

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Bioprospección de bacterias benéficas del suelo cacaotero en Alta Verapaz, Guatemala, para el biocontrol de hongos fitopatógenos de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Rodrigo Mejicanos Cifuentes
para optar el grado académico de Licenciado en Biotecnología Molecular

Guatemala,

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



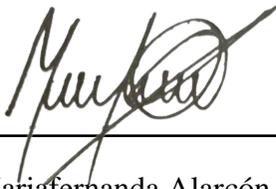
Bioprospección de bacterias benéficas del suelo cacaotero en Alta Verapaz, Guatemala, para el biocontrol de hongos fitopatógenos de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Rodrigo Mejicanos Cifuentes
para optar el grado académico de Licenciado en Biotecnología Molecular

Guatemala,

2023

Vo. Bo:

(f) 

MSc. Mariafernanda Alarcón

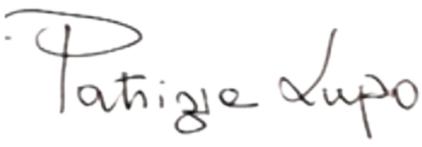
Tribunal Examinador:

(f) 

MSc. Mariafernanda Alarcón

(f) 

MSc. Martha Patricia Herrera

(f) 

PhD. Patrizia Lupu

Fecha de aprobación: Guatemala, 12 de enero de 2023

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por darme la vida, sabiduría y capacidades para estudiar durante 5 años y realizar esta tesis. A mis padres, cuyo ejemplo de perseverancia y amor, me motivaron a crecer personalmente y a seguir mis sueños. A mis hermanos por alentarme y acompañarme en todo momento.

En particular, a la MSc. Mariafernanda Alarcón y la MSc. Patricia Herrera, por sus conocimientos compartidos, su tiempo y dedicación durante la elaboración de esta investigación. A las técnicas de laboratorio Maritza De León y Leyda Hernández, por su apoyo y guía a lo largo de este trayecto. En general, al equipo del Laboratorio de Protección Vegetal, por ser personas de calidad y hacer esta experiencia memorable.

Por último, a la Universidad del Valle por proporcionarme la educación para desarrollar nuevas habilidades profesionales. A mis amigos, por todas sus muestras de cariño y por los momentos más inolvidables. Gracias por todo.

“Incluso la noche más oscura, terminará con la salida del Sol”

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
A. General.....	3
B. Específicos.....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. MARCO TEÓRICO	6
A. Generalidades del cacao	6
B. Cultivo de cacao	6
C. Hongos fitopatógenos y su impacto en el cacao	10
D. Estrategias de control de hongos fitopatógenos	18
V. METODOLOGÍA.....	21
A. Hipótesis	21
B. Viabilidad	21
C. Materiales y métodos.....	21
VI. RESULTADOS	29
VII. DISCUSIÓN	40
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. RECOMENDACIONES	47
X. REFERENCIAS	48
XI. ANEXOS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pasos para la colonización de los hongos en las plantas. (A) Adherencia y penetración de hongos biotróficos y (B) necrotróficos a las plantas	12
Figura 2. Síntomas de antracnosis causados por <i>C. gloeosporioides</i> s.I. en cacao de Ghana. (A – E) Necrosis y clorosis en hojas y fruto, (F y G) Manifestaciones de pudrición en árbol.	13
Figura 3. Características microscópicas de <i>C. noveboracense</i> . (A – B) Morfología, (C) Conidias hialinas, (D – F) Conidióferos y conidias, (G – K) Apresorios simples.....	14
Figura 4. Síntomas en hojas de <i>Curculigo capitulata</i> causados por <i>C. curculiginis</i>	15
Figura 5. Características microscópicas de <i>C. lunata</i> . (A – B) Morfología, (B – D) Hifas septadas con conidióferos, (H – K) Conidios septados	15
Figura 6. Síntomas en árbol de banano en Sudáfrica causados por <i>F. oxysporum</i>	16
Figura 7. Características microscópicas de <i>F. oxysporum</i> . (A) Morfología, (B) Monofiálides, (C) Microconidia, (D) Macroconidios, (E) Clamidosporas.....	17
Figura 8. Manifestaciones de <i>P. palmivora</i> en el cacao y estructuras microscópicas. (A – C) Síntomas de <i>P. palmivora</i> en cacao de Cuba, (D) Esporangios, (E) Clamidosporas ..	18
Figura 9. Representación del método para identificar las bacterias con propiedades antifúngicas.	24
Figura 10. Representación del método del ensayo dual del antagonismo de las bacterias frente a los hongos fitopatógenos.	25
Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas de la colonia bacteriana 6.6. (A) Colonia bacteriana aislada en agar nutritivo, (B) Colonia bacteriana observada en microscopio óptico a 1000x, (C) Colonia bacteriana observada en microscopio óptico a 1000x con zoom adicional.	29

Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas de la colonia bacteriana 8.3. (A) Colonia bacteriana aislada en agar nutritivo, (B) Colonia bacteriana observada en microscopio óptico a 1000x, (C) Colonia bacteriana observada en microscopio óptico a 1000x con zoom adicional.	30
Figura 13. Comparación de las medias de los porcentajes de inhibición para cada hongo fitopatógeno.	32
Figura 14. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo F1. (A) Control: Inoculación de hongo F1, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.	33
Figura 15. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo F2. (A) Control: Inoculación de hongo F2, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.	33
Figura 16. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo F3. (A) Control: Inoculación de hongo F3, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.	34
Figura 17. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo F4. (A) Control: Inoculación de hongo F4, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.	34
Figura 18. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo C1. (A) Control: Inoculación de hongo C1, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.	35
Figura 19. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo C2. (A) Control: Inoculación de hongo C2, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.	35

Figura 20. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo N1. (A) Control: Inoculación de hongo N1, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.	36
Figura 21. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo G1. (A) Control: Inoculación de hongo G1, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.	36
Figura 22. Características macroscópicas y microscópicas del ejemplar 1 de <i>Fusarium</i> sp. (F1) (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250x.	57
Figura 23. Características macroscópicas y microscópicas del ejemplar 2 de <i>Fusarium</i> sp. (F2) (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250x.	57
Figura 24. Características macroscópicas y microscópicas del ejemplar 3 de <i>Fusarium</i> sp. (F3) (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250x.	58
Figura 25. Características macroscópicas y microscópicas del ejemplar 4 de <i>Fusarium</i> sp. (F4) (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional.	58
Figura 26. Características macroscópicas y microscópicas de <i>C. siamense</i> (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional.	59
Figura 27. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Colletotrichum</i> sp. (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional.	59

Figura 28. Características macroscópicas y microscópicas de *G. candidum* (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional. 60

Figura 29. Características macroscópicas y microscópicas de *N. zimmermanii* (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional. 60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de los eslabones de la cadena productiva de cacao.	9
Cuadro 2. Porcentaje de inhibición de la bacteria 6.6 frente al crecimiento de los hongos fitopatógenos.....	31
Cuadro 3. Información obtenida a partir del alineamiento local de la secuencia de ARNr 16s de las bacterias 6.6 y 8.3 en BLAST, NCBI.....	37
Cuadro 4. Información obtenida a partir del alineamiento local de la secuencia de la región ITS1, ADNr 5.8s, ITS2 de los hongos C1, C2 y N1 en BLAST, NCBI.....	38
Cuadro 5. Producción de quitinasas y proteasas en las 32 bacterias aisladas.....	38
Cuadro 6. Características morfológicas de las bacterias aisladas a partir de muestras de suelo.....	54
Cuadro 7. Evaluación del antagonismo de las bacterias 1.1 a la 8.2 frente al crecimiento de los 8 hongos fitopatógenos.....	55
Cuadro 8. Evaluación del antagonismo de las bacterias 8.3 a la 15.6 frente al crecimiento de los 8 hongos fitopatógenos.....	56
Cuadro 9. Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de la bacteria 6.6 frente a los 8 hongos fitopatógenos.....	56

RESUMEN

Las enfermedades de las plantas son causadas, en un 80%, por hongos fitopatógenos. Los hongos disminuyen la integridad, productividad y el rendimiento de distintos cultivos, como el del cacao. El cultivo de cacao es de importancia socioeconómica para el país porque contribuye, principalmente, a los ingresos de las familias agricultoras. Sin embargo, el cacaotero en el norte de Guatemala se ve afectado por la presencia de hongos fitopatógenos. Se han buscado opciones sustentables, como agentes de control biológico, para su manejo. El objetivo del estudio fue determinar el efecto biológico *in vitro* de bacterias aisladas de suelo cacaotero en Alta Verapaz, Guatemala, sobre hongos fitopatógenos que afectan a las plantaciones de cacao. Las bacterias identificadas como *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* inhibieron el crecimiento de los 8 hongos fitopatógenos evaluados que afectan al cacao del país. Para determinar el porcentaje de inhibición, se eligió *B. cereus* por presentar un crecimiento más rápido. El mayor porcentaje de inhibición fue para *Geotrichum candidum* con 61.2%, seguido de dos ejemplares de *Fusarium* sp. con 60.7% para F3 y 58.2% para F4. *Colletotrichum siamense* fue inhibido un 58.7 %, *Colletotrichum* sp. 57.9 % y *Fusarium* sp. (F2) 53.6 %. *B. cereus* inhibió en menor medida a *Fusarium* sp. (F1) 39.8 % y *Nigrospora zimmermanii* 39.1 %. El efecto biológico fue por antibiosis y no fue mediado por la producción de quitinasas o proteasas. Se recomienda evaluar la producción de otras enzimas líticas, metabolitos volátiles orgánicos y metabolitos orgánicos no volátiles, implicados en la acción antifúngica.

ABSTRACT

Plant diseases are 80% caused by phytopathogenic fungi. Fungi decrease the integrity, productivity and yield of different crops, such as cocoa. Cocoa cultivation is of socioeconomic importance for the country because it contributes mainly to the income of farming families. However, the cocoa tree in northern Guatemala is affected by the presence of phytopathogenic fungi. Sustainable options have been sought, such as biological control agents, for its management. The objective of the study was to determine the in vitro biological effect of bacteria isolated from cocoa soil in Alta Verapaz, Guatemala, on phytopathogenic fungi that affect cocoa plantations. The bacteria identified as *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* inhibited the growth of the 8 evaluated phytopathogenic fungi that affect cocoa in the country. To determine the percentage of inhibition, *B. cereus* was chosen for presenting faster growth. The highest percentage of inhibition was for *Geotrichum candidum* with 61.2%, followed by two specimens of *Fusarium* sp. with 60.7% for F3 and 58.2% for F4. *Colletotrichum siamense* was inhibited 58.7 %, *Colletotrichum* sp. 57.9 % and *Fusarium* sp. (F2) 53.6%. *B. cereus* inhibited *Fusarium* sp. to a lesser extent. (F1) 39.8 % and *Nigrospora zimmermanii* 39.1 %. The biological effect was due to antibiosis and was not mediated by the production of chitinases or proteases. It is recommended to evaluate the production of other lytic enzymes, volatile organic metabolites and non-volatile organic metabolites, involved in the antifungal action.

I. INTRODUCCIÓN

El cacao es un cultivo de importancia social, cultural y económica a nivel mundial y nacional. Alrededor del 95% de este producto se produce en medianas y pequeñas parcelas, representando una fuente de ingreso primordial para la agricultura familiar. El cacao que se produce en Guatemala destaca a nivel internacional por sus propiedades organolépticas y su caracterización genética. Sin embargo, la producción se ve limitada por las plagas y enfermedades que afectan las plantaciones (MAGA, 2016; Williams, 2019).

El 80% de estas enfermedades son causadas por hongos fitopatógenos. Al infectar a las plantas, los hongos causan muerte de tejidos, disminuyen los nutrientes disponibles y afectan al fruto. En consecuencia, la integridad, productividad y el rendimiento del cultivo es perjudicado. Ante esta problemática, se prioriza el uso de sustancias químicas, como los pesticidas, para eliminar a los hongos. No obstante, los compuestos químicos dañan el ecosistema, la salud de los agricultores y la integridad del suelo. Siendo la razón por la que se ha buscado minimizar su aplicación (Carmona *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2016).

Los métodos de control biológico, como el uso de bacterias, son alternativas sostenibles que reducen los efectos adversos. Los microorganismos antagonistas son aquellos que inhiben el crecimiento de los patógenos. Esto lo hacen mediante la producción de enzimas, metabolitos orgánicos volátiles; metabolitos orgánicos no volátiles, péptidos, entre otros. Asimismo, dependiendo el tipo de interacción que tienen con los microorganismos patógenos, el efecto puede ser de competencia, antibiosis o parasitismo (Correia *et al.*, 2016).

Se ha evidenciado que géneros, como *Bacillus*, exhiben propiedades antifúngicas y son beneficiosos para las plantas. Por tanto, para determinar el efecto antagonista contra hongos fitopatógenos, el primer paso es aislar los microorganismos. Seguido, se realizan ensayos de cultivo dual *in vitro* para determinar el comportamiento de los hongos ante el crecimiento de las bacterias. Por último, la caracterización, identificación de propiedades; ensayos *in vivo* y formulación de un producto biológico, son etapas a mediano y largo plazo, para lograr un manejo agronómico sustentable (Ons *et al.*, 2020). Por lo antes expuesto, el objetivo principal del estudio fue determinar el efecto biológico *in vitro* de

bacterias aisladas de suelo cacaotero en Alta Verapaz, Guatemala, sobre hongos fitopatógenos que afectan a las plantaciones de cacao.

II. OBJETIVOS

A. General

Determinar el efecto biológico *in vitro* de bacterias aisladas de suelo cacaotero en Alta Verapaz, Guatemala, sobre hongos fitopatógenos que afectan a las plantaciones de cacao.

B. Específicos

- Aislar bacterias de muestras de suelo colectadas de Alta Verapaz, Guatemala, utilizando medios de cultivo nutritivos y el método de dilución seriada.
- Evaluar el antagonismo de las bacterias más representativas frente al crecimiento de los hongos fitopatógenos mediante el ensayo de placa de cultivo dual *in vitro*.
- Identificar molecularmente mediante la secuenciación del gen 16s ARN ribosomal (ARNr 16s) las bacterias que se evaluaron en el cultivo dual *in vitro* frente al crecimiento de los hongos fitopatógenos.
- Evaluar la producción de quitinasas y proteasas en las bacterias aisladas empleando un medio de cultivo diferencial.

III. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de cacao en Guatemala tiene un impacto socioeconómico para la agricultura familiar, pues, la mayor parte de la producción se realiza en pequeñas y medianas parcelas que siguen una práctica tradicional. El departamento de Alta Verapaz en la Región Norte y los departamentos de Suchitepéquez y San Marcos en la Región Suroccidente del país, representan el 82% de la cosecha. Principalmente, el grano de cacao se utiliza a nivel nacional y solamente el 4% se exporta; posicionándose preferentemente en el mercado internacional por ser de alta calidad y con características organolépticas distinguidas. Sin embargo, la producción local no se da abasto y se ve afectada por labores culturales perjudiciales, la propagación de plagas y enfermedades (Cooperación Suiza en América Central, 2017; Ministerio de Agricultura y Ganadería y Alimentación [MAGA], 2016).

Hasta un 80% de las enfermedades de las plantas son causadas por hongos fitopatógenos (Peng *et al.*, 2016). Estos hongos reducen la viabilidad de los cultivos, dado que afectan los órganos principales de las plantas, manifestándose generalmente como necrosis. En consecuencia, se generan pérdidas de cultivos, del rendimiento de producción y monetarias, que si no se controlan pueden comprometer el 100% de la cosecha y hasta USD 230,000,000; como lo reportado en otros países productores de cacao (Adeniyi, 2019; Armengot *et al.*, 2020).

Se han descrito hongos fitopatógenos que afectan al cacaotero en el norte de Guatemala (Lachuá, Cahabón y Polochic, Alta Verapaz), siendo los más prevalentes en 2019 los del género *Colletotrichum*, *Curvularia* y *Fusarium*. En menor proporción se detectó *Phytophthora*, un género de interés a nivel mundial, debido a que coloniza todos los órganos del árbol de cacao (Dubón, Alarcón y De León, 2021; Decloquement *et al.*, 2021). Estos géneros se catalogan de importancia en los cultivos agrícolas, porque generan grandes pérdidas en la producción y patologías destructivas. En vista de la presencia de estos patógenos en las plantaciones locales, es imprescindible efectuar técnicas de control, para contrarrestar el impacto negativo.

Una alternativa sostenible, es el uso de agentes de control biológico. Estos microorganismos inhiben el crecimiento, directa o indirectamente, de distintos patógenos.

A diferencia de las estrategias químicas, las biológicas disminuyen el impacto ambiental, conservan la integridad de los suelos; reducen los efectos adversos en organismos superiores e incluso les podrían proveer beneficios a la planta (Thambugala *et al.*, 2020). No obstante, en el país gran parte del control de hongos fitopatógenos se realiza con productos químicos, como los plaguicidas. Esto se debe a la falta de divulgación e investigación de los métodos biológicos en producciones locales, lo que genera escepticismo en los productores. Por ello, se plantea buscar bacterias con propiedades antifúngicas en suelos nativos de plantaciones de cacao, con el fin de evaluar su efecto sobre los hongos fitopatógenos asociados y proponerlas como una opción sustentable para el manejo agronómico.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Generalidades del cacao

Theobroma cacao L., más conocido como cacao o cacaotero, es la especie de árbol más representativa de la familia Malvaceae. Crece de forma óptima en regiones cálidas y húmedas. Requiere de una precipitación estable entre 1,500 a 2,000 mm, una humedad relativa alta (>70 %) y condiciones de luz y sombra después de los primeros años de vida. Es idóneo que los suelos tengan una buena retención de agua, un pH entre 5 a 7.5, un contenido de materia orgánica de 3.5 % y una proporción de nitrógeno y fósforo de 1:5 (International Cocoa Organization [ICCO], 2016).

El árbol tiene una raíz primaria que puede alcanzar hasta 2 m de profundidad y raíces secundarias que se encuentran en la capa superior del suelo, entre los primeros 15 a 25 cm. El tallo es ortótropo, con una yema principal de 1.5 m y presenta copas con tres a cinco ramas principales, lo que le provee una altura promedio entre 5 a 8 m. Las hojas son oblongas, péndulas y de colores variables; verde pálido, verde oscuro, rosado y violeta. Las flores poseen cinco unidades de cada parte excepto por el ovario, que es uno solo. Tan solo el 0.1% de las flores desarrollan el fruto. El fruto es una mazorca que varía de color según su tiempo de maduración. En su interior se encuentran las semillas de cacao, estas son elipsoides, están cubiertas de pulpa o mucílago y son la materia prima más aprovechable para la obtención de productos (Arvelo *et al.*, 2017; de Souza *et al.*, 2018).

B. Cultivo de cacao

1. Global

En sus inicios, el cacao se domesticó en la región norte amazónica de Sudamérica. Luego, se extendió a Mesoamérica, África y Asia (Zarrillo *et al.*, 2018). Desde entonces, países de estas regiones han sido los principales productores de cacao. África domina la producción mundial, con el 77%, siendo Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún los países representantes. El resto de la producción mayoritaria se lleva cabo en Indonesia, Ecuador y Brasil (ICCO, 2021; Suri y Basu, 2021).

El mercado del cacao está valorado en más de USD 103,000,000 (Suri y Basu, 2021). En la temporada 2020/21 se reportó una producción bruta mundial de 5,226,000 toneladas de cacao (ICCO, 2022). Los agricultores de pequeña y mediana escala son los más favorecidos, puesto que producen hasta el 95% del cacao, lo que les provee más del 50% de sus ingresos (Abdulai *et al.*, 2018). Esto representa una fuente de progreso para los países menos desarrollados que conforman el sector del cacao.

2. Guatemala

En Guatemala la mayor parte de la producción de cacao se da en la Región Norte y Sur, específicamente en los departamentos de Alta Verapaz, Suchitepéquez y San Marcos (MAGA, 2016). Se estima que en 2016 se produjeron 12,500 toneladas métricas y en 2020 se exportaron cerca de 196 toneladas, con un valor estimado de USD 851,500. Estas cifras son bajas en comparación con los principales productores, tan solo representan el 0.3% de la producción global; sin embargo, contribuyen al producto interno bruto (PIB) del país (Asociación Guatemalteca de Exportadores [AGEXPORT] HOY, 2021; Williams, 2019).

El 4 % de la producción del cacao es exportada a Estados Unidos, Italia, Holanda, Francia, Alemania y Japón. Internacionalmente, se considera como cacao fino de aroma, es decir que destaca por sus propiedades organolépticas y su base genética. El resto del cacao se utiliza a nivel nacional para la elaboración de productos derivados, como cacao en polvo, aceite de cacao, bebidas, la pasta, manteca y cáscara de cacao (MAGA, 2016).

Las labores de cosecha y transformación del cacao son de importancia para el país. En 2016 esta actividad agrícola generó hasta 990 empleos permanentes, lo que favoreció el crecimiento social y económico de los agricultores y de la región (Cooperación Suiza en América Central, 2017). En Guatemala hay alrededor de 250,000 pequeñas y medianas parcelas que cultivan cacao. En 2015 el área cosechada fue de 4,340 hectáreas (ha), representando únicamente el 2.7 % del total del área que se podría aprovechar (MAGA, 2016; Williams, 2019). Desde entonces, se han abordado aspectos de la cadena productiva de cacao para mejorar el rendimiento.

a. Eslabones de la cadena de valor de cacao en Guatemala

La cadena de valor de cacao se creó con el fin de organizar las actividades que integran la producción de cacao, identificar los actores clave del proceso y las áreas de oportunidad y mejora. Fue implementada por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), el Instituto de Cooperación para la Agricultura (IICA) y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA). Estas instituciones brindan asistencia técnica, asesoramiento y financiamiento para posicionar al cacao guatemalteco en el mercado internacional (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza [CATIE], 2016).

La cadena se compone de cinco eslabones (Cuadro 1). Estos integran distintas etapas de la producción del cultivo, desde la reproducción de las plantas hasta la comercialización de los productos. Cabe resaltar que la presencia y el ataque de plagas y enfermedades en los eslabones de insumos y producción son cuellos de botella que afectan directamente la integridad del cultivo, disminuyen la productividad y el rendimiento. Indirectamente, tiene un impacto negativo en la calidad organoléptica, lo que perjudica las etapas de transformación y comercialización (CATIE, 2016).

Para hacerle frente a este problema se utilizan plaguicidas. Esto resulta contradictorio con las buenas prácticas agropecuarias, puesto que no reduce el impacto ambiental y el cacao no puede ser certificado como un producto orgánico en el mercado; restándole valor agregado. Por tanto, se deben buscar alternativas sostenibles para reducir las amenazas de las plagas y enfermedades y así describir nuevas tecnologías que favorezcan a los eslabones de insumos y producción (CATIE, 2016).

Cuadro 1. Características de los eslabones de la cadena productiva de cacao.

Eslabón	Actores	Función principal	Problemas asociados más frecuentes
Insumos	Asociaciones, instituciones y viveros.	Reproducir plantas de cacao injertadas y no injertadas para su venta a productores.	Falta de identificación de los tipos de cacao. Falta de recursos técnicos, como manuales, para el manejo adecuado del cacao en la región.
Producción	Productores y asociados.	Abarca las actividades de la producción de cacao: siembra y crecimiento de la planta y cosecha de la mazorca.	Manejo inadecuado de plantaciones. Incidencia de plagas y enfermedades.
Transformación primaria	Asociaciones y transformadores locales.	Engloba las actividades de beneficiado: fermentación, secado y clasificación de los granos de cacao.	Escasa infraestructura para el beneficiado. Falta de estándares de calidad, procesamiento y análisis de costos.

Eslabón	Actores	Función principal	Problemas asociados más frecuentes
Transformación secundaria	Asociaciones y transformadores locales.	Ocupa las actividades de procesamiento y transformación de los granos de cacao.	Falta de aplicación del valor agregado de los productos de cacao.
Comercialización	Comercializadores	Venta de productos derivados del cacao a nivel local, nacional e internacional.	Mercadeo insuficiente de los productos de cacao. Falta de acuerdos entre productores y compradores.

(CATIE, 2016)

C. Hongos fitopatógenos y su impacto en el cacao

Los hongos fitopatógenos son aquellos que colonizan y afectan a las plantas. Son los organismos eucariotas más prevalentes e incidentes en las infecciones de plantas que conllevan a pérdidas económicas. Anualmente se les atribuye la pérdida del 10 al 12 % de los cultivos agrícolas (Doehlemann *et al.*, 2017). Para el cacao, las pérdidas anuales causadas por hongos fitopatógenos son del 30 al 100 %, principalmente por especies de Ascomycota y Basidiomycota (Villamizar-Gallardo, Osma y Ortíz-Rodríguez, 2019).

En Centroamérica se han descrito distintas enfermedades causadas por hongos fitopatógenos que afectan al fruto y otras partes del cacao. Las principales son la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la mazorca negra y el cáncer de tronco (*Phytophthora roreri* o *P. capsisi*); roselinia (*Roselinia pepo*), el mal del machete (*Ceratocystis cacaofunesta*) y la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Philips – Mora y Cerda, 2011). A pesar de

esto, la presencia de los agentes causales de las enfermedades puede variar a lo largo del tiempo por factores ambientales, actividades antropogénicas y cambios en las prácticas agrícolas.

En 2019 en fincas cacaoteras en Lachuá, Cahabón y Polochic (Alta Verapaz, Guatemala) se identificaron hongos fitopatógenos de interés económico que reducen la productividad e integridad de los cultivos. Los géneros más prevalentes fueron *Colletotrichum*, *Curvularia* y *Fusarium*, en menor medida *Phytophthora* (Dubón, Alarcón y De León, 2021). Estos ejemplares son descritos globalmente como limitantes de la salud agrícola, lo que ha llevado a buscar estrategias de control.

1. Interacciones de los hongos fitopatógenos con las plantas

Los hongos fitopatógenos se pueden clasificar dependiendo de la interacción que establecen con las plantas y el tipo de adquisición de nutrientes. Existen tres tipos: biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos. Los primeros obtienen los nutrientes de los tejidos vivos e íntegros de las plantas. En contraste, los necrotróficos causan necrosis en los tejidos para luego obtener los nutrientes. Los hemibiotróficos presentan ambos tipos de nutrición, comienzan siendo biotróficos y luego se convierten en necrotróficos (Doehlemann *et al.*, 2017).

La colonización de los hongos biotróficos y necrotróficos ocurre en dos pasos importantes: la adhesión y la penetración (Figura 1). Primero, las esporas que son transportadas en el ambiente se adhieren al hospedero y secretan una matriz extracelular compuesta de proteínas insolubles, glicoproteínas, lípidos y polisacáridos, para asegurar su fijación. Aquí, se da la germinación de las esporas para formar tubos germinales y apresorios. Los apresorios rompen la parte externa o cutícula de la planta mediante presión física o acción enzimática, hasta colonizar la epidermis y el mesófilo (Doehlemann *et al.*, 2017; Pradhan *et al.*, 2020).

En el caso de los hongos biotróficos, se forman haustorios que transportan moléculas efectoras al espacio intracelular o citoplásmico de las plantas. En su mayoría, los efectores son residuos de aminoácidos sin actividad enzimática cuyas funciones son facilitar la entrada de las hifas a la célula, absorber nutrientes y debilitar las defensas de la planta. Por otro lado, los hongos necrotróficos degradan la pared celular del hospedero tras la liberación de enzimas, seguido del transporte de toxinas por los haustorios y finalmente obtienen nutrientes de los tejidos muertos (Pradhan *et al.*, 2020).

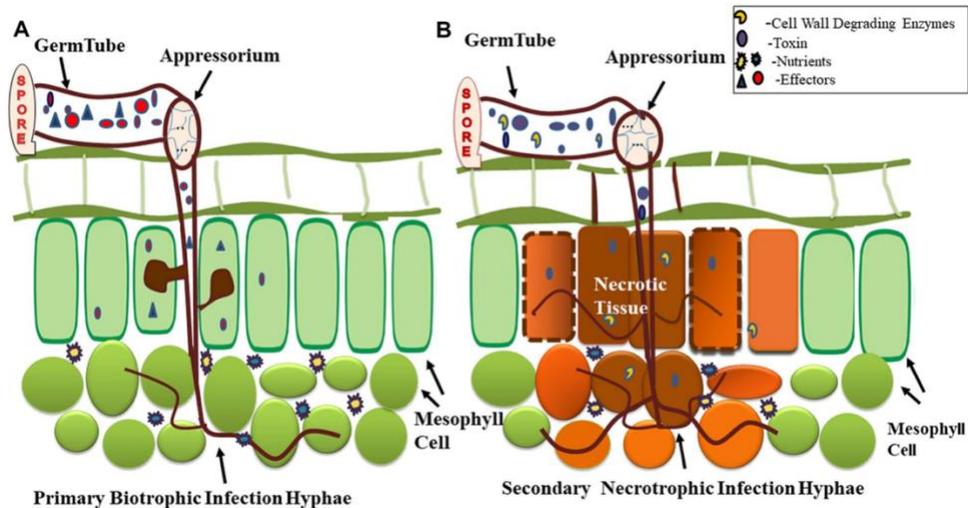


Figura 1. Pasos para la colonización de los hongos en las plantas. (A) Adherencia y penetración de hongos biotróficos y (B) necrotróficos a las plantas (Pradhan *et al.*, 2020)

2. Generalidades de los hongos fitopatógenos más prevalentes en 2019 en Alta Verapaz, Guatemala.

a. *Colletotrichum* sp.

Este género del filo Ascomycota se encuentra dentro del grupo de los hongos fitopatógenos más importantes, dado su impacto social y económico. Afecta a nivel global a una gran variedad de plantas, principalmente a dicotiledóneas; también a cereales, helechos, pinos y humanos. La mayor parte de las especies pertenecientes a este género

son fitopatógenas y siguen un ciclo hemibiotrófico (da Silva *et al.*, 2020; Talhinhos y Baroncelli, 2021).

La antracnosis es una de las enfermedades más reportadas causadas por *Colletotrichum*. El síntoma más común en el cacao es la necrosis de los tejidos; caracterizada por manchas marrones con halos amarillos en las hojas, lesiones marrones oscuro en las mazorcas, pérdida de hojas y muerte regresiva (Figura 2). En el estudio de Dubón, Alarcón y De León (2021) realizado en Guatemala, los síntomas más comunes encontrados en árboles de cacao infectados con *Colletotrichum gloeosporioides* fueron: necrosis en el fruto y en el tallo y colonización por micelio en el tallo.

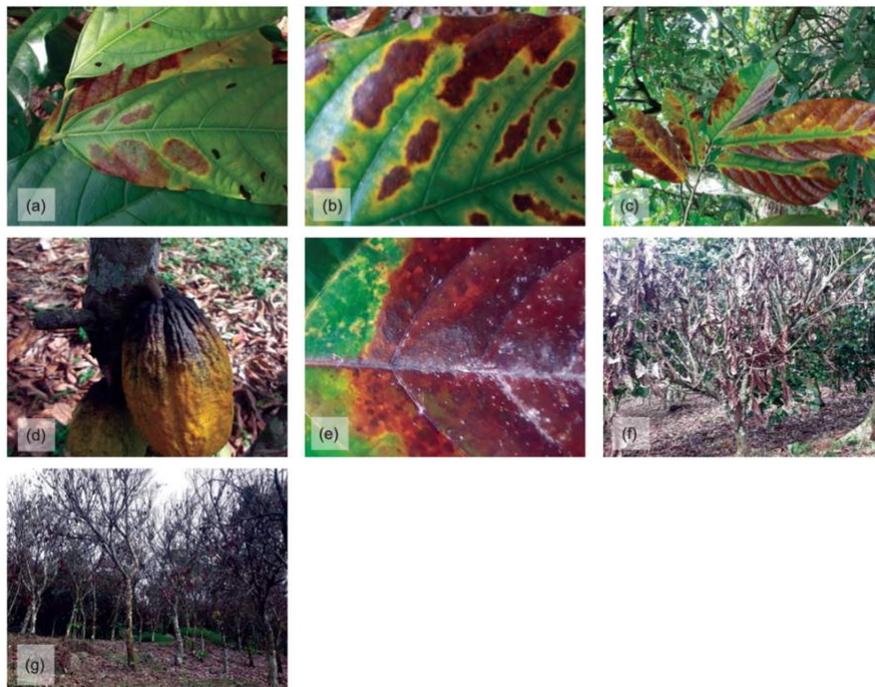


Figura 2. Síntomas de antracnosis causados por *C. gloeosporioides* s.I. en cacao de Ghana. (A – E) Necrosis y clorosis en hojas y fruto, (F y G) Manifestaciones de pudrición en árbol

(Asare *et al.*, 2021)

Aunque estos hongos no son capaces de ingresar a la mazorca y dañar los granos de cacao, las lesiones necróticas disminuyen la tasa de fotosíntesis y de este modo se reduce el rendimiento (Asare *et al.*, 2021; Nair, 2010). Microscópicamente se observan conidióforos acervulares y separados, con hifas hialinas septadas; conidias hialinas,

unicelulares, ovoides a oblongas y con extremos obtusos, y apresorios simples sin septos (Figura 3) (Ajay Kumar, 2014; Qiao *et al.*, 2021).

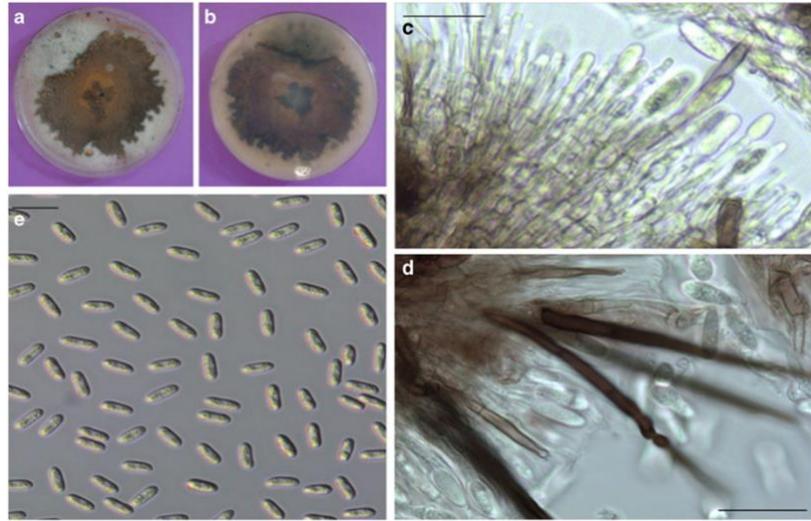


Figura 3. Características microscópicas de *C. gloeosporioides*. (A – B) Morfología, (C) Conidióforos, (D) Conidias, (E) Esporas (Khodadadi *et al.*, 2020)

b. *Curvularia* sp.

Este género pertenece al filo Ascomycota, son hongos dematiáceos, saprófitos y patógenos de animales, humanos y plantas. Afectan mayormente a gramíneas de la familia *Poaceae* y cultivos hortícolas en regiones tropicales y subtropicales (Hyde *et al.*, 2014). La mayor parte de las especies de este género son fitopatógenas y siguen un ciclo hemibiotrófico. Son capaces de infectar las raíces (Lu *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2018).

Curvularia lunata, *C. tuberculata* y *C. trifolii*, son las especies que frecuentan en las infecciones de las plantas y disminuyen el rendimiento de los cultivos. El síntoma más representativo es la aparición de manchas foliares oscuras con halos claros, en las hojas, tallos, flores y semillas (Figura 4). También puede ocurrir clorosis y descomposición por necrosis en las raíces y en los frutos (Hyde *et al.*, 2014). Si bien la Figura 4 no corresponde a una infección en el cacao, los síntomas serían similares

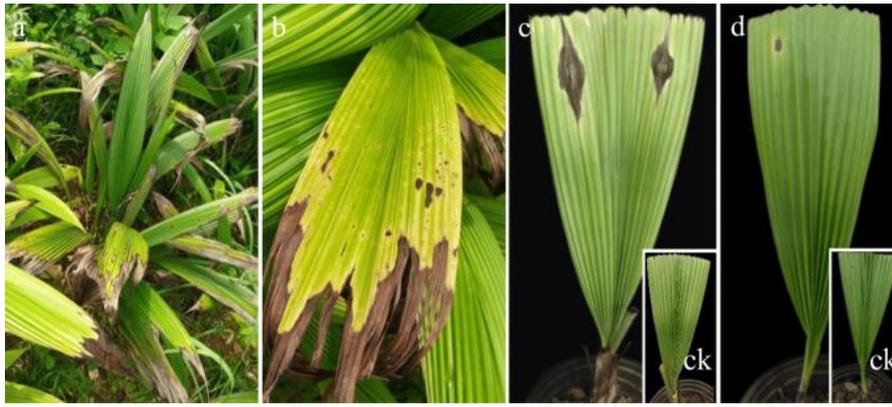


Figura 4. Síntomas en hojas de *Curculigo capitulata* causados por *C. curculiginis* (Liu *et al.*, 2019)

En el estudio de Dubón, Alarcón y De León (2021), realizado en Guatemala, los síntomas más comunes encontrados en árboles de cacao infectados con *Curvularia lunata* fueron: puntos necróticos y cloróticos en los frutos y en las hojas, canchales en hojas y manchas necróticas en los tallos. Microscópicamente se observan hifas septadas con conidióforos geniculados, simpodiales y con una apariencia hinchada o curvada. Generalmente, los conidios tienen tres septos y cuatro células (Figura 5) (Sutton, Rinaldi y Sanche, 2009).



Figura 5. Características microscópicas de *C. lunata*. (A) Morfología, (B – D) Hifas septadas con conidióforos, (H – K) Conidios septados (Manamgoda *et al.*, 2012)

c. *Fusarium* sp.

Este género del filo Ascomycota posee más de 300 especies de las cuales algunas causan enfermedad en animales y humanos por la producción de micotoxinas; y otras como *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum* y *F. avenaceum*, son fitopatógenas (Arie, 2019; Rampersad, 2020). Globalmente generan entre el 30 al 70% de pérdidas de cultivos agrícolas, en particular de cereales, frutas y verduras. Dependiendo de las condiciones ambientales pueden ser parásitos, endófitos o patógenos con un ciclo hemibiotrófico (Aoki, O'Donnell y Geiser, 2014; Saremi y Okhovvat, 2008).

Al infectar a las plantas generan marchitez vascular progresiva, epinastia y pérdida de hojas, retraso del crecimiento y muerte (Figura 6) (Aoki, O'Donnell y Geiser, 2014). Estos síntomas también fueron observados en árboles de cacao de Guatemala en el estudio de Dubón, Alarcón y De León (2021). Las clamidosporas producidas por este género permanecen en el suelo por mucho tiempo, lo que favorece la colonización e infección por medio de las raíces (Aoki, O'Donnell y Geiser, 2014). Microscópicamente presentan macroconidios septados y curvados, clamidosporas, conidióforos con células conidiógenas y esporodocios (Figura 7) (Arie, 2019).

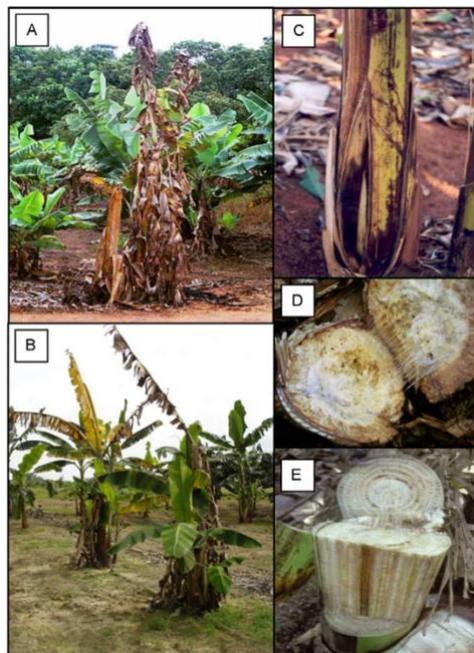


Figura 6. Síntomas en árbol de banano en Sudáfrica causados por *F. oxysporum* (Fourie *et al.*, 2011)



Figura 7. Características microscópicas de *F. oxysporum*. (A) Morfología, (B) Monofiálides, (C) Microconidia, (D) Macroconidios, (E) Clamidosporas (Cutuli *et al.*, 2015)

d. *Phytophthora* sp.

Este género pertenece a los Oomycetes, un grupo de eucariotas filamentosos que se asemejan morfológicamente a los hongos, pero difieren principalmente en la composición de la pared celular, la ploidía de las células y la división de sus hifas. La mayor parte de las especies de este género son fitopatógenas, consideradas unas de las mayores amenazas para la agricultura y los ecosistemas y siguen un ciclo hemibiotrófico. Ciertos ejemplares pueden infectar a más de 300 hospederos, siendo así considerados como patógenos emergentes (McGowan y Fitzpatrick, 2020; Meng *et al.*, 2014).

Phytophthora sp. causa la enfermedad de la mazorca negra en el cacao, causando la pérdida anual de hasta el 30% de las mazorcas. Los síntomas se desarrollan en todos los órganos. Se observan manchas necróticas en la mazorca y en las hojas, destrucción de la corteza del tronco tras la aparición de manchas necróticas con bordes cloróticos; pudrición de la mazorca y afectación de las raíces. Microscópicamente presenta esporangios esféricos u ovoides y clamidosporas esféricas (Figura 8) (Martínez de la Parte y Pérez – Vicente, 2015, Meng *et al.*, 2014).

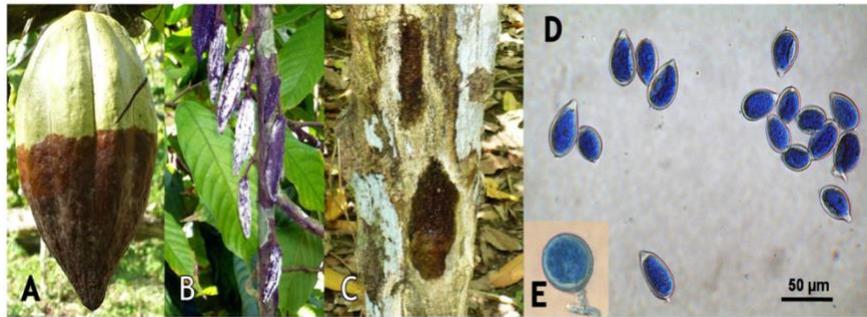


Figura 8. Manifestaciones de *P. palmivora* en el cacao y estructuras microscópicas. (A – C) Síntomas de *P. palmivora* en cacao de Cuba, (D) Esporangios, (E) Clamidosporas (Martínez de la Parte y Pérez – Vicente, 2015)

D. Estrategias de control de hongos fitopatógenos

El control de hongos fitopatógenos se debe hacer con base en el manejo integrado de plagas. Este proceso prioriza el bienestar social, económico y ambiental, a la vez que busca disminuir las pérdidas de los cultivos causadas por plagas y enfermedades. Uno de los objetivos principales de este planteamiento es reducir el uso de pesticidas y potenciar el uso de métodos de control biológicos y culturales para no alterar el ecosistema agrícola (Stenberg, 2017).

1. Métodos culturales

Se basan en evaluar las condiciones de las plantaciones para identificar plantas infectadas, eliminarlas y evitar la propagación de enfermedades a individuos circundantes. Asimismo, busca mejorar el área de cultivo para evitar las plagas. La tecnología utilizada es meramente con prácticas agrícolas tradicionales, como la fertilización del suelo, la poda de las plantas, el manejo de la sombra, las malezas y la altura de las plantas (Arvelo *et al.*, 2017).

2. Métodos químicos

Es la estrategia más tradicional utilizada a nivel global. Se basa en la aplicación de productos químicos, como los pesticidas; específicamente fungicidas, a las semillas, el tejido foliar o al suelo para prevenir, curar o erradicar las infecciones por hongos. Los mecanismos de acción se basan en inhibir pasos clave del metabolismo de los hongos que son necesarios para su supervivencia.

Las principales desventajas de utilizar pesticidas es que los hongos fitopatógenos eventualmente generan resistencia a los fungicidas, tienen un alto costo de producción, dañan los ecosistemas y pueden ser tóxicos para humanos y animales. A nivel del suelo, alteran las propiedades, disminuyen las comunidades de hongos, invertebrados beneficiosos y la materia prima. En organismos superiores causan efectos negativos a nivel endocrino, neurológico y del aparato reproductor; además son carcinógenos. (Carmona *et al.*, 2020; Zubrod *et al.*, 2019).

3. Métodos biológicos con microorganismos antagonistas

Los métodos biológicos son una alternativa sostenible a los métodos químicos, dado que disminuyen el impacto en el ambiente y la salud. Específicamente los microorganismos antagonistas se usan para controlar patógenos en un cultivo e incluso le pueden proveer beneficios a las plantas. Los microorganismos benéficos de uso habitual son hongos y bacterias, siendo estas últimas de interés para esta investigación (Correia *et al.*, 2016).

El primer paso de esta estrategia es explorar fuentes biológicas en ambientes naturales, como los suelos, que sean útiles a nivel económico y social; proceso conocido como bioprospección. Posteriormente se lleva a cabo el aislamiento y la identificación molecular de los microorganismos, como las bacterias. Luego se realizan pruebas *in vitro* para determinar el efecto antagonista contra los hongos fitopatógenos. El modo de acción puede ser a partir de parasitismo, antibiosis o por competencia de nutrientes (Ons *et al.*, 2020).

Se han descrito bacterias con propiedades antifúngicas *in vitro* mediante la liberación de enzimas líticas, sideróforos, ácido salicílico y metabolitos volátiles (Petatán-Sagahón *et al.*, 2011). Ciertos géneros poseen comúnmente características benéficas, siendo los

principales *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*; *Bacillus*, *Burkholderia*; *Enterobacter*, *Klebsiella*; *Pseudomonas*, *Rhodococcus*; *Serratia*, *Streptomyces*, entre otros. Además, ciertos ejemplares de este listado han demostrado propiedades antifúngicas contra los hongos fitopatógenos que afectan al cacao (Bababola, 2010).

V. METODOLOGÍA

A. Hipótesis

1. Hipótesis alternativa (Ha)

La/s bacteria/s más representativa/s aislada/s del suelo cacaotero tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*.

2. Hipótesis nula (Ho)

La/s bacteria/s más representativa/s aislada/s del suelo cacaotero no tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*.

B. Viabilidad

- El desarrollo de este estudio será asesorado por las licenciadas Mariafernanda Alarcón -MSc. y Patricia Herrera -MSc.
- El financiamiento de la investigación será cubierto por el Laboratorio de Protección Vegetal en el Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios de la Universidad del Valle de Guatemala.
- Los recursos consumibles, así como los reactivos serán cubiertos por el Laboratorio de Protección Vegetal en el Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios de la Universidad del Valle de Guatemala.

C. Materiales y métodos

1. Aislamiento de bacterias de muestras de suelo

Se utilizaron 75 muestras de suelo de cacao colectadas en un estudio previo (Cifuentes y Alonzo, 2021). Estas correspondían a tres regiones de Alta Verapaz: 25 muestras de Cahabón, 25 muestras de Lachuá y 25 muestras de Polochic. Se formaron muestras compuestas dentro de cada región, para un total de 5 muestras por región y 15 muestras en total.

Para las 15 muestras se siguió el siguiente procedimiento dentro de una campana de flujo laminar. Se homogeneizaron las muestras de suelo y se pesó 1 g para colocarlo en un beaker. A este se le agregaron 9 mL de solución de Tritón X-100 0.05%. Se tapó la boca del beaker con papel aluminio y se incubó durante 1 h a 150 rpm y temperatura ambiente.

Se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-5} . Para esto, se tomó 1 mL de la muestra incubada y se agregó a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de solución salina 1% para obtener la dilución 10^{-2} . Se homogeneizó la solución en un vortex y se agregó 1 mL de esta dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de solución salina 1% para obtener la dilución 10^{-3} . El último paso se repitió dos veces más para llegar a la dilución 10^{-5} .

Por último, se inocularon 100 μ L de las últimas dos diluciones (10^{-4} y 10^{-5}) en placas Petri con agar nutritivo. Se diseminó el inóculo con esparcidores de vidrio estériles y se incubaron las placas Petri a 28 ± 1 °C por 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se observaron los diferentes tipos de colonias bacterianas en cada placa.

Se enumeraron y se describió su morfología (forma, margen, color, apariencia de superficie y elevación). Cada colonia distinta se re aisló en una nueva caja Petri con agar nutritivo utilizando un asa bacteriológica. Las bacterias 6.6 y 8.3 se caracterizaron por tinción Gram. Se incubaron las cajas Petri a 28 ± 1 °C por 72 horas. Las cajas Petri se preservaron en refrigeración a 2 °C – 8 °C hasta nuevo uso. En total se aislaron 32 bacterias.

2. Aislamiento de hongos fitopatógenos de muestras de la planta de cacao

Se tomaron muestras foliares, de ramas y frutos de la planta de cacao con síntomas. Se siguió el procedimiento descrito por Dubón, Alarcón y De León (2021). Brevemente, se obtuvieron porciones de las partes con síntomas y se desinfectaron con hipoclorito de sodio 10%, etanol 70% y agua, en intervalos de 1 minuto. Las porciones se sembraron en placas Petri con agar PDA suplementado con cloranfenicol y estreptomycin, en placas Petri con agar V8® y en cámaras húmedas.

Las cajas Petri se incubaron a 28 ± 1 °C por 4 – 8 días y se observaron los diferentes tipos de micelios fúngicos. Estos se re aislaron individualmente en nuevas cajas Petri con

agar PDA utilizando una aguja bacteriológica y se incubaron en las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, se hicieron montajes con azul de lactofenol para la identificación de las estructuras fúngicas con microscopía óptica. Las cajas Petri se preservaron en refrigeración a 2 °C – 8 °C hasta nuevo uso.

En total se aislaron 6 hongos fitopatógenos. Por sus características microscópicas se identificaron 4 correspondientes al género *Fusarium* (F1, F2, F3 y F4) y 2 del género *Colletotrichum* (C1 y C2). Además, se hizo un nuevo cultivo de 2 hongos fitopatógenos del cacao guatemalteco aislados en estudios previos: 1 del género *Nigrospora* sp. (N1) y el otro correspondiente a *Geotrichum candidum* (G1) (Dubón, Alarcón y De León, 2021).

3. Cribado de bacterias con propiedades antifúngicas frente a hongos fitopatógenos.

Se prepararon nuevos cultivos de las bacterias y los hongos aislados. Los ensayos se realizaron en cajas Petri con agar de extracto de levadura glucosa triptona (TGYA). Se siguió el esquema de la Figura 9 para evaluar las combinaciones posibles de las 32 bacterias contra los 8 hongos fitopatógenos (total de microorganismos aislados) en donde la H representa al hongo y las B las bacterias (Passera *et al.*, 2017).

En el centro de la caja Petri se colocó un disco de micelio de 5 mm cortado con un perforador estéril de un cultivo fúngico con 10 días previos de incubación. Se incubaron las cajas Petri a 28 ± 1 °C por 2 días. Dos días después, se colocaron 4 discos estériles de papel filtro de 5 mm a distancias equidistantes de 3 cm del centro. En cada disco se agregaron 20 µL de cultivo de cada bacteria. Los cultivos fueron preparados 24 h antes, agregando una colonia bacteriana a tubos de ensayo de plástico estériles conteniendo 4 mL de caldo nutritivo e incubados a 28 ± 1 °C. Se midió la densidad óptica de cada cultivo bacteriano con un Biofotómetro plus V1.04 (Eppendorf), procurando que se encontrara en 1.0. En los controles se sembró el hongo y se colocaron 2 discos estériles de papel filtro con 20 µL de caldo nutritivo y 2 discos estériles de papel filtro. Por último, se incubaron las cajas Petri a 28 ± 1 °C por 7 días y se revisó si el crecimiento fúngico fue inhibido por las bacterias (Passera *et al.*, 2017).

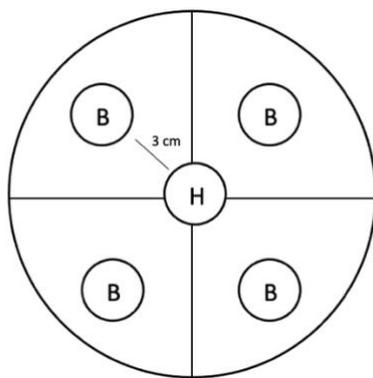


Figura 9. Representación del método para identificar las bacterias con propiedades antifúngicas.

4. Ensayo de antagonismo de bacterias frente a hongos fitopatógenos mediante ensayo dual *in vitro*.

Se seleccionó la bacteria que visualmente presentó inhibición sobre los 8 hongos fitopatógenos y tuvo un crecimiento caracterizado por su amplia extensión en la caja Petri. Se preparó un nuevo cultivo de la bacteria y de los hongos. Los ensayos se realizaron en cajas Petri con agar TGYA. Se siguió el esquema de la Figura 10 en donde la H representa al hongo y la B la bacteria. Se realizaron 5 réplicas por cada hongo.

En un lado de la caja Petri, a 3 cm del centro, se colocó un disco de micelio de 5 mm cortado con un perforador estéril de un cultivo fúngico con 10 días previos de incubación. Se incubaron las cajas Petri a 28 ± 1 °C por 2 días. Dos días después, se colocó un disco estéril de papel filtro de 5 mm a 3 cm del centro. En el disco se agregó 20 μ L de cultivo bacteriano. El cultivo fue preparado 24 h antes, agregando una colonia bacteriana a tubos de ensayo de plástico estériles conteniendo 4 mL de caldo nutritivo e incubados a 28 ± 1 °C. Se midió la densidad óptica de cada cultivo bacteriano con un Biofotómetro plus V1.04 (Eppendorf®), procurando que se encontrara en 1.0. En los controles se sembró únicamente el hongo. Por último, se incubaron las cajas Petri a 28 ± 1 °C por 7 días y se calculó el porcentaje de inhibición (Passera *et al.*, 2017).

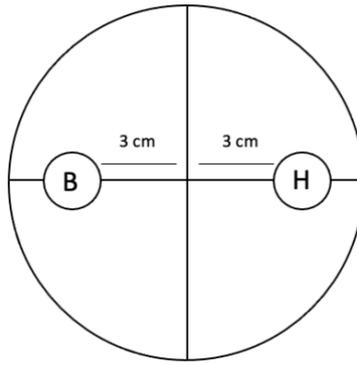


Figura 10. Representación del método del ensayo dual del antagonismo de las bacterias frente a los hongos fitopatógenos.

5. Porcentajes de inhibición

El porcentaje de inhibición (%I) en cm^2 que ejerce la bacteria frente al crecimiento de los hongos se calculó mediante la fórmula:

$$\%I = \left(\frac{A}{B}\right) * 100$$

en donde A es el área en cm^2 que ocupó la bacteria en la caja Petri en y B es el área en cm^2 total que ocupó la bacteria y el hongo en la caja Petri (Szekeres *et al.*, 2006). Ambas áreas se calcularon con el programa ImageJ versión 1.46r, utilizando fotografías (iPhone 14 Pro) de las cajas Petri tomadas a 19 cm de distancia en todos los casos.

6. Identificación molecular de colonias bacterianas antagonistas

Se amplificó el gen ARNr 16s de ambas bacterias mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) con los cebadores 27F y 1492R. Para la extracción del ADN se tomó una colonia bacteriana y se colocó en un tubo cónico Eppendorf de 1.5 mL conteniendo 400 μL de agua desmineraliza estéril. El tubo se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se colocó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min.

Se preparó el máster mix para 7 reacciones con los siguientes componentes por reacción (μL): 17.05 agua ultrapura, 2.5 buffer 10X con MgCl_2 , 1.25 dNTPs (2.5 mM); 1 cebador

27F (5 μ M), 1 cebador 1492R (5 μ M) y 0.2 Taq (5U). El máster mix se dividió en 7 tubos de 0.5 mL agregando 23 μ L a cada uno. Se hicieron triplicados para ambas bacterias adicionando 3 μ L de ADN. Al tubo control se le agregó únicamente el máster mix.

La PCR se realizó en un termociclador Flexlid Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf®) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial por 2 min a 94 °C, desnaturalización del ADN por 30 s a 94 °C; alineamiento de cebadores por 58 s a 30 °C; extensión por Taq por 1.5 min a 72 °C y una extensión final por 7 min a 72 °C. Para la visualización de los amplicones se preparó un gel de agarosa al 1.33% y se utilizó una cámara de electroforesis de 30 mL (Sigma Aldrich®) con una fuente AccuPower 500 (VWR).

En el primer pozo se colocaron 5 μ L de la escalera molecular de 1 kb PCR Marker (Promega®) más 1 μ L de Loading Dye 6x Blue (Promega®). En los pozos 2 – 4 se agregaron 4 μ L del amplicón de la primera bacteria, 1 μ L de Loading Dye 6x Blue y 1 μ L de GelRed 10,000X (Biotium®). En los pozos 5 – 7 se agregaron 4 μ L del amplicón de la segunda bacteria, 1 μ L de Loading Dye 6x Blue y 1 μ L de GelRed. En el pozo 8 se colocaron 4 μ L del control, 1 μ L de Loading Dye 6x Blue y 1 μ L de GelRed. Se corrió por 40 min a 80 voltios y se observó el gel en un transiluminador (UVP®).

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en Macrogen, Inc. Se analizó la calidad de las secuencias en CodonCode Aligner versión 10.0.2 observando la resolución de los cromatogramas y haciendo una limpieza del inicio y el final de las secuencias para eliminar bases de mala calidad. Asimismo, se hizo una alineación de las secuencias forward y reverse, para obtener la secuencia consenso. Esta se alineó localmente en BLAST, NCBI con el fin de identificar la especie bacteriana.

7. Identificación molecular de hongos fitopatógenos

Se amplificó la región del espaciador transcrito interno 1 (ITS 1), ITS2 y 5.8s ADN ribosomal (ADNr 5.8s) de los hongos fitopatógenos identificados como C1, C2 y N1 mediante una PCR con los cebadores ITS1 e ITS4. Para la extracción del ADN se tomaron de 0.1 a 0.3 g de micelio fúngico de 10 días de incubación previa y se colocaron en tubos

cónicos Eppendorf de 1.5 mL conteniendo 400 μ L de buffer TE. El tubo se incubó a 20 °C por 20 min.

Se agregaron 600 μ L de buffer de extracción CTAB precalentado a 65 °C y se maceró durante 30 – 60 s. Se incubó a 65 °C por 15 – 30 min, seguido de una incubación por 5 min en una gradilla previamente enfriada. Se agregaron 500 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se colocó en un vórtex durante 1 min. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf.

Se agregó 1 volumen de isopropanol frío y 1/10 de volumen de acetato de amonio 7.5 M. Se mezcló por inversión y se incubó a -20 °C por 20 min. Se centrifugó a las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 150 μ L de etanol frío al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante, se secó el precipitado al aire por 45 min y se resuspendió en 50 μ L de buffer TE precalentado a 65 °C.

La preparación del máster mix, la PCR y la evaluación de la integridad de los amplicones en el gel de agarosa se realizó de la misma manera empleada para la identificación molecular de las bacterias. Exceptuando que la composición del máster mix por reacción fue (μ L): 15.55 agua ultrapura, 5 buffer 5X, 1.25 dNTPs (2.5 mM); 1 cebador ITS1 (5 μ M), 1 cebador ITS4 (5 μ M) y 0.2 Taq (5U). Además, el programa de PCR consistió en desnaturalización inicial por 3 min a 95 °C, desnaturalización del ADN por 45 s a 94 °C; alineamiento de cebadores por 1.5 min a 55 °C; extensión por Taq por 2 min a 72 °C y una extensión final por 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en Macrogen, Inc. Se analizó la calidad de las secuencias en CodonCode Aligner versión 10.0.2 observando la resolución de los cromatogramas y haciendo una limpieza del inicio y el final de las secuencias para eliminar bases de mala calidad. Asimismo, se hizo una alineación de las secuencias forward y reverse, para obtener la secuencia consenso. Esta se alineó localmente en BLAST, NCBI con el fin de identificar la especie fúngica.

8. Evaluación de la producción de quitinasas y proteasas bacterianas

Se utilizaron medios diferenciales para la evaluación de la producción de enzimas líticas. Se colocaron 20 μ L de cultivo de cada bacteria en los medios cuya preparación se especifica posteriormente. Se incubaron las cajas Petri a 28 ± 1 °C, los resultados de la producción de quitinasas se observaron a los 10 días y de proteasas a los 2 días. Se interpretó un resultado positivo como la generación de un halo transparente alrededor de las colonias y un resultado negativo como la ausencia del halo.

Para la evaluación de la producción de quitinasas se utilizó un medio de quitina coloidal. La quitina coloidal se preparó siguiendo las indicaciones del estudio de Subramanian *et al* (2020), adicionando quitina de cáscaras de camarón de grado reactivo. El medio se formuló agregando los siguientes componentes por litro: 1% de quitina coloidal, 0.3 g de K_2HPO_4 , 4 g de NaCl; 0.3 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 1.5% de agar. Por otro lado, para la evaluación de la producción de proteasas se utilizó un medio compuesto por siguientes componentes por litro: 20 g de leche descremada en polvo, 5 g de peptona; 2.5 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa y 15 g de agar microbiológico.

9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) en Microsoft® Excel para Mac versión 16.70 (23021201) para corroborar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de inhibición. Se establecieron las hipótesis de investigación, donde la hipótesis alternativa indicaba que las medias entre los tratamientos diferían entre sí. Se corroboró que el valor F de prueba fuera mayor al valor crítico para F, con el fin de rechazar la hipótesis nula. Se realizó la prueba LSD de Fisher calculando el valor LSD y la diferencia absoluta de los tratamientos. Se comparó la diferencia de medias contra el valor LSD, en caso de ser mayor se estableció que las medias diferían estadísticamente entre sí. Se evaluaron los supuestos de independencia de las observaciones, homogeneidad de varianzas y distribución normal.

VI. RESULTADOS

A. Aislamiento de colonias bacterianas a partir de muestras de suelo de plantaciones de cacao.

Se aislaron 32 bacterias con morfología aparentemente distinta. El Cuadro 6 en anexos presenta las características de las colonias. Para fines del estudio, las colonias con identificación 6.6 y 8.3 se caracterizaron por tinción Gram (Figuras 11 y 12). Ambas fueron bacilos Gram positivo con endosporas; sin embargo, los bacilos de la colonia 6.6 fueron más cortos que los de la colonia 8.3.

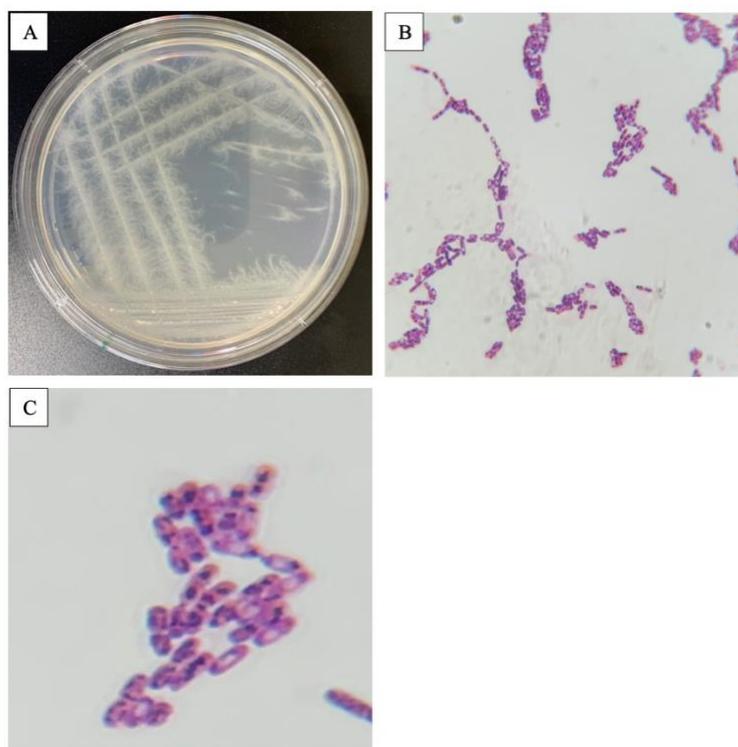


Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas de la colonia bacteriana 6.6. (A) Colonia bacteriana aislada en agar nutritivo, (B) Colonia bacteriana observada en microscopio óptico a 1000x, (C) Colonia bacteriana observada en microscopio óptico a 1000x con zoom adicional.

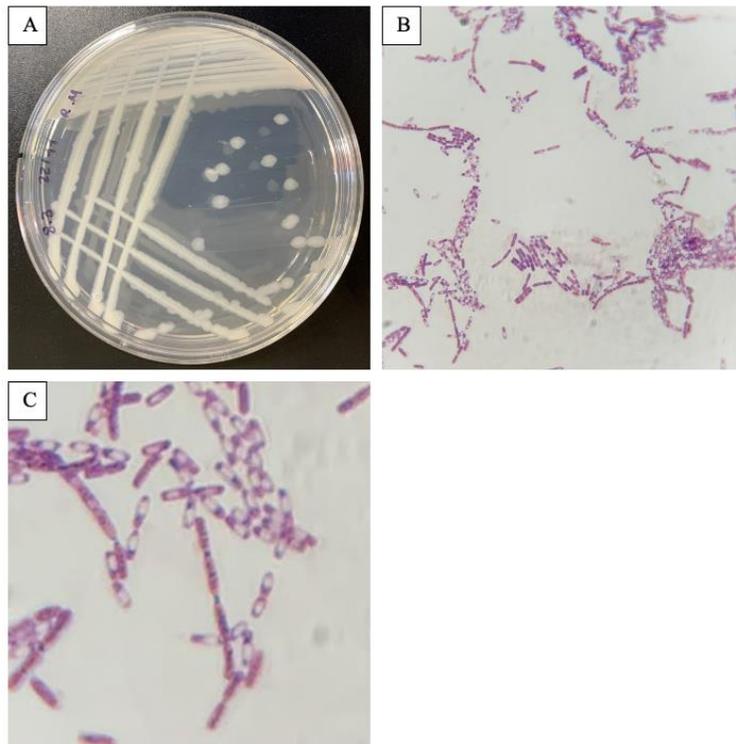


Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas de la colonia bacteriana 8.3. (A) Colonia bacteriana aislada en agar nutritivo, (B) Colonia bacteriana observada en microscopio óptico a 1000x, (C) Colonia bacteriana observada en microscopio óptico a 1000x con zoom adicional.

La Figura 11 muestra a nivel macroscópico colonias rizoides, color crema; opacas y planas. A nivel microscópico son bacilos cortos, Gram positivo, individuales o en cadenas cortas y con esporas ovales que no hinchaban la célula. En contraste, la Figura 12 muestra colonias irregulares, color blanco, opacas y planas. A nivel microscópico son bacilos Gram positivo, individuales o en cadenas cortas y con esporas ovales que hinchaban la célula.

B. Evaluación del antagonismo de las bacterias frente al crecimiento de los hongos fitopatógenos.

Se evaluó el antagonismo de las 32 bacterias frente a los 8 hongos fitopatógenos. Las figuras 22 – 29 en anexos muestran la morfología y estructuras microscópicas de los hongos. Los Cuadros 7 y 8 en anexos muestran los resultados de este cribado. Se evidenció que las bacterias con identificación 6.6 y 8.3 tuvieron antagonismo frente al crecimiento

de todos los hongos fitopatógenos. Por esta razón, ambas bacterias se identificaron molecularmente y la bacteria 6.6 se utilizó para realizar los ensayos de cultivo dual *in vitro*.

Los ensayos de cultivo dual *in vitro* se realizaron con el fin de determinar el porcentaje de inhibición que ejercen las bacterias sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos. El Cuadro 2 muestra los porcentajes de inhibición promedio que tuvo la bacteria 6.6 sobre los hongos fitopatógenos. Seis de los ocho hongos fueron inhibidos en más del 50%, siendo G1 el mayormente inhibido (61.2%). Los hongos F1 y N1 fueron los hongos inhibidos en menor medida con un 39.8 y 39.1% respectivamente.

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición de la bacteria 6.6 frente al crecimiento de los hongos fitopatógenos.

Hongo fitopatógeno	Inhibición promedio (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
F1	39.8	3.15	7.96
F2	53.6	3.04	5.68
F3	60.7	4.10	6.68
F4	58.2	10.5	17.9
C1	58.7	5.42	9.22
C2	57.9	6.36	10.9
G1	61.2	4.43	7.24
N1	39.1	2.66	6.82

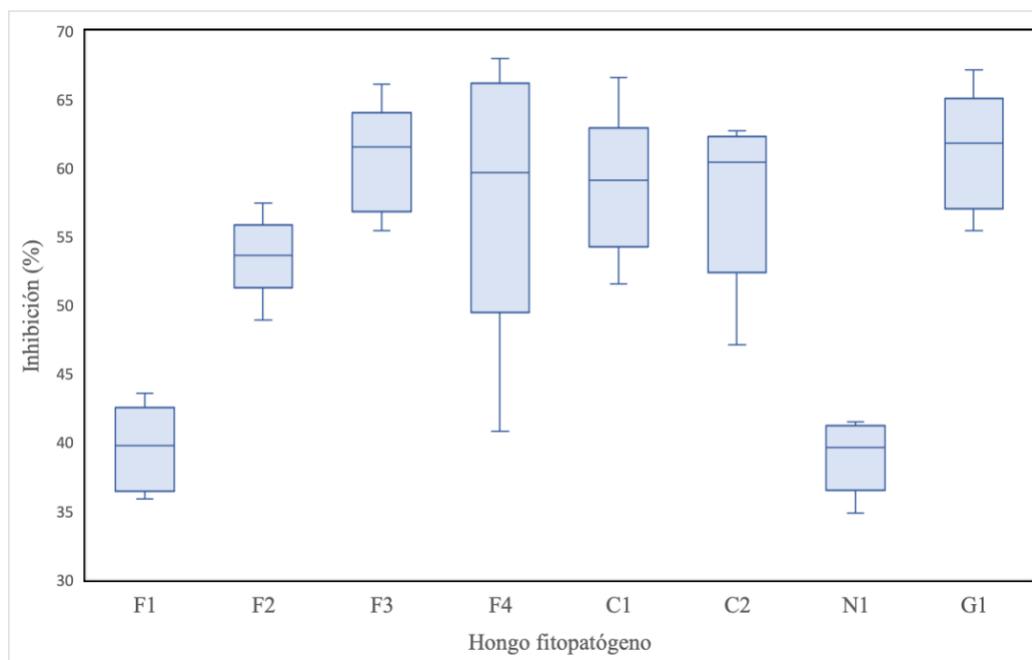


Figura 13. Comparación de las medias de los porcentajes de inhibición para cada hongo fitopatógeno.

La Figura 13 muestra un diagrama de caja y bigotes entre las medias de los porcentajes de inhibición para los hongos fitopatógenos. A simple vista los porcentajes que difieren en mayor medida son los que corresponden a los hongos F1 y N1. Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para corroborar si esta diferencia era estadísticamente significativa.

Se estableció que la media del porcentaje de inhibición para F1 difiere significativamente de las medias de los demás hongos, exceptuando N1. Además, se comprobó que la media del porcentaje de inhibición para N1 difiere significativamente de las medias de los demás hongos, exceptuando F1. Se confirmó que la bacteria 6.6 tuvo una mayor capacidad inhibitoria sobre los hongos F2, F3, F4, C1, C2 y G1.

En las figuras 14 – 21 se observan los ensayos duales de la bacteria 6.6 frente a los hongos fitopatógenos.

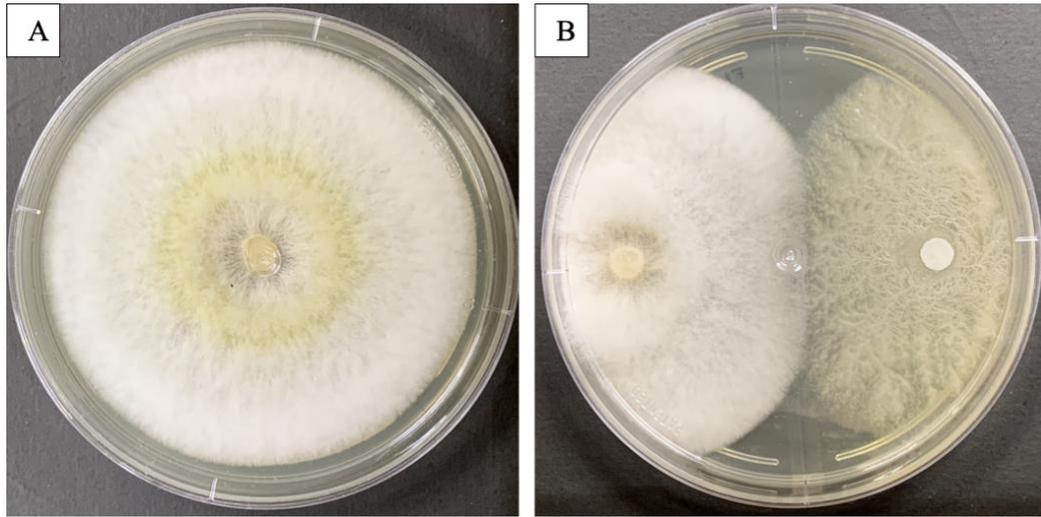


Figura 14. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo F1. (A) Control: Inoculación de hongo F1, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.

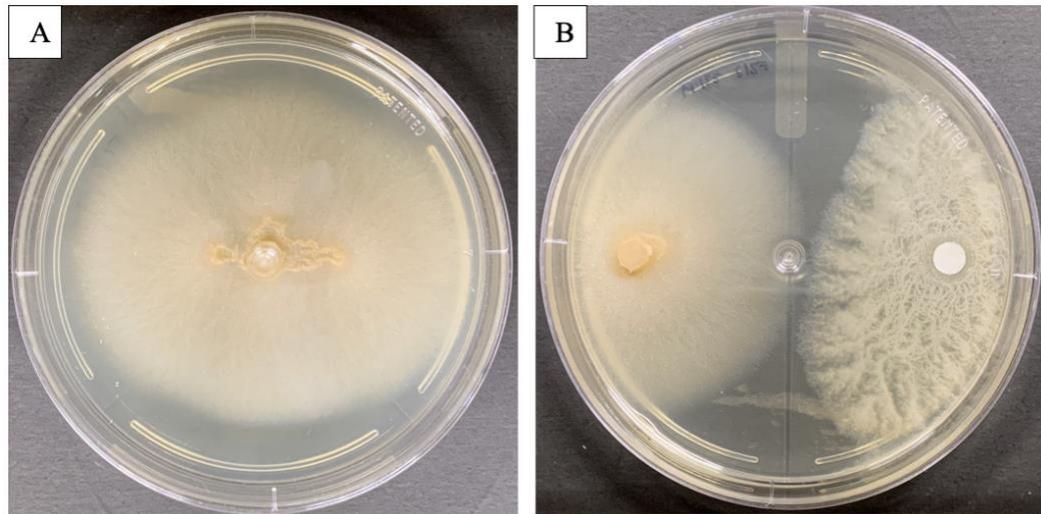


Figura 15. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo F2. (A) Control: Inoculación de hongo F2, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.

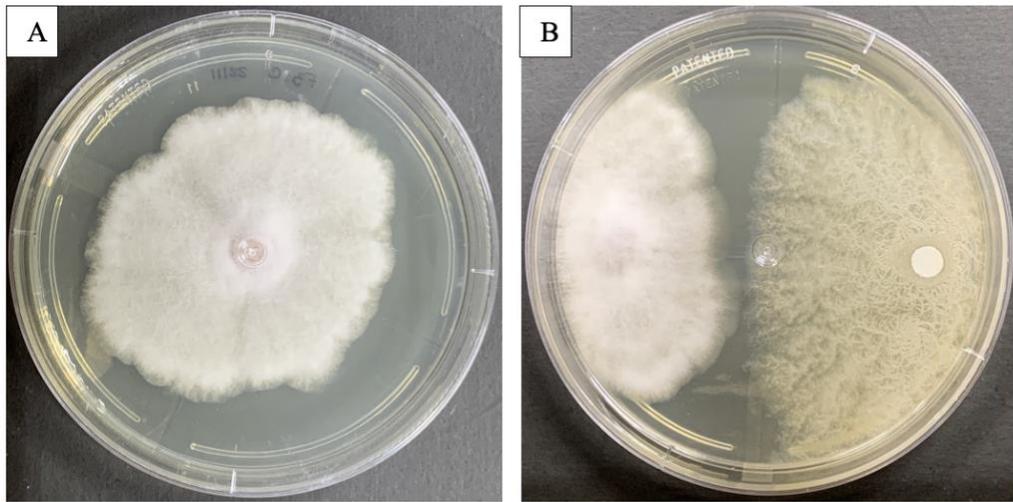


Figura 16. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo F3. (A) Control: Inoculación de hongo F3, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.

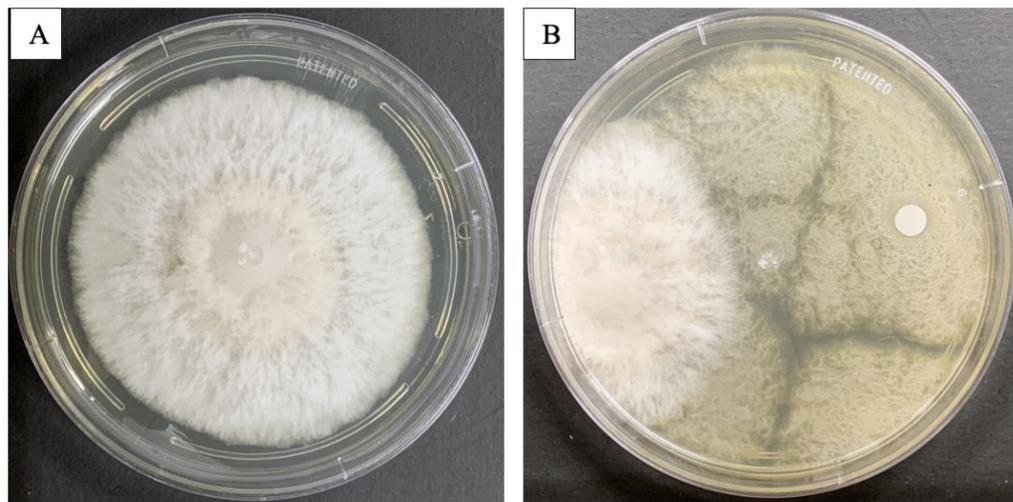


Figura 17. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo F4. (A) Control: Inoculación de hongo F4, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.

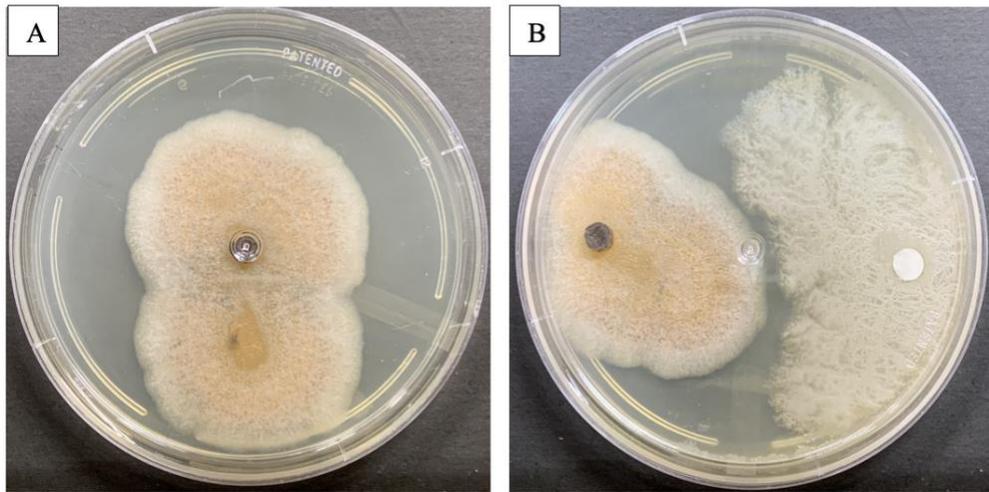


Figura 18. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo C1. (A) Control: Inoculación de hongo C1, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.

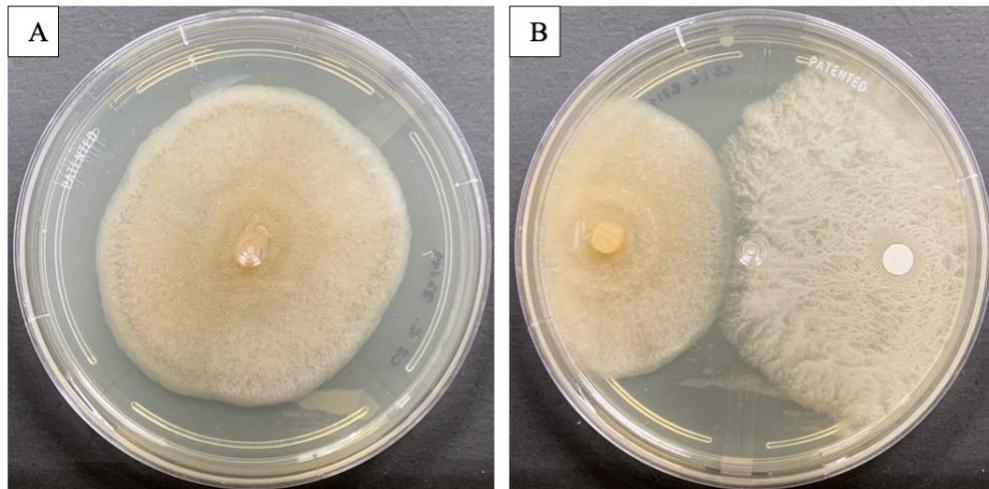


Figura 19. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo C2. (A) Control: Inoculación de hongo C2, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.

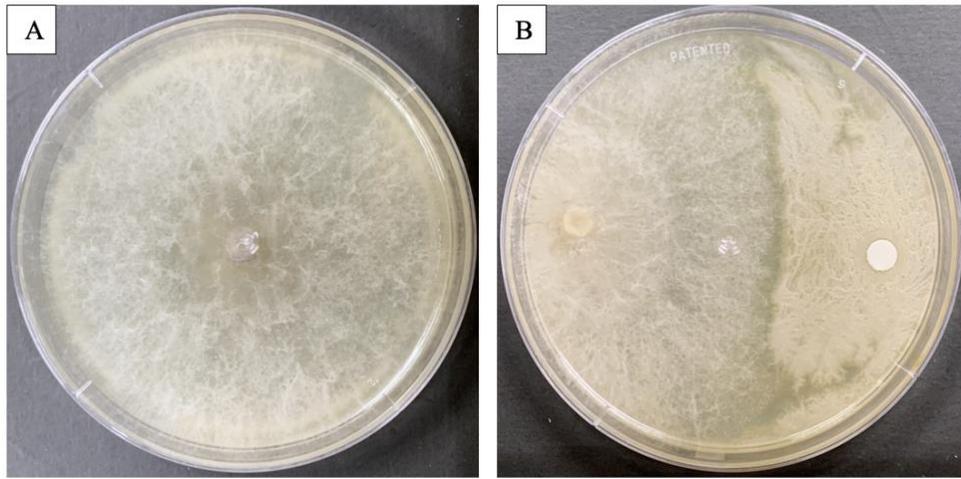


Figura 20. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo N1. (A) Control: Inoculación de hongo N1, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.

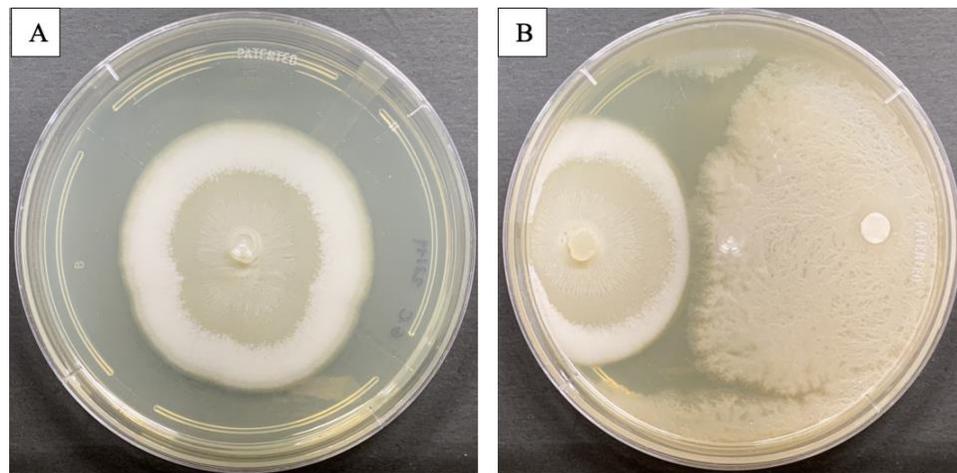


Figura 21. Ensayo dual entre la bacteria 6.6 y el hongo G1. (A) Control: Inoculación de hongo G1, (B) Inoculación del hongo del lado izquierdo y de la bacteria del lado derecho.

En todos los ensayos se observa que los hongos dejaron de crecer al estar cercanos a la bacteria, con una ligera zona de inhibición y no hubo contacto entre estos dos microorganismos.

C. Identificación molecular de las bacterias que presentaron antagonismo frente al crecimiento de todos los hongos fitopatógenos evaluados.

Se amplificó y secuenció el gen ARNr 16s de las 2 bacterias que presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los 8 hongos fitopatógenos. En el Cuadro 3 se observa el análisis obtenido a partir del alineamiento de ambas secuencias de nucleótidos en BLAST. La bacteria 6.6 corresponde a *Bacillus cereus* con un 99.40% de identidad y un valor E = 0.0. La bacteria 8.3 corresponde a *Bacillus thuringiensis* con un 100% de identidad y un valor E = 0.0.

Cuadro 3. Información obtenida a partir del alineamiento local de la secuencia de ARNr 16s de las bacterias 6.6 y 8.3 en BLAST, NCBI.

ID	Nombre científico	Porcentaje de la secuencia query (%)	Valor E	Porcentaje de identidad (%)
6.6	<i>Bacillus cereus</i>	100.00	0.0	99.40
8.3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100.00	0.0	100.00

D. Identificación molecular de hongos fitopatógenos

Se amplificó y secuenció la secuencia ITS1, ADNr 5.8s, ITS2 de 3 hongos fitopatógenos. En el Cuadro 4 se observa el análisis obtenido a partir del alineamiento de ambas secuencias de nucleótidos en BLAST. El hongo C1 corresponde a *Colletotrichum siamense* con un 99.80% de identidad y un valor E = 0.0. El hongo C2 corresponde a *Colletotrichum* sp., no se identificó la especie. El hongo N1 corresponde a *Nigrospora zimmermanii* con un 100% de identidad y un valor E = 0.0. No fue posible caracterizar los ejemplares con características microscópicas semejantes a *Fusarium*.

Cuadro 4. Información obtenida a partir del alineamiento local de la secuencia de la región ITS1, ADNr 5.8s, ITS2 de los hongos C1, C2 y N1 en BLAST, NCBI.

ID	Nombre científico	Porcentaje de la secuencia query (%)	Valor E	Porcentaje de identidad (%)
C1	<i>Colletotrichum siamense</i>	100.00	0.0	99.80
C2	<i>Colletotrichum</i> sp.	N/A	N/A	N/A
N1	<i>Nigrospora zimmermanii</i>	100.00	0.0	100.00

E. Evaluación de la producción de quitinasas y proteasas en las bacterias aisladas.

Se utilizaron medios de cultivo diferenciales para evaluar la producción de enzimas líticas. En el Cuadro 5 se observan los resultados de esta evaluación. Las bacterias 7.2 y 8.3 fueron las únicas en producir quitinasas, mientras que la producción de proteasas fue llevada a cabo por una mayor cantidad de bacterias.

Cuadro 5. Producción de quitinasas y proteasas en las 32 bacterias aisladas.

Bacteria	Quitinasas	Proteasas
1.1	-	+
1.2	-	+
1.3	-	+
2.3	-	+
2.4	-	+
2.5	-	+
3.3	-	+
3.4	-	-
5.1	-	-
6.2	-	+
6.6	-	-
7.1	-	-
7.2	+	+
7.3	-	-

Bacteria	Quitinasas	Proteasas
8.2	-	+
8.3	+	+
9.1	-	-
9.2	-	-
11.2	-	-
11.3	-	-
12.1	-	+
13.1	-	+
13.2	-	+
13.3	-	-
13.4	-	+
15.1	-	+
15.2	-	-
15.3	-	+
15.5	-	+
15.6	-	-

VII. DISCUSIÓN

Los hongos fitopatógenos comprometen la integridad y salud del cacao en el país. En consecuencia, se ve afectada la etapa de insumos, producción y transformación en la cadena de valor de cacao por la presencia de plagas y enfermedades. Ante esta problemática se han buscado métodos biológicos de control, como las bacterias, para reducir los efectos adversos que implican los controles químicos. Se cumplió con el objetivo del estudio, el cual fue determinar el efecto biológico *in vitro* de bacterias aisladas de suelo cacaotero en Alta Verapaz, Guatemala, sobre hongos fitopatógenos que afectan a las plantaciones de cacao.

Se aislaron 32 bacterias de muestras de suelo cacaotero, de estas, las bacterias de interés en este estudio, identificadas como 6.6 y 8.3, se caracterizaron microscópicamente con tinción Gram. Las Figuras 11 y 12 muestran que ambas colonias coinciden con el género *Bacillus*. Se observaron endosporas en las dos estructuras de bacilos Gram positivo, lo que coincide con las características de reproducción y supervivencia de este género. Además, concuerda con la procedencia de la muestra, debido a que *Bacillus* y distintas especies formadoras de endosporas están ampliamente distribuidas en el suelo (Babalola, 2010).

El aislamiento de las bacterias del mismo suelo en donde se cultiva el cacao es una opción para no introducir especies invasoras en el ecosistema. Las especies invasoras alteran las comunidades intrínsecas del ecosistema, de manera que la salud del suelo y de las plantas es perjudicada. Se ha observado que las comunidades bacterianas inherentes al suelo cambian después de la introducción de una nueva especie, pudiendo o no adquirir nuevos taxones (Cornell *et al.*, 2021). Por tanto, una especie nativa evita las perturbaciones en el sistema a la vez que aumenta la abundancia.

Las bacterias 6.6 y 8.3 fueron de interés porque inhibieron el crecimiento de los 8 hongos fitopatógenos en el cribado (Cuadro 7 y 8: Anexos). La colonia 7.2 también inhibió el crecimiento de todos los hongos fitopatógenos, pero presentó características morfológicas similares a la colonia 8.3 por lo que se eligió solo una. En comparación con la colonia 8.3, la colonia 6.6 presentó un crecimiento más rápido y en forma rizoide. Esto facilita el área

de colonización y extensión sobre las superficies, siendo la bacteria de elección para los ensayos de antagonismo.

Los ensayos de cultivo dual *in vitro* se hicieron para determinar el porcentaje de inhibición que tiene la bacteria 6.6 sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos. Según el Cuadro 2, *Geotrichum candidum* (G1) fue mayormente inhibido, en un 61.2 %. Lo que concuerda con el estudio de Gordillo *et al* (2009) en donde *G. candidum* fue inhibido por metabolitos de *Bacillus* sp. del 65.58 % hasta 88.44 %. Esto indica que *Bacillus* sp. posee propiedades antifúngicas efectivas contra *G. candidum*.

G. candidum se identificó en muestras de cacao, causando necrosis en frutos y semillas (Dubón, Alarcón y De León, 2021). En países de Latinoamérica se ha reportado como agente patógeno de cítricos y ocasionalmente en tubérculos, causando pudrición ácida. A pesar de esto, la incidencia de este hongo como fitopatógeno, no tiene una distribución extendida y aparece en infecciones post cosecha. Esto se puede deber a que se ha descrito como un hongo endófito y presente en la fermentación del cacao. Por tanto, la aparición de este hongo como patógeno se debe seguir estudiando ante los cambios ambientales y el estrés en el ecosistema del cultivo de cacao (García-Ávila *et al.*, 2018).

Continuando con los resultados del Cuadro 2, se evaluó el antagonismo frente a 4 ejemplares del género *Fusarium* (F1 – F4). No fue posible identificar la especie de estos hongos, pero las características morfológicas y microscópicas concuerdan con el género. Los porcentajes de inhibición para F1, F2, F3 y F4 fueron los siguientes: 39.8 %, 53.6 %, 60.7 % y 58.2 %, respectivamente. Los resultados son prometedores, puesto que *Fusarium* sp. fue el segundo género con mayor incidencia en el cacao del país (Dubón, Alarcón y De León, 2021).

Existen distintos estudios que demuestran que bacterias del género *Bacillus* poseen propiedades antifúngicas frente a especies de *Fusarium*. Por ejemplo, en el estudio de Khan *et al* (2018) *B. subtilis* y *B. simplex* inhibieron en un 60 – 70% el crecimiento de *F. oxysporum* y *F. solani*. También, en el estudio de Ramírez *et al* (2021) el inóculo de *B. cereus* inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* en un 65%. Esto concuerda con los

resultados de este estudio, debido a que *Fusarium* fue sensible a la actividad de la bacteria *Bacillus* y en porcentajes similares para F2, F3 y F4.

El hongo F1 tuvo un comportamiento característico debido a que fue sensible tan solo a 4 de las 32 bacterias aisladas (Cuadro 7 y 8: Anexos) y fue inhibido en menor medida. Esto indica que la efectividad del modo de acción antifúngico y/o el metabolito que produce la bacteria, puede variar entre especies y cepas de hongos. Ciertas cepas particulares de hongos, también denominadas razas, presentan clamidosporas que otorgan resistencia a estrés ambiental, compuestos químicos o biológicos. El fenómeno se observa con mayor frecuencia en las razas de *F. oxysporum* (Fourie *et al.*, 2011).

Respecto a la inhibición de los hongos del género *Colletotrichum*, C1 y C2, se obtuvo un 58.7 % y 57.9 % respectivamente (Cuadro 2). Estos resultados son favorables para un futuro control biológico, debido a que fue el género más incidente en las plantaciones de cacao del país (Dubón, Alarcón y De León, 2021). Además, producen necrosis generalizada en los cultivos y pueden coinfectar distintos huéspedes.

Los resultados son similares con otros estudios, tal como el de Ashwini y Srividya (2019) el cual demostró que bacterias del género *B. subtilis* inhibieron un 57 % a *C. gloeosporoides*. De igual forma, en el estudio de Zhou *et al* (2022), *B. tequilensis* inhibió en un 56 % a *C. fructicola*. Asimismo, Kim *et al* (2022) demostró que *B. velezensis* inhibió el crecimiento de *C. acutatum* un 44.63 %, *C. coccodes* un 66.05 %; *C. dematium* un 63.89 % y *C. gloeosporoides* un 56.47 %. Sin importar la especie de *Bacillus* y *Colletotrichum*, el rango de inhibición *in vitro* es semejante.

El último hongo evaluado fue del género *Nigrospora* (N1). En comparación con los otros hongos, se obtuvo el porcentaje de inhibición más bajo, con un 39.1%. Este hongo, colonizó rápidamente con micelio la caja Petri, lo que favoreció su crecimiento. En la literatura hay escasos reportes de la evaluación de inhibición de bacterias sobre este hongo. Esto se debe a que generalmente es saprófito y patógeno únicamente en plantas dañadas. La patogenicidad se asocia mayormente con las especies *N. oryzae* y *N. sphaerica*, la incidencia y severidad de otras especies suelen ser bajas. A pesar de esto, causan lesiones necróticas y secas en tejidos y hojas (Hao *et al.*, 2020).

Para continuar con el análisis de los hongos F1 y N1, los más resistentes al efecto antagonista, se plantea hacer un control integrado. La combinación de dos agentes de control biológico ha demostrado un mayor efecto antagonista contra patógenos resistentes. Esto se debe a que los modos de acción y los metabolitos producidos por los agentes biológicos difieren, como resultado el efecto es sistémico. Asimismo, se ha reportado un mejor efecto antagonista mediante la combinación de agentes de control biológico con fungicidas. Este método reduce la cantidad de los compuestos químicos utilizados. Ambas estrategias suelen usarse a nivel pre cosecha y post cosecha (Ons *et al.*, 2020).

En general, el porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos se mantuvo entre 50 – 60 %, exceptuando el hongo N1 con un 39.1 % y y F1 con un 39.8%. Los controles mostraron un crecimiento homogéneo de los hongos en las cajas Petri, a diferencia de los tratamientos, cuyo crecimiento fue inhibido por la bacteria 6.6 (Figuras 14 – 21). Se observó que los microorganismos no entraron en contacto, clasificándose como una inhibición del tipo antibiosis. Diversos estudios indican que el grupo *Bacillus* libera lipopéptidos que tienen un efecto antagonista sobre los hongos patógenos; siendo los de principal atención, las iturinas, surfactinas y fengicinas (Kim *et al.*, 2022).

Respecto a la hipótesis del estudio, se rechazó la hipótesis nula, es decir que la/s bacteria/s más representativa/s aislada/s del suelo cacaotero tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*. El análisis de ANOVA mostró que el porcentaje de inhibición promedio es significativo. El valor F (13.8) fue mayor el valor crítico para F (2.31) y la prueba LSD de Fisher demostró que la diferencia absoluta de los promedios de inhibición para todos los hongos, exceptuando F1 y N1, fueron mayores al valor LSD (7.08). Indicando que los porcentajes de inhibición promedio para estos hongos son menores y la bacteria 6.6 tiene un mayor efecto inhibitorio sobre el resto de los hongos. También se cumplieron con los supuestos de independencia de las observaciones, homogeneidad de varianzas y distribución normal (Cuadro 9: anexos).

La identidad de las bacterias más representativas no había sido evaluada. La caracterización molecular de las bacterias 6.6 y 8.3 se hizo mediante la secuenciación del gen ARNr 16s y su comparación con la base de datos BLAST. De acuerdo con el Cuadro 3, la bacteria 6.6 corresponde a *Bacillus cereus* y la bacteria 8.3 a *Bacillus thuringiensis*,

confirmando las predicciones hechas según las características morfológicas y microscópicas. Los valores $E = 0.0$ y los porcentajes de identidad de 99.40 % y 100.00 % indican que la alineación en la base de datos no se hizo al azar y que la coincidencia con las especies es certera.

Ambas especies son de interés en la biotecnología porque tiene una amplia aplicación como agentes de control biológico. *B. thuringiensis* se ha explorado por sus metabolitos insecticidas, ampliamente utilizados en la agricultura. En especial, *B. cereus* produce naturalmente moléculas que contribuyen a la antibiosis, las cuales pueden actuar por sí solas o en sinergia. Adicionalmente, ambas especies se han descrito como productoras de zwittermicina A, un antibiótico que suprime el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos, como *Phytophthora* para el último caso. También producen endosporas, lo cual lo hace ideal para formular a largo plazo un producto biológico, dado que les provee ventaja para tolerar condiciones adversas de temperatura, pH y osmolaridad (Ramírez *et al.*, 2021 y Zhou *et al.*, 2022).

Los estudios describen que la actividad antifúngica directa se debe a la producción de enzimas líticas, como celulasas, xilanasas; pectinasas, proteasas y quitinasas. Asimismo, a la producción de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, sideróforos y lipopéptidos. Por esta razón, se evaluó la producción bacteriana de proteasas y quitinasas. Adicionalmente, valdría la pena evaluar la producción de los otros compuestos mencionados, para tener una caracterización completa de las bacterias antagonistas.

Se utilizaron medios diferenciales para evaluar la producción de proteasas y quitinasas. Ambas enzimas están implicadas en el control biológico de hongos fitopatógenos. Las proteasas alteran la composición proteica de la pared celular fúngica, resultando en su descomposición. Las quitinasas descomponen los enlaces de los oligosacáridos que unen los enlaces de quitina en la pared celular de los hongos (Petatán-Sagahón *et al.*, 2011). Según el Cuadro 5, para las bacterias más representativas, *B. cereus* (6.6) no produjo ninguna de estas enzimas, en comparación con *B. thuringiensis* (8.3) que produjo las dos enzimas. Esto indica que la acción inhibitoria de *B. cereus* no está mediada propiamente por quitinasas y proteasas, mientras que *B. thuringiensis* podría inhibir a los hongos

mediante la producción de estas enzimas. Además, demuestra que el antagonismo se puede dar mediante otras vías, como las mencionadas previamente.

Finalmente, se identificaron molecularmente a ciertos hongos fitopatógenos aislados en este estudio mediante la secuenciación de región ITS1, ADNr 5.8s, ITS2. Se identificó a C1 como *Colletotrichum siamense*, C2 únicamente como *Colletotrichum* sp. y N1 como *Nigrospora zimmermanii*. Los valores E = 0.0 y los porcentajes de identidad del 100 % indican que la alineación no se hizo al azar y que la coincidencia con las especies es certera. Sería ventajoso identificar la especie de los ejemplares pertenecientes a *Fusarium* (F1, F2, F3 y F4) para evaluar si su incidencia y prevalencia ha sido reportada previamente en plantaciones de cacao del país.

Los ensayos de cultivo dual *in vitro* de bacterias aisladas de suelo cacaotero frente a hongos fitopatógenos de las plantaciones de cacao, demostraron que *B. cereus* tiene un efecto inhibitorio mayor al 50% para 3 ejemplares de *Fusarium* sp. (F2, F3 y F4), *C. siamense* (C1) *Colletotrichum* sp. (C2) y *G. candidum* (G1). Este efecto es mediado por antibiosis, lo que demuestra una posible aplicación de esta bacteria para el control biológico de estos hongos en el país. En contraste, para un ejemplar de *Fusarium* sp. (F1) y para *N. zimmermanii* (N1) el porcentaje de inhibición promedio fue de 39.8 y 39.1. Demostrando que ambos hongos no son igualmente sensibles al efecto de *B. cereus*.

VIII. CONCLUSIONES

- *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*, aisladas del suelo cacaotero, mostraron antagonismo frente al crecimiento de 8 hongos fitopatógenos que afectan al cacao de la región: 4 ejemplares de *Fusarium* sp. (F1, F2, F3 y F4), *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum* sp., *Geotrichum candidum* y *Nigrospora zimmermanii*.
- *B. cereus* inhibió en mayor medida a *G. candidum* 61.2%, *Fusarium* sp. (F3) 60.7 % y *Fusarium* sp. (F4) 58.2 %. Asimismo, a *C. siamense* 58.7 %, *Colletotrichum* sp. 57.9 % y *Fusarium* sp. (F2) 53.6 % en los ensayos de cultivo dual *in vitro*.
- *B. cereus* inhibió en menor medida a *Fusarium* sp. (F1) 39.8 % y *N. zimmermanii* 39.1 % en los ensayos de cultivo dual *in vitro*.
- El modo de acción de inhibición de *B. cereus* frente a los hongos fitopatógenos fue de antibiosis, caracterizado por una ligera zona de inhibición y ausencia de contacto entre ambos microorganismos.
- Dado que *B. cereus* no produjo quitinasas y proteasas, se evidencia que no inhibe a los hongos mediante esta vía. A diferencia de *B. thuringiensis* que las produjo, se asume que utiliza las enzimas para ejercer su acción antagonista.

IX. RECOMENDACIONES

- Identificar molecularmente los 4 ejemplares de *Fusarium* aislados y comprobar la especie de *Colletotrichum* sp. con el fin de conocer su identidad.
- Evaluar la producción de otras enzimas líticas, como celulasas, xilanasas y pectinasas, y de metabolitos orgánicos volátiles y no volátiles, para establecer de manera concreta del modo de acción antagonista de *B. cereus*.
- Estudiar la cinética microbiana de ambas especies para definir la concentración óptima necesaria para inhibir a los hongos fitopatógenos *in vitro* y comprender a mayor detalle su comportamiento de crecimiento.
- Secuenciar el genoma completo de *B. cereus* y *B. thuringiensis* para evaluar su patogenicidad e identificar genes de interés.
- A largo plazo, evaluar el efecto antagonista *in vivo* para determinar si el porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos es similar. Asimismo, determinar la capacidad del inóculo bacteriano para disminuir el porcentaje de colonización de los hongos en plantas y las lesiones asociadas.
- A largo plazo, formular un producto biológico a partir de las especies bacterianas aisladas en este estudio y utilizarlo en campo como una opción sustentable al manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de cacao en Guatemala.

X. REFERENCIAS

- Abdulai, I., Vaast, P., Hoffmann, M. P., Asare, R., Jassogne, L., Van Asten, P., ... & Graefe, S. (2018). Cocoa agroforestry is less resilient to sub-optimal and extreme climate than cocoa in full sun. *Global change biology*, 24(1), 273-286.
- Ajay Kumar, G. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides*: biology, pathogenicity and management in India. *J. Plant Physiol. Pathol*, 2(2), 2-11.
- Aoki, T., O'Donnell, K., & Geiser, D. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal Of General Plant Pathology*, 80(3), 189-201. doi: 10.1007/s10327-014-0509-3
- Arie, T. (2019). *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science*, J19-03.
- Arvelo, M., González, D., Maroto, S., Delgado, T., Montoya, P. (2017). *Manual Técnico del Cultivo de Cacao Buenas Prácticas para América Latina*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [ICCA]. ISBN: 978-92-9248-732-4
- Asare, E. K., Domfeh, O., Avicor, S. W., Pobee, P., Bukari, Y., & Amoako-Attah, I. (2021). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l causes an outbreak of anthracnose of cacao in Ghana. *South African Journal of Plant and Soil*, 38(2), 107-115.
- Asare, E., Domfeh, O., Avicor, S., Pobee, P., Bukari, Y., & Amoako-Attah, I. (2021). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. causes an outbreak of anthracnose of cacao in Ghana. *South African Journal of Plant and Soil*, 38(2), 107–115. doi:10.1080/02571862.2020.1863
- Ashwini, N., & Srividya, S. (2013). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4(2), 127–136. doi:10.1007/s13205-013-0134-4
- Asociación Guatemalteca de Exportadores [AGEXPORT] HOY. (2021). Guatemala tras su excelencia en su cacao de Exportación. <https://agexporthoy.export.com.gt/sectores-de-exportacion/sector-agricola/guatemala-tras-la-excelencia-en-su-cacao-de-exportacion/>
- Babalola, O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32(11), 1559-1570. doi: 10.1007/s10529-010-0347-0

- Carmona, M., Sautua, F., Pérez-Hernández, O., & Reis, E. (2020). Role of Fungicide Applications on the Integrated Management of Wheat Stripe Rust. *Frontiers In Plant Science*, *11*. doi: 10.3389/fpls.2020.00733
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza [CATIE]. (2016). Análisis de la cadena de cacao de la Region Norte de Guatemala. https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/9125/El_sector_cacao_en_centroamerica.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Correia, M., Rodrigues, M., Paíga, P., & Delerue-Matos, C. (2016). Fungicides. *Encyclopedia Of Food And Health*, 169-176. doi: 10.1016/b978-0-12-384947-2.00342-1
- Cornell, C., Kokkoris, V., Richards, A., Horst, C., Rosa, D., Bennett, J., & Hart, M. (2021). Do Bioinoculants Affect Resident Microbial Communities? A Meta-Analysis. *Frontiers In Agronomy*, *3*. doi: 10.3389/fagro.2021.753474
- Cutuli, M. T., Gibello, A., Rodriguez-Bertos, A., Blanco, M. M., Villarroel, M., Giraldo, A., & Guarro, J. (2015). Skin and subcutaneous mycoses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) caused by *Fusarium oxysporum* in coinfection with *Aeromonas hydrophila*. *Medical mycology case reports*, *9*, 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2015.06.002>.
- da Silva, L., Moreno, H., Correia, H., Santana, M., & de Queiroz, M. (2020). *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. *Applied Microbiology And Biotechnology*, *104*(5), 1891-1904. doi: 10.1007/s00253-020-10363-y
- de Souza, P., Moreira, L., Sarmiento, D., & da Costa, F. (2018). Cacao— *Theobroma cacao*. *Exotic Fruits*, 69-76. doi: 10.1016/b978-0-12-803138-4.00010-1
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology Spectrum*, *5*(1). doi: 10.1128/microbiolspec.funk-0023-2016
- Dubón, A., Alarcón, M., De León, M. (2021). Incidencia de hongos fitopatógenos y benéficos en plantaciones de cacao de Alta Verapaz, Guatemala. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*. (43), 19 – 30. <https://www.uvg.edu.gt/servicios/volumen-43/>
- Fourie, G., Steenkamp, E., Ploetz, R., Gordon, T., & Viljoen, A. (2011). Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis cubense within the

- Fusarium oxysporum complex. *Infection, Genetics And Evolution*, 11(3), 533-542.
doi: 10.1016/j.meegid.2011.01.012
- García-Ávila, C., Valenzuela-Tirado, G., Florencio-Anastasio, J., Ruiz-Galván, I., Moreno-Velázquez, M., & Hernández-Macías, B. et al. (2018). Organismos asociados a daños en tubérculos de papa en postcosecha. *Revista Mexicana De Fitopatología, Mexican Journal Of Phytopathology*, 36(2). doi: 10.18781/r.mex.fit.1801-1
- Gordillo MA, Navarro AR, Benitez LM, De Plaza MIT, Maldonado MC. (2009). Preliminary Study and Improve the Production of Metabolites with Antifungal Activity by a Bacillus Sp Strain IBA 33. *Microbiology Insights*. ;2. doi:10.4137/MBLS995
- Hao, Y., Aluthmuhandiram, J. V., Chethana, K. T., Manawasinghe, I. S., Li, X., Liu, M., ... & Zhang, W. (2020). Nigrospora species associated with various hosts from Shandong Peninsula, China. *Mycobiology*, 48(3), 169-183. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1761747>
- Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., ... & Zhou, N. (2014). One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity*, 67(1), 21-125.
- International Cocoa Organization [ICCO]. (2016). Growing Cocoa. <https://www.icco.org/growing-cocoa/>
- International Cocoa Organization [ICCO]. (2021). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. <https://www.icco.org/may-2021-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics/>
- International Cocoa Organization [ICCO]. (2022). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. <https://www.icco.org/february-2022-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics/>
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T., Maymon, M., Humm, E., & Nejat, N. et al. (2018). Antifungal Activity of Bacillus Species Against Fusarium and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Frontiers In Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02363.
- Kim, T., Hwang, S., Noh, J., Cho, J., & Maung, C. (2022). Antifungal Potential of Bacillus velezensis CE 100 for the Control of Different Colletotrichum Species through Isolation of Active Dipeptide, Cyclo-(D-phenylalanyl-D-prolyl). *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(14), 7786. doi: 10.3390/ijms23147786

- Liu, H., Zha, Q., Huang, T., Huang, C., Pei, D., Liu, Q., & Deng, J. (2019). *Curvularia curculiginis* causes leaf spot and blight on *Curculigo capitulata* in China. *Australasian Plant Disease Notes*, *14*(1). doi: 10.1007/s13314-019-0346-5
- Lu, Y., Sun, J., Gao, Y., Liu, K., Yuan, M., Gao, W., ... & Xue, C. (2021). The key iron assimilation genes CIFTR1, CINPS6 were crucial for virulence of *Curvularia lunata* via initiating its appressorium formation and virulence factors. *Environmental Microbiology*, *23*(2), 613-627.
- Manamgoda, D. S., Cai, L., McKenzie, E. H., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., ... & Hyde, K. D. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia complex. *Fungal diversity*, *56*(1), 131-144.
- Martínez de la Parte, E., & Pérez Vicente, L. (2015). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, *30*(2), 87-96.
- McGowan, J., & Fitzpatrick, D. (2020). Recent advances in oomycete genomics. *Advances In Genetics*, 175-228. doi: 10.1016/bs.adgen.2020.03.001
- Meng, Y., Zhang, Q., Ding, W., & Shan, W. (2014). *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology*, *5*(2), 43-51.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería y Alimentación [MARN]. (2016). Plan estratégico de la agrocadena de cacao de Guatemala. <https://www.maga.gob.gt/download/enac16-25.pdf>
- Nair, K. (2010). Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *The Agronomy And Economy Of Important Tree Crops Of The Developing World*, 131-180. doi: 10.1016/b978-0-12-384677-8.00005-9
- Ons, L., Bylemans, D., Thevissen, K., & Cammue, B. (2020). Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. *Microorganisms*, *8*(12), 1930. doi: 10.3390/microorganisms8121930
- Petatán-Sagahón, I., Anducho-Reyes, M., Silva-Rojas, H., Arana-Cuenca, A., Tellez-Jurado, A., Cárdenas-Álvarez, I., & Mercado-Flores, Y. (2011). Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal Of Molecular Sciences*, *12*(9), 5522-5537. doi: 10.3390/ijms12095522

- Philips – Mora, W., & Cerda, R. (2011). Catálogo: *Enfermedades del cacao en Centroamérica*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza [CATIE]. ISBN: 978-9977-57-501-8.
- Pradhan, A., Ghosh, S., Sahoo, D., & Jha, G. (2020). Fungal effectors, the double edge sword of phytopathogens. *Current Genetics*, 67(1), 27-40. doi: 10.1007/s00294-020-01118-3
- Passera, A., Venturini, G., Battelli, G., Casati, P., Penaca, F., Quaglino, F., & Bianco, P. (2017). Competition assays revealed *Paenibacillus pasadenensis* strain R16 as a novel antifungal agent. *Microbiological Research*, 198, 16-26. doi: 10.1016/j.micres.2017.02.001
- Qiao, M., Li, J., Fang, L. L., Li, J. Y., & Yu, Z. F. (2021). Morphology, Phylogeny and Pathogenicity of *Colletotrichum menglaense* sp. nov., Isolated from Air in China. *Pathogens*, 10(10), 1243.
- Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M., Catañeda-Antonio, D., Munive, J., & Baez, A. (2021). *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. *Journal Of Applied Microbiology*, 132(1), 470-482. doi: 10.1111/jam.15179
- Rampersad, S. N. (2020). Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants. *Pathogens*, 9(5), 340.
- Rhaim, A., & Taylor, P. W. J. (2016). *Colletotrichum gloeosporioides* associated with anthracnose symptoms on citrus, a new report for Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*, 146(1), 219–224. doi:10.1007/s10658-016-0907-9
- Santos, P. R. R. D., Leão, E. U., Aguiar, R. W. D. S., Melo, M. P. D., & Santos, G. R. D. (2018). Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to *Andropogon* grass. *Bragantia*, 77, 326-332.
- Saremi, H., & Okhovvat, S. M. (2008). Major *Fusarium* diseases on crops and their control management with soil solarisation in northwest Iran. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 73(2), 189-199.
- Stenberg, J. (2017). A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends In Plant Science*, 22(9), 759-769. doi: 10.1016/j.tplants.2017.06.010
- Subramanian, K., Sadaiappan, B., Aruni, W., Kumarappan, A., Thirunavukarasu, R., & Srinivasan, G. et al. (2020). Bioconversion of chitin and concomitant production of chitinase and N-acetylglucosamine by novel *Achromobacter xylosoxidans* isolated

- from shrimp waste disposal area. *Scientific Reports*, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-68772-y
- Suri, T., & Basu, S. (2021). Heat resistant chocolate development for subtropical and tropical climates: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1888690>
- Sutton, D., Rinaldi, M., & Sanche, S. (2009). Dematiaceous fungi. *Clinical Mycology*, 329-354. doi: 10.1016/b978-1-4160-5680-5.00014-1
- Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Manczinger, L., & Vágvölgyi, C. (2006). A novel, image analysis-based method for the evaluation of in vitro antagonism. *Journal Of Microbiological Methods*, 65(3), 619-622. doi: 10.1016/j.mimet.2005.09.014
- Talhinhas, P., & Baroncelli, R. (2021). Colletotrichum species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity*, 110(1), 109-198. doi: 10.1007/s13225-021-00491-9
- Villamizar-Gallardo, R., Osmá, J. F., & Ortíz-Rodríguez, O. O. (2019). Regional evaluation of fungal pathogen incidence in Colombian cocoa crops. *Agriculture*, 9(3), 44.
- Williams, B. (2019). Advances and Opportunities of Cacao Production in Guatemala. https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Advances%20and%20Opportunities%20of%20Cacao%20Production%20in%20Guatemala_Guatemala_Guatemala_8-9-2019.pdf
- Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., & Lesur, I. et al. (2018). The use and domestication of Theobroma cacao during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*, 2(12), 1879-1888. doi: 10.1038/s41559-018-0697-x
- Zhou, A., Wang, F., Yin, J., Peng, R., Deng, J., & Shen, D. et al. (2022). Antifungal action and induction of resistance by Bacillus sp. strain YYC 155 against Colletotrichum fructicola for control of anthracnose disease in Camellia oleifera. *Frontiers In Microbiology*, 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.956642
- Zubrod, J., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C., Imfeld, G., & Knäbel, A. et al. (2019). Fungicides: An Overlooked Pesticide Class?. *Environmental Science & Technology*, 53(7), 3347-3365. doi: 10.1021/acs.est.8b04392

XI. ANEXOS

Cuadro 6. Características morfológicas de las bacterias aisladas a partir de muestras de suelo.

Bacteria (código de identificación)	Forma	Margen	Color	Apariencia	Elevación
1.1	Circular	Ondulado	Crema	Opaca	Plana
1.2	Irregular	Ondulado	Blanco	Brillante	Plana
1.3	Circular	Entero	Amarillo	Opaca	Plana
2.3	Circular	Irregular	Crema	Opaca	Elevada
2.4	Circular	Entero	Crema	Brillante	Convexa
2.5	Irregular	Irregular	Crema	Brillante	Plana
3.3	Circular	Entero	Transparente	Brillante	Plana
3.4	Circular	Entero	Blanco	Brillante	Elevada
5.1	Circular	Entero	Transparente	Suave	Elevada
6.2	Circular	Entero	Crema	Opaca	Convexa
6.6	Rizoide	Rizoide	Crema	Opaca	Plana
7.1	Circular	Entero	Naranja	Seca	Elevada
7.2	Circular	Entero	Blanco	Opaca	Plana
7.3	Circular	Entero	Transparente	Brillante	Convexa
8.1	Circular	Entero	Naranja	Brillante	Convexa
8.2	Irregular	Ondulado	Blanco	Opaca	Plana
8.3	Irregular	Ondulado	Blanco	Opaca	Plana
9.1	Circular	Irregular	Blanco	Seca	Convexa
9.2	Circular	Entero	Transparente	Brillante	Elevada
11.2	Circular	Ondulado	Blanco	Brillante	Plana
11.3	Circular	Entero	Transparente	Brillante	Elevado
12.1	Filamentosa	Filamentoso	Blanco	Opaca	Plana
13.1	Rizoide	Rizoide	Blanca	Opaca	Plana
13.2	Rizoide	Rizoide	Crema	Opaca	Plana
13.3	Irregular	Irregular	Naranja	Brillante	Plana

Bacteria (código de identificación)	Forma	Margen	Color	Apariencia	Elevación
15.2	Irregular	Irregular	Crema	Brillante	Plana
15.3	Circular	Entero	Crema	Opaca	Convexa
15.5	Circular	Entero	Blanco	Opaca	Plana
15.6	Circular	Entero	Amarillo	Brillante	Convexa

Cuadro 7. Evaluación del antagonismo de las bacterias 1.1 a la 8.2 frente al crecimiento de los 8 hongos fitopatógenos.

Hongo	Bacterias															
	1.1	1.2	1.3	2.3	2.4	2.5	3.3	3.4	5.1	6.2	6.6	7.1	7.2	7.3	8.1	8.2
F1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
F2	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
F3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
F4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
C1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
C2	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
N1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
G1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+

(+) Las bacterias tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos, (-) Las bacterias no tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos.

Cuadro 8. Evaluación del antagonismo de las bacterias 8.3 a la 15.6 frente al crecimiento de los 8 hongos fitopatógenos.

Hongo	Bacterias															
	8.3	8.4	9.1	9.2	11.2	11.3	12.1	13.1	13.2	13.3	13.4	15.1	15.2	15.3	15.5	15.6
F1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
F3	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F4	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
N1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
G1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

(+) Las bacterias tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos, (-) Las bacterias no tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos.

Cuadro 9. Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de la bacteria 6.6 frente a los 8 hongos fitopatógenos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2920.60	7.00	417.22	13.81	4.37E-08	2.31
Dentro de grupos	966.56	32	30.21			
Total	3887.17	39				

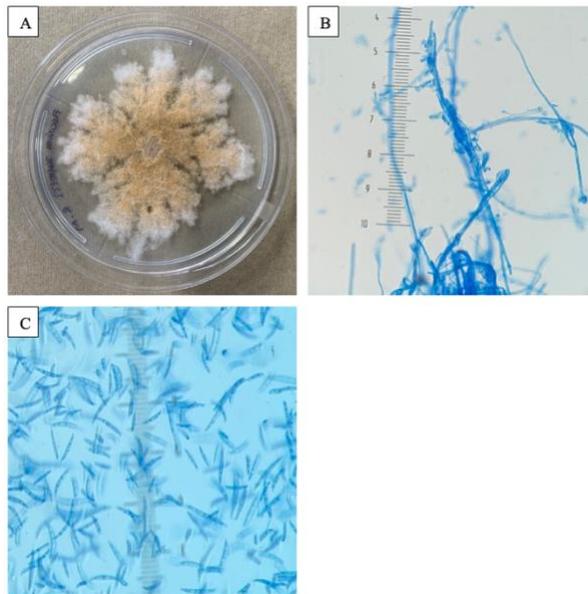


Figura 22. Características macroscópicas y microscópicas del ejemplar 1 de *Fusarium* sp. (F1) (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250x.

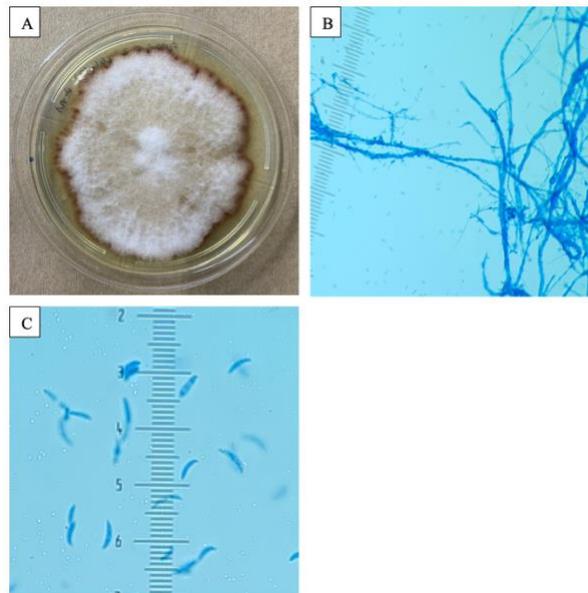


Figura 23. Características macroscópicas y microscópicas del ejemplar 2 de *Fusarium* sp. (F2) (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250x.

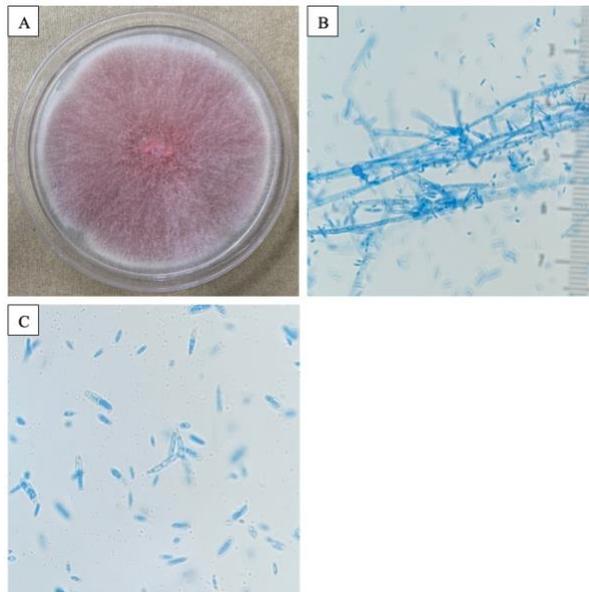


Figura 24. Características macroscópicas y microscópicas del ejemplar 3 de *Fusarium* sp. (F3) (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250x.

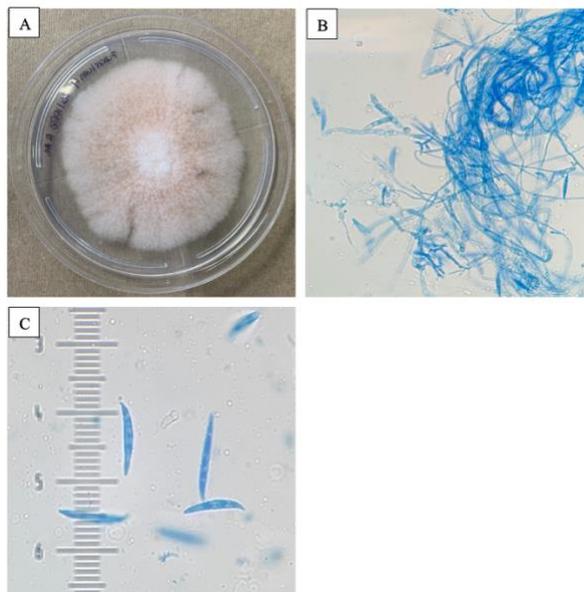


Figura 25. Características macroscópicas y microscópicas del ejemplar 4 de *Fusarium* sp. (F4) (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional.

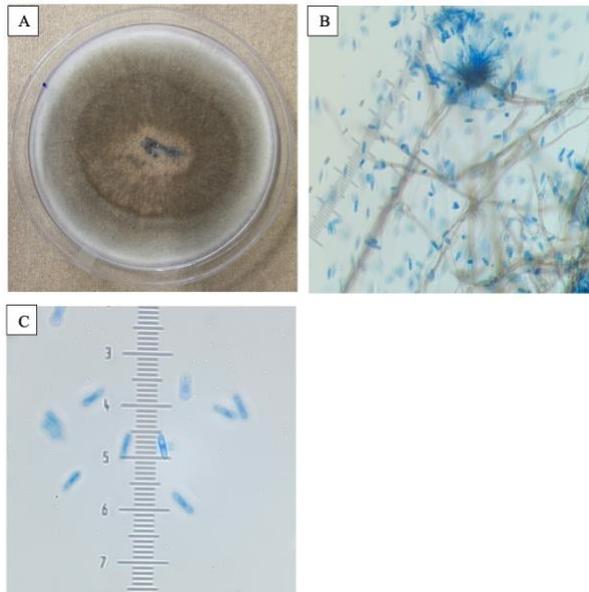


Figura 26. Características macroscópicas y microscópicas de *C. siamense* (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) xEsporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional.

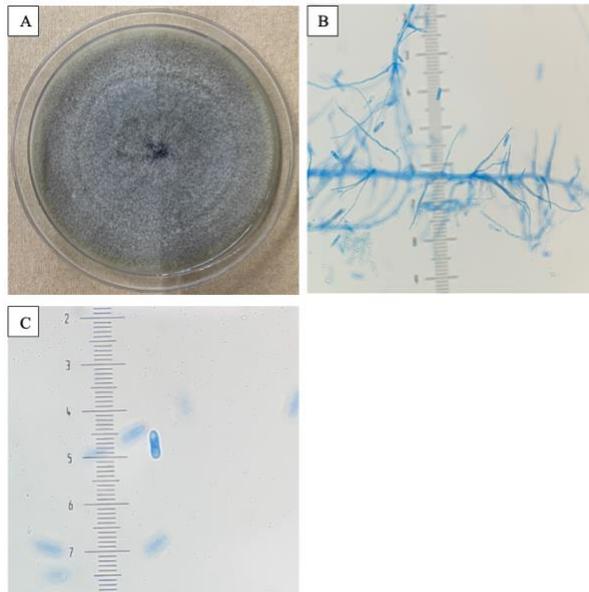


Figura 27. Características macroscópicas y microscópicas de *Colletotrichum* sp. (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional.

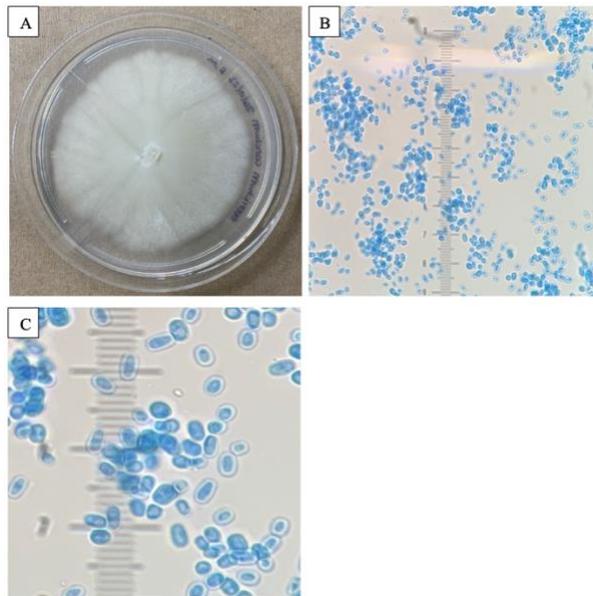


Figura 28. Características macroscópicas y microscópicas de *G. candidum* (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional.

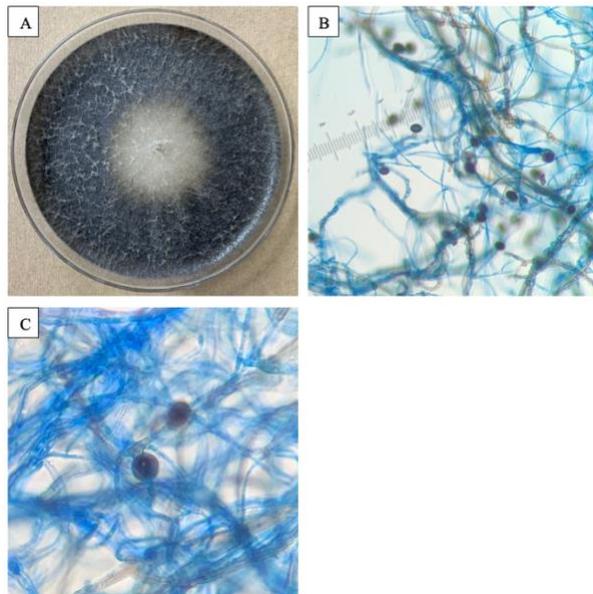


Figura 29. Características macroscópicas y microscópicas de *N. zimmermanii* (A) Colonia fúngica aislada en agar PDA, (B) Micelio observado en microscopio óptico a 250x, (C) Esporas observadas en microscopio óptico a 250 con zoom adicional.