

## EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE APLICACIÓN DE *Bacillus amyloliquefaciens* ENDÓFITO SOBRE *Moniliophthora roreri* EN CONDICIONES DE CAMPO

Alexander Bernal-Cabrera<sup>1</sup>, Sofia L. Peñaherrera-Villafuerte<sup>2</sup>, Marjorie D. Espinoza-Roca<sup>2</sup>, Betty J. Rivadeneira Moreira<sup>3</sup> y Pedro P. Páez-Martínez<sup>4</sup>

### RESUMEN

El uso de bacterias endófitas del género *Bacillus* como agentes de biocontrol contra *Moniliophthora roreri* se presenta como una opción ambientalmente segura y eficaz. El objetivo fue evaluar el efecto de la frecuencia de aplicación de *B. amyloliquefaciens* endófito contra el agente causal de la moniliasis en una zona productora de cacao de la provincia de Esmeraldas, Ecuador. El experimento se realizó con el genotipo de cacao EET-103 tipo Nacional de 14 años de edad, en un marco de 3 x 3 m, sobre un suelo Andisol, bajo un diseño de bloques completos al azar, con tres tratamientos (frecuencia de aplicación: 15, 30 y 45 días) y cinco repeticiones. Durante los 90 días de desarrollo con una frecuencia quincenal se evaluó la incidencia y severidad externa en mazorcas. Al momento de cosecha fueron abiertas longitudinalmente y se determinó el porcentaje de severidad interna. Además, se determinó la colonización endofítica. Se halló que seis aplicaciones, con una frecuencia quincenal, de una suspensión de esporas *B. amyloliquefaciens* tuvo efecto de biocontrol sobre *M. roreri*, con valores de incidencia promedio entre 1,0 y 4,1 %, severidad externa entre 1,8 y 5,0 %, severidad interna entre 5,9-6,3 % y colonización endofítica entre 7,3-7,5 x 10<sup>8</sup>UFCg<sup>-1</sup> de masa fresca del tejido vegetal, respectivamente. La frecuencia de aplicación quincenal de *B. amyloliquefaciens* demostró efecto de biocontrol sobre *M. roreri* por su alta capacidad de colonización endofítica en condiciones de campo, sin diferencias con el control, presentándose como una alternativa biológica para reducir las afectaciones ocasionadas por la moniliasis en los agroecosistemas cacaoteros.

**Palabras clave adicionales:** *Bacillus* endófito, campo, control biológico, moniliasis, *Theobroma cacao*

### ABSTRACT

#### Effect of application frequency of *Bacillus amyloliquefaciens* endophyte on *Moniliophthora roreri* under field conditions

The use of endophytic bacteria of the genus *Bacillus* as biocontrol agents against *Moniliophthora roreri* is presented as an environmentally effective option in agriculture. The objective was to evaluate the effect of the application of endophytic *B. amyloliquefaciens* against the causal agent of moniliasis in cocoa. The experiment was conducted in a 14-year-old cocoa plantation, under a 3 x 3 m frame, in a randomized complete block design, with three treatments (frequency of application: 15, 30 and 45 days) and five replications. During the 90 days of development at a biweekly frequency, incidence and external severity were evaluated on the pod. At harvest time, the pods were opened and the percentage of internal severity was determined. Also, endophytic colonization was determined. It was found that six applications of spore suspension had a biocontrol effect on *M. roreri*, with average incidence between 1.0 and 4.1 %, external severity between 1.8 and 8.5 %, internal severity between 5.9-6.3 % and endophytic colonization between 7.3-7.5 x 10<sup>8</sup>CFU g<sup>-1</sup> of plant tissue. The application of the bacteria, at a fortnightly frequency, had a biocontrol effect on *M. roreri*, with average incidence values between 1.0 and 4.1 %, external severity between 1.8 and 5.0 %, internal severity between 5.9-6.3 % and endophytic colonization between 7.3-7.5 x 10<sup>8</sup>CFU g<sup>-1</sup> of plant tissue. The biweekly application frequency demonstrated a biocontrol effect on *M. roreri* due to its high capacity for endophytic colonization, without differences with the control, presenting itself as a biological alternative to reduce the effects caused by the moniliasis in cocoa agroecosystems.

**Additional keywords:** Biological control, cacao, endophytic *Bacillus*, field, frosty pod rot

Editor Asociado: Prof. María Elena Sanabria-Chópita

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.)

abarca más de 11 millones de hectáreas de superficie agrícola a nivel mundial (Fountain,

Recibido: Octubre 19, 2024

Aceptado: Enero 25, 2025

<sup>1</sup>Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Departamento de Agronomía y Centro Investigaciones Agropecuarias, Cuba. e-mail: alexanderbc@uclv.edu.cu (autor de correspondencia)

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Tropical Pichilingue. Dept. Protección Vegetal. Quevedo. Los Ríos. Ecuador. e-mail: loren80@gmail.com; marjorieesbpg@gmail.com

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Tropical Pichilingue. Dept. Manejo de Suelos y Agua. Quevedo. Los Ríos. Ecuador. e-mail: bettyr\_2004@yahoo.es

<sup>4</sup>Instituto Superior Tecnológico Ciudad de Valencia. Pueblo Viejo. Los Ríos Ecuador. e-mail: pablopaez70@hotmail.com

2022; Hütz *et al.*, 2022). Se estimó que alrededor del 33 % del cacao se cultiva bajo condiciones de sombra (Somarriba y López, 2018). América Latina y el Caribe (ALC) es la tercera región de cultivo de *T. cacao* a nivel mundial; con 1,2 millones de hectáreas bajo diferentes sistemas de cultivo y sostiene los medios de vida de aproximadamente 1,7 millones de pequeños agricultores (Daymond *et al.*, 2022; Hütz *et al.*, 2022).

La moniliasis, causada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora. roreri* Evans *et al.*, es considerada una de las enfermedades más importantes que afecta la producción de cacao a nivel mundial, debido a su alto poder invasivo y endemismo (Cobos *et al.*, 2024). Para su control, los productores han integrado diferentes métodos preventivos debido a la ausencia de fungicidas económicamente viables (Solis *et al.*, 2021).

Entre los métodos preventivos para el manejo de la moniliasis se encuentran: manejo de la sombra, las podas, el saneamiento de la plantación, no movilizar las mazorcas esporuladas dentro de la plantación, realizar aplicaciones de fungicidas a base de cobre y azoxystrobina cada 21 días y mantener los drenajes (Suárez, 1993; Solis *et al.*, 2021). Sin embargo, dada la rápida diseminación que presenta *M. roreri*, el uso de bacterias endófitas resulta de gran interés ya que podría representar una alternativa más sostenible económica y ecológicamente (Abo, 2023).

Se ha demostrado que ciertas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, en inglés) en condiciones controladas suprimen el crecimiento de *M. roreri* (Melnick *et al.*, 2011; Vera *et al.*, 2020). Dentro de éstos se han descrito varios grupos de cepas del género *Bacillus* (Vera *et al.*, 2021a).

*Bacillus* spp., en particular, ha sido ampliamente estudiado como agente de control biológico, debido a sus múltiples mecanismos de acción antagonista como la antibiosis, la competencia y la inducción de resistencia sistémica en las plantas (Villarreal *et al.*, 2017). Además, se distingue de otros géneros bacterianos como *Pseudomonas* por formar endosporas que les permiten sobrevivir durante largos periodos en condiciones ambientales desfavorables (Shoda, 2019). Estas características hacen que los bioplaguicidas basados en *Bacillus* spp. sean más activos, porque aumenta la viabilidad de las células dentro de las formulaciones (Thakur y

Singh, 2018).

Diversas cepas de *B. amyloliquefaciens* han sido estudiadas por sus propiedades antifúngicas contra un gran número de hongos fitopatógenos (Cruz *et al.*, 2021). Esta especie bacteriana ha sido ampliamente reconocida por combinar varios de sus mecanismos antifúngicos, lo que favorece un biocontrol eficaz (Guapo *et al.*, 2024). En un informe reciente, Páez *et al.* (2024) seleccionaron las cepas *B. amyloliquefaciens* 24 y *Bacillus* sp. 33, de entre 4 cepas de *Bacillus* que aplicaron en condiciones de campo, por su eficacia en la disminución de la incidencia y severidad de *M. roreri* en zona cacaotera de la provincia de Esmeraldas, Ecuador. Estos investigadores después de realizar varios estudios en condiciones de campo, seleccionaron la cepa que se emplea en esta investigación para evaluar su frecuencia de aplicación en el control biológico de la moniliasis en campo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la frecuencia de aplicación de *B. amyloliquefaciens* endófito (cepa 24) sobre la incidencia y severidad de la moniliasis y colonización endofítica de la bacteria en condiciones de campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio.** La investigación se realizó en una plantación establecida con el genotipo de cacao EET-103 tipo Nacional de 14 años de edad, con un marco de 3 x 3 m, sobre un suelo Andisol (Espinosa *et al.*, 2022) en la provincia de Esmeraldas, cantón Quinindé, parroquia Rosa Zarate en Ecuador (0°18'49"N, 79°25'42"W) ubicada a 118 m.s.n.m durante los meses de abril a julio de 2019 (época de verano). Las condiciones climáticas predominantes durante el experimento se caracterizaron por una temperatura promedio de 27,1 °C, humedad relativa del 90,4 %, precipitación de 380 mm y velocidad del viento de 2,5m·s<sup>-1</sup>.

Se utilizó la cepa endófito *B. amyloliquefaciens* 24 (MF000350.1), aislada del mesocarpio de la mazorca del genotipo de cacao Criollo tipo Nacional, perteneciente a la colección de cultivos microbianos del laboratorio de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) e identificada molecularmente según Vera *et al.* (2021b).

Previo al establecimiento de los tratamientos se realizó una fertilización a la plantación con YaraMila Complex a una dosis de 500 kg ha<sup>-1</sup>, control de arvenses, manual y mecánica con motoguadaña; el primer manejo agronómico se realizó al iniciar el ensayo, donde se delimitaron los árboles en estudio y el segundo tres meses después. Se efectuó una poda sanitaria a todo el lote, donde se eliminaron las ramas entrecruzadas, para equilibrar la arquitectura de los árboles y permitir la entrada de luz solar y ventilación, se eliminaron síntomas de escobas de bruja, además de mazorcas enfermas. Las heridas se protegieron con la aplicación de pasta Bordelesa®.

**Obtención de inóculo.** La cepa de *B. amyloliquefaciens* se inoculó en un Erlenmeyer de 1 L de capacidad que contenían 500 mL de medio de cultivo TSB (Difco). La incubación se realizó entre 28 y 30 °C a 120 rpm en una zaranda orbital durante 9 días (Melnick *et al.*, 2011). Transcurrido ese tiempo de incubación, se dejó que las esporas se asentaran en el fondo del Erlenmeyer y posteriormente se procedió a decantar el caldo de cultivo. La concentración de inóculo se determinó por el método de recuento de células viables en

una placa con medio de cultivo sólido (Hoben y Somasegaran, 1982). Finalmente, las concentraciones se ajustaron a 10<sup>8</sup> esporas mL<sup>-1</sup> en el momento de la aplicación.

El experimento se realizó bajo un diseño de bloques completos al azar, con tres tratamientos (frecuencia de aplicación) y cinco repeticiones (Cuadro 1).

Cada réplica estuvo conformada por una parcela útil de diez árboles plantados a 3 x 3 m. Se dejó un área (45 m<sup>2</sup>), conformada por dos hileras de plantas sin tratar para utilizar como fondo de infección. El esquema del experimento de campo se muestra en la Figura 1.

**Inoculación.** La aplicación de la cepa bacteriana se realizó con atomizadores manuales de 500 mL de capacidad, asperjando 1 cojinete floral (flores abiertas) y 5 mazorcas, previamente marcadas con cinta de colores, en cada uno de los árboles. Por cada árbol se utilizaron 200 mL de inóculo con una concentración de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y se le añadió Silwet L-77 al 0,24 % (v/v) como coadyuvante para reducir la tensión superficial del agua. La altura estimada de alcance de la aplicación fue de 2 m.

**Cuadro 1.** Tratamientos empleados en el estudio

Tratamientos (Frecuencia de aplicación, días)	Número de aplicaciones
15	6
45	2
30 (Control)	3 (según trabajo realizado por Páez <i>et al.</i> , 2024)

Se determinó el porcentaje de colonización endofítica (UFC g<sup>-1</sup> de peso fresco de tejido vegetal) en los tratamientos. Para ello, se realizaron muestreos cada 15 días, siempre antes de la aplicación del tratamiento. Las muestras (4 mazorcas por tratamiento), con un peso aproximadamente igual, se trasladaron al laboratorio en bolsas de papel etiquetadas y dentro de las cuatro horas de su colecta. Se utilizaron los mismos procedimientos que se describen por Vera (2023), para el aislamiento y verificación de las bacterias endófitas en los tejidos.

Para las evaluaciones de incidencia y severidad externa de la enfermedad se muestrearon 30 frutos por tratamiento. Se realizaron seis muestreos, con una frecuencia quincenal, a partir de la aparición de los primeros síntomas según la escala de Sánchez (1982) (Cuadro 2) y durante los primeros

90 días de desarrollo del fruto (periodo crítico de mayor susceptibilidad a *M. roreri*) (Solis *et al.*, 2021). La incidencia de la enfermedad se calculó mediante la aplicación de la fórmula planteada por Ciba-Geigy (1981) y la severidad externa según Townsend y Heuberger (1943).

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{\text{Número de mazorcas enfermas}}{\text{Total de mazorcas evaluadas}} \times 100$$

$$\% S = \frac{\sum(n \times v)}{N \times K} \times 100$$

S = Severidad de la enfermedad

n = Número de frutos por grado de la escala

v = Grado de ataque según la escala

K = Número total de grados

N = Número total de frutos observados

X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
A	X	X	A	A	A	A	A	X	X	A
A	X	X	A	A	A	A	A	X	X	A
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	A	A	A	A	A	X	X	X

**Figura 1.** Esquema del experimento de campo

**Leyenda:** X----- Barreras    A----- Parcela útil

Cuando las mazorcas alcanzaron la madurez de cosecha (aproximadamente a los 5 meses), se abrieron 25 muestras de fruto por tratamiento, de forma similar a las variables anteriores, y se

determinó el porcentaje de severidad interna mediante el uso de la escala propuesta por Sánchez *et al.* (1987) (Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Escala de valoración de severidad externa propuesta por Sánchez (1982)

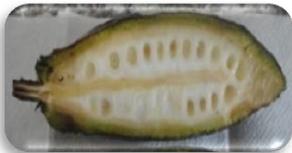
Grado	Descripción
0	Ningún síntoma aparente
1	Pequeños y pocos puntos aceitosos o ligera deformación
2	Puntos aceitosos abundantes y bien definidos, deformación pronunciada o madurez irregular debido a la enfermedad
3	Puntos aceitosos abundantes y bien definidos más deformación pronunciada o madurez irregular; ligero agrietamiento a lo largo de uno de los surcos del fruto
4	Mancha hasta 3 cm de diámetro sola o acompañada de madurez irregular o también con deformación; agrietamiento pronunciado a lo largo del fruto
5	Mancha de más de 3 cm de diámetro pero sin cubrir más de 2/3 del fruto o esta misma acompañada de madurez debido a la enfermedad
6	Mancha hasta cubrir 2/3 del fruto con presencia de micelio o necrosis desde 2/3 del fruto hasta cubrir toda la superficie del mismo
7	Mancha desde 2/3 del fruto hasta cubrirlo totalmente más micelio; mancha hasta 3 cm de diámetro más esporulación pero en poco grado
8	Mancha desde 2/3 hasta cubrir toda la superficie del fruto más esporulación en poco grado; mancha desde 2 cm de diámetro hasta aproximadamente la mitad del fruto con esporulación más bien abundante hasta la mitad de la misma
9	Mancha desde 2/3 hasta cubrir todo el fruto más esporulación hasta la mitad de la mancha o mancha hasta 2/3 del fruto más esporulación que cubre todo el área necrosada
10	Mancha total más esporulación abundante que cubre todo el área necrosada o también con madurez pronunciada debido a la enfermedad

Las mazorcas enfermas por pudrición negra y los *Cherelle Wilt* (marchitamiento prematuro) se eliminaron en cada fecha de evaluación. Toda esta información fue registrada para cada árbol de la parcela útil.

**Análisis de datos.** Los datos correspondientes

a las variables evaluadas se sometieron a análisis de varianza y prueba de rango múltiple medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Se utilizó el paquete estadístico STATISTICA versión 12.0 sobre Windows (StatSoft, 2014)

**Cuadro 3.** Escala de valoración de severidad interna propuesta por Sánchez *et al* (1987)

Grado	Descripción	Correspondencia visual
0	Cero área necrosada	
1	1-20 % del área necrosada	
2	21-40 % área necrosada	
3	41-60 % área necrosada	
4	61-80 % área necrosada	
5	100 % área necrosada	

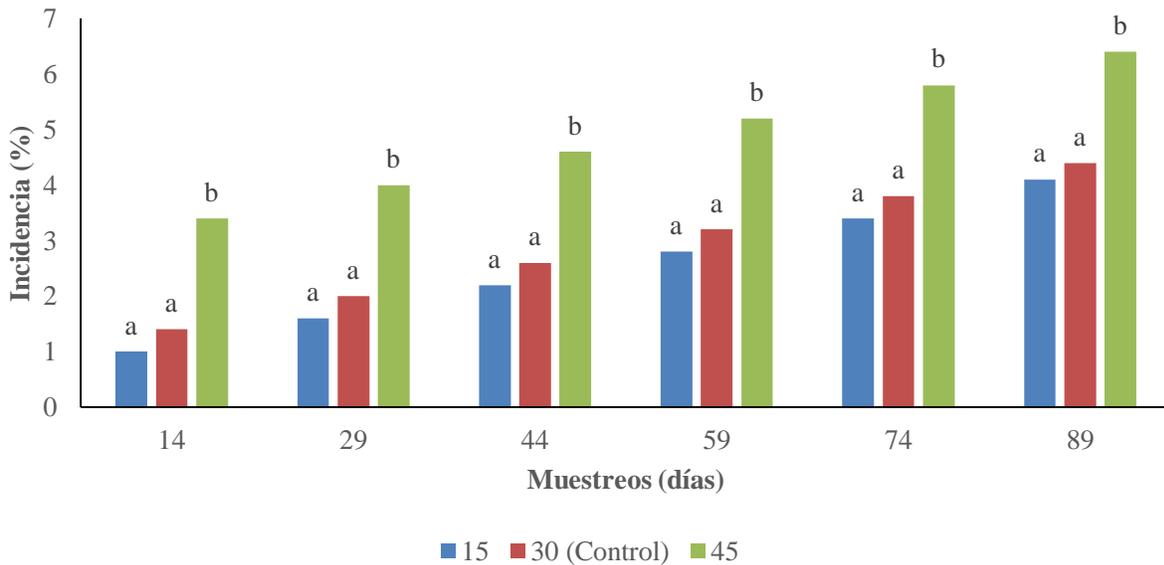
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incidencia de moniliasis en los frutos de cacao, en cada uno de los muestreos, fue significativamente menor en los tratamientos donde se hicieron seis aplicaciones de suspensiones de esporas de este microorganismo, con una frecuencia quincenal, sin diferencias significativas con el tratamiento control (30 días), pero sí, con respecto al tratamiento donde se realizaron dos aplicaciones (45 días), de esta bacteria endófito (Figura 2).

La explicación a este hallazgo, pudiera estar relacionada con el método de inoculación inundativo que se empleó, al aplicar la bacteria en

condiciones de campo, así como, con las interacciones microbianas complejas que se establecieron entre este antagonista y el agente patógeno sobre la planta. Resultados que le permitió a la bacteria poder establecerse en ese nicho ecológico, penetrar y multiplicarse en los tejidos internos de la mazorca del cacao y ejercer su efecto de biocontrol sobre el hongo patógeno.

Estos resultados se encuentran en correspondencia con los de Krauss *et al.* (2006), al emplear estrategias de biocontrol inundativo en la enfermedad moniliasis del cacao, en países como: Perú, Panamá y Costa Rica, aunque con resultados variables.



**Figura 2.** Efecto de la frecuencia de aplicación de *B. amyloliquefaciens* sobre la incidencia de *M. royeri* en los diferentes muestreos. Medias con letras diferentes en cada muestreo indican diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

De manera similar a la incidencia, para las variables severidad externa e interna, no se hallaron diferencias significativas entre las frecuencias de aplicación de la cepa de *Bacillus* cada 15 días y el control. Estas solo se diferenciaron del tratamiento, en la frecuencia de aplicación cada 45 días, que fue donde se obtuvieron los mayores valores de afectación externa e interna de las mazorcas (Figuras 3 y 4).

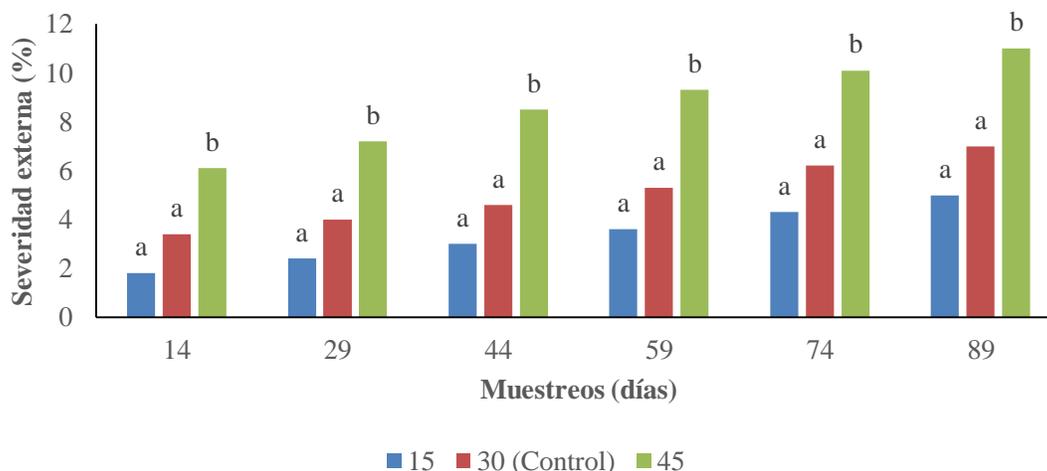
Los valores de severidad obtenidos podrían estar relacionados con las variaciones en las variables climáticas durante el desarrollo del experimento. Los valores de temperatura media fluctuaron entre 24,6-27,5 °C y humedad relativa entre 84,8- 94,5 % (Cuadro 4)

Phillips y Wilkinson (2007) y Phillips *et al.* (2007), afirmaron que el conidio de *M. royeri* necesita la presencia de agua para germinar, por lo que la moniliasis se incrementa en los meses de lluvia; en general, el hongo prolifera con precipitación anual de 780 a 5500 mm, temperatura promedio anual de 18,6 a 28 °C y humedad relativa de 85 %, condiciones que se

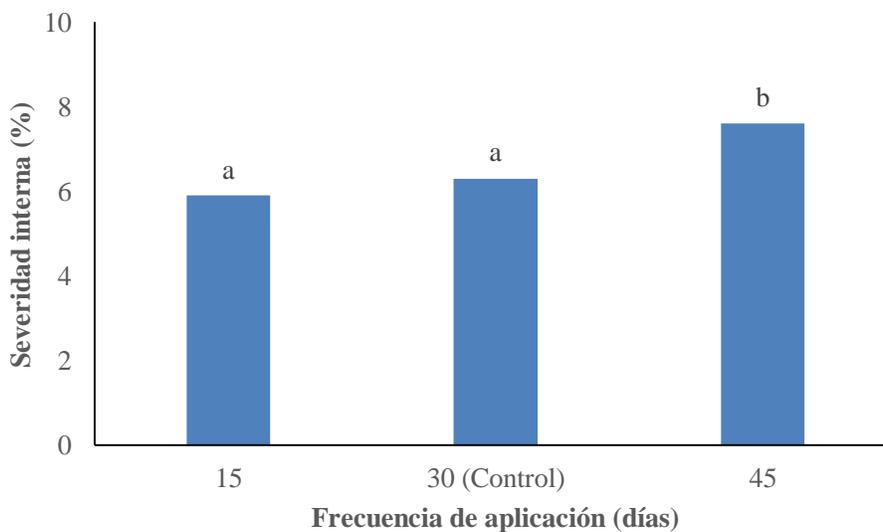
corresponden con las óptimas de crecimiento del hongo patógeno en este experimento.

Este resultado coincidió con lo expresado por Muñoz (2019), al referir que el control biológico no elimina la enfermedad, sino que reduce las poblaciones de *M. royeri* y como consecuencia, reduce el daño externo e interno de la enfermedad.

En la literatura científica, existen escasos informes sobre el efecto de las frecuencias de aplicación de bacterias endófitas sobre la moniliasis. Algunos ejemplos se ilustran en Colombia, donde el empleo de *Bacillus* sp. redujo la incidencia de la moniliasis en un 13,5 % (Villamil *et al.*, 2015). En México, la aplicación del agente de control biológico, *Paenibacillus* sp. NMA1017, disminuyó la incidencia y severidades externas e internas de la moniliasis de un 66,6 a un 27 % (Gómez *et al.*, 2023). Estos mismos autores, informaron que el uso de esta cepa de *Paenibacillus* sp. puede constituir una alternativa dentro de un programa de manejo integrado de enfermedades para lograr una producción sostenible de cacao.



**Figura 3.** Efecto de la frecuencia de aplicación de *B. amyloliquefaciens* sobre la severidad externa de *M. roreri* en los diferentes muestreos. Medias con letras diferentes en cada muestreo indican diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ )



**Figura 4.** Efecto de la frecuencia de aplicación de *B. amyloliquefaciens* sobre la severidad externa de *M. roreri* en frutos cosechados en estado de madurez fisiológica. Medias con letras diferentes en cada muestreo indican diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Los resultados en esta investigación se encuentran en correspondencia con los bajos valores de incidencia y severidad (externa e interna) encontrados para la enfermedad, al aplicar *B. amyloliquefaciens* 24, con una frecuencia quincenal en condiciones de campo. Hecho que refuerza, las potencialidades de esta cepa a partir

de sus mecanismos de biocontrol.

En el caso de la variable colonización endofítica, no se encontraron diferencias significativas al realizar las aplicaciones de las bacterias con una frecuencia quincenal respecto al control (30 días), pero sí, con respecto a las aplicaciones cada 45 días (Cuadro 5).

**Cuadro 4.** Comportamiento de las variables climáticas durante el desarrollo del experimento

Meses	Temperaturas (°C)			Humedad relativa (%)	Lluvia acumulada (mm)
	Máxima	Media	Mínima		
<b>Abril</b>	32,8	27,5	22,1	94,5	297,1
<b>Mayo</b>	31,0	26,6	22,2	91,2	332,3
<b>Junio</b>	29,6	24,6	19,5	91,0	188,8
<b>Julio</b>	30,7	25,8	20,8	84,8	103

Estación Meteorológica del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), localizada en Quinindé, Esmeraldas, Ecuador

**Cuadro 5.** Conteo de *B. amyloliquefaciens* endófito en relación a la frecuencia de aplicación

Frecuencia de aplicación (días)	Concentración (UFCg <sup>-1</sup> masa fresca de tejido vegetal)
15	7,3 x 10 <sup>8</sup> a
45	6,8 x 10 <sup>8</sup> b
30 (Control)	7,5 x 10 <sup>8</sup> a
E.E (±)	0,002
C. V (%)	10,4

Medias con letras diferentes en cada muestreo indican diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Maldonado (2015), encontró una disminución del 40 % en la incidencia de esta enfermedad, luego de realizar podas y raleos fitosanitarios en cacao. Otro componente importante dentro del manejo integrado de esta enfermedad es el uso de antagonistas (Villamil *et al.*, 2015) como *Bacillus subtilis*, el cual es usado para controlar diversos fitopatógenos en cultivos de importancia económica (Ashwini y Srividya, 2014; Reiss y Jorgensen, 2017).

En Colombia, Villamil *et al.* (2015), en un ensayo de laboratorio comparó, una cepa de *Bacillus* con dos de *Trichoderma* y encontró que una de las cepas del hongo fue más efectiva y recomendable para ensayos de control de moniliasis a nivel de campo.

En Ecuador, en un ensayo de campo, los tratamientos con preparados en base a *Pseudomonas cepacea* y *B. subtilis*, exhibieron un área de progreso de la curva de la enfermedad, menor que cuando solo se hizo eliminación de frutos enfermos cada 15 días (Estrella y Cedeño, 2012).

El resultado de este estudio reveló la estabilidad que presentó la cepa bacteriana *B. amyloliquefaciens* 24 en el control de la enfermedad en condiciones de campo, así como también demostró su potencial como agente de

control biológico.

El control eficiente de enfermedades por parte de los agentes de control biológico requiere que éstos sean capaces de establecerse e interactuar con su planta hospedante (Pérez *et al.*, 2011).

## CONCLUSIONES

La frecuencia de aplicación quincenal de la cepa *B. amyloliquefaciens* 24, demostró su alta capacidad de colonización endofítica, disminuyendo la incidencia y severidad de la moniliasis en condiciones de campo.

## LITERATURA CITADA

1. Abo-Koura, H.A. 2023. Endophytic bacteria; diversity, characterization and role in agriculture. *Journal of Basic & Applied Science* 19:116-130.
2. Ashwini, N. y S. Srividya. 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC. *Biotech* 4(2): 127-136.
3. Ciba-Geigy. 1981. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. 2da Edición. Suiza. p.11-20.

4. Cobos, F., P. Montero, J. Gómez e I. Pérez. 2024. Eficiencia de agentes antagónicos para el control de *Moniliophthora roreri* en el cultivo de cacao. Magazine De Las Ciencias: Revista de Investigación e Innovación 9(2): 16-29.
5. Cruz-Martín, M., L. Leyva, M. Acosta-Suárez, T. Pichardo, I. Bermúdez-Carabaloso y Y. Alvarado-Capó. 2021. Actividad antifúngica de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Agronomía Mesoamericana 32(2): 466-478.
6. Daymond, A., D. Giraldo, P. Hadley y P. Bastide. 2022. A global guide to cocoa farming systems. Reading: University of Reading 35.
7. Espinosa, J., J. Moreno y G. Bernal. 2022. Suelos del Ecuador: Clasificación, uso y manejo. Instituto Geográfico Militar (IGM). Quito, Ecuador (capítulo 2), p. 45-103.
8. Estrella, E.E. y J.G. Cedeño. 2012. Medidas de control de bajo impacto ambiental para mitigar la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par. Evans *et al.*) en cacao Híbrido Nacional x Trinitario en Santo Domingo de los Tsáchilas. Trabajo de titulación de Ingeniero Agropecuario, Escuela Politécnica del Ejército, Santo Domingo, Ecuador, 139pp.
9. Fountain, A.C. 2022. Cocoa Barometer Living Income Compendium. The Cocoa Barometer Consortium. <https://n9.cl/4f8igc>
10. Gómez-de la Cruz, I., B. Chávez-Ramírez, C.H. Avendaño-Arrazate, Y.E. Morales-García, J. Muñoz-Rojas y P. Estrada-de los Santos. 2023. Optimization of *Paenibacillus* sp. NMA1017 application as a biocontrol agent for *Phytophthora tropicalis* and *Moniliophthora roreri* in cacao-growing fields in Chiapas, Mexico. Plants 12: 2336.
11. Guapo, L.A., G. Virgen, C.V. Sánchez, M.J. Bermúdez, R. Ramírez y P.A. Palmeros. 2024. Efectividad biológica de consorcios microbianos e inductores de resistencia contra *Botrytis cinerea* en fresa. Avances en Investigación Agropecuaria 28: 185-197.
12. Hoben H.J. y P. Somasegaran. 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. In inoculants made from presterilized peatt. Applied and Environmental Microbiology 44(5): 1246-1247.
13. Hütz-Adams, F., P. Campos y A.C. Fountain. 2022. Latin America Baseline Cocoa Barometer, 2022. The Cocoa Barometer Consortium, 37. <https://voicenetwork.cc/wp-content/>
14. Krauss, U., G.M. TenHoopen, E. Hidalgo, A. Martínez, T. Stirrup, C. Arroyo, J. García y M. Palacios. 2006. The effect of cane molasses amendment on biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) and black pod (*Phytophthora* spp.) of cacao (*Theobroma cacao*) in Panama. Biological Control 39(2): 232-239.
15. Maldonado, C. 2015. Efecto del manejo en la reducción de incidencia de enfermedades (Moniliasis, escoba de bruja y mazorca negra) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L. en la Estación experimental de Sapecho. APThAPI 1(1): 38-51.
16. Melnick, R.L., C. Suarez, B.A. Bailey y P.A. Backman. 2011. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. Biological Control 57(3): 236-245.
17. Muñoz, J. 2019. Control de *Phytophthora palmivora* en *Theobroma cacao* clon CCN-51 con fosetil aluminio, hidróxido de cobre y propineb en Satipo, Perú: UNCP. <https://n9.cl/m7tgv> (consulta de agosto, 2023).
18. Páez, P.P., A. Bernal, H.A. Castro, R.P. Castro y M.A. Vera. 2024. *Bacillus* endófitos como agentes de control biológico de *Moniliophthora roreri* en cacao bajo condiciones de campo. Bioagro 36(2): 325-334.
19. Pérez-García, A., D. Romero y A. de Vicente. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. Current Opinion in Biotechnology 22(2): 187-193.

20. Phillips-Mora, W y MJ Wilkinson. 2007. Frosty pod, a disease of limited geographic distribution but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97(12): 1644-1647.
21. Phillips-Mora, W., CF. Ortiz y MC. Aime. 2007. Fifty years of frosty pod rot in Central America: Chronology of its spread and impact from Panama to Mexico. En: Proceedings of the 15th International Cocoa Research Conference, San José, Costa Rica 1: 1039-1047.
22. Reiss, A. y L. Jorgensen. 2017. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade ASO (*Bacillus subtilis* strain QST 713). *Crop Protection* 93: 1-8.
23. Sánchez, L. 1982. Reacción de cultivares de cacao a la inoculación artificial con *Monilia royeri*. Tesis de Maestro en Ciencias. CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica. 55 pp.
24. Sánchez, J., O. Brenes, W. Phillips y G. Enríquez. 1987. Methodology for inoculating pods with the fungus *Moniliophthora (Monilla) royeri*. Proceedings of the Tenth International Cocoa Research Conference. Santo Domingo, Dominican Republic: Cocoa Producers Alliance. pp. 467-471.
25. Shoda, M. 2019. Biocontrol of plant diseases by *Bacillus subtilis*: Basic and practical applications. Boca Raton, Florida, 325p.
26. Solis, K., S. Peñaherrera y D. Vera. 2021. Las enfermedades del cacao y las buenas prácticas agronómicas para su manejo. Guía No 178. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Tropical Pichilingue. Mocache, provincia de Los Ríos. Ecuador. 20 p. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5747>.
27. Somarriba, E. y S. A López. 2018. Coffee and Cocoa Agroforestry Systems: Pathways to Deforestation, Reforestation, and Tree Cover Change. Washington, DC: LEAVES-The World Bank.
28. StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 12. 2014, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
29. Suárez, C.C. 1993. Enfermedades del cacao y su control. In Manual del cultivo de cacao. Suárez, C. ed. 2ª. Ed. Quevedo, Ecuador. Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP. Manual técnico No. 25. pp. 90-106.
30. Townsend, G.R. y J.W. Heuberger. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report* 27(17): 340-343.
31. Vera, M.A., A. Bernal, D. Vera, M. Leiva, A. Rivero y A.E.A. Vera. 2020. Antagonismo *in vitro* de bacterias endófitas formadoras de endosporas frente a *Moniliophthora royeri* H.C Evans *et al.* *Revista de Protección Vegetal* 35(2): 1-8.
32. Vera, M.A., A. Bernal, D. Vera., M. Leiva, A. Rivero y L. Morales. 2021a. Actividad antifúngica de compuestos volátiles producidos por especies endófitas de *Bacillus* sobre *Moniliophthora royeri* H.C Evans *et al.* *Revista de Protección Vegetal* 36(1): 1-6.
33. Vera, M.A., A. Bernal, D. Vera, M. Leiva, A. Rivero y L. Morales. 2021b. Árbol filogenético y diversidad de bacterias endófitas asociadas a *Theobroma cacao* L. en una zona de la provincia de Esmeraldas, Ecuador. *Bioagro* 33(3): 223-228.
34. Vera, M.A. 2023. *Bacillus* endófitos asociados a *Theobroma cacao* L., como agentes de biocontrol de *Moniliophthora royeri* H.C Evans *et al.* Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, 90 pp.
35. Villamil, J., S. Viteri y W. Villegas. 2015. Aplicación de antagonistas para el control biológico de *Moniliophthora royeri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 68(1): 7441-7450.
36. Villarreal-Delgado, M.F., E.D. Villarodríguez, L.A. Cira-Chávez, M.I. Estrada-Alvarado, F.I. Parra-Cota y S. De los Santos-Villalobos. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130.