

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

ESTUDIO IN VITRO DE MICROORGANISMOS CARACTERIZADOS
DESDE EL AISLAMIENTO DE FRUTOS DE CACAO COMO
POTENCIALES ANTAGONISTAS DE *Moniliophthora roreri* H.C.Evans

Autor:

PABLO ISRAEL ALVAREZ ROMERO
JUAN JOSÉ VÁZQUEZ GUILLÉN

Director:

Ing. Luis Cagua Montaña, MSc.

Milagro, 2024

Derechos de autor

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

Nosotros, **PABLO ISRAEL ALVAREZ ROMERO Y JUAN JOSÉ VÁZQUEZ GUILLÉN** 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 mi Grado, de Magister en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación de **Impacto económico y social de la aplicación de tecnología biotecnológicas agrícolas en el marco de la soberanía alimentaria** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

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

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de 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, 01 de mayo de 2024



Firmado electrónicamente por:
**PABLO ISRAEL
ALVAREZ ROMERO**

Pablo Israel Álvarez Romero

0601810005



Firmado electrónicamente por:
**JUAN JOSE VAZQUEZ
GUILLEN**

Juan José Vázquez Guillén

0104053863

//

Aprobación del tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Luis Eduardo Cagua Montaña** en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Pablo Israel Álvarez Romero y Juan José Vázquez Guillén**, cuyo tema es **ESTUDIO IN VITRO DE MICROORGANISMOS CARACTERIZADOS DESDE EL AISLAMIENTO DE FRUTOS DE CACAO COMO POTENCIALES ANTAGONISTAS DE *Moniliophthora roreri* H.C.Evans**, que aporta a la Línea de Investigación **Impacto económico y social de la aplicación de tecnología biotecnológicas agrícolas en el marco de la soberanía alimentaria**, 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, 01 de mayo de 2024



Luis Eduardo Cagua Montaña

0924773559

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. ALVAREZ ROMERO PABLO ISRAEL**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "ESTUDIO IN VITRO DE MICROORGANISMOS CARACTERIZADOS DESDE EL AISLAMIENTO DE FRUTOS DE CACAO COMO POTENCIALES ANTAGONISTAS DE MONILIOPTHORA RORERI H.C.EVANS", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.00
SUSTENTACIÓN	39.50
PROMEDIO	98.50
EQUIVALENTE	Excelente



Munabmm SARANGO ORTEGA YESSENIA BEATRIZ
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Mgs VERA RODRIGUEZ JOSE HUMBERTO
VOCAL



Msc GARCÉS MONCAYO MARÍA FERNANDA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. VAZQUEZ GUILLEN JUAN JOSE**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "ESTUDIO IN VITRO DE MICROORGANISMOS CARACTERIZADOS DESDE EL AISLAMIENTO DE FRUTOS DE CACAO COMO POTENCIALES ANTAGONISTAS DE MONILIOPTHORA RORERI H.C.EVANS", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.00
SUSTENTACIÓN	38.67
PROMEDIO	97.67
EQUIVALENTE	Excelente



Munabmm SARANGO ORTEGA YESSENIA BEATRIZ
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Mgs VERA RODRIGUEZ JOSE HUMBERTO
VOCAL



Msc GARCÉS MONCAYO MARÍA FERNANDA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

Este trabajo, se lo dedico a mis padres, quienes han sido mi fuente inagotable de apoyo, inspiración y amor incondicional a lo largo de este viaje académico. Agradezco profundamente su sacrificio y dedicación para brindarme las oportunidades que hoy se reflejan en esta tesis. A mis amigos y seres queridos, quienes han compartido conmigo momentos de alegría y desafíos durante este camino. Su aliento y compañía han sido fundamentales para superar obstáculos y celebrar logros.

Finalmente, dedico este trabajo a todas aquellas personas que, de una u otra manera, contribuyeron a mi desarrollo como estudiante y como individuo. Este logro no solo es mío, sino de aquellos que creyeron en mí y me impulsaron a alcanzar mis metas. Gracias a todos por ser parte de este capítulo significativo en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la culminación de esta tesis. En primer lugar, quiero destacar y agradecer el invaluable apoyo brindado por mi tutor de tesis, Luis Cagua, cuya orientación, paciencia y conocimiento fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Su guía constante y dedicación fueron una inspiración a lo largo de todo el proceso.

Asimismo, deseo agradecer a la Universidad Politécnica del Chimborazo por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto. El respaldo académico y administrativo proporcionado por la universidad fue crucial para superar los desafíos y llevar a cabo la investigación de manera efectiva. Además, quiero reconocer y agradecer el acceso a los laboratorios, insumos y otros recursos que la universidad puso a mi disposición, los cuales fueron esenciales para llevar a cabo experimentos y obtener resultados significativos.

Agradezco sinceramente a todos los profesores, compañeros de clase y personal administrativo que contribuyeron de diversas maneras a mi formación y al desarrollo de esta tesis. Este logro no habría sido posible sin el respaldo de la comunidad universitaria.

En resumen, mi más profundo agradecimiento a mi tutor, a la Universidad Politécnica del Chimborazo y a todas las personas que de alguna manera colaboraron en este proyecto. Este trabajo es el resultado del esfuerzo colectivo y del apoyo brindado, y estoy agradecido por la oportunidad de aprender y crecer académicamente en este entorno.

Resumen

La investigación explora la interacción entre *Moniliophthora roreri* y microorganismos antagonistas en la Moniliasis del cacao. Se enfoca en comprender la diversidad microbiana asociada al cacao y su potencial contra *M. roreri*. Se plantea la pregunta: ¿Cuál es el potencial antagonista de microorganismos aislados de frutos de cacao frente a *M. roreri* y cómo utilizarlo para desarrollar estrategias de control biológico? La metodología incluyó la recolección de frutos, aislamiento de microorganismos, pruebas in vitro y caracterización molecular. Se encontró una variabilidad sorprendente en la diversidad de hongos y bacterias, destacando *Penicillium* (27,8%) y *Bacillus* (61,1%) como los más importantes, con ciertos microorganismos mostrando alto potencial inhibitorio. *Trichoderma harzianum* cepa TH2 mostró 45,2% de inhibición, mientras que la cepa B40 de *Mammaliicoccus* obtuvo 30,66%. La caracterización molecular reveló patrones genéticos específicos en los hongos asociados a la Moniliasis. En cuanto a sensibilidad in vitro, el difenoconazol mostró valores DE50 entre 0,046-0,92 µg/mL. La investigación destaca la importancia de ciertos microorganismos como agentes antagónicos en el cultivo del cacao y sugiere optimizar condiciones de cultivo para favorecer su presencia, además de proponer futuras líneas de investigación, como el estudio de genes de resistencia y estrategias de manejo integrado para controlar la Moniliasis.

Diversidad microbiana, efecto antagónico, control biológico

Abstract

The research explores the interaction between *Moniliophthora roreri* and antagonistic microorganisms in cocoa Moniliasis. It focuses on understanding the microbial diversity associated with cocoa and its potential against *M. roreri*. The key research question is: What is the antagonistic potential of microorganisms isolated from cocoa fruits against *M. roreri*, and how can this knowledge be used to develop biological control strategies? The methodology included the collection of fruits, isolation of microorganisms, in vitro testing, and molecular characterization. A surprising variability was found in the diversity of fungi and bacteria, highlighting *Penicillium* (27.8%) and *Bacillus* (61.1%) as the most significant, with certain microorganisms showing high inhibitory potential. *Trichoderma harzianum* strain TH2 showed 45.2% inhibition, while the B40 strain of *Mammaliococcus* achieved 30.66% inhibition. Molecular characterization revealed specific genetic patterns in the fungi associated with Moniliasis. Regarding in vitro sensitivity, difenoconazole showed DE50 values ranging from 0.046-0.92 µg/mL. The research underscores the importance of certain microorganisms as antagonistic agents in cocoa cultivation and suggests optimizing cultivation conditions to promote their presence, as well as proposing future research lines, such as the study of resistance genes and integrated management strategies to control Moniliasis.

microbial diversity, antagonistic effects, and biological control.

Lista de Figuras

Figura 1 Mapa de la zona de estudio.....	12
Figura 2 Composición del PIB de la provincia de Orellana en el año 2016 (%).....	13
Figura 3 Principales países productores de cacao (miles de toneladas).....	14
Figura 4 Abundancia relativa a nivel de género de hongos aislados de frutos de <i>T. cacao</i> en la provincia de Orellana	43
Figura 5 Abundancia a nivel de clase de microorganismos fúngicos aislados de frutas de <i>T. cacao</i> en la provincia de Orellana	44
Figura 6 Abundancia relativa a nivel de orden de microorganismos fúngicos aislados de frutos de <i>T. cacao</i> en la provincia de Orellana	45
Figura 7 Abundancia relativa a nivel de familia de microorganismos fúngicos aislados de frutos de <i>T. cacao</i> en la provincia de Orellana	47
Figura 8 Riqueza de microorganismos fúngicos aislados de frutos de <i>T. cacao</i> en la provincia de Orellana.....	48
Figura 9 Índices de diversidad de microorganismos fúngicos aislados de frutas de <i>T. cacao</i> en la provincia de Orellana	49
Figura 10 Prueba de Tukey al 5 % para el porcentaje de inhibición de las distintas cepas de <i>Trichoderma</i> sp. frente a <i>Moniliophthora roreri</i>	53
Figura 11 Prueba de Tukey al 5 % para el porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> sp. frente a 21 cepas de <i>M. roreri</i>	54
Figura 12 Cultivos duales de las mejores especies de <i>Trichoderma</i> sp.....	55
Figura 13 Especies de <i>Trichoderma</i> sp. y sus niveles de micoparasitismo según la escala de Bell.....	57
Figura 14 Porcentaje de inhibición de las cepas de <i>M. roreri</i>	58
Figura 15 Porcentaje de inhibición de las distintas cepas de bacterias asociadas a los frutos de <i>T. cacao</i> de la provincia de Orellana a <i>M. roreri</i>	59
Figura 16 Antagonismo en medio KADO 523 (A) y medio V8 modificado (B)	60
Figura 17 Porcentaje de inhibición de acuerdo con el medio KADO 523 y V8 modificado	60
Figura 18 Interacción con mayor porcentaje de inhibición del factor A (Cepa de <i>M. roreri</i>) por el factor B (cepa de bacteria	61
Figura 19 Interacción con menor porcentaje inhibición del factor A (Cepas de <i>M. roreri</i>) por el factor B (cepas de bacterias).	62

Figura 20 Interacción con mayor porcentaje de inhibición del factor A (Cepa de <i>M. roreri</i>) por el factor C (Medio de cultivo)	64
Figura 21 Interacción con menor porcentaje de inhibición del factor A (Cepa de <i>M. roreri</i>) por el factor C (Medio de cultivo).....	65
Figura 22 Interacción con mayor porcentaje de inhibición del factor B (Bacteria) por el factor C (Medio de cultivo)	67
Figura 23 Interacción con menor porcentaje de inhibición del factor B (Bacteria) por el factor C (Medio de cultivo)	67
Figura 24 Interacción con mayor porcentaje de inhibición del factor A (cepa de <i>M. roreri</i>) por el factor B (cepa de bacteria) y por el factor C (Medio de cultivo).	69
Figura 25 Interacción con menor porcentaje de inhibición del factor A (cepa de <i>M. roreri</i>) por el factor B (cepa de bacteria) y por el factor C (Medio de cultivo).	69
Figura 26Árbol filogenético generado con las secuencias de <i>M.roreri</i> analizadas en el estudio.....	74
Figura 27 Frecuencia de los aislados de <i>M. roreri</i> en diferentes clases de valores de DE50 estimados para productos de diferentes modos de acción.....	76

Lista de Tablas

Tabla 1 Principales países productores de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) a nivel internacional.....	17
Tabla 2 Clasificación taxonómica del cacao.....	19
Tabla 3 Morfología y descripción de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	20
Tabla 4 Clasificación taxonómica de <i>Moniliophthora roreri</i>	23
Tabla 5 Ubicación geográfica de las tres localidades de estudio de la Provincia de Orellana	29
Tabla 6 Escala de evaluación de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> sp.....	34
Tabla 7 Cepas de <i>Moniliophthora roreri</i> utilizadas en el estudio.....	35
Tabla 8 Cepas de bacterias utilizadas en el estudio	35
Tabla 9 Descripción de las cepas de <i>M. roreri</i> usados en el presente estudio.....	38
Tabla 10 Escala de sensibilidad propuesta por Gudmestad et al.,(2013)	40
Tabla 11 Escala de sensibilidad propuesta por Liu	40
Tabla 12 Aislados fúngicos de frutos de <i>T. cacao</i> de la provincia de Orellana	41
Tabla 13 Identificación molecular mediante análisis BLASTn de las cepas de bacterias obtenidas de frutos de <i>T. cacao</i> en la provincia de Orellana.....	50
Tabla 14 Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> sp. frente <i>Moniliophthora roreri</i>	53
Tabla 15 Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de bacterias vs <i>M. roreri</i>	57
Tabla 16 Análisis BLASTn de las secuencias obtenidas de los aislados <i>M.roreri</i> de la provincia de Orellana.....	73
Tabla 17 Valores de DE50 de cuatro principios activos de 23 aislados de <i>M. roreri</i> obtenidos de la provincia de Orellana	77

Índice / Sumario

<i>Derechos de autor</i>	II
<i>Aprobación del director del Trabajo de Titulación</i>	III
<i>Aprobación del tribunal calificador</i>	IV
<i>DEDICATORIA</i>	V
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	VI
<i>Resumen</i>	VIII
<i>Abstract</i>	IX
<i>Introducción</i>	1
<i>Capítulo I: El problema de la investigación</i>	3
<i>CAPÍTULO II: Marco teórico referencial</i>	12
2.2.1 Cacao (<i>Teobroma cacao</i> L.).....	16
2.2.1.1 Origen	16
2.2.1.2. Principales países productores de cacao.....	16
2.2.1.3. Principales variedades de cacao en el Ecuador.....	17
2.2.1.4 Clasificación taxonómica.....	19
2.2.1.5. Morfología de la planta	20
2.2.1.6 Principales enfermedades	21
2.2.2 <i>Moniliphthora roreri</i> H.C Evans.....	22
2.2.3 Taxonomía.....	23
2.2.4 Ciclo biológico	23
2.2.5 Síntomas y daños.....	24
2.2.6 Especies afectadas	24
2.2.7 Manejo integrado en el control de enfermedades del Cacao	25
2.2.7.3.1 Bacterias como agente de control biológico	26
2.2.7.3.2 Hongos como agentes de control biológico	27
<i>CAPÍTULO III: Diseño metodológico</i>	28
3.1 Tipo y diseño de investigación.....	28

3.2	La población y la muestra.....	29
3.2.1	Características de la población	29
3.2.2	Delimitación de la población	29
3.2.3	Tipo de muestra.....	30
3.2.4	Tamaño de la muestra.....	30
3.2.5	Proceso de selección de la muestra.....	30
3.3	Los métodos y las técnicas	31
CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados		41
4.1	Análisis de los resultados	41
4.1.1	Comparar la diversidad de hongos y bacterias aisladas de frutos de cacao	41
4.1.1.1	Diversidad fúngica asociada a frutos de <i>T. cacao</i> de la provincia de Orellana	41
4.1.1.2	Diversidad bacteriana asociada a frutos de <i>T. cacao</i> de la provincia de Orellana.....	49
4.1.2.	Hongos.....	52
4.1.3.	Bacterias.....	57
4.1.3.1	Respuesta de inhibición para el factor A: Cepas de <i>M. royeri</i> (C8, C10, C18).....	58
4.1.3.2.	Respuesta de inhibición para el factor B: Cepas de Bacterias.....	59
4.1.3.3.	Respuesta de inhibición para el factor C: Medio (V8 modificado y KADO 523).....	60
4.1.3.4.	Respuesta de inhibición para el factor A por el factor B.....	61
4.1.3.5.	Respuesta de inhibición para el factor A por el factor C.....	64
4.1.3.6.	Respuesta de inhibición para el factor B por el factor C.....	67
4.1.3.7.	Respuesta de la inhibición para el factor A x B x C.....	69
4.2	Interpretación de los resultados	78
CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones		82
5.1	Conclusiones	82
5.2	Recomendaciones.....	83

Introducción

La producción de cacao en Ecuador ha sido históricamente un componente fundamental de su economía e identidad nacional. Durante casi un siglo, antes del auge petrolero, el mercado internacional del cacao representó la principal fuente económica y social del país. En la actualidad, el cacao se posiciona como el quinto producto más exportado en las exportaciones no petroleras, destacando además como el principal exportador mundial de cacao fino y de aroma (Badillo et al., 2023). La región costa, especialmente en provincias como Manabí, Los Ríos, Guayas y Esmeraldas, juega un papel crucial en la producción de cacao, abarcando el 80% de la superficie cosechada a nivel nacional en 2009 (Abad et al., 2020).

A pesar de la relevancia económica del cacao, la producción enfrenta diversas amenazas, siendo el hongo *Moniliophthora roreri* H.C. Evans uno de los fitopatógenos más limitantes para el cultivo de *Theobroma cacao* L. Este patógeno ocasiona pérdidas considerables a los productores, generando la necesidad de estrategias innovadoras para contrarrestar su impacto negativo. En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo explorar el potencial de microorganismos aislados de frutos de cacao como posibles antagonistas de *M. roreri*, buscando alternativas efectivas y sostenibles para mitigar las pérdidas en la producción cacaotera (Correa et al., 2014).

M. roreri, conocido como el hongo agente causal de la moniliasis, representa un desafío significativo para los productores de cacao. Este fitopatógeno afecta brotes, flores y frutos del cacao, resultando en la destrucción masiva de cosechas y un impacto negativo en la economía de las regiones productoras, como ha sido confirmado por diversos estudios (Macías et al., 2023).

Ante la importancia económica del cacao en Ecuador y la amenaza constante de *M. roreri*, la investigación sobre microorganismos aislados de frutos de cacao como posibles antagonistas emerge como una estrategia prometedora. La identificación de microorganismos, ya sean hongos o bacterias, con capacidad de antagonismo sobre a *M. roreri*, podría conducir al desarrollo de una herramienta biológica efectiva y sostenible para el control de este fitopatógeno, evitando el uso excesivo de agroquímicos. Además, al enfocarse en la provincia de Orellana, una región con una

significativa y creciente contribución a la producción cacaotera, la investigación adquiere relevancia local y nacional (Bravo & Quimis, 2015).

El estudio tuvo como objetivo principal caracterizar el potencial antagonista de hongos y bacterias presentes en los frutos de cacao frente a *Moniliophthora roreri* en la provincia de Orellana. Se plantearon objetivos específicos que incluyeron la identificación de estos microorganismos, tanto hongos como bacterias, asociados a los frutos de cacao, la evaluación *in vitro* de su capacidad antagonista contra *M. roreri* y el análisis de la sensibilidad de este último a diversos productos utilizados en su control. La consecución de estos objetivos proporcionó información crucial para el desarrollo de estrategias de manejo integrado de *M. roreri* en la producción de cacao.

Para respaldar esta investigación, se usaron estudios y descubrimientos científicos recientes, realizados entre 2018 y 2023. Estos estudios ofrecieron una base sólida para comprender el estado actual del conocimiento sobre microorganismos antagonistas, técnicas de caracterización molecular y estrategias de control biológico en la agricultura, especialmente en el contexto del cacao.

Finalmente, los microorganismos aislados de frutos de cacao como posibles antagonistas de *M. roreri* representa una estrategia prometedora y necesaria para abordar los desafíos en la industria cacaotera de Ecuador. La combinación de la importancia económica del cacao, la amenaza constante de *M. roreri* y la rica biodiversidad de microorganismos en los frutos de cacao de la provincia de Orellana confiere a esta investigación un valor estratégico sobre la caracterización molecular y la evaluación *in vitro* del potencial de antagonismo permiten el desarrollo de estrategias prácticas y sostenibles para mitigar las pérdidas causadas por *M. roreri* y garantizar la prosperidad sostenible continua de la industria cacaotera ecuatoriana.

Capítulo I: El problema de la investigación

1.1 Planteamiento del problema

Moniliophthora roreri, comúnmente conocido como el hongo del moniliasis, emerge como un desafío de considerable magnitud para los productores de cacao. Este fitopatógeno impacta de manera adversa en los brotes, flores y frutos del cacao, dando lugar a la destrucción masiva de cosechas (Correa et al., 2014). La gravedad de su impacto se traduce en consecuencias económicas negativas para las regiones productoras de cacao en Ecuador. La información recopilada de diversas fuentes, incluyendo estudios referenciados, subraya la importancia de abordar la amenaza que representa *M. roreri*, confirmando su severidad y destacando la necesidad urgente de estrategias efectivas de control para preservar la sostenibilidad de la industria cacaotera (García et al., 2021).

Los estudios consultados refuerzan la percepción de que *M. roreri* va más allá de ser simplemente un fitopatógeno; se ha convertido en un factor determinante que afecta negativamente la economía de las regiones dedicadas al cultivo de cacao en Ecuador. La capacidad de este hongo para incidir en múltiples partes cruciales de la planta de cacao, como los brotes, las flores y los frutos, amplifica su impacto y por ende, la urgencia de abordar esta problemática desde múltiples perspectivas. Los datos provenientes de referencias científicas subrayan la necesidad de explorar enfoques innovadores, como la identificación de microorganismos aislados de frutos de cacao con potencial antagonista contra *M. roreri*, para contrarrestar las pérdidas económicas y garantizar la sostenibilidad a largo plazo de la industria cacaotera ecuatoriana (Pilaloa et al., 2021).

La amenaza continua de *M. roreri* resalta la importancia de la investigación propuesta, que se centra en la provincia de Orellana. Esta región, con una contribución significativa a la producción cacaotera, se encuentra directamente afectada por la presencia de *M. roreri*. La elección de esta provincia como punto focal de la investigación no solo confiere relevancia local, sino también nacional, dada la importancia del cacao en la economía ecuatoriana. La caracterización molecular y la evaluación del potencial de antagonismo de microorganismos aislados de frutos de cacao en Orellana serán fundamentales para desarrollar estrategias específicas y

adaptadas a las condiciones locales, contribuyendo así a enfrentar de manera efectiva el desafío que plantea *M. royeri* y asegurando el futuro sostenible de la producción de cacao en Ecuador.

1.2 Delimitación del problema

La elección estratégica de la provincia de Orellana como epicentro de la investigación no solo responde a su contribución significativa a la producción cacaotera ecuatoriana, sino también a la directa exposición a la presencia del fitopatógeno *M. royeri*. Al destacarse como una región con una importancia económica clave en el cultivo de cacao, Orellana se convierte en un microcosmos representativo de los desafíos que enfrenta la industria cacaotera a nivel nacional. La delimitación del problema de investigación se enfoca en la identificación precisa de microorganismos aislados de los frutos de cacao en Orellana, con el objetivo claro de encontrar potenciales antagonistas contra *M. royeri*.

Este enfoque específico no sólo subraya la necesidad de soluciones adaptadas a las condiciones locales, sino que también se erige como un paso crucial hacia la mitigación eficaz de la amenaza que representa *M. royeri*. La investigación busca no solo entender la dinámica de esta relación entre microorganismos y fitopatógeno, sino también desarrollar estrategias concretas y prácticas que puedan implementarse en Orellana y en otras regiones cacaoteras del país. Al abordar de manera específica los desafíos en el epicentro de la producción cacaotera, se aspira a garantizar la sostenibilidad a largo plazo de la industria cacaotera ecuatoriana, asegurando así el bienestar económico de la región y contribuyendo a la estabilidad del sector a nivel nacional.

1.3 Formulación del problema

El problema central que motiva esta investigación en la provincia de Orellana es la amenaza representada por *M. royeri* en los cultivos de cacao. Dada la significativa contribución de esta región a la producción cacaotera ecuatoriana, la presencia y el impacto negativo de este fitopatógeno específico en los frutos de cacao se convierten en un desafío crítico para la sostenibilidad económica y la estabilidad del sector. El problema específico radica en la necesidad de identificar microorganismos aislados de los frutos de cacao en esta zona que posean potencial antagonista contra este

patógeno. Esta búsqueda se fundamenta en la urgente demanda de estrategias eficaces y adaptadas a las condiciones locales que mitiguen las pérdidas económicas y preserven la salud y productividad a largo plazo de los cultivos de cacao.

1.4 Preguntas de investigación

Para dar solución a la problemática planteada, surgen las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cuáles son los microorganismos específicos presentes en los frutos de cacao de la provincia de Orellana que podrían desempeñar un papel antagonista contra *M. royeri*?

Esta pregunta se plantea con el objetivo de explorar a fondo la biodiversidad microbiana en los cultivos de cacao de Orellana y desarrollar estrategias específicas que contribuyan a la mitigación eficaz de la amenaza que representa *M. royeri* en la industria cacaotera de Ecuador.

1.5 Determinación del tema

La idea principal, "**Estudio In Vitro de Microorganismos caracterizados desde el aislamiento de Frutos de cacao como Potenciales Antagonistas De *Moniliophthora royeri* H.C.Evans**", sugiere un tema de investigación centrado en la identificación y caracterización de microorganismos presentes en los frutos de cacao que puedan tener propiedades antagonistas contra *M. royeri*, un fitopatógeno significativo para los cultivos de cacao. El tema de investigación podría abordar diversos aspectos, como la diversidad microbiana en los frutos de cacao, las interacciones entre estos microorganismos y el patógeno en estudio, así como la evaluación de su potencial antagonista *in vitro*.

Además, se pueden explorar aspectos moleculares para caracterizar y entender mejor el comportamiento antagonista de estas especies vivas. El tema podría extenderse a estrategias prácticas para utilizar estas herramientas biológicas en el manejo integrado de *M. royeri*, contribuyendo así a la sostenibilidad y la salud de la industria cacaotera

1.6 Objetivo general

Evaluar la capacidad de microorganismos aislados de frutos de cacao como posibles antagonistas de *Moniliophthora roreri*, empleando pruebas *In vitro*

1.7 Objetivos específicos

- Comparar la diversidad de hongos y bacterias aisladas de frutos de cacao.
- Realizar pruebas *in vitro* para determinar el potencial antagonista de los microorganismos frente a *Moniliophthora roreri*.
- Caracterización molecular de los hongos asociados a la Moniliasis aislados en distintas especies de cacao cultivados en la provincia de Orellana
- Cuantificar la sensibilidad de 23 cepas *Moniliophthora roreri* de los diferentes ensayos usados en el control.

1.8 Declaración de las variables (operacionalización).

VARIABLE	DEFINICION	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
Variables Dependientes				
Diversidad de microorganismos	Organismos vivos (hongos y bacterias) de tamaño microscopicos	Fenotípica	Tasa de Crecimiento Biomasa Caracterizacion	mm/día # esporas/m Culti Descripción morfológica y taxonómica
Inhibición	Condición biológica que impide el crecimiento de microorganismos	Fenotípica	Disminución del crecimeinto	% de inhibición
Especies de M. roreri caracterizadas molecularmente	Hongo que ataca a las especies vegetales produciendo moniliasis	Fenotípica	Caracterización	Descripción filogénica de las especies
Dosis efectiva 50	Es una medida utilizada en	Toxicológica	Tasa de mortalidaad	mm/dia

toxicología para cuantificar la dosis de un compuesto que causa un efecto letal en el 50% de los organismos o individuos expuestos a esa dosis específica.

Variables Independientes

Localidades	Lugar donde se ha recolectado los frutos de cacao	Demográfico	Comunidades	NOMINAL 1. La Paz 2. Bajo Huino 3. La Belleza 4. San Carlos 5. San Jacinto 6. Calumeña
Cepas de microorganismos	Microorganismos (hongos, bacterias) empleados en el estudio	Fenotípico	Biomasa Caracterización	# esporas/m Culti Descripción morfológica y taxonómica
Medio de cultivo	Material alimenticio para el cultivo y crecimiento de microorganismos	Social	Recursos	PDA KADO 523 V8

1.9 Justificación

La investigación sobre "Microorganismos aislados de frutos de cacao como potenciales antagonistas de *M. royeri*" se justifica por varias razones fundamentales. En primer lugar, *M. royeri* es reconocido como un fitopatógeno altamente perjudicial para los cultivos de cacao, causando pérdidas económicas sustanciales a los productores (Correa et al., 2014). Dada la importancia del cacao en la economía ecuatoriana y su posición como principal exportador mundial de cacao fino y de

aroma, abordar la amenaza de *M. royeri* se vuelve crucial para la sostenibilidad de la industria.

La identificación de microorganismos aislados de los frutos de cacao que puedan actuar como antagonistas contra *M. royeri* ofrece una perspectiva innovadora y sostenible para el control de este fitopatógeno. La utilización de herramientas biológicas podría reducir la dependencia de métodos tradicionales basados en agroquímicos, promoviendo prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente y la salud humana.

Además, al enfocarse en la provincia de Orellana, que tiene una contribución significativa a la producción cacaotera ecuatoriana, la investigación aborda de manera específica la problemática local y nacional. El conocimiento generado a partir de esta investigación no solo beneficiaría a los productores locales al proporcionar estrategias adaptadas a las condiciones de la región, sino que también contribuiría al desarrollo de prácticas agrícolas más resilientes y sostenibles a nivel nacional. En resumen, la investigación justifica su relevancia al abordar una problemática económica y agrícola crucial, proponiendo soluciones novedosas y sostenibles para el manejo de *Moniliophthora royeri* en los cultivos de cacao.

1.10 Alcance y limitaciones

Este estudio, al enfocarse en la provincia de Orellana, representa un paso significativo hacia la comprensión y gestión efectiva del complejo ecosistema cacaotero en Ecuador. La identificación y caracterización de microorganismos en los frutos de cacao, con especial atención a su diversidad fúngica y bacteriana, ofrecen una visión detallada de la riqueza biológica presente en esta región. La necesidad de entender la interacción específica de estos microorganismos con *M. royeri* responde a la urgente demanda de soluciones innovadoras y sostenibles para enfrentar las amenazas que plantea este fitopatógeno a la industria cacaotera. La propuesta de realizar un análisis molecular detallado no solo amplía nuestro conocimiento sobre la composición genética de estos microorganismos, sino que también establece una base sólida para investigaciones posteriores, permitiendo una comprensión más profunda de sus funciones y potencialidades.

Para respaldar esta investigación, se pueden encontrar estudios adicionales que destacan la importancia de la biodiversidad microbiana en la agricultura y la búsqueda de estrategias de control biológico. Investigaciones recientes, como las llevadas a cabo por profesionales especializados en fitopatología y microbiología agrícola, han abordado la relevancia de los microorganismos en la salud de los cultivos y la necesidad de desarrollar métodos sostenibles para combatir patógenos. Estos estudios respaldan la premisa central de este estudio, que propone la búsqueda de microorganismos específicos en los frutos de cacao de Orellana como posibles antagonistas de *M. royeri*. Además, se encuentran análisis que destacan la importancia de la evaluación *in vitro* para comprender y validar el potencial de antagonismo de estos microorganismos, proporcionando una sólida base metodológica y respaldo científico a la propuesta de este estudio.

En este contexto, la investigación no solo se presenta como un esfuerzo local para abordar la problemática en Orellana, sino que también contribuye al corpus global de conocimiento en microbiología agrícola. La relevancia y aplicabilidad de los resultados trascienden las fronteras de la provincia, ofreciendo perspectivas valiosas que podrían influir en prácticas agrícolas a nivel nacional e incluso internacional. La intersección de la investigación actual con los avances científicos y las perspectivas globales sobre la biodiversidad microbiana en la agricultura fortalece la posición de este estudio como un componente esencial para la innovación y el avance en el sector cacaotero ecuatoriano y en la agricultura sostenible a nivel mundial.

La provincia de Orellana en Ecuador desempeña un papel crucial en la producción cacaotera, siendo reconocida tanto a nivel local como nacional por su significativa contribución a esta industria. Sin embargo, al abordar la investigación en esta región, es imperativo considerar las limitaciones inherentes que podrían afectar la generalización de los resultados. La variabilidad climática y edafológica entre distintas regiones cacaoteras plantea un desafío importante, por las condiciones específicas de esta región que podrían no ser directamente aplicables a otras áreas, comprometiendo la extrapolación de los hallazgos. La importancia de este aspecto se respalda con la revisión de literatura reciente sobre la variabilidad climática en

regiones cacaoteras, destacando la necesidad de adaptar los resultados a contextos específicos para garantizar su validez y aplicabilidad más amplia (Ferrer et al., 2022)

Además, la influencia de condiciones ambientales cambiantes, como las fluctuaciones climáticas y de humedad, se perfila como un desafío constante en la investigación. La literatura científica sobre la dinámica climática y su impacto en la producción agrícola respalda la necesidad de abordar estas fluctuaciones para mantener la consistencia en los resultados a lo largo del tiempo (Quiroz et al., 2022). Esta información respalda la afirmación de que la variabilidad climática no solo es una limitación específica de esta investigación en Orellana, sino un desafío más amplio que enfrentan las investigaciones en regiones agrícolas sensibles a cambios ambientales.

Asimismo, al explorar la complejidad del ecosistema microbiano en los frutos de cacao, es esencial reconocer la necesidad de un enfoque minucioso en la identificación y comprensión de las interacciones entre los microorganismos. Investigaciones previas sobre la biodiversidad microbiana en cultivos agrícolas sugieren que esta complejidad requiere herramientas avanzadas de caracterización molecular y análisis de datos para desentrañar completamente las funciones específicas de los microorganismos (Machuca et al., 2019). Este conocimiento respalda la estrategia de la investigación y resalta la relevancia de abordar la complejidad microbiana en los estudios agrícolas para lograr resultados más completos y aplicables.

La investigación sobre microorganismos como posibles antagonistas de *M. royeri* en los frutos de cacao en la provincia de Orellana no solo se presenta como un esfuerzo esencial para abordar los desafíos fitopatológicos en la industria cacaotera ecuatoriana, sino que también destaca la necesidad de considerar cuidadosamente las limitaciones inherentes. La variabilidad climática y edafológica entre distintas regiones cacaoteras, como se plantea en la investigación, subraya la importancia de este estudio en el contexto del complejo ecosistema cacaotero ecuatoriano. Además, la inclusión de fuentes adicionales de mi base de datos revela que las variaciones en estas condiciones ambientales pueden tener un impacto significativo en la dinámica microbiana y, por ende, en la eficacia de estrategias de control biológico. Esta consideración es crucial para enriquecer la comprensión de la diversidad del

ecosistema y garantizar que las soluciones propuestas sean aplicables en un rango más amplio de contextos geográficos.

La complejidad del ecosistema microbiano en los frutos de cacao, según las fuentes adicionales consultadas, sugiere la necesidad de adoptar enfoques avanzados en la caracterización molecular y análisis de datos en futuras investigaciones. Estos enfoques podrían proporcionar una visión más detallada de las interacciones específicas entre los microorganismos y *M. royeri*, permitiendo una comprensión más precisa de su potencial antagonista. Aunque la investigación puede enfrentar restricciones de recursos, se destaca la innegable contribución al desarrollo de estrategias específicas para la provincia.

Información adicional señala que la adaptación de soluciones a condiciones locales es crucial para maximizar la efectividad de las intervenciones agrícolas. Además, la investigación puede servir como modelo para investigaciones similares en otras regiones cacaoteras, facilitando un enfoque integrado para abordar la amenaza de *M. royeri* a nivel nacional.

Entonces, la investigación sobre microorganismos como posibles antagonistas de *M. royeri* en los frutos de cacao en Orellana, a pesar de sus limitaciones, se posiciona como una contribución valiosa para avanzar en el conocimiento y la sostenibilidad de la producción cacaotera en Ecuador. La combinación de un enfoque localizado, consideración de las variaciones climáticas y edafológicas, y la aplicación de enfoques avanzados en la caracterización molecular respaldan la relevancia y la aplicabilidad de los resultados en un contexto más amplio de la producción cacaotera nacional.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1 Antecedentes

La extensión territorial de la provincia de Orellana abarca 21.730,05 kilómetros cuadrados, su cantidad de habitantes alcanza los 139.336, según los datos recopilados en el censo poblacional de 2010, y se encuentra en la región noroeste de Ecuador. La ciudad principal de esta provincia es Francisco de Orellana, la cual ocupa un área total de 7.047 kilómetros cuadrados (704.755 hectáreas), tiene una población de 72.795 residentes y está ubicada en la región nordeste de Ecuador (Aguirre et al., 2021).

Figura 1

Mapa de la zona de estudio



Según lo detalla el GADPOrellana (2018), el vigor laboral, o Población Económicamente Activa (PEA), constituye el 33% de la suma de la población de la provincia (45.140 individuos). La distribución de la PEA por áreas muestra que el 52% se ocupa en el ámbito primario (agricultura, silvicultura, caza y pesca), el 35% en el ámbito secundario (manufactura, industria, comercio) y el 13% en el ámbito terciario (prestación de servicios y sector público).

La estructura del Producto Interno Bruto (PIB) en el territorio de Orellana sitúa a la agricultura en la tercera posición, considerablemente distante de las actividades de extracción y de servicios públicos, como se evidencia en la figura 2.

Figura 2

Composición del PIB de la provincia de Orellana en el año 2016 (%)



El chocolate se deriva de un árbol nativo de América conocido como cacao, cuyo fruto lleva el mismo nombre y se emplea como ingrediente en diversos alimentos. Este recurso ha sido utilizado desde la época de las civilizaciones mayas, aztecas e incas, desempeñando roles tanto nutricionales como medicinales a lo largo de la historia.

En la economía ecuatoriana, el cacao juega un papel crucial como producto de exportación y una fuente significativa de empleo tanto en áreas urbanas como rurales. (García et al., 2021). Este fruto constituye uno de los sectores más significativos para la nación (Cambisaca & Macías, 2023) que a través de los años, ha experimentado un desarrollo continuo, colocando actualmente a Ecuador en la tercera posición global, con un 7% de la producción mundial, tal como se evidencia en la Figura 3.

Figura 3 Principales países productores de cacao (miles de toneladas)

		2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019*
	Total Mundo	4 252	3 997	4 739	4 645	4 799
1	Costa de Marfil	1 796	1 581	2 020	1 964	2 150
2	Ghana	740	778	970	905	900
3	Indonesia	325	320	270	240	220
4	Brasil	230	141	174	204	195
5	Nigeria	195	200	245	255	245
6	Ecuador	261	232	290	285	298
7	Camerún	232	211	246	250	250
8	Peru	92	105	115	134	120
9	República Dominicana	82	80	57	70	70
10	Colombia	51	53	55	55	55
	Subtotal	4 004	3 700	4 441	4 362	4 503
	Otros	248	297	298	283	296

Según (Mendoza et al., 2021), la industria del chocolate a nivel mundial se posiciona como la principal consumidora del cacao, y su demanda sigue en aumento, evidenciando un mercado no satisfecho. Esto brinda una excelente oportunidad para Ecuador, permitiendo la generación de riqueza interna y divisas. Para lograrlo, el país deberá implementar tácticas de inversión y colaborar con entidades financieras tanto públicas como privadas para obtener líneas de crédito con tasas de interés bajas. Asimismo, se requiere asistencia técnica adecuada en coordinación con instituciones gubernamentales y académicas para mantener la calidad del cacao y cumplir con los estándares exigentes de los mercados internacionales a los que se dirige el cacao ecuatoriano.

Desde su proceso de colonización, Orellana ha estado fuertemente vinculada a actividades agropecuarias; no obstante, el sector productivo presenta diversas deficiencias. A pesar de ello, se reconoce al sector agropecuario como un impulsor clave de la economía. En la provincia, el subsector agrícola se destaca por la producción de cacao en 12,623 hectáreas (2013), café en 5,000 hectáreas (2010), palma aceitera en 69,981 toneladas métricas (14.7 TM/ha), maíz, plátano, yuca, palmito, arroz y caña.

En el cantón Francisco de Orellana, se observa que, según el área de cultivo, los cultivos más plantados son cacao (12,000 ha), maíz duro seco (9,284 ha), café (7,162 ha) y palma africana (6,863 ha). Posteriormente, se encuentran plátano, yuca y arroz (GADPOrellana, 2018).

En las comunidades indígenas del cantón, a diferencia de las zonas no indígenas, la agricultura se realiza en pequeñas extensiones de tierra llamadas chacras, que no superan una hectárea. Las mujeres suelen ser las encargadas de cuidar y gestionar estas chacras, donde se cultivan productos de ciclo corto como yuca, plátano y maíz, entre otros (Salinas & Rodríguez, 2019).

En el cantón La Joya de los Sachas, específicamente en las parroquias San Carlos, Unión Milagreña y Pompeya, el cacao es el producto principal, seguido de arroz y maíz. Según Caicedo (2020), el cacao es un cultivo de gran demanda en el mercado y es un pilar esencial de la economía campesina. Los desafíos en la producción de cacao, tanto para los colono-campesinos como para los indígenas, incluyen intermediarios, baja productividad por plagas y el uso de tecnologías inadecuadas.

En un escenario proyectado para el 2022 por el consejo provincial de Orellana, se espera un aumento en la producción y la demanda de empleo local, especialmente para productos primarios de exportación como el cacao y el café. No obstante, uno de los riesgos significativos para los productores de cacao en la región es la amenaza de enfermedades y plagas, lo que podría resultar en pérdidas considerables.

La Monilla (*Moniliophthora roreri*) se destaca como una de las enfermedades más perjudiciales para los cultivos de cacao en Ecuador. Según (Correa et al., 2014), los primeros informes inciertos de esta enfermedad datan de 1895 en la Hacienda Maravilla, Provincia de Los Ríos. La Monilla, junto con la enfermedad Escoba de bruja, causaron estragos en la producción de cacao, reduciendo las plantaciones en un 30% en 1918 y llevando a la sustitución del cacao por el banano en 1920 debido a los bajos rendimientos.

Según Orozco Holguín et al. (2022), la falta de apoyo gubernamental en cuestiones crediticias y la ausencia de asesoramiento técnico para el cultivo, cosecha y comercialización, sumado al aumento de la producción en otros países como Costa de Marfil, Ghana e Indonesia, han afectado la competitividad del cacao ecuatoriano, según la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao (2010).

En este contexto, es esencial que entidades gubernamentales, productores y la academia colaboren para encontrar estrategias y soluciones a los desafíos que afectan la competitividad del país.

2.2 Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1 Cacao (*Teobroma cacao* L.)

2.2.1.1 Origen

Se estima que la fuente primaria del árbol de cacao se encuentra en la región noroeste de América del Sur, específicamente en los trópicos húmedos de la parte alta de la Amazonia, abarcando países como Brasil, Colombia, Perú y Ecuador. Desde esta zona, su presencia se propagó hacia América Central, donde las culturas indígenas locales, como los Olmecas y los Mayas, lo incorporaron en su uso cotidiano y lo veneraron como "el alimento de los dioses". La introducción del cacao a América Central se remonta a 1519, cuando los colonizadores lo encontraron por primera vez en México, donde ya era cultivado por la civilización azteca. Desde ese punto, el cacao experimentó una expansión significativa, dando lugar a la creación de importantes centros de producción en regiones como Ecuador, América Central y Venezuela (Abad et al., 2020).

2.2.1.2. Principales países productores de cacao

El cacao es representativo a nivel internacional puesto que su producción ha generado diversas fuentes de trabajo que han incrementado en una gran escala el desarrollo económico a nivel nacional e internacional. Los países con mayor producción a nivel mundial son África con mayor cobertura del 73%, seguido en

segundo lugar por América con el 17%, y Asia y Oceanía con el 10%, a nivel de países en orden de importancia son Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador, Perú, República Dominicana y Colombia que concentran el 93% de la producción total como lo muestra la Tabla 1 (Velásquez & Silva Pérez, 2023).

Tabla 1

Principales países productores de cacao (*Theobroma cacao* L.) a nivel internacional

Principales países productores a nivel mundial	Producción (miles Ton)
Costa de Marfil	1,471,267
Ghana	747,635
Indonesia	656,127
Nigeria	340,845
Camerún	232,108
Brasil	224,159
Ecuador	155,488
República Dominicana	60,701
Perú	56,586
Papua Nueva Guinea	44,2
México	28,213
Otros	274,766

2.2.1.3. Principales variedades de cacao en el Ecuador

- **Nacional o arriba**

Este tipo de cacao es conocido como fino de aroma y es el producto emblemático y tradicional de Ecuador. Se encuentra principalmente en las provincias de Guayas y Los Ríos, en la región de la Costa del país, y su cultivo se limita a Ecuador debido a las condiciones climáticas específicas que requiere. Las mazorcas de este cacao son de forma amelonada, grandes y casi ovals, con una cáscara gruesa y de color verde.

Las semillas varían en tamaño de medianas a grandes y presentan tonalidades que van desde el violeta al morado. El cacao exhibe notas florales y frutales, lo cual lo distingue como "cacao fino de aroma". Esta variedad de cacao es ampliamente exportada debido a su alta reputación a nivel mundial por su exquisito sabor y calidad. Además, es única, ya que solo se cultiva en Ecuador, lo que ha llevado a que el Cacao de Arriba tenga una denominación de origen, otorgándole protección a nivel global (Mendoza et al., 2021).

- **CCN-51**

El Cacao CCN-51, también conocido como Ramilla en Ecuador, es un híbrido de tres variedades: trinitario, nacional y oriente, originario de la región amazónica del país. Gracias a esta combinación de variedades, se considera uno de los cacaos más productivos a nivel mundial. Durante su desarrollo y maduración, los frutos adquieren una tonalidad rojiza, su perfil de aroma y sabor difiere significativamente del cacao fino de aroma. Sin embargo, esto no significa que se considere de menor calidad. Además, se destaca por tener una alta cantidad de manteca, lo que lo hace muy apreciado en la industria cosmetológica debido a sus propiedades hidratantes para la piel (Badillo et al., 2023).

- **Cacao Sacha**

Este tipo de cacao también es conocido como "cacao Edwin Sánchez Sacha", en honor al hombre que descubrió esta variedad en la finca de sus padres. Estos árboles eran altamente productivos y mostraban resistencia frente a enfermedades, es considerado altamente productivo y tiene características distintivas en sus mazorcas. Estas mazorcas son alargadas y rugosas, con colores que varían entre tonos rojizos y anaranjados (Macías et al., 2023).

En la provincia de Orellana, específicamente en el cantón Joya de los Sachas, se ubican las primeras plantaciones de un cacao considerado altamente productivo, conocido como cacao Sacha. Este tipo de cacao contiene en su ADN una gran proporción de trinitario, lo que se refleja en sus mazorcas alargadas y rugosas, de

colores rojizos y anaranjados. Su sabor presenta notas cítricas que se asemejan al sabor del cacao fino del Caribe, lo que lo convierte en un cacao muy valorado en el mercado mundial (Chávez et al., 2021).

Una de las particularidades del cacao Sacha es su ADN, que contiene una significativa influencia de la variedad trinitario. Esta influencia genética se refleja en su sabor, el cual presenta notas cítricas que recuerdan al cacao fino del Caribe, una variedad altamente apreciada en el mercado mundial. El cacao Sacha ha ganado reconocimiento por su productividad y sus características organolépticas únicas, lo que lo convierte en una opción atractiva para los productores y consumidores de cacao. Su cultivo y producción están centrados en la provincia de Orellana, donde se han establecido las primeras plantaciones de este tipo de cacao prometedor (Abad et al., 2020)

- **Super árbol**

Es una variedad de cacao que se ha identificado en la región Amazónica en Ecuador. Este cacao sobresale por su notable resistencia a enfermedades, alto rendimiento y calidad destacada. La utilización de este material genético en nuevas siembras, mediante prácticas agrícolas apropiadas, podría aumentar significativamente el rendimiento por hectárea y generar beneficios a mediano y largo plazo en términos económicos, sociales y medioambientales (García et al., 2021).

2.2.1.4 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica, esencial en biología, debido a que tiene como objetivo organizar y categorizar la diversidad biológica. La identificación única del género *Theobroma* y la especie *Theobroma cacao* L., según Badillo et al. (2023) ofrece una comprensión detallada de su posición en la riqueza biológica del reino vegetal como se resume en la tabla 2.

Tabla 2

Clasificación taxonómica del cacao

División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malvales
Familia:	Esterculiaceae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie:	<i>Theobroma cacao</i> L.

2.2.1.5. Morfología de la planta

Según Dumble Amador Sacoto et al. (2022). El cacao, un árbol de dimensiones medianas, generalmente oscila entre 5 y 8 metros de altura, aunque puede llegar a alcanzar altitudes de hasta 20 metros en ausencia de restricciones bajo una densa sombra. Su copa exhibe una densidad y redondez notables, con un diámetro que varía entre 7 y 9 metros. La conformación del tronco es recta y asume diversas formas según las condiciones ambientales en las que se desarrolle.

Un estudio adicional, que hace un mayor análisis de las características morfológicas preeminentes del cacao, se encuentran detalladas de manera exhaustiva en la tabla 3

Tabla 3

Morfología y descripción de cacao (*Theobroma cacao* L.)

La revisión de la morfología y la descripción de *Theobroma cacao* L, se basa en la información presentada por Jaramillo et al. (2022)

Raíz: Su sistema radicular se caracteriza por ser pivotante en plantas que provienen de semillas formándose hasta los 2 m, consta de raíces principales y secundarias distribuidas a 15 cm por debajo del suelo, además los pelos absorbentes ubicados de 0 a 5 cm de profundidad del suelo encargados de la absorción de agua y nutrientes.

Tallo:	La planta de cacao posee dos tipos de tallos: aquellos que crecen de forma recta y vertical llamados ortotrópico que provienen de plantas por semillas y aquellas plantas que son producidas por injertos que su crecimiento es horizontal y lateral llamados plagiotrópicos. La corteza del tallo es de color oscuro (gris-café), pueden alcanzar entre 1 – 2 m de altura a una edad de 1 a 1.5 años de edad, es donde sus yemas apicales se detienen para dar inicio a la formación de 3 a 5 ramas laterales las cuales son conocidas como horquetas o verticilo.
Hojas	Las hojas son grandes y perennes, están ordenadas de forma alterna poseen longitudes de 20-35 cm de largo y de 15 cm de ancho, tienen consistencias gruesas son de color verde oscuro en el haz, y en el envés de tono más pálido.
Flores	También llamado cojinete floral o botón floral el cual puede contener de 1 – 40 flores que una vez abiertas solo tienen 48 h de viabilidad para ser polinizadas por insectos o de forma manual.
Fruto	La fruta del árbol de cacao es conocida como mazorca, botánicamente es una baya la cual adopta diversas formas, tamaños y colores de acuerdo a la especie y variedad que pertenezcan, sus tamaños varían de los 10 – 35 cm de longitud, su forma es ovalada y alargada con puntas prominentes y otras achatadas según su variedad que pertenezcan, son de color verde o rojas en su fase inicial y cuando llegan a la maduración se tornan de color amarillo generalmente.
Semillas	Son del tamaño de almendras grandes de color chocolate, recubiertas por el mucilago blanco y de sabor dulce lo que lo caracteriza, comúnmente se conocen como granos de cacao o como habas.

2.2.1.6 Principales enfermedades

- ***Phytophthora palmivora***

Esta patología afecta de manera más acentuada a los productos del cacao, aunque se pueden observar señales de su presencia en diversas partes de la planta. Este mal ocasiona pérdidas anuales que ascienden al 30%, además de provocar la muerte de los árboles de cacao. Se caracteriza por la aparición de manchas de tonalidad parda,

capaces de extenderse por todo el fruto y obstaculizar su desarrollo, resultando en la anulación de la producción. Durante los períodos de lluvia, las esporas, ubicadas en el suelo, son transportadas por el agua, constituyendo uno de los principales factores de propagación de esta afección (Simamora et al., 2021).

- **Escoba de bruja**

En Ecuador, se reconoce como una de las enfermedades más devastadoras, con un impacto del 80% en la merma de la producción de cacao. La *Moniliophthora perniciosa* es la causa subyacente, manifestando diversos síntomas en los cultivos. A lo largo del ciclo vegetativo, esta enfermedad afecta las partes de los árboles, como ramas y brotes, generando protuberancias en las áreas infectadas y debilitando la planta. En el caso de la invasión del patógeno en las yemas, se observa la formación de pequeñas hojas en forma de escoba debido a la hipertrofia. Otro indicio visible comprende la clorosis, fragilidad y necrosis de las hojas. Cuando ataca al fruto en las primeras 35 semanas de su desarrollo, la enfermedad se intensifica conforme el fruto crece (Pallazhco, 2021).

2.2.2 *Moniliphthora roreri* H.C Evans

La moniliasis se presenta como una enfermedad originada por el hongo *M.roreri*, dirigida exclusivamente a los productos del cacao. Su incidencia puede extenderse a la mayor parte de los frutos cuando las prácticas agrícolas son ejecutadas de manera inapropiada (Guevara et al., 2022). Esta patología se evalúa como capaz de incidir en los rendimientos de cacao en un rango del 20% al 80%. También reconocida como la enfermedad de la vaina helada o enfermedad de Quevedo, en alusión al lugar donde se originó su epidemiología, es crucial destacar que esta es una de las afecciones más perjudiciales para los cultivos de cacao, ya que impacta negativamente en los frutos en todas las etapas de su desarrollo (Plasencia et al., 2022).

Al existir indicios de la existencia de esta enfermedad en las plantaciones de cacao ecuatorianas en provincias como Guayas y Los Ríos, se tuvo que confrontar un

severo problema ya que la producción empezaba a generar grandes pérdidas (Perez, 2021).

2.2.3 Taxonomía

La taxonomía del hongo *Moniliophthora roreri* se resume en la tabla 4, con la información obtenida de Guevara et al. (2022)

Tabla 4

Clasificación taxonómica de *Moniliophthora roreri*

Reino:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Clase:	Basidiomycetes
Orden:	Agaricales
Familia:	Tricholomataceae
Género:	<i>Moniliophthora</i>
Especie:	<i>Moniliophthora roreri</i>

2.2.4 Ciclo biológico

M.roreri se activa en condiciones de baja humedad, es decir, durante períodos de sequía, ya que se producen una elevada cantidad de esporas que son transportadas por el viento y depositadas en los frutos y en la superficie de las plantas de cacao, dando lugar así a la propagación de la enfermedad. Las partes de las plantas más susceptibles a la infección son los frutos con una edad inferior a tres meses, donde se observan masas blancas en estado polvoriento que infectan la superficie del fruto. El patógeno suele actuar en el momento en que los conidios germinan a temperaturas superiores a los 24°C y en ambientes con alta humedad. En un período de 8 horas, las hifas son capaces de atravesar la epidermis y dirigirse hacia los tejidos principales ubicados en el mesodermo y las semillas, provocando la generación de proteínas que inducen la necrosis y, por ende, la muerte del tejido del fruto. Un factor crucial para

identificar la distribución de esta enfermedad en Ecuador es la cantidad de mazorcas infectadas en diversas zonas productoras de cacao (Chávez et al., 2021)

Según Hipólito-Romero et al. (2020), las esporas siempre necesitarán la presencia de agua para su germinación posterior. Por lo tanto, la enfermedad tiene una mayor incidencia durante las épocas de lluvia, cuando el inóculo está presente en mayor cantidad, lo que resulta en síntomas y daños más severos. En la mayoría de los casos, la propagación de la enfermedad ocurre a través del mismo entorno, es decir, si hay frutos que contienen esporas y se llevan a cabo actividades de manejo del cultivo, se produce la liberación de conidios a otras áreas de las plantaciones.

2.2.5 Síntomas y daños

Los indicios más comunes de la afección se evidencian en estructuras como el fruto, con una antigüedad no inferior a los tres meses, siendo estas las más propensas a la infección. En concordancia con la fase de desarrollo del fruto, los síntomas varían; por ejemplo, en frutos de tres meses, el primer signo de infección se manifiesta a través de la aparición de elevaciones o protuberancias, mientras que, en frutos de más de tres meses, la primera señal consiste en la formación de manchas de aceite bajo la epidermis en el interior del fruto (Guevara et al., 2022). Estos tejidos, al descomponerse, se convierten en una masa de contenido acuoso debido a su descomposición, con algunas almendras destruidas en casos particulares. La afectación de las almendras varía según el tiempo de infección, pudiendo ser afectadas o no. Desde el inicio del proceso infeccioso hasta la manifestación de los primeros síntomas, transcurre un periodo de aproximadamente un mes o mes y medio, dando lugar a la aparición de la mancha de color chocolate. Posteriormente, tras nueve días, se visualiza una estructura lanosa o de tono crema, indicando la madurez de las esporas del hongo (Flores et al., 2022).

2.2.6 Especies afectadas

M. roreri, cuyo principal huésped es el fruto de *Theobroma cacao*, se localiza también en parientes cercanos como *T. bicolor* y *T. glandiflorum*. Las pérdidas en la

producción oscilan entre el 45% y el 100% en variedades comerciales, como el cacao clonal de la Colección Clonal Naranja 51 (CCN-51), lo cual se traduce en pérdidas monetarias significativas anuales. Dentro de las especies de cacao, los cultivares Super Árbol, CCN51 y Cacao Nacional son las que presentan síntomas y daños atribuibles a la enfermedad de la moniliasis (Badillo et al., 2023).

2.2.7 Manejo integrado en el control de enfermedades del Cacao

2.2.7.1 Control cultural

Una de las tareas en el marco del manejo integrado para contrarrestar esta patología reside en el control cultural, cuya meta es respaldar a los cultivadores de cacao en la implementación de prácticas adecuadas para la preservación de sus plantaciones. En este contexto, se procura evitar la entrada del hongo y su posterior ataque al fruto. Entre las acciones que previenen la propagación se incluyen: la eliminación de frutos infectados antes de que las esporas se dispersen, limitando de manera inmediata el desarrollo del hongo; asimismo, llevar a cabo labores de control de malezas y realizar podas en la estación y forma adecuadas contribuirá a dotar a las plantas de una mayor vitalidad (Guevara et al., 2022).

2.2.7.2 Control químico

La utilización de sustancias químicas ha representado la medida de control más frecuentemente empleada; dentro de los fungicidas utilizados, aquellos de carácter sistémico destacan como los más efectivos contra *M.roreri*. Algunos productos que contienen elementos de oxiclورو de cobre exhiben la máxima eficacia en el manejo del cultivo de cacao.

A pesar de que comúnmente se recurre a productos químicos de tipo protector, los más beneficiosos son aquellos que incorporan compuestos de cobre y estrategias biológicas de protección, evidenciando así una disminución en la incidencia del hongo. Aunque se ha propuesto el empleo de fungicidas para el control de *M.roreri* en distintas localidades, se les percibe como ineficientes y costosos en la mayoría de los casos, lo cual disminuye su eficacia. Además, los fungicidas, al igual que otros agentes pesticidas, generan contaminación ambiental con consecuencias adversas para diversos organismos, motivo por el cual no se aconseja su aplicación (Torres et al., 2018).

2.2.7.3. Control biológico

La gestión biológica implica la dirección directa e indirecta de los individuos, en la cual organismos vivos son empleados con el propósito de disminuir la aparición de diversas enfermedades y sus concentraciones poblacionales. Por lo general, estos organismos se encuentran de manera inherente en la naturaleza y poseen la capacidad de regulación. En entornos de laboratorio, se han logrado resultados eficaces al aislar cepas de hongos *Trichoderma* sp. que exhiben una acción antagonista sobre la colonia de *M. royeri* (Anzules et al., 2019).

2.2.7.3.1 Bacterias como agente de control biológico

La mayoría de las plantas cultivadas en el campo están colonizadas por bacterias de la rizosfera, algunas de las cuales se consideran microorganismos beneficiosos debido a sus efectos positivos en el rendimiento de las plantas. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) son un grupo de bacterias de vida libre que prosperan en la rizosfera y producen diversos metabolitos con propiedades antifúngicas y promotoras del crecimiento de las plantas. Estas bacterias también actúan como biopesticidas, contribuyendo a la salud de las plantas y aumentando la productividad al mejorar la disponibilidad de nutrientes, liberar hormonas de crecimiento y reducir enfermedades causadas por patógenos. Las PGPR incluyen diversas especies bacterianas, como *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, y otras. Además, producen una variedad de metabolitos secundarios, como antibióticos, endotoxinas, sideróforos, enzimas hidrolíticas, cianuro de hidrógeno y ácido fenazina-1-carboxílico, que ayudan a eliminar patógenos y prevenir el desarrollo de enfermedades (Camacho et al., 2022; Moreno et al., 2018). El uso de cepas específicas de *Bacillus* en aplicaciones de biocontrol ha demostrado ser efectivo en la protección y promoción del crecimiento de diversos cultivos. En estudios, estas cepas han mostrado eficacia en el control de plagas y enfermedades, y su actividad de control biológico ha sido comparable a la de agentes comerciales, aunque ligeramente menor que la de algunos fungicidas sintéticos. Además, algunas cepas de *Bacillus* endofíticos han exhibido efectos inhibitorios contra patógenos como *Verticillium dahliae*, contribuyendo así a la reducción de la marchitez en plantas de algodón (Villarreal et al., 2018).

2.2.7.3.2 Hongos como agentes de control biológico

Varias especies fúngicas, como *Trichoderma*, han demostrado ser entomopatógenos de plagas de insectos y hongos endofíticos de plantas, convirtiéndolos en agentes de control biológico efectivos. *Trichoderma*, en particular, es ampliamente estudiado y utilizado en la agricultura por su capacidad para competir, parasitar fitopatógenos y mitigar condiciones desfavorables de crecimiento. Además de su eficacia contra fitopatógenos, se ha demostrado que *Trichoderma* suprime plagas de insectos mediante diversos mecanismos, haciendo de él una alternativa prometedora para una agricultura sostenible (Hernández et al., 2019).

Diferentes aislados de *Trichoderma*, como *T. aggressivum* y *T. asperellum*, han mostrado alta actividad antagonista contra fitopatógenos, incluso en combinación con fungicidas químicos. Estos aislados también han demostrado mejorar la resistencia de plantas a enfermedades específicas, como manchas foliares y marchitez. Otros estudios destacan el potencial de *Trichoderma* spp. en la supresión de diversas enfermedades, como la mildiú veloso del mijo perla y la marchitez en olivos (Peñar & Pavone, 2020).

Además de los hongos, las levaduras también se utilizan como agentes de control biológico, mostrando capacidades significativas en la inhibición de patógenos postcosecha. Ciertas cepas de levaduras, como *Wickerhamomyces anomalus* y *Candida oleophila*, han demostrado un alto rendimiento en el control de enfermedades en viñedos y frutas postcosecha, ofreciendo perspectivas prometedoras para su aplicación en la agricultura (Kuchen et al., 2023). En conjunto, estos hallazgos resaltan la diversidad de microorganismos útiles en el control biológico, proporcionando opciones valiosas para promover prácticas agrícolas más sostenibles.

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1 Tipo y diseño de investigación

3.1.1 Tipo de Investigación:

El tipo de investigación fue descriptivo y experimental, donde se combinaron elementos cualitativos y cuantitativos para cumplir con el propósito central del estudio. Para el primer objetivo que es identificar los microorganismos asociados a los frutos de cacao se usó una investigación cualitativa para la descripción de características fenotípicas y genotípicas que permitieron describir esa diversidad de microorganismos asociados a frutos de cacao. Posteriormente para ese mismo objetivo se usó un enfoque de investigación cuantitativa al mostrar la abundancia relativa de los microorganismos asociados a los frutos de cacao. Para el segundo objetivo se usó un enfoque de investigación cuantitativa al determinar *in vitro* el potencial de antagonismo de hongos y bacterias asociados a frutos de cacao a *M. roreri*. Finalmente, en el tercer objetivo se usó un enfoque de investigación cuantitativo al determinar los niveles de sensibilidad de *M. roreri* a diferentes productos usados en el control.

3.1.2 Diseño de Investigación:

Se usó un plan de tipo descriptivo experimental. En el primer objetivo se usó un plan de tipo descriptivo en donde fueron descritos los principales grupos fúngicos y bacterianos asociados a frutos de cacao. En el segundo objetivo, se plantearon experimentos *in vitro* en donde se siguió un diseño experimental completamente al azar, con arreglos factoriales tanto en las confrontaciones hongos-*M. roreri* como bacterias-*M. roreri* seguidos de pruebas de separación de medias de Tukey al 5%. Para el tercer objetivo igualmente se usaron experimentos *in vitro* para determinar el nivel de sensibilidad de algunas cepas de *M. roreri* a diferentes productos usados en el control en donde fueron determinadas las dosis efectivas 50 (ED₅₀) de cada producto analizado para *M. roreri* mediante análisis de regresión.

3.2 La población y la muestra

3.2.1 Características de la población

En la provincia de Orellana, se lleva a cabo el cultivo de cacao mediante tres genotipos distintos: CCN51, Nacional y Super Árbol. Estos genotipos son cultivados en las principales zonas productoras de la región, destacando su importancia en la economía local. La diversidad genética representada por el CCN51, el Nacional y el Super Árbol refleja el compromiso de los agricultores con la investigación y la mejora continua de las prácticas agrícolas. La elección de estos genotipos específicos también responde a las condiciones climáticas y de suelo de la provincia, buscando optimizar la producción y calidad del cacao, un cultivo emblemático que contribuye significativamente al desarrollo sostenible de la región.

3.2.2 Delimitación de la población

Una selección representativa de plantaciones de cacao afectadas, asegurando diversidad en términos de condiciones climáticas, tipos de suelo y genotipos de cacao en la Provincia de Orellana. La investigación se realizó con muestras obtenidas de tres localidades de la provincia de Orellana, ubicadas en los cantones de Loreto, Francisco de Orellana y La Joya de los Sachas, lugares en donde existen cultivos de cacao.

Tabla 5

Ubicación geográfica de las tres localidades de estudio de la Provincia de Orellana.

LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD
Loreto	0°47'28"S	77°22'19"O	373 m.s.n.m
Francisco de Orellana	0°37'36"S	77°07'40"O	292 m.s.n.m

La Joya de los
Sachas

0°45'41"S

77°05'01"O

330 m.s.n.m

3.2.3 Tipo de muestra

Aunque puede haber variabilidad en las condiciones de los cultivos de cacao, se buscó una muestra aleatoria que proporcione una representación equitativa de la población afectada.

3.2.4 Tamaño de la muestra

En el contexto técnico de la investigación sobre los cultivos de cacao en la provincia de Orellana, se implementó un enfoque riguroso para abordar la variabilidad inherente en las condiciones de los cultivos. La estrategia adoptada consistió en la selección de una muestra aleatoria, cuidadosamente diseñada para proporcionar una representación equitativa de la población afectada. Este método busca minimizar sesgos y garantizar la validez estadística de los resultados obtenidos. La elección de una muestra aleatoria contribuye a la generalización de los hallazgos, permitiendo extrapolaciones confiables sobre la variabilidad genética y las condiciones agronómicas en las áreas de cultivo de cacao evaluadas en la provincia, lo que a su vez fortalece la robustez y la aplicabilidad de los resultados de la investigación

3.2.5 Proceso de selección de la muestra

Para el desarrollo de esta investigación, se procedió a seleccionar la muestra utilizando un enfoque de muestreo no probabilístico, específicamente por conveniencia. La elección de este método se basó en la accesibilidad y disponibilidad de las áreas de cultivo de los genotipos CCN51, Nacional y Super Árbol en las principales zonas productoras de la provincia de Orellana. La conveniencia de acceso a estas ubicaciones facilitó la recolección de datos de manera eficiente, permitiendo una representación práctica de la población estudiada. Aunque este enfoque conlleva limitaciones en términos de generalización, se optó por la conveniencia con el objetivo de maximizar la eficacia y la viabilidad logística del estudio, garantizando al mismo

tiempo la obtención de información valiosa para la investigación sobre efectos antagónico de los microorganismos sobre los cultivos de cacao en la región.

3.3 Los métodos y las técnicas

3.3.1 Comparar la diversidad de hongos y bacterias aisladas de frutos de cacao

Diversidad fúngica asociada a frutos de *T. cacao* de la provincia de Orellana.

En este estudio se utilizaron alrededor de 59 muestras de frutos de cacao de variedades tradicionales de cacao (CCN51, Nacional y Super Árbol), los cuales provinieron de productores de cacao de la región norte de la Amazonía ecuatoriana. Para el proceso de aislamiento de hongos asociados a los frutos de cacao se tomaron pequeñas muestras de los frutos sanos con un bisturí esterilizado, de cada fruta se tomaron cinco fragmentos de aproximadamente 25 mm² de tejido (considerando un 50 % de tejido sano y 50% de tejido enfermo). Los cortes fueron lavados con agua corriente y posteriormente se colocaron sobre toallas de papel estériles y en una cámara de flujo laminar hasta su secado. Los fragmentos posteriormente fueron sometidos a un proceso de desinfección en alcohol al 70% durante 30 s, luego en hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril durante un periodo de 30 s, los fragmentos fueron colocados de nuevo sobre toallas de papel estériles para un secado final. Una vez secados los fragmentos se transfirieron a palcas de Petri que contenían un medio papa dextrosa agar (PDA, Difco ®) con 25 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol y 25 µg.mL⁻¹ de estreptomycin. Las cajas se incubaron a una temperatura de 26°C en condiciones de oscuridad durante 12 días. Los fenotipos de hongos resultantes fueron purificados mediante repicados sucesivos.

Para la identificación molecular de los hongos, la extracción de ADN fue realizada a partir de los cultivos monospóricos. El micelio se recolectó con una espátula esterilizada, se dejó secar sobre una hoja de papel estéril durante 30 min, se etiquetó para su almacenamiento y se cubrió con papel de aluminio, se guardó dentro de un sobre de papel, se selló y se colocó en una funda de plástico. La muestra de micelio se mantuvo a -40°C durante 24 h. Posteriormente el micelio se maceró con nitrógeno líquido en un mortero y pistilo estéril, el resto del proceso de extracción fue realizado

con el Kit de extracción de ADN genómico Wizard de PROMEGA®, según el protocolo descrito por el fabricante.

Por PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) se amplificaron las regiones internas ITS4 e ITS1 de los genes ribosomales (ARN) 18S–5.8S y 5.8S–28S; esto con los cebadores universales ITS4 (3'-TCTCCTCCGTTTTATTGATATATGC-5') e ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (White *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Professional estándar (Eppendorf®, Alemania) en un volumen final de 25 µL con los siguientes reactivos: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl₂ 0.75 mM, dNTP's 0.2 mM, Taq DNA polymerase 1U (Promega®, USA), 10 µM de cada iniciador y 50 ng de ADN total. El programa de amplificación fue el siguiente: 96 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 45 s; seguido de una extensión final a 72°C por 4 min. Se verificó la presencia del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, la tinción se realizó con diamond dye (Promega®, USA), (5 mg L⁻¹) y los geles se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad®, USA). Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones (5'– 3' y 3'– 5') por la compañía Macrogen Korea. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Chromas versión 2.6.6 y se alinearon con la base de datos del GenBank-NCBI (NCBI, 2019).

Los aislados identificados fueron utilizados para el análisis de diversidad fúngica asociada a las diferentes localidades de la provincia de Orellana, utilizando una matriz de abundancia relativa de géneros, posteriormente estos géneros fueron agrupados en OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales). Los análisis de diversidad de hongos fueron calculados utilizando los Índices de Diversidad (ID). La diversidad Alfa (la diversidad que existe dentro de cada muestra) fue calculada utilizando la serie de Hill, que lleva en consideración el número efectivo de OTUs para calcular la riqueza (q=0), diversidad de Shannon (q=1) y la diversidad de Simpson (q=2) usando la librería iNEXT en el programa R 3.6.

Diversidad bacteriana asociada a frutos de *T. cacao* de la provincia de Orellana.

Para el aislamiento de bacterias se usó un procedimiento similar al de hongos en cuanto a la desinfección de los fragmentos de frutos de cacao, pero una vez desinfectados estos fueron colocados sobre toallas de papel estériles dentro de la cabina de flujo laminar hasta su completo secado, posteriormente en morteros de 100 mL estériles y con aproximadamente 3 mL de agua destilada estéril, los fragmentos fueron macerados y del macerado con una asa de platina se tomó una gota de la suspensión para posteriormente hacer un estriado simple en cajas de Petri estériles con medio agar nutritivo (Difco®). Luego las cajas de Petri fueron incubadas a 28°C durante 48 h. Los diferentes fenotipos bacterianos obtenidos fueron purificados mediante repicados sucesivos.

Para la identificación molecular de bacterias, la extracción de ADN fue realizada a partir de los cultivos bacterianos purificados. Una pequeña porción de colonia bacteriana fue tomada con un asa de platina estéril y se transfirió a un microtubo de 1,5 mL con agua destilada estéril. El resto del proceso de extracción fue realizado con el Kit de extracción de ADN genómico OMEGA E.Z.N.A®, según el protocolo descrito por el fabricante.

Por PCR se amplificaron las regiones asociadas a los genes ribosomales (ARN) 16S–5.8S y 5.8S–28S; esto con los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492 R (3'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-5'). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Professional estándar (Eppendorf®, Alemania) en un volumen final de 25 µL con los siguientes reactivos: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl₂ 0.75 mM, dNTP's 0.2 mM, Taq DNA polymerase 1U (Promega®, USA), 10 µM de cada iniciador y 50 ng de ADN total. El programa de amplificación fue el siguiente: 95 °C por 4 min, 30 ciclos a 94 °C durante 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 60 s; seguido de una extensión final a 72°C por 10 min. Se verificó la presencia del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, la tinción se realizó con diamond dye (Promega®, USA), (5 mg L⁻¹) y los geles se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad®, USA). Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones (5'–3' y 3'–5') por la compañía MacroGen Korea. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Chromas versión 2.6.6 y se alinearon con la base de datos del GenBank-NCBI (NCBI, 2019).

3.3.2 Pruebas *in vitro* para determinar el potencial antagonista de los microorganismos frente a *Moniliophthora roreri*.

Hongos

Se realizaron confrontaciones en donde se evaluó el nivel de antagonismo de 9 cepas de *Trichoderma* sp. frente a 21 cepas de *M. roreri in vitro*, mediante el método de cultivo dual en cajas Petri en medio de cultivo V8, con un sorbete esterilizado se procedió a colocar discos de 5 mm de micelio en cada extremo de la caja petri dejando 1 cm al borde de cada una, y se incubó a 25° C. El crecimiento diametral de las colonias tanto del patógeno como de los antagonistas fue cuantificado cada 24h con un calibrador digital. Para el tipo de antagonismo se utilizó la escala de Bell et al., (1982) (Tabla 6).

Tabla 6

Escala de evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp.

GRADO	CAPACIDAD ANTAGÓNICA
1	<i>Trichoderma</i> coloniza el 100% de la superficie del medio y crece sobre el fitopatógeno
2	<i>Trichoderma</i> coloniza dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y limita el crecimiento del fitopatógeno
3	<i>Trichoderma</i> y el fitopatógeno colonizan cada uno la mitad de la superficie ningún hongo domina
4	El fitopatógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y limita el crecimiento de <i>Trichoderma</i>
5	El fitopatógeno coloniza el 100% de la superficie del medio y crece sobre el <i>Trichoderma</i>

Bacterias

Para probar el potencial de antagonismo de bacterias obtenidas de frutos de cacao de la provincia de Orellana, se usaron tres cepas de *M. roreri* y 12 cepas de bacterias asociadas a frutos de cacao.

Tabla 7*Moniliophthora roreri* utilizadas en el estudio**Cepas de *Moniliophthora roreri* utilizadas en el estudio**

CEPA	CÓDIGO	LOCALIDAD	GENOTIPO DE CACAO
C8	OS-SC-03-A1	Joya de los Sachas	Tipo nacional
C10	OL-03-A1	Loreto	Super árbol
C18	O-FO-03-A1	Francisco de Orellana	CCN51

Tabla 8**Cepas de bacterias utilizadas en el estudio**

CEPA	CÓDIGO	LOCALIDAD	GENOTIPO DE CACAO
B6	O-FO-03-A2-M-S	La Belleza	CCN51
B8	OS-LS-03-A2-M-S	La Calumeña	Super árbol
B10	OS-UM-03-A2-M-E	La Calumeña	Super árbol
B14	OS-SC-03-A2-M-E	INIAP EECA	Tipo Nacional
B18	OS-SC-03-A6-M-E	INIAP EECA	Tipo Nacional
B23	O-FO-05-A5-M-S	La Belleza	CCN51
		Unión	
B25	O-UM-05-A2-MS-E	Milagreña	Super árbol
	O-UM-05-A10-MS-	Unión	
B33	E	Milagreña	Super árbol
B37	OL-07-A2-M-S	Bajo Huiruno	CCN51
B40	OS-LS-07-A1-M—S	La Calumeña	Super árbol
B46	JS-EECA-A2-M-E	INIAP EECA	Tipo Nacional
B48	JS-EECA-A4-M-E	INIAP EECA	Tipo Nacional
B53	O-FO-09-A2-M-S	La Belleza	CCN51
		Unión	
B59	OS-UM-09-A2-M-S	Milagreña	CCN51
B64	OS-LS-09-A3-M-E	La Calumeña	CCN51

B68	OS-R-09-A3-M-E	Tomebamba	CCN51
B69	OS-R-09-A4-M-E	Tomebamba	CCN51
B71	OS-SC-09-A1-M-E	INIAP EECA	Tipo Nacional

Para determinar el potencial antagonista de las bacterias obtenidas de frutos de cacao, se llevaron a cabo ensayos de confrontación utilizando la técnica de siembra dual, enfrentando *Moniliophthora roreri* como patógeno, con 12 cepas bacterianas como antagonistas, en medio de cultivo V8 modificado y en medio de cultivo KADO 523. En este proceso, se sembraron discos de micelio de 5 mm de diámetro del patógeno en el centro de la caja Petri. Luego de 6 días de crecimiento de *M. roreri* se procedió a realizar un estriado con la bacteria antagonista tomada con puntas de micropipetas que se colocó en la parte superior e inferior de la caja Petri, y se procedió a incubar las cajas Petri a una temperatura de 25 °C durante 4 días. El crecimiento diametral del patógeno fue medido cada 24 h con un calibrador digital.

3.3.3 Caracterización molecular de los hongos asociados a la Moniliasis del cacao en la provincia de Orellana.

Para el aislamiento de *Moniliophthora roreri*, se tomaron frutos de cacao con sintomatología y esporulación del hongo, posteriormente en la cámara de flujo laminar con una aguja hipodérmica estéril se tomaron esporas directamente de los frutos las cuales fueron transferidas directamente a cajas de Petri con medio de cultivo PDA (Difco ®) con ampicilina a una concentración de 50 µg.mL⁻¹. Luego las cajas se incubaron a una temperatura de 28 °C en condiciones de oscuridad durante 15 días. Una vez obtenidas las cepas de *M. roreri*, estas fueron purificadas mediante repicados sucesivos.

Para la identificación molecular de las cepas de *M. roreri*, la extracción de ADN fue realizada a partir de los cultivos monospóricos. El proceso de extracción de ADN fue realizado con el Kit de extracción de ADN genómico Wizard de PROMEGA®, según el protocolo descrito por el fabricante.

Por PCR se amplificaron las regiones internas ITS4 e ITS5 de los genes ribosomales (ARN) 18S–5.8S y 5.8S– 28S; esto con los cebadores universales ITS4 (3'- GGA AGTAAA AGTCGTAACAAGG -5') e ITS5 (5'- TCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador

Professional estándar (Eppendorf[®], Alemania) en un volumen final de 25 µL con los siguientes reactivos: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl₂ 0.75 mM, dNTP's 0.2 mM, Taq DNA polymerase 1U (Promega[®], USA), 10 µM de cada iniciador y 50 ng de ADN total. El programa de amplificación fue el siguiente: 96 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 45 s; seguido de una extensión final a 72°C por 4 min. Se verificó la presencia del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, la tinción se realizó con diamond dye (Promega[®], USA), (5 mg L⁻¹) y los geles se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad[®], USA). Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones (5'– 3' y 3'– 5') por la compañía Macrogen Korea. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Chromas versión 2.6.6 y se alinearon con la base de datos del GenBank-NCBI (NCBI, 2019).

Los aislados fueron inicialmente identificados por la verificación de la región ITS5-ITS4 en el banco de datos público GenBank, utilizando la herramienta BLAST nucleotide (Basic Local Alignment Search Tool). Los análisis filogenéticos fueron realizados con base en la identificación inicial del GenBank. Secuencias adicionales de especies de *Moniliophthora roreri* y *M. perniciosa* fueron seleccionadas a partir de las secuencias disponibles en el GenBank. Todas las secuencias recuperadas fueron alineadas con las secuencias de los aislados fúngicos obtenidos utilizando el software Muscle[®], implementado en el programa MEGA 11.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar; Stecher; Tamura, 2016). El árbol filogenético fue construido basado en el método de neighbor joining. Los parámetros utilizados fueron basados en el análisis bootstrap con 1000 réplicas.

3.3.4 Cuantificación de la sensibilidad de 23 aislados de *M. roreri* a productos de diferente modo de acción.

Las cepas utilizadas para la sensibilidad fueron obtenidas según se describe en el ítem 4.2.3. En la cámara de flujo laminar, se colocó el medio en cada caja petri y se dejó gelificar usando medio PDA, luego de lo cual se colocaron uno o dos discos de las 23 cepas en cada caja, para que se reactivaran y crecieran como cultivo puro.

Tabla 9 Descripción de las cepas de *M. royeri* usados en el presente estudio

Descripción de las cepas de *M. royeri* usados en el presente estudio

Cepa	Genotipo	Ubicación
C1	CCN51	Loreto
C2	CCN52	F. de Orellana
C3	Súper Árbol	J. de los Sachas
C4	Súper Árbol	J. de los Sachas
C5	Tipo Nacional	J. de los Sachas
C6	CCN51	F. de Orellana
C7	Tipo Nacional	J. de los Sachas
C8	Tipo Nacional	J. de los Sachas
C9	Súper Árbol	J. de los Sachas
C10	Súper Árbol	Loreto
C11	Súper Árbol	J. de los Sachas
C12	Súper Árbol	J. de los Sachas
C13	Súper Árbol	J. de los Sachas
C14	CCN51	F. de Orellana
C15	Tipo Nacional	J. de los Sachas
C16	Tipo Nacional	J. de los Sachas
C17	Tipo Nacional	J. de los Sachas
C18	CCN51	F. de Orellana
C19	CCN51	F. de Orellana
C20	CCN51	F. de Orellana

C21	CCN51	F. de Orellana
C22	Súper Árbol	J. de los Sachas
C23	CCN51	F. de Orellana

La solución madre para el enmendado de los medios de cultivo se realizó dentro de la cabina de flujo laminar, luego se tomó una pequeña cantidad del fungicida con una micropipeta, siempre que el fungicida estuviera en forma líquida (si eran fungicidas sólidos, se pesó en una balanza analítica), y se colocó en un vaso de precipitación, luego se agregó el agua destilada estéril faltante hasta completar los 10 mL, que es el volumen de la solución final, consecuentemente se obtuvo la dosis de 100 ppm.

Para proceder a la modificación del medio se disolvieron 0,918 mL de la solución fungicida de cada dosis en 45 mL de medio PDA para 3 repeticiones de cada una de las dosis en las que se trabajó (100; 10; 1; 0,1; 0,01 ppm), dispensando 15 mL de medio modificado en cada caja de Petri, excepto en el control en el que solo se dispensó medio sin fungicida. Entonces se cortaron discos de micelio con ayuda de pajitas estériles de 5,13 mm de diámetro, las cuales se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo enmendado, posteriormente se etiquetaron, se sellaron con papel film y se llevaron a la incubadora en oscuridad a una temperatura de 27 ± 2 °C hasta que el control llenó completamente la caja.

Para la determinación de la tasa de crecimiento micelial (TCM) de los aislados de *M. royeri* los datos de crecimiento se tomaron en función del número de horas y se dividieron por el número de días en los que el micelio llena completamente la caja ($TCM = \text{Crecimiento del micelio} / \text{Número de días}$).

Para la estimación de la dosis efectiva 50 (DE_{50}), a partir de las mediciones del diámetro de la colonia en los ensayos de crecimiento micelial, se utilizó para calcular el crecimiento para cada dosis de fungicida y para cada aislado y calculado mediante la regresión de los valores de la inhibición del crecimiento micelial versus el \log_{10} de la concentración de los fungicidas.

Para estimar el rango de sensibilidad de acuerdo con los fenotipos observados se utilizaron dos escalas: la primera correspondió a Gudmestad et al.,(2013), con la que

se evaluaron los fungicidas difenoconazol, azoxystrobin y boscalid; el segundo correspondió a Liu con el que se evaluó el sulfato de cobre.

Tabla 10

propuesta por Gudmestad et al.,(2013)

Escala de sensibilidad propuesta por Gudmestad et al.,(2013)

Sensibilidad	Rango
Muy sensible	<1,0 µg/ml
Sensible	1-5 µg/ml
Moderadamente resistente	5-20 µg/ml
Alta resistencia	20-100 µg/ml
Resistencia muy alta	> 500 µg/ml

Tabla 11

Escala de sensibilidad propuesta por Liu

Sensibilidad	Rango
Muy sensible	<10 µg/ml
Sensible	10-20 µg/ml
Moderadamente resistente	20-100 µg/ml
Alta resistencia	100-500 µg/ml
Resistencia muy alta	> 500 µg/ml

Para el análisis de los datos se utilizó el programa informático R con su interfaz Rstudio versión 4.3.1, donde se utilizó la biblioteca: librería (ec50estimator) la cual sirvió para calcular la dosis efectiva 50 o DE₅₀ de cada uno de los fungicidas utilizados a partir de las tasas de crecimiento de las distintas cepas de *M. royeri* en las diferentes concentraciones y diferentes productos.

CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

4.1 Análisis de los resultados

En este capítulo se van a describir los resultados más relevantes sobre cada uno de los objetivos específicos planteados.

4.1.1 Comparar la diversidad de hongos y bacterias aisladas de frutos de cacao

4.1.1.1 Diversidad fúngica asociada a frutos de *T. cacao* de la provincia de Orellana.

Se aislaron un total de 464 muestras fúngicas de frutos de *T. cacao*, que mostraron una esporulación adecuada para su identificación. La mayoría de los aislamientos se identificaron por sus características morfológicas, siendo los hongos más abundantes los del género: *Penicillium* sp. (27.8%), *Epicoccum* sp. (20.5%), *Lasiodiplodia* sp. (10.1%), *Trichoderma* sp. (9.91%) y *Fusarium* sp. (9.70%); y los menos frecuentes fueron *Nigrospora* sp., *Clonostachys* sp., *Diaporthe* sp., *Daldinia* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Alternaria* sp., *Purpureocillium* sp., *Coniochaeta* sp. y *Geotrichum*. Además, el 1.06% de los aislamientos no pudo ser identificado por género según se muestra en la tabla 12.

Tabla 12

Aislados fúngicos de frutos de *T. cacao* de la provincia de Orellana

Aislados fúngicos	Número de aislados	Frecuencia (%)
<i>Penicillium</i>	129	27.80
<i>Epicoccum</i>	95	20.47
<i>Lasiodiplodia</i>	47	10.13
<i>Trichoderma</i>	46	9.91
<i>Fusarium</i>	45	9.70
<i>Nigrospora</i>	25	5.39
<i>Clonostachys</i>	17	3.66
<i>Diaporthe</i>	16	3.45

<i>Daldinia</i>	11	2.37
<i>Neopestalotiopsis</i>	11	2.37
<i>Alternaria</i>	6	1.29
<i>Purpureocillium</i>	4	0.86
<i>Coniochaeta</i>	4	0.86
<i>Geotrichum</i>	2	0.55
NI	6	1.06

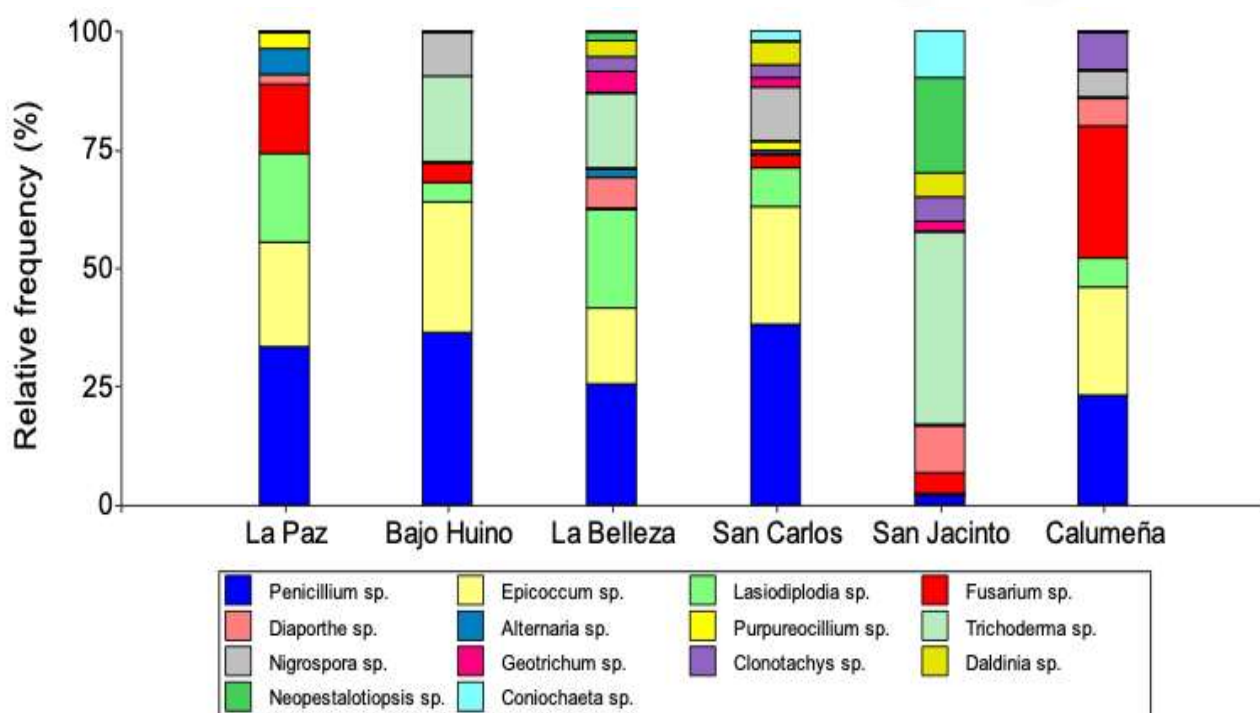
NI: no identificados

En el cantón de Loreto, se encontraron 13 géneros en las dos localidades, siete en La Paz y seis en Bajo Huino. En ambas localidades, se encontraron cuatro géneros en común (*Penicillium* sp.: 33.33 y 36.61%, *Epicoccum* sp.: 22.22 y 27.78%, *Lasiodiplodia* sp.: 18.52 y 4.17% y *Fusarium* sp.: 14.81 y 4.17%). Además, en las dos localidades, los hongos se agruparon en tres (*Diaporthe* sp.: 1.86, *Alternaria* sp.: 5.56 y *Purpureocillium* sp.: 3.7%) y dos (*Trichoderma* sp.: 18.05 y *Nigrospora* sp.: 9.72%) géneros diferentes, respectivamente. En el cantón Francisco de Orellana, en la localidad de La Belleza, en orden de abundancia, se determinaron diez géneros: *Penicillium* sp. (25.53%), *Lasiodiplodia* sp. (21.28%), *Trichoderma* sp. (15.96%), *Epicoccum* sp. (15.95%), *Diaporthe* sp. (6.38%), *Geotrichum* sp. (4.26%), *Clonostachys* sp. (3.19%), *Daldinia* sp. (3.19%), *Neopestalotiopsis* sp. (2.13%) y *Alternaria* sp. (2.13%). En La Joya de los Sachas, se identificaron 14 géneros y tres géneros en común en las tres localidades (*Penicillium* sp.: 38.14, 2.27 y 22.33%, *Fusarium* sp.: 4.12, 4.55 y 27.18% y *Clonostachys* sp.: 4.12, 4.55 y 7.77%). En San Carlos y La Calumeña, se encontraron tres géneros en común (*Epicoccum* sp.: 25.77 y 22.34, *Lasiodiplodia* sp.: 9.27 y 4.85%, *Nigrospora* sp.: 12.37 y 5.82%). En San Carlos y San Jacinto se identificaron dos géneros en común: *Coniochaeta* sp. (2.6 y 9.09%) y *Geotrichum* sp. (2.07 y 2.27%), así como en San Jacinto y La Calumeña, *Diaporthe* sp. (9.09 y 4.85%) y *Daldinia* sp. (6.28 y 4.85%). Además, en San Carlos y San Jacinto, se identificaron cuatro géneros más (dos por localidad), en San Carlos los géneros *Alternaria* sp. (1.04%) y *Purpureocillium* sp. (2.6%) y en San Jacinto *Trichoderma* sp. (40.91%) y *Neopestalotiopsis* sp. (20.14%). Finalmente, se encontraron hongos no identificados por género en la localidad La Belleza en Francisco de Orellana (4.26%) y en San Carlos en Joya de los Sachas (2.07%) como lo indica la figura 4

Figura 4

hongos aislados de frutos de

Abundancia relativa a nivel de género de hongos aislados de frutos de *T. cacao* en la provincia de Orellana.

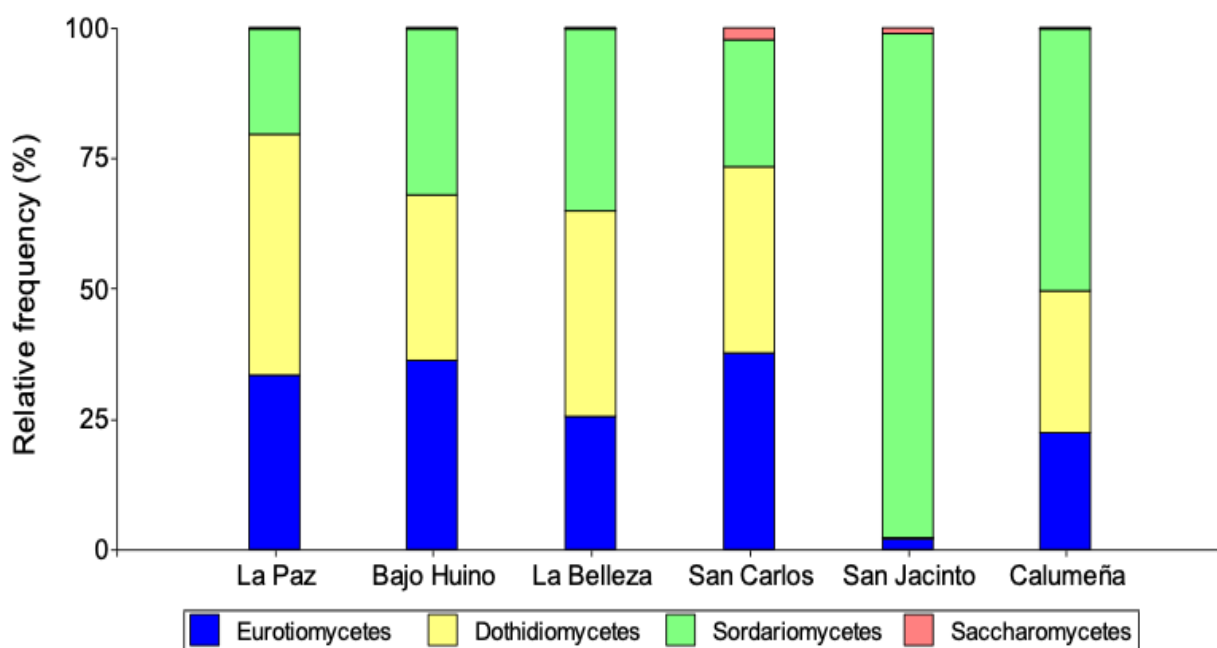


El análisis de la abundancia relativa para el grupo de microorganismos fúngicos identificados en las frutas de *T. cacao* permitió agruparlos en el filo fúngico Ascomycota. Por otro lado, el análisis por clase clasificó los hongos en Sordariomycetes (39.85%), Dothidiomycetes (31.89%), Eurotiomycetes (27.8%) y Saccharomyces (0.43%). Además, en las dos localidades (La Paz y Bajo Huino) del cantón Loreto, en Francisco de Orellana (La Belleza) y en dos localidades (San Carlos y La Calumeña) en La Joya de los Sachas, estuvieron presentes tres clases de hongos (Eurotiomycetes, Dothidiomycetes, Sordariomycetes); y Saccharomyces se identificó en dos localidades (San Carlos y San Jacinto) de La Joya de los Sachas.

En las localidades La Paz y Bajo Huino, los hongos se agruparon en Eurotiomycetes (33.33 y 36.12%), Dothidiomycetes (46.3 y 31.94%) y Sordariomycetes (20.37 y 31.94%), respectivamente. En el cantón de Francisco de Orellana, la clase más abundante fue Dothidiomycetes (39.09%), seguida de Sordariomycetes (35.11%) y finalmente Eurotiomycetes (25.53%). En el cantón de La Joya de los Sachas, en San Carlos, San Jacinto y La Calumeña, se identificaron Eurotiomycetes (38.14, 2.27 y 22.33%) y Sordariomycetes (24.74, 95.46 y 50.49%), respectivamente. Además, la clase Dothidiomycetes (36.09 y 27.18%) se identificó solo en San Carlos y La Calumeña; y Saccharomycetes (2.27 y 1.03%) en San Carlos y San Jacinto como lo resume la figura 5

Figura 5

Abundancia a nivel de clase de microorganismos fúngicos aislados de frutas de *T. cacao* en la provincia de Orellana.



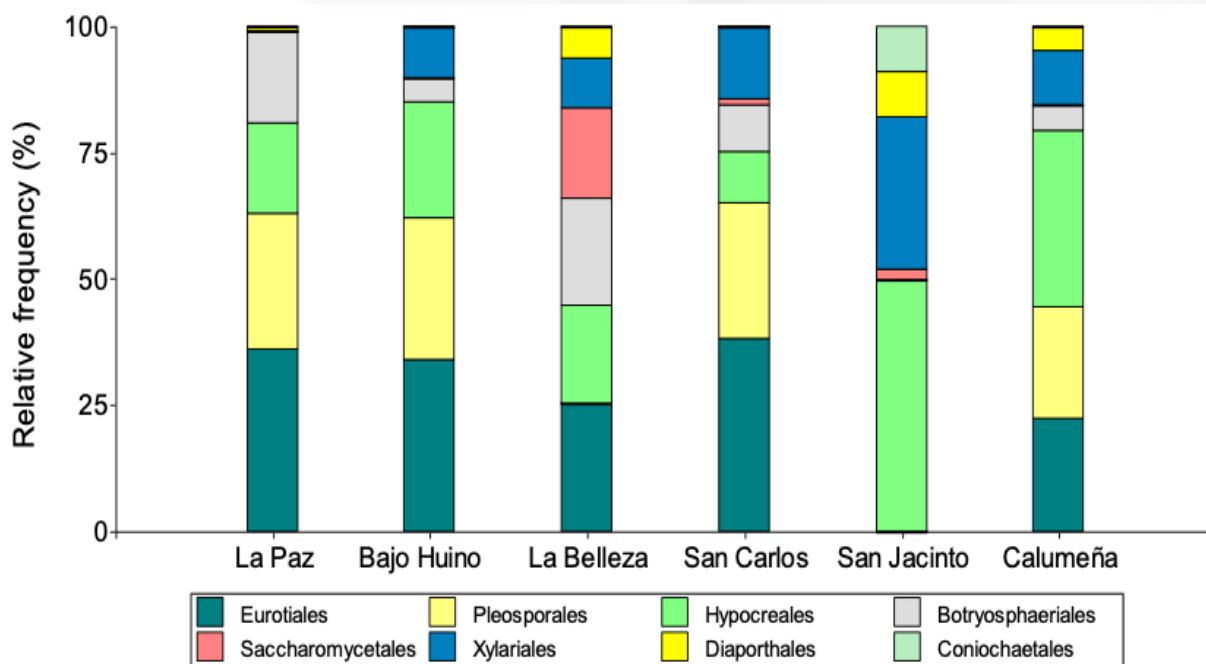
El análisis a nivel de orden permitió clasificar los hongos en siete órdenes. Eurotiales e Hypocreales (26.29 y 25.86%, respectivamente) estuvieron presentes en las seis localidades. Pleosporales, Xylariales y Botryosphaeriales (20.46, 11.95, 9.68%, respectivamente) solo se encontraron en cinco localidades. Diaporthales, Coniochaetales y Saccharomycetales (3.70 y 1.51, 0.55%, respectivamente) fueron

los órdenes de menor frecuencia y estuvieron presentes en cuatro y dos localidades, respectivamente.

Además, el mayor número de órdenes estuvo presente en los cantones Francisco de Orellana y La Joya de los Sachas, con seis en cada localidad. Por otro lado, en Loreto, en las dos localidades los hongos se agruparon en cinco órdenes. En La Paz y Bajo Huino hubo una mayor presencia de Eurotiales (36.11 y 33.33%), Pleosporales (27.68 y 27.78%) e Hypocreales (18.52 y 22.22%), respectivamente. Botryosphaeriales estuvieron presentes en mayor número en La Paz (18.52%) en comparación con Bajo Huino (4.17%). El orden Xylariales solo estuvo presente en Bajo Huino (9.72%) y Diaporthales en La Paz (1.85%). En Francisco de Orellana, los microorganismos fúngicos se agruparon en seis órdenes, siendo los más frecuentes Eurotiales (25.53%), Botryosphaeriales (21.28%), Hypocreales (19.16%), Saccharomycetales (18.08%), Xylariales (9.57%) y Diaporthales (6.38%). En La Joya de los Sachas, la abundancia de microorganismos fue muy variable por localidad. En San Carlos, los órdenes identificados fueron Eurotiales (38.15%), Pleosporales (26.8%), Xylariales (14.44%), Hypocreales (10.31%), Botryosphaeriales (9.27%) y Saccharomycetales (1.03%); en San Jacinto, los órdenes fueron Hypocreales (50%), Hylariales (34.95%), Diaporthales (9.1%), Coniochaetales (9.09%) y Saccharomycetales (2.27%); y, en La Calumeña, estuvieron presentes Hypocreales (34.96%), Eurotiales (22.33%), Pleosporales (22.33%), Hylariales (10.68%), Botryosphaeriales (4.85%) y Diaporthales (4.85%) como se aprecia en la figura 6.

Figura 6

Abundancia relativa a nivel de orden de microorganismos fúngicos aislados de frutos de T. cacao en la provincia de Orellana.



La abundancia relativa a nivel de familia permitió agrupar los microorganismos fúngicos en 15 familias. En orden de importancia, se encontró la presencia de Aspergillaceae (26.28%), Didymellaceae (19.01%), Hypocreaceae (12.49%), Botryosphaeriaceae (9.68%), Nectriaceae (9.13%), Apiosporaceae (4.65%), Sporocadaceae (3.76%), Diaporthaceae (3.70%), Bionectriaceae (3.27%), Hypoxylaceae (2.48%), Plesporaceae (1.46%), Coniochaetaceae (1.52%), Xylariaceae (1.06%), Ophiocordycipitaceae (0.96%) y Dipodascaceae (0.55%).

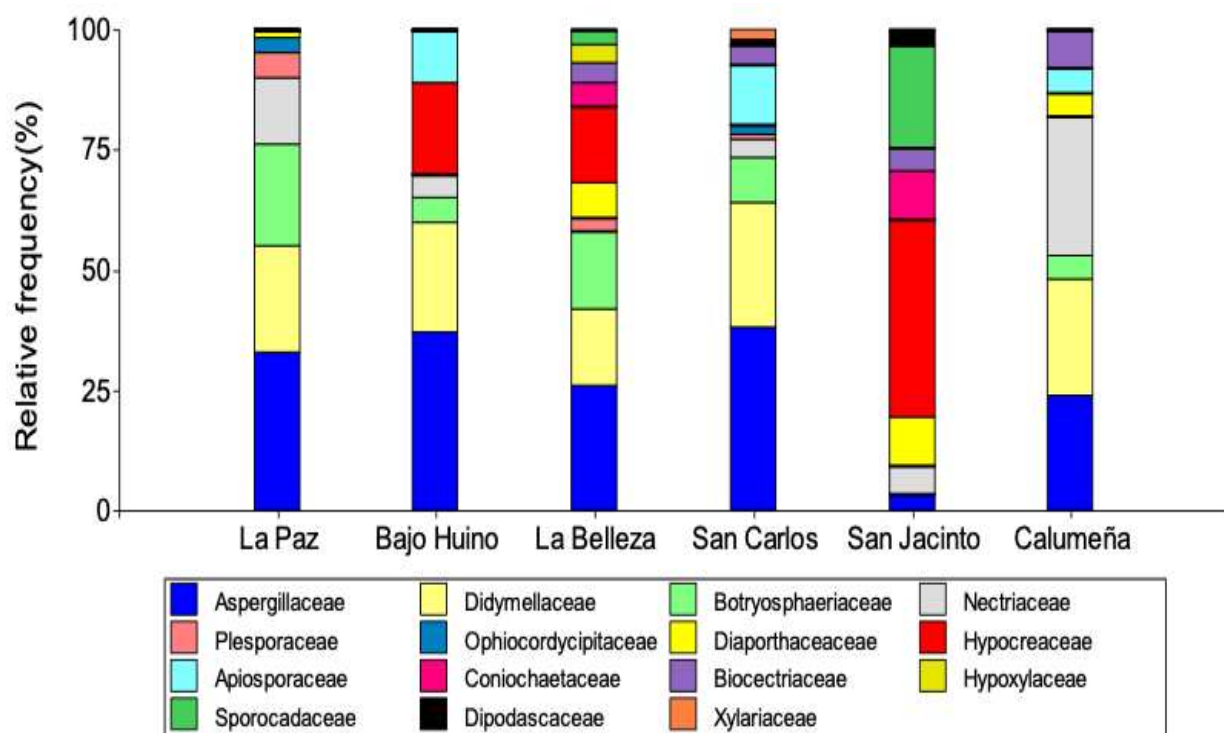
En el cantón de Loreto, en las dos localidades La Paz y Bajo Huino, los microorganismos se agruparon en 9 familias, siendo las más abundantes Aspergillaceae (33.33 y 36.11%) y Didymellaceae (22.22 y 22.78%); además, dos familias similares, pero menos abundantes se identificaron en los dos lugares: Botryosphaeriaceae (21.28 y 4.17%) y Nectriaceae (14.81 y 4.17%). En La Paz, se identificaron 3 familias (Plesporaceae 5.56%, Ophiocordycipitaceae 3.70% y Diaporthaceae 1.86%) que no estaban presentes en Bajo Huiruno; y dos que estaban presentes en Bajo Huiruno (Hypocreaceae 18.05% y Apiosporaceae 9.72%) pero no en La Paz. En el cantón Francisco de Orellana, en La Belleza, los microorganismos se agruparon en diez familias, cuatro similares a las del cantón Loreto y seis diferentes; Aspergillaceae (25.53%), Didymellaceae (15.95%) Botryosphaeriaceae (15.95%), Hypocreaceae (15.96%), Diaporthaceae (6.38%), Coniochaetaceae

(4.26%), Biocettriaceae (3.19%), Hypoxylaceae (3.19%), Plesporaceae (2.13%) y Sporocadaceae (2.13%) (Figura 4).

En el cantón de La Joya de los Sachas, en San Carlos, San Jacinto y La Calumeña, los microorganismos se agruparon en diez, nueve y ocho familias, respectivamente. En las tres localidades, las familias similares fueron: Aspergillaceae (38.14, 2.27 y 22.34%), Bionectriaceae (4.12, 4.55 y 7.77%) y Nectriaceae (4.12, 4.55 y 27.18%). San Carlos y La Calumeña presentaron tres familias idénticas: Didymellaceae (25.77 y 22.34%), Botryosphaeriaceae (9.27 y 4.85%), Apiosporaceae (12.37 y 5.82%); y, entre San Carlos y San Jacinto se identificó una familia similar Dipodascaceae (1.04 y 2.27%). Además, en San Jacinto y La Calumeña se identificaron dos familias idénticas: Diaporthaceae (9.09 y 4.85%) e Hypoxylaceae (6.28 y 4.85%). Finalmente, se identificaron tres familias más en San Carlos (Plesporaceae: 1.04%, Xylariaceae: 2.07% y Ophiocordycipitaceae: 2.06%) como en San Jacinto: Hypocreaceae 40.91%, Sporocadaceae 20.45% y Coniochaetaceae 9.09%, según se muestra en la figura 7.

Figura 7

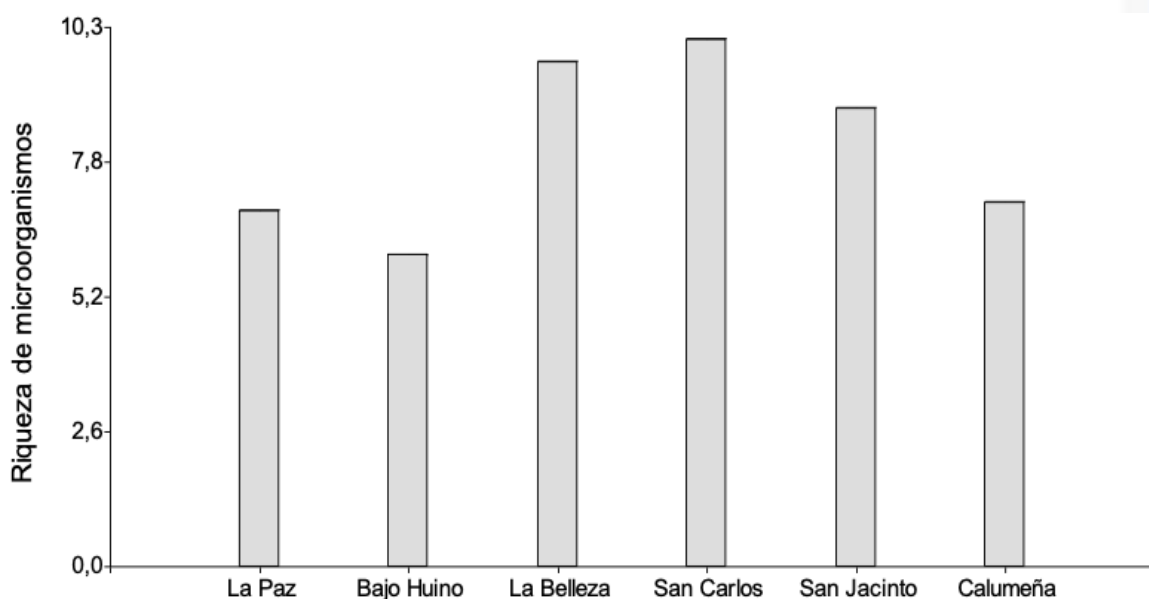
Abundancia relativa a nivel de familia de microorganismos fúngicos aislados de frutos de *T. cacao* en la provincia de Orellana.



Se encontró la mayor riqueza de microorganismos fúngicos en La Joya de los Sachas, con 14 géneros, seguido de Francisco de Orellana con 9 géneros y finalmente Loreto con 9 géneros. El análisis por localidad muestra que en La Paz y Bajo Huino estuvieron presentes 7 y 6 géneros, respectivamente. En La Belleza, se encontraron 10 de los 14 géneros identificados; y en San Carlos, San Jacinto y La Calumeña, estuvieron presentes 11, 9 y 7 géneros, respectivamente de acuerdo a lo presentado en la figura 8.

Figura 8

Riqueza de microorganismos fúngicos aislados de frutos de *T. cacao* en la provincia de Orellana.



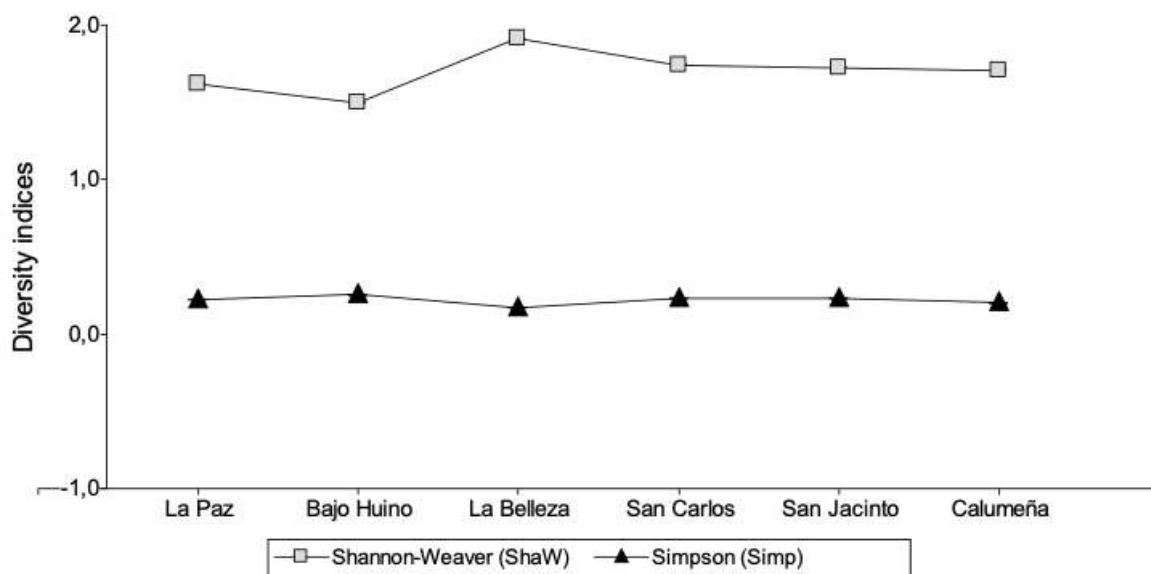
Los valores promedio registrados según el índice de Shannon en los cantones Loreto, Francisco de Orellana y La Joya de los Sachas fueron 1.76, 1.96 y 2.30 respectivamente. En La Paz, se registró un índice de diversidad (1.65) y en Bajo Huino (1.52). En La Belleza, cantón Francisco de Orellana, el índice de diversidad fue 1.96. Finalmente, en el cantón La Joya de los Sachas, la diversidad en San Carlos fue 1.80, en San Jacinto fue 1.76 y en La Calumeña fue 1.74. Según el índice de Shannon, la

población de muestra con el valor de diversidad más alto se encontró en el cacao presente en La Joya de los Sachas, con 2.30.

De acuerdo con el resultado del índice de Simpson, la población de muestra se encontró en Loreto con un valor de 0.21, en Bajo con un valor de 0.25, con una probabilidad más alta de individuos del mismo género. En Francisco de Orellana y La Joya de los Sachas, el índice de Simpson fue de 0.16 y 0.12, respectivamente, como lo presenta la figura 9

Figura 9

Índices de diversidad de microorganismos fúngicos aislados de frutas de *T. cacao* en la provincia de Orellana.



4.1.1.2 Diversidad bacteriana asociada a frutos de *T. cacao* de la provincia de Orellana.

La diversidad bacteriana obtenida en los frutos de cacao empleados en este estudio, se determinaron a partir de las secuencias obtenidas de nucleótidos y alineadas con la base de datos BLASTn del Centro Nacional de Información Biotecnológica arrojaron

resultados de 7 géneros diferentes en relación a las diferentes cepas bacterianas; siendo las cepas B6, B8, B10, B18, B25, B37, B53, B59, B68, B69 y B71 que correspondieron al género *Bacillus* sp. con un porcentaje de identidad promedio de 82,57%, seguido por la cepa B14 que fue representado por el género *Stenotrophomonas* sp. con un porcentaje de identidad promedio de 92,68%, las cepas B23 y B33 sobre llevados por el género *Sphingobacterium* sp. con un porcentaje de identidad promedio 86,83% , la cepa B40 corresponde al género *Mammaliococcus* sp, con un porcentaje de identidad del 91,12%, la cepa B46 por el género *Brucella* sp. con un porcentaje de identidad promedio 87,59%, la cepa B48 por el género *Achromobacter* sp con un porcentaje de identidad del 91,68% y finalmente, la cepa B64 por el género *Brachybacterium* sp. con un porcentaje de identidad del 89,76% como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13

Identificación molecular mediante análisis BLASTn de las cepas de bacterias obtenidas de frutos de *T. cacao* en la provincia de Orellana

Muestra	Código	Región amplificada	Género Identificado	Porcentaje de identidad	E-value
B6	O-FO- 03-A2- M-S	16s	<i>Bacillus</i>	91,44 %	0
B8	OS-LS- 03-A2- M-S	16s	<i>Bacillus</i>	87,74 %	0
B10	OS-UM- 03-A2- M-E	16s	<i>Bacillus</i>	92,75 %	0
B14	OS-SC- 03-A2- M-E	16s	<i>Stenotrophomonas</i>	92,64 %	0

B18	OS-SC- 03-A6- M-E	16s	<i>Bacillus</i>	96,56 %	0
B23	O-FO- 05-A5- M-S	16s	<i>Sphingobacterium</i>	95,51 %	8e ⁻⁷²
B25	O-UM- 05-A2- MS-E	16s	<i>Bacillus</i>	88,38 %	0
B33	O-UM- 05-A10- MS-E	16s	<i>Stenotrophomonas</i>	98,01 %	0
B37	OL-07- A2-M-S	16s	<i>Bacillus</i>	96,84 %	0
B40	OS-LS- 07-A1- M-S	16s	<i>Mammaliicoccus</i>	94,88 %	0
B46	JS- EECA- A2-M-E	16s	<i>Brucella</i>	97,13 %	8e ⁻⁹³
B48	JS- EECA- A4-M-E	16s	<i>Achromobacter</i>	93,94 %	0
B53	O-FO- 09-A2- M-S	16s	<i>Bacillus</i>	96,39 %	0
B59	OS-UM- 09-A2- M-S	16s	<i>Bacillus</i>	93,41 %	1e ⁻¹⁶⁸
B64	OS-LS- 09-A3- M-E	16s	<i>Brachybacterium</i>	89,72 %	2e ⁻¹³⁵

B68	OS-R- 09-A3- M-E	16s	<i>Bacillus</i>	84,69 %	1e ⁻¹⁶⁴
B69	OS-R- 09-A4- M-E	16s	<i>Bacillus</i>	82,3 %	2e ⁻¹⁴⁹
B71	OS-SC- 09-A1- M-E	16s	<i>Bacillus</i>	95,69 %	0

Del total de bacterias aisladas de frutos de *T. cacao* de la provincia de Orellana, el 66,67 % correspondieron al Phylum Bacillota, el 22,23% al Phylum Pseudomonadota, el 5,6% al Phylum Bacteroidota y el 5,5 % al Phylum Actinomycetota. El 66,67 % de bacterias pertenecieron a la Clase Bacilli, el 11,12 % a la Clase Gammaproteobacteria, el 5,6 % a la Clase Sphingobacteria, el 5,6 % a la Clase Alphaproteobacteria, el 5,6 % a la Clase Betaproteobacteria y el 5,5 % a la Clase Actinomycetes. Del total de bacterias el 61,1 % pertenecieron a la familia Bacillaceae, el 11,1 % a la familia Xanthomonadaceae, el 5,6 % a la familia Sphingobacteriaceae, el 5,6 % a la familia Staphylococcaceae, el 5,6 % a la familia Brucellaceae, el 5,6 % a la familia Alcaligenaceae y el 5,5 % a la familia Dermabacteraceae. Finalmente del total de bacterias asociadas a los frutos de *T. cacao* de la provincia de Orellana el 61,1 % pertenecieron al género *Bacillus*, el 11,1 % al género *Stenothopphononas*, el 5,6 % pertenecieron al género *Sphingobacterium*, el 5,6 % al género *Mammalicoccus*, el 5% al género *Brucella*, el 5,6 % al género *Achromobacter* y el 5,5 % al género *Brachybacterium*.

4.1.2 Evaluación *in vitro* para determinar el potencial antagonista de los microorganismos frente a *Moniliophthora roreri*.

4.1.2. Hongos

El análisis de varianza correspondiente al porcentaje de inhibición de las diferentes especies de *Trichoderma* sp. frente a las cepas de *M. roreri* determinó diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) para los 3 factores (especie de *Trichoderma* sp.,

cepa de *M.roreri*, y la interacción de los dos factores) según la tabla 14, con un coeficiente de variación de 23,4%.

Tabla 14

Inhibición de *Trichoderma*

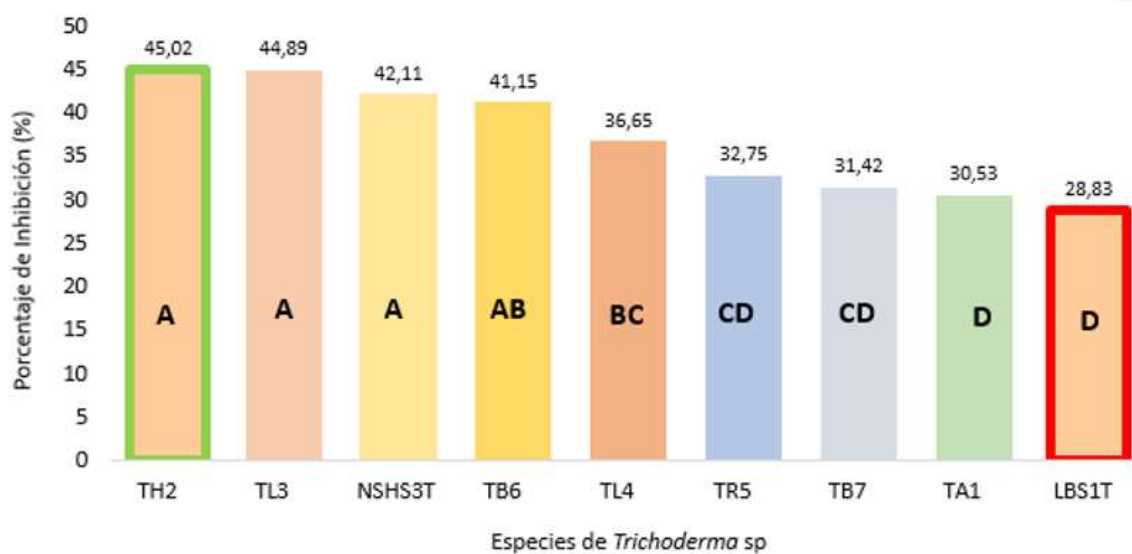
Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp. frente *Moniliophthora roreri*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Especie ¹	20650,19	8	2581,27	35,02	<0,0001
Cepa ²	12324,35	20	616,22	8,36	<0,0001
Especie*cepa ³	32310,74	160	201,94	2,74	<0,0001
Error	27860,59	378	73,71		
Total	93145,87	566			

¹ Especie de *Trichoderma* sp., ²Cepa de *M.roreri*, ³Interacción de especie de *Trichoderma* x cepa de *M. roreri*

Figura 10

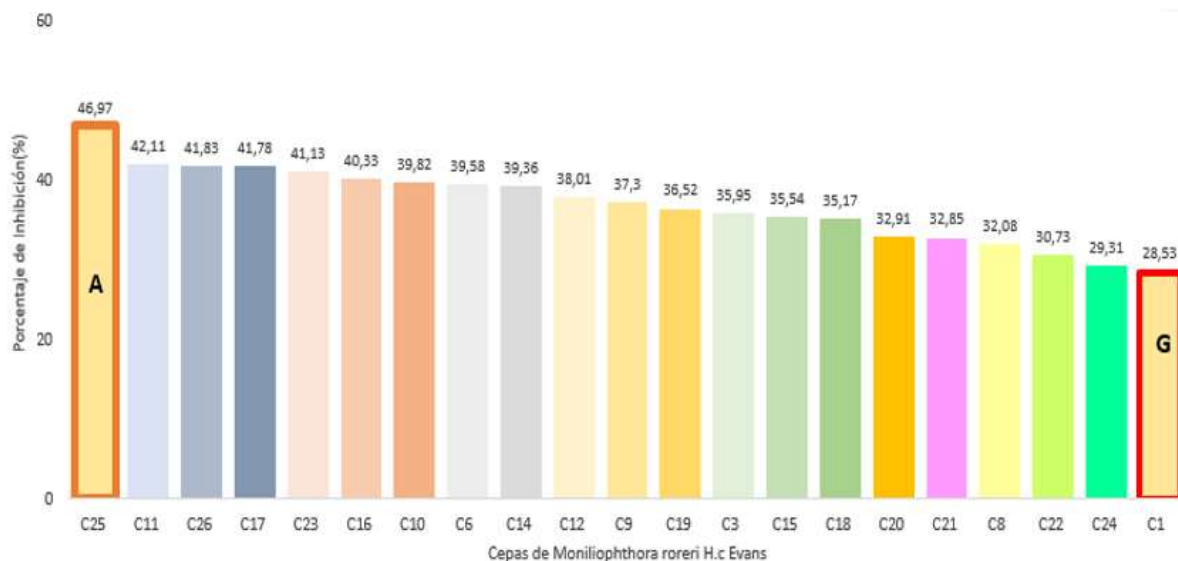
Prueba de Tukey al 5 % para el porcentaje de inhibición de las distintas cepas de *Trichoderma* sp. frente a *Moniliophthora roreri*



La prueba de Tukey al 5%, para el porcentaje de inhibición del factor especies de *Trichoderma* sp. frente a *M. royeri*, mostró cinco grupos, en el grupo A se determinaron 3 especies de *Trichoderma* sp. siendo estas: *T. harzianum* (cepa TH2) con el 45,02% de inhibición del crecimiento micelial de *M. royeri*, *T. lentiforme* (cepa TL3) con el 44,89%, y *T. harzianum* (cepa NSHS3T) con el 42,11%, para el grupo D las especies que inhibieron en menor porcentaje el crecimiento micelial de *M. royeri* son las especies de *T. andinanse* (cepa TA1) con el 30,53% de inhibición, y *Trichoderma* sp. (cepa LBST1) con el 28,53% de inhibición según lo indica la figura 10.

Figura 11

Prueba de Tukey al 5 % para el porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp. frente a 21 cepas de *M. royeri*.



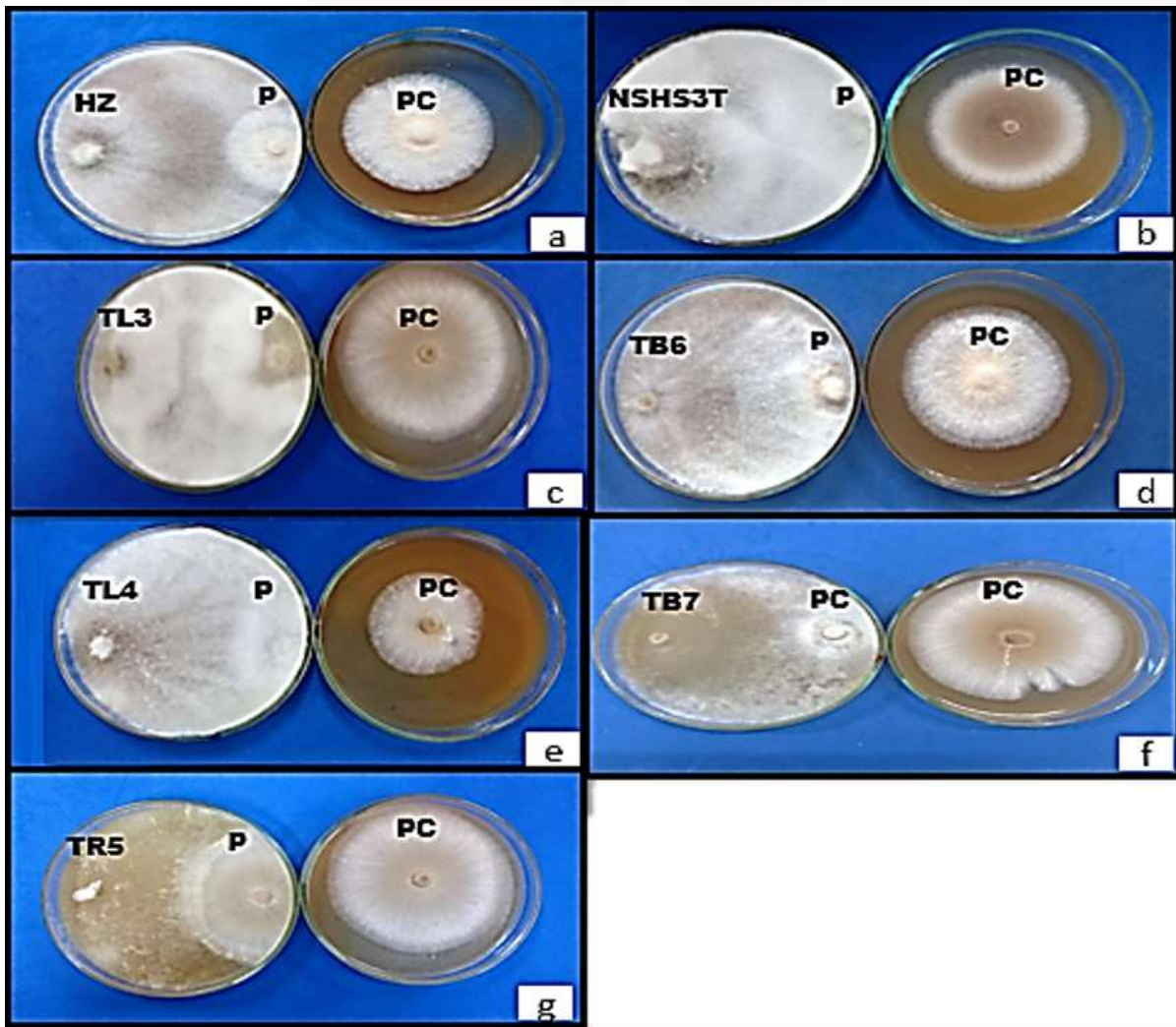
La prueba de Tukey al 5%, para el porcentaje de inhibición del factor cepas de *M. royeri* frente a *Trichoderma* sp. mostró doce grupos, sin embargo el grupo que presentó mayor nivel de significancia en el grupo A fue la cepa C25 con el 46,97% de inhibición correspondiente a una cepa de *M. royeri* obtenida del genotipo CCN51 de cacao de la localidad La Belleza del cantón Francisco de Orellana, el último grupo que presentó diferencias significativas lo constituye el grupo G siendo la de menor

porcentaje de inhibición representado por la cepa C1 con 28,53% de inhibición que correspondió a una cepa de *M.roreri* obtenida del genotipo CCN51 de la localidad La Paz del cantón Loreto según la figura 11.

La prueba de Tukey al 5%, para el porcentaje de inhibición del factor AXB (cepas de *M.roreri* frente a especies de *Trichoderma* sp.) mostró varios grupos, la interacción de *Trichoderma breve* frente a la cepa C26 de *M.roreri* proveniente de la localidad Getsemaní genotipo CCN51 del cantón Joya de los Sachas mostró el mejor porcentaje de inhibición de 66,57%, por otro lado la interacción que mostró menor porcentaje de inhibición fue la especie de *Trichoderma* sp. (LBST1) frente a la cepa C24 de la localidad de La Madgalena genotipo CCN51 del cantón Francisco de Orellana con el 17,53% de inhibición(Figura 10) se muestran a su vez los cultivos duales que mostraron menor porcentaje de interacción entre *Trichoderma* sp. vs *M.roreri* como se aprecia en la figura 12.

Figura 12

Cultivos duales de las mejores especies de *Trichoderma* sp



Nota : a) *Trichoderma harzianum* vs *M. roreri* b) *Trichoderma harzianum* obtenido de la provincia de Orella vs *M. roreri* c) *Trichoderma* sp. vs *M. roreri* d) *Trichoderma breve* vs *M. roreri* e) *Trichoderma longibrachatum* vs *M. roreri* f) *Trichoderma* sp. vs *M. roreri* g) *Trichoderma resei* vs *M. roreri*

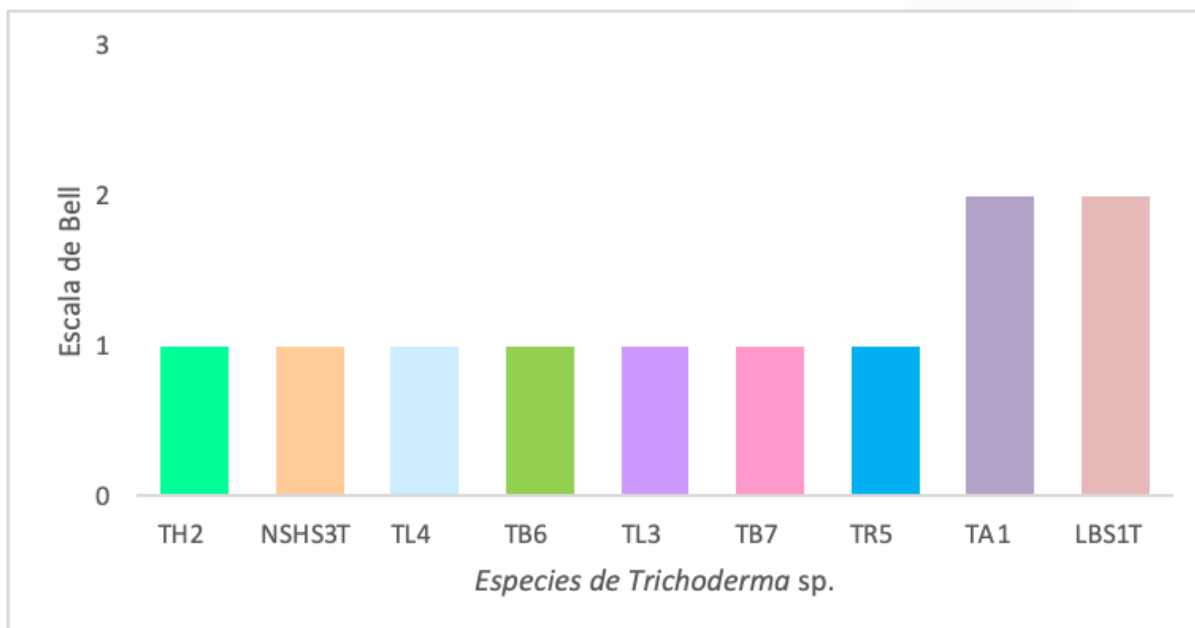
De acuerdo con la escala Bell et al (1982), los aislamientos se encontraron en las categorías I y II (Figura 11) de micoparasitismo siendo los de clase I: *T. harzianum* (TH2), *T. lentiforme* (TL3), *T. longibrachatum* (TL4), *T. resei* (TR5), *T. breve* (TB6), *T. harzianum* (NSHS3T) y dos cepas de *Trichoderma* sp. (B7), estos hongos demostraron su capacidad antagonica ya que colonizaron el 100% del medio de cultivo y crecieron sobre el fitopatógeno en su totalidad. Por otra parte, las especies de *Trichoderma* sp. de grado II, una cepa de *Trichoderma* sp. (LBS1T) y la especie de *T. andinanse* (TA1) en donde se observó que el antagonista coloniza las dos

terceras partes del medio de cultivo, y limitó el crecimiento del hongo *M.roreri* como lo señala la figura 13.

Figura 13

Trichoderma sp. y sus niveles de micoparasitismo según

Especies de *Trichoderma sp.* y sus niveles de micoparasitismo según la escala de Bell



4.1.3. Bacterias

El análisis de varianza correspondiente al factor A (cepas de *Moniliophthora roreri*), factor B (cepas bacterianas) y factor C (medios de cultivo) mostró un efecto significativo de los tratamientos ($P < 0,05$). Las interacciones A x B no mostraron un efecto significativo ($P > 0,05$). Por otro lado, las interacciones A x C, B x C y A x B x C si mostraron un efecto significativo de los factores en estudio ($P < 0,05$) como lo muestra la tabla 15.

Tabla 15

Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de bacterias vs *M. roreri*

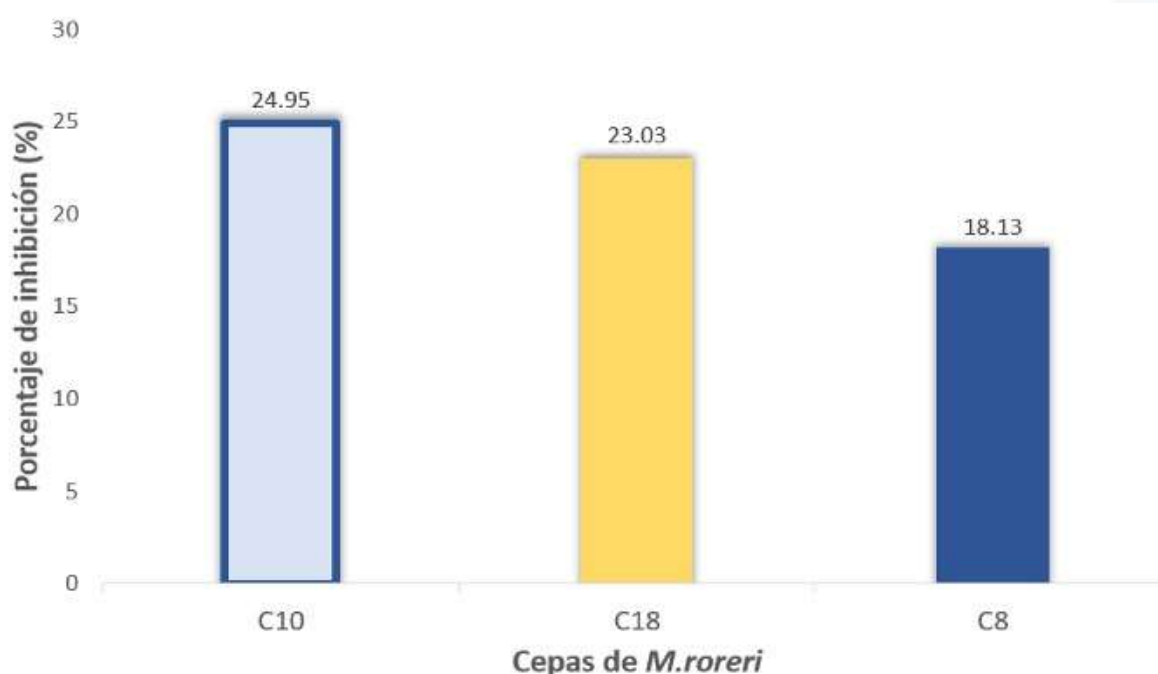
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Cepa	1785,25	2	892,63	13,5	$4,20 \times 10^{-6}$

Bacteria	4397,27	11	399,75	6,05	4,45 x10 ⁻⁸
Medio	9136,4	1	9136,4	138,19	2 x10 ⁻¹⁶
cepa*bacteria	1869,5	22	84,98	1,29	0,1907
cepa*medio	874,38	2	437,19	6,61	0,0018
bacteria*medio	5754,49	11	523,14	7,91	<0,0001
cepa*bacteria*me dio	2690,5	22	122,3	1,85	0,0172
Error	9520,75	144	66,12		
Total	36028,54	215			

4.1.3.1 Respuesta de inhibición para el factor A: Cepas de *M. royeri* (C8, C10, C18).

Figura 14

Porcentaje de inhibición de las cepas de *M. royeri*



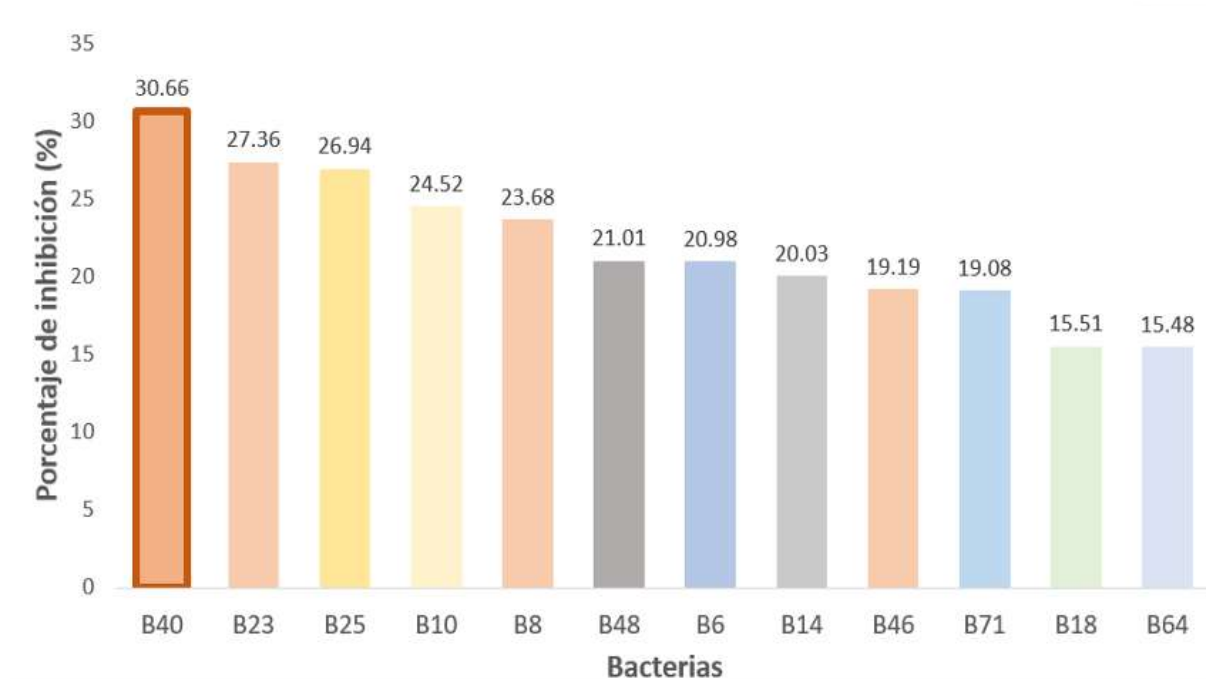
La cepa de *M. royeri* que obtuvo un mayor porcentaje de inhibición fue la C10, obtenida del genotipo de cacao Super Árbol proveniente del cantón Loreto con un porcentaje

de inhibición del 24,95%. La prueba de Tukey para las distintas cepas de *Moniliophthora roreri*, presentaron dos grupos estadísticos; en el grupo “a” se ubicaron las cepas C10 y C18, con un promedio de 23,99 % de inhibición; mientras que para el grupo “b” se observó a la cepa C8 con un promedio de inhibición del 18,13% como se aprecia en la figura 14

4.1.3.2. Respuesta de inhibición para el factor B: Cepas de Bacterias

Figura 15

Porcentaje de inhibición de las distintas cepas de bacterias asociadas a los frutos de *T. cacao* de la provincia de Orellana a *M. roreri*.



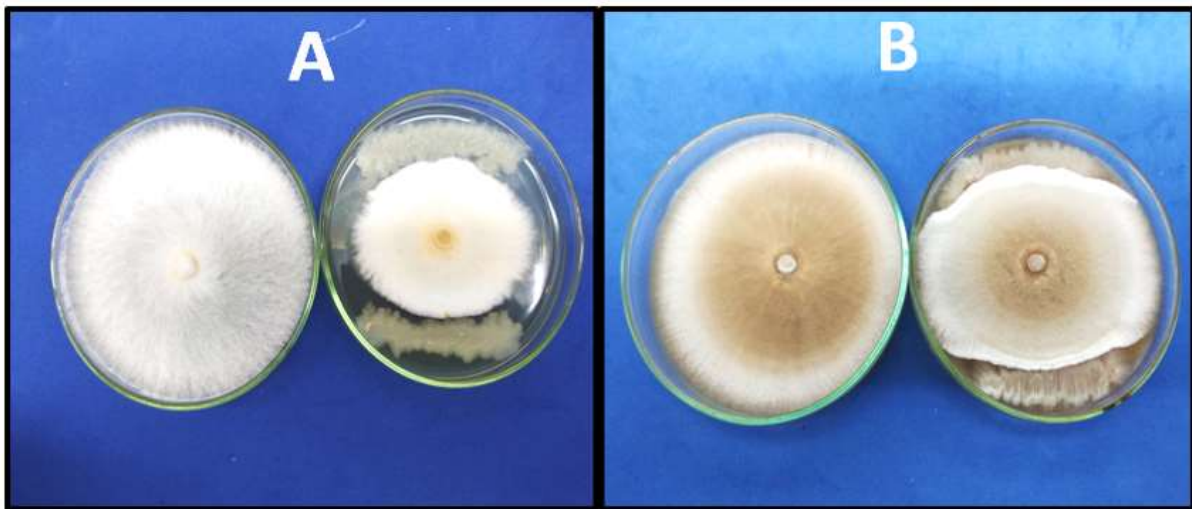
La bacteria del género *Mammaliicoccus* con el código B40 fue la que produjo el mayor porcentaje de inhibición (30,66%), esta bacteria fue obtenida del genotipo de cacao Super Árbol proveniente de la comunidad La Calumeña. La prueba de Tukey para las distintas cepas bacterianas mostró cinco grupos estadísticos; en el grupo “a” la cepa B40 (*Mammaliicoccus*), con una inhibición del 30,66%; para el grupo “ab” se mostraron las cepas B23, B25 y B10 (*Sphingobacterium*, *Bacillus B25* y *Bacillus B10*) con un valor promedio de 27,27% de inhibición; por otro lado el grupo “abc” en donde se ubicó a la cepa B8 (*Bacillus*) con un promedio de inhibición del 23,68 %; así

mismo en el grupo “bc” se encontró a las cepas B48, B6, B14, B46 y B71 (*Achromobacter*, *Bacillus* B6, *Stenotrophomonas*, *Brucella*, y *Bacillus* B71) con un valor promedio de inhibición de 20,06%; finalmente el grupo “c” tenemos a las cepas B18 y B64 (*Bacillus* B18 y *Brachy bacterium*) con un promedio de inhibición del 15,50% como se aprecia en la figura 15.

4.1.3.3. Respuesta de inhibición para el factor C: Medio (V8 modificado y KADO 523).

Figura 16

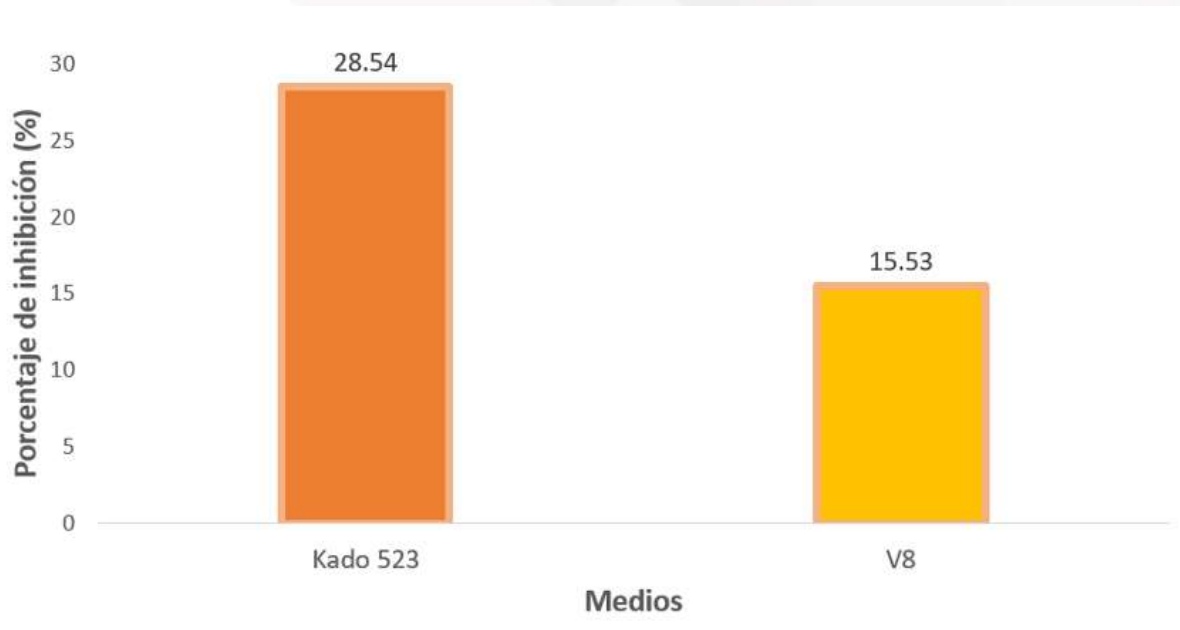
Antagonismo en medio KADO 523 (A) y medio V8 modificado (B)



El medio de cultivo en dónde se observó el mayor porcentaje de inhibición fue el medio KADO 523 con un porcentaje de inhibición del crecimiento de *M. roreri* del 28,54%.

Figura 17

Porcentaje de inhibición de acuerdo con el medio KADO 523 y V8 modificado.



La prueba de Tukey al 5% para el tipo de medio de cultivo, presentó dos grupos estadísticos; en el grupo “a” se ubicó al medio KADO 523, con un promedio de inhibición del 28,54%; mientras que para el grupo “b” encontramos al medio de cultivo V8 modificado con un promedio de inhibición del 15,53% según la figura 17.

4.1.3.4. Respuesta de inhibición para el factor A por el factor B

Figura 18

Interacción con mayor porcentaje de inhibición del factor A (Cepa de *M. roreri*) por el factor B (cepa de bacteria).

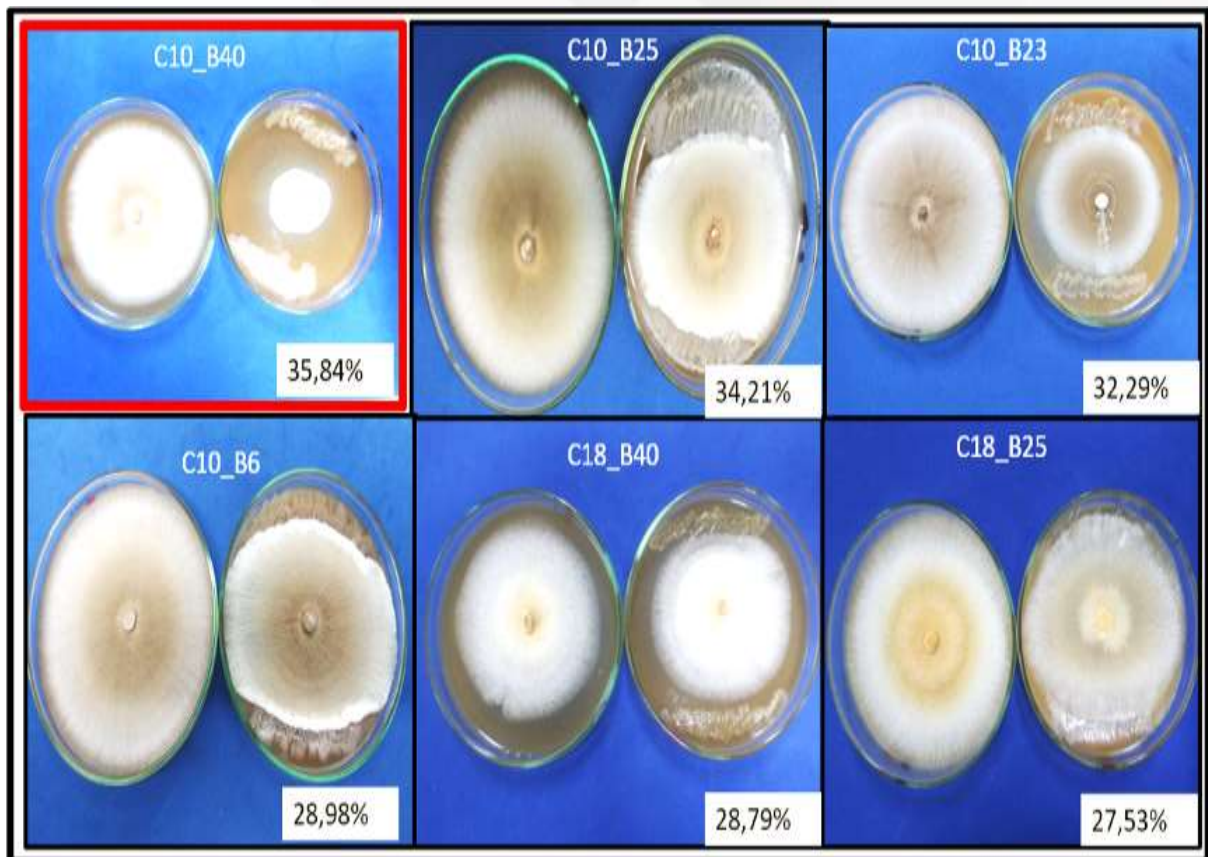
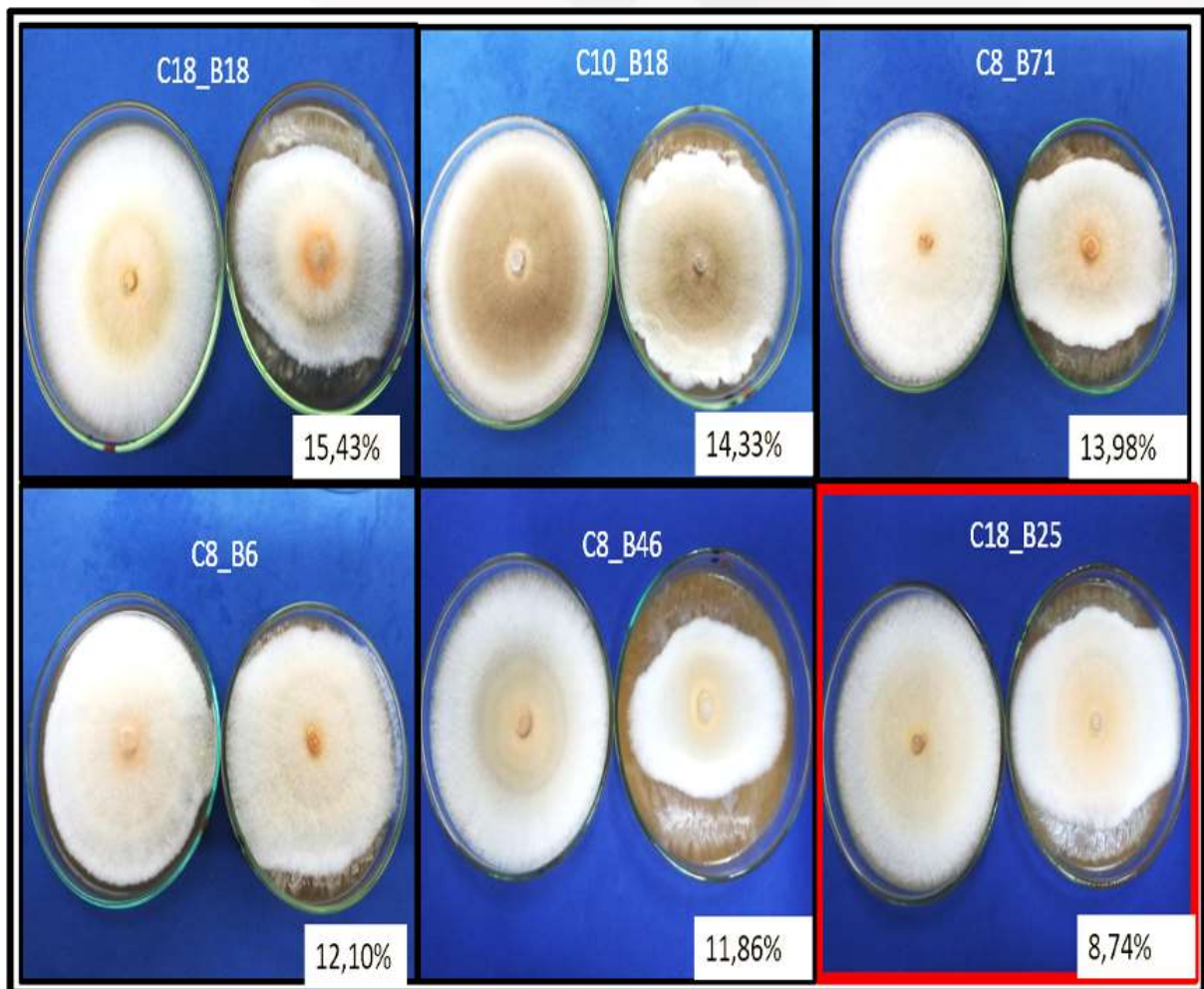


Figura 19

Interacción con menor porcentaje inhibición del factor A (Cepas de *M. royeri*) por el factor B (cepas de bacterias).



La interacción del factor A x B (cepas de *M. royeri* x cepas de bacterias) para la prueba de Tukey al 5% mostró nueve grupos; en el grupo “a” la interacción de la cepa C10 de *M. royeri* x bacteria B40 con un promedio de inhibición del 35,84 %, seguido por el grupo “ab” con la interacción de la cepa C10 de *M. royeri* x bacteria B25 con un promedio de inhibición del 35,21 %, el grupo “abcd” con la interacción de la cepa C10 de *M. royeri* x la bacteria B6, la interacción de la cepa C18 de *M. royeri* x la bacteria B40, cepa C18 de de *M. royeri* x la bacteria B25, cepa C8 de *M. royeri* x la bacteria B40 y de la cepa C18 de *M. royeri* x la bacteria B8 con un valor promedio de inhibición del 27,97 %, para el grupo “abcde” la interacción de la cepa C10 de *M. royeri* x la bacteria B10, interacción de la cepa C18 de *M. royeri* x la bacteria B10, la interacción de la cepa C8 de *M. royeri* x la bacteria B23, la interacción de la cepa C18 de *M. royeri* x la bacteria B46, la interacción de la cepa C18 de *M. royeri* x la bacteria B23, la interacción de la cepa C8 de *M. royeri* x la bacteria B8, la interacción de la cepa C18 de *M. royeri* x la bacteria B48, la interacción de la cepa C10 de *M. royeri* x la bacteria

B48, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B14, la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B6, la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B71, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B71, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B64, la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B10, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x las bacteria B46, la interacción de la cepa C18 x la bacteria B14, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B8, la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B25, la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B48 y la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x bacteria B14 con un promedio de inhibición del 22,07 %, el grupo “**bcde**” con la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B18 y la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B64 con un promedio de inhibición del 16,65%, el grupo “**cde**” con la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B18 y la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B18 con un promedio de inhibición del 14,88%, mientras que para el grupo “**de**” se encontró la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B71, la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B6 y la interacción de la cepa la C8 de *M. roreri* x la bacteria B46 con un valor promedio de inhibición del 12,65 5, finalmente el grupo “**e**” con la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B64 con un promedio de inhibición del crecimiento de *M. roreri* del 8,74 %.

4.1.3.5. Respuesta de inhibición para el factor A por el factor C

Figura 20

Interacción con mayor porcentaje de inhibición del factor A (Cepa de de *M. roreri*) por el factor C (Medio de cultivo)

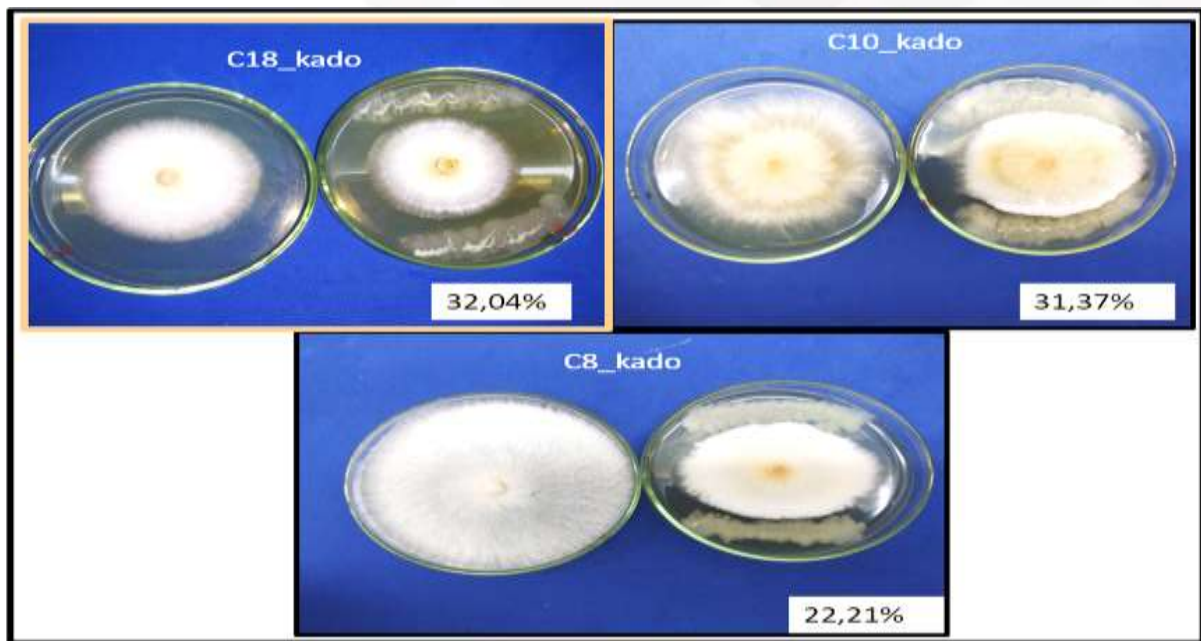
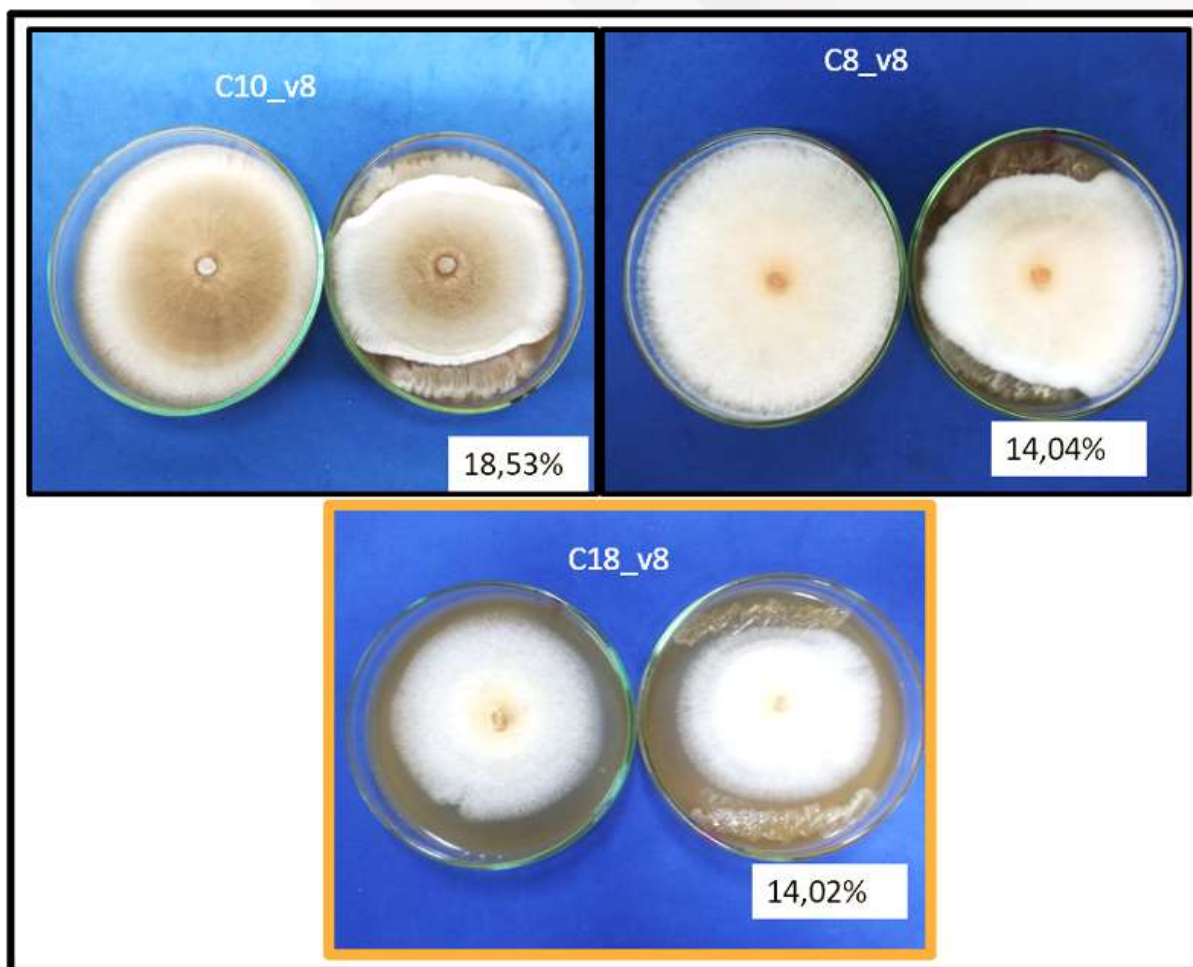


Figura 21

Interacción con menor porcentaje de inhibición del factor A (Cepa de *M. royeri*) por el factor C (Medio de cultivo).



En la prueba de Tukey al 5 % para la interacción cepa de *M. roreri* x medio de cultivo se presentaron cuatro grupos estadísticos; en el grupo “a” la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x el medio de cultivo KADO 523 y la cepa C10 de *M. roreri* x el medio de cultivo KADO 523 con un promedio de inhibición del 31,71 %, seguido por el grupo “b” con la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x el medio de cultivo KADO523 con un promedio de inhibición del 22,21 %, el grupo “bc” la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x el medio de cultivo V8 modificado con un promedio de inhibición del 18,53 %, por último, el grupo “c” con la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x el medio de cultivo V8 modificado y la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x el medio V8 modificado con un valor promedio de inhibición del 14,02 %.

4.1.3.6. Respuesta de inhibición para el factor B por el factor C

Figura 22 Interacción con mayor porcentaje de inhibición del factor B (Bacteria) por el factor C (Medio de cultivo)

Interacción con mayor porcentaje de inhibición del factor B (Bacteria) por el factor C (Medio de cultivo)

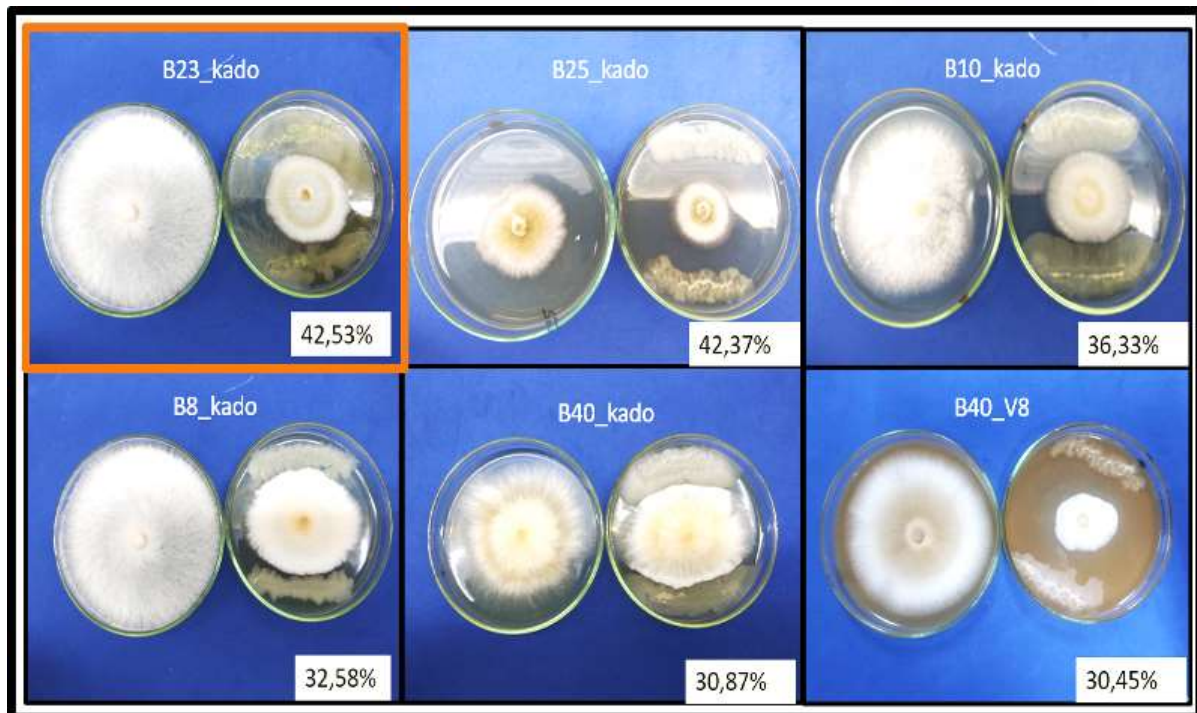
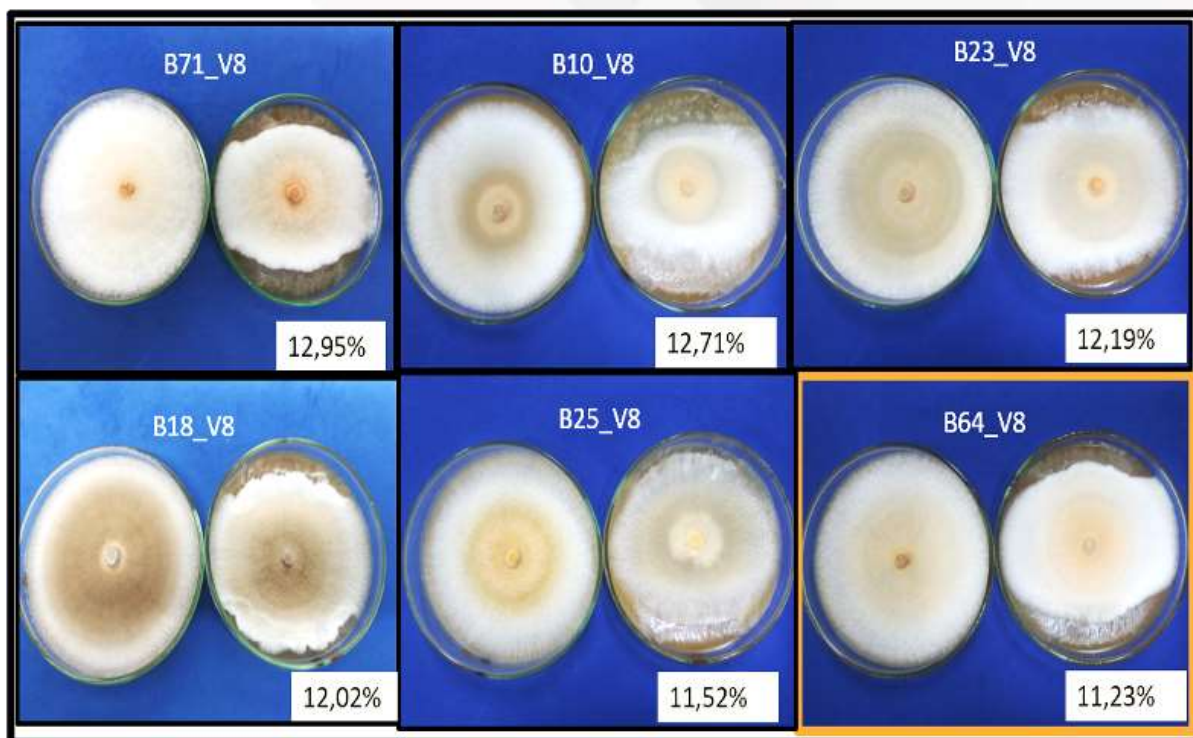


Figura 23 Interacción con menor porcentaje de inhibición del factor B (Bacteria) por el factor C (Medio de cultivo)

Interacción con menor porcentaje de inhibición del factor B (Bacteria) por el factor C (Medio de cultivo)



En la prueba de Tukey al 5 % para la interacción bacteria x medio de cultivo se observaron doce grupos estadísticos; en el grupo “a” la interacción de la bacteria B23 x el medio de cultivo KADO 523 y la interacción de la bacteria B25 x el medio de cultivo KADO 523 con un promedio de inhibición del 42,45 %, seguido por el grupo “ab” con la interacción de la bacteria B23 x el medio de cultivo KADO 523 con un promedio de inhibición del 36,33 %, el grupo “abc” con la interacción de la bacteria B8 x el medio de cultivo KADO 523 con un promedio de inhibición del 32,58 %, para el grupo “abcd” la interacción de la bacteria B40 x el medio de cultivo KADO 523 y la interacción de la bacteria B23 x el medio de cultivo V8 modificado con un promedio de inhibición del 30,66 %, el grupo “bcde” con la interacción de la bacteria B48 x el medio de cultivo KADO 523 con un promedio de inhibición del 27,52 %, el grupo “bcdef” la interacción de la bacteria B71 x el medio de cultivo KADO 523 con un promedio de inhibición del 25,21 %, el grupo “bcdefg” con la interacción de la bacteria B6 x el medio de cultivo KADO 523 y la interacción de la bacteria B6 x el medio de cultivo KADO 523 con un valor promedio de inhibición del 23,85 %, el grupo “cdefg” con la interacción de la bacteria B14 x el medio de cultivo V8 modificado, la interacción de la bacteria B64 x el medio KADO 523, la interacción de la bacteria B18 x el medio KADO 523 y la bacteria B14 x el medio de cultivo KADO 523 con un valor promedio de inhibición del 19,70 %, el grupo “defg” con la interacción de la bacteria

B6 x el medio V8 modificado con un promedio de inhibición del 17,42 %, el grupo “efg” con la interacción de la bacteria B46 x el medio V8 modificado, la interacción de la bacteria B8 x el medio V8 modificado y la interacción de la bacteria B48 x el medio V8 modificado con un valor promedio de inhibición del 14,83 %, el grupo “fg” con la interacción de la bacteria B71 x el medio V8 modificado, la interacción de la bacteria B10 x el medio V8 modificado, la interacción de la bacteria B23 x el medio V8 modificado, la interacción bacteria B18 x el medio V8 y la interacción bacteria B25 x el medio V8, con un valor promedio de inhibición del 12,28 %, finalmente, el grupo “g” con la interacción de la bacteria B64 x el medio V8 modificado con un promedio de inhibición del 11,23%

4.1.3.7. Respuesta de la inhibición para el factor A x B x C.

Figura 24

Interacción con mayor porcentaje de inhibición del factor A (cepa de *M. royeri*) por el factor B (cepa de bacteria) y por el factor C (Medio de cultivo).

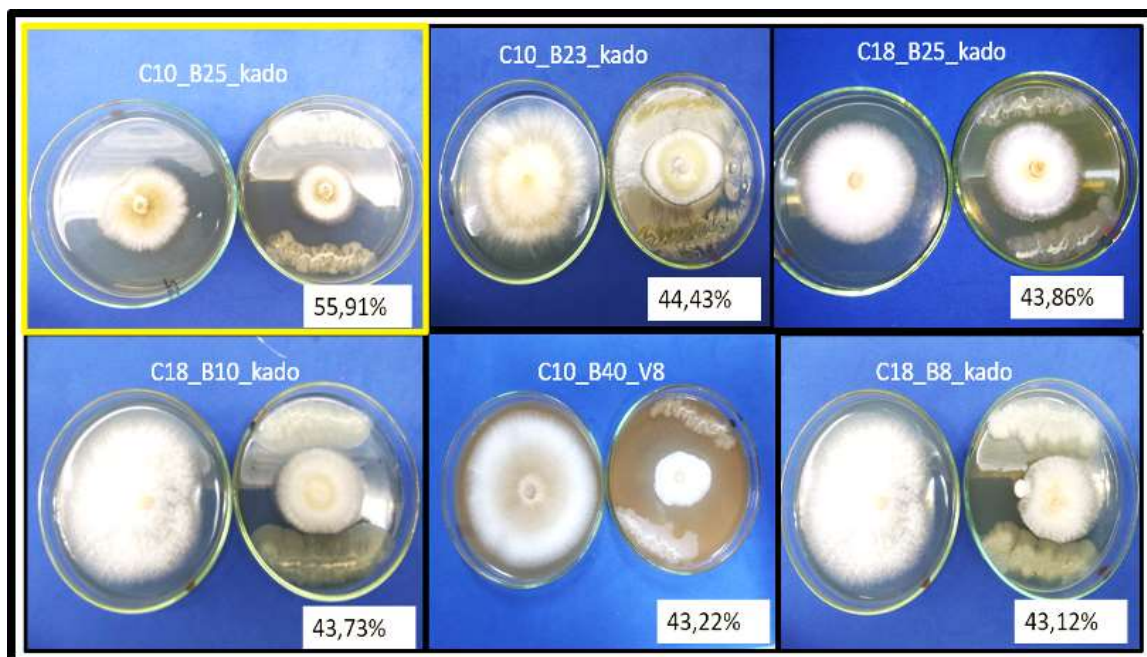
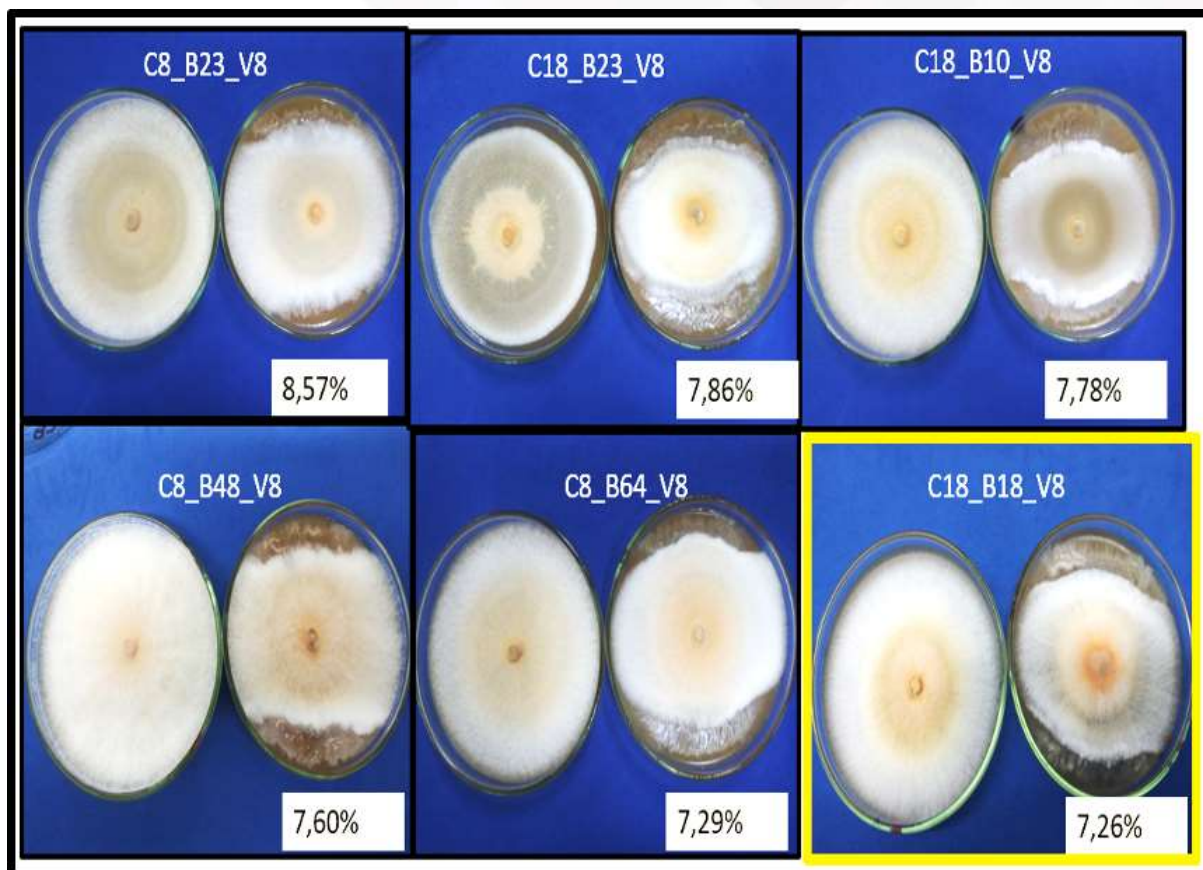


Figura 25

Figura 25

Interacción con menor porcentaje de inhibición del factor A (cepa de *M. royeri*) por el factor B (cepa de bacteria) y por el factor C (Medio de cultivo).



En la prueba de Tukey al 5 % para la interacción cepa de *M. roreri* x cepa de bacteria x medio de cultivo se observaron catorce grupos estadísticos. En el grupo “a” se observó la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B25 x el medio de cultivo KADO 523 con un promedio de inhibición del 55,91 %, seguido por el grupo “ab” con la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B23 x el medio KADO 523 y la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B25 x el medio KADO 523 con un valor promedio de inhibición del 44,15 %, el grupo “abc” con la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B10 x el medio KADO 523 con un promedio de inhibición del 43,73 %, el grupo “abcd” con la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B40 x el medio V8 modificado y la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B8 x el medio KADO 523 con un promedio de inhibición del 43,17 %, el grupo “abcde” con la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B23 x el medio KADO 523 con un promedio de inhibición del 42,59 %, el grupo “abcdef” con la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B23 x el medio KADO 523 con un promedio de inhibición del 40,56 %, el grupo “abcdefg” con la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B10 x el medio KADO 523 con un promedio de

inhibición del 39 %, el grupo **“abcdefgh”** con la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B40 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C10 x la bacteria B6 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B71 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B8 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B46 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B71 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B48 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B40 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B6 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C10 x la bacteria B64 x el medio KADO 523 y la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B40 x el medio KADO 523 con un valor promedio de inhibición del 34,44 %, para el grupo **“bcdefgh”** con la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B25 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B48 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B10 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B46 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C10 x la bacteria B48 x el medio KADO523, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B6 x el medio V8 modificado, la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B40 x el medio V8, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B8 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18 x la bacteria B46 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18 x la bacteria B18 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C8 x la bacteria B14 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18x la bacteria B40 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C10 x la bacteria B14 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C10 x la bacteria B14 x el medio V8, la interacción de la cepa C18 x la bacteria B14 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18 x la bacteria B64 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B23 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18 x la bacteria B14 x el medio V8 modificado, la interacción de la cepa C8 x la bacteria B18 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C10 de *M. roreri* x la bacteria B48 x el medio V8, la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x bacteria B48 x el medio V8 y la cepa C8 de *M. roreri* x bacteria B8 x medio V8, con un promedio de inhibición del 22,61 %, el grupo **“cdefgh”** con la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B10 x el medio V8 con un promedio de inhibición del 16,06 %, el grupo **“defgh”** con la interacción de la cepa

C10 *M. roreri* x la bacteria B8 x el medio V8 con un promedio de inhibición del 15,55 %, el grupo “**efgh**” con la interacción de la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B18 x el medio V8 y la interacción de la cepa C10 *M. roreri* x la bacteria B18 x el medio KADO 523 con un valor promedio de inhibición del 15,05 %, el grupo “**fgh**” con la interacción de la cepa C18 *M. roreri* x la bacteria B6 x el medio V8, la interacción de la cepa C10 *M. roreri* x la bacteria B10 x el medio V8, la interacción de la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B71 x el medio KADO 523, la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B71 x el medio V8, la interacción de la cepa C10 *M. roreri* x la bacteria B64 x el medio V8, la interacción de la cepa C10 *M. roreri* x la bacteria B18 x el medio V8, la interacción de la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B46 x el medio KADO 523 y la interacción de la cepa C10 *M. roreri* x la bacteria B71 x el medio V8 con un valor promedio de inhibición del 13,79 %, el grupo “**gh**” con la interacción de la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B14 x el medio KADO 523, la interacción de la cepa C18 *M. roreri* x la bacteria B64 x el medio V8, la interacción de la cepa C10 *M. roreri* x la bacteria B25 x el medio V8, la interacción de la cepa C18 *M. roreri* x la bacteria B71 x el medio V8, la interacción de la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B6 x el medio KADO 523 y la interacción de la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B6 x el medio V8 con un valor promedio de inhibición del 12,06 %, por último, el grupo “**h**” con la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B8 x el medio V8 modificado, la interacción de la cepa C18 *M. roreri* x la bacteria B25 x el medio V8, la interacción de la cepa C10 *M. roreri* x la bacteria B46 x el medio V8, la interacción de la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B25 x el medio V8, interacción de la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B46 x el medio V8, la interacción de la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B64 x el medio KADO 523, la cepa C8 de *M. roreri* x la bacteria B23 x el medio V8, la interacción de la cepa C18 *M. roreri* x la bacteria B23 x el medio V8, la interacción de la cepa C18 de *M. roreri* x la bacteria B10 x el medio V8, la interacción de la cepa C8 *M. roreri* x la bacteria B48 x el medio V8, la interacción de la cepa C8 *M. roreri* de la bacteria B64 x el medio V8 y la interacción de la cepa C18 *M. roreri* x la bacteria B18 x el medio V8 modificado con un promedio de inhibición del 9,31 %.

4.1.3 Caracterización molecular de los hongos asociados a la Moniliasis del cacao en la provincia de Orellana.

Tabla 16

BLASTn de las secuencias obtenidas de los aislados *M.roreri* de la provincia de Orellana.

Análisis BLASTn de las secuencias obtenidas de los aislados *M.roreri* de la provincia de Orellana.

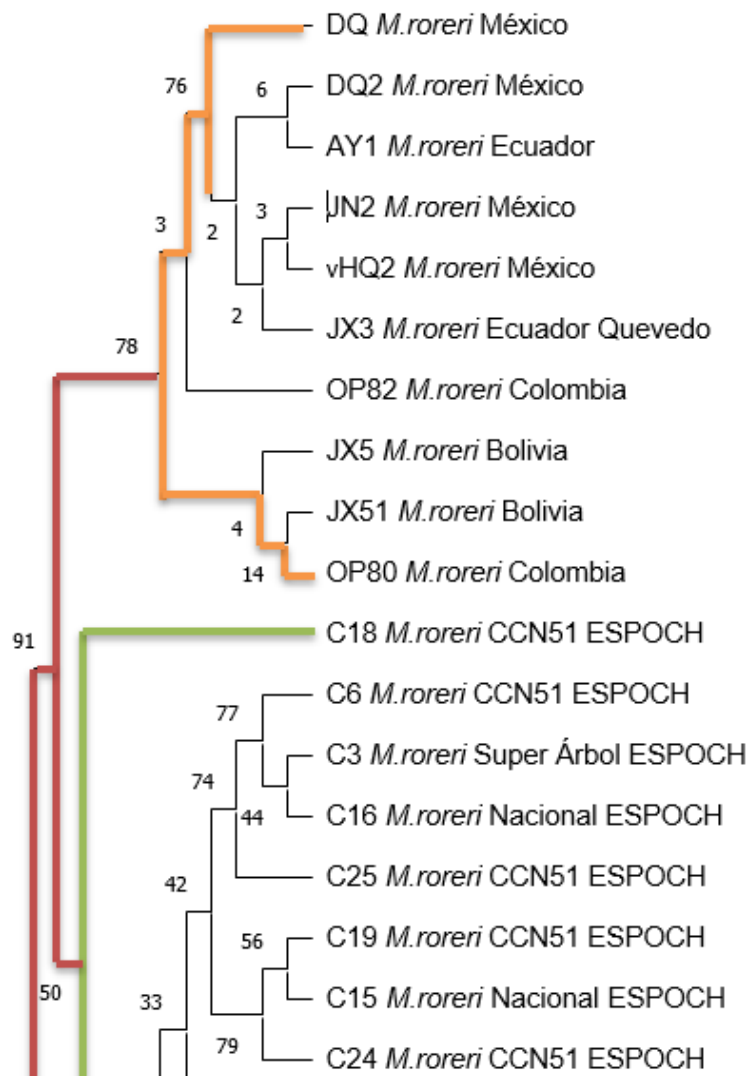
Código Muestra	Microorganismo identificado	Región amplificada	%IDENTIDAD	ACCESO ¹	ORIGEN ²	Tamaño (pb) ³	e-value ⁴
C1	<i>M.roreri</i>	ITS	98,60%	OP806971.1	Colombi a	727	0
C25	<i>M.roreri</i>	ITS	98,24%	OP806971.1	Colombi a	726	0
C18	<i>M.roreri</i>	ITS	98,14%	OP806971.1	Colombi a	730	0
C23	<i>M.roreri</i>	ITS	98,00%	OP806971.1	Colombi a	733	0
C21	<i>M.roreri</i>	ITS	97,99%	OP806971.1	Colombi a	731	0
C12	<i>M.roreri</i>	ITS	97,56%	OP806971.1	Colombi a	734	0
C3	<i>M.roreri</i>	ITS	97,46%	OP806971.1	Colombi a	730	0
C16	<i>M.roreri</i>	ITS	97,16%	OP806971.1	Colombi a	725	0
C24	<i>M.roreri</i>	ITS	96,29%	AY230254.1		1105	0
C6	<i>M.roreri</i>	ITS	95,76%	OP806971.1	Colombi a	721	0
C10	<i>M.roreri</i>	ITS	95,58%	OP806971.1	Colombi a	735	0
C19	<i>M.roreri</i>	ITS	94,85%	OP806971.1	Colombi a	794	0
C15	<i>M.roreri</i>	ITS	90,16%	MT127258.1	México	984	3 e ⁻⁰⁹

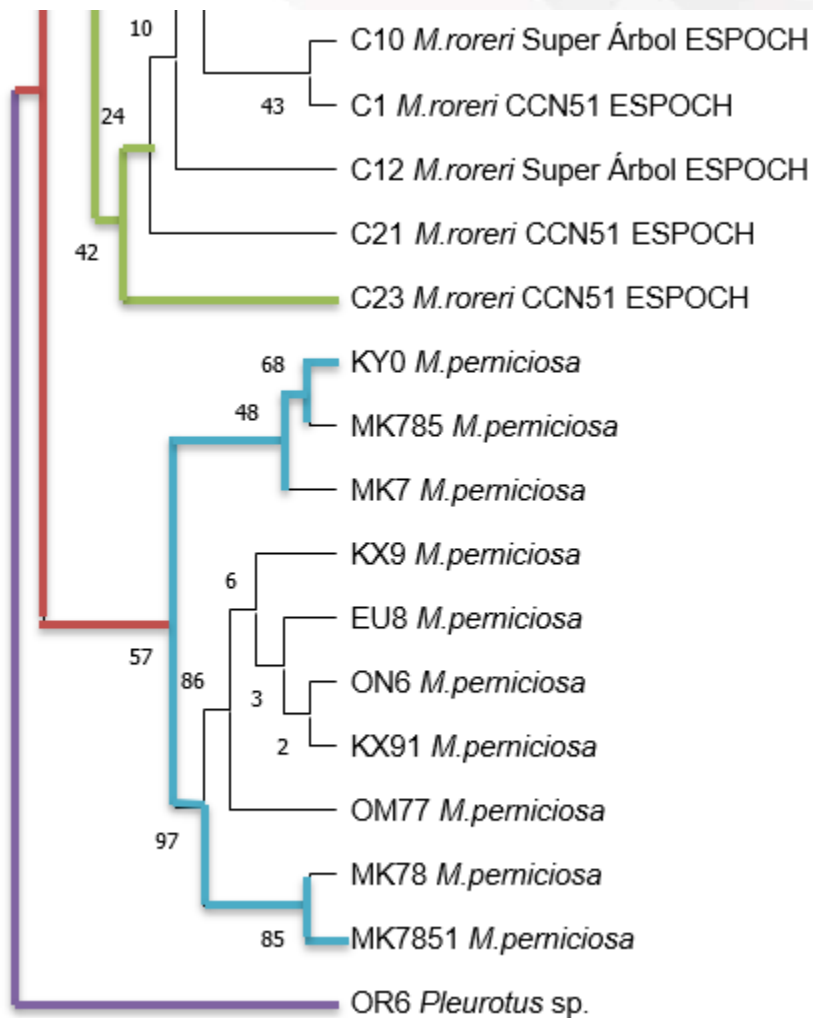
¹ Accesión, ²Lugar de donde proviene la cepa de *M.roreri* ³Tamaño del fragmento, ⁴e-value

Se trabajo con 13 secuencias de *M.roreri* que mostraron amplificación para la región ITS5-ITS4, mediante el análisis BLASTn en el GENBANK se comprobó que todas las cepas en estudio corresponden a la especie *M.roreri* con porcentajes de identidad que fueron desde el 98,60% al 90,16%, la cepa con mayor porcentaje de identidad correspondió a la cepa C1 con el 98,60 % de identidad con la accesión OP806971.1 de origen en Colombia y con un fragmento de 727 pb, la cepa que presentó menor porcentaje de identidad fue la C15 con el 90,16% de identidad con la accesión MT127258.1 de Origen en Colombia, con un fragmento de 984 pb como se señala en la tabla 16.

Figura 26 Árbol filogenético generado con las secuencias de *M.roreri*

Árbol filogenético generado con las secuencias de *M.roreri* analizadas en el estudio





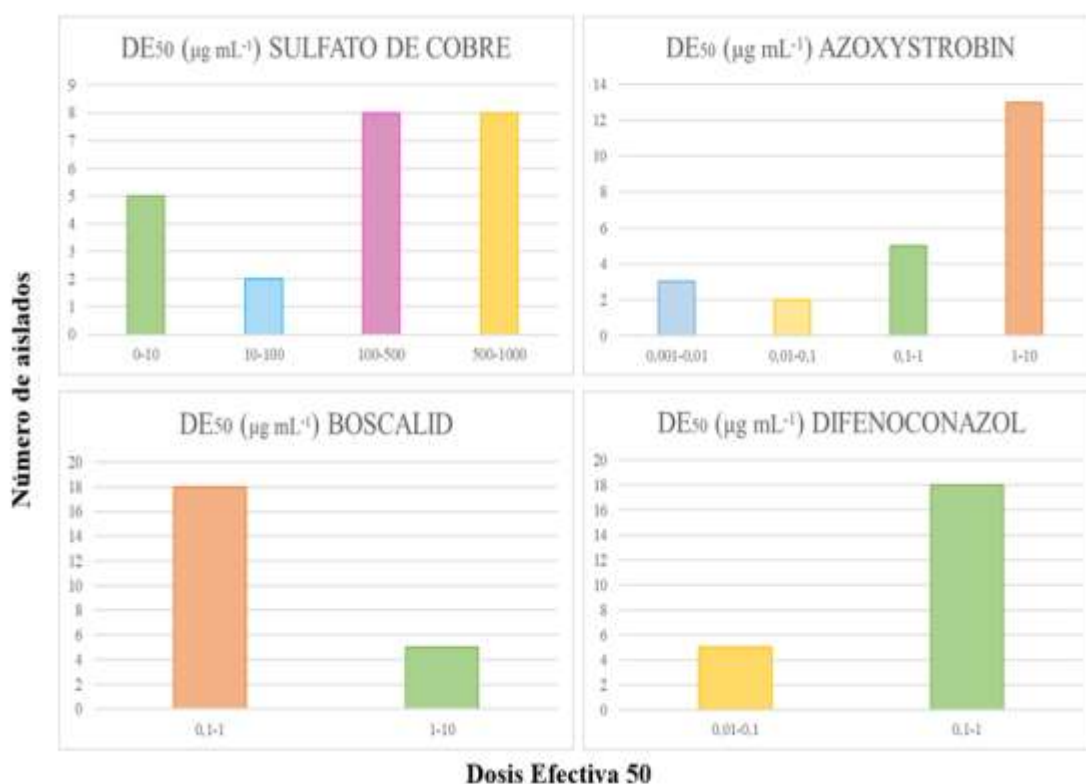
El análisis filogenético produjo un filograma con tres grupos en el grupo basal A se observaron aislados de *M. roreri* obtenidos de distintos países de la base de datos del GENBANK con un porcentaje de parentesco de 78% ,el grupo B constituido por secuencias ecuatorianas de *M. roreri* procedentes de la provincia de Orellana formando un solo caldo, con un porcentaje del 50% y el grupo C que se encontró formado por secuencias de *M. pernicioso* como lo muestra la figura 26.

4.1.4 Cuantificación de la sensibilidad de 23 aislados de *M. royeri* a productos de diferente modo de acción.

Figura 27

Frecuencia de los aislados de M. royeri en diferentes clases de valores de DE₅₀ para productos de diferentes modos de acción

Frecuencia de los aislados de *M. royeri* en diferentes clases de valores de DE₅₀ estimados para productos de diferentes modos de acción



Los valores en el eje X son las concentraciones de DE₅₀; los valores en el eje Y son el número de aislados de *M. royeri* en cada clase DE₅₀.

Tabla 17

DE₅₀ de cuatro principios activos de 23 aislados de *M. royeri* de la provincia de Orellana.

Valores de DE₅₀ de cuatro principios activos de 23 aislados de *M. royeri* obtenidos de la provincia de Orellana.

Productos	Datos de DE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)			
	Nº	Mínimo	Máximo	Promedio
Sulfato de cobre	23	0,0004	>1000	>1000
Azoxystrobin	23	0,0042	5,2533	2,6287
Boscalid	23	0,4935	2,2757	1,3846
Difenoconazol	23	0,0467	0,9215	0,4841

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se observó que la DE₅₀ obtenida por la tasa de crecimiento micelial (TCM) de los veintitrés aislados de *M. royeri* variaba dependiendo del ingrediente activo y las concentraciones a las que estaban presentes en los medios de cultivo enmendados.

Se observó una variación significativa en la sensibilidad de los diferentes aislados de *M. royeri* a los 4 cuatro fungicidas estudiados como lo muestra la tabla 17. Para el sulfato de cobre, los valores de la DE₅₀ oscilaron entre 0,000431 y >1000 µg mL⁻¹ (Tabla 5). La mayoría de las aislados (69,57%) tuvieron una DE₅₀ igual y superior a 100 µg mL⁻¹ al sulfato de cobre (Figura 26) y el valor promedio de la DE₅₀ al sulfato de cobre para la mayoría de los aislados fue >1000 µg mL⁻¹. Los valores de la DE₅₀ para el azoxystrobin oscilaron entre 0,0042 y 5,25 µg ml⁻¹. El valor promedio de la DE₅₀ para el azoxystrobin fue de 2,63 µg mL⁻¹ (Tabla 5). El 55% de los aislados de *M. royeri* analizados presentaron una DE₅₀ para el azoxystrobin entre 1-10 µg.mL⁻¹ y el 45% de los aislados mostraron valores de DE₅₀ menores o iguales a 1 µg.mL⁻¹(Figura 25). Los valores de DE₅₀ para el principio activo boscalid oscilaron entre 0,49 y 2,27 µg.mL⁻¹ (Tabla 17). De los 23 aislados de *M. royeri* probados con este fungicida, el 78,26% de los aislados presentaron valores de DE₅₀ entre 0,1 y 1 µg.mL⁻¹ y para el 21,74% la DE₅₀ estuvo entre 1-10 µg.mL⁻¹. La DE₅₀ promedio fue de 1,38 µg.mL⁻¹ (Figura 26). Finalmente, los valores de DE₅₀ para el difenoconazol oscilaron entre 0,046 y 0,92 µg. mL⁻¹ (Tabla 17). La mayoría de los aislados de *M. royeri* (78,26%) presentaron una DE₅₀ entre 0,1-1 µg.mL⁻¹ (Figura 25) y el 21,74% presentó una DE₅₀ inferior a 0,1 µg mL⁻¹.

4.2 Interpretación de los resultados

La distribución de los géneros fúngicos en las muestras de frutas de *T. cacao* reveló una alta diversidad y variabilidad, con *Penicillium* encabezando la lista con un 27,80 %. *Penicillium* conocido por su papel en la producción de penicilina y en la industria alimentaria, representa casi una tercera parte de los hongos identificados en las muestras asociadas a frutos de cacao. Su alta frecuencia plantea interrogantes sobre cómo esto podría afectar la calidad y estatus sanitario del cacao (Tannous et al., 2020). Aunque algunos miembros de *Penicillium* son benéficos, otros pueden producir micotoxinas que tienen implicaciones en la seguridad alimentaria y la calidad de los productos agrícolas (Liang et al., 2021). La presencia significativa de este género sugiere la necesidad de una evaluación más profunda de las cepas específicas presentes y su impacto potencial en la calidad y estatus sanitario del cacao.

El género *Epicoccum* que representa el 20,47 %, también merece atención. Aunque generalmente es considerado un saprófito débil, algunas especies de *Epicoccum* pueden tener propiedades antagónicas contra patógenos de plantas (Braga et al., 2018). Su presencia en una proporción significativa podría indicar un papel importante en la regulación de otros hongos presentes y en el estatus sanitario de los frutos de cacao.

Lasiodiplodia, *Trichoderma* y *Fusarium* también fueron prominentes en las muestras. *Lasiodiplodia* y *Fusarium* tienen características que van desde ser saprófitos hasta patógenos de plantas. Su presencia plantea la pregunta de cómo podrían afectar la salud y la calidad de los frutos de cacao, y si la diversidad funcional de estos hongos podría tener consecuencias positivas o negativas para el cultivo. Por otro lado, en el caso de *Trichoderma* es uno de los hongos más usados en el control biológico de patógenos de plantas (Guzmán et al., 2023). En términos de estrategias de control, la presencia de *Trichoderma*, conocido por sus propiedades antagónicas contra patógenos, podría considerarse beneficiosa. Su inclusión en la muestra sugiere la posibilidad de utilizar enfoques basados en la promoción de hongos benéficos para controlar la presencia de hongos perjudiciales, como *Fusarium* o *Moniliophthora* (Guzmán et al., 2023). Sin embargo, la implementación de tales estrategias requeriría de una comprensión más profunda de las interacciones entre estos hongos en el entorno específico de los frutos de cacao.

La diversidad de los géneros bacterianos asociados a los frutos de cacao fue también diversa, entre los diversos agentes biológicos, las especies de *Bacillus* asociadas a frutos de cacao en la provincia de Orellana previamente han demostrado ser especialmente eficaces en el control de patógenos, ofreciendo una perspectiva prometedora para mejorar el estatus sanitario de los cultivos (Fira et al., 2018).

Bacillus es un género de bacterias grampositivas que ha sido objeto de atención debido a su capacidad para producir una variedad de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas. Estas bacterias benéficas, presentes de forma natural en diferentes agroecosistemas, han evolucionado para establecer una relación simbiótica con las plantas, ofreciendo protección contra patógenos a través de diversos mecanismos. Uno de los mecanismos clave es la producción de antibióticos y compuestos antifúngicos que inhiben el crecimiento y desarrollo de patógenos perjudiciales como el caso del patógeno objeto del presente estudio (Fira et al., 2018). El género *Bacillus* secreta una amplia gama de metabolitos secundarios, como las iturinas, surfactinas y bacitracinas, que han demostrado ser eficaces contra hongos fitopatógenos y bacterias. Estas sustancias inhiben la germinación de esporas, la formación de micelio y la propagación de patógenos, proporcionando así una defensa robusta para las plantas hospedadoras (Fira et al., 2018).

La aplicación práctica de *Bacillus* en el control biológico de patógenos de plantas ha demostrado ser eficiente y respetuosa con el medio ambiente. Los productos a base de *Bacillus* son biodegradables y no dejan residuos dañinos en el suelo o los cultivos, lo que los convierte en una opción sostenible en comparación con los pesticidas químicos convencionales (Fira et al., 2018). Además, al utilizar microorganismos benéficos ya presentes en el entorno, se promueve la biodiversidad del suelo y se evita el desarrollo de resistencia en los patógenos, un problema común con el uso excesivo de pesticidas químicos.

En el presente estudio se evaluó *in vitro* la sensibilidad de 23 aislados de *M.roreri* a productos de diferentes modos de acción provenientes de plantas de cacao (Tipo Nacional, CCN51, CCN52 y Súper árbol) ubicados en plantaciones de la Amazonía ecuatoriana, centro de domesticación del cacao. *M. roreri* se ha ido dispersando continuamente en diferentes zonas del Ecuador, esta reacción puede deberse a la forma de reproducción del cacao (*Theobroma cacao*) que es de carácter clonal. Por ello, el uso de diferentes productos químicos para controlar la enfermedad se vuelve más frecuente.

Conocer el modo de acción del fungicida es fundamental para comprender el comportamiento de los hongos fitopatógenos y sus mecanismos de defensa (Reuveni & Sheglov, 2002). Asimismo, las condiciones en las que se encuentra el cultivo y a las que se enfrenta según el lugar en el que se establece.

En el presente estudio se observaron diferencias claras en los niveles de sensibilidad contra fungicidas multisitio y de sitio específico. El efecto inhibitor del sulfato de cobre sobre el crecimiento micelial de *M. royeri* fue bajo en todos los aislados y dosis utilizadas, con una DE_{50} alta, por lo que la mayoría de los aislados se categorizaron como "Muy Resistentes" y "Resistentes". En otros estudios de manejo con sulfato de cobre se reporta una situación similar ya que con el uso de productos basados en sales de cobre se han obtenido respuestas para el control *in vitro* de *M. royeri*, sin embargo, su uso en campo requiere altas cantidades del fungicida en cortos periodos de tiempo, lo que no lo hace rentable para el agricultor que cuenta con mano de obra familiar. Además, al utilizar altas concentraciones de productos cúpricos se podría generar un efecto fitotóxico en el cultivo (Burandt et al., 2024). La resistencia de *M. royeri* a fungicidas cúpricos podría deberse a cambios genéticos en relación con la transposición de elementos transponibles (genes saltadores) activados por el estrés abiótico.

Con relación a los fungicidas de sitio específico el ingrediente activo azoxystrobin inhibió el crecimiento micelial de la mayoría de los aislados de *M. royeri*, clasificándolos como "sensibles y muy sensibles". Estos resultados concuerdan con otros estudios quienes reportan que el azoxystrobin inhibe el crecimiento micelial de *M. royeri*, así mismo en otra investigación se observó un 100% de inhibición del crecimiento micelial. En complemento a lo anterior el uso de azoxystrobin se podría usar para controlar eficientemente al hongo en plantaciones de cacao la provincia de Orellana. Este fungicida del grupo de las estrobirulinas es un inhibidor de las quinonas e impide la respiración al unirse al sitio Qo del complejo enzimático citocromo bc1, lo que provoca una deficiencia de energía y a su vez la muerte de los patógenos (Achilonu et al., 2023; Reuveni & Sheglov, 2002).

El boscalid también tuvo un efecto inhibitor considerable contra *M. royeri in vitro*. Sin embargo, existen estudios *in vivo* que categorizan al boscalid como un fungicida de riesgo de generar resistencia si su uso es excesivo y su modo de acción, que afecta la respiración, eliminando la fuente de energía celular y uniéndose a proteínas del

complejo II del electrón. sistema de transporte en la cadena respiratoria (Avenot et al., 2008).

Finalmente, al utilizar difenoconazol que es un triazol que inhibe la biosíntesis de ergosterol, se inhibió considerablemente el crecimiento de los 23 aislados de *M. roleri*, con una DE_{50} promedio de $0,48 \mu\text{g/mL}^{-1}$, lo que representaría una inhibición muy efectiva. La evaluación periódica del uso de este fungicida sería importante para evitar resistencia cruzada con otros fungicidas del mismo grupo químico.

Este estudio es uno de los pioneros que busca conocer el estado actual de la sensibilidad de *M. roleri* a los potenciales fungicidas y a los más usados en el cultivo del cacao. Esto no solo permitirá la implementación integral de estrategias de control a nivel de campo, sino también que al evaluar la eficiencia de los fungicidas se prevendrá el desarrollo de resistencia.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

La investigación dió luces sobre la sorprendente variabilidad en la diversidad de hongos y bacterias presentes en los frutos de cacao, revelando así la complejidad del microbioma en este entorno específico. Este descubrimiento resalta la importancia de llevar a cabo una identificación taxonómica y funcional de estos microorganismos, emergiendo como un área crucial para futuras investigaciones. El conocimiento más profundo obtenido de esta investigación contribuiría significativamente a entender mejor cómo estos microorganismos impactan la salud de los frutos y participan en las interacciones microbianas complejas. La aplicación de técnicas avanzadas de secuenciación genómica y metagenómica podría proporcionar un análisis más detallado y preciso del microbioma cacaotero, abriendo la puerta a nuevos horizontes de investigación.

Este panorama lleva a una conclusión fundamental: ciertos medios de cultivo, destacando KADO 523, demuestran un potencial inhibitorio más destacado contra *Moniliophthora roreri* en comparación con el V8 modificado. Esta información no solo es relevante sino crucial, ya que sienta las bases para la identificación efectiva de agentes antagónicos y el diseño de estrategias de control biológico más eficaces. La investigación ofrece, de esta manera, una dirección clara para mejorar las prácticas de manejo de la enfermedad y proteger los cultivos de cacao de manera más efectiva.

Al explorar la caracterización molecular de los hongos asociados a la Moniliasis en diferentes especies de cacao, la investigación destaca patrones genéticos específicos. Estos patrones genéticos sugieren la posibilidad de una especificidad en la interacción planta-patógeno, una revelación que tiene implicaciones significativas para comprender las dinámicas precisas que subyacen a la enfermedad. Este descubrimiento no solo amplía nuestro conocimiento sobre la relación entre los hongos y el cacao, sino que también plantea preguntas intrigantes sobre las adaptaciones genéticas específicas que pueden estar en juego.

Finalmente, la variabilidad en la sensibilidad de las cepas de *Moniliophthora roreri* a diferentes fungicidas subraya la necesidad de adaptar estrategias de control según la variabilidad genética del patógeno. Este hallazgo destaca la complejidad de gestionar eficazmente la Moniliasis y sugiere que un enfoque personalizado basado en la genética de las cepas puede ser crucial para mejorar la eficacia de los tratamientos fungicidas. En última instancia, la investigación no solo identifica problemas críticos en el manejo de la enfermedad, sino que también señala la dirección para futuras investigaciones y desarrollos en el campo de la fitopatología del cacao.

5.2 Recomendaciones

La investigación destaca la necesidad de que estudios futuros se enfoquen en la exploración detallada de las interacciones específicas entre ciertos microorganismos y el cacao, con el propósito de entender mejor su impacto directo en el rendimiento y la calidad de los frutos. Esta línea de investigación se presenta crucial para abordar la complejidad del microbioma cacaotero y podría ofrecer perspectivas valiosas para mejorar la salud de los cacaotales y fortalecer la resistencia contra patógenos.

En concordancia con lo mencionado, se recomienda explorar las condiciones óptimas que maximicen la actividad inhibitoria de los medios identificados. La consideración de factores como concentraciones, pH y elementos nutricionales resulta esencial en este contexto. Además, se propone investigar otras estrategias de control biológico, como la introducción de microorganismos específicos con propiedades antagónicas. Esta ampliación del enfoque contribuiría a la identificación de métodos más efectivos para el control biológico de *Moniliophthora roreri*.

Dentro del ámbito de la caracterización molecular de los hongos asociados a la Moniliasis, para futuras investigaciones se sugiere profundizar en la identificación de genes de virulencia y resistencia en los hongos caracterizados. Este paso adicional proporcionaría información crucial para el desarrollo de estrategias de mejoramiento genético del cacao. La posibilidad de seleccionar variedades más resistentes a la Moniliasis podría representar un avance significativo en la mejora de la producción de cacao.

Siguiendo esta línea, se propone además, estudiar las bases genéticas de la resistencia a fungicidas en *Moniliophthora roreri*. Este enfoque genético podría guiar el desarrollo de estrategias de manejo que minimicen la aparición de resistencia y optimicen la eficacia del control. Además, la exploración de estrategias de manejo integrado que combinen fungicidas con enfoques biológicos y culturales podría representar un paso significativo hacia un control más sostenible y efectivo de la Moniliasis en los cultivos de cacao.

Bibliografía

- Abad, A., Acuña, C., & Naranjo, E. (2020). El cacao en la Costa ecuatoriana: estudio de su dimensión cultural y económica. *Estudios de La Gestión. Revista Internacional de Administración*, 59–83. <https://doi.org/10.32719/25506641.2020.7.3>
- Aguirre., C., Pabón Salazar, D., De Marchi, M., & Codato, D. (2021). Información Geográfica Voluntaria para la Detección de Impactos Socioambientales de la Actividad Petrolera en la Amazonía Ecuatoriana. *Universidad-Verdad*, 78, 30–47. <https://doi.org/10.33324/uv.v1i1.353>
- Amador, C., Alvarado, A., Farah, S. E., & Martillo, J. J. (2022). Caracterización morfológica del cacao nacional “Theobroma cacao L.” del cantón Naranjal, Ecuador. *Revista Tecnológica - ESPOL*, 34(4), 80–97. <https://doi.org/10.37815/rte.v34n4.978>
- Anzules, V., Borjas, R., Alvarado, L., Castro, V., & Julca, A. (2019). Cultural, biological and chemical control of *Moniliophthora roreri* and *Phytophthora* spp IN *Theobroma cacao* ‘CCN-51.’ *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 511–520. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.08>
- Badillo, K., Teneda, W., & Santamaría, E. (2023). El comportamiento de los precios de venta del cacao (*theobroma cacao*. L) en la Provincia de los Ríos-Ecuador. 593 *Digital Publisher CEIT*, 8(2), 5–17. <https://doi.org/10.33386/593dp.2023.2.1656>
- Bravo, A., & Quimis, P. (2015). *Estudio descriptivo de la Producción , Comercialización y Logística de Exportación a la India de la madera de Teca Tectona grandis y su proceso de industrialización como cambio de la matriz productiva*. 121.
- Caicedo, C. (2020). Agroforestería: Una Alternativa De Agricultura Sostenible En La Amazonía Ecuatoriana. *Revista Científica Ecuatoriana*, 7(C), 17–20. [/revistaecuadorescalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorescalidad/index.php/revista/article/view/81](http://revistaecuadorescalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorescalidad/index.php/revista/article/view/81)

- Camacho, M., Almaraz, J. J., Vázquez, C., Angulo, A., Ríos, M. E., & González, A. (2022). Efecto de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el desarrollo y rendimiento del chile jalapeño. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 28, 185–196. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3273>
- Cambisaca, M., & Macías, K. (2023). Competitividad de las exportaciones de cacao en Ecuador 2015 – 2020. *Revista Económica*, 11(1), 86–94. <https://doi.org/10.54753/rve.v11i1.1595>
- Chávez, H. D., Miranda, P. R., Álava, L. M., Mendoza, M. K., Zambrano, A. M., & Marín, L. S. (2021). Chocolate: Origins, current technology and production of antioxidants beneficial to health. *Ciencia y Tecnología*, 14(1), 45–53. <https://doi.org/10.18779/cyt.v14i1.458>
- Correa, J., Castro, S., & Coy, J. (2014). Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388–399. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
- Ferrer, Y., Mafaldo, A., Plasencia, A., & Urdánigo, J. (2022). Riesgo para el cultivo de cacao por los cambios en la distribución potencial del fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* bajo escenarios de cambio climático en Ecuador continental. *Revista terra latinoamericana*, 40. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1338>
- Flores, V., Gómez Rodríguez, L., López García, J. A., & Grajales Conesa, J. (2022). Mecanismos de infección endógena en frutos de cacao con *Moniliophthora roreri*. *Polibotánica*, 53. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.53.13>
- GADPOrellana. (2018). *Plan de Ordenamiento Territorial de la Provincia de Orellana*.
- García, A., Pico, B., & Jaimez, R. (2021). La cadena de producción del Cacao en Ecuador: Resiliencia en los diferentes actores de la producción. *NovasinerGía Revista Digital De Ciencia, Ingeniería Y Tecnología*, 4(2), 152–172. <https://doi.org/10.37135/ns.01.08.10>
- Guevara, I., Gómez, J., Reyes, K., & Mercado, N. (2022). Aislamiento y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif) H.C. Evans, Stalpers,

- Samson & Benny. (1978). de frutos de *Theobroma cacao* L. *Revista Torreón Universitario*, 11(32). <https://doi.org/10.5377/rtu.v11i32.14980>
- Hernández, D., Ferrera, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: Importancia Agrícola, Biotecnológica, Y Sistemas De Fermentación Para Producir Biomasa Y Enzimas De Interés Industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, ahead, 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hipólito, E., Cocoltzi, E., Ramos, J. M., Espinoza, C., Torres, M., & Ricaño, J. (2020). Breve aproximación a la naturaleza genómica de *Moniliophthora roreri* CPMRT01 aislado de cacao en Tabasco, México//Brief approach to the genomic nature of *Moniliophthora roreri* CPMRT01 isolated from cocoa in Tabasco, Mexico. *Biotecnia*, 22(2), 39–49. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1244>
- Jaramillo, F., Guerrero, Q., & Guncay, T. (2022). Morfología floral en 20 árboles élite de la colección de Cacao de la Utmach. *Revista Científica Agroecosistemas*, 10(3), 58–64.
- Kuchen, B., Paroldi, E. H., Azcona, M. S., Groff, M. C., Pera, L., & Vazquez, F. (2023). Evaluation of the application of *Wickerhamomyces anomalus* supernatant for the control of relevant spoilage yeasts in wines. *OENO One*, 57(1), 279–288. <https://doi.org/10.20870/oenone.2023.57.1.7165>
- Machuca, J., Suárez, E., Motte, E., & Mialhe, E. (2019). Caracterización molecular de los microorganismos presentes durante el proceso fermentativo de los granos de cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Peruana de Biología*, 26(4), 535–542. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i4.17220>
- Macías, R., Guerra, G., Cunuhay, J., Santana, J., & Jiménez, W. (2023). Comparación de producción de seis variedades de cacao (*Theobroma cacao*) en el centro experimental Sacha Wiwa. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(3), 8112–8123. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i3.6804
- Mendoza, E., Boza, J., & Manjarrez, N. (2021). Impacto socioeconómico de la producción y comercialización del cacao de los pequeños productores del cantón Quevedo. *Revista Científica Ecociencia*, 8, 255–272.

<https://doi.org/10.21855/ecociencia.80.603>

Moreno, A., García, V., Reyes, J. L., Vásquez, J., & Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>

Orozco, J., Chávez, G., Centanaro, P. H., & Ramírez, V. (2022). Competitividad en la agroindustria del sector cacaotero del Ecuador. *Pro Sciences: Revista de Producción, Ciencias e Investigación*, 6(42), 27–35. <https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol6iss42.2022pp27-35>

Pallazhco, R. (2021). *Análisis espacial de la Moniliasis en el Cultivo de cacao en tres zonas de la provincia del Guayas*. 61. https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/PALLAZHCO_MONTAÑO_RUBEN_DARIO.pdf

Peñar, E., & Pavone, D. (2020). Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de plántulas de *Capsicum annum* L. (pimentón) y el biocontrol del hongo fitopatógeno *Sclerotium* sp. In *Agrobiología*. Mérida Publishers. <https://doi.org/10.4322/mp.2020.001.03>

Perez, D. (2021). Poda Fitosanitaria Con La Aplicación De Biofungicidas Para El Control De Moniliasis En Cacao Ccn 51 Ing. *Universidad Agraria Del Ecuador Facultad De Ciencias Agrarias*. https://www.uagraria.edu.ec/carrera_ambiental.php

Pilaloa, W., Alvarado, A., Pérez, D., & Torres, S. (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. *Revista Alfa*, 5(15). <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v5i15.129>

Plasencia, A., Vilchez, C., Ferrer, Y., & Veloz, C. (2022). Efecto del cambio climático sobre la distribución potencial del hongo *Moniliophthora roreri* y el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en Ecuador continental. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*, 40. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1151>

- Quiroz, U., Monterroso, A., Calderón, M., & Ramírez, A. (2022). Aptitud de los cultivos de café (*Coffea arabica* L.) y cacao (*Theobroma cacao* L.) considerando escenarios de cambio climático. *La Granja*, 36(2). <https://doi.org/10.17163/lgr.n36.2022.05>
- Salinas, V., & Rodríguez, L. (2019). Poblaciones indígenas amazónicas del Ecuador, su situación, cambios y diferencias reflejadas en su fecundidad. *Bulletin de l'Institut Français d'études Andines*, 48 (3), 257–281. <https://doi.org/10.4000/bifea.10742>
- Simamora, A., Hahuly, M., & Henuk, J. (2021). Endophytic fungi as potential biocontrol agents of *Phytophthora palmivora* in the cocoa plant. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(5). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220519>
- Torres, M., Quevedo, I., Ortiz, C., Lagúnez, L., Nieto, D., & Cruz, M. (2018). Control químico de *Moniliophthora roreri* en México Chemical control of *Moniliophthora roreri* in Mexico. *Ciencias Biológicas y de La Salud*, 21(2), 55–61. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/906/322>
- Velásquez, S., & Silva Pérez, E. (2023). Diversificación geográfica de las exportaciones de cacao en polvo, por medio de iniciativas comerciales destinadas a mercados internacionales. *Prohominum*, 5(3), 71–88. <https://doi.org/10.47606/ACVEN/PH0194>
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>

UNEMI
UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

