

***Bacillus* ENDÓFITOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE *Moniliophthora roreri* EN CACAO BAJO CONDICIONES DE CAMPO**

Pedro P. Páez-Martínez¹, Alexander Bernal-Cabrera², Hugo A. Castro-Albán^{3,4}, Rosa del P. Castro-Gómez⁴ y María A. Vera Loo⁵

RESUMEN

Dada la importancia de las investigaciones relacionadas con el uso de *Bacillus* endófitos como agentes de control biológico de *Moniliophthora roreri*, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro cepas de este género bacteriano en la protección de *Theobroma cacao* L. frente al agente causal de la moniliasis en una zona productora de la provincia de Esmeraldas, Ecuador. El experimento 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, bajo un diseño de bloques completos al azar, con seis tratamientos y cinco réplicas. Se hicieron tres aplicaciones con una frecuencia mensual. Se evaluó la incidencia y severidad externa en la mazorca durante los 90 días de desarrollo con una frecuencia quincenal. Cuando las mazorcas alcanzaron la madurez de cosecha se abrieron longitudinalmente y se determinó el porcentaje de severidad interna. Todas las cepas mostraron efecto de biocontrol sobre *M. roreri* en condiciones de campo, sobresaliendo *Bacillus* sp. 33 y *B. amyloliquefaciens* 24, aisladas del mesocarpio del fruto, con valores de incidencia promedio entre 4,4 y 7,6 %, severidad externa entre 3,6 y 6,2 % e interna entre 22-30 %, respectivamente. La aplicación de cepas de *Bacillus* endófitos constituye una alternativa biológica para reducir las afectaciones ocasionadas por la moniliasis en los agroecosistemas cacaoteros.

Palabras clave adicionales: Bacterias endófitas, biocontrol, campo, moniliasis, *Theobroma cacao*

ABSTRACT

Endophytic bacillus as biological control agent against *Moniliophthora roreri* in cocoa under field conditions

Given the importance of research related to the use of *Bacillus* endophytes as biological control agents of *Moniliophthora roreri*, the objective of this study was to evaluate the effect of four strains of this bacterial genus in the protection of *Theobroma cacao* L. against the causal agent of moniliasis in a production area of the province of Esmeraldas, Ecuador. The experiment was conducted in an established plantation with the 14-year-old cocoa genotype EET-103 Nacional type, with a 3 x 3 m frame, on an Andisol soil, under a randomized complete block design, with six treatments and five replications. Three applications were made at a monthly frequency. Incidence and external severity were evaluated on the pod during the 90 days of development at a biweekly frequency. When the pods reached harvest maturity, they were opened longitudinally and the percentage of internal severity was determined. It was found that all strains showed biocontrol effect on *M. roreri* under field conditions, with *Bacillus* sp. 33 and *B. amyloliquefaciens* 24, isolated from the fruit mesocarp, standing out with average incidence values between 4.4 and 7.6 %, external severity between 3.6 and 6.2 % and internal severity between 22-30 %, respectively. The application of *Bacillus* endophytes strains constitutes a biological alternative to reduce the effects of moniliasis in cocoa agroecosystems.

Additional keyword: Biocontrol, endophytic bacteria, field, fostry pod rot, *Theobroma cacao*

Editora asociada: Prof. María Elena Sanabria

INTRODUCCIÓN

La moniliasis, causado por el hongo hemibiotrófico *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al., es una de las enfermedades más

frecuentes que afecta la producción y calidad de las cosechas en *Theobroma cacao* L. Este agente fitopatógeno, ataca al fruto en cualquier edad de desarrollo y puede ocasionar pérdidas económicas

Recibido: Enero 29, 2024

Aceptado: Julio 26, 2024

¹Carrera Producción Agrícola. Instituto Superior Tecnológico Ciudad de Valencia. Pueblo viejo. Los Ríos, Ecuador. e-mail: pablopaez70@hotmail.com

²Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Centro de Investigaciones Agropecuarias, Cuba. e-mail: alexanderbc@uclv.edu.cu (autor de correspondencia)

³Agromikroben, Riobamba, Chimborazo, Ecuador. e-mail: castroalex1711@hotmail.es

⁴Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Chimborazo, Ecuador. e-mail: rosa.castro@epoch.edu.ec

⁵Estación Experimental Tropical Pichilingue. INIAP, Ecuador. e-mail: mariverloor2007@gmail.com

de hasta el 90 % de la producción (Bailey et al., 2018).

En la literatura científica se han descrito diferentes estrategias para el control de la enfermedad, entre las que se encuentran el cultural, genético, químico y biológico (Ten y Krauss, 2016). Sin embargo, dada la rápida diseminación que presenta *M. royeri* y su difícil control hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de manejo.

El uso de bacterias endófitas del género *Bacillus* se presenta como una opción ambientalmente segura y eficaz para combatir los agentes patógenos que afectan cultivos anuales y perennes en la agricultura (Abo, 2023). Estos microorganismos tienen la ventaja que una vez dentro de los tejidos de la planta, no se ven afectados por las condiciones ambientales como la temperatura, la salinidad, la radiación ultravioleta, el potencial osmótico, el pH y el estrés por sequía (Fatima et al., 2022; Anand et al., 2023).

En Ecuador existen limitadas investigaciones referidas al empleo de *Bacillus* endófitos en el control del agente causal de la moniliasis del cacao. Hasta la fecha, sólo se informaban los estudios realizados por Melnick et al. (2008; 2011), quienes caracterizaron *in vitro* 69 aislados de bacterias endófitas formadoras de endosporas contra los principales hongos patógenos que afectan las mazorcas de cacao. Estos mismos autores emplearon con éxito cepas de *Bacillus* spp., en el manejo de las enfermedades pudrición negra de la mazorca, escoba de brujas y moniliasis del cacao, durante dos campañas consecutivas en condiciones experimentales en la provincia Los Ríos.

Vera et al. (2020; 2021a) obtuvieron 33 nuevas cepas de *Bacillus* endófitos a partir de muestras de tejidos de la mazorca del clon de cacao criollo tipo Nacional en una zona productora de cacao de la provincia Esmeraldas en Ecuador. Estos investigadores después de realizar varios estudios *in vitro* con estas bacterias frente a *M. royeri* en condiciones de laboratorio, seleccionaron las 4 cepas que se emplean en esta investigación para llevar a condiciones de campo.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de cepas de *Bacillus* endófitos en la protección de *T. cacao* frente a *M. royeri* 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 msnm durante los meses de diciembre de 2018 hasta marzo de 2019 (época de invierno). Las condiciones climáticas predominantes durante el experimento se caracterizaron por una temperatura promedio de 26,5 °C, humedad relativa de 94,3 %, precipitación de 305 mm y velocidad del viento de 2,1 m·s⁻¹.

Se utilizaron cuatro cepas endófitas de *Bacillus* pertenecientes a la colección de cultivos microbianos del laboratorio de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Tropical Pichilingue perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), identificadas molecularmente según Vera et al. (2021b) (Cuadro 1).

Previo al establecimiento de los tratamientos se aplicó el fertilizante YaraMila Complex (12-11-18 más microelementos) con dosis de 500 kg·ha⁻¹, control de arvenses, manual y mecánica con motoguadaña; el primer manejo agronómico se realizó al iniciar el ensayo, en el que 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 de las cepas de *Bacillus* spp. Las cepas de *Bacillus* se inocularon en 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 placa con medio de cultivo sólido (Hoben y Somasegaran, 1982). Finalmente,

la concentración se ajustó a 10^8 esporas·mL⁻¹ en el momento de la aplicación.

Cuadro 1. Especies endófitas de *Bacillus* procedentes de tejidos de mazorcas de cacao (*Theobroma cacao*) colectadas en parroquias de Ecuador

Código	Especie	No. de accesión GenBank	Tipo de tejido	Parroquia
9-2	<i>B. subtilis</i>	KP165035.1	Endocarpio	Malimpia
24	<i>B. amyloliquefaciens</i>	MF000350.1	Mesocarpio	Malimpia
33	<i>Bacillus</i> sp.	KT583479.1	Mesocarpio	Rosa Zarate
45-1	<i>B. cereus</i>	EU266622.1	Mesocarpio	Rosa Zarate

El experimento se realizó bajo un diseño de bloques completos al azar, con seis tratamientos: cuatro cepas de *Bacillus* (*B. subtilis* 9-2; *B. amyloliquefaciens* 24; *B. cereus* 45-1; *Bacillus* sp. 33), un control químico (hidróxido de cobre, Kocide) a dosis de 1,5 kg i.a·ha⁻¹ y un control absoluto con cinco repeticiones. Cada réplica estuvo conformada por una parcela de diez árboles plantados a 3 x 3 m. Se dejó un área de dos hileras de plantas sin tratar para utilizar como fondo de infección.

Inoculación de *Bacillus* endófitos. La aplicación de las cepas bacterianas se realizó con atomizadores manuales de 500 mL de capacidad, asperjando un 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 10^8 UFC·mL⁻¹. Para cada tratamiento se utilizaron equipos y materiales diferentes, con la finalidad de evitar la contaminación entre las cepas bacterianas y se les añadió Silwet L-77 al 0,24 % (v/v) como coadyuvante para reducir la tensión superficial del agua. Se hicieron tres aplicaciones con una frecuencia mensual, tomando como criterio trabajos previos realizados por Vera (2023). La altura estimada de alcance de la aplicación fue de 2 m.

Para las evaluaciones de incidencia y severidad externa de la enfermedad se muestrearon 25 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 (1983), 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).

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{N^{\circ} \text{ mazorcas enfermas}}{\text{Total evaluadas}} \times 100$$

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

S = Severidad de la enfermedad

n = Número de frutos por grado de la escala

v = Grado de ataque según la escala

G = Número total de grados

N = Número total de frutos observados

Cuando las mazorcas alcanzaron la madurez de cosecha (aproximadamente a los 5 meses), se abrieron 25 muestras de frutos 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).

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.

Los datos correspondientes al porcentaje de incidencia, severidad externa e interna producto del efecto de las cepas de *Bacillus* endófitos se sometieron a la prueba no paramétrica de Friedman y Wilcoxon con corrección de Bonferroni-Holm. Se utilizó el programa estadístico Statistica (StatSoft) versión 12.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incidencia de moniliasis en los frutos de cacao se redujo significativamente en lo

tratamientos donde se aplicaron las suspensiones de esporas de *B. cereus* 45-1, *Bacillus* sp. 33 y *B. amiloliquefaciens* 24, sobre los cojinetes florales, en cada uno de los muestreos. Estos tratamientos

biológicos no tuvieron diferencias significativas con el control químico (solución de hidróxido de cobre), pero si con respecto a *B. subtilis* 9-2 y el control absoluto (Figura 1).

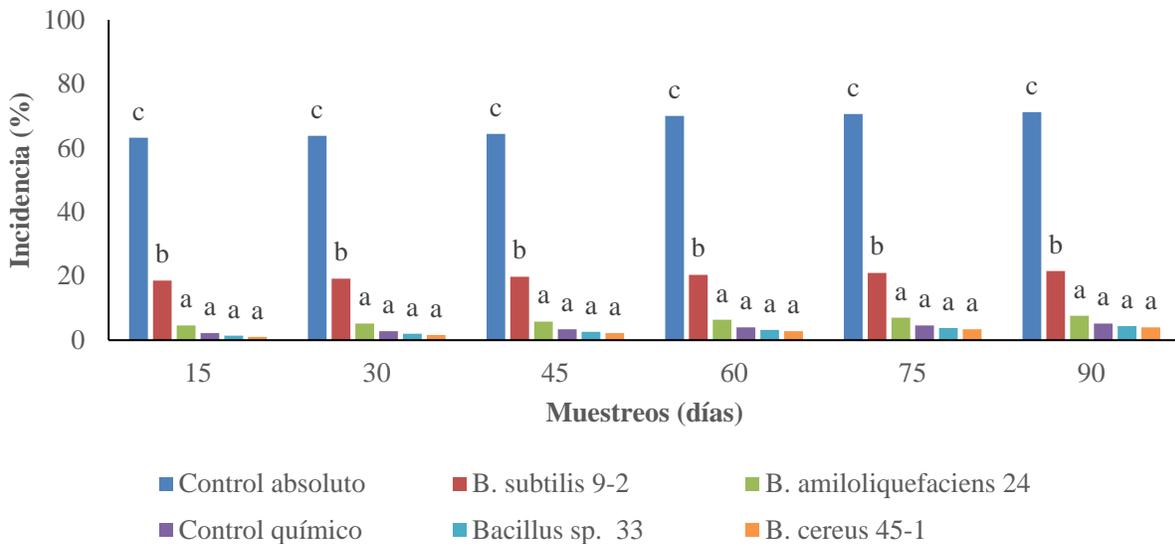


Figura 1. Efecto de los tratamientos sobre la incidencia de *Moniliophthora roreri* en los diferentes muestreos.

Medias con letras diferentes para cada muestreo indican diferencias estadísticas significativas. Análisis de Friedman ($n = 25$; $df = 5$) $\chi^2 = 22,81621$ ($P = 0,00037$), y Wilcoxon con corrección de Bonferroni-Holm ($P \leq 0,05$)

Los altos valores de incidencia de la enfermedad que se encontraron en el control absoluto durante todos los muestreos pudieran estar influenciado por el comportamiento de las

variables climáticas durante el desarrollo del experimento que favorecieron la alta presión de inóculo de *M. roreri* en el cacaotal (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comportamiento de las variables climáticas durante el desarrollo del experimento

Meses	Temperaturas (°C)			Humedad relativa (%)	Lluvia acumulada (mm)
	Máxima	Media	Mínima		
Diciembre	30,1	26,4	22,7	93,6	312,6
Enero	31,2	26,7	22,2	94,4	235,9
Febrero	32,5	27,4	22,2	95,1	384,1
Marzo	32,7	27,5	22,2	94,4	279,9

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

Según Pilalao et al. (2021), la efectividad del control biológico se puede explicar sobre la base de dos factores: las características del agente biológico y el microambiente de la mazorca del cacao. En este sentido, todo parece indicar que las cepas bacterianas aplicadas, al ser nativas del agroecosistema cacaotero, presentaron una gran

capacidad de adaptación a esas condiciones ambientales; además, de asperjarse, en una etapa muy joven de formación del fruto (clavo).

Por su parte, las características de las cepas de *Bacillus* spp y el microclima en el cacaotal pueden haber favorecido que las bacterias colonizaran y ocuparan, en altas concentraciones, la superficie

del pericarpio del fruto en la época crítica para la moniliasis, lo cual queda demostrado en la reducción significativa de la incidencia de la enfermedad con los tratamientos biológicos aplicados.

Las condiciones del microambiente en los cacaotales del trópico húmedo son ideales para la supervivencia de las bacterias; según Jaimes et al. (2022), la luz que llega a la mazorca es apenas un 5-10 % de la luz que incide sobre el cacaotal, con lo cual los efectos de la radiación solar son amortiguados casi totalmente por el follaje del árbol de cacao y de la sombra.

En cuanto a la humedad, Aceves e Yzquierdo (2024) afirmaron que la mazorca está cubierta por una película de agua durante varias horas al día debido al efecto de condensación y protección solar del follaje, en la que persiste una película de agua en el fitoplasma que permite la distribución efectiva de las bacterias y la competencia por nutrientes entre las bacterias y los propágulos del hongo.

Por su parte, el efecto protector que ejercieron las bacterias aplicadas, coincidió con los resultados obtenidos por Coronel (2018), quien señaló una reducción de la incidencia de moniliasis durante las fechas evaluadas en un ensayo realizado en la provincia de Esmeraldas.

El efecto protector de las cepas de *Bacillus*, en la reducción de la incidencia de *M. roreri*, corroboró lo referido por Melnick et al. (2011), al aplicar las cepas *Lysinibacillus sphaericus* A-20, *B. cereus* CT, *B. subtilis* CR y *B. pumilus* ET, contra las principales enfermedades de la mazorca en experimentos de campo en Ecuador. En este sentido, estos investigadores encontraron además un aumento en el número de mazorcas sanas en los dos primeros meses, de los cuatro que duró el experimento.

Shoda (2019) y Khan et al. (2020) demostraron las potencialidades de bacterias endófitas del género *Bacillus* como agentes de control biológico de hongos patógenos. En este sentido, se conoce que entre los mecanismos a través de los cuales transcurre este proceso se encuentran las relaciones de competencia, la producción de antibióticos, enzimas y de otras sustancias como sideróforos, que permiten a estos microorganismos ejercer su capacidad biocontroladora (Pavithra et al., 2020).

Los hallazgos obtenidos con las cepas *B. subtilis* 9-2, *B. amyloliquefaciens* 24, *Bacillus* sp. 33 y *B. cereus* 45-1, en el control de la enfermedad, se encuentran en correspondencia con la actividad antifúngica *in vitro* que demostraron las mismas frente *M. roreri* (Vera et al., 2021a).

El resultado obtenido para la severidad externa de la enfermedad fue similar al de la variable incidencia, en la cual no se detectaron diferencias significativas entre las aplicaciones de *B. cereus* 45-1, *Bacillus* sp. 33, *B. amyloliquefaciens* 24 y el control químico, pero sí con respecto a *B. subtilis* 9-2 y el control absoluto (Figura 2).

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 26,4-27,5 °C y humedad relativa entre 93,6- 95,1 % (Cuadro 2).

Phillips y Wilkinson (2007) y Phillips et al. (2007), afirmaron que el conidio de *M. roreri* 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 28,0 °C y humedad relativa de 85 %, condiciones que se corresponden con las óptimas de crecimiento del hongo patógeno en este experimento.

Jaimes et al. (2008) y Suárez y Alba (2013), plantean que las especies del género *Bacillus* pueden inhibir el crecimiento y esporulación de *M. roreri*, mediante la producción de compuestos antimicrobianos. Específicamente cepas de *B. cereus* y *B. subtilis* han sido utilizadas para el control biológico de la moniliasis (Melnick et al., 2008; Melnick et al., 2011; Acebo et al., 2012; Hernández et al., 2014).

Al analizar la severidad interna, las cepas *B. cereus* 45-1 y *Bacillus* sp. 33 mostraron los mejores resultados de biocontrol de la enfermedad al diferir significativamente con *B. subtilis* 9-2 y *B. amyloliquefaciens* 24, pero sin diferencias significativas con respecto al control químico (Figuras 3 y 4).

Las mazorcas que alcanzaron la madurez presentaron disminución en el número de semillas y pudriciones acuosas (Figura 4), similar a lo observado por Evans (2007), en frutos infectados por *M. roreri*

Los valores de severidad externos e internos provocados por *M. roreri* a las mazorcas de cacao, demuestran la capacidad de biocontrol que

tuvieron las cepas de *Bacillus*, al realizar su aplicación en condiciones de campo

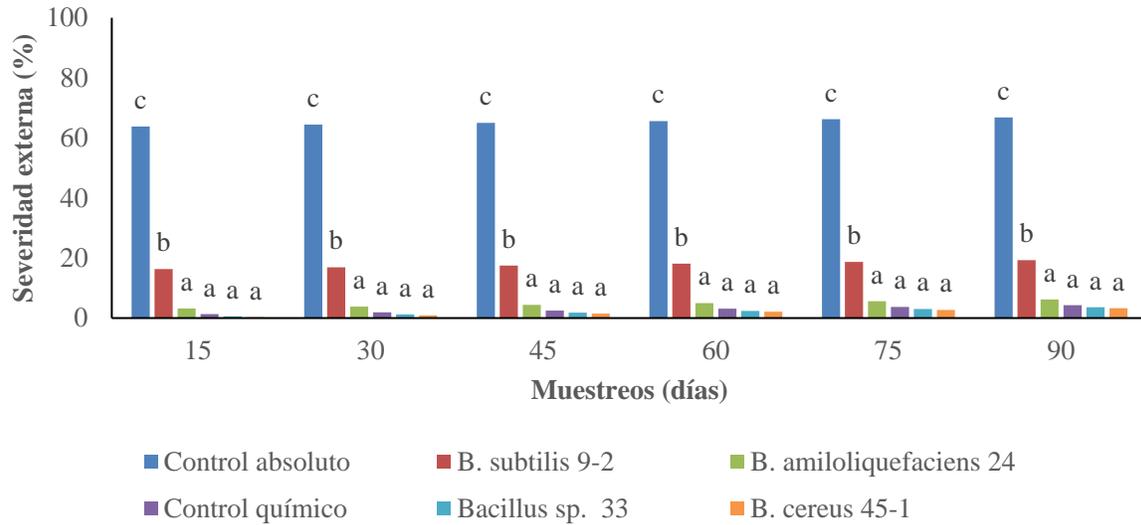


Figura 2. Efecto de los tratamientos sobre la severidad externa de *Moniliophthora roreri* en los diferentes muestreos

Medias con letras diferentes para cada muestreo indican diferencias estadísticas significativas. Análisis de Friedman ($n = 25$, $df = 5$) $\chi^2 = 21,33663$ ($P = 0,0007$), y Wilcoxon con corrección de Bonferroni-Holm ($P \leq 0,05$)

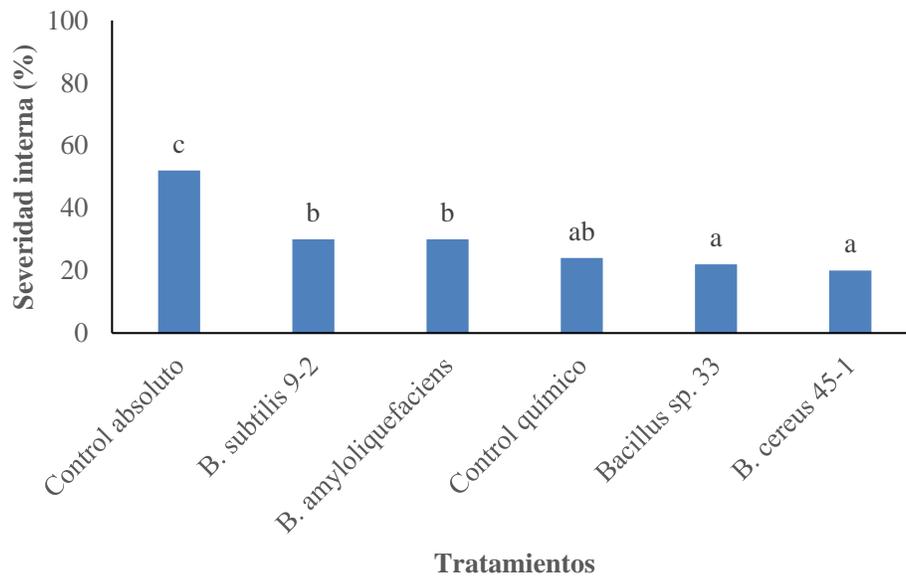


Figura 3. Efecto de los tratamientos sobre la severidad interna de *Moniliophthora roreri* en frutos cosechados en estado de madurez fisiológica. Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Análisis de Friedman. ($n = 25$, $df = 5$) $\chi^2 = 16,43836$ ($P = 0,0057$), y Wilcoxon con corrección de Bonferroni-Holm ($P \leq 0,05$)

En la literatura consultada, existen limitados informes sobre el efecto de la aplicación de bacterias endófitas del género *Bacillus* sobre la incidencia y severidad de la moniliasis del cacao en condiciones de campo. La mayoría de estos estudios están vinculados, principalmente, a otras enfermedades de la mazorca del cacao. Larbi et al. (2020) y Ouattara et al. (2020), al evaluar la aplicación de la bacteria endófito *B.*

amyloliquefaciens en el control de la enfermedad pudrición negra de la mazorca causada por *P. palmivora* en condiciones de campo, encontraron un porcentaje de control de la enfermedad que osciló entre el 53,33 y el 66,67 %. Estos autores demostraron que las bacterias endofíticas antagonistas de *Phytophthora* spp. pueden ser una solución alternativa en el biocontrol de la enfermedad.

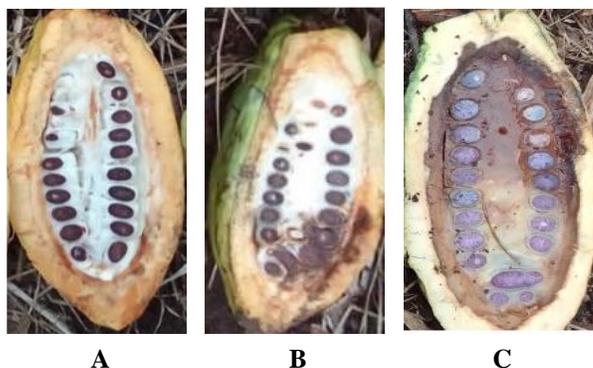


Figura 4. Síntomas de severidad interna de *Moniliophthora roreri* en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao*) a los 90 días de aplicación de las cepas de *Bacillus* spp. A) *Bacillus* sp. 33, B) *Bacillus amyloliquefaciens* 24, C) Control

CONCLUSIONES

Las aplicaciones de las cepas *B. amyloliquefaciens* 24 y *Bacillus* sp. 33 constituyen una alternativa de control biológico contra *M. roreri*, disminuyendo la incidencia y severidad de una de las principales enfermedades fúngicas que limitan la producción en zonas cacaoteras de la provincia de Esmeraldas, Ecuador.

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. Acebo, Y., A. Hernández, M. Heydrich, M. El Jaziri y A.N. Hernández. 2012. Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. *Fruits* 67(1): 41-48.
3. Aceves, L.A. y M.E. Yzquierdo. 2024. Condiciones térmicas favorables para el desarrollo de monilia (*Moniliophthora roreri*) en la Chontalpa, Tabasco, México. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research* 7(1): 331-338.
4. Anand, U., T. Pal., N. Yadav., V. Kumar Singh., V. Tripathi., K. Kumar Choudhary, et al. 2023. Current scenario and future prospects of endophytic microbes: Promising candidates for abiotic and biotic stress management for agricultural and environmental sustainability. *Microbial Ecology*.
5. Bailey, B.A., H.C. Evans., W. Phillips-Mora., S.S. Ali y LW. Meinhardt. 2018. *Monilophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular plant pathology* 19(7): 1580-1594.
6. Ciba-Geigy. 1981 Manual para ensayos de campo en protección vegetal. 2da Edición. Basilea, Suiza. pp.11-20.
7. Coronel-Rojas, N. 2018. Análisis de los patrones de producción de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1

- durante diferentes etapas de crecimiento. Trabajo de grado. Universidad de Las Américas (DLA). Quito. <https://n9.cl/badrd>.
8. Espinosa, J., J. Moreno y G. Bernal. 2022. Suelos del Ecuador: Clasificación, uso y manejo. Instituto Geográfico Militar (IGM). Quito. pp. 45-103.
 9. Evans, H.C. 2007. Cacao diseases: The trilogy revisited. *Phytopathology* 97(12): 1640-1643.
 10. Fatima, T., S. Sharma, A. Bano, D. Srivastava, I. Verma y P.C. Singh. 2022. Microbial endophytes: A hidden plant resident, application and their role in abiotic stress management in plants. *Journal of Ecophysiology and Occupational Health* 22(3): 127-140.
 11. Hernández, A., Y. Ruiz, Y. Acebo, Y. Miguélez y M. Heidrych. 2014. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto de *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Revista de Protección Vegetal* 29(1): 11-19.
 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. Jaimes, A., R. Coronado y Y. Jaimes. 2008. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de cinco cepas de *Bacillus* sp. como agentes de biocontrol de *Moniliophthora roreri*. In: *Memorias Seminario Internacional de Cacao: Avances de Investigación*. Instituto Colombiano Agropecuario y Federación Nacional de Cacaoteros. Bucaramanga, Colombia. pp. 26-27.
 14. Jaimes-Suárez, Y.Y., A.S. Carvajal-Rivera, DA. Galvis-Neira, F.E.L. Carvalho y J. Rojas-Molina. 2022. Cacao agroforestry systems beyond the stigmas: Biotic and abiotic stress incidence impact. *Frontiers Plant Science* 13: 921469.
 15. Khan, S.S., V. Verma y S. Rasool. 2020. Diversity and the role of endophytic bacteria: a review. *Botanica Serbica* 44(2): 103-120.
 16. Larbi-Koranteng, S., R. Tuyee y F. Kankam. 2020. Biological control of black pod disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.) with *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. *in vitro* and in the field. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 12(2): 52-63.
 17. Melnick, R.L., N.K. Zidack, B.A. Bailey, S.N. Maximova, M. Guiltinan y P.A. Backman. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological control* 46(1): 46-56.
 18. 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.
 19. Ouattara, A., K. Coulibaly, I. Konate, B.I. Kebe, G.A.M. Beugre, A.S. Tidou y A. Filali-Maltouf. 2020. Screening and selection *in vitro* and *in vivo* of cocoa tree (*Theobroma cacao* Linn.) endophytic bacteria having antagonistic effects against *Phytophthora* spp. fungal agents responsible of black pod disease in Côte d'Ivoire. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 8(1): 25-31.
 20. Pavithra, G., S. Bindal, M. Rana y S. Srivastava. 2020. Role of endophytic microbes against plant pathogens: A review. *Asian Journal of Plant Science* 19(1): 54-62.
 21. 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.
 22. Phillips-Mora, W., C.F. Ortiz y M.C. 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.
 23. Pilaloo, W., A. Alvarado, D. Pérez y S. Torres. 2021. Manejo agroecológico de la moniliasis en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) mediante la utilización de biofungicidas y podas fitosanitarias en el cantón La Trocal. *Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinarias* 5(15): 453-468.
 24. Sánchez, J.A. 1983. Reacción de cultivares de cacao a la inoculación artificial con

- Monilia roreri* Tesis de Maestro en Ciencias. CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica. 55 p.
25. Sánchez, J., O. Brenes, W. Phillips y G. Enríquez. 1987. Methodology for inoculating pods with the fungus *Moniliophthora (Monilla) roreri*. Proceedings of the Tenth International Cocoa Research Conference. Santo Domingo, Dominican Republic: Cocoa Producers Alliance. pp. 467-471.
 26. Shoda, M. 2019. Biocontrol of plant diseases by *Bacillus subtilis*: Basic and practical applications. Boca Raton, Florida, 325p.
 27. 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 (INIAP), Est. Exp. Tropical Pichilingue. Mocache, provincia de Los Ríos, Ecuador. 20 p. <https://n9.cl/zcde8>
 28. Suárez, L. y R. Alba. 2013. Aislamiento de microorganismos para el control biológico de *Moniliophthora roreri*. Acta Agronómica 62(4): 370-378.
 29. Ten Hoopen, G.M. y U. Krauss. 2016. Biological control of cacao diseases. In: B. A. Bailey y L.W. Meinhardt (eds.). Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters. Springer International Publishing. New York. pp. 511-566.
 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 roreri* 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 roreri* 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 roreri* H.C. Evans et al. Tesis. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba. 90 p.

