

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR UNIVERSIDAD
ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA

TEMA:

**ACTIVIDAD ANTAGONISTA *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS
EFICIENTES FRENTE A
Diaporthe longicolla COMO CONTROL FITOPATÓGENO EN
PLANTACIONES DE CACAO**

Autores:

ROSA LILIANA ROMERO BLANCO

INGRID LOURDES SANDOVAL ENDARA

Director:

MV. VERA RODRIGUEZ JOSE HUMBERTO., MG.

Milagro, 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.
Fabricio Guevara Viejó
Rector de la Universidad Estatal de Milagro
Presente.

Nosotros, **Romero Blanco Rosa Liliana** y **Sandoval Endara Ingrid Lourdes** en calidad de autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de nuestro Grado, de Magister en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación **Agrobiotecnología** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedemos a favor de la Universidad Estatalde Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercialde la obra, con fines estrictamente académicos. Conservamos a nuestro favor todos los derechos de autores sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizamos a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Los autores declaran que la obra objeto de la presente autorización es original en su formade expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 07 de agosto del 2024



Firmado electrónicamente por:
**ROSA LILIANA ROMERO
BLANCO**

Romero Blanco Rosa Liliana

CI: 0951493865



Firmado electrónicamente por:
**INGRID LOURDES
SANDOVAL ENDARA**

Sandoval Endara Ingrid Lourdes

CI: 0920195765

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Yo, **José Humberto Vera Rodríguez** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **Romero Blanco Rosa Liliana** y **Sandoval Endara Ingrid Lourdes** , cuyo tema es **Actividad antagonista *in vitro* de microorganismos eficientes frente a *Diaporthe longicolla* como control fitopatógico en plantaciones de cacao** que aporta la Línea de Investigación **Agrobiotecnología**, previo a la obtención del Grado Magister en biotecnología, Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo APRUEBO, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 07 de agosto del 2024



Firmado electrónicamente por:
**JOSE HUMBERTO VERA
RODRIGUEZ**

José Humberto Vera Rodríguez

CI: 131258756-9

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTAD DE POSGRADO

CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. ROMERO BLANCO ROSA LILIANA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "ACTIVIDAD ANTAGONISTA IN VITRO DE MICROORGANISMOS EFICIENTES FRENTE A DIAPORTHE LONGICOLLA COMO CONTROL FITOPATÓGENO EN PLANTACIONES DE CACAO", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	58.00
SUSTENTACIÓN	32.83
PROMEDIO	90.83
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Unidad de certificación por:
MONICA DEL ROCIO
VILLAMAR AVEIGA

Msc VILLAMAR AVEIGA MONICA DEL ROCIO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Unidad de certificación por:
MANUEL IGNACIO
CANDO DIAZ

Mg CANDO DIAZ MANUEL IGNACIO
VOCAL



Unidad de certificación por:
MARIA FERNANDA
GARCES MONCAYO

Msc GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTAD DE POSGRADO

CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. SANDOVAL ENDARA INGRID LOURDES**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "ACTIVIDAD ANTAGONISTA IN VITRO DE MICROORGANISMOS EFICIENTES FRENTE A DIAPORTHE LONGICOLLA COMO CONTROL FITOPATÓGENO EN PLANTACIONES DE CACAO", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	58.00
SUSTENTACIÓN	27.67
PROMEDIO	85.67
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Firmado digitalmente por:
**MONICA DEL ROCIO
VILLAMAR AVEIGA**

Msc VILLAMAR AVEIGA MONICA DEL ROCIO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado digitalmente por:
**MANUEL IGNACIO
CANDO DIAZ**

Mg CANDO DIAZ MANUEL IGNACIO
VOCAL



Firmado digitalmente por:
**MARIA FERNANDA
GARCES MONCAYO**

Msc GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

V

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado a mis queridos padres PEDRO ALFONSO ROMERO BALAGUERA que ya no se encuentra en este plano pero que siempre estará viviendo en mi mente y corazón, a FLOR ELDA BLANCO TORRES quienes me dieron la vida y quienes dieron todo lo que estuvo en sus manos y en su conocimiento para que hoy me encuentre viviendo esta nueva experiencia. A ella que con sus palabras de ánimo, motivación y sabios consejos me ayudó mucho y me ayudarán siempre en cada momento de mi vida.

A mis amados hijos JOEL Y NAKEYSHA DE LA CUADRA ROMERO, quienes son mi motivación de superación a ellos que aun estando a miles de km de distancia nos mantenemos unidos con videollamadas dedicando tiempo sagrado de sus vidas a compartir conmigo conversaciones largas pidiéndome recetas y enseñándome sus éxitos sin saber que también con su cariño y tiempo dedicado ayudan en mi progreso, desafíos y mis metas alcanzadas.

A mis hnos. que de igual manera no se imaginan cuanto bien hacen con solo una llamada con echar cuento y adelantar cuadernos de vida en los grupos familiares de WhatsApp., sus conversaciones son un bálsamo en tiempos de estrés y desafíos. Eternamente agradecida a mis hermanitas bellas; LORE, LUZ, JULY, MAIRA, a mi único y bello hno. CARLOS que sus llamadas imprevistas y sus ocurrencias me alegran la vida y finalmente mi hermanita MARCELA que ella no lo sabe, pero es mi pilar fundamental siendo mi coaching personal mi manager en todo hasta en toma de decisiones más importantes, convirtiéndose en mi asesora y mano derecha a quien amo y respeto mucho, agradezco eternamente su existencia en mi vida y finalmente agradezco a LEITO FORERO que no es mi hermana pero es como si lo fuera, millón gracias pues siempre será importante en nuestras vidas y nuestra familia gracias por sus lindas palabras de afecto y sus buenos consejos la quiero mucho.

ROMERO BLANCO ROSA LILIANA

DEDICATORIA

A mi querida hija Corina Urmacher.

Desde el primer momento en que llegaste a mi vida, has sido una fuente constante de inspiración y alegría. Este proyecto es un reflejo de mi amor y dedicación, y está impregnado con la misma pasión y esfuerzo que pongo en cada momento que comparto contigo.

Eres mi mayor tesoro y todo lo que hago es para asegurar que tengas un futuro lleno de oportunidades y felicidad. Tu curiosidad, creatividad y fuerza me impulsan a ser mejor cada día.

Con todo mi amor,

SANDOVAL ENDARA INGRID LOURDES

AGRADECIMIENTOS

Con mucha gratitud infinita a mi Creador y fuente de vida; mi amado Padre Celestial, que me dio y ha dado esta gran oportunidad de vivir estas experiencias y desafíos, otorgándome salud necesaria, conocimiento e inteligencia que, aunque diferente es suficiente para estos logros alcanzados en este capítulo de vida como son los estudios seculares. Eternamente agradecida por su guía e iluminación por estar ahí siempre fortaleciéndome y sosteniéndome en todo momento y lugar.

A mi querido y amado RODRIGO VELASCO HERNANDEZ, alias Mi Rodry. Mis más sinceros agradecimientos pues quizás no lo sabe, pues de muchas maneras este logro también le pertenece, ya que sin él no lo hubiese logrado, por su amor incondicional, atenciones y dedicación constante siempre está ahí ayudándome, en otras palabras, mi ancla y mi pilar fundamental por esto y mucho más quiero que sepas que te amo.

Hay amigos de amigos que le invitan a muchas cosas diferentes, en este mi caso mi gran amiga, en las buenas y en las malas y compañera laboral INGRID SANDOVAL E. Quien es Autora también de este particular proyecto que no tenía en mis planes realizar, pero que ella es de esos escasos y casi extintos amigos que invitan a progresar y crecer, que gracias a su persistencia nata y motivación de alguna manera u otra de repente me vi en este camino de avanzar y crecer un peldaño más, jamás sintiéndome sola en este proyecto de vida, fue su gran idea y no se equivocó en que lo lograríamos a pesar de las muchas trabas y desafíos encontrados; muchas gracias eternas pues este logro que no es solo mío también es suyo y sinceramente no lo hubiese logrado sola un abrazo eterno la quiero mucho.

A la Universidad Estatal de Milagro UNEMI, que me abrió sus puertas en posgrado de Biotecnóloga, para este nuevo proyecto, a cada uno de los profesores en cada módulo por sus conocimientos compartidos y empatía brindada, apoyo y sobre todo paciencia en este año 2023-2024. A nuestro tutor de tesis MSc. JOSÉ HUMBERTO VERA R, quien siempre estuvo al pendiente de nuestros avances ayudándonos y guiándonos en todo con su conocimiento y experiencias, así mismo a mi apreciada ANITA RUIZ MOROCHO un gran elemento importante en esta cohorte y más en nuestras vidas como futuros Magister de la Republica. La apodamos nuestra

Madrina y a si lo será pues siendo tan joven fue como una madre para todos nosotros con su gran cariño y su infinita paciencia, siempre oportuna y amable recordándonos las cosas y prestándonos ayuda en todo para que saliéramos con éxito en cada módulo, sinceramente gracias mil pues sin su ayuda no hubiese sido posible este proyecto y finalmente al MSc. RAFAEL LAZO SULCA nuestro coordinador académico del programa muchas gracias por su guía y consejos cada vez que hubo oportunidad de intervenir con su asesoría y conocimiento.

Y para culminar muy agradecida con mi querida Karla preciosa y Mr. Tony por su compañía grata, por las alegrías que con su sana energía provocan en nuestras vidas por ser nuestros verdaderos y más fieles acompañantes en este camino a si mismo lo fueron tras bambalina, que como toda película su éxito depende mucho de estos muy buenos elementos que están siempre prestos con su conocimiento y habilidades para que la obra tenga un buen final gracias eternas a CRITHIAN ADRIAN RIVAS SANTACRUZ Y ANGIE PAMELA LOPEZ ORELLANA.

ROMERO BLANCO ROSA LILIANA

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis.

Primero a mi Dios, mi director de tesis, Dr. Humberto Vera, por su guía, paciencia y conocimientos compartidos. Su orientación ha sido fundamental en cada etapa de este proceso y me ha permitido crecer tanto académica como personalmente.

A mi compañera y amiga Liliana Romero, al Ing. Mario Rodríguez, por su compañerismo y apoyo moral. Sus palabras de ánimo y su disposición para compartir ideas han sido invaluable.

Finalmente, a mi hija Corina Urmacher, por ser mi inspiración diaria y la luz de mi vida. Tu presencia me ha motivado a seguir adelante y a esforzarme por alcanzar mis metas. También a mi Bengi por ser quién nos da su compañía y buena energía en nuestro hogar.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento.

SANDOVAL ENDARA INGRID LOURDES

Resumen

Millones de microorganismos se asocian de manera positiva y negativa a las plantaciones de cacao, los patógenos de importancia económica disminuyen anualmente su producción, generando considerables pérdidas en la industria cacaotera. El objetivo de la investigación consistió en evaluar el efecto antagonista de microorganismos eficientes frente al hongo patógeno *Diaporthe longicolla* a nivel *in vitro*. Se realizó una caracterización morfológica e identificación molecular al microorganismo mediante la técnica de Barcoding EF1- α . Se efectuaron 4 tratamientos con 5 réplicas y sus respectivos controles, sumando un total de 45 unidades experimentales. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza simple ANOVA, bajo un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), la prueba de medias se efectuó según Tukey $p=0.05$. Se midió el crecimiento radial del microorganismo cada 24 horas, además se analizó la longitud del halo de inhibición en cajas Petri, a los 10 días post-siembra. Los resultados de la caracterización morfológica microscópica confirman que las muestras analizadas pertenecen al género *Diaporthe* sp. La extracción de ADN permitió amplificar una banda de aproximadamente 1200 pares de bases para el marcador EF1- α . La secuenciación reveló que la muestra de *D. longicolla* (EF1- α) tiene un porcentaje de pureza del 98,41%. El Control *Diaporthe longicolla* tuvo un crecimiento superior en ambos experimentos tanto para el antagonismo frente a *T. harziaum* y *T. asperellum*. Además, el crecimiento micelial entre ellos fue similar en ambos casos. Se observó un efecto inhibitorio de *B. subtilis* sobre *D. longicolla*, mientras que *P. fluorescens* no mostró un efecto inhibitorio significativo.

Palabras Clave: Antagonista, cacao, *Diaporthe longicolla*, microorganismos, patógenos.

Abstract

Millions of microorganisms are positively and negatively associated with cocoa plantations, pathogens of economic importance annually reduce their production, generating considerable losses in the cocoa industry. The objective of the research was to evaluate the antagonistic effect of efficient microorganisms against the pathogenic fungus *Diaporthe longicolla* at an *in vitro* level. A morphological characterization and molecular identification of the microorganism was carried out using the EF1- α Barcoding technique. Four treatments were carried out with 5 replicates and their respective controls, adding a total of 45 experimental units. The data were analyzed using a simple analysis of variance ANOVA, under a completely randomized experimental design (DCA), the test of means was carried out according to Tukey $p=0.05$. The radial growth of the microorganism was measured every 24 hours, and the length of the inhibition zone was analyzed in Petri dishes, 10 days after sowing. The results of the microscopic morphological characterization confirm that the analyzed samples belong to the genus *Diaporthe* sp. DNA extraction allowed the amplification of a band of approximately 1200 base pairs for the EF1- α marker. Sequencing revealed that the *D. longicolla* sample (EF1- α) has a purity percentage of 98.41%. The Control *Diaporthe longicolla* had superior growth in both experiments for both the antagonism against *T. harziaum* and *T. asperellum*. Furthermore, the mycelial growth between them was similar in both cases. An inhibitory effect of *B. subtilis* on *D. longicolla* was observed, while *P. fluorescens* did not show a significant inhibitory effect.

Keywords: Antagonist, cocoa, *Diaporthe longicolla*, microorganisms, pathogens.

Lista de Figuras

Figura 1. Característica morfológica de <i>D. longicolla</i>	51
Figura 2. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 1%	51
Figura 3. Crecimiento radial de los hongos <i>Trichoderma harzianum</i> & <i>Diaporthe longicolla</i>	52
Figura 4. Crecimiento radial de los hongos <i>Trichoderma asperellum</i> & <i>Diaporthe longicolla</i>	53
Figura 5. Crecimiento radial del micelio del hongo <i>Diaporthe longicolla</i> sobre <i>Bacillus subtilis</i>	54
Figura 6. Crecimiento radial del micelio del hongo <i>Diaporthe longicolla</i> sobre <i>Pseudomona fluorescens</i>	55

Lista de Tablas

Tabla 1. Tabla de operacionalización de variables	23
Tabla 2. Descripción de los tratamientos	47

Índice /Sumario

Derechos de autor	ii
Aprobación del director del Trabajo de Titulación	iii
Aprobación del tribunal calificador	iv
DEDICATORIA	v
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
AGRADECIMIENTOS	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Tablas	xiii
Índice /Sumario.....	14
Introducción.....	17
Capítulo I: El problema de la investigación	20
1.1 Planteamiento del problema	20
1.2 Delimitación del problema.....	21
1.3 Formulación del problema	21
1.4 Preguntas de investigación	21
1.5 Determinación del tema	22
1.6 Objetivo general.....	23
1.7 Objetivos específicos	23
1.8 Hipótesis	23
1.9 Declaración de las variables (operacionalización)	23
1.10 Justificación	24
1.11 Alcance y limitaciones.....	25
1.12	

1.12.1.	Alcance.....	25
1.12.2.	Limitaciones.....	26
CAPÍTULO II: Marco teórico referencial.....		30
2.1	Antecedentes.....	30
2.2	Contenido teórico que fundamenta la investigación.....	31
2.2.1.	Introducción al control fitopatógeno en plantaciones de cacao.....	31
2.2.2.	Microorganismos eficientes como agentes de control biológico.....	33
2.2.3.	Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas in vitro.....	35
2.2.4.	Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas.....	35
2.2.5.	Identificación y caracterización de los microorganismos eficientes.....	36
2.2.6.	Factores que afectan la eficacia de los microorganismos eficientes.....	38
2.2.7.	Perspectivas futuras y aplicaciones potenciales de microorganismos eficientes.....	39
2.2.8.	Pérdidas económicas y ambientales a causa de hongos patógenos que afectan al cacao.....	41
2.2.9.	Consideraciones económicas y ambientales del control biológico.....	42
2.2.10.	Resistencia de los hongos patógenos en las plantaciones de cacao.....	44
CAPÍTULO III: Diseño metodológico.....		47
3.1	Tipo y diseño de investigación.....	47
3.2	La población y la muestra.....	47
3.2.1	Delimitación de la población.....	47
3.2.2	Tipo de muestra.....	48
3.2.3	Tamaño de la muestra.....	48
3.2.4	Proceso de selección de la muestra.....	49
3.3	Los métodos y las técnicas.....	49
3.4	Procesamiento estadístico de la información.....	50
CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados.....		51
4.1	Análisis de los resultados.....	51

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones	56
5.1 Conclusiones	56
5.2 Recomendaciones	56
Bibliografía.....	58
Anexos	68
.	74

Introducción

El cacao, científicamente conocido como *Theobroma cacao* L., es un árbol de hoja perenne originario de la región amazónica y clasificado dentro de la familia Malvaceae (Martínez-Salvador & Flores Pacheco, 2022). Destaca como una de las especies vegetales más cultivadas y de mayor importancia económica en las zonas tropicales globales (Ríos-Moyano et al., 2023). Su fruto es ampliamente utilizado en la industria alimentaria para la producción de una variedad de productos de confitería, así como en la industria cosmética y medicinal por sus propiedades grasas (Muñoz & López, 2022).

Los desafíos fitosanitarios representan los principales elementos que han contribuido a la disminución en la producción de cacao y a la reducción en la calidad del producto final, originándose por enfermedades derivadas de hongos fitopatógenos (Polanco et al., 2020). Esta situación ha experimentado un aumento reciente, en parte debido a la falta de prácticas de manejo adecuadas en los cultivos y a las alteraciones ambientales inducidas por actividades humanas (Ramos-Ramos et al., 2020).

La producción global de cacao se ve influenciada por una variedad de factores bióticos, convirtiéndose en enfermedades ocasionadas por organismos fúngicos y oomycetes emergen como las más significativas para el cultivo (Anzules Toala et al., 2022). Entre las patologías se destacan la “escoba de bruja” causada por *Moniliophthora perniciosa*, “la moniliasis” provocada por *Moniliophthora roreri* y la “pudrición negra de la mazorca” atribuida por el género *Phytophthora spp* (Martínez-Reina et al., 2023). Esta situación amenaza la sostenibilidad de la producción nacional del cultivo, requiriendo estrategias de manejo integrado que aborden aspectos preventivos para mitigar su impacto en la industria cacaotera (Gerrero et al., 2020).

En los últimos años, se han detectado la aparición de nuevos hongos que conllevan una amenaza considerable para la producción de cacao, impulsado un incremento en la investigación sobre estrategias de control y prevención de enfermedades en los campos del cultivo (Cedeño Moreira et al., 2020). Un estudio llevado a cabo en Puerto Rico ha identificado dos nuevas especies de hongos, *Diaporthe tulliensis* y

Diaporthe pseudomangiferae, como agentes causales de la pudrición de la mazorca de cacao, este hallazgo marca el primer informe de estas especies de hongos, enfatizando la importancia de la identificación y comprensión de nuevos patógenos en distintas especies vegetales para el desarrollo de medidas efectivas de control (Serrato-Díaz et al., 2022).

Los hongos del género *Diaporthe* son conocidos por ser fitopatógenos, lo que significa que pueden causar enfermedades en plantas, y se encuentra comúnmente asociados con una amplia gama de especies vegetales, incluyendo árboles, arbustos, y plantas herbáceas (Mena et al., 2024). Algunas especies de *Diaporthe* son patógenos primarios que pueden causar enfermedades graves, mientras que otras actúan como patógenos oportunistas, aprovechando las debilidades de las plantas huésped (Montoya et al., 2021). Los síntomas de las enfermedades causadas por *Diaporthe* varían dependiendo de la especie de planta afectada y del hongo específico involucrado, incluyendo manchas foliares, marchitamiento, pudrición de tallos, y la muerte de tejidos vegetales (Sánchez et al., 2015).

Además, resulta relevante destacar que los insecticidas químicos son el principal recurso empleado para el control de hongos fitopatógenos, convirtiéndose en una acción efectiva en los sistemas de producción agrícola, proporcionando una estrategia de control de amplio espectro y acción rápida (Chirinos et al., 2020). Sin embargo, este enfoque ha conllevado a una serie de consecuencias negativas en el medio ambiente, puesto que la contaminación resultante de la aplicación de productos químicos ha generado efectos adversos, como la eliminación de enemigos naturales, la posible intoxicación para la salud humana y el desarrollo de resistencia en las plagas, lo que destaca la necesidad de considerar alternativas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente para el control de enfermedades en los cultivos (Villa et al., 2022).

Considerando lo expuesto, es conveniente emplear alternativas de control más sostenibles para mitigar los impactos ambientales y los riesgos para la salud asociados con el uso excesivo de insecticidas químicos (Pilaló David et al., 2021). El control biológico, en particular, emerge como una alternativa viable y respetuosa con el ambiente, fundamentada en el empleo de organismos vivos para combatir las poblaciones de insectos plaga (López-Barrera, 2021).

En este contexto, los microorganismos entomopatógenos como *Bacillus subtilis*, *Trichoderma spp* y *Pseudomona fluorescen*, se perfilan como antagonistas biológicos prometedores que pueden integrarse con facilidad en los planes de manejo integrado de enfermedades (Guerrero et al., 2020). Estos microorganismos poseen un alto potencial de control biológico al reducir la esporulación de los patógenos en las mazorcas y permanecer activos alrededor de cuatro meses en los tejidos florales, proporcionando una defensa prolongada contra la infección por hongos fitopatógenos (F. C. Mora et al., 2024). El objetivo de este estudio se enfocó en evaluar bajo condiciones *in vitro* el potencial antagonico de microorganismo eficientes frente al hongo *Diaporthe longicolla*.

Capítulo I: El problema de la investigación

1.1 Planteamiento del problema

El cultivo del cacao es crucial para la economía de muchas regiones tropicales. No obstante, enfrenta una amenaza constantemente por la proliferación de hongos fitopatógenos. Estos organismos, tales como *Phytophthora* spp., *Moniliophthora* spp., *Lasiodiplodia* spp., causan enfermedades devastadoras como la pudrición de la planta y la mazorca resultando pérdidas significativas de rendimiento y calidad.

A consecuencia de la deficiencia del desarrollo y productividad del cultivo, investigadores han descubierto nuevas especies de fitopatógenos, se ha observado un aumento de nuevos organismos derivando una amenaza significativa para la salud de diversas especies vegetales. Para Serrato-Díaz et al., (2022) el hongo *Diaporthe longicolla* es un patógeno fúngico recientemente identificado con afectaciones a plantaciones de cacao en Puerto Rico, provocando la pudrición de la mazorca, derivando devastadores mermas en el rendimiento de la planta afectada.

A pesar de los intentos de la industria y los agricultores por controlar estas enfermedades, los enfoques tradicionales que se apoyan en fungicidas químicos han demostrado ser inviables a largo plazo debido al desarrollo de resistencia por parte de los patógenos. Este proceso, desencadenado por la presión selectiva generada por el uso repetido de los mismos fungicidas, ha propiciado la emergencia de cepas de hongos fitopatógenos que muestran resistencia, lo que reduce la efectividad de los tratamientos y agrava la situación.

Por lo tanto, existe una necesidad apremiante de desarrollar alternativas efectivas y sostenibles para el control de hongos fitopatógenos en plantaciones de cacao. Una prometedora estrategia es la utilización de microorganismos eficientes con actividad antagonista contra estos patógenos. Los microorganismos son organismos beneficiosos que, mediante la producción de compuestos antimicrobianos y la competencia por nutrientes y espacio, pueden suprimir el crecimiento y la propagación

de los hongos fitopatógenos.

Entender cómo estos microorganismos afectan positivamente el crecimiento de las plantas de cacao enfrentando a hongos patógenos, proporcionará a agricultores y científicos la capacidad de tomar decisiones fundamentadas sobre la implementación de estos métodos biológicos como parte de las prácticas de gestión agrícola. Esta medida podría influir notablemente en la eficiencia productiva y la sostenibilidad a largo plazo de las plantaciones de cacao.

1.2 Delimitación del problema.

Dado el limitado número de reporte sobre la incidencia del hongo patógeno *Diaporthe longicolla* en las plantaciones de cacao, amerita el estudio biotecnológico enfocado en la utilización de microorganismos eficientes como estrategia de control biológico sostenible. Además, la aplicación de herramientas biotecnológicas ofrece una aproximación innovadora y efectiva para abordar esta problemática, permitiendo el desarrollo de soluciones personalizadas y adaptativas a las condiciones específicas de industria cacaotera.

El estudio se enfoca en investigar el efecto antagonista de microorganismos eficientes en condiciones *in vitro* frente al hongo *Diaporthe longicolla*, aislado de muestras de tejidos vegetal infectado en cacao CCN-51.

1.3 Formulación del problema

¿Cuál será el efecto inhibitorio de crecimiento del hongo fúngico *Diaporthe longicolla* frente a los microorganismos eficientes (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona fluorescens*)?

1.4 Preguntas de investigación

¿Cuál es el objetivo principal al evaluar el efecto antagonista *in vitro* de microorganismos eficientes frente al hongo *Diaporthe longicolla*?

¿Qué características hacen que *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* sean candidatos

prometedores para este tipo de evaluación?

¿Cuál es la importancia práctica de evaluar estos microorganismos en condiciones *in vitro* antes de realizar pruebas en el campo?

¿Cuáles son los posibles mecanismos mediante los cuales estos microorganismos pueden ejercer su efecto antagonista contra *Diaporthe longicolla*?

¿Cómo se pueden optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la actividad antagonista de estos microorganismos?

¿Qué implicaciones podría tener el uso de estos microorganismos como agentes biocontroladores en términos de sostenibilidad ambiental y seguridad alimentaria?

¿Cuál es el impacto de los microorganismos frente al crecimiento del hongo *Diaporthe longicolla*?

¿Cuál es el mecanismo de acción de los microorganismos en el desarrollo del crecimiento del hongo *Diaporthe longicolla*?

1.5 Determinación del tema

El tema de investigación propuesto es “Evaluar el efecto antagonista *in vitro* de microorganismos eficientes (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*) frente al hongo *Diaporthe longicolla*.”

En esta investigación, se busca determinar estrategias de control biológico efectivas para combatir las enfermedades en cultivos de cacao. Esta evaluación es fundamental para comprender la viabilidad y eficacia de estos agentes de gestión biológica en la supresión del crecimiento del hongo patógeno, lo que a su vez podría proporcionar una base sólida para el desarrollo de medidas preventivas y de manejo preventivo en la agricultura.

Esta investigación ampliará el conocimiento sobre el empleo de

microorganismos eficientes en prácticas agrícolas, así como su capacidad para potenciar la productividad en especies vegetales.

1.6 Objetivo general

Evaluar el efecto antagonista *in vitro* de microorganismos eficientes (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona fluorescens*) frente al hongo *Diaporthe longicolla*.

1.7 Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar morfológica y molecularmente al hongo *Diaporthe longicolla* a partir de aislados de tejido vegetal infectado de cacao CCN-51.
- ❖ Medir el crecimiento radial de las colonias del microorganismo patógeno *Diaporthe longicolla* y antagonistas (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*) cada 24 horas durante 10 días.
- ❖ Analizar la longitud del halo de inhibición, entre la cepa fitopatógena *Diaporthe longicolla* sobre (*Bacillus subtilis* y *Pseudomona fluorescens*) cada 24 horas durante 10 días.

1.8 Hipótesis

Al menos uno de los microorganismos eficientes tendrá un efecto inhibitorio *in vitro* sobre el hongo *Diaporthe longicolla*.

1.9 Declaración de las variables (operacionalización)

Se detalla en la tabla 1 el cuadro de operacionalización de variables

Tabla 1. Tabla de operacionalización de variables.

Variable independiente	Aplicación de microorganismos eficientes (<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomona fluorescens</i>)
Variable dependiente	✓ Característica morfológica de hongo <i>Diaporthe longicolla</i> . ✓ Características moleculares del hongo

Diaporthe longicolla.

- ✓ Crecimiento de las colonias
 - ✓ Medir el crecimiento inhibitorio de las cepas
-

1.10 Justificación

El objetivo de este estudio consistió en evaluar el efecto antagonista *in vitro* de microorganismos eficientes (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*) frente al hongo *Diaporthe longicolla*. En este contexto los microorganismos eficientes incrementan la diversidad microbiana de los suelos, secretan sustancias útiles que incluyen aminoácidos, ácidos nucleicos, sustancias bioactivas y azúcares que promueven el crecimiento de las plantas logrando suprimir la presencia de patógenos.

Es importante destacar que el cultivo de cacao es un sistema productivo agrícola de interés creciente a nivel mundial, con un interés en constante aumento. No obstante, se enfrenta a diversos desafíos, especialmente relacionados con la presencia de enfermedades fitopatógenas que han sido reportadas como limitantes en numerosas regiones productoras de cacao en todo el mundo. Por lo tanto, resulta fundamental llevar a cabo de forma precisa, la dinámica de estas enfermedades en campo, con el fin de desarrollar estrategias de manejo adecuadas que puedan mitigar su impacto negativo en la producción.

Estudios de Jaizme-Vega & Rodríguez-Romero (2008), manifiestan que el control biológico en la agricultura mediante el empleo de microorganismos eficientes ofrece una solución prometedora en este sentido. En relaciones suelo - plantas estos microorganismos son fundamentales por ejemplo en el ciclo del “fósforo”, gobiernan las transformaciones y son solubilizadores de fosfato y hacen que sean disponibles para la nutrición de la planta.

La evaluación del efecto antagonista *in vitro* proporciona una plataforma controlada y reproducible para estudiar las interacciones entre los microorganismos eficientes y los hongos fitopatógenos. Esto permite investigar aspectos fundamentales de la dinámica de estas interacciones

y la capacidad de colonización del hospedador. Además, los ensayos *in vitro* pueden ser el primer paso en la selección de cepas de microorganismos eficientes con potencial para aplicaciones en condiciones de campo.

Por último, el empleo de organismos benéficos, puede tener un impacto positivo en la productividad y calidad del cultivo de cacao. Estos organismos positivos, establecen un equilibrio microbiológico del suelo y mejoran su calidad, lo que incrementa la producción y protección de los cultivos, conserva los recursos naturales y crea una agricultura sustentable.

1.11 Alcance y limitaciones

1.11.1. Alcance

El objetivo de esta investigación se enfoca en la evaluación rigurosa y sistemática del efecto antagonista *in vitro* de microorganismos eficientes (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona fluorescens*) frente al hongo *Diaporthe longicolla*. Esta selección de microorganismos se basa en su reconocida capacidad para actuar como agentes de control biológico en cultivo agrícolas de interés económico, y su capacidad potencial para suprimir el crecimiento y la propagación de hongos fitopatógenos.

En cada uno de los grupos se medirán diferentes variables relacionadas en el desarrollo inhibitorio de las cepas, como caracterización morfológica, caracterización molecular, crecimiento de las colonias, medición del halo inhibitorio, etc. Estas mediciones se realizarán de forma periódica al largo del desarrollo experimental de las cepas.

Se aplicarán métodos estadísticos para analizar los datos recopilados y determinar si hay diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y control. La presentación de los resultados se llevará a cabo mediante figuras y tablas, junto con un análisis de varianza para identificar la capacidad potencial de los microorganismos en la supresión de hongos patógenos durante el cultivo de cacao.

El alcance de la investigación abarcará la realización de pruebas *in vitro* para determinar la capacidad de los microorganismos eficientes para inhibir el crecimiento y desarrollo del hongo *Diaporthe longicolla*. Se llevarán a cabo experimentos en condiciones controladas, utilizando diferentes combinaciones de los microorganismos.

Los resultados de esta investigación podrían tener un impacto significativo en la agricultura, ya que podrían proporcionar alternativas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente para el control del hongo *Diaporthe longicolla*. Si se demuestra que los microorganismos eficientes tienen un efecto antagonista efectivo, se podrían desarrollar productos biológicos basados en ellos, lo que reduciría la dependencia de los productos químicos tradicionales y sus efectos negativos en la salud humana y el medio ambiente.

1.11.2. Limitaciones

En base al tema propuesto y los objetivos planteados se puede detallar las principales limitaciones de la investigación:

- *Disponibilidad limitada de muestras:* La obtención de muestras adecuadas tanto de los microorganismos como del hongo puede ser un desafío, especialmente si se busca una variación genética específica.
- *Contaminación cruzada:* Existe el riesgo de contaminación cruzada entre las diferentes cepas de microorganismos y el hongo objetivo, lo que podría afectar los resultados y dificultar la interpretación de los efectos antagonistas.
- *Factores ambientales:* Los resultados de un estudio *in vitro* pueden no reflejar necesariamente las condiciones reales del ambiente en el que los microorganismos y el hongo interactúan, lo que podría limitar la aplicabilidad de los resultados a situaciones de campo.
- *Variabilidad biológica:* Los microorganismos y el hongo pueden exhibir una variabilidad biológica inherente, lo que dificulta la

extrapolación de los resultados obtenidos en un estudio a otras situaciones o especies relacionadas.

- *Resistencia del hongo:* El hongo *Diaporthe longicolla* puede desarrollar resistencia a los microorganismos antagonistas a lo largo del tiempo, lo que podría afectar la efectividad de estos en futuras aplicaciones.
- *Interacciones complejas:* La interacción entre los microorganismos y el hongo puede ser influenciada por una serie de factores, como la composición del medio de cultivo, la densidad celular y las condiciones de crecimiento, lo que puede dificultar la interpretación de los resultados.
- *Generalización de resultados:* Los resultados obtenidos en un estudio *in vitro* pueden no ser directamente aplicables a la realidad de campo, donde existen una serie de factores adicionales que pueden influir en la efectividad de los microorganismos antagonistas.
- *Evaluación a corto plazo:* Los estudios *in vitro* suelen tener una duración limitada, lo que puede dificultar la evaluación de los efectos a largo plazo de los microorganismos antagonistas sobre el hongo y su persistencia en el tiempo.
- *Disponibilidad limitada de recursos:* La investigación requiere de recursos como equipos de laboratorio, insumos y materiales específicos, así como personal especializado. La falta de acceso a estos recursos puede limitar la realización de estudios exhaustivos.
- *Variabilidad de los resultados:* Los resultados obtenidos en un entorno *in vitro* pueden no reflejar fielmente lo que sucede en la naturaleza. Debido a las condiciones controladas del experimento, existe la posibilidad de que los efectos observados en el laboratorio no se traduzcan directamente en el campo.
- *Dificultad para reproducir los resultados:* La investigación científica

se basa en la reproducibilidad de los resultados para validar las conclusiones. Sin embargo, la evaluación *in vitro* de la actividad antagónica de los microorganismos puede ser complicada de replicar en diferentes condiciones experimentales.

- *Efectos sinérgicos o antagónicos:* La interacción entre los microorganismos evaluados y el hongo *Diaporthe longicolla* podría verse influenciada por la presencia de otros organismos presentes en el medio ambiente. Estos efectos adicionales pueden ser difíciles de controlar y comprender completamente.
- *Limitaciones éticas:* Algunos estudios *in vitro* pueden requerir el uso de animales o la manipulación de organismos vivos, lo cual puede plantear preocupaciones éticas. Estas limitaciones pueden afectar la realización de estudios a gran escala o la obtención de aprobaciones regulatorias.
- *Sensibilidad a las condiciones ambientales:* Los microorganismos eficientes y el hongo *Diaporthe longicolla* pueden ser sensibles a las condiciones ambientales como la temperatura, la humedad y el pH. Estas variaciones pueden afectar la estabilidad de los resultados y dificultar la comparación entre diferentes estudios.
- *Limitaciones de tiempo:* La evaluación *in vitro* de la actividad antagónica de los microorganismos puede requerir un período de incubación prolongado para observar los efectos deseados. Esto puede generar limitaciones en términos de tiempo y recursos disponibles para llevar a cabo el estudio.
- *Influencia de otros factores bióticos y abióticos:* Además de los microorganismos evaluados y el hongo objetivo, existen otros factores bióticos y abióticos presentes en el medio ambiente que podrían influir en la interacción. Estos factores pueden ser difíciles de controlar y pueden afectar los resultados del estudio.
- *Complejidad de los mecanismos de acción:* Los microorganismos

eficientes pueden ejercer su actividad antagónica a través de diversos mecanismos, como la competencia por nutrientes o la producción de metabolitos secundarios. La comprensión completa de estos mecanismos puede ser un desafío y puede requerir estudios adicionales.

- *Limitaciones en la extrapolación de resultados:* Los estudios *in vitro* proporcionan información valiosa, pero es importante considerar que los resultados pueden no ser directamente aplicables en el campo. Las condiciones del laboratorio y la interacción simplificada entre los organismos pueden limitar la extrapolación de los resultados obtenidos.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1 Antecedentes

Según López Medina & Gil Rivero (2017), el cacao es un cultivo de gran importancia económica y social en varias regiones tropicales del mundo. Sin embargo, su producción se ve amenazada por diversas enfermedades, una de ellas causada por el hongo fitopatógeno *Diaporthe longicolla*, este microorganismo provoca antracnosis en numerosas especies de plantas y diversos cultivos, provocando pérdidas significativas en la producción y calidad afectando negativamente a los productores y a la industria en general, así es como informa Serrato-Díaz et al (2022).

El creciente interés en el control biológico de patógenos vegetales surge principalmente como respuesta a la preocupación creciente de la sociedad sobre el uso de agridefensivos químicos en la agricultura (Suárez Contreras & Rangel Riaño, 2013). Tanto los gobiernos de diversos países como agricultores y consumidores de productos agrícolas están cada vez más conscientes de los problemas asociados con los productos químicos, incluyendo su impacto en la seguridad alimentaria, el medio ambiente, los recursos naturales y la biodiversidad (M. C. Mora et al., 2023).

Desde el punto de vista de Infante et al., (2009), el uso de microorganismos eficientes (MOE) como agentes de control biológico ha surgido como una alternativa prometedora y sostenible para manejar las enfermedades en plantas y cultivos de interés. Estos organismos positivos poseen la capacidad de colonizar el sistema radicular, promover el crecimiento y salud de las plantas, además de poseer propiedades antagonistas contra fitopatógenos

Estos microorganismos producen una amplia variedad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales exhiben propiedades antimicrobianas, siendo capaces de secretar enzimas como celulasas, quitinasas y glucanasas, que actúan descomponiendo las paredes celulares de los

hongos patógenos debilitándolos y facilitando su eliminación, reduciendo la incidencia de enfermedades en las plantas. (Reinaldo, 2020).

Paredes-Escalante et al., (2009), en este contexto plantea que, los microorganismos antagonistas, actúan mediante diversos mecanismos, como la competencia por nutrientes, el hiperparasitismo y la producción de sustancias antibióticas contra los patógenos, siendo capaces de prevenir el desarrollo de hongos o nematodos durante el desarrollo de especies en plantaciones.

2.2 Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1. Introducción al control fitopatógico en plantaciones de cacao

En el contexto del cultivo del cacao, el control fitopatológico emerge como una disciplina primordial en la gestión integral de la sanidad vegetal (Chávez et al., 2024). El cacao es una especie altamente susceptible a diversas enfermedades causadas por agentes fitopatógenos, incluyendo hongos, virus y bacterias, que pueden incidir significativamente en la producción y materia prima.

La fitopatología es la rama de la biología vegetal encargada del estudio de enfermedades de las plantas e implementa un conjunto de estrategias y técnicas encaminadas a prevenir, reducir o controlar los efectos de estos patógenos en miles y cientos de especies de cultivos diferentes en todo el mundo (Tena et al., 2015). Estas estrategias van desde enfoques preventivos, como la selección de genotipos resistentes y la implementación de buenas prácticas agrícolas, hasta enfoques terapéuticos, como el uso de productos fitosanitarios y el uso de métodos fitosanitarios integrados (Alvarez Hernández, 2012).

El control fitopatológico de las plantaciones de cacao se basa en un enfoque multidisciplinario que combina conocimientos de fitopatología, fisiología vegetal, genética, agricultura y agroecología (Guamán et al., 2022). Esta integración de disciplinas permite desarrollar estrategias de manejo adaptadas a las condiciones específicas de cada plantación,

tomando en cuenta factores como el clima, el suelo, la diversidad genética de los cultivos y las prácticas culturales.

La identificación temprana de fitopatógenos y el monitoreo continuo de su aparición son aspectos clave en el control de la patología de las plantas de cacao (Ricaño-Rodríguez, 2018). Para ello, el uso de métodos de diagnóstico molecular como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y ELISA (Enzyme Immunosorbent Assay) permite la detección rápida y precisa de la presencia de patógenos, facilitando la toma de decisiones sobre medidas de manejo (Llanes-Alvarez et al., 2017).

En el estudio del control biológico se ha observado la capacidad potencial que tienen los microorganismos antagonistas, como ciertas cepas de bacterias y hongos, con el fin de controlar y minimizar enfermedades comunes y severas en el cultivo de cacao (Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento, 2019). Estos organismos beneficiosos funcionan compitiendo con patógenos vegetales por recursos o produciendo metabolitos que inhiben su crecimiento, proporcionando una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente al uso de productos químicos agrícolas.

Además del control biológico, el control cultural juega un papel importante en el manejo de enfermedades de los cultivos mencionados utilizando métodos agrotécnicos especiales como la poda sanitaria, la eliminación de residuos vegetales infectados, la rotación de cultivos y el manejo óptimo de la sombra de los cultivos, ayudando a reducir la presión de enfermedades en las plantaciones y mantener el equilibrio en los ecosistemas forestales (AnzulesToala et al., 2019).

La resistencia genética es un elemento esencial en el control de la patología vegetal, esta resistencia genética puede ser inducida por procesos evolutivos naturales y programas de mejora genética específicos destinados a identificar y promover genes de resistencia en zonas cacaoteras (Freire et al., 2017). La incorporación de genotipos de resistencia en las prácticas de mejoramiento no sólo reducirá la

vulnerabilidad de las plantaciones a las enfermedades, sino que también reducirá la necesidad de intervenciones fitosanitarias, contribuyendo así a la sostenibilidad y rentabilidad a largo plazo de la industria.

2.2.2. Microorganismos eficientes como agentes de control biológico

Las especies microbianas en los ecosistemas tienen amplias interrelaciones, como sinergia, antagonismo, competencia física y bioquímica, y están reguladas por una serie de factores bióticos y abióticos complejos (Guzmán Duchén & Montero Torres, 2021). La rizosfera es uno de los principales sitios donde aparecen microorganismos con funciones específicas como fijadores de nitrógeno, potenciadores de fósforo, promotores del crecimiento de las plantas, agentes de biocontrol y bacterias patógenas, que a menudo compiten por espacio y nutrientes (Meléndez-Jácome et al., 2021).

El control biológico se basa en el uso de microorganismos altamente eficientes y se basa en la capacidad que poseen estos organismos para colonizar el ambiente agrícola y competir con sustancias nocivas produciendo metabolitos antimicrobianos, activando respuestas de defensa de la planta huésped o adquiriendo directamente sustancias nocivas (Vega-Torres et al., 2019).

Los microorganismos benéficos más estudiados son algunas cepas de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y hongos de los géneros *Trichoderma* y *Beauveria*, que han demostrado ser eficaces para combatir enfermedades fúngicas como la pudrición de la raíz y pudrición de las hojas, así como para suprimir plagas, ácaros y gusanos (Cano, 2011).

Trichoderma spp.: Debido a sus conocidos mecanismos de control biológico, han sido ampliamente utilizados en la agricultura (Khan et al., 2020). El uso de este inoculante microbiano en especies está relacionado con enfermedades vegetales, crecimiento de plantas, procesos de descomposición y biorremediación.

Bacillus spp: Tiene la capacidad de fijar nitrógeno y disolver fosfato con la ayuda de enzimas como la nitrogenasa y la fitasa (Corrales-Ramírez MSc et al., 2017). Estas propiedades tienen un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas y la mejora de la productividad agrícola.

Pseudomona spp: Estas bacterias promueven el crecimiento, inducen resistencia sistémica (RSI) y controlan los patógenos que invaden a las plantas a través de una variedad de mecanismos de acción, incluidos varios compuestos antimicrobianos como el 2,4-dietilfluorotriol y enzimas celulolíticas y otras enzimas metabólicas que mejoran la absorción de nutrientes por formando sideróforos (Marrero et al., 2015).

En comparación con los métodos tradicionales de control de plagas, el uso de microorganismos altamente eficaces como agentes de control biológico tiene varias ventajas, puesto que, es respetuoso con el medio ambiente y no genera residuos tóxicos en el suelo y cultivo (Rivera-Méndez, 2016). Además, ayuda a preservar la biodiversidad al reducir la dependencia de productos químicos sintéticos.

La efectividad de estos microorganismos puede variar dependiendo de varios factores, incluidas las condiciones ambientales, la tasa y frecuencia de aplicación y las interacciones con otros organismos presentes en el agroecosistema (Alfonso et al., 2005). Por tanto, los estudios de compatibilidad y eficacia son muy importantes ante la generalización del uso de estos microorganismos en los sistemas agrícolas.

La formulación y uso de estos organismos generalmente se realiza a través de productos comerciales como biofungicidas, biopesticidas y biofertilizantes que contienen cepas seleccionadas y concentradas de microorganismos específicos (Cruz-Cárdenas et al., 2021). Estos preparados pueden aplicarse vía foliar, radicular o riego dependiendo de las necesidades y características del cultivo y agroecosistema.

Además de su papel en el control de plagas y enfermedades, también pueden mejorar la calidad y la productividad de los cultivos al promover el crecimiento de las plantas y aumentar la resistencia al estrés abiótico

(Ferrer Wurs, 2021). Este efecto beneficioso puede atribuirse a la capacidad de algunos microorganismos para fijar nitrógeno atmosférico, disolver fosfato y producir hormonas de crecimiento vegetal.

2.2.3. Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas *in vitro*

Los microorganismos que luchan contra hongos patógenos son una parte importante del control biológico y tienen varios mecanismos de acción que les permiten inhibir el crecimiento y la propagación de patógenos *in vitro* (Alcívar et al., 2023). Estos mecanismos son fundamentales para comprender cómo interactúan los microorganismos beneficiosos con sus competidores y cómo utilizarlos eficazmente en la agricultura para combatir las enfermedades de las plantas.

Entre los mecanismos más comunes se encuentran la producción de metabolitos antimicrobianos, antibióticos (p. ej., antibióticos, ácidos orgánicos), producción de enzimas hidrolíticas y péptidos antimicrobianos (Melgoza et al., 2024). Estos factores inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos al alterar sus procesos metabólicos, estructuras celulares o su comunicación química.

Además de producir metabolitos antimicrobianos, estos organismos pueden competir con los patógenos por nutrientes y espacio, limitando así su capacidad de crecer y colonizar el medio ambiente, otorgando ventaja competitiva y reduciendo la supervivencia de fitopatógenos. (Reinaldo, 2020).

Se ha descubierto en estudios realizados para dilucidar los mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas, llegando a la conclusión de que estos organismos destacan la producción de antibióticos y la competencia por los nutrientes, pero es importante seguir abordando aspectos fundamentales de las interacciones antagonista-patógeno *in vitro* (Hernández-Lauzardo et al., 2007).

2.2.4. Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas

Los microorganismos antagonistas utilizan varios mecanismos de acción especializados que les permiten suprimir el crecimiento y la propagación de fitopatógenos (Camelino et al., 2023). Estos mecanismos son una combinación de estrategias bioquímicas, físicas y metabólicas que han evolucionado para competir en ambientes que coexisten con diversas especies de hongos.

Uno de los mecanismos más visibles es la producción de péptidos antimicrobianos y compuestos volátiles, capaces de inhibir el crecimiento y reproducción de hongos negativos para los cultivos (Patiño et al., 2020). Estos metabolitos pueden interferir con la síntesis de la pared celular, la división celular o la respiración del hongo, provocando que este se debilite y muera (Guédez et al., 2009).

Otro mecanismo importante es la producción de enzimas hidrolíticas, como quitinasas, proteasas y celulasas, que son capaces de degradar las estructuras celulares de hongos patógenos (Vargas-Hoyos & Gilchrist-Ramelli, 2015). Estas enzimas descomponen la quitina de la pared celular del hongo, destruyendo su integridad estructural y reduciendo su viabilidad.

Además, los microorganismos antagonistas pueden inducir respuestas de defensa de la planta huésped, activar sistemas de señalización molecular e inducir la producción de fitoalexinas y otras moléculas de defensas (Soto et al., 2018). Estas respuestas inmunes aumentan la resistencia de la planta y ayudan a limitar el daño causado por la infección.

La competencia por el espacio es también un mecanismo esencial por el cual los microorganismos antagonistas pueden colonizar el mismo nicho ecológico que los hongos patógenos, ocupando su espacio y limitando su capacidad para establecerse y reproducirse (Acosta et al., 2021). Esta competencia puede ocurrir en la rizosfera, las hojas u otros tejidos vegetales, donde los microorganismos antagonistas pueden desplazar al patógeno.

2.2.5. Identificación y caracterización de los

microorganismos eficientes

La identificación y caracterización de microorganismos (ME) eficaces en la agricultura y la biotecnología aplicada es un proceso de investigación multifacético esencial, llevándose a cabo en laboratorios especializados, comienza con la recolección cuidadosa de muestras de suelo, tejidos vegetales u otras matrices agrícolas para registrar la riqueza microbiana del ambiente agroecológico (Suárez Contreras & Rangel Riaño, 2013).

La caracterización morfológica es uno de los primeros pasos en la identificación de los ME, ya que, mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica, se examinan características celulares de los microorganismos, tales como; tamaño, forma, cápsulas, presencia de flagelos y otros orgánulos celulares que pueden derivar información útil sobre la taxonomía y la fisiología microbiana (Tena et al., 2015).

Otro aspecto crucial en el proceso de identificación de los ME, es la caracterización genética y molecular, debido a que se emplean técnicas de biología molecular como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la secuenciación de ADN y el análisis de restricción para investigar los perfiles genéticos y la diversidad genómica de los microorganismos, identificando su clasificación taxonómica y la identificación de genes de importancia (Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento, 2019).

La evaluación de la actividad antagónica es un componente crítico en la caracterización de dichos organismos, llevando a cabo diversos ensayos *in vitro*, en el cuales estos microorganismos se enfrentan a patógenos oportunistas para determinar su capacidad de inhibir su crecimiento y desarrollo (Ferrer Wurs, 2021). Estos ensayos pueden comprender la medición de zonas de inhibición, la cuantificación de biomasa o la observación de efectos morfológicos de los fitopatógenos.

Referente a lo antes mencionado, además de evaluar su actividad antagónica, son estudiados por otros atributos beneficiosos, como su capacidad para estimular el crecimiento vegetal mediante la producción

de hormonas de crecimiento, la solubilización de nutrientes inorgánicos y la inducción de respuestas defensivas en las plantas hospederas (Camelino et al., 2023).

Es esencial considerar la seguridad y la inocuidad de los microorganismos durante su caracterización, con la implementación de pruebas de toxicidad y evaluaciones de riesgo para garantizar que su aplicación en el campo no tenga efectos adversos en el medio ambiente, la salud humana o la biodiversidad.

Una vez completada la identificación y caracterización, los ME seleccionados pueden ser formulados y aplicados en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades en la agricultura (Alvarez Hernández, 2012). Estos microorganismos beneficiosos representan una alternativa prometedora hacia los agroquímicos convencionales, contribuyendo a la sostenibilidad y resiliencia de sistemas agrícolas.

2.2.6. Factores que afectan la eficacia de los microorganismos eficientes

Los microorganismos eficientes establecen un equilibrio microbiológico en el suelo y mejoran su calidad, incrementando la producción y protección de cultivos, conservando los recursos naturales y creando una agricultura sustentable (Melgoza et al., 2024). Con base en Castro-Barquero & González-Acuña (2021) existen varios factores que pueden afectar la eficacia de estos organismos y limitar la capacidad para cumplir su función. A continuación, se mencionarán aquellos:

pH del suelo: Si el pH es muy ácido o alcalino, tiene la posibilidad de afectar negativamente la supervivencia y el mecanismo de acción, puesto que es importante mantener un pH equilibrado para asegurar su eficacia.

Temperatura: Ciertos microorganismos son más activos en temperaturas más cálidas, mientras que otros son adaptables en temperatura más templadas, por lo tanto, un cambio brusco en la temperatura puede afectar su actividad y supervivencia.

Nutrientes: La falta de nutrientes puede limitar su crecimiento y actividad, disminuyendo así su eficacia, puesto que es importante asegurar que el suelo esté bien fertilizado para proporcionarles los nutrientes necesarios.

Competencia microbiana: En el suelo existen una gran diversidad de organismos vivos, algunos de los cuales pueden competir entre ellos por recursos y espacio, generando un antagonismo inhibiendo el desarrollo y crecimiento de los microorganismos eficientes.

Contaminantes químicos: La presencia de contaminantes químicos en el suelo, como fertilizantes y pesticidas y herbicidas sintéticos, puede afectar negativamente su eficacia, dado que estos productos químicos pueden ser tóxicos, reduciendo su población y su capacidad para llevar a cabo sus funciones.

Aplicación incorrecta: Las formulaciones mal diseñadas influye en la viabilidad y la estabilidad de los ME, lo que resulta en una menor eficacia posterior de la aplicación, siendo fundamental optar por formulaciones que garanticen su protección durante el almacenamiento y la aplicación, facilitando su liberación y colonización en el medio ambiente.

Variaciones genéticas y de cepas: Los microorganismos eficientes están compuestos por diferentes cepas y variaciones genéticas, puesto que algunas cepas pueden tener una mayor eficacia en ciertos suelos y condiciones ambientales que otras.

2.2.7. Perspectivas futuras y aplicaciones potenciales de microorganismos eficientes

Las perspectivas futuras y las aplicaciones potenciales de los microorganismos eficientes (MOE) abren un amplio espectro de posibilidades en diversos campos científicos y profesionales, dado que la continua investigación en el área de microbiología ambiental y agrícola ha revelado la potencial capacidad en mejora de la salud del suelo, producción agrícola y la mitigación de los impactos ambientales negativos asociados con la agricultura intensiva (Alcívar et al., 2023).

En el ámbito agrícola, los MOE ofrecen una alternativa sostenible y amigable con el medio ambiente, debido a su capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y descomponer materia orgánica, logrando potenciar la fertilidad del suelo y promoviendo un crecimiento saludable en los cultivos, reduciendo así la dependencia de insumos agrícolas sintéticos y optimizando la eficiencia de los sistemas de producción (Infante et al., 2009).

Además, tienen el potencial de ser utilizados en la biorremediación de suelos contaminados y restauración de ecosistemas degradados, ya que la potencialidad para degradar contaminantes orgánicos e inorgánicos, tales como; hidrocarburos y metales pesados, puede contribuir a la recuperación de áreas afectadas por la contaminación industrial y agrícola, así como la conservación de la biodiversidad y salud del suelo (Montoya et al., 2021).

En el ámbito de la biotecnología, se está investigando el potencial de los organismos eficientes como agentes para controlar enfermedades en plantas, así como los patógenos en humanos y animales, además de su capacidad para colonizar las raíces en plantas y competir con microorganismos patógenos puede ser beneficiosa para prevenir enfermedades y fortalecer la resistencia de las plantas frente a condiciones de estrés, tanto bióticas como abióticas, provocando una reducción en la dependencia de tratamientos químicos y en el riesgo asociado al desarrollo de resistencia a los pesticidas (Villa et al., 2022).

Además, tienen el potencial de ser utilizados en la producción de bioproductos y biofertilizantes de alto valor agregado, puesto que su capacidad para producir enzimas, metabolitos secundarios y compuestos bioactivos puede ser aprovechada en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, así como en la producción de biocombustibles y productos químicos renovables, contribuyendo a la diversificación de la bioeconomía y la reducción hacia la dependencia de recursos no renovables (Ríos-Moyano et al., 2023).

En el ámbito de la investigación científica, estos organismos representan una herramienta invaluable para el estudio detallado de la ecología microbiana y los procesos biogeoquímicos en ecosistemas terrestres y acuáticos (Guerrero et al., 2020). Sin embargo, su capacidad para interactuar con otros microorganismos y organismos hospedadores, así como para adaptarse a cambios ambientales y climáticos, puede proporcionar información crucial sobre la dinámica de los ecosistemas y los efectos del cambio global en la biodiversidad y salud ambiental (Muñoz & López, 2022).

2.2.8. Pérdidas económicas y ambientales a causa de hongos patógenos que afectan al cacao

La industria cacaotera enfrenta considerables pérdidas económicas debido a la presencia y proliferación de hongos patógenos que afectan la producción y calidad del cultivo (Polanco et al., 2020). Estos hongos, conocidos como *Moniliophthora spp.*, *Phytophthora spp.*, *Lasiodiplodia spp.*, son responsables de enfermedades devastadoras como la moniliasis y la escoba de bruja, que provocan pérdidas muy alta en plantaciones enteras del cultivo (F. C. Mora et al., 2024). El daño económico resultante que derivan estas enfermedades incluyen; la disminución de rendimiento, pérdida de calidad y el aumento de los costos de producción asociados con la gestión de las enfermedades.

La moniliasis, causada por el hongo *Moniliophthora spp.*, es una de las enfermedades más destructivas del sector cacaotero logrando provocar pérdidas económicas significativas en diferentes regiones productoras. conllevando a una disminución significativa tanto en el rendimiento como en la calidad del producto final (Anzules Toala et al., 2022).

La escoba de bruja, causada por el hongo *Phytophthora spp.*, es otra enfermedad devastadora, causando pérdidas económicas y ambientales significativas, afectando los brotes y las hojas jóvenes de los árboles, provocando la formación de estructuras anormales similares a escobas en lugar de vainas y flores normales (López-Barrera, 2021).

Además de las pérdidas económicas, los hongos patógenos también tienen impactos ambientales significativos, dado que la necesidad de controlar estas enfermedades con productos químicos puede resultar la contaminación del suelo y del agua, así también la degradación de ecosistemas circundantes (Cruz-Cárdenas et al., 2021). El uso excesivo de fungicidas también puede generar resistencia en los hongos patógenos, dificultando su control y aumentando su dependencia de productos químicos sintéticos.

Además, las prácticas agrícolas intensivas asociadas con la gestión de enfermedades fúngicas pueden conducir a la deforestación y la pérdida de biodiversidad en las regiones productoras (Paredes-Escalante et al., 2009). La expansión de las plantaciones de cacao a expensas de los hábitats naturales puede tener consecuencias devastadoras para la flora y fauna local, así como para la salud de los ecosistemas en general.

Las pérdidas económicas y ambientales causadas por microorganismos patógenos que afectan al cacao, subrayan la importancia de desarrollar estrategias de manejo integrado de enfermedades que sean ecoamigable con el medio ambiente (Alvarez Hernández, 2012). Esto incluye la promoción de prácticas agrícolas agroecológicas que fomenten la diversidad genética y biológica en plantaciones de cacao, así como el desarrollo y la promoción de variedades resistentes a enfermedades y métodos de control biológico de plagas y enfermedades.

Además, es fundamental mejorar la capacidad de los agricultores para identificar y gestionar eficazmente las enfermedades fúngicas del cacao a través de educación, capacitación y el acceso a recursos y tecnologías adecuadas, con el fin de reducir las pérdidas económicas asociadas con las enfermedades fúngicas y promover una producción de cacao más sostenible y resiliente en el futuro (Paredes-Escalante et al., 2009).

2.2.9. Consideraciones económicas y ambientales del control biológico

El control biológico implica la introducción artificial de microorganismos

antagonistas en un ecosistema particular para regular la población de un patógeno o plaga (Rivera-Méndez, 2016). Esta práctica se inspira en la estrategia empleada por los entomólogos, que consiste en introducir depredadores para controlar las plagas de insectos (Infante et al., 2009). A diferencia del control químico, el control biológico tiende a tener efectos más específicos, afectando solo al microorganismo patógeno o la plaga principal, mientras respeta a otros microorganismos beneficiosos y la fauna útil.

Uno de los principales impulsores del desarrollo actual de sistemas de control biológico es la reducción en el uso de plaguicidas químicos de síntesis (Chirinos et al., 2020). La creciente preocupación por la salud, seguridad y medio ambiente, así como los efectos adversos de los productos químicos agrícolas en el agua, suelo y alimentos, demanda una disminución en su aplicación.

Desde una perspectiva económica, el control biológico puede ofrecer una alternativa rentable a los métodos tradicionales de control de plagas, como el uso de pesticidas químicos (Jaizme-Vega & Rodríguez-Romero, 2008). Aunque los costos iniciales de implementación del control biológico pueden ser mayores que los de los productos químicos, a largo plazo, el control biológico puede ser más rentable debido a la reducción de los costos de aplicación y la menor necesidad de tratamiento repetido.

Desde una perspectiva ambiental, el control biológico ofrece numerosos beneficios en términos de reducción del uso de productos químicos sintéticos y la contaminación asociada, al evitar el uso de pesticidas químicos, se logra prevenir la contaminación del suelo, el agua y el aire, así como proteger la salud de los ecosistemas y la biodiversidad (Llanes-Alvarez et al., 2017).

Además, el control microbiológico es compatible con prácticas agrícolas sostenibles, como la agricultura orgánica y la agroecología, puesto que al promover la biodiversidad y el equilibrio natural de los ecosistemas agrícolas, ayuda a contribuir a la conservación de los recursos naturales y

la salud del suelo, así como a la resiliencia de los sistemas agrícolas frente a los cambios climáticos y ambientales (Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento, 2019).

Otro aspecto importante es que el control biológico puede reducir los riesgos para la salud humana y animal asociados con el uso de pesticidas químicos (Marrero et al., 2015). Al minimizar la exposición a sustancias tóxicas y carcinogénicas presentes en los productos químicos puede contribuir a la protección de los trabajadores, consumidores y comunidades rurales.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que el control biológico no está exento de desafíos y limitaciones, puesto que la efectividad puede verse afectada por diversos factores, tales como; las condiciones climáticas, la disponibilidad de hábitats adecuados para los organismos y la presencia de especies invasoras que compiten con los organismos de control (Cruz-Cárdenas et al., 2021).

Además, algunos organismos positivos pueden tener efectos no deseados en especies no objetivo, lo que puede conducir a impactos negativos en la biodiversidad y los servicios ecosistémicos, siendo fundamental realizar evaluaciones de riesgo y un monitoreo meticuloso para asegurar la implementación segura y efectiva del control biológico (Ferrer Wurs, 2021).

2.2.10. Resistencia de los hongos patógenos en las plantaciones de cacao

El uso de fungicidas químicos como método de control de enfermedades es una práctica ampliamente empleada en la agricultura moderna, ya que estos productos son esenciales para garantizar una producción de alimentos eficiente, pero en muchas ocasiones, el uso de estos compuestos fungicidas se considera una medida eficaz, rápida, práctica y económicamente viable (Carmona & Sautua, 2017). Sin embargo, al igual que sucede con las malezas e insectos, las poblaciones de hongos objetivo del control pueden desarrollar resistencia, lo que hace que los productos fitosanitarios destinados a la protección de las plantas sean

menos efectivos, generando serios problemas hacia los productores, empresas y la comunidad en general (Samaniego-Gómez et al., 2017).

La resistencia a los fungicidas se refiere a la disminución adquirida y heredable que posee un hongo hacia un agente antifúngico específico, ya que esta propiedad, heredable y estable en los organismos fúngicos, les permite adaptarse a condiciones agronómicas adversas y sobrevivir (Castillo-Arévalo, 2022). Durante este proceso de adquisición de resistencia, algunos individuos de la población fúngica logran multiplicarse y propagarse, a pesar de haber sido expuestos a un fungicida que normalmente los controlaría, debido a que en este proceso implica la sustitución genética de la población originalmente susceptible por una nueva población genéticamente y bioquímicamente distinta que posee resistencia.

Las cepas resistentes surgen de mutaciones genéticas con una baja tasa de ocurrencia, ya que la predominancia de las cepas resistentes se debe a su mayor capacidad de reproducción en presencia del fungicida, lo que hace que este último pierda su eficacia, llegando a dominar la población, volviendo completamente ineficaz al fungicida (Carranza & Salinas, 2024).

La resistencia de los fitopatógenos hacia un fungicida específico suele surgir de una modificación genética que afecta el sitio de acción dentro de la célula del microorganismo (Alcívar et al., 2023). Esta modificación está determinada por cambios heredables en la molécula de ADN y está influenciado directamente por la biología y la variabilidad inherente del patógeno, así como por el modo o mecanismo bioquímico de acción del fungicida en la célula fúngica (Freire et al., 2017).

La biología y epidemiología de los hongos son determinantes importantes a considerar al estudiar la resistencia, por ejemplo, un patógeno que experimenta muchas generaciones durante el ciclo de cultivo, tiene una alta tasa epidemiológica, periodos de incubación y latencia cortos, una amplia variabilidad genética, afecta a una amplia gama de hospedantes y sus esporas se dispersan fácilmente, tendrá una mayor probabilidad de

desarrollar resistencia (López-Bautista et al., 2020).

La rápida evolución de la resistencia en los hongos representa un desafío importante para la industria cacaotera, resaltando la necesidad de adoptar enfoques integrados y sostenibles para el manejo de enfermedades (Cedeño Moreira et al., 2020). Esto implica promover la diversidad genética y biológica en plantaciones de cacao y emplear estrategias de control de plagas y enfermedades que combinen métodos culturales, biológicos y químicos de manera efectiva.

Además, es crucial impulsar la investigación y el desarrollo de nuevos fungicidas y técnicas de control menos propensos a inducir resistencia en hongos patógenos. Esto podría incluir la exploración de productos químicos con modos de acción alternativos o el uso de agentes biológicos de control específicos para estos microorganismos, siendo menos susceptibles a la resistencia.

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1 Tipo y diseño de investigación

El estudio es de tipo experimental, se efectuó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias e Ingenierías de la Universidad Estatal de Milagro (UNEMI).

Se procedió a realizar un confrontamiento entre microorganismos eficientes (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona fluorescens*) cepas adquiridas del laboratorio Microbiolab S.A. con ruc 1793170374001, frente a replica de una cepa secuenciada de *Diaporthe longicolla* N° de Accesoión OP753556.1.

El experimento se efectuó bajo 4 tratamiento, 5 réplicas con sus respectivos controles, sumando un total de 45 unidades experimentales, ver tabla 2.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos

Tratamientos	Enfrentamientos y Controles	Replicas
T1	<i>Trichoderma harzianum</i> v.s <i>Diaporthe longicolla</i>	5
T2	<i>Trichoderma asperellum</i> v.s <i>Diaporthe longicolla</i>	5
T3	<i>Bacillus subtilis</i> v.s <i>Diaporthe longicolla</i>	5
T4	<i>Pseudomona fluorescens</i> v.s <i>Diaporthe longicolla</i>	5
T5	<i>Trichoderma harzianum</i>	5
T6	<i>Trichoderma asperellum</i>	5
T7	<i>Bacillus subtilis</i>	5
T8	<i>Pseudomona fluorescens</i>	5
T9	<i>Diaporthe longicolla</i>	5
Total		45

Fuente: Elaboración propia de los autores.

3.2 La población y la muestra

3.2.1 Características de la población

Se realizó una caracterización morfológica con azul de lactofenol a las réplicas de *D. Longicolla*. Además, se realizó la identificación molecular de

la cepa madre.

3.2.2 Delimitación de la población

La población objeto de estudio en esta investigación se compone de cuatro microorganismos eficientes seleccionados por su potencial antagonista contra el hongo *D. longicolla*. Los microorganismos evaluados son: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *D. longicolla*

3.2.3 Tipo de muestra

Las muestras utilizadas en esta investigación incluyen tanto los microorganismos antagonistas como el hongo patógeno objetivo. Los tipos de muestras son:

Microorganismos Antagonistas:

- *T. harzianum*: Cepa específica seleccionada por su potencial biocontrolador.
- *T. asperellum*: Cepa conocida por su eficacia en la inhibición de patógenos fúngicos.
- *B. subtilis*: Bacteria grampositiva con propiedades antagonistas y promotora de crecimiento vegetal.
- *P. fluorescens*: Bacteria gramnegativa, reconocida por su capacidad de producir metabolitos antibióticos.

Microorganismos Patógeno:

- *D. longicolla*: Hongo fitopatógeno causante de enfermedades en diversas plantas de cultivo.

3.2.4 Tamaño de la muestra

Para asegurar la validez estadística y la reproducibilidad de los resultados, se seleccionó un tamaño de muestra adecuado para los experimentos *in vitro*:

Número de Replicados:

Cada tratamiento (combinación de microorganismo antagonista con *D. longicolla*) se realizó con 5 réplicas.

Los controles negativos *D. longicolla* y positivos con microorganismo antagonista también se realizaron en 5 replicados cada uno.

Total de Muestras:

Considerando los 4 microorganismos antagonistas, 1 control negativo *D. longicolla* y 4 positivos con microorganismos antagonista, con 5 replicados por tratamiento, se realizó un total de 45 placas por experimento (20 placas de tratamiento + 25 placas de control).

3.2.5 Proceso de selección de la muestra

Se seleccionaron cepas de microorganismos reconocidos por su capacidad biocontroladora y previamente estudiados en ensayos de antagonismo contra diversos fitopatógenos. Las cepas utilizadas provienen de colecciones microbiológicas del laboratorio Microbiolab S.A. RUC. 1793170374001, mientras que la cepa patógena corresponde a réplicas de una cepa secuenciada de *Diaporthe longicolla* N° de Accesoión OP753556.1.

3.3 Los métodos y las técnicas

Inicialmente se realizó el pesaje del medio de cultivo, utilizando Agar Papa Dextrosa (PDA) en dosis de 39 g/L⁻¹ de agua destilada, esterilizando el medio de cultivo a calor húmedo dentro de la autoclave marca Yamato modelo SM311 a 121°C por 15 minutos. Las placas de vidrio fueron esterilizadas en el mismo equipo a calor en seco. La dispensación del medio en las placas de vidrio con un diámetro de 100 mm se efectuó dentro de una cámara de flujo laminar marca BIOBASE modelo FH1200(X), con el fin de mantener el área aséptica, dispensando 20 ml de medio de cultivo por placa.

Para la siembra de los hongos *T. harzianum* y *T. asperellum* frente a *D. longicolla* se procedió con la técnica de corte 5 mm² de la cepa madre y ubicarlos a extremos de la placa a una separación de 2 cm del borde. Para la siembra de bacterias *B. subtilis* y *P. fluorescens* se procedió a diluir una muestra de la cepa

en agua pectonada dentro de un tubo de ensayo de vidrio y con una micropipeta succionar 100 microlitros para verterlo dentro de la placa y con la ayuda de un asa de siembra de vidrio Digralesky se dispersa en toda la superficie de la placa y se sembró en punto central de la placa los 5 mm² de la cepa de *D. longicolla*. La siembra de los tratamientos controles correspondió en el punto central de las placas 5 mm² para hongos y cobertura en toda la placa para bacterias.

Una vez sembrada todas las cepas, fueron incubadas a 28 – 30°C. El crecimiento radial de las colonias se midió cada 24 h durante 10 días. Las mediciones se realizaron con la ayuda de un calibrador vernier mecánico.

3.4 Procesamiento estadístico de la información.

Para la tabulación de datos, se efectuó un análisis de varianza simple ANOVA, bajo un diseño experimental completamente al azar DCA, la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey con probabilidades de error de p 0,05. El procesamiento estadístico, fue realizado bajo el software InfoStat, versión 2020.

CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

4.1 Análisis e interpretación de los resultados

En la caracterización morfológica microscópica, se resalta la presencia del micelio del hongo con sus hifas, así como la observación de sus conidióforos y conidiósporas, cuyas características confirman que pertenecen al género *Diaporthe* sp., ver figura 1, datos similares a lo propuesto por Gao et al., (2017).

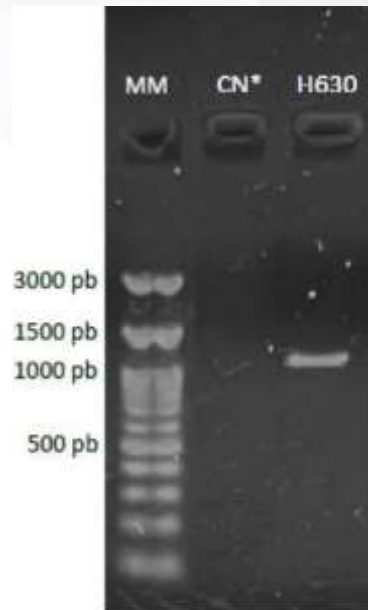
Figura 1. Característica morfológica de *D. longicolla*.



Fuente: Elaboración propia de los autores.

También se efectuó la extracción de ADN, permitió la amplificación a 1200 pares de bases de banda aproximadamente para el marcador EF1- α , ver figura 2. La secuenciación según Sanger reveló que *D. longicolla* (EF1- α) posee un porcentaje de pureza de 98,41% y fue confirmada en la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

Figura 2. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 1%.



Fuente: IDgen-Identificación Molecular (2024).

Como describe Sun et al. (2021) quienes comunicaron el primer reporte de *D. longicolla* en China, provocando manchas foliares en un grupo de plantas medicinales.

En la figura 3 se muestra el crecimiento radial de las colonias Th: *Trichoderma harsianum*; D: *Diaporthe longicolla*; ThC: Control *Trichoderma harzianum*; DC: Control *Diaporthe longicolla*. cada 24 horas durante 10 días.

Figura 3. Crecimiento radial de los hongos *Trichoderma harzianum* & *Diaporthe longicolla*.



Th: *Trichoderma harsianum*; D: *Diaporthe longicolla*; ThC: Control *Trichoderma*

harzianum; DC: Control *Diaporthe longicolla*.

Fuente: Elaboración propia del autor

Analizando la gráfica y la prueba de medias según Tukey con $p < 0,05$ (ver anexo 1) existió diferencias significativas para el Control *Diaporthe longicolla*, alcanzando un crecimiento exponencial hasta los 31,06 mm en promedio. Sin embargo, el crecimiento antagónico entre *Trichoderma harzianum* y *Diaporthe longicolla* fueron a la par alcanzándose a toparse a los 10 días post siembra. Como sostiene López-Valenzuela et al., (2022), los *Trichodermas*, además de ser productoras de ácidos orgánicos y fitohormonas, son potenciales para futuras evaluaciones sobre cultivos agrícolas por el control biológico a enfermedades por su capacidad antagónica contra fitopatógenos.

Se logra observar en la figura 4 el crecimiento radial de las colonias Th: *Trichoderma asperellum*; D: *Diaporthe longicolla*; ThC: Control *Trichoderma asperellum*; DC: Control *Diaporthe longicolla*. cada 24 horas durante 10 días.

Figura 4. Crecimiento radial de los hongos *Trichoderma asperellum* & *Diaporthe longicolla*.



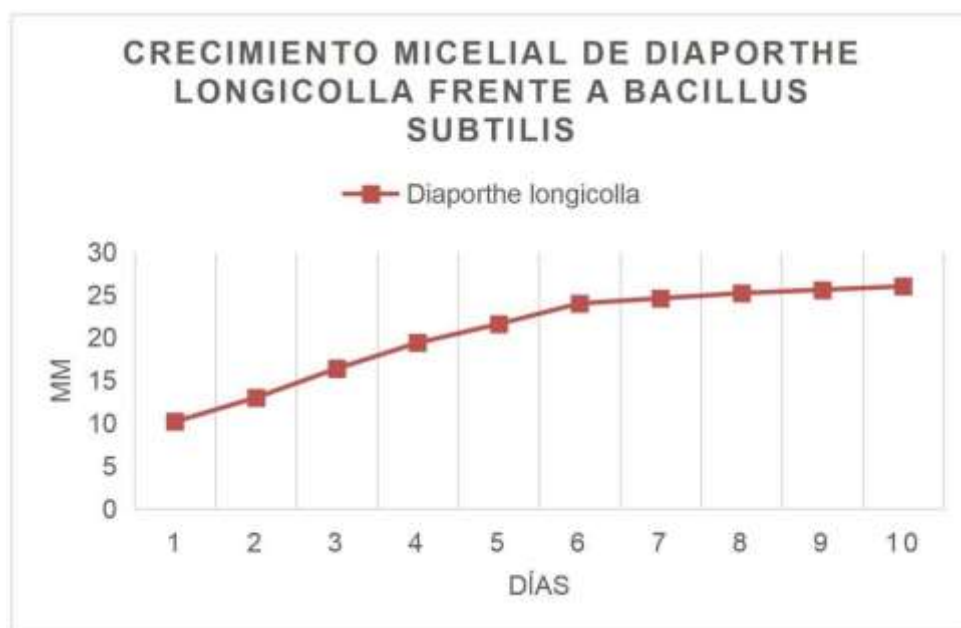
Ta: *Trichoderma asperellum*; D: *Diaporthe longicolla*; TaC: Control *Trichoderma asperellum*; DC: Control *Diaporthe longicolla*.

Fuente: Elaboración propia del autor

Como se figura en la gráfica el Control *Diaporthe longicolla* fue el que mantuvo un mayor crecimiento micelial con respecto a los otros microorganismos, a pesar de esto la prueba de medias según Tukey con $p < 0,05$ (ver anexo 2) no presento diferencias significativas. El crecimiento micelial del antagonismo entre *T. asperellum* y *D. longicolla* fue muy similar hasta los 10 días post siembra en relación a los microorganismos controles. Para Celis-Perera et al (2021), el *T. asperellum* tiene una capacidad de biocontrol al inhibir el crecimiento micelial en, al menos, 60 % en tres de los cinco fitopatógenos.

La figura 5 identifica la longitud del halo de inhibición de la cepa fitopatógena *Diaporthe longicolla* sobre *Bacillus subtilis* cada 24 horas durante 10 días.

Figura 5. Crecimiento radial del micelio del hongo *Diaporthe longicolla* sobre *Bacillus subtilis*.

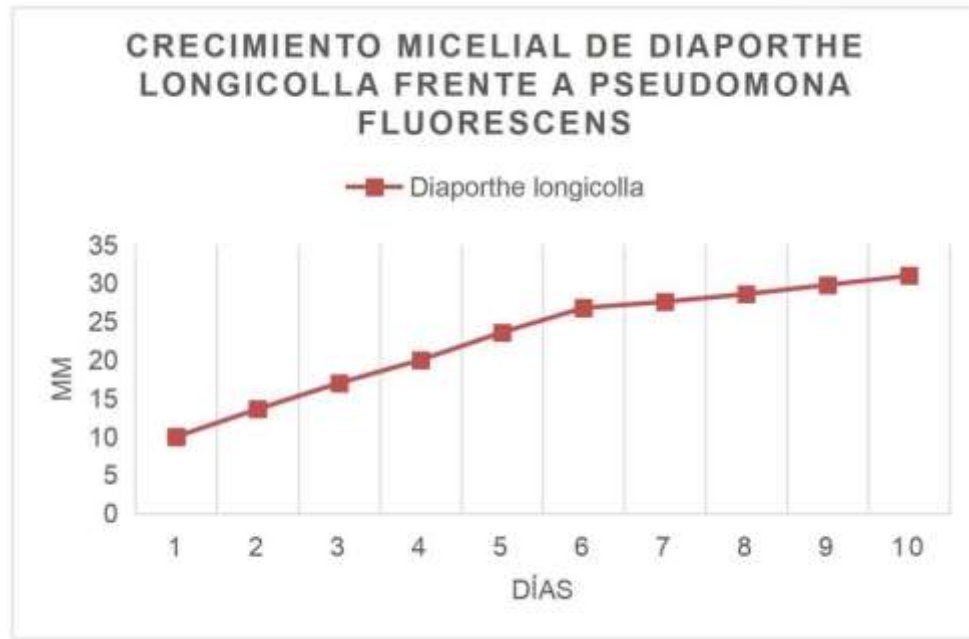


Fuente: Elaboración propia del autor

La grafica indica que el microorganismo *B. subtilis* inicia un proceso inhibitorio sobre la cepa de *D. longicolla* a partir del sexto día impidiendo su desarrollo alrededor de la placa. El efecto biocontrolador y estimulante del *B. subtilis*, sugiere que su aplicación resultaría beneficiosa a los cultivos pudiendo considerarse como estrategia tecnológica para adicionar al momento de la siembra (Illa et al., 2020).

La figura 6 muestra la longitud del halo de inhibición de la cepa fitopatógena *D. longicolla* sobre *P. fluorescens* cada 24 horas durante 10 días.

Figura 6. Crecimiento radial del micelio del hongo *Diaporthe longicolla* sobre *Pseudomonas fluorescens*.



Fuente: Elaboración propia del autor

La figura muestra que no existe un efecto inhibitorio del microorganismo patógeno *D. longicolla* sobre la bacteria *P. fluorescens*, permitiendo expandirse exponencialmente alrededor de la placa hasta los 10 días de evaluación. Afirmaciones de Trujillo et al., (2007) demostró que cepas de *P. fluorescens* producían diferentes tipos de sideróforos, los que podrían estar involucrados en el antagonismo microbiano y en la resistencia sistémica inducida (RSI) en diferentes sistemas planta de la planta.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

En base a los resultados presentados, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

Los resultados de la caracterización morfológica microscópica confirman que las muestras analizadas pertenecen al género *Diaporthe* sp. Esto se basa en la observación del micelio del hongo con sus hifas, así como la presencia de conidióforos y conidiosporas.

La extracción de ADN permitió amplificar una banda de aproximadamente 1200 pares de bases para el marcador EF1- α . La secuenciación reveló que la muestra de *D. longicolla* (EF1- α) tiene un porcentaje de pureza del 98,41% y fue confirmada en la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

Los resultados indican que el Control *Diaporthe longicolla* tuvo un crecimiento superior en ambos experimentos tanto para el antagonismo frente a *T. harziaum* y *T. asperellum*. Además, el crecimiento micelial entre ellos fue similar en ambos casos. Estos hallazgos pueden ser útiles para comprender el comportamiento de los hongos analizados en relación con su crecimiento y la interacción con otros microorganismos.

Se observó un efecto inhibitorio de *Bacillus subtilis* sobre *D. longicolla*, mientras que *Pseudomonas fluorescens* no mostró un efecto inhibitorio significativo. Estos hallazgos pueden tener implicaciones en la comprensión de las interacciones entre diferentes microorganismos en el contexto fitopatológico.

5.2 Recomendaciones

Los resultados indican que la muestra de *D. longicolla* tiene un alto porcentaje de pureza y mostró un crecimiento superior en los experimentos

de antagonismo frente a *T. harziaum* y *T. asperellum*. Esto sugiere que *D. longicolla* podría ser una cepa de preocupación económica para el sector cacaotero ya que posee una alta resistencia frente a macroorganismos antagonistas fitopatógenos. Con excepción del efecto inhibitorio de *Bacillus subtilis* sobre *D. longicolla*, podría ser utilizado como un agente de control biológico.

Estos hallazgos son útiles para comprender el comportamiento de los hongos analizados en relación con su crecimiento y la interacción con otros microorganismos. Esto puede tener implicaciones importantes en la comprensión de las interacciones entre diferentes microorganismos en el contexto fitopatológico tanto a nivel *in vitro* como *in situ*.

Bibliografía

- Acosta, L. T., Azania, D. K., & Azania, R. (2021). Cultivo dual in vitro de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. patógeno de *Passiflora ligularis* Juss. *Revista de Investigación Agropecuaria Science and Biotechnology*, 1(4), 43-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.25127/riagrop.20214.720>
- Alcívar, D. C. C., Vera Macías, L. A., Cedeño Guzmán, W. P., & Vélez Zambrano, S. M. (2023). Inhibición del crecimiento in vitro de *Bacillus* spp sobre hongos asociados al proceso de fermentación en cacao. *Manglar*, 20(3), 233-238. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.57188/manglar.2023.026>
- Alfonso, E. T., Leyva, Á., & Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 47-54. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/498/892>
- Alvarez Hernández, J. C. (2012). Comportamiento agronómico e incidencia de enfermedades en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) injertadas. *Acta Agronómica*, 61(2), 117-125. <https://biblat.unam.mx/hevila/Actaagronomica/2012/vol61/no2/4.pdf>
- Anzules Toala, V., Pazmiño Bonilla, E., Alvarado-Huamán, L., Borjas-Ventura, R., Julca-Vera, N., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2022). Incidencia de "cherelle wilt" y enfermedades fungosas en mazorcas de cacao 'CCN-51' en Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. *Idesia (Arica)*, 40(1), 31-37. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292022000100031>
- AnzulesToala, V., Borjas Ventura, R., Alvarado Huamán, L., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2019). Control cultural, biológico y químico de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* spp en *Theobroma cacao* 'CCN-51.' *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 511-520. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.08>
- Camelino, S., de Elías, M., Hernández, T. G., Graffigna, J. C., Ortiz, J., Kovolinski, C., Kokic, M., Reiner, M., Vargas, L., & Minchiotti, M. (2023). ANÁLISIS DE UN POTENCIAL MECANISMO DE ACCIÓN DE TRICHODERMA SPP. DURANTE SU COMPORTAMIENTO COMO AGENTE BIOCONTROLADOR. *Nexo*

Agropecuario, 11(2), 61-64.

<https://revistas.unc.edu.ar/index.php/nexoagro/article/view/42992>

Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31.

Carmona, M., & Sautua, F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía & Ambiente*, 37(1). <http://agronomiayambiente.agro.uba.ar/index.php/AyA/article/view/60/59>

Carranza, R. C., & Salinas, J. V. C. (2024). La resistencia bacteriana, una larga historia y un reto moderno. *Revista de Educación Bioquímica*, 42(4), 182-186. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2023/reb234a.pdf>

Castillo-Arévalo, T. (2022). Alternativas biológicas y químicas para el manejo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en cultivo de plátano (*Musa paradisiaca* L.) en Rivas, Nicaragua. *Ciencia e Interculturalidad*, 31(02), 153-165. <https://doi.org/https://doi.org/10.5377/rci.v31i02.15188>

Castro-Barquero, L., & González-Acuña, J. (2021). Factores relacionados con la activación líquida de microorganismos de montaña (MM). *Agronomía Costarricense*, 45(1), 81-92. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242021000100081&script=sci_arttext

Cedeño Moreira, Á. V., Romero Meza, R. F., Auhing Arcos, J. A., Mendoza León, A. F., Abasolo Pacheco, F., & Canchignia Martínez, H. F. (2020). Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51. *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 503-512. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.05>

Celis-Perera, S. E., Moo-Koh, F. A., Reyes-Ramirez, A., Suárez, J. M. T., & Cristóbal-Alejo, J. (2021). Antagonismo in vitro de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (Ta13-17) contra hongos patógenos de *Solanum lycopersicum* L. *Revista de Protección Vegetal*, 36(3). <https://eqrcode.co/a/l96hul>

Chávez, J. P. A., Romero, E. J. C., Sabando, K. D. C., & Ramos, V. E. P. (2024).

Buenas Prácticas Agrícolas (GAPS) en el Cultivo de Cacao (*Theobroma cacao*) Injerto en la Parroquia Luz de América. *Revista Social Fronteriza*, 4(Especial), e4-Especial. [https://doi.org/https://doi.org/10.59814/resofro.2024.4\(Especial\)152](https://doi.org/https://doi.org/10.59814/resofro.2024.4(Especial)152)

Chirinos, D., Castro, R., Cun, J., Castro, J., Peñarrieta Bravo, S., Solis, L., & Geraud-Pouey, F. (2020). Los insecticidas y el control de plagas agrícolas: la magnitud de su uso en cultivos de algunas provincias de Ecuador. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(1), 84-99.

https://doi.org/https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1276

Corrales-Ramírez MSc, L. C., Caycedo-Lozano, L., Gómez-Méndez, M. A., Ramos-Rojas, S. J., & Rodríguez-Torres, J. N. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27), 46-65.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702017000100046&script=sci_arttext

Cruz-Cárdenas, C. I., Zelaya Molina, L. X., Sandoval Cancino, G., Santos Villalobos, S. de los, Rojas Anaya, E., Chávez Díaz, I. F., & Ruíz Ramírez, S. (2021). Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: consideraciones y retos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(5), 899-913. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2905>

Ferrer Wurs, F. (2021). Control biológico de plagas agrícolas en Venezuela: los logros históricos de la empresa Servicio Biológico (SERVBIO). *Revista de Ciencias Ambientales*, 55(1), 327-344.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15359/rca.55-1.16>

Freire, O. M. T., Cantos, I. A. S., Mendoza, T. de J. C., Zamora, G. A. R., Avellán, L. F. P., & Flores, F. G. Z. (2017). Selección de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con resistencia a escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en Los Ríos, Ecuador. *Revista Ciencia y Tecnología*, 10(1), 17-26.

[file:///C:/Users/Administrator/Downloads/Dialnet-](file:///C:/Users/Administrator/Downloads/Dialnet-SeleccionDeGenotiposDeCacaoTheobromaCacaoLConResis-6261803.pdf)

[SeleccionDeGenotiposDeCacaoTheobromaCacaoLConResis-6261803.pdf](file:///C:/Users/Administrator/Downloads/Dialnet-SeleccionDeGenotiposDeCacaoTheobromaCacaoLConResis-6261803.pdf)

Gao, Y., Liu, F., Duan, W., Crous, P. W., & Cai, L. (2017). *Diaporthe* is paraphyletic. *IMA Fungus*, 8, 153-187.

<https://doi.org/https://doi.org/10.5598/ima fungus.2017.08.01.11>

- Gerrero, R., Risco, G., Cevallos, O., Villamar, R., Peñaherrera, S. (2020). Extractos vegetales: una alternativa para el control de enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*). *Ingeniería E Innovación*, 8(1).
<https://doi.org/https://doi.org/10.21897/23460466.2326>
- Guamán, M., Aguilar, E. J., & Morales, J. F. B. (2022). Control biológico de la mazorca negra (*Phytophthora Palmivora* L.) En el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 5(3), 13.
<https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/539/549>
- Guédez, C., Cañizález, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 34-38. https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562009000100007&script=sci_arttext
- Guerrero, R., Cevallos, O., Eguez, E., & Peñaherrera, S. (2020). El potencial del uso de microorganismos endofíticos como agentes de control de enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Centrosur Agraria*, 1-18.
<https://doi.org/https://doi.org/10.37959/cs.v1i7.33>
- Guzmán Duchén, D., & Montero Torres, J. (2021). Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(2), 87-101.
<https://doi.org/https://doi.org/10.53287/uyxf4027gf99e>
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 66-74. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092007000100009&script=sci_arttext
- Illa, C., Torassa, M., Pérez, M. A., & Pérez, A. A. (2020). Efecto de biocontrol y promoción del crecimiento en maní por *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 119-131.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción

de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext

Jaizme-Vega, M. del C., & Rodríguez-Romero, A. S. (2008). Integración de microorganismos benéficos (Hongos micorrícicos y bacterias izosféricas) en agrosistemas de las Islas Canarias. *Agroecología*, Vol 3,(2008). <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/23826/1/95491-384891-1-PB.pdf>

Khan, R. A. A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., & Li, Y. (2020). Bioactive secondary metabolites from Trichoderma spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms*, 8(6), 817. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>

Llanes-Alvarez, Y., Hernández-Rodríguez, L., & Peña-Bárcaga, I. (2017). La validación de métodos de diagnóstico como herramienta en los programas de vigilancia y manejo de fitopatógenos. *CitriFrut*, 34(1), 46-54. https://www.researchgate.net/profile/Lester-Hernandez-Rodriguez/publication/326464566_LA_VALIDACION_DE_METODOS_DE_DIAGNOSTICO_COMO_HERRAMIENTA_EN_LOS_PROGRAMAS_DE_VIGILANCIA_Y_MANEJO_DE_FITOPATOGENOS_Validation_of_diagnostic_methods_as_a_tool_in_the_surve

López-Barrera, G. L. (2021). Análisis molecular de hongos antagonistas aislados de plantaciones de cacao (Theobroma cacao) de Norte de Santander. *Ingeniería y Competitividad*, 23(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.25100/iyc.v23i2.11154>

López-Bautista, V., Mora-Aguilera, G., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Mendoza-Ramos, C., Martínez-Bustamante, V. I., Coria-Contreras, J. J., Acevedo-Sánchez, G., & Santana-Peñaloza, B. (2020). Caracterización morfológica y molecular de Fusarium spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en Agave tequilana. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(1), 79-106. <https://doi.org/https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-4>

López Medina, S. E., & Gil Rivero, A. E. (2017). Características germinativas de semillas de Theobroma cacao L.(Malvaceae)" cacao". *Arnaldoa*, 24(2), 609-618. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.242.24212>

- López-Valenzuela, B., Tzintzun-Camacho, O., Armenta-Bojórquez, A., Valenzuela-Escoboza, F., Lizárraga-Sánchez, G., Ruelas-Islas, J., & González-Mendoza, D. (2022). Microorganisms of genus *Trichoderma* as phytohormone promoters and pathogen suppressors. *Bioagro*, 34(2), 163-172.
<https://doi.org/10.51372/bioagro342.6>
- Marrero, M. A., Agaras, B., Wall, L. G., & Valverde, C. (2015). Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas* spp. en el rizoplano de distintas especies cultivadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 132-137.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.007>
- Martínez-Reina, A. M., Tordecilla-Zumaqué, L., Ballesteros-Leal, H. A., del Valle Rodríguez-Pinto, M., Grandett-Martínez, L. M., & Díaz-Cabadías, A. (2023). Determinantes para el manejo de enfermedades en cacao (*Theobroma cacao* L.) en el sur de Córdoba, Colombia. *Ciencia y Agricultura*, 20(2), 15834.
<https://doi.org/https://doi.org/10.19053/01228420.v20.n2.2023.15834>
- Martínez-Salvador, L. E., & Flores Pacheco, M. V. (2022). Modelos de gobernanza en las denominaciones de origen para el desarrollo territorial. Aproximaciones desde el caso del cacao en América Latina. *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 32(60).
<https://doi.org/https://doi.org/10.24836/es.v32i60.1261>
- Meléndez-Jácome, M. R., Flor-Romero, L. E., Sandoval-Pacheco, M. E., Vasquez-Castillo, W. A., & Racines-Oliva, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Características cariotípicas y filogenéticas, composición nutricional, condiciones edafoclimáticas, factores bióticos y microorganismos benéficos en la rizosfera. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 109-120.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.013>
- Melgoza, J. J. C., García-Saucedo, P. A., Aguirre-Paleo, S., Vargas-Sandoval, M., Guzmán-de Casa, A., & del Carmen Ávila-Val, T. (2024). Microorganismos antagonistas como manejo del marchitamiento de la zarzamora por *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 15(3), e3655-e3655.
<https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v15i3.3655>
- Mena, E., Stewart, S., Montesano, M., & Ponce de León, I. (2024). Current

understanding of the Diaporthe/Phomopsis complex causing soybean stem canker: A focus on molecular aspects of the interaction. *Plant Pathology*, 73(1), 31-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppa.13803>

Montoya, M. R. A., Massa, G. A., Colabelli, M. N., & del Carmen Ridaio, A. (2021). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of *Diaporthe caulivora*. *Journal of Microbiological Methods*, 184, 106197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106197>

Mora, F. C., Flores, P. M., Villalva, J. G., & Almeida, I. P. (2024). Eficiencia de agentes antagónicos para el control de *moniliophthora roreri* en el cultivo de cacao. *Magazine de Las Ciencias: Revista de Investigación e Innovación*, 9(2), 16-29. <https://doi.org/https://doi.org/10.33262/rmc.v9i2.3100>

Mora, M. C., De Castro, I. A., & Pedraza, M. C. E. (2023). Evaluación de técnicas para el control biológico en cultivos agrícolas del municipio de Monterrey-Casanare, Colombia. *Revista EIA*, 20(39), 3912-pp. <https://doi.org/https://doi.org/10.24050/reia.v20i39.1621>

Muñoz, D. A. F., & López, D. S. D. (2022). Método de fermentación y secado para el beneficio de la obtención del chocolate blanco a partir del cacao criollo (*Theobroma cacao* L.), ecuatoriano. *Universidad y Sociedad*, 14(S2), 323-329. <https://rus.ucf.edu.cu/index.php/rus/article/view/2788/2750>

Paredes-Escalante, J. E., Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Allende-Molar, R., Sañudo-Barajas, J. A., & Valdez-Torres, J. B. (2009). Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 27-35. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092009000100004&script=sci_arttext

Patiño, M., Nieto-Ramirez, I. J., Chegwin-Angarita, C., & Torres-Rojas, E. (2020). Actividad biocontroladora in vitro de macrohongos contra diferentes hongos fitopatógenos. *Acta Biológica Colombiana*, 25(2), 265-279. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/abc.v25n2.75303>

Pilaloo David, W., Pérez Vaca, D., Alvarado Aguayo, A., & Torres Sánchez, Si.

- (2021). Manejo agroecológico de la Moniliasis en el cultivo de cacao (Theobroma cacao) mediante la utilización de biofungicidas y podas fitosanitarias en el cantón La Troncal. *Alfa Revista de Investigación En Ciencias Agronómicas y Veterinaria*, 5(15), 70-85.
<https://doi.org/https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v5i15.129>
- Polanco, E. R., Alferes, E. B. P., Fuquene, P. A. B., Amaya, J. D. S., & Polanco, L. A. R. (2020). Manejo de la pudrición parda de la mazorca (Phytophthora palmivora) en cacao por aplicación conjunta de prácticas culturales y químicas. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 16(1), 79-94.
<https://doi.org/https://doi.org/10.18359/rfcb.4887>
- Ramos-Ramos, T. P., Guevara-Llerena, D. J., Sarduy-Pereira, L. B., & Diéguez-Santana, K. (2020). Producción más limpia y ecoeficiencia en el procesado del cacao: Un caso de estudio en Ecuador. *Investigación & Desarrollo*, 20(1), 135-146. <https://doi.org/10.23881/idupbo.020.1-10i>
- Reinaldo, J. R. M. (2020). Microorganismos eficientes y su empleo en la protección fitosanitaria de los cultivos. *Revista Científica Agroecosistemas*, 8(2), 102-109.
<https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/407>
- Ricaño-Rodríguez, J. (2018). El estudio genómico del cacao (Theobroma cacao L.); breve recopilación de sus bases conceptuales. *Agro Productividad*, 11(9).
file:///C:/Users/Administrator/Downloads/valeria_sias,+con-5.pdf
- Ríos-Moyano, D. K., Rodríguez-Cruz, F. A., Salazar-Peña, J. A., & Ramírez-Godoy, A. (2023). Factores asociados a la polinización del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.). *Agronomía Mesoamericana*, 34(3).
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15517/am.2023.52280>
- Rivera-Méndez, W. (2016). Control microbiológico como experiencia de sostenibilidad local en la agricultura centroamericana. *Revista Tecnología En Marcha*, 29, 31-40. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18845/tm.v29i7.2703>
- Samaniego-Gámez, B. Y., Reyes-Ramírez, A., Moreno-Valenzuela, O. A., & Tun-Suárez, J. M. (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria Bacillus spp. *Revista de Protección Vegetal*, 32(1), 10-22. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010->

27522017000100002&script=sci_arttext&tlng=pt

- Sánchez, M. C., Ridao, A. del C., & Colavita, M. L. (2015). Diaporthe caulivora: agente causal de cancro del tallo predominante en cultivos de soja del sudeste bonaerense. *Fave. Sección Ciencias Agrarias*, 14(2), 0. <http://www.scielo.org.ar/pdf/fave/v14n2/v14n2a12.pdf>
- Serrato-Díaz, L. M., Ayala-Silva, T., & Goenaga, R. (2022). First report of Diaporthe tulliensis and D. pseudomangiferae causing cacao pod rot in Puerto Rico. *Plant Disease*, 106(9), 2530. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-12-21-2634-PDN>
- Soto, F., Tramón, C., Aqueveque, P., & de Bruijn, J. (2018). Microorganismos antagonistas que inhiben el desarrollo de patógenos en post-cosecha de limones (Citrus limon L.). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 34(2), 173-184. <http://repositorio.uppuebla.edu.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/166/art5VP2015-2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Suárez Contreras, L. Y., & Rangel Riaño, A. L. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de Moniliophthora roreri. *Acta Agronómica*, 62(4), 370-378. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28122013000400011&script=sci_arttext
- Sun, X.-D., Cai, X.-L., Pang, Q.-Q., Zhou, M., Zang, W., Chen, Y.-S., & Bian, Q. (2021). First report of Diaporthe longicolla causing leaf spot on Kalanchoe pinnata in China. *Plant Disease*, 105(11), 3739. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/pdis-12-20-2681-pdn>
- Tena, A. R., Enríquez, G. R., Pérez, L. L., Martínez, Z. E., & Aguilar, E. E. Q. (2015). Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Vol. 16, No. 11*. <https://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/>
- Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., & Heydrich, M. (2007). Antagonismo de cepas de Pseudomonas fluorescens y Burkholderia cepacia contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Revista de Protección Vegetal*, 22(1), 41-46.
- Vargas-Hoyos, H. A., & Gilchrist-Ramelli, E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de Trichoderma asperellum sobre dos cepas

de Fusarium aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología*, 42, 9-16.

<http://repositorio.uppuebla.edu.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/166/art5VP2015-2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Vega-Torres, M. G., Ruiz-Cisneros, M. F., Pérez-Corral, D. A., Berlanga-Reyes, D. I., Ornelas-Paz, J. J., Rios-Velasco, C., Cambero-Campos, O. J., Estrada-Virgen, M. O., Luna-Esquivel, G., & Denise-Revérchon, F. L. (2019). Actividad antifúngica in vitro de microorganismos antagonistas contra *Fusarium oxysporum* de rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 37, 57-64. <https://rmf.smf.org.mx/Vol3712019E/RMF1904-3.pdf>

Villa, M. A. G., Aguilar, E. E. J., & Morales, J. F. B. (2022). Control biológico de la mazorca negra (*Phytophthora Palmivora* L.) En el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 5(3), 149-154. <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/539/549>

Vinchira-Villarraga, D. M., & Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 2-5. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.80860>

Anexos

Anexo 1. Tabla de ANOVA para *Trichoderma harsianum* & *Diaporthe longicolla*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Crecimiento micelial ThxD	20	0,79	0,67	7,47	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	177,83	7	25,40	6,40	0,0027
Tratamiento	160,00	3	53,33	13,44	0,0004
Repeticion	17,83	4	4,46	1,12	0,3910
Error	47,64	12	3,97		
Total	225,46	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,74109

Error: 3,9696 gl: 12

Tratamiento	Medias	n	E.E.
T2	23,45	5	0,89 A
T1	25,18	5	0,89 A
T3	27,05	5	0,89 A
T4	31,06	5	0,89 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

T1: *Trichoderma harsianum*; T2: *Diaporthe longicolla*; T3: Control *Trichoderma harsianum*; T4: Control *Diaporthe longicolla*.

Anexo 2. Tabla de ANOVA para *Trichoderma asperellum* & *Diaporthe longicolla*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Crecimiento micelial TaxD	20	0,47	0,16	17,54	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	279,98	7	40,00	1,52	0,2508
Tratamiento	88,99	3	29,66	1,13	0,3777
Repeticion	190,99	4	47,75	1,81	0,1915
Error	316,35	12	26,36		
Total	596,33	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,64088

Error: 26,3622 gl: 12

Tratamiento	Medias	n	E.E.
T2	26,10	5	2,30 A
T1	28,62	5	2,30 A
T4	31,10	5	2,30 A
T3	31,26	5	2,30 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

T1: *Trichoderma asperellum*; T2: *Diaporthe longicolla*; T3: Control *Trichoderma asperellum*; T4: Control *Diaporthe longicolla*.

Anexo 3. Antagonismo entre *Trichoderma asperellum* & *Diaporthe longicolla*



Anexo 4. Antagonismo entre *Trichoderma harsianum* & *Diaporthe longicolla*



Anexo 5. Inhibición de *Diaporthe longicolla* & *Pseudomona fluorescens*



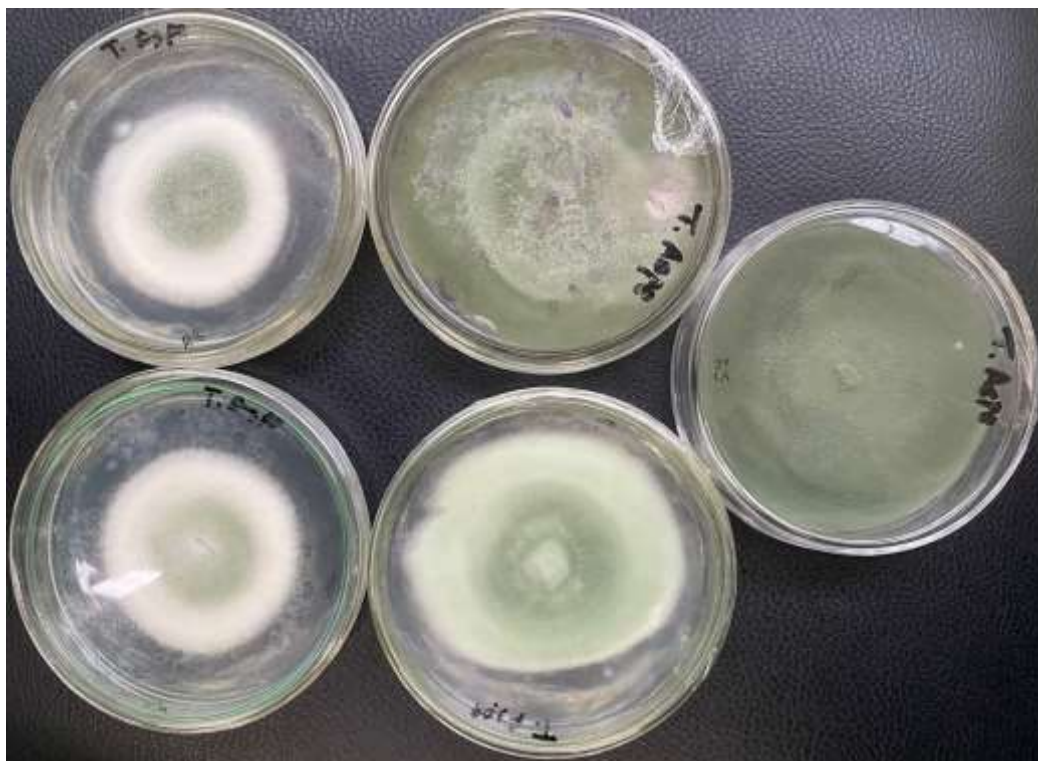
Anexo 6. Inhibición de *Diaporthe longicolla* & *Bacillus subtilis*



Anexo 7. Control de *Trichoderma harsianum*



Anexo 8. Control de *Trichoderma asperellum*



Anexo 9. Control de *Diaporthe longicolla*



Anexo 10. Control de *Bacillus subtilis*



Anexo 11. Control de *Pseudomona fluorescens*



UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

