueba Tukey (Tabla 9). Observando que las bacterias promisorias que proporciona el análisis Kruskal-Wallis son iguales a la de Tukey, ya que, en ambas pruebas, las mismas bacterias otorgaron datos estadísticamente significativos al ser competitivas con el hongo patógeno en el transcurso de los días, manteniendo y asegurando que se cumplieron con los parámetros esperados.

Tabla 9. Prueba de Tukey con nivel de confianza del 90% en las bacterias de fermentados de cacao y *Moniliophthora roreri*.

Tabla de medias por el Método Tukey HSD				
Bacterias de fermentados de cacao	de	Media	Límite inferior	Límite superior
<i>Acetobacter oryzoeni</i>		1,11667	-0,441722	2,67506
<i>Acetobacter papayae</i>		1,18333	-0,375056	2,74172
<i>Acetobacter tropicalis</i>		0,95	-0,608389	2,50839
<i>Bacillus cereus</i>		0,858333	-0,700056	2,41672
<i>Bacillus paramycoides</i>		1,99167	0,433278	3,55006
<i>Bacillus siamensis</i>		1,56667	0,00827783	3,12506
<i>Bacillus sp.</i>		3,20833	1,64994	4,76672
<i>Bacillus velezensis</i>		0,8	-0,758389	2,35839
<i>Brevibacillus formosus</i>		3,09167	1,53328	4,65006
<i>Leuconostoc pseudomesentorioides</i>		1,08333	-0,475056	2,64172
<i>Priestina megaterium</i>		1,23333	-0,325056	2,79172
<i>Sphingomonas panni</i>		1,425	-0,133389	2,98339

Todas las cepas tenían un crecimiento similar como indican las medias de cada una, a diferencia de las bacterias *Acetobacter tropicalis* y *Bacillus velezensis*, posiblemente por la falta de consorcios microbianos, ya que con anterioridad sí expresó un biocontrol. Al ser expuestas de manera directa, no tuvieron el mismo crecimiento, siendo afectadas por el patógeno. Para poder reconocer cuales bacterias tuvieron mayor viabilidad, se emplea una gráfica con ayuda del programa MiniTab con los valores que nos dio Statgraphics en la tabla 9.



Bacterias promisorias

Figura 19. Gráfica de diferencias de medias de bacterias de fermentados de cacao con mayor crecimiento y con menor crecimiento realizada con prueba de Tukey (*M. roreri*).

Para corroborar estos datos, se realiza una comparación de medias en grupos de las bacterias seleccionadas de acuerdo con la figura 19, la cual representa el crecimiento de cada bacteria por sus medias, destacando su posibilidad como biocontroladores de patógenos. A pesar de que las medias de estos microorganismos eran estadísticamente similares, se establece que estos datos son similares a los que se obtuvieron con el patógeno *Lasiodiplodia theobromae*, ya que en ambos patógenos estudiados, 8 microorganismos antagonistas resaltaron por igual, que fueron *Acetobacter oryzoeni*, *Acetobacter papayae*, *Acetobacter tropicalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus* sp., *Bacillus velezensis* y *Priestia megaterium*.

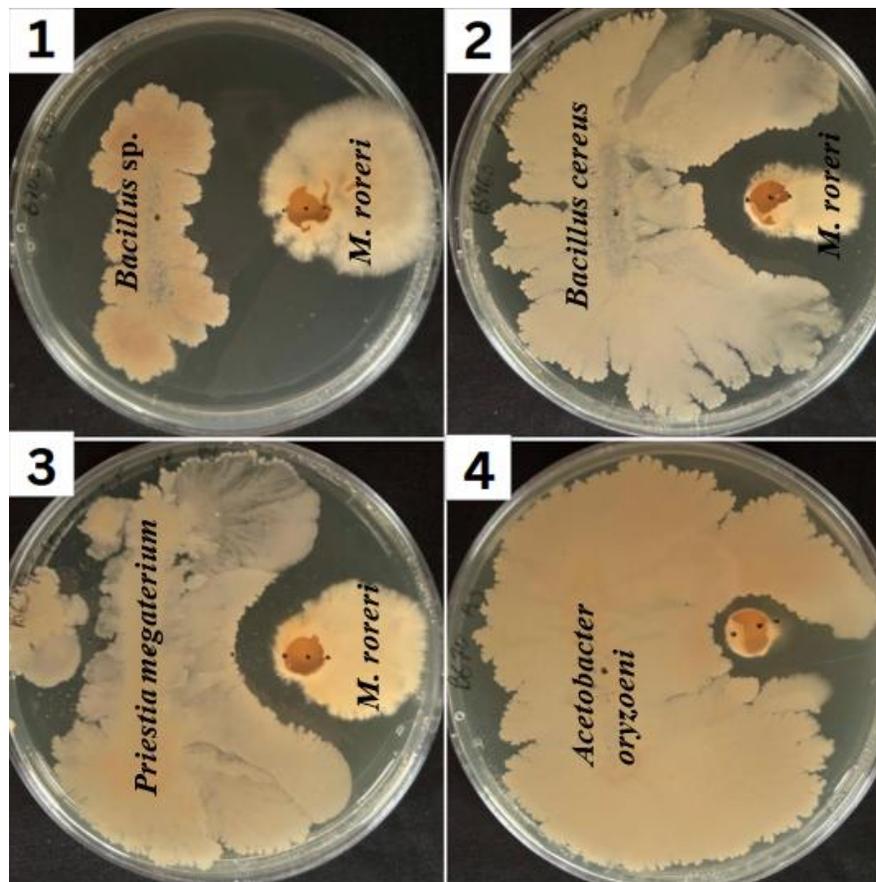


Figura 20. Bacterias promisorias de fermentados de cacao que inhibieron al patógeno *Moniliophthora roreri* en el día 7.

A partir del día 10, se realizó un seguimiento para observar algún cambio significativo en las confrontaciones. Todas las bacterias continuaron controlando al patógeno, excepto *Bacillus paramycoides* y *Sphingomonas panni*, quienes fueron inhibidas por *M. roreri*. Esta interacción opuesta a las demás cepas pudo deberse a un mecanismo de defensa del patógeno que pudiese implicar la producción de metabolitos tóxicos para estas bacterias (Palacios-López et al., 2020).

4.2.2 Ensayo antagónico de microorganismos de Antártida

Una vez seleccionadas las cepas microbianas, se establecieron mediciones diarias del crecimiento de los microorganismos promisorios contra el patógeno *M. roreri* que se encuentran en el anexo 5. Con estos datos, se realizó una prueba de Levene presentado en la tabla 10 con ayuda de Statgraphics.

Tabla 10. Resultados de la prueba de Levene para los datos de crecimiento diario de las bacterias de fermentados de cacao frente a *Moniliophthora roreri*.

Prueba de varianza	Prueba	Valor p
Levene	3,14068	0,0083

El valor p menor a 0,05 en la prueba de Levene representa la relación entre la variabilidad observada entre los grupos de las bacterias seleccionadas y la variabilidad dentro de los grupos, por lo que se lleva a cabo un análisis de Kruskal-Wallis, ya que es un método no paramétrico (Tabla 11).

Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis con nivel de confianza del 90% en bacterias de Antártida y *Moniliophthora roreri*.

Prueba de Kruskal-Wallis	
Bacterias de Antártida	Rango promedio
<i>Chryseobacterium</i> sp.	53,3333
<i>Filibacter</i> sp.	42,5417
<i>Janthinobacterium tructae</i>	26,9167

<i>Pseudomonas kitaguniensis</i>	45,7917
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	52,2083
<i>Pseudomonas yamanorum</i>	32,75
<i>Streptomycesnojiriensis</i>	43,9583

Prueba estadística: 11,3943 **Valor p:** 0,0769283

Estos valores fueron extraídos por Statgraphics con los datos del anexo 5, por consiguiente, como el valor p en el Kruskal-Wallis es mayor a 0,05, no se encuentra evidencia suficiente para concluir que haya diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, dándonos a entender que la mayor parte de microorganismos seleccionados fueron capaces de controlar al patógeno hasta el día 7. Por lo que su crecimiento no es estadísticamente diferente al resto de bacterias.

Una bacteria que no logró inhibir a *M. royeri* fue *Janthinobacterium tructae*, pese a haber demostrado la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo patógeno en las pruebas duales. Esta diferencia en los resultados finales podría deberse por la falta de consorcios microbianos, puesto que en la fase preliminar de las cepas promisorias estaban expuestas con otras bacterias en la misma caja Petri, resaltando la baja competitividad microbiana contra el patógeno (Orella et al., 2023).

Aunque esto no explica a detalle su incapacidad antagónica en la confrontación final, se cree que la interacción con otras cepas puede generar el intercambio de nutrientes entre ambas cepas. Se sugiere que *Janthinobacterium tructae* no se descarte sin probar nuevas condiciones de ensayo (Dheeman et al., 2023).

Para verificar que las bacterias actúan como biocontroladoras contra el patógeno, se realizó la prueba de Tukey, agrupando cada bacterias para ver si hay diferencias

significativas entre ellas (Tabla 12). Esto permitió relacionar las medias de crecimiento de las bacterias con mayor y menor de inhibición frente al patógeno, estableciendo una diferencia significativa en el crecimiento directo entre ambas bacterias contra *Moniliophthora roreri*.

Tabla 12. Prueba de Tukey con nivel de confianza del 90% en las bacterias de Antártida y *Moniliophthora roreri*.

Tabla de medias por el Método Tukey HSD			
Bacterias de Antártida	Media	Límite inferior	Límite superior
<i>Chryseobacterium</i> sp.	1,775	0,393403	3,1566
<i>Filibacter</i> sp.	1,5	0,118403	2,8816
<i>Janthinobacterium tructae</i>	0,9	-0,481597	2,2816
<i>Pseudomonas kitaguniensis</i>	3,21667	1,83507	4,59826
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	1,65	0,268403	3,0316
<i>Pseudomonas yamanorum</i>	1,175	-0,206597	2,5566
<i>Streptomyces nojiriensis</i>	1,45	0,0684028	2,8316

Estos resultados aportan información relevante sobre las bacterias seleccionadas en las confrontaciones directas, ya que la mayoría logró detener el crecimiento contra el patógeno de manera óptima hasta el día 7. Sin embargo, todas tuvieron un comportamiento similar de acuerdo con la gráfica descrita de la figura 21, describiendo así, que todas las cepas tienen un mecanismo de defensa similar contra el patógeno.

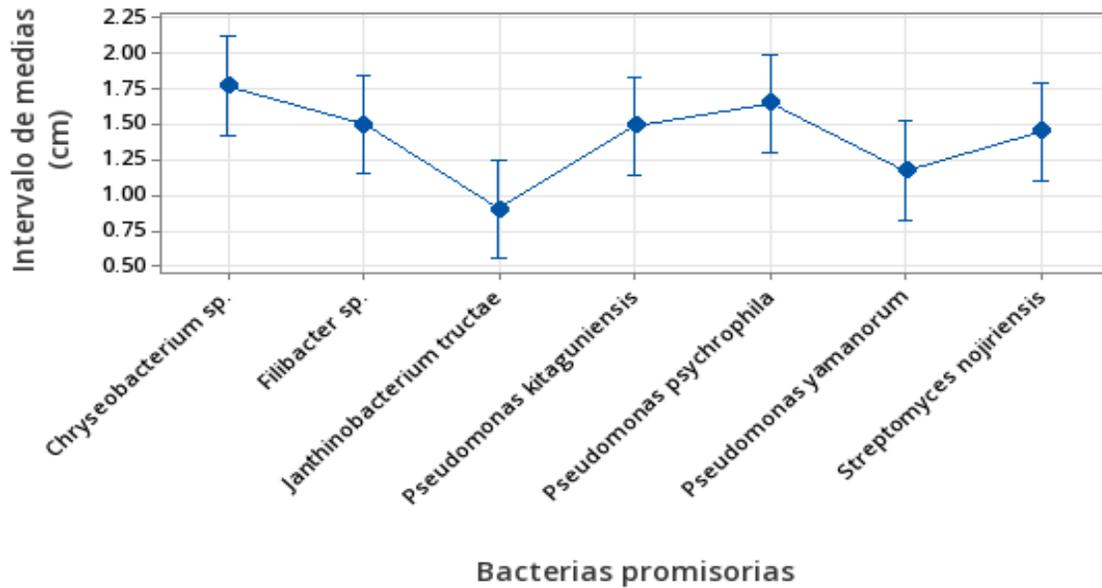


Figura 21. Gráfica de diferencias de medias de bacterias de Antártida con mayor crecimiento y con menor crecimiento realizada con prueba de Tukey (*M. roreri*).

Se observó el crecimiento de las bacterias seleccionadas, destacando que la mayoría de los microorganismos fueron capaces de inhibir el crecimiento del hongo patógeno de manera significativa, sobresaliendo la bacteria *Chryseobacterium sp.* (Figura 21). Los resultados obtenidos mediante la prueba Tukey y el análisis de Kruskal-Wallis nos ayudaron a coincidir en que las bacterias con menor antagonismo fueron *Janthinobacterium tructae* y *Pseudomonas yamanorum*, ya que su crecimiento fue bajo como se mostró en la tabla de mediciones diarias del anexo 5. Esto concuerda con Santos

et al. (2020), quien encontró bacterias de suelos antárticos con crecimientos limitados, debido a la variabilidad de su entorno, como el medio de cultivo o temperatura, afectando a sus propiedades antifúngicas, aceptando que se debe de seguir investigando más a estas bacterias para mejorar su aplicación como cepas biocontroladoras de fitopatógenos.

Las actinobacterias antárticas han demostrado una importante actividad antifúngica contra varios hongos fitopatógenos (Santos et al., 2020). Aunque el hongo patógeno mostró crecimiento limitado hasta el día 5, se procedió a cambiar la temperatura a 25 °C a partir del día 7 tras tomar las mediciones finales, debido a que no se registró crecimiento micelial en el control ni en las confrontaciones.

Este cambio pudo afectar a las confrontaciones generando dudas al respecto. Se recomendaría repetir estas pruebas individuales, bajo diferentes temperaturas, hasta encontrar un rango de crecimiento similar entre el microorganismo promisorio contra el patógeno *M. roreri*, y hasta ver un crecimiento óptimo en el control para validar estos hallazgos.

Al día 10 se observó un cambio drástico entre el microorganismo y *M. roreri*, donde el hongo patógeno creció de manera significativa, afectando el crecimiento de las bacterias de la Antártida e inhibiéndolas por completo, excepto *Filibacter* sp., quien pudo controlar el crecimiento del patógeno hasta el día 10.

En los enfrentamientos individuales contra el patógeno, ciertos microorganismos presentan diferente capacidad antagónica por la competitividad de nutrientes con el fitopatógeno. Por ello, funciona de mejor manera en consorcios bacterianos (Blanco et al., 2021).

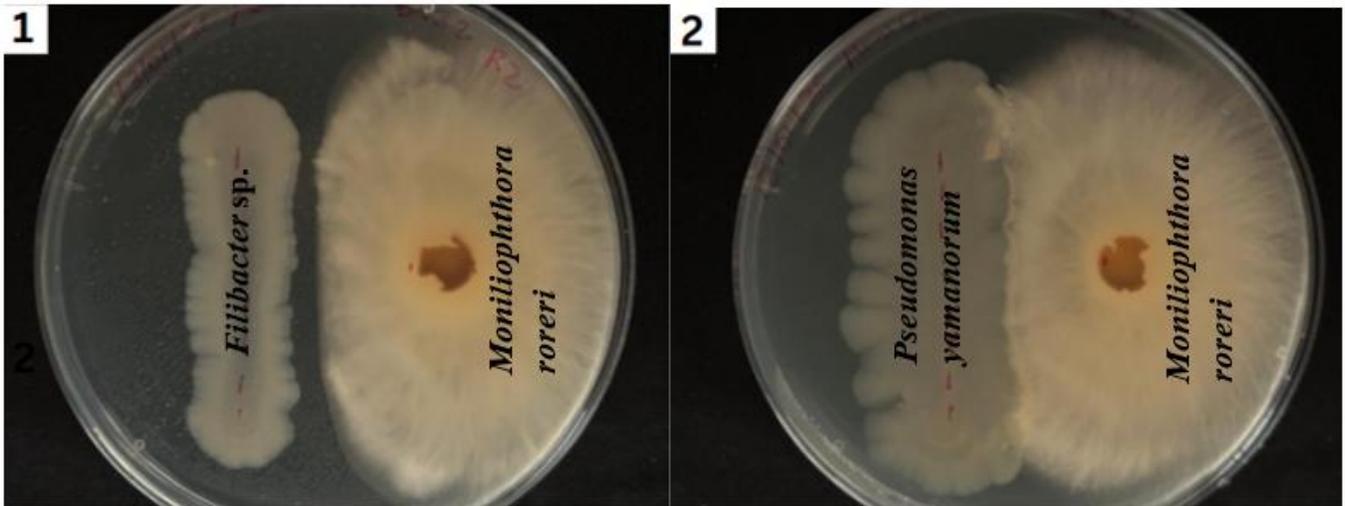


Figura 22. Bacterias promisorias de Antártida que inhibieron al patógeno *Moniliophthora roreri* en el día 7 de evaluación. 1) Bacteria promisoría inhibió al fitopatógeno. 2) Bacteria detuvo el crecimiento del patógeno.

4.2.3 Ensayo antagónico de hongos del bosque protector

Los hongos promisorios del bosque seco tropical lograron inhibir al patógeno cuando actuaron en conjunto. También se observó este efecto antagonista de manera individual e incluso potenciado. Los hongos promisorios inhibieron por completo al patógeno a partir del día 3 (Anexo 3).

Los hongos del género *Trichoderma* fueron antagonistas con capacidad biocontroladora. Este hallazgo se puede comparar con los controles del patógeno *L. theobromae*, el cual sí creció completamente en toda la caja Petri. Esta capacidad

biocontroladora puede ser el resultado de la producción de metabolitos secundarios que tienen propiedades inhibitorias de fitopatógenos (Oyesola et al., 2024).

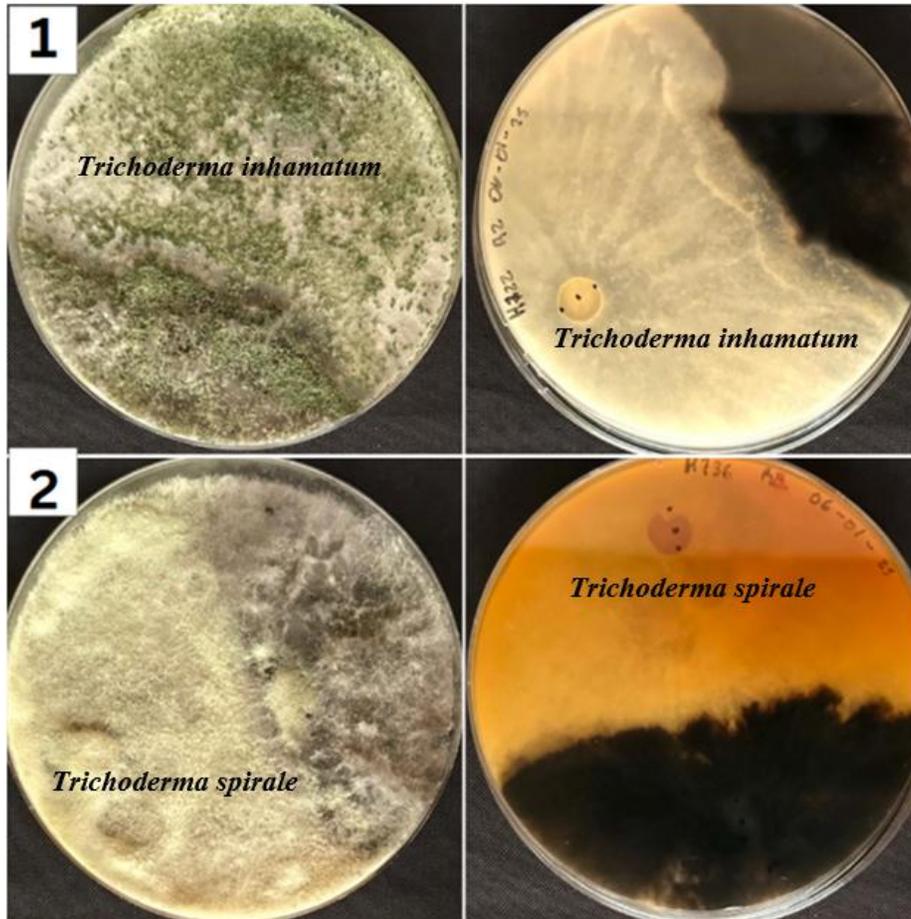


Figura 23. Hongos benéficos que inhibieron al patógeno *Lasiodiplodia theobromae* en el día 7 de evaluación.

Estos hongos promisorios *Trichoderma spirale* y *Trichoderma inhamatum* presentaron gran capacidad antagónica contra *L. theobromae*, como lo demuestran algunos autores, puesto que logran producir metabolitos secundarios como la gliotoxina y las triconinas, que tienen propiedades antifúngicas. Además, pueden degradar las paredes celulares de fitopatógenos, ya que utilizan enzimas como las quitinasas y las β -1,3-glucanasas (Oyesola et al., 2024).

La confrontación final de los tres hongos promisorios, *Trichoderma spirale*, *Trichoderma inhamatum* y *Gongronella butleri* presentaron micoparasitismo contra el fitopatógeno *Moniliophthora roreri* (Figura 24), inhibiendo al patógeno desde el día 5 como se muestra en el anexo 6.

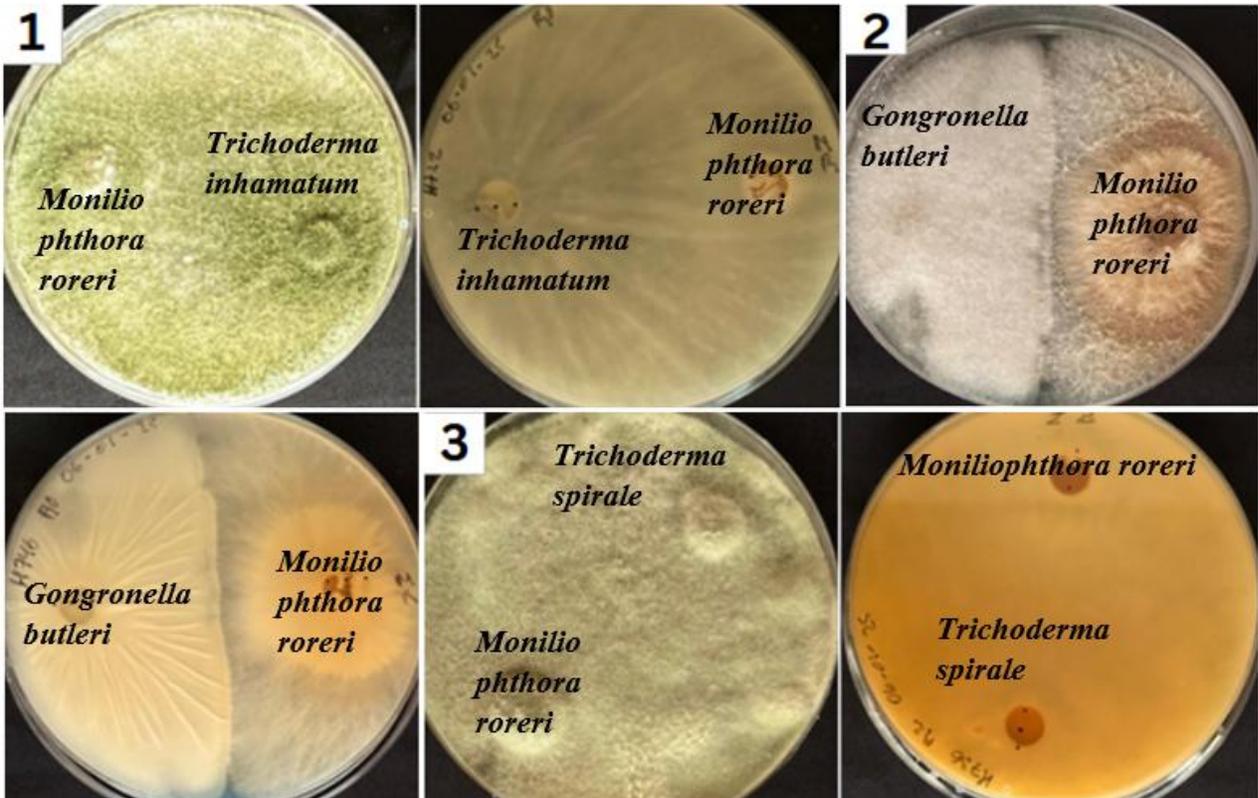


Figura 24. Hongos benéficos que inhibieron al patógeno *Moniliophthora roreri* en el día 7 de evaluación.

Estos hongos presentaron antagonismo contra el patógeno *L. theobromae* y contra *M. roreri*, demostrando su alta capacidad antagónica contra estos hongos fitopatógenos (Oyesola et al., 2024). De estos hongos, destaca el hongo *Gongronella butleri*, cuyos estudios son limitados y escasos, por lo que su inclusión en esta investigación como biocontrolador sugiere una posible actividad micoparasitaria similar a *Trichoderma spirale* y *Trichoderma inhamatum* (Borriss & Keswani, 2023).

Capítulo 5

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Este estudio demostró el potencial de bacterias y hongos en la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos *Lasiodiplodia theobromae* y *Moniliophthora roreri*. En los enfrentamientos duales contra *L. theobromae*, 20 bacterias provenientes de fermentados de cacao y 2 hongos del bosque seco tropical mostraron actividad antagónica, mientras que en los enfrentamientos finales, solo 16 bacterias de fermentados de cacao y los 2 hongos promisorios mantuvieron esta capacidad inhibitoria. En los enfrentamientos duales frente a *Moniliophthora roreri*, se identificó actividad inhibitoria en 12 bacterias de fermentados de cacao, 7 bacterias antárticas y 3 hongos del bosque seco tropical. En los enfrentamientos finales, 10 bacterias de fermentados de cacao, 1 bacteria de Antártida y 3 hongos del bosque seco inhibieron el crecimiento micelial del fitopatógeno.

Se destaca principalmente las bacterias provenientes de fermentados de cacao, en especial del género *Acetobacter* y *Bacillus*, y los hongos endófitos *Trichoderma inhamatum* y *Trichoderma spirale*, con mejores resultados para el control biológico de agentes infecciosos. El hongo *Gongronella butleri* también presentó actividad antagónica en menor medida que los hongos del género *Trichoderma*, aun así, se presenta como una nueva alternativa de biocontrolador contra patógenos. Además, hay que resaltar otras cepas bacterianas que tuvieron actividad antagónica como *Chryseobacterium* sp., *Lactiplantibacillus fabifermentans*, *Ralstonia* sp. y *Priestia megaterium*.

Sobre los microorganismos antárticos, hubo bacterias que crecieron en confrontación dual, pero no en confrontación directa. Por lo que, sería recomendable el uso

de consorcios microbianos en las cepas que tuvieron menor actividad antagónica para potenciar su efecto biocontrolador contra patógenos. También se debería considerar *Chryseobacterium* sp., *Filibacter* sp., *Pseudomonas kitaguniensis*, *Pseudomonas psychrophila*, *Pseudomonas yamanorum* y *Streptomyces nojiriensis* como posibles nuevas alternativas de biocontroladores contra patógenos.

Finalmente, este estudio proporciona información de la evaluación *in vitro* de estas cepas bacterianas para el biocontrol de fitopatógenos para futuras investigaciones con la finalidad de que estas cepas bacterianas puedan ser aprovechadas para el desarrollo de futuros productos biotecnológicos a base de microorganismos.

5.2 Recomendaciones

- Se sugiere realizar más confrontaciones duales que incluyan diferentes arreglos de cepas que en esta investigación no hayan demostrado actividad inhibitoria contra ambos patógenos, con el fin de explorar su potencial en consorcios microbianos antes de descartarlos.
- Evaluar nuevas condiciones controladas de ensayo tales como temperatura y concentración, para las pruebas con bacterias provenientes de la Antártida, en búsqueda de profundizar el potencial de estos microorganismos.

Referencias bibliográficas:

- Anecacao (2023). *Asociación nacional de exportadores de cacao - Ecuador*. Revista Anecacao: Edición junio 2023. <https://anecacao.com/wp-content/uploads/2023/07/26.-REVISTA-ANECACAO-junio-2023.pdf>
- Atin Kumar., Narasimha, Reddy, Donthi. (2024). *Adverse Effects of Pesticides: Regulatory Failures, Impacts on Public Health and Environmental Wellbeing*. doi:10.5772/intechopen.1006357
- BCE (2024). *Presentación coyuntural, estadísticas y macroeconómicas*. Banco Central del Ecuador.<https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/SectorReal/Previsiones/IndCoyuntura/EstMacro052024.pdf>
- Blanco, Erika Lorena y Castro, Yulimar. (2021). *Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador*. Revista Colombiana de Biotecnología, 23 (1), 6-16. Publicación electrónica del 10 de agosto de 2021. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808>
- Borriss, R., & Keswani, C. (2023). *Biological Control of the Plant Pathogens. Microorganisms*, 11(12), 2930. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122930>
- Carine Rusin., F., R., Cavalcanti., Patrícia, Carla, Giloni, de, Lima., Cacilda, Márcia, Duarte, Rios, Faria., Marcus, André, Kurtz, Almança., Renato, Vasconcelos, Botelho. (2020). *Control of the fungi Lasiodiplodia theobromae, the causal agent of dieback, in cv. syrah grapevines*. doi: 10.6084/m9.figshare.14288169
- Carreño-Bulgarin, G. P., Quijije-Franco, G., Diaz, B., Maridueña-Zavala, M. G., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2023). *Identificación de hongos filamentosos asociados al suelo del*

bosque protegido de Prosperina. Bionatura, 8(1), 1–10.
<https://doi.org/10.21931/rb/2023.08.01.22>

Carvajal, Ivonne & Macías Holguín, Cristhian & Thompson, Javier & Briones, Denis & Díaz, Luis. (2024). *Biocontrol de Moniliophthora roreri con Trichoderma harzianum y Bacillus subtilis en cacao CCN-51*. Código Científico Revista de Investigación. 10.55813/gaea/ccri/v5/nE4/462.

<https://revistacodigocientifico.itslosandes.net/index.php/1/article/view/462>

Chamba Correa , K. P., Pardo Castillo , D. M., Cabrera Montiel , L. G., & León Serrano , L. A. (2024). *Ecuador: Producción agrícola de cacao de la Economía Popular y Solidaria con respecto al rendimiento por hectárea, 2002-2022*. Arandu UTIC, 11(2), 1668–1680.

<https://doi.org/10.69639/arandu.v11i2.274>

Chaudhary, R., Nawaz, A., Khattak, Z., Butt, M. A., Fouillaud, M., Dufossé, L., Munir, M., Haq, I. u., & Mukhtar, H. (2024). *Microbial bio-control agents: A comprehensive analysis on sustainable pest management in agriculture*. Journal of Agricultural and Food Research.

<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101421>

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2020). *Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization*. Soil Biology & Biochemistry, 42(5), 669–678.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

Condori N, Leon B, Zapana J. (2016). *Antagonistic native fungi of Vicia faba L. with biocontrol capacity to Botrytis fabae S*. Rev Investig Altoandin. Doi:10.18271/ria.2016.217

Cubilla, Alberto & Ruiz-Diaz-Mendoza, Dani & Romero-Rodriguez, Maria & Flores, Eugenia & Barua, Javier. (2019). *Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de Trichoderma*

contra aislamientos paraguayos de Macrophomina phaseolina. Agronomía Mesoamericana. doi:10.15517/am.v30i1.34423.

Darmawa (2023). *Evaluation of environmental impact on cocoa production and processing under life cycle assessment method: From beans to liquor*. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100481>

Delgado Morato, L. D., Álvarez González, A. S., & Bermúdez Cardona, M. B. (2023). *Inducción de resistencia sistémica en Theobroma cacao L. para el manejo de la “escoba de bruja” causada por Moniliophthora perniciosa*. Tropical Plant Pathology, 48(5), 463–468. <https://doi.org/10.1007/s40858-023-00581-w>

Dheeman, S., Kumar, M., Maheshwari, D.K. (2023). *Beneficial Microbial Mixtures for Efficient Biocontrol of Plant Diseases: Impediments and Success*. In: Maheshwari, D.K., Dheeman, S. (eds) *Sustainable Agrobiolgy. Microorganisms for Sustainability, vol 43*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-9570-5_2

Duke, S. O., Pan, Z., Bajsa Hirschel, J., Tamang, P., Hammerschmidt, R., Lorsbach, B. A., & Sparks, T. C. (2023). *Molecular targets of herbicides and fungicides - Are there useful overlaps for fungicide discovery?* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71(51), 20532-20548. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c07166>

Erazo Solórzano, C. Y., Bravo Franco, K. J., Tuárez García, D. A., Fernández Escobar, Á. O., Torres Navarrete, Y. G., Vera Chang, J. F., & Universidad Técnica Estatal de Quevedo. (2021). *Efecto de la fermentación de cacao (Theobroma cacao L.), variedad nacional y trinitario, en cajas de maderas no convencionales sobre la calidad física y sensorial del licor de cacao*. Revista de Investigación Talentos, 8(2), 42–55. <https://doi.org/10.33789/talentos.8.2.153>

- FAO, et al. (2021). *The state of food security and nutrition in the world 2021*. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. <https://doi.org/10.4060/cb4474en>
- Faruque, Ahmad., Fakhruddin, Ali, Ahmad., A., A., Alsayegh., Md, Zeyauallah., Abdullah, M., AlShahrani., Khursheed, Muzammil., Abdullah, Ali, Saati., Shadma, Wahab., Ehab, Yones, Elbendary., Nahla, Kambal., Mohamed, H., Abdelrahman., Sohail, Hussain. (2024). *Pesticides impact human health and the environment with their mechanisms of action and possible countermeasures*. Heliyon. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e29128
- Flores, V. Fernández, C. (2016). *Protocolo Crioconservación de cepas bacterianas*. Instituto del Mar del Perú (IMARPE). <https://rnia.produce.gob.pe/wp-content/uploads/2019/09/Protocolo-de-crioconservaci%C3%B3n-de-cepas-bacterianas.pdf>
- García-Bayona, L., & Comstock, L. E. (2019). *Bacterial antagonism in host-associated microbial communities*. Science. doi:10.1126/science.aat2456
- Grace Wijaya, Agustin Krisna Wardani & Deden Dewantara Eris. (2023). *Biocontrol activity of endophytic bacteria from cocoa against Phytophthora sp. and Colletotrichum sp.* Menara Perkebunan. <http://dx.doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v9i1i1.522>
- Guo, N., Wei, Q. y Xu, Y. (2020). *Optimización de la criopreservación de cepas microbianas patógenas. Revista de bioseguridad y bioprotección.* <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2020.11.003>
- Harris Valle, C., Bonilla Pioquinto, E., & Palafox Rodríguez, M. (2020) *Antagonismo de microorganismos nativos sobre Phytophthora infestans (Mont.) de Bary aislada de Solanum tuberosum L.* CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias, 9(17), 23 - 43. <https://doi.org/10.23913/ciba.v9i17.96>

- Herrera, R., de Von Chong, M., Vergara, N., & Pinzón, M. (2023). *Aislamiento e identificación de microorganismos con actividad antagónica contra Thanatephorus cucumeris (Rhizoctonia solani) en el cultivo de frijol*. Revista Científica Agropecuaria, 24(1), 33-41. <https://portal.amelica.org/ameli/journal/334/3344527009/html/>
- INIAP (2021). *Las enfermedades del cacao y las buenas prácticas agronómicas para su manejo*. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5747/6/iniapbeetpG178.pdf>
- Khuban Buch., D., R., K., Saikanth., Bal, Veer, Singh., B., Mallick., Shivam, Kumar, Pandey., N., Prabhavathi., Satya, Narayan, Satapathy. (2023). *Impact of Agrochemicals on Beneficial Microorganisms and Human Health*. International Journal of Environment and Climate Change, 13(10):1135-1145. doi: 10.9734/ijecc/2023/v13i102763
- Lahlali R, Ezrari S, Radouane N, Kenfaoui J, Esmael Q, El Hamss H, Belabess Z, Barka EA. *Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective*. Microorganisms. 2022 Mar 9;10(3):596. Doi: 10.3390/microorganisms10030596. PMID: 35336171; PMCID: PMC8951280.
- Magdiel, Torres-de-la-Cruz., Isaí, Quevedo-Damián., Carlos, Freddy, Ortiz-García., Luz, del, Carmen, Lagúnez-Espinoza., Daniel, Nieto-Angel., Manuel, Pérez, de, la, Cruz. (2019). *Control químico de Moniliophthora roreri en México*. 21(2):55-61. doi: 10.18633/BIOTECNIA.V21I2.906
- Maridueña, María & Quevedo, Adela & Aguaguña, Karla & Serrano, Lissette & Sosa, Daynet. (2021). *Colección de cultivos microbianos CIBE (CCM-CIBE): Una colección para la investigación*. Bionatura. doi: 1664-1668. 10.21931/RB/2021.06.01.32.

- Maridueña-Zavala, MG, Freire-Peñaherrera, A., Espinoza-Lozano, RF et al. *Caracterización genética de Moniliophthora perniciosa del Ecuador y sensibilidad in vitro al té de compost*. Eur J Plant Pathol 154, 943–959 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01714-1>
- Morais, E., Silva, A., Sousa, F., Azevedo, I., Silva, H., Santos, A., Beserra, J., Carvalho, C., Eberlin, M., Porcari, A., Araújo, F. (2022). *Endophytic Trichoderma strains isolated from forest species of the Cerrado-Caatinga ecotone are potential biocontrol agents against crop pathogenic fungi*. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35427356/>
- Moreira-Morrillo, A. A., Cedeño-Moreira, Á. V., Canchignia-Martínez, F., & Garcés-Fiallos, F. R. (2021). *Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl (syn.) Botryodiplodia theobromae pat in the cocoa crop: symptoms, biological cycle, and management strategies*. Scientia Agropecuaria, 12(4), 653–662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
- Núñez-Montero, K., & Barrientos, L. (2018). *Advances in Antarctic research for antimicrobial discovery: A comprehensive narrative review of bacteria from Antarctic environments as potential sources of novel antibiotic compounds against human pathogens and microorganisms of industrial importance*. Antibiotics. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040090>.
- Odintsova, T., Shcherbakova, L., Slezina, M., Pasechnik, T., Kartabaeva, B., Istomina, E., y Dzhavakhiya, V. (2020). *Hevein-like antimicrobial peptides WAMP: structure-function relationship in antifungal activity and sensitization of phytopathogenic fungi to tebuconazole by peptides derived from WAMP2*. Int.J.Mol.Sci.,21(21),7912. <https://doi.org/10.3390/ijms21217912>
- Orella, P., Pavón, A., Calisto, N., Wiese, G., Navarro, L., Cortés, P., Gidekel, M., Gutiérrez, A., Corsini, G. (2022). *Identificación de bacterias antárticas con actividad antimicrobiana*

aisladas de la rizosfera de Deschampsia antarctica Desv.

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-686X2022000100202

Oyesola, O., Tonjock, R. K., Bello, O. A., Taiwo, O. S., & Obembe, O. O. (2024). *Trichoderma: A Review of Its Mechanisms of Action in Plant Disease Control*. <https://doi.org/10.20944/preprints202405.1378.v1>

Palacios-López, O. A., González-Rangel, M. O., Rivera-Chavira, B. E., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2020). *El papel de los antimicrobianos en la estructura de las comunidades microbianas en la naturaleza: Rol of antimicrobials on the structure of microbial communities in nature*. *Tecnociencia Chihuahua*. <https://doi.org/10.54167/tch.v5i1.701>

Pino Peralta, S., Washburn Herrera, C., & Garabiza Castro, B. (2023). *Estimación de pérdidas económicas en Cacao causado por escoba de bruja (Crinipellis perniciososa) y Monilia (Monilia rozeri) en pequeños productores*. *Revista de la Universidad Del Zulia*, 15 (42), 179-192. <https://doi.org/10.46925//rdluz.42.10>

Rajib, Majumder. (2024). *Balancing food security and environmental safety: rethinking modern agricultural practices*. *Environmental and Experimental Biology*. doi: 10.22364/eeb.21.12

Santos, A., Núñez-Montero, K., Lamilla, C., Pavez, M., Quezada-Solís, D., & Barrientos, L. (2020). *Antifungal activity screening of Antarctic actinobacteria against phytopathogenic fungi*. *Bothalia*, 25(2), 353–358. <https://doi.org/10.15446/ABC.V25N2.76405>

Statgraphics Technologies, Inc. (2024). *Download Statgraphics Centurion 19*. Statgraphics.com. <https://www.statgraphics.com/download19>

Suraj, Poudel., Bikash, Poudel., Birochan, Acharya., Puspa, Poudel. (2020). *Pesticide use and its impacts on human health and environment*. *Environmental Engineering Science*, 4(1):47-51. doi: 10.26480/EES.01.2020.47.51

- Tigrero-Vaca, J.; MaridueñaZavala, M.G.; Liao, H.-L.; PradoLince, M.; Zambrano-Vera, C.S.; Monserrate-Maggi, B.; CevallosCevallos, J.M. *Microbial Diversity and Contribution to the Formation of Volatile Compounds during FineFlavor Cacao Bean Fermentation. Foods* 2022, *11*, 915. <https://doi.org/10.3390/foods11070915>
- Valenzuela-Cobos, J. D., Guevara-Viejó, F., Vicente-Galindo, P., & Galindo-Villardón, P. (2023). *Biocontrol ecológico de la moniliasis en cacao ecuatoriano mediante técnicas Biplot. Sostenibilidad*, *15*(5), 4223. <https://doi.org/10.3390/su15054223>
- Valtek S.A. (s.f.). *Agar Papa Dextrosa (PDA)*. Valtek.Cl. <https://www.valtek.cl/wp-content/uploads/2020/02/Agar-Papa-Dextrosa-PDA-Versi%C3%B3n-3-Valtek-1.pdf>
- Viera-Arroyo, W., Tello-Torres, C., Martínez-Salinas, A., Navia-Santillán, D., Medina-Rivera, L., Delgado-Parra, A., Perdomo-Quispe, C., Pincay-Verdezoto, A., Báez-Cevallos, F., Vásquez-Castillo, W., Jackson, T. (2020). *Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador*. Journal of the Selva Andina Biosphere. <https://portal.amelica.org/ameli/journal/71/712031011/html/>
- Villavicencio-Vásquez M, Espinoza-Lozano RF, Pérez-Martínez S, Sosa del Castillo D. *Foliar endophyte fungi as candidate for biocontrol against Moniliophthora sp. of Theobroma cacao (Malvaceae) in Ecuador*. Acta biol. Colomb. 2018;23(3):235-241. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v23n3.69455>
- Wang, B., Pu, Q., Zhang, Y., Zhang, C., Wu, H., Zeng, G., Yao, Y., & Hu, X. (2023). *Secretion and volatile components contribute to the antagonism of Bacillus velezensis 1-10 against fungal pathogens*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105379>

Anexos:

Anexo 1: Hongos y bacterias preliminares reactivadas.

Procedencia	Código	Identificación
Fermentados de cacao	CCMCIBE-B683	<i>Acetobacter ghanensis</i>
	CCMCIBE-B953	<i>Acetobacter papayae</i>
	CCMCIBE-B681	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
	CCMCIBE-B972	<i>Bacillus altitudinis</i>
	CCMCIBE-B753	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	CCMCIBE-B963	<i>Bacillus cereus</i>
	CCMCIBE-B841	<i>Bacillus licheniformis</i>
	CCMCIBE-B878	<i>Bacillus siamensis</i>
	CCMCIBE-B703	<i>Bacillus</i> sp.
	CCMCIBE-B952	<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>
	CCMCIBE-B659	<i>Priestia megaterium</i>
	CCMCIBE-B670	<i>Acetobacter oryzoeni</i>
	CCMCIBE-B660	<i>Bacillus paramycoides</i>
	CCMCIBE-B715	<i>Acetobacter tropicalis</i>
	CCMCIBE-B652	<i>Bacillus subtilis</i>
	CCMCIBE-B873	<i>Paenibacillus vulneris</i>
	CCMCIBE-B859	<i>Paenibacillus acanthi</i>
	CCMCIBE-B866	<i>Liquorilactobacillus mali</i>
	CCMCIBE-B915	<i>Brevibacillus formosus</i>
	CCMCIBE-B872	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	CCMCIBE-B997	<i>Levilactobacillus brevis</i>
	CCMCIBE-B689	<i>Acetobacter</i> sp.
	CCMCIBE-B869	<i>Bacillus velezensis</i>
	CCMCIBE-B858	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	CCMCIBE-B857	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
	CCMCIBE-B722	<i>Paenibacillus yunnansis</i>
	CCMCIBE-B700	<i>Ralstonia</i> sp.
	CCMCIBE-B682	<i>Sphingomonas panni</i>
CCMCIBE-B992	<i>Staphylococcus capitis</i>	
CCMCIBE-B864	<i>Staphylococcus epidermis</i>	
Antártida	CCMCIBE-B762	<i>Arthrobacter livingstonensis</i>
	CCMCIBE-B051	<i>Arthrobacter</i> sp.
	CCMCIBE-B775	<i>Chryseobacterium</i> sp.
	CCMCIBE-B132	<i>Filibacter</i> sp.
	CCMCIBE-B006	<i>Janthinobacterium lividum</i>
	CCMCIBE-B062	<i>Janthinobacterium</i> sp.

	CCMCIBE-B095	<i>Janthinobacterium tructae</i>
	CCMCIBE-B138	<i>Leifsonia antartica</i>
	CCMCIBE-B135	<i>Pseudomonas antartica</i>
	CCMCIBE-B126	<i>Pseudomonas brenneri</i>
	CCMCIBE-B1031	<i>Pseudomonas caspiana</i>
	CCMCIBE-B053	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	CCMCIBE-B057	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
	CCMCIBE-B052	<i>Pseudomonas kitaguniensis</i>
	CCMCIBE-B089	<i>Pseudomonas munensis</i>
	CCMCIBE-B082	<i>Pseudomonas paraversuta</i>
	CCMCIBE-B1007	<i>Pseudomonas psychrophila</i>
	CCMCIBE-B124	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>
	CCMCIBE-B088	<i>Pseudomonas silesiensis</i>
	CCMCIBE-B139	<i>Pseudomonas sp.</i>
	CCMCIBE-B081	<i>Pseudomonas yamanorum</i>
	CCMCIBE-B041	<i>Pseudomonas glacincola</i>
	CCMCIBE-B065	<i>Pseudomonas pickettii</i>
	CCMCIBE-B764	<i>Rhodoccus sp.</i>
	CCMCIBE-B761	<i>Streptomyces nojiriensis</i>
Bosque seco tropical	CCMCIBE-H721	<i>Talaromyces liani</i>
	CCMCIBE-H722	<i>Trichoderma inhamatum</i>
	CCMCIBE-H725	<i>Absidia sp.</i>
	CCMCIBE-H736	<i>Trichoderma spirale</i>
	CCMCIBE-H738	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
	CCMCIBE-H746	<i>Gongronella butleri</i>

Anexo 2: Registro de los días de crecimiento bacteriano en cepas de fermentados de cacao con el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*. Junto al control del patógeno.

Confrontación directa bacterias fermentado de cacao vs <i>Lasiodiplodia theobromae</i>												
Bacteria	Crecimiento antagónico de microorganismos (cm)											
	Día 1			Día 3			Día 5			Día 7		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<i>Acetobacter ghanensis</i>	1,8	1,6	1,7	1,3	1,3	1	1,1	1	0,9	0,9	1	0,9
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	1,6	1,7	1,4	1,1	1,2	1,2	0,9	0,8	1	0,6	0,6	0,4
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,7	1,7	1,6	0,8	1,3	1,1	0,5	1	0,9	0,5	1	0,9
<i>Acetobacter oryzoeni</i>	1,6	2,2	2	1,2	1,6	1,5	0,9	1,3	0,9	-	0,5	-
<i>Bacillus velezensis</i>	1,1	1,5	1,3	0,9	1	0,9	0,7	0,6	0,7	0,3	0,6	0,5
<i>Acetobacter tropicalis</i>	1,8	1,4	1,6	1,2	1,2	1,2	0,8	0,7	0,8	0,6	0,5	0,8
<i>Paenibacillus vulneris</i>	1,2	0,4	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ralstonia</i> sp.	1,9	1,7	1,7	1,3	1	1,1	0,9	0,8	0,8	0,9	0,8	0,7
<i>Bacillus</i> sp.	1,7	1,9	1,8	1	1,1	1,3	0,7	0,7	0,5	0,7	0,6	0,5
<i>Levilactobacillus brevis</i>	0,9	0,6	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Priestia megaterium</i>	1,8	1,3	1,4	1,2	0,9	0,9	0,9	0,7	0,6	0,8	0,7	0,6
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	2,1	1,7	1,8	1,7	1,4	1,4	1	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8
<i>Bacillus siamensis</i>	1,7	1,5	1,5	1,1	1	1	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6
<i>Liquorilactobacillus mali</i>	1,8	1,7	1,7	0,7	1,1	1,2	0,5	0,8	1	0,4	0,3	0,5
<i>Acetobacter</i> sp.	1,4	1,2	1,4	0,8	0,85	1	0,8	0,9	0,9	0,4	0,3	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,5	1,6	1,8	0,9	1	1,4	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1,1	0,8	0,35	-	0,1	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	1,8	1,8	1,7	1,1	1	1,3	0,7	1,1	1,2	0,2	1,1	0,1
<i>Bacillus altitudinis</i>	1	1,4	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter papayae</i>	1,7	1,7	1,5	1,4	1,3	1	0,9	0,8	0,9	0,9	1	1

Nota: Las bacterias que se encuentran con el color gris significan que no presentaron crecimiento antagónico con el hongo fitopatógeno, por lo cual quedaron descartadas en la investigación.

Control de patógeno *Lasiodiplodia theobromae*

<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Crecimiento de patógeno (cm)											
	Día 1			Día 3			Día 5			Día 7		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Control	2,3	2,1	2,2	4,5	5,2	5,1	7	6,8	7,1	8,5	8,5	8,5

Nota: Control diario del crecimiento del fitopatógeno.

Anexo 3: Registro de los días de crecimiento del bosque seco tropical con el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*. Junto al control del patógeno.

Confrontación directa hongos bosque seco tropical vs *Lasiodiplodia theobromae*

Bacteria	Crecimiento antagonico de microorganismos (cm)											
	Día 1			Día 3			Día 5			Día 7		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<i>Trichoderma inhamatum</i>	3,2	3,1	3,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma spirale</i>	3,6	3,1	3,2	0,5	0,1	-	-	-	-	-	-	-

Nota: El hongo fitopatógeno inhibió las cepas del hongo con potencial benéfico.

Crecimiento de tratamiento control de patógeno (cm)

Días	R1	R2	R3
1	2,5	2,7	2,8
2	6,2	6,6	7
3	8,5	8,5	8,5
4	8,5	8,5	8,5
5	8,5	8,5	8,5
6	8,5	8,5	8,5
7	8,5	8,5	8,5

Nota: Control diario del crecimiento del fitopatógeno.

Anexo 4: Registro de los días de crecimiento bacteriano en cepas de fermentados de cacao con el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* y control del patógeno.

Confrontación directa bacterias fermentado de cacao vs <i>Moniliophthora roreri</i>												
Bacteria	Crecimiento antagónico de microorganismos (cm)											
	Día 1			Día 3			Día 5			Día 7		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<i>Priestina megaterium</i>	2,2	2,3	2,4	1,6	2	0	1	1,5	0	0,7	1,1	0
<i>Bacillus paramycoides</i>	2,4	2,2	2,3	2	1,8	1,7	0,7	1,3	0,9	0,4	0,1	0
<i>Acetobacter oryzoeni</i>	2,3	2,2	1,9	1,2	1,2	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,2
<i>Bacillus sp.</i>	2.1	2,2	2	1,6	1,8	1,6	1,5	1,8	1,3	0,9	1,6	1,2
<i>Acetobacter tropicalis</i>	1,6	1,3	1,1	0,8	1,2	1,3	0,5	1,2	0,9	0	1	0,5
<i>Leuconostoc pseudomesentorioides</i>	2,4	2,4	2,4	0	1,1	1,4	0	0,8	1,1	0	0,5	0,9
<i>Sphingomonas panni</i>	2,5	2,4	2,4	1,9	1,9	1,7	1,2	1,1	1	0,2	0,3	0,5
<i>Bacillus velezensis</i>	1,5	1,6	1,1	0,5	0,8	0,6	0,5	0,8	0,5	0,4	0,8	0,5
<i>Bacillus siamensis</i>	2,4	2,4	2,3	1,6	1,7	1,6	1,1	1,4	1,5	0,9	1,4	0,5
<i>Brevibacillus formosus</i>	2	2,3	2,1	1,2	2,2	2	1,1	1,8	1,3	0,7	1,5	0
<i>Acetobacter papayae</i>	2,2	2,1	2,3	1,7	1,6	0	1,2	1,1	0	1,1	0,9	0
<i>Bacillus cereus</i>	1,6	1,9	1,8	0,7	1,1	0,7	0	0,5	0,9	0	0,3	0,8

Control de patógeno vs bacterias de fermentados de cacao												
<i>M. roreri</i>	Halos de inhibición promisorio en patógeno (cm)											
	Día 1			Día 3			Día 5			Día 7		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Control	–	–	–	3,768	3,925	3,611	6,594	6,908	7,222	8,949	9,577	10,362

Anexo 5: Registro de los días de crecimiento bacteriano en cepas de la Antártida con el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* y control del patógeno.

Confrontación directa bacterias de Antártida vs <i>Moniliophthora roreri</i>												
Bacteria	Crecimiento antagonico de microorganismos (cm)											
	Día 1			Día 3			Día 5			Día 7		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<i>Pseudomonas kitaguniensis</i>	2,2	2,1	2,3	2,1	1,9	2	1,4	1,2	1,3	0,3	0,5	0,6
<i>Janthinobacterium tructae</i>	2,1	-	2	1,8	-	1,8	1,2	-	1,2	0,3	0	0,4
<i>Filibacter</i> sp.	2,2	2,1	1,8	2	2	1,8	1,2	1,5	1,2	0,7	0,8	0,7
<i>Pseudomonas yamanorum</i>	1,9	2	1,9	1,8	1,7	1,9	1	0,8	1,1	0	0	0
<i>Streptomyces nojiriensis</i>	2,2	2	2,2	2,1	2	1,9	1,5	1,3	1,2	0,2	0,8	0
<i>Chryseobacterium</i> sp.	2,4	2,3	2	2,3	2,2	1,9	1,8	1,6	1,5	1	0,9	1,4
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	2,3	2,2	2,4	2,1	2,2	2,4	1,4	1,2	1,9	0,3	0,5	0,9

Control de patógeno vs bacterias de Antártida												
<i>Moniliophthora roreri</i>	Halos de inhibición promisorio en patógeno (cm)											
	Día 1			Día 3			Día 5			Día 7		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Control	-	-	-	-	-	-	-	2,1	2	0	4,3	4,1

Anexo 6: Registro de los días de crecimiento micelial del bosque protector con el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* y control del patógeno.

Confrontación directa hongos bosque seco tropical vs <i>Moniliophthora roreri</i>												
Bacteria	Crecimiento antagónico de microorganismos (cm)											
	Día 1			Día 3			Día 5			Día 7		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<i>Trichoderma inhamatum</i>	3,4	3,6	3,6	1	1,9	1,3	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma spirale</i>	3,7	3,6	3,8	1,5	1,6	1,6	-	-	-	-	-	-
<i>Gongronella butleri</i>	4,3	4,1	4,2	3,1	3,3	2,8	2,6	2,2	2,1	-	-	-

Control patógeno <i>Moniliophthora roreri</i> (cm)			
Día	R1	R2	R3
1	0,9	0,9	0,9
2	1	1,1	1,1
3	1,4	1,5	1,4
4	2,1	2,2	2,2
5	2,7	2,5	3
6	3	3	3
7	3	3	3