



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSTGRADO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROBIOTA DE PLANTAS
SANAS Y ENFERMAS DE *Theobroma cacao* L. E IDENTIFICACIÓN DE
CEPAS NATIVAS DE *Bacillus amiloliquefaciens* ANTAGONISTA *IN VITRO*
DEL HONGO FITOPATÓGENO *Colletotrichum fructicola*.**

AUTOR

ERICK ANTONIO SUAREZ PEÑA

TUMBES, PERÚ

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSTGRADO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN:**

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

PROYECTO DE TESIS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROBIOTA DE PLANTAS
SANAS Y ENFERMAS DE *Theobroma cacao* L. E IDENTIFICACIÓN DE
CEPAS NATIVAS DE *Bacillus amiloliquefaciens* ANTAGONISTA *IN VITRO*
DEL HONGO FITOPATÓGENO *Colletotrichum fructicola*.**

AUTOR

ERICK ANTONIO SUAREZ PEÑA

TUMBES, PERÚ

2016

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo Erick Antonio Suarez Peña declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

Erick Antonio Suarez Peña

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

RESPONSABLES

ERICK ANTONIO SUAREZ PEÑA

EJECUTOR

ERIC LOUIS MIALHE MATONNIER

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. Víctor Benjamín Carril Fernández

PRESIDENTE

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón.

SECRETARIO

Dra. Virna Alexia Cedeño Escobar

VOCAL

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN.	12
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.	16
2.1. Antecedentes.	16
2.2. Bases teóricas científicas	18
2.3. Definición de términos básicos	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS	27
3.1. Colección de muestras	27
3.2. Aislamientos y purificación de bacterias y hongos.	28
3.3. Co-cultivo bacteriano de hojas, frutos (sanos y enfermos) y suelo rizosférico de plantas sanas <i>T. cacao</i>	28
3.4. Extracción de ADN de las bacterias purificadas	29
3.5. Reacción en cadena de la polimerasa para bacterias (PCR)	29
3.6. Extracción de ADN fúngico	30
3.7. Reacción en cadena de la polimerasa para hongos (PCR)	31
3.8. Extracción de ADN metagenómico de muestra de suelo rizosférico.	31
3.9. Extracción de ADN metagenómico de muestra de co-cultivo bacteriano de hojas, frutos (sanos y enfermos) y suelo rizosférico de plantas sanas.	33
3.10. Verificación del ADN metagenómico mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	33
3.11. Establecimiento de un cepario	34
3.12. Ensayos de antagonismo bacteria – hongo	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Identificación de bacterias aisladas de la filósfera de plantas sanas y enfermas de <i>T. cacao</i> .	36

4.2. Identificación de bacterias aisladas de la rizósfera de plantas sanas de <i>T. cacao</i> .	37
4.3. Análisis metagenómico de los co-cultivos bacterianos provenientes de hojas, frutos (sanos y enfermos) y suelo rizosférico de plantas sanas <i>T. cacao</i>	38
4.4. Aislamiento e identificación de hongos desde la rizósfera desde plantas sanas de <i>T. cacao</i> .	47
4.5. Aislamiento e Identificación de hongos desde frutos de plantas enfermas de <i>T. cacao</i> .	48
4.7. Antagonismo bacteria-hongos en condiciones <i>in vitro</i>	48
5. DISCUSIÓN.	50
6. CONCLUSIONES.	55
7. RECOMENDACIONES.	56
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	57
9. DEDICATORIA	66
10. AGRADECIMIENTOS.	67
11. ANEXOS	68

RESUMEN.

El cultivo de *Theobroma cacao* en el país tiene una gran importancia económica, siendo considerada la región Tumbes productora de cacao fino aroma y sabor con fines de exportación, Sin embargo, este cultivo es susceptible a enfermedades fúngicas, lo que ha generado el uso indiscriminado de pesticidas. Una alternativa para reducir o eliminar el uso de estos pesticidas, consiste en la aplicación de bacterias y hongos benéficos nativos con carácter de bio-controlador. Con la finalidad de conocer la diversidad bacteriana y fúngica, se realizaron diversos análisis metagenómicos, mostrando estos la predominancia de las bacterias, de los *Phyla* firmicutes y proteobacteria los cuales varían acorde a la etapa de infección causada por hongos, así mismo en una muestra directa de suelo rizosférico se determinó el predominio de bacterias no clasificadas. Las cepas bacterianas y fúngicas identificadas de la filósfera fueron: *Leclercia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Macrophomina*, *Phomopsis*, *Lasioidiplodia*, *Neurospora*, *Moniliophthora* y de la rizósfera *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea* y *Trichoderma*, *Cunninghamella*. Los ensayos *in vitro* mostraron que *B. amiloliquefaciens* posee actividad antagonista contra *C. gloesporioides*. Se concluye que estas cepas bacterianas aisladas de *T. cacao* tienen un gran potencial como bio controlador.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, Metagenómica, Rizósfera

ABSTRACT

The cultivation of *Theobroma cacao* in the country has great economic importance, being considered the Tumbes region producer of cocoa fine aroma and flavor for export, however, this crop is susceptible to fungal diseases, which has led to the indiscriminate use of pesticides. An alternative to reduce or eliminate the use of these pesticides, is the application of bacteria and fungi native character beneficial bio-driver. In order to meet the bacterial and fungal diversity, various metagenomic analyzes were performed, showing these the predominance of bacteria of the Firmicutes phyla and proteobacteria which vary according to the stage of infection caused by fungi, also in a direct sample rhizosphere soil the prevalence of bacteria was determined not classified. Bacterial and fungal strains identified the phyllosphere were *Leclercia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Macrophomina*, *Phomopsis*, *Lasiodiplodia*, *Neurospora*, *Moniliophthora* and rhizosphere *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea* and *Trichoderma*, *Cunninghamella*. In vitro assays they showed that *B. amyloliquefaciens* has antagonistic activity against *C. gloeosporioides*. It is concluded that these bacterial strains isolated from *T. cacao* have great potential as biocontrol.

Key words: *Theobroma cacao*, Metagenomic, Rizosphere.

1. INTRODUCCIÓN.

El cultivo de *Theobroma cacao* es la base de la producción de la materia prima del chocolate en varios países del mundo (Holmes 2004). Actualmente, el 18% de la producción mundial del cultivo se concentra en América Latina. No obstante, Ecuador lidera el segmento de cacao fino y aromático, y en esta lista el Perú ocupa el segundo lugar. (ICCO 2015). La producción en el 2014 a nivel nacional fue de 81, 651 Tm, siendo una de las mayores demandas en los países asiáticos.

Tumbes es una región en donde los cultivos predominantes son el arroz y el banano; a la vez se ha convertido desde el año 2005 en una región con excepcionales características para la producción de cacao orgánico de aroma con fines de exportación. La producción no solo supera estándares de productividad sino también es una alternativa que está mejorando considerablemente los ingresos de los productores de pequeña escala de los valles de Zarumilla y Aguas Verdes con capacidades de gerencia para posicionarse a mercados competitivos de Europa y Estados Unidos (ARPROCAT 2014).

T. cacao es considerado como una especie de árbol forestal. Dentro de los campos modernos de estudio de los árboles forestales, la ecología y sistemática de microorganismos endófitos han sido extensamente estudiadas (Crozier *et al.* 2006). Los microorganismos que habitan las plantas corresponden a comunidades específicas en las diferentes partes de la rizósfera y filósfera, la cual comprende la parte superior de la planta y que está compuesta por las hojas, brotes, tronco, flores y frutos. (Arnold *et al.* 2000).

Estas comunidades microbianas que colonizan la rizósfera y filósfera, y están constituidas esencialmente de bacterias, hongos y protistas, siendo las bacterias las que dominan en cantidad la filósfera comparativamente a los hongos (Lindow and Brandl 2003).

Las comunidades bacterianas de la filósfera se han adaptado para desarrollarse bajo diversas y variables condiciones de temperatura, como lo son: radiaciones ultra violetas, humedad relativa, etc. (Newton, Gravouil and Fountaine 2010; Whipps *et al.* 2008).

La rizósfera es colonizada por diversas comunidades de microorganismos con distintas capacidades, como lo son: producción de fitohormonas, inhibición de patógenos, captación de nitrógeno, fitorremediación, solubilización de fosfatos, promoción de crecimiento de la misma planta (Vessey 2003; Chen *et al.* 2006; Lugtenberg and Kamilova 2009).

Los hongos endófitos están presentes dentro del huésped, siendo ubicados dentro varios tipos de tejidos de plantas por al menos parte de su ciclo de vida (Arnold *et al.* 2003). Las relaciones planta-hongo son de diversas naturalezas conocidas como sinergismo, comensalismo, parasitismo, siendo entonces del tipo benéficas o perjudiciales para la planta huésped.

Además existen otros tipos de hongos los cuales son responsables de las principales enfermedades que afectan al fruto de cacao en Latinoamérica causando importantes bajas de producción y de calidad del cacao, y subsecuentemente bajas rentabilidades y pérdidas económicas (Alarcón *et al.* 2012).

Entre las principales enfermedades fúngicas que afectan a este cultivo están la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) responsable de la pudrición del fruto, la antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides*) responsable de la muerte regresiva (*Lasidoplodia* spp.) y *Phytophthora* spp responsables de la pudrición radicular. (Mejía *et al.* 2008; Alves *et al.* 2008)

A pesar de la capacidad de los hongos endófitos en la supresión de enfermedades en cacao (Cuervo *et al.* 2011), las bacterias endófitas parecen ofrecer un rango más amplio de actividades benéficas tales

como promoción de crecimiento (Barka *et al.* 2002), reducción de enfermedades (Coombs, Michelsen and Franco 2004) e induciendo mecanismos de defensa en plantas (Bakker *et al.* 2007). Tales propiedades microbianas han atraído la atención debido a la necesidad de reducir el uso de productos químicos, especialmente cuando se considera el contexto del desarrollo sostenible de la agricultura orgánica y la protección del medio ambiente (Vale *et al.* 2010).

Las comunidades bacterianas asociadas a plantas, y conocidas como microbiota, han sido estudiadas y caracterizadas en las distintas especies cultivadas, incluyendo el cacao, mediante tecnologías dependientes e independientes del cultivo *in vitro* de los microorganismos (Andreote *et al.* 2009; Trivedi, Duan and Wang 2010; Melnick *et al.* 2011).

Las tecnologías dependientes del cultivo *in vitro* presentan la ventaja de disponer de los microorganismos aislados y caracterizados molecularmente, pero presentan a su vez la desventaja de no poder identificar a la mayoría de estos, que se encuentran presentes en la microbiota de la planta, debido a que son del tipo no cultivables o difícilmente cultivables a nivel *in vitro*. En la práctica de estas tecnologías dependientes del cultivo *in vitro*, permiten identificar menos de 10% de la diversidad microbiana presente en una muestra.

Las tecnologías independientes del cultivo *in vitro* presentan la desventaja de no poder disponer de cepas aisladas y utilizables subsecuentemente en los cultivos pero presentan la ventaja de poder identificar la totalidad de las cepas presentes en la microbiota de la planta ya sea cultivables, no cultivables o difícilmente cultivables *in vitro*. De hecho, las identificaciones están realizadas directamente a partir del ADN microbiano extraído de la planta y amplificado con iniciadores universales específicos de ADNr de bacterias o hongos con secuenciación subsecuente masiva de los millares de amplicones utilizando tecnología NGS ("Next generation Sequencing": secuenciación

de próxima generación). Las tecnologías independientes del cultivo *in vitro* son conocidas como “metagenómica dirigida al ADN” y cada vez son más utilizadas, para caracterizar los microorganismos presentes en las plantas y en los animales (Bodenhause, Horton and Bergelson 2013; Nadkarni *et al.* 2009).

El conjunto del genoma de la planta o del animal y de los genomas de su microbiota ha conducido al concepto de hologenoma con análisis y críticas del concepto; considerando ya sea la co-evolución de los genomas en relación a los procesos de simbiosis o de la diversidad de naturaleza de las interacciones del huésped con los microorganismos benéficos y perjudiciales (Collier and Casadevall 2016; Douglas and Werren 2016).

Con este concepto reciente del hologenoma e interacciones del huésped con microorganismos benéficos y perjudiciales, es primordial para el cacao, implementar proyectos de investigación para caracterizar los microorganismos de la rizósfera y filósfera, en particular de las frutas, considerando plantas sanas y enfermas. Adicionalmente de la caracterización de las microbiotas con tecnologías independientes y dependientes de cultivo *in vitro* de los microorganismos, es primordial disponer de las cepas aisladas respectivamente de frutas sanas y enfermas para buscar aquellas con potencial antagonista, utilizables para el control biológico de los microorganismos patógenos y así apoyar el sector cacaotero como estrategia de cultivo orgánico.

Los resultados de estas investigaciones están presentados en continuación con la identificación y evaluación de cepas de la bacteria nativa *Bacillus amiloloquefaciens* antagonista *in vitro* del hongo fitopatógeno *Colletotrichum fructicola*.

2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.

2.1. Antecedentes.

A nivel regional, no existen estudios relacionados a la microbiota benéfica para el cacao (*Theobroma cacao*), pero existen reportes sobre microorganismos patógenos, en particular los hongos.

Melnick *et al.* (2011), han aislado y caracterizado molecularmente 69 cepas bacterianas a partir de distintas partes de plantas *T. cacao*, provenientes de una estación experimental de Ecuador, Algunas cepas formadoras de endosporas han sido luego evaluadas como agentes de bio-control ante hongos patógenos de cacao. Evaluando un grupo de 16 cepas, con propiedades quitinolíticas y con efectos antagonistas *in vitro* frente a varios hongos como lo son: *Moniliophthora roreri* (42%), *M. perniciosa* (33%), *Phytophthora capsici* (49%).

Thomas *et al.* (2008), realizaron estudios de caracterización molecular de varias especies endofíticas fúngicas, previamente identificadas por morfología, desde plantas de *Theobroma gileri* en Ecuador. Las 46 cepas identificadas corresponden a 31 taxones, 15 basidiomicetes (*Agaricomycetes*) y 16 ascomicetes (*Sordariomycetes*).

Barreto *et al.* (2008), estudiaron las densidades poblacionales y diversidades genéticas de actinomicetos asociados a la rizósfera de *Theobroma cacao*, reportando la identificación de 38 aislados, mediante el análisis de secuencias del fragmento codificante de la subunidad- β del gen *rop β* . Posteriormente, evaluaron bajo condiciones *in vitro* las actividades xianolíticas, celulolíticas y quitinolíticas, la solubilización de fosfatos y la producción de ácido

indol acético, siendo este conjunto de actividades características de microorganismos promotores de crecimiento.

Falcao *et al.* (2014), estudiaron el efecto antimicrobiano y promotor de crecimiento de *Bacillus subtilis* ALB629 en plántulas de cacao, con un incremento significativo de los sistemas de raíces de más del 30%, del área foliar un 14% y una altura de tallo de 7.6%. Además mediante ensayos *in vitro* esta cepa bacteriana mostró efectos antagonistas contra *Colletotrichum* spp y *Monilophthora perniciosa*.

Diferentes autores como Rubini *et al.* (2005), Hanada *et al.* (2010), y Gupta *et al.* (2014), han logrado identificar microorganismos endófitos con múltiples capacidades hacia la planta y contra los distintos patógenos que afectan al cacao.

Investigaciones similares han sido realizadas para otras especies cultivadas, como la realizada por Ayyadurai *et al.* (2005), los cuales aislaron y caracterizaron las bacterias de la rizósfera del banano, identificando molecularmente a *Pseudomonas aeruginosa* de la cual se determinó su capacidad para solubilizar fosfatos, promover el crecimiento, sintetizar IAA (indole-3-acetic acid) y el antibiótico por DAPG, capacidad para producir siderosporas e inhibir al hongos causantes de la necrosis en las raíces (*Fusarium oxysporum*).

Douanla-Meli, Langer and Mouafo (2013), analizaron la diversidad endófito fúngica y patrones de comunidades microbianas en las hojas amarillentas y sanas de cultivo de limón (*Citrus limón*). Mediante el análisis de secuencias ITS, lograron identificar 482 aislados, de los cuales casi todos eran ascomicetos del tipo patogénico; siendo los hongos más frecuentes en hojas sanas y fueron del genero *Mycosphaerella* (34.2%), mientras que el hongo *Colletotrichum gloesporioides* (50.4%) fue el más frecuente en hojas amarillentas.

Pastor *et al.* (2009), realizaron investigaciones similares en el tomate, caracterizando a especies de bacterias del tipo *Pseudomonas* mediante el sistema bioquímico API 20NE en la rizósfera, con efecto antagonista contra los hongos patógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii*.

2.2. Bases teóricas científicas

Enfoque relacionado la problemática del cultivo de *T. cacao*

La falta de pruebas moleculares para el diagnóstico rutinario, específico y sensible de los patógenos susceptibles de ser transmitidos de forma directa e indirecta, constituye un problema mayor para el desarrollo y la sostenibilidad de cultivos de cacao. Por otra parte la falta de conocimiento de la microbiota benéfica asociada a la filósfera, rizosfera del cacao, no ha permitido el aislamiento de cepas benéficas nativas utilizables para colonizar los plantones producidos en viveros de cacao y estimular así la defensa inmediata contra patógenos, y posteriormente estimular el crecimiento radicular (Vale *et al.* 2010).

Enfoque de la diversidad microbiana en plantas.

Las comunidades microbianas juegan un rol importante en el balance de la ecología de suelos y plantas de los diversos cultivos, siendo la interacción de los microorganismos asociados a plantas la principal influencia en la nutrición y salud de la planta (Giassi, Kiritani and Kupper 2016). Las interacciones pueden darse en las distintas partes de la planta como lo son la filósfera, endósfera y rizósfera, debido a que estas son colonizadas por diversidades de especies del tipo bacterianas, como también levaduras y hongos filamentosos (Andrews and Harris 2000; Kent and Triplett 2002).

Las potencialidades de los microorganismos nativos esta basada en los beneficios que muchos microorganismos pueden brindarle a la planta cuando se adiciona a esta (Lucy *et al.* 2004), asi mismo la selección y el uso de estos microorganismos en plantas, tiene el potencial para reducir la incidencia de enfermedades (Bloemberg and Lugtenberg 2001), incremenando la producción en la agricultura (Bakker *et al.* 2012), reducción de los insumos agrícolas (Adesemoye, Torbert and Kloepper 2009), resultando mucho en practicas de agricultura sostenible.

Enfoque de técnicas dependiente e independiente de cultivo *in vitro*.

Las técnicas dependiente de cultivo *in vitro* clásicas, involucran los aislamientos y cultivos de microorganismos, utilizando diferentes medios nutritivos y condiciones de crecimiento depediendo el tipo de microorganismo. A pesar de obtener un cultivo puro de un microorganismo, es requerido un estudio a detalle de su fisiología y genética. Numerosos cultivos independientes, y técnicas moleculares son utilizadas en la mayoría de la ecología microbiana (Thomas, Euan and Phillip 2013).

Por ende esta técnica ha permitido aislar microorganismos para estudios a detalle, y las técnicas moleculares tal como la técnica independiente de cultivo (metagenomica), han sido situadas para la identificación de microorganismos *in situ*. Las comunidades microbianas y microbiomas de diversos ambientes han sido estudiados para un mejor entendimiento de la funcion de la ecologia (Gilbert *et al.* 2010).

2.3. Definición de términos básicos.

ADN: El ADN es el ácido desoxirribonucleico cuya secuencia de nucleótidos contiene la información necesaria para poder controlar el metabolismo un ser vivo. El ADN es la molécula donde reside la información genética de un ser vivo.

(https://es.wikipedia.org/wiki/Ácido_desoxirribonucleico).

Amplicón: Es un fragmento de ADN que es el producto de la amplificación de eventos de replicación artificiales. Puede formarse usando diversos métodos correspondientes a reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). En este contexto, " amplificación" se refiere a la producción de una o más copias de un fragmento genético o secuencia diana, específicamente el amplicón. Como el producto de una reacción de amplificación.

(<https://en.wikipedia.org/wiki/Amplicon>)

Biotecnología molecular: Es el conjunto de tecnologías derivadas de la biología molecular y la ingeniería genética que son agrupadas como "ómicas" correspondiente a la genómica, metagenómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. La biotecnología se enfoca en varios campos, como la veterinaria, en la agricultura y acuicultura, así como la ecología y protección del ambiente.

(https://es.wikipedia.org/wiki/Biología_molecular)

Iniciador: iniciador o primer, es una cadena de ácido nucleído o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Cepario: Colección de especies de microorganismos, aislados y generalmente caracterizados molecularmente, que son conservados en distintos medios convenientes para largos periodos o preservados por congelación o con crio preservantes.

Electroforesis: Es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (p. ej., electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

Filósfera: Se refiere a la superficie de la hoja o en el total de superficie de la parte aérea de una planta como un hábitat para los microorganismos.

Metagenómica: La metagenómica es el estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno (metagenoma) directamente a partir de muestras de medio ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar esas especies.

Microorganismos antagonistas: Los microorganismos antagonistas son capaces de inhibir o afectar el desarrollo de un o diferentes tipos de microorganismos, generalmente de tipo patógeno, lo que conduce a su utilización como agentes bio controladores de estos patógenos.

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), es una técnica de biología molecular que se basa en las características de la estructura química del ADN y su replicación semi conservativa. Se basa en la amplificación de un fragmento diana de un genoma, siendo este fragmento amplificado de forma exponencial.

NCBI: El Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information (NCBI) es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos. Es una importante fuente de información de biología molecular. Almacena y

constantemente se actualiza la información en lo referente a secuencias genómicas en Gen Bank, un índice de artículos científicos referentes a biomedicina, biotecnología, bioquímica, genética y genómica en PubMed. El NCBI es una herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN, ARN y proteínas, siendo BLAST una de las más usadas.

BLAST: Es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa compara una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

Rizósfera: Es una parte del suelo que está en contacto directo con las raíces donde tienen lugar las interacciones con los microorganismos.

EDTA: Acido etil diamino tetra acetico, es un quelante de iones metálicos que tiene aplicación generalizada en farmacia y medicina moderna (John 1999).

ARNasa: Es una enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis del ARN en componentes más pequeños. Pueden dividirse en endonucleasas y exonucleasas, y comprenden varias sub clases dentro de las clases de enzimas. Digiere el ARN de cadena simple reconociendo al ribonucleótido en un dúplex de ADN y rompiendo el enlace 5'-fosfodiéster de dicho ribonucleótido. (Chon 2009)

Deoxinucleosido trifosfato (dNTP): Los dNTPs que se usan en la replicación del ADN, está compuestos por tres fosfatos, unidos al grupo hidroxilo 5' de la desoxirribosa, y dependiendo de la base nitrogenada serán dATP, dTTP, dCTP, dGTP. La reacción fundamental es una transferencia de un grupo fosfato en la que el grupo 3'-OH actúa como nucleótido en el extremo 3' de la cadena

que está en crecimiento. El ataque nucleótido se produce sobre el fosfato α del desoxirribonucleósido 5' tri fosfato que entra, liberándose pirofosfato inorgánico y alargándose el ADN. A diferencia de la mayoría de procesos biológicos que ocurren en la célula en los que sólo se separa un grupo fosfato (Pi), durante la replicación se separan los dos últimos grupos fosfato, en forma de grupo pirofosfato (PPi). A pesar de que la ADN polimerasa sólo tiene un sitio activo para emparejar los cuatro dNTPs diferentes, la unión correcta de los pares de bases A: T, C: G es posible basándose en la geometría de éstos: si la unión es incorrecta se produce un desplazamiento del fosfato α haciendo más difícil su unión al extremo 3'-OH, lo que da lugar a que la ADN polimerasa añada preferentemente las bases correctas.

Taq polimerasa: Es un tipo de ADN polimerasa termoestable, nombrada de esta forma debido a que es producida por la bacteria *Thermus aquaticus*, fue aislada en el año 1968 por Thomas D. Brock (Chien 1976). Es utilizada en las técnicas de PCR, un método que se utiliza para amplificar secuencias cortas de ADN. *T. aquaticus* es una bacteria que vive en manantiales calientes y fuentes hidrotermales, y la polimerasa Taq que de ella se extrae ha sido caracterizada (Chien 1976). Es una enzima extrema, capaz de soportar las condiciones de alta temperatura requeridas durante el proceso de PCR sin desnaturalizarse (Saiki 1988). Por esta razón ha reemplazado a la ADN polimerasa proveniente de *E. coli* que era la que originalmente se utilizaba en esta técnica, pero que requería ser reemplazada luego de cada ciclo de calentamiento aumentando las probabilidades de contaminación y prolongando los tiempos (Saiki 1988). La temperatura óptima de funcionamiento de la Taq es de 75-80°C, con una semivida mayor a las dos horas a 92,5°C, 40 minutos a 95°C y 9 minutos a 97,5°C. Esta enzima puede replicar una cadena de ADN de 1000 pares de bases en menos de 10 segundos funcionando a 72°C de temperatura.

Endófitos: Se ha usado para referirse a distintos organismos que viven dentro de una planta sin que importara la relación que guardan con ella. Puesto que el término daba pie a confusiones fue necesario definirlo mejor y actualmente se utiliza para referirse a los organismos que en algún periodo de su ciclo de vida habitan dentro de las plantas colonizando sus tejidos sin causar perjuicio aparente (Arnold 2005).

Alícuota: Es una parte que se toma de un volumen (alícuota líquida) o de una masa (alícuota sólida) iniciales, para ser usada en una prueba de laboratorio, cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original.

Buffer PBS: El tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de phosphate buffered saline) es una solución tampón o buffer empleada en la investigación biológica, bioquímica y de inmunología diagnóstica. Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Se trata de una solución isotónica, es decir, la concentración de soluto es igual dentro y fuera de la célula; no es tóxica para las células de los mamíferos, y su pH es de 7.4.

16S ADN ribosómico: El ADN ribosómico (ADNr) es una secuencia de ADN contenida en los cromosomas del nucléolo que codifica ARN ribosómico. Estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación y contienen segmentos espaciadores transcribibles y no transcribibles. Las unidades de transcripción del ARN ribosómico se agrupan en tándem. Estas regiones de ADNr se denominan también regiones de organización del nucléolo. En el genoma humano existen cinco cromosomas con ADN ribosómico: los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. (Hillis 1991).

TRIS: Tris es el nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como tris (hidroximetil) aminometano, de fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Se utiliza ampliamente en bioquímica y biología molecular, en particular para preparar disoluciones tampón (por ejemplo, tampones Tris-HCl, Tris-Gly, TAE y TBE). Es una amina primaria, con la reactividad típica, por ejemplo la condensación con aldehídos y el establecimiento de un equilibrio ácido-base (responsable de su capacidad tamponante) (Gomori 1955).

Bromuro de etidio: El bromuro de etidio (BrEt) es un agente intercalante usado comúnmente como aclarador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en gel de agarosa. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN.

SDS: El dodecil sulfato sódico (SDS o NaDS) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$), también conocido como laurilsulfato sódico (SLS), es un compuesto tensio activo aniónico, la molécula posee una cola de 12 átomos de carbono, adosada a un grupo sulfato, dotando a la molécula de las propiedades anfífilas requeridas para todo detergente.

β -mercaptoetanol: Es un híbrido entre el etilenglicol, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, y el 1,2-etanoditiol, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$. El ME o β ME, como comúnmente se abrevia, se emplea profusamente en el laboratorio para reducir los puentes disulfuro y puede actuar como antioxidante biológico, reciclando radicales hidroxilo (entre otros) Se emplea ampliamente debido a que el grupo hidroxilo le confiere buena solubilidad en agua, a la vez que disminuye la volatilidad.

CTAB: El Bromuro de hexadeciltrimetilamonio o Bromuro de cetiltrimetilamonio ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$) es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos grupos alquilo es de gran longitud, con actividad detergente. Se le conoce también por las

siglas CTAB, del inglés Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide. Es un surfactante catiónico. Sus usos incluyen la utilización como solución tamponante para la extracción de ADN. Es uno de los compuestos del antiséptico tópico cetrimide, siendo este un agente antiséptico efectivo contra bacterias y hongos.

Proteínasa K: En la biología molecular a la proteínasa K corresponde a un amplio espectro de serina proteasa. La proteínasa K es capaz de digerir el pelo (queratina), de ahí el nombre "proteínasa K". El sitio de escisión predominante es el enlace peptídico adyacente al grupo carboxilo de alifáticos y aromáticos aminoácidos con grupos alfa amino bloqueados. Es comúnmente usado por su amplia especificidad (Moriyama 1975).

Acetato de sodio: También llamado etanoato de sodio, es la sal de sodio del ácido acético. Es un producto químico económico producido en cantidades industriales para una amplia gama de usos.

Isopropanol: Alcohol isopropílico (IUPAC nombre de 2-propanol), también llamado isopropanol o carbinol de dimetilo, es un compuesto con la fórmula química C_3H_8O o C_3H_7OH o $CH_3CHOHCH_3$ (a veces representado como $iPrOH$). Es un incoloro, inflamable compuesto químico con un fuerte olor. Como propilo grupo vinculado a un hidroxilo grupo, es el ejemplo más simple de un alcohol secundario. Cuenta con una amplia variedad de usos industriales y domésticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Colección de muestras.

Las muestras fueron colectadas de los sectores de Uña de gato, Cabuyal y San Jacinto ubicados en la región Tumbes. Se realizó la selección al azar, diferenciando las plantas sanas de las enfermas, luego se procedió a la toma de muestras de hojas, frutos, flores, troncos y raíces. Para ello se utilizó material estéril; posteriormente se colocaron en bolsas estériles y se transportaron al laboratorio del Centro de Biotecnología Molecular de la empresa de Investigación Inca'Biotec SAC.

Los tejidos fueron cortados en pequeños pedazos y colocados en placas estériles. Para la obtención de microorganismos se procedió a colocar una pequeña porción de la muestra en un tubo falcon de 15 mL conteniendo medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB), o directamente en placas con medios PDA; en el caso de los endófitos previamente se realizó la desinfección de la superficie del tejido con hipoclorito de sodio al 2%, alcohol al 70% y agua destilada; se seccionó antes de adicionarlo al tubo falcon. Parte de las muestras rizósfericas fueron conservadas a 4°C, para estudios metagenómicos. Los co-cultivos fueron incubados por 24 hrs a 28°C. Transcurrido este tiempo, se realizaron diluciones seriadas del tubo madre (1/10), y se tomó una alícuota de 20µl (de cada dilución) y se esparció por barrido en placas Petri conteniendo agar TSA (Tryptic Soy Agar), Agar Cetrimide (Agar cetrimide merck) y PDA (Potato Dextrose Agar). Las placas sembradas fueron incubadas por 24hr a 28°C.

3.2. Aislamientos y purificación de bacterias y hongos.

De las placas incubadas, se seleccionaron diferentes colonias bacterianas de acuerdo a su morfología, color y tamaño. Luego se procedió a purificar mediante la técnica de agotamiento en placas conteniendo medios TSA y Cetrimide. Posteriormente se realizó una tinción Gram para confirmar la existencia de un solo tipo bacteriano en las colonias aisladas. Una vez purificada, se realizaron replicas para la conservación de las cepas en medio de cultivo líquido (Luria Bertani) con glicerol al 15% a -20°C.

Para el caso de los hongos, se cortó una porción del micelio (fragmentos de 0,5 mm) y se colocaron en nuevas placas conteniendo PDA (Potato Dextrose Agar), las cuales fueron incubadas a 27°C por 3 a 4 días. Se realizaron réplicas, las cuales se conservaron en tubos de 15 mL conteniendo 10 mL de agar PDA en forma inclinada.

3.3. Co-cultivos bacterianos de hojas, frutos (sanos y enfermos) y suelo rizosférico de plantas sanas de *T. cacao*.

En el caso de hojas, se realizaron cortes para obtener pequeños pedazos, de 2 hojas sanas y la otra de 2 hojas enfermas; Para fruto se realizó en las etapas inmaduras y en distintas fases de infección causadas por hongos fitopatógenos; utilizando la metodología anteriormente mencionada. La muestra de suelo rizosférico se obtuvo mediante la remoción de suelo adherido a raíces mediante raspados con mondadientes estériles, por consiguiente se homogenizó, y se pesó un aproximado de 2g; posteriormente se colocaron estas muestras en tubos falcon de 15mL conteniendo 10mL de medio líquido LB (Luria Bertani). Posteriormente estas

muestras se dejaron incubar por 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizó la extracción de ADN.

3.4. Extracción de ADN de las bacterias purificadas

Se realizó la extracción de ADN a partir de 1mL de cultivo bacteriano puro, este fue centrifugado a 13000 RPM por 5 min (centrifuga marca Heraeus modelo Biofuge pico). Se descartó el sobrenadante y se adicionó 500µl de búfer PBS 1X, luego se centrifugó a 10000 RPM por 2 min; se descartó el sobrenadante y se incorporó 200µl de TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM) pH 8.0, luego se llevó a ebullición por 10 min e inmediatamente se colocó sobre hielo por 5 min. Se centrifugó el lisado a 10000 RPM durante 1 min y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo (el cual contenía el ADN). Posteriormente se hizo una dilución en agua ultra pura (1/10), finalmente a la nueva dilución se agregó 2µl de ARNasa y se incubó a 37°C por 30 min.

3.5. Reacción en cadena de la polimerasa para bacterias (PCR)

La identificación molecular de las bacterias fue realizada mediante una amplificación por PCR, utilizando el ADN extraído (**figura 3**). Las reacciones fueron configuradas en un volumen final de 25 µl, conteniendo: 2,5µl de Buffer 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, pH 8.3), 2,5µl MgCl₂ a 25mM, 0,5 µl dNTPs a 10mM, 16,2 µl AUP (Agua ultra pura), 0,6µl Primer Forward 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) , y 0,6 primer Reverse 1492R (GGT TAC CTT GTT ACG ACTT) del Gen 16S rRNA (Galkiewicz., 2008), 0.1 µl Taq DNA polymerase (Invitrogen*) y 2 µl de ADN bacteriano. Seguido por una programación para 35 ciclos en el Termociclador (BIOMETRA UNO-Thermoblock) con temperatura de pre-desnaturalización de 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a

95°C por 30 seg, Hibridación 58°C por 45 seg), Polimerización 72°C por 1min 30 seg., además de un paso final de Extensión de 72°C por 4 min. Se confirmó los productos de PCR mediante electroforesis al 1.5% Tris-acetato-EDTA en gel de agarosa y las bandas fueron visualizadas por tinción con bromuro de Etidio, en un transiluminador UV. Los productos de PCR amplificados fueron enviados a un proveedor de servicios MACRO GEN, para su secuenciación.

3.6. Extracción de ADN Fúngico

Se realizó un raspado del micelio, utilizando una hoja de bisturí y se colocó en un tubo de 1,5mL. La extracción del ADN fúngico fue realizada con el protocolo descrito por Kim *et al.* (1992), y modificado por Lee *et al.* (2000), el cual consistió en hacer lavados del raspado del micelio, centrifugándolo a 13000 rpm por 30 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante. Se maceró el micelio directamente en el tubo de 1,5ml al que se le añadió 500µl de Buffer CTAB (200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 25 mM EDTA, pH 8.0; 250 mM de NaCl; 1% SDS; 1% β-mercaptoetanol, 2% CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide (CTAB))). Se agregó 1.5µl de proteinasa K a cada muestra (0.1 mg/mL) y se incubó por 65°C por 1hr en baño maría. Se añadió 700µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1) y se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se trató nuevamente con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1) y seguidamente se centrifugó a 13000 rpm por 15 min. El sobrenadante se trató con 1 µl de RNAasa (50 µg/mL) y se incubó por 1 hora a 37°C en baño maría. Se añadió 1 volumen de Cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) y luego se centrifugó por 15 min a 13000 rpm. El sobrenadante nuevamente fue tratado con 1 volumen de cloroformo y alcohol isoamil. Se realizó la precipitación del ADN con 25µl de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 500µl de isopropanol helado, incubándose durante toda la noche a -20°C, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 15 min. Se lavó

el pellet con 400µl de etanol 75 % y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar la muestra de ADN a temperatura ambiente por 15 min y se re-suspendió en 50µl de TE (Tris-HCl 10 mM y 1mM EDTA, pH 8.0), se trató con 1µl de ARNasa y se incubó a 37°C por 30 min. Se conservó a -20°C.

3.7. Reacción en cadena de la polimerasa para hongos (PCR).

El mix de reacción de PCR incluyó los siguientes volúmenes: 2.5µl del Buffer Taq 10X (Thermo Scientific); 0.2µl de Taq DNA polymerase Recombinante 5U/µl (Thermo Scientific); 2.5µl de MgCl₂ a 25mM (Thermo Scientific); 0.2µl de dNTP's a 10mM (Promega); 0.6µl del primer a 15 pmol/µl de ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y 0.6µl de a 15 pmol/µl de ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de la región ITS (White et al., 1990); 2 µl de ADN y llevados hasta un volumen final de 25µl con agua ultra pura. Los ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador (BIOMETRA UNO-Thermoblock) bajo las siguientes condiciones: un paso inicial de pre-desnaturalización a 94°C por 6 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 95°C por 30 seg, hibridación de 54°C por 45 seg, polimerización 72°C por 45 seg. Adicionalmente se realizó un paso de extensión final de 72°C por 5 min, con una conservación a 4°C por 24hr.

3.8. Extracción de ADN metagenómico de muestra de suelo rizosférico.

Previo a este proceso se esterilizó todos los materiales, luego se pesó 2g de la muestra de suelo rizosférico; la cual fue incubada en 10ml de buffer PBS 1X (buffer sodio-fosfato) de pH7, conteniendo 0.1% de tween 80 durante toda la noche, dejándose en un equipo Shaker para mantener una agitación constante. Luego se transfirió la

suspensión a un tubo falcón de 15 ml, el cual fue centrifugado a 5500 rpm por 10 min, el sobrenadante fue descartado. Al pellet se le agregó 0.1g de perlas de vidrio y fue disgregado en vortex por 1 min. Adicionalmente se lavó el pellet dos veces, agregándose en este paso 3mL de buffer TE 50/50 (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA) al pellet, se homogenizó fuertemente por 1 min y se centrifugó a 5500 rpm por 5 min. El sobrenadante se descartó y al pellet se le adicionó 2mL de TE 50 /50; 2µl de lisozima (50 mg/ml); 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 2µl de ARNasa, homogenizándose e incubándose a 37°C por 15 min. Posteriormente, se adicionó 200µl de SDS 10% y se incubó por 1 hr a 65°C. Luego, se realizó un choque térmico para la lisis; mediante el congelamiento de la muestra por 5 min en nitrógeno líquido y luego se transfirió a agua hirviendo (100°C) por 15 min, repitiéndose tres veces este pasó. Una vez terminado el choque térmico, a la muestra se le adicionó un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) y se centrifugó por 5500 rpm por 20 min; recuperándose el sobrenadantes en un tubo de 1.5mL, adicionándosele 500µl de PEG 8000 e incubándose a temperatura ambiente por 1 hr. Luego se centrifugó a 9000 rpm por 20 min y se descartó el sobrenadante. Se disolvió al pellet obtenido en el paso anterior en 500µl de TE 10/1 (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA), luego se añadió 50 µl de acetato de potasio 5M y se incubó a 4°C por 15 min, luego se centrifugó a 13000 rpm por 15 min. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo de 1.5 mL, al cual se le añadió 1 volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) y fue centrifugado a 5000 rpm por 10 min. La fase acuosa fue recuperada en un nuevo tubo de 1.5mL, posteriormente se añadió 0.7 volumen de isopropanol helado y fue incubado por toda la noche a -20°C. Posteriormente, el ADN fue colectado por centrifugación a 10 000 rpm por 10 min, lavándose el pellet con etanol helado al 95% y centrifugado a 10 000 rpm por 5 minutos; adicionalmente, fue lavado con etanol al 70% y centrifugado a 10 000 rpm por 5 min. Luego se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min, y fue re-suspendido

en 30µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM y 1mM EDTA, pH 8.0) y almacenado a -20°C.

3.9. Extracción de ADN metagenómico de muestra de co-cultivo de hojas, frutos (sanos y enfermos) y suelo rizosférico de plantas sanas.

Se tomó 1.5mL de los co-cultivos; posteriormente se siguió el protocolo del kit de extracción "Power Soil" (MoBio Laboratorios Inc., Carlsbad, CA, USA), extrayéndose el ADN a partir de co-cultivos de muestras de hojas, frutos; tanto sanos como enfermos y suelo rizosférico. Se evaluó la calidad del ADN y solamente los ADNs puros ($OD_{260}/OD_{280} = 2$) fueron enviados a secuenciar por el método Ion Torrent PGM. Los datos fueron analizados en el servidor MG RAST (MetaGenome Rapid Annotation using Subsystem Technology), versión 3.2 (Argonne National Laboratory: <http://metagenomics.anl.gov/metagenomics.cgi?page=Analysis>), y la interpretación de los datos se evaluó mediante los parámetros: Fuente de anotación RDP, el máximo valor e (Max. e-Value Cutoff) de -5; el porcentaje mínimo de identidad (Max. e-Value Cutoff) de 97%, y la longitud de alineamiento (Min. Alignment Length Cutoff) de 50. (Glass *et al.* 2010).

3.10. Verificación del ADN metagenómico mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El mix de PCR para la Metagenómica se realizó con los volúmenes de 2.5µl de Buffer 10X, 1µl de MgCl₂ a 25 mM, 0.1 unidad de taq polimerasa recombinante (Invitrogen*), 0.5µl de dNTPs a 10mM, 0.6µl del primer 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) a 15pmol y 0.6µl del primer 1492R (GGT TAC CTT GTT ACG ACTT) a 15pmol para la amplificación del Gen 16S ADNr (Galkiewicz 2008), 17.6µl de agua libre de nucleasas y 2µl de ADN, terminando en un volumen

final de 25µl. La Programación para el termociclador (BIOMETRA UNO-Thermoblock) fue con una temperatura de predesnaturalización de 95°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, la de Hibridación a 58°C por 45 seg, una polimerización de 72°C por 1min 30 seg además de un paso final de Extensión de 72°C por 4 min y una conservación de 4°C por 10 hr. Se confirmó los productos de PCR mediante electroforesis al 1.5% Tris-acetato-EDTA en gel de agarosa y las bandas fueron visualizadas por tinción con bromuro de Etidio, en un transiluminador UV. Los productos de PCR amplificados fueron enviados a un proveedor de servicios MACRO GEN, para su secuenciación.

3.11. Establecimiento de un cepario

El establecimiento del cepario, se realizó a partir de las cepas bacterianas puras, previamente caracterizadas molecularmente desde frutos sanos de *T. cacao* y conservadas en glicerol al 15% a -20°C. Se reactivaron los cultivos bacterianos de la colección de cepas conservadas y fueron mantenidos a una temperatura 28°C en medio LB (Luria-Bertani) y sembradas en TSA (Tryptic Soy Agar).

3.12. Ensayos de antagonismo bacteria–hongo

El efecto de los aislados bacterianos del fruto de cacao (*T. cacao*), para inhibir el incremento de *C. fructicola* se llevó mediante condiciones *in vitro*. Previo a esto se hizo la reactivación del hongo fitopatógeno desde una cepa conservada en tubos con agar inclinado, colocándose una pequeña porción del micelio y se incrementó en el centro de las placas con agar PDA, sin antibiótico durante 3 días a 28°C. Posteriormente cuatro piezas de discos de papel filtro estériles (Whatman N°1 de 6mm) fueron colocadas en direcciones opuestas al hongo fitopatógeno, adicionalmente se les colocó por cada disco una suspensión bacteriana de 7µl de cada

cepa bacteriana reactivada con ayuda de una micro pipeta. El cultivo fue incubado a 29°C por 2 días. La actividad inhibitoria se determinó basándose en la zona de inhibición formada alrededor de las colonias bacterianas en medio PDA. La zona de inhibición estuvo determinada por la presencia o ausencia de halo.

4. RESULTADOS.

4.1. Identificación de bacterias aisladas de la filósfera de plantas sanas y enfermas de *T. cacao*.

Se logró aislar de la filósfera y luego identificar un total de 33 cepas bacterianas, pertenecientes a 20 especies diferentes, 7 géneros distintos. En plantas sanas se logró identificar 32 bacterias, entre las cuales 5 cepas aisladas desde hojas sanas, 4 desde troncos sanos (**Tabla 1**), 13 cepas desde flores (**Tabla 2**) y 11 cepas desde frutos, ya sea sanos (10 cepas) o enfermos (1 cepa de *Pantoea dispersa*) (**Tabla 3**).

Tabla 1. Aislados bacterianos de hoja y tronco de plantas de cacao (*T. cacao*) identificados mediante la secuenciación parcial del gen 16S del ADNr.

Aislado	Origen	Salud de la planta	Identificado	Similitud (%)	Nº de Accesoión Gen Bank
2	Hoja	Sana	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	99%	NR_104933.1
1	Hoja	Sana	<i>Serratia marcescens</i>	98%	NR_102509.1
2	Hoja	Sana	<i>Bacillus toyonensis</i>	98%	NR_121761.1
2	Tronco	Sana	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99%	NR_117624.1
2	Tronco	Sana	<i>Serratia marcescens</i>	99%	NR_102509.1

Tabla 2. Aislados bacterianos de la flor de plantas de cacao (*T. cacao*) identificados mediante la secuenciación del gen 16S del ADNr

Aislado	Origen	Salud de la planta	Identificado	Similitud (%)	Nº de Accesoión Gen Bank
2	Flor	Sana	<i>Pantoea wallisii</i>	100%	NR_118122.1
1	Flor	Sana	<i>Pantoea ananatis</i>	96%	NR_103927.1
1	Flor	Sana	<i>Enterobacter asburiae</i>	98%	NR_074722.1
1	Flor	Sana	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	98%	NR_126208.1
2	Flor	Sana	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	NR_117686.1
2	Flor	Sana	<i>Klebsiella variicola</i>	98%	NR_074729.1
3	Flor	Sana	<i>Pantoea dispersa</i>	99%	NR_116797.1
1	Flor	Sana	<i>Bacillus cereus</i>	99%	NR_074540.1

Tabla 3. Aislados bacterianos del fruto de plantas de cacao (*T. cacao*), identificados mediante la secuenciación parcial del gen 16S del ADNr.

Aislado	Origen/Etapa	Salud de la planta	Identificado	Similitud (%)	Nº de Accesoión Gen Bank
2	Fruto maduro	Sana	<i>Bacillus nealsonii</i>	99%	NR_044546.1
1	Fruto inmaduro	Sana	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	NR_074977.1
1	Fruto maduro	Sana	<i>Bacillus aerius</i>	99%	NR_118439.1
1	Fruto maduro	Sana	<i>Bacillus circulans</i>	97%	NR_118445.1
1	Fruto maduro	Sana	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	NR_117946.1
1	Fruto inmaduro	Sana	<i>Bacillus amyloliquefaciens sub. esp plantarum</i>	99%	NR_075005.1
1	Fruto inmaduro	Sana	<i>Serratia marcescens</i>	98%	NR_102509.1
1	Fruto inmaduro	Sana	<i>Serratia marcescens</i>	99%	NR_114043.1
1	Fruto inmaduro	Sana	<i>Serratia sp.</i>	99%	KJ944098.1
1	Fruto inmaduro	Enferma	<i>Pantoea dispersa</i>	99%	NR_116797.1

4.2. Identificación de bacterias aisladas de la rizósfera de plantas sanas de *T. cacao*.

Se logró aislar desde la rizósfera de plantas sanas e identificar un total de 32 cepas bacterianas, perteneciendo a 28 especies diferentes, 8 géneros distintos en plantas sanas de *T. cacao*. (Tabla 4).

Tabla 4. Aislados de la rizósfera de plantas de cacao (*T. cacao*), identificados mediante la secuenciación del gen 16S del ADN.

Aislado	Origen	Salud de la planta	Identificado	Similitud (%)	Nº de Accesoión Gen Bank
1	Rizósfera	Sana	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	99%	KF523303.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	98%	KP830088.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Lysinibacillus macroides</i>	99%	KU359260.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	KU297784.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Lysinibacillus sp.</i>	100%	KM388719.1
4	Rizósfera	Sana	<i>Aeromonas punctata</i>	100%	FJ940796.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	AF302796.3
1	Rizósfera	Sana	<i>Kluyvera georgiana</i>	99%	JQ917919.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Klebsiella oxytoca</i>	100%	KM096608.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Pseudomonas sp.</i>	96%	KF835756.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Klebsiella sp.</i>	100%	KJ933520.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Enterobacter cloacae</i>	100%	JF772071.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Bacillus boroniphilus</i>	99%	EU620409.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Pseudomonas sp</i>	93%	KT025904.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	99%	NR_116585.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Pantoea agglomerans</i>	99%	AM184266.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Enterobacter sp.</i>	99%	HQ189499.1

2	Rizósfera	Sana	<i>Pseudomonas parafulva</i>	99%	KP190118.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Klebsiella oxytoca</i>	96%	KF145191.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Pseudomonas indica</i>	98%	KC443112.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%	AY792969.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99%	NR_042336.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Bacillus cereus</i>	100%	NR_074540.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Bacillus sp.</i>	99%	KF956657.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Bacillus sp.</i>	99%	KJ781868.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	KJ496383.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Bacillus sp.</i>	99%	KF543101.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Pseudomonas entomophila</i>	99%	NR_102854.1

4.3. Análisis metagenómico de los co-cultivos bacterianos provenientes de hojas, frutos (sanos y enfermos) y suelo rizosférico de plantas sanas (*T. cacao*)

Metagenómica de co-cultivos bacterianos a partir de hojas sanas y enfermas con hongos de *T. cacao*

A nivel de los *Phyla*, los resultados de la secuenciación mostraron que las microbiotas bacterianas correspondieron respectivamente a los co-cultivos de hojas sanas y enfermas, estas en su mayoría están compuestas de microorganismos de los *Phylum* Firmicutes (58.07% y 79.50%), Proteobacteria (35,67% y 12,24%) y en menores porcentaje por el *Phylum* Bacteroidetes con 0.008% y 0.018% (**Tabla 5 y Figura 1**).

Tabla 5: Distribución del *Phylum* en los co-cultivos de las hojas sanas (HS) y enfermas (HE) de *T. cacao*

<i>Phylum</i>	HS (%)	HE (%)
Firmicutes	58.074	79.504
Proteobacteria	35.670	12.241
Actinobacteria	3.782	0.127
unclassified (derived from Bacteria)	2.466	8.109
Bacteroidetes	0.008	0.018

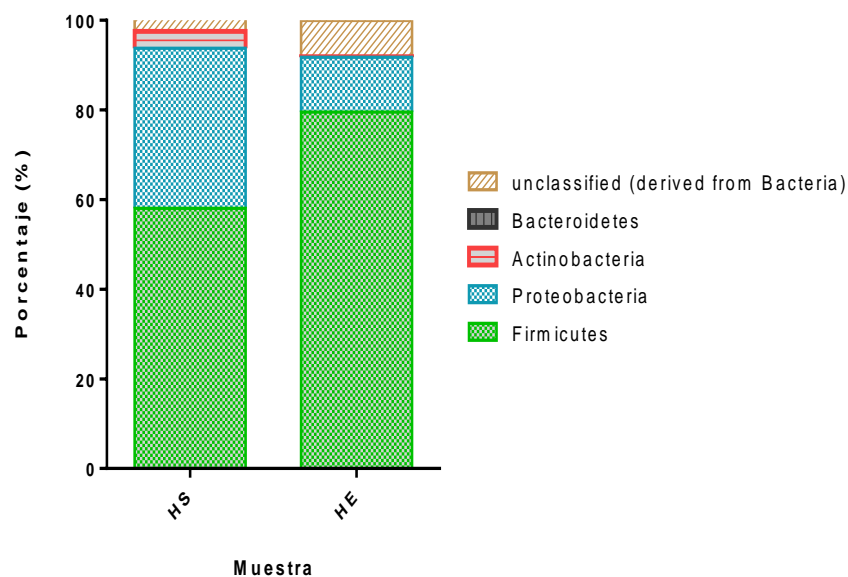


Figura 1: Distribución por *Phylum* de las bacterias presentes en los co-cultivos de hojas sanas (HS) y enfermas (HE) de *T. cacao*.

A nivel de géneros, se encontró un total de 37 géneros dentro del co-cultivo de hojas sanas y 32 géneros dentro de co-cultivos de hojas enfermas. Los mayores porcentajes fueron del género *Bacillus* con 56.49% y 74.81%, respectivamente en hojas sanas y enfermas. (Tabla 6 y Figura 2).

Los géneros *Acetobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella* y *Curtobacterium* estuvieron presentes en los co-cultivos, provenientes de hojas sanas, lo que indica que podrían ser géneros indicadores de plantas sanas.

A contrario, los géneros *Acinetobacter*, *Exiguobacterium*, *Geobacillus* y *Pseudomonas* estuvieron presentes en los co-cultivos provenientes de hojas enfermas, lo que indicó que podrían ser géneros indicadores de enfermedad en las plantas, en particular las bacterias del género *Pseudomonas*.

Tabla 6: Distribución de Género de las bacterias presentes en los co-cultivos de hojas sanas (HS) y enfermas (HE) de *T. cacao*

Género	HS (%)	HE (%)
<i>Bacillus</i>	56.494	74.811
<i>Acetobacter</i>	23.940	0.000
<i>Pantoea</i>	7.599	0.000
<i>Klebsiella</i>	2.683	0.000
<i>Curtobacterium</i>	2.679	0.000
<i>unclassified (derived from Bacteria)</i>	2.466	8.109
<i>Staphylococcus</i>	1.456	0.000
<i>Enterobacter</i>	1.125	0.000
<i>Microbacterium</i>	1.039	0.000
<i>Acinetobacter</i>	0.000	3.389
<i>Exiguobacterium</i>	0.000	2.310
<i>Geobacillus</i>	0.000	2.299
<i>Pseudomonas</i>	0.000	8.008
Otros <1%	0.519	1.074

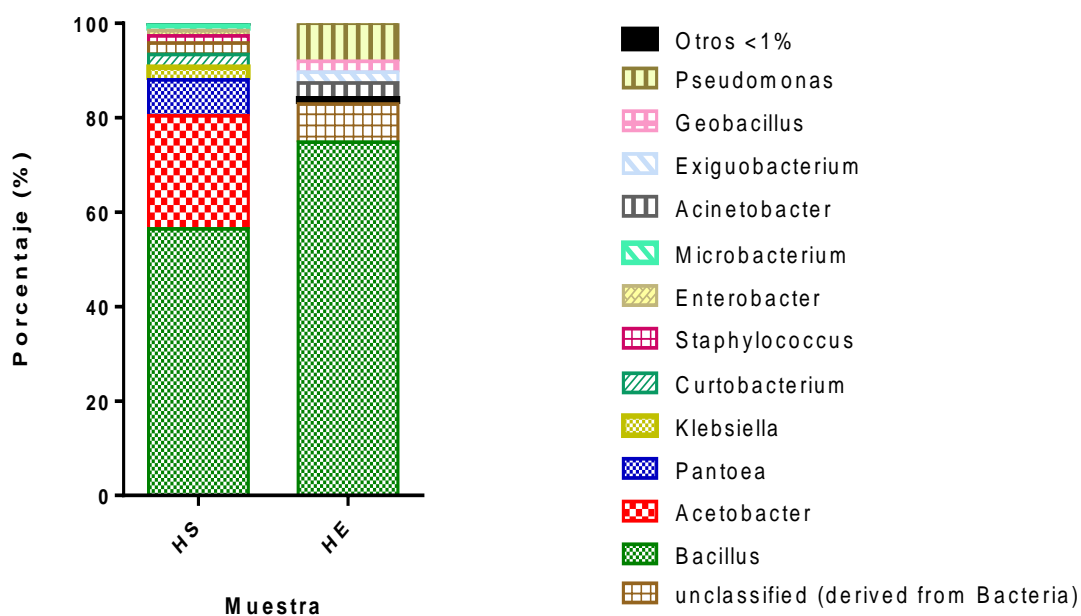


Figura 2: Distribución por Género de las bacterias presentes en los co-cultivos de hojas sanas (HS) y enfermas (HE) de *T. cacao*.

Metagenómica de co-cultivos bacterianos a partir de frutos sanos y enfermos con hongos (etapas temprana y tardía) de *T. cacao*

A nivel de los *Phyla*, los resultados mostraron que las microbiotas bacterianas de los co-cultivos de frutos sanos (FS), enfermos en epata inicial (FEI) y en epata tardía (FET) por infección fúngica; estuvieron constituidos en su mayoría por microorganismos de los *Phyla* Firmicutes y Proteobacteria.

En la etapa de infección causada por enfermedades fúngicas, los resultados correspondieron a una reducción del *Phylum* firmicutes (FS: 90.89%; FEI: 60.12%; FET 24,89%) y a un incremento del *Phylum* proteobacteria (FS: 8,41%; FEI: 24,33%; FET 71,54%) (**Tabla 7 y Figura 3**).

Tabla 7: Distribución por *Phylum* de las bacterias presentes en los co-cultivos de frutos sanos (FS) y frutos enfermos en etapa inicial (FEI) o etapa tardía (FET) de *T. cacao*.

<i>Phylum</i>	FS (%)	FEI (%)	FET (%)
Firmicutes	90.897	60.125	24.892
Proteobacteria	8.401	24.335	71.540
unclassified (derived from Bacteria)	0.679	15.537	3.527
Actinobacteria	0.020	0.003	0.038
Bacteroidetes	0.002	0.000	0.002
Verrucomicrobia	0.001	0.000	0.000

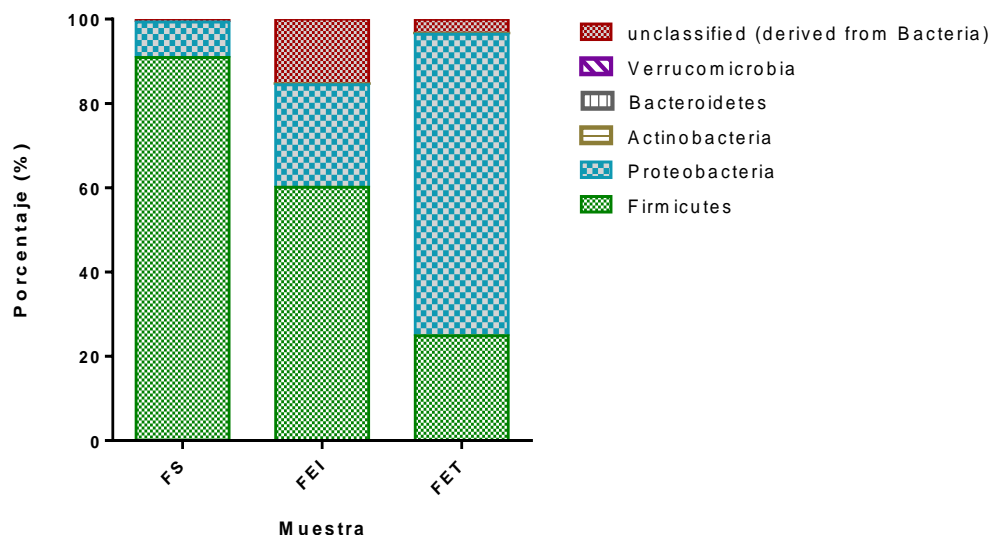


Figura 3: Distribución por *Phylum* de las bacterias presentes en los co-cultivos en frutos sanos (FS) y enfermos en etapa inicial (FEI) y etapa tardía (FET) de *T. cacao*

A nivel de los géneros, se encontró un total de 39 géneros dentro de los co-cultivos de frutos sanos (FS), 27 géneros dentro de co-cultivos de frutos enfermos en etapa inicial (FEI) y 28 géneros dentro de co-cultivos de frutos enfermos en etapa tardía (FET).

El género *Bacillus* parece ser un excelente indicador del co-cultivo de la microbiota de frutos sanos (FS 90.85%) mientras que su presencia es reducida en los co-cultivos de frutos enfermos en etapa inicial (FEI: 59,99%) y de co-cultivos de frutos enfermos en etapa tardía (FET: 10,64%) donde la mayoría son enterobacterias no identificadas (FET: 70,81%) y un porcentaje elevado de *Staphylococcus* (FET: 14,09%). (Tabla 8 y Figura 4)

Tabla 8: Distribución por géneros de bacterias presentes en los co-cultivos de frutos sanos (FS) y enfermos en etapa inicial (FEI) y etapa tardía (FET) de *T. cacao*.

Género	FS (%)	FEI (%)	FET (%)
<i>Bacillus</i>	90.857	59.994	10.641
unclassified (derived from Enterobacteriaceae)	6.109	0.000	70.818
<i>Pantoea</i>	2.039	23.083	0.000
<i>Staphylococcus</i>	0.000	0.000	14.092
unclassified (derived from Bacteria)	0.000	15.537	3.527
Otros <1%	0.995	1.386	0.921

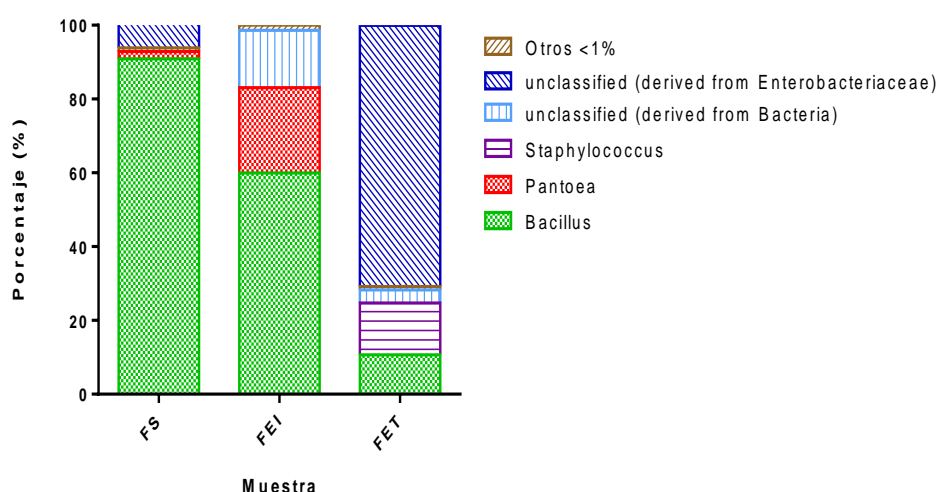


Figura 4: Distribución por género de las bacterias presentes en los co-cultivos de frutos sanos (FS) y enfermos en etapa inicial (FEI) y etapa tardía (FET) de *T. cacao*

Metagenómica de co-cultivo y de muestra directa de la microbiota bacteriana de la rizósfera de plantas sanas de *T. cacao*

Los resultados relacionados a la microbiota de la rizósfera de plantas sanas mostraron composiciones microbianas extremadamente diferentes, según la tecnología dependiente o independiente de cultivo *in vitro*.

El *Phylum* firmicutes, representan 85.83% en los co-cultivos de la microbiota de rizósfera (RcoCS), a vez este representan solamente el 5,83% en la microbiota rizosférica caracterizada directamente, lo que indica una alteración artificial de la composición bacteriana, resultando del co-cultivo *in vitro*.

En la microbiota nativa, están presentes las bacterias de cuatro *Phylum* que podrían ser del tipo no co-cultivables: Verrucomicrobia (RMbS: 8,87%), Bacteroidetes (RMbS: 8,38%), Gemmatimonadetes (RMbS: 5,14%), Actinobacteria (RMbS: 3,77%).

Por otra parte, 47,86% de las bacterias de la microbiota nativa de la rizósfera sana corresponden a bacterias de tipo no clasificables en términos de *Phylum*. (**Tabla 9 y Figura 5**).

Tabla 9: Distribución por *Phylum* de las bacterias presentes en un co-cultivo (RcoCS) y en muestra directa (RMbS) de rizósfera de plantas sanas de *T. cacao*.

<i>Phylum</i>	RcoCS (%)	RMbS (%)
unclassified (derived from Bacteria)	2.621	47.861
Proteobacteria	10.789	17.160
Verrucomicrobia	0.000	8.875
Bacteroidetes	0.000	8.385
Firmicutes	85.838	5.836
Gemmatimonadetes	0.000	5.147
Actinobacteria	0.000	3.778
Otros <1%	0.752	2.958

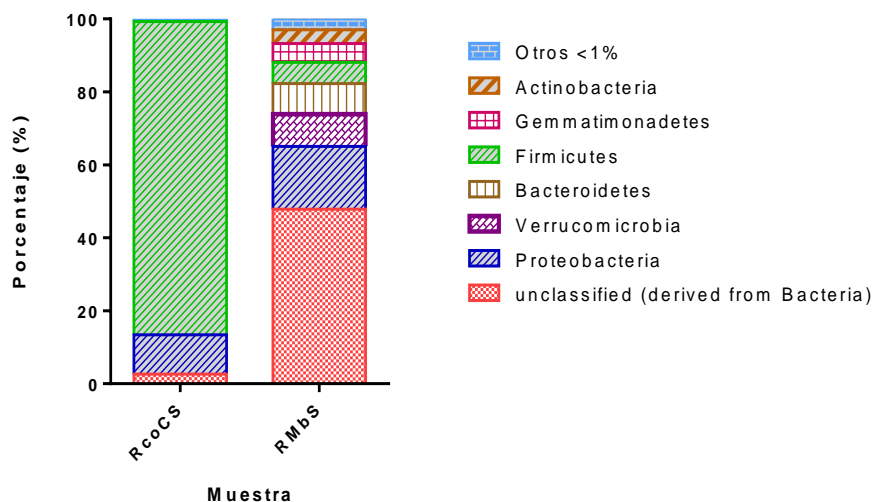


Figura 5: Distribución por *Phylum* de las bacterias presentes en el co-cultivo (RcoCS) y en muestra directa (RMbS) de rizósfera de plantas sanas de *T. cacao*.

A nivel de géneros, se encontró un total de 109 géneros dentro del co-cultivo de bacterias de rizósfera de planta sana y 404 géneros dentro la microbiota directamente caracterizada de rizósfera de planta sana de *T. cacao*. Estos resultados indican evidente conveniencia de la tecnología independiente de cultivo in vitro para caracterizar la microbiota.

El género *Bacillus* corresponde a las bacterias desarrolladas en el co-cultivo, debido a que representa solamente 1.88% en la microbiota nativa de la rizósfera y 62,54% del co-cultivo. Los géneros *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Lysinibacillus*, *Aeromonas* y *Paenibacillus*, están presentes en el co-cultivo mientras no fueron detectados en la microbiota nativa.

Al contrario, los géneros *Chthoniobacter*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Gemmatimonas*, *Pedosphaera*, *Rubrobacter* y *Terrimonas* están presentes en la microbiota nativa de la rizósfera, pero parecen del tipo no co-cultivables (Tabla 10 y Figura 6).

Tabla 10: Distribución por género de las bacterias presentes en el co-cultivo de la rizósfera (RcoCS) y en la muestra directa (RMbS) de rizósfera de plantas sanas de *T. cacao*.

Género	RcoCS (%)	RMbS (%)
<i>Bacillus</i>	62.540	1.880
unclassified (derived from Peptostreptococcaceae)	10.391	0.000
<i>Clostridium</i>	6.239	0.000
<i>Pseudomonas</i>	5.965	0.000
<i>Lysinibacillus</i>	4.701	0.000
<i>Aeromonas</i>	3.207	0.000
Otros <1%	3.187	15.742
unclassified (derived from Bacteria)	2.621	47.828
<i>Paenibacillus</i>	1.149	0.000
<i>Chthoniobacter</i>	0.000	1.993
<i>Cytophaga</i>	0.000	1.960
<i>Flexibacter</i>	0.000	2.362
<i>Gemmatimonas</i>	0.000	5.146
<i>Pedosphaera</i>	0.000	6.253
<i>Rubrobacter</i>	0.000	1.718
<i>Terrimonas</i>	0.000	2.939
unclassified (derived from Alphaproteobacteria)	0.000	2.660
unclassified (derived from Betaproteobacteria)	0.000	1.162
unclassified (derived from Deltaproteobacteria)	0.000	5.397
unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	0.000	2.961

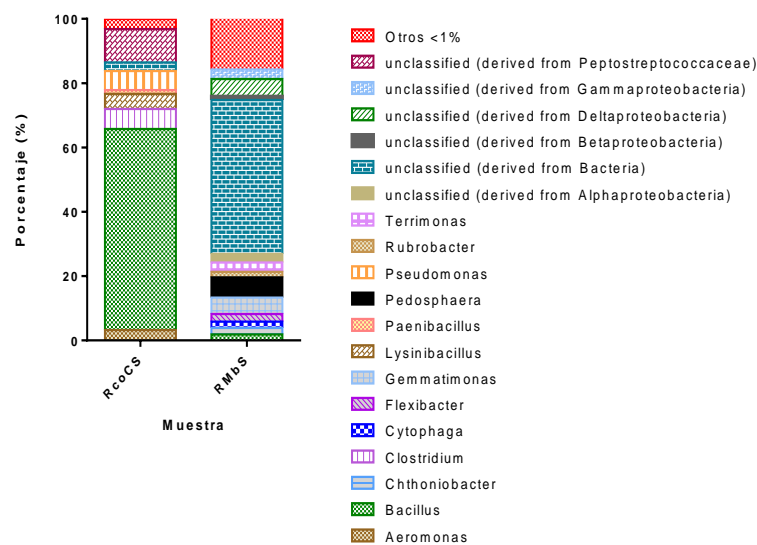


Figura 6: Distribución por género de las bacterias presentes en el co-cultivo de la rizósfera (RcoCS) y en muestra directa (RMbS) de rizósfera de plantas sanas de *T. cacao*

4.4. Aislamiento e identificación de hongos desde la rizósfera de plantas sanas de *T. cacao*.

A nivel de la rizósfera de plantas sanas, se logró aislar e identificar un total de 8 cepas fúngicas pertenecientes a 2 géneros (*Trichoderma* y *Cunninghamella*) y 3 especies.

Tabla 11. Aislados fúngicos de la rizósfera de plantas de cacao (*T. cacao*) identificados mediante la secuenciación de la región ITS.

Aislado	Origen	Salud de la planta	Identificado	Similitud (%)	Nº de Accesoión Gen Bank
1	Rizósfera	Sana	<i>Trichoderma virens</i>	100%	KJ739790.1
2	Rizósfera	Sana	<i>Trichoderma virens</i>	100%	KP898752.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Trichoderma virens</i>	99%	KC847193.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Trichoderma virens</i>	99%	KJ739790.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Trichoderma virens</i>	99%	KP263694.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Trichoderma harzianum</i>	100%	JX139600.1
1	Rizósfera	Sana	<i>Cunninghamella echinulata</i>	99%	KM246745.1

4.5. Aislamiento e identificación de hongos desde frutos de plantas enfermas de *T. cacao*.

A nivel de frutos enfermos, maduros o inmaduros, se logró aislar e identificar un total de 8 cepas fúngicas, pertenecientes a 7 géneros y 7 especies, en particular *Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum frutícola* y *Lasiodiplodia sp.* en frutos inmaduros.

Tabla 12. Aislados del fruto de plantas de cacao (*T. cacao*) identificados mediante la secuenciación de la región ITS.

Aislado	Origen/Etapa	Salud de la planta	Identificado	Similitud (%)	Nº de Accesoión Gen Bank
1	Fruto inmaduro	Enferma	<i>Colletotrichum fruticola</i>	100%	JN715843.1
1	Fruto maduro	Enferma	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99%	AF001025.2
1	Fruto maduro	Enferma	<i>Macrophomina phaseolina</i>	99%	KJ629093.1
1	Fruto maduro	Enferma	<i>Phomopsis bougainvilleicola</i>	100%	JX847139.1
1	Fruto inmaduro	Enferma	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	100%	KJ756381.1
1	Fruto maduro	Enferma	<i>Neurospora pannonica</i>	99%	KF881757.1
1	Fruto maduro	Enferma	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99%	JN541222.1
2	Fruto inmaduro	Enferma	<i>Moniliophthora roreri</i>	100%	AY916750.1

4.6. Antagonismo bacteria-hongos en condiciones *in vitro*.

Ensayos de antagonismo *in vitro* han sido realizados para evaluar cepas de bacterias (*Bacillus spp.* y *Serratia spp.*) aisladas de frutos sanos como posible bio-controladores de hongos patógenos del fruto de cacao.

Se consideró como modelo el hongo *Colletotrichum fruticola* aislado de frutos enfermos inmaduros y subsecuentemente posible agente precursor y facilitador de las otras infecciones fúngicas, en particular por *Moniliophthora*.

Los ensayos se realizaron por triplicados, con dos concentraciones bacterianas; las cuales han mostrado que 3 cepas de *Bacillus* respectivamente *Bacillus aerius*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus*

amyloliquefaciens sub. esp *plantarum*, presentan un efecto antagonista fuerte contra el hongo patógeno *C. fructicola*.

Tabla 13. Resultados de ensayos *in vitro* de antagonismo bacteria-hongo (*Colletotrichum fructicola*) sobre medio PDA, con dos concentraciones bacterianas.

Ensayo de antagonismo	<i>Colletotrichum fructicola</i>					
	OD = 0.5			OD = 0.8		
	1	2	3	1	2	3
Bacterias aisladas de fruto sano						
<i>Bacillus nealsonii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus nealsonii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus aerius</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus circulans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> sub. esp <i>plantarum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Control 1	-	-	-	-	-	-

5. DISCUSIÓN.

El presente trabajo, enfocado a la caracterización de la microbiota del cacao *Theobroma cacao*, ha sido realizado considerando, varias partes de plantas sanas y enfermas con síntomas de infecciones fúngicas, por otra parte tecnologías dependientes e independientes de cultivo bacterianos y fúngicos.

El objetivo principal del trabajo correspondió a la identificación de microorganismos bacterianos y fúngicos específicamente asociados a las plantas sanas y enfermas, para luego disponer de las cepas nativas benéficas, y entonces utilizarlas como bio fertilizantes y probióticos, en particular como bio controladores de los hongos patógenos del cultivo orgánico de cacao donde son prohibidos los productos fitosanitarios.

La caracterización molecular de las microbiotas del cacao ha sido inicialmente realizada en base de tecnología dependiente del cultivo de bacterias y hongos, previamente aislados y disponibles como cepas puras. La identificación molecular de las cepas aisladas ha sido basada en la secuenciación de los amplicones respectivos, correspondientes al ADNr.

A partir de muestras de plantas sanas, ha sido posible aislar y caracterizar molecularmente varios géneros bacterianos constitutivos de la microbiota de las hojas (*Leclercia*, *Serratia*, *Bacillus*), del tronco (*Acinetobacter*, *Serratia*), de la flor (*Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*), del fruto (*Bacillus*, *Serratia*) y de la rizósfera (*Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pantoea*).

Entre los géneros más importantes se encuentra *Enterobacter*, el cual es conocido por ser promotor de crecimiento de las plantas, así lo reporta Khalifa *et al.* (2016), mientras que los géneros *Serratia* y

Bacillus son conocidos como agentes bio-controladores de patógenos en los distintos cultivos, así como lo reportan Wang *et al.* 2013; Gutiérrez and Román (2012), subsecuentemente *Bacillus* es reportado, particularmente en cacao como lo reportó Melnick *et al.* (2008).

Los resultados referentes a la diversidad de géneros bacterianos aislados de la rizósfera, concuerdan con la publicación de Gupta *et al.* (2014), referente al análisis de bacterias aisladas desde cacao, coco y nuez de areca, con capacidad promotora de crecimiento. Los géneros *Enterobacter* y *Bacillus*, son promotores de crecimiento y agentes bio-controladores, según Szilagyi-Zecchin *et al.* (2014). Sólo algunos géneros de *Pseudomonas* son conocido como controlador de hongos patógenos así lo reportaron Pastor *et al.* (2012).

Un segundo componente del trabajo ha sido enfocado a la identificación molecular de bacterias presentes en co-cultivos establecidos a partir de hojas y frutos, ya sea sanos o enfermos con síntomas de infecciones fúngicas. La identificación molecular de las cepas presentes en los co-cultivos, y disponibles como consorcios, ha sido basada en la secuenciación masiva de las mezclas de amplicones respectivos correspondientes al ADNr. Esta tecnología de caracterización de microbiota es conocida como metagenómica dirigida al ADNr, utilizando la tecnología NGS (Next generation Sequencing) que permite secuenciar millones de amplicones y subsecuentemente establecer cualitativamente y cuantitativamente la composición bacteriana.

En los co-cultivos provenientes de hojas sanas o enfermas con infecciones fúngicas, los resultados han mostrado la prevalencia importante del género *Bacillus*, constituyendo respectivamente 55% y 75% de la población microbiana, lo cual indica que este género bacteriano puede ser predominante en la microbiota de las hojas, o puede estar más adaptado al medio y condiciones de co-cultivo.

Los géneros *Acetobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella* y *Curtobacterium* estuvieron presentes en los co-cultivos provenientes de hojas sanas, lo que indica que podrían ser géneros indicadores de plantas sanas. Las mezclas bacterianas, preparadas a partir de cepas puras correspondientes a estos géneros, podrían ser evaluadas como consorcios probióticos, en particular en los viveros de cacao para constituir la microbiota benéfica de la filósfera antes la siembra de los plantones en los campos de cultivo.

Al contrario, los géneros *Acinetobacter*, *Exiguobacterium*, *Geobacillus* y *Pseudomonas* estuvieron presentes en los co-cultivos provenientes de hojas enfermas; lo que implica que podrían ser géneros indicadores plantas enfermas, en particular el género *Pseudomonas*.

En los co-cultivos provenientes ya sea de frutos sanos o de frutos en la etapa inicial y en etapa tardía, se encontró más diversidad microbiana en los frutos sanos que en frutos enfermos, respectivamente 39 y 27-28 géneros.

El género *Bacillus* parece ser un excelente indicador del co-cultivo de la microbiota de frutos sanos (90,85%) mientras que su presencia es reducida en los co-cultivos de frutos enfermos en etapa inicial (59,99%) y de co-cultivos de frutos enfermos en etapa tardía (10,64%) donde la mayoría son enterobacterias no identificadas (70,81%) y un porcentaje elevado de *Staphylococcus* (14,09%).

Las mezclas bacterianas, preparadas a partir de cepas nativas de *Bacillus* aisladas de frutos sanos, podrían entonces ser evaluadas como consorcios probióticos, en particular en los campos de cacao para constituir la microbiota benéfica de la frutósfera y así prevenir las infecciones fúngicas.

Ha sido indicado previamente que las bacterias, aisladas de la rizósfera de plantas de cacao sanas, han sido identificadas molecularmente como representantes de los 7 géneros bacterianos *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pantoea*.

La caracterización por metagenómica de co-cultivos bacterianos provenientes de la rizósfera de plantas de cacao sanos, ha conducido a la identificación de 109 géneros, lo que indica claramente la superioridad de esta tecnología dependiente de co-cultivo comparativamente a la tecnología clásica de aislamiento.

La caracterización por metagenómica de la microbiota directamente de la rizósfera de plantas sanas de T. cacao, ha conducido a la identificación de 404 géneros, lo que indica claramente la superioridad absoluta de esta tecnología independiente que de un cultivo *in vitro*. Numerosas publicaciones relacionadas a la caracterización de las microbiotas de plantas y animales indican esta superioridad con un factor de 10 a 100 veces más especies bacterianas identificadas por metagenómica con tecnología independiente de cultivo *in vitro*.

El género *Bacillus* corresponde a una de las bacterias favorecidas por el co-cultivo, debido a que representa solamente 1.88% en la microbiota nativa de la rizósfera y 62,54 % del co-cultivo.

Los géneros *Clostridium* *Pseudomonas* *Lysinibacillus*, *Aeromonas* y *Paenibacillus* están presentes en el co-cultivo, mientras no han sido detectados en la microbiota nativa.

A contrario, los géneros *Chthoniobacter* *Cytophaga* *Flexibacter* *Gemmatimonas* *Pedosphaera* *Rubrobacter* y *Terrimonas* están presentes en la microbiota nativa de la rizósfera pero no aparecen en los no co-cultivables *in vitro*.

Los resultados, en relación a la diversidad fúngica encontrada en la rizósfera de plantas sanas, concuerdan con la identificación por Torres de la Cruz *et al.* (2015) de *Trichoderma harzianum* y *T. virens* en un cultivo de cacao, siendo estas especies reportadas como agentes de bio control de hongos patógenos según Evans, Holmes and Thomas (2003).

De las 8 especies de hongos patógenos encontrados en frutos de cacao, tres han sido aisladas de frutos inmaduros, mediante esto se indicó su carácter pionero en la enfermedad; se trata de *Moniliophthora roreri* el cual es específico de frutos de cacao así como lo reporta Phillips-Mora *et al.* (2007) mientras *Colletotrichum fructicola* y *Lasiodiplodia* sp. son conocidos como patógenos de otros cultivos, como banano como lo menciona Salazar *et al.* (2012) y mango, según lo estudiado por Sandoval-Sánchez *et al.* (2012).

Los ensayos de antagonismo *in vitro* mostraron la eficiencia de las cepas bacterianas *Bacillus amiloliquefaciens* y *B. aerius*, contra el hongo patógeno *Colletotrichum fructicola*, concordando con el potencial antagonista de *B. amiloliquefaciens* contra el hongo patógeno *Botryosphaeria dothidea*, como lo estudiaron Chen *et al.* (2016) o contra el hongo *Acidovorax avenae* como lo reporta Jiang *et al.* (2015).

6. CONCLUSIONES

- La superioridad de las tecnologías independientes (Metagenómica) ha sido establecida en la identificación, conduciendo números más grandes de cepas identificadas. Sin embargo las tecnologías dependientes de cultivo, presentan la ventaja de permitir el establecimiento de cepario de bacterias y hongos.
- Un cepario bacteriano fue establecido con bacterias nativas, provenientes de distintas partes de plantas sanas, e identificadas como *Serratia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, las cuales son agentes bio-controladores y bio-estimulantes para el cultivo de T. cacao y otros cultivos.
- Adicionalmente se identificó a *Pantoea* aislada de una planta enferma como indicador de esta y posible antecesor de agentes fúngicos patógenos.
- Un cepario ha sido establecido con hongo benéficos provenientes de la rizósfera de plantas sanas (*Trichoderma* spp.) y con hongos patógenos provenientes de frutos enfermos en etapa inicial y tardía de la infección fúngica (*Moniliophthora*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia*).
- Se estableció un protocolo de ensayo in vitro permitiendo la identificación de cepas bacterianas antagonistas del hongo patógeno del fruto de cacao (*C. gloesporioides*).

7. RECOMENDACIONES.

- Evaluar bajo condiciones *in vitro* el efecto antagonista de las varias cepas bacterianas aisladas de la filósfera de plantas sanas de cacao, ya sea de manera individual o en consorcios, contra las varias cepas del hongo aislados de frutos enfermos de cacao.

- Caracterizar los metabolitos involucrados en los procesos de antagonismo en base de la tecnología de “mass imaging” sobre gelosa utilizando el equipo de espectrometría de masa MALDI TOF TOF.

- Evaluar en vivero, y campo definitivo el uso de consorcios de bacterianos y fúngico, nativos con potencial benéficos, ya sea como probióticos (promotores de crecimiento, etc.). o del tipo bio controlador de hongos patógenos, los cuales constituyan el problema mayor para el sector cacaotero de la región de Tumbes, así como del Perú y de los países vecinos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol.* 58 (4): 921-9.
- Alves, A., P. W. Crous, A. Correia and A. J. L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1-13.
- Alarcón, J., E. P. Arevalo, A. L. Díaz, J. R. Galindo y A. Rosero. 2012. Manejo Fitosanitario del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Medidas para la Temporada Invernal.
- Andreote, F. D., P. Rossetto, B. Avila, M. R. Carlos, L. A. Labate, A. A. Pizzirani-Kleiner, J. L. Azevedo and W. L. Araujo. 2009. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1065–1073.
- Andrews, J. H and R. F. Harris. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Phytopathol.* 38:145–180.
- ARPROCAT. 2014. Producción de cacao orgánico en la región Zarumilla. Resumen productivo de Cacaoteros Zarumilla-Tumbes.
- Arnold, A. E., Z. Maynard, G. S. Gilbert, P. D. Coley and T. A. Kursar. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol Lett*, 3: 267–274.
- Arnold, A. E., 2005. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. *New Delhi*: 49-68.
- Arnold, A. E., L. C. Mejía, D. Kylló, E. I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins and E. A. Herre. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical

- tree. Proceedings of the National Academy of Sciences. 26: 15649-15654
- Ayyadurai, N., P. R. Naik, M. S. Rao, R. S. Kumar, S. K. Samrat, M. Manohar and N. Sakthivel. 2005. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 926-937
- Bakker, P. A. H. M., C. M. J. Pieterse and L.C. Van Loon. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 97: 239-243.
- Bakker, M. G., D. K. Manter, A. M. Shefflin, T. L. Weir, J. M. Vivanco. 2012. Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant Soil*. 360: 1–13
- Barka, E. A., S. Gognies, J. Nowak, J. C. Audran and A. Belarbi. 2002. Inhibitory effect of endophytic bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control* 24: 135-142.
- Barreto, T. R., A. C. M. Da Silva, A. C. F. Suarez and J. T. De Souza. 2008. Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rhizosphere of *Theobroma cacao*. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 464-470.
- Bodenhausen, N., M. W. Horton and J. Bergelson. 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8(2): e56329.
- Bloemberg, G. V and B. J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Plant Biol*. 4(4):343-50.

- Chen, X., Y. Zhang, X. I. Fu, Y. Li and Qi. Wang. 2016. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biology and Technology* 115: 113–121.
- Chen, Y., P. Rekha, A. Arun, F. Shen, W. Lai and C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *American Society for Microbiology* 3: 1550-1557
- Chon, H. 2009. Contributions of the two accessory subunits, RNA SEH2B y RNA SEH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex. *Nucleic Acids* 37: 96-110.
- Collier, R. J and A. Casadevall. 2016. The holobiont/hologenome concept series. *MBio*. 7(2): e00605-16.
- Coombs, J. T., P. P. Michelsen and C. M. Franco. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control*. 29: 359–366.
- Crozier, J., S. E. Thomas, M. Aime, H. Evans and K. Holmes. 2006. Molecular characterization of fungal endophytic morpho species isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathol*. 55: 783-791.
- Cuervo-Parra, J. A., M. Ramírez-Suero, V. Sánchez-López and M. Ramírez-Lepe. 2011. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. *African Journal of Biotechnology* 10 (52): 10657-10663.
- Chun-Hao, Jiang., Fang Wu, Zhen-Yun Yu, Ping Xie, Hong-Jiao Ke, Hong-Wei Li, Yi-Yang Yu and Jian-Hua Guo. 2015. Study on screening and

antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*. *Microbiological Research* 170: 95–104.

Douanla-meli, C., E. Langer and F. T. Mouafo. 2013 .Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of *Citrus limón*. *funga ecology* 6: 212-222.

Douglas, A. E and J. H. Werren. 2016 .Holes in the Hologenome: Why Host-Microbe Symbioses Are Not Holobionts. *MBio*. 7: 2-3

Evans, H. C., K. A. Holmes and S. E. Thomas. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as bio control agents of cocoa diseases. *Mycological Progress* 2: 149–160.

Falcão, L. L., J. O. Silva-Werneck, B. R. Vilarinho, J. P. Da Silva, A. W. V. Pomella and L. H. Marcellino. 2014. Antimicrobial and plant growth-promoting properties of the cacao endophyte *Bacillus subtilis* ALB629. *Journal of Applied Microbiology*.

Galkiewicz, J. P and C. A. Kellogg. 2008. Cross-Kingdom Amplification Using Bacterial-Specific Primers: Complications for Coral Microbial Ecology.» *Applied and environmental microbiology*. 74(24): 7828-31.

Giassi, V., C. Kiritani and K. C. Kupper. 2016. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*. 190: 46–54.

Gilbert, J. A., F. Meyer, J. Jansson, J. Gordon, N. Pace, J. Tiedje, R. Ley, N. Fierer, D. Field, N. Kyrpides, F. O. Glockner, H. P. Klenk, K. E. Wommack, E. Glass, K. Docherty, R. Gallery, R. Stevens and R. Knight. 2010. The Earth Microbiome Project: meeting report of the “1st EMP meeting on sample selection and acquisition” at Argonne National Laboratory. *Stand Genomic Sci*. 3: 249-253.

- Gupta, A., M. Gopal, V. G. Thomas, V. Manikandan, J. Gajewski, G. Thomas, S. Seshagiri, C. S. Schuster, P. Rajesh and R. Gupta. 2014. Whole Genome Sequencing and Analysis of Plant Growth Promoting Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Plantation Crops Coconut, Cocoa and Arecanut. *PLoS ONE* 9 (8): e104259.
- Glass, E., J. Wilkening, A. Wilke, D. Antonopoulos and Meyer. 2010. Using the Metagenomics RAST Server (MG-RAST) for Analyzing Shotgun Metagenomes. *Cold Spring Harbor Protocols* 1: 1-9
- Gomori, G. 1955 «Preparation of buffers for use in enzyme studies» *Methods Enzymology* 1: 138-146.
- Gutiérrez-Román, M. I., F. Holguín-Meléndez, R. Bello-Mendoza, K. Guillén-Navarro, M. F. Dunn and G. Huerta-Palacios. 2012. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potential to control plant pathogens. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 145–153.
- Hanada, R. E., A. W. V. Pomella, H. S. Costa, J. L. Bezerra, L. L. Loguercio and J. O. Pereira. 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *fungus biology* 114: 901-910.
- Holmes, K. A., H. Schroers, S. E. Thomas, H. C. Evans and G. J. Samuels. 2004. Taxonomy and biocontrol of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress* 3: 199–210.
- Hillis, D. M and M. T. Dixon 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol.* 66: 411-453.

- ICCO. Organización Internacional del Cacao 2015: Cifras de cacao Peruano. <http://larepublica.pe/imprensa/economia/713042-el-peru-debe-apostar-por-el-cacao-fino-y-de-aroma-para-la-exportacion>.
- Kent, A. D and E. W. Triplett. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Microbiol.* 56: 211–236.
- Khalifa, A. Y., A. M. Alsyeeh, M. A. Almalki and F. A. Saleh. 2016. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 79–86.
- LI, Feng-Xia., M. A. Hui-Quan, Jing LIU and Chao ZHANG. 2012. Antagonistic Effects of *Bacillus cereus* Strain B-02 on Morphology, Ultrastructure and Cytophysiology of *Botrytis cinerea*. *Polish Journal of Microbiology.* 2 (61):119–128.
- Lindow, S. E and M. T. Brandl. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol.* 69: 1875–1883.
- Lucy, M., E. Reed, B. R. Glick. 2004. Application of free living plant growthpromoting rhizobacteria. *Antonie van Leewenhoek* 86: 1–25
- Lugtenberg, B and F. Kamilova. 2009. Plant-growth promoting rhizobacteria. *Microbiol.* 63: 541–556.
- Mejía, L., E. I. Rojas, Z. Maynard, S. V. Bael, A. E. Arnold, P. Hebbbar, G. J. Samuels, N. Robbins and E. A. Herre. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* Pathogens. *Biological Control* 46: 4-14.
- Melnick, R., C. Suárez, B. Bailey and P. Backman. 2011. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential

biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*. 57: 236-245

Melnick, R. L., N. K. Zidack, B. A. Bailey, S. N. Maximova, M. Gultinan and Backman P. A. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*. 46: 46–56.

Morihara, K and H. Tsuzuki. 1975. La especificidad de la proteínasa K de *Tritirachium album* Limber para péptidos sintéticos. *Agric. Biol* 39: 1489-1492.

Nadkarni, M. A., F. E. Martin, N. Hunter and N. A. Jacques. 2009. Methods for optimizing DNA extraction before quantifying oral bacterial numbers by real-time PCR. *FEMS Microbiol*. 296, 45–51.

Newton, A. C., C. Gravouil and J. M. Fountaine. 2010. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Ann Appl Biol* 157: 343-359

Pastor, N., E. Carlier, J. Andrés, S. B. Rosas and M. Rovera. 2012. Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. *Journal of Environmental Management* 95: S332-S337.

Phillips-Mora, W., M. C. Aime and M. J. Wilkinson. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56: 911–922.

Rubini, M. R., y otros. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*. 1: 24-33.

- Rastogi, G., A. Sbdio, J. A. Tech, T. V. Suslow, G. L. Coaker and J. H. J. Leveau. 2012. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME Journal*. 6: 1812–1822.
- Saiki, R. K. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-91.
- Salazar, E., R. Hernández, A. Tapia y L. Gómez-Alpízar. 2012. Identificación molecular del hongo *colletotrichum* spp., aislado de banano (*musa* spp) de altura en la zona de turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas post cosecha. *Agronomía Costarricense*. 36: 53-68
- Sandoval-Sánchez, M., D. Nieto-Ángel, J. S. Sandoval-Islas, D. Téliz-Ortiz, M. Orozco-Santos y H. V. Silva-Roja. 2012. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.)» *Artículo en Agro ciencia*. 47: 61-73.
- Szilagyi-Zecchin, V., A. C. Ikeda, M. Hungria, D. Adamoski, V. Kava-Cordeiro, C. Glienke, and L. V. Galli-Terasawa. 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agricultura. *AMB Express*. 4: 26.
- Thomas, S. E., J. Crozier, M. C. Aime, C. Harry, H. C. Evans and K. A. Holmes 2008. Molecular characterisation of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. *The British Mycological Society*. 112: 852–860.
- Torres-De la Cruz, M., y otros. 2015. Diversidad de Trichoderma en el agro ecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86: 947–961.
- Thomas, R. T., K. J. Euan and S. P. Phillip. 2013. The plant microbiome. *Genome Biol*. 14(6): 209.

- Trivedi, P., Duan and Wang N. 2010. Huanglongbing, a systemic disease, restructures the bacterial community associated with citrus roots. *Microbiol.* 76: 3427–3436
- Vale, M., L. Seldin, F. F. Araújo and R. Lima. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. Plant growth and health promoting bacteria. *Springer.* 5: 21-43.
- Vessey, J. K. 2003 «Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers» *Plant and Soil.* 255: 571-586.
- Wang, Kai., Pei-sheng Yan, Li-xin Cao, Qing-long Ding, Chi Shao and Teng-fei Zhao. 2013. Potential of Chitinolytic *Serratia marcescens* Strain JPP1 for Biological Control of *Aspergillus parasiticus* and Aflatoxin. *Hindawi Publishing Corporation.* 7.
- Wiley, John and Sons. 1999. Citotocyt of EDTA used in biological samples: effect on some human breast-milk studies» Departament of Inmunology, Georg-August Universit. *Journal of Applied Toxicology.* 19: 395-400.
- Whipps, J. M., P. Hand, D. Pink and G. D. Bending 2008 «Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype» *J Appl Microbiol.* 105: 1744–1755.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR Protocols: A guide to methods and applications. 315-322.

9. DEDICATORIA

Dedico la presente investigación a mis padres Antonio y Juana; a mis hermanos Winkler y Dilsey, a mis sobrinos Darlyn, Jeremy y Eikel; que son el motivo para alcanzar mis metas.

A mis mejores amigas como lo son Vanesa, Yuliana y Mercedes; por el apoyo brindado durante todo este tiempo.

10. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Coordinadores de la Maestría en Biotecnología Molecular conformado por Dr. Auberto hidalgo, Dr. Enedia Vieyra PhD. Eric Louis Mialhe por la gran oportunidad brindada; al equipo Científico de Inca´Biotec SAC conformado por: PhD. Virna Cedeño, PhD. Emmeric Motte, MSc Juan Quimi, MSc Ricardo avellán y al equipo técnicos conformado por Tec. Cesar Chanta, Tec. Pedro Masías, Tec. Petter Baca, Tec. Rodrigo Chota, que ayudaron con el desarrollo de presente trabajo de investigación; a nuestro equipo conformado por la Br. Juana Machuca, el Est. Christofer espíritu, Est Joselin Aguilar, por su apoyo durante la elaboración de este trabajo; a mis amigos, Msc (c) Jose stalyn, Msc (c) David lindo, MSc (c) Manuel Saucedo, Msc (c) Vanesa Baylon, MSc (c) Cesar solano, MSc (c) Mercedes Oyola, MSc (c). Mogollón Farías, Est. Camisan ramos, Br Astudillo Urbina, entre otros; por su ayuda incondicional y a Msc(c) Yuliana Saavedra olivos, MSc(c) Fredy fabian, MSc (c) Luis Aldo por su aporte intelectual.

Esta Maestría fue financiada gracias a las becas otorgadas por el CONCITEC y a otros proyectos de gran envergadura a nivel nacional.

11. ANEXOS

Figura 7: Curvas de rarefacción de los co-cultivos a partir de la co-cultivo de hojas sanas y enfermas de plantas de *T. cacao*; el meta genoma HS (4698938.3) es mayor, en comparación al número de especies del HE (4698935.3).

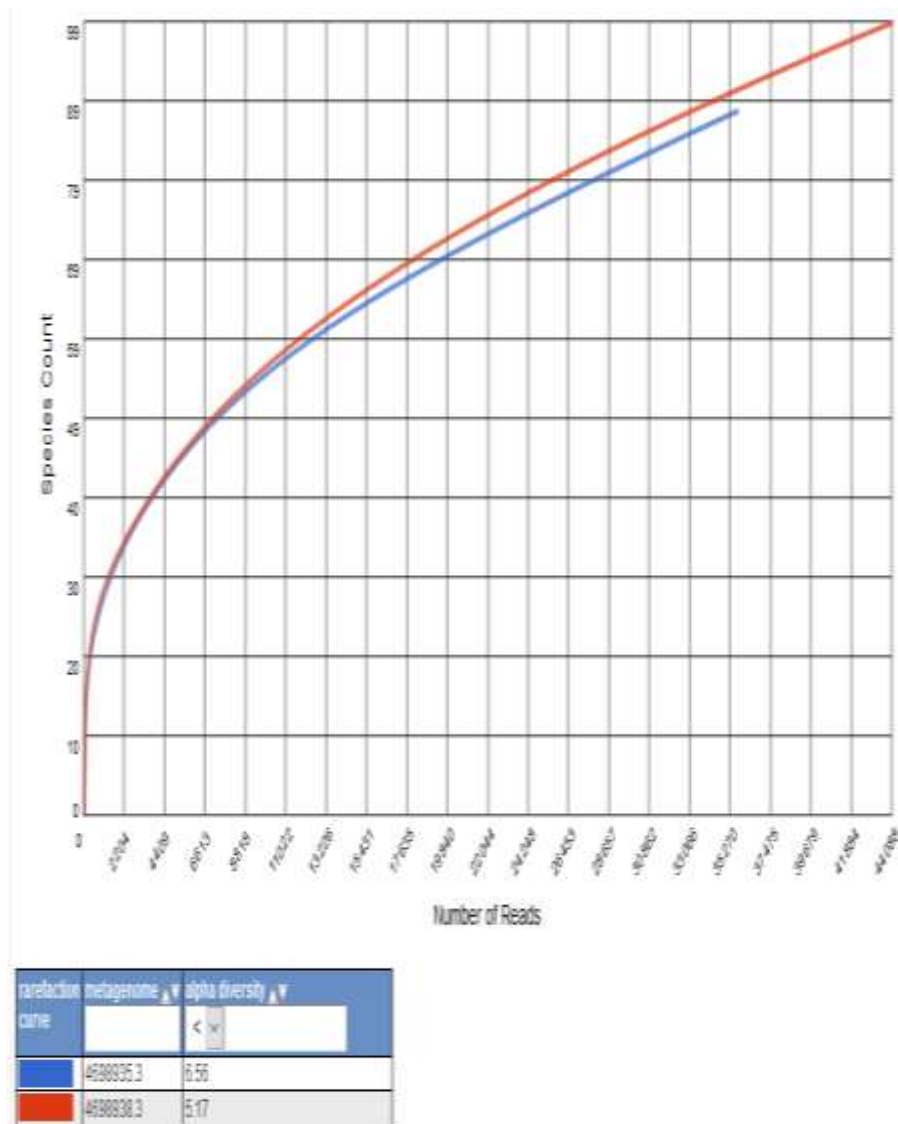


Figura 7: Curva de rarefacción de los co-cultivos a partir de hojas sanas y enfermas.

Figura 8: Curvas de rarefacción de los co-cultivos a partir de la co-cultivo de frutos sanos (FS) y enfermos en etapa temprana (FEI) y tardía (FET) de plantas de *T. cacao*; el meta genoma FS (4698937.3) es mayor, en comparación al número de especies del metagenoma EFT (4698933.3), y del FEI (4698936.3).

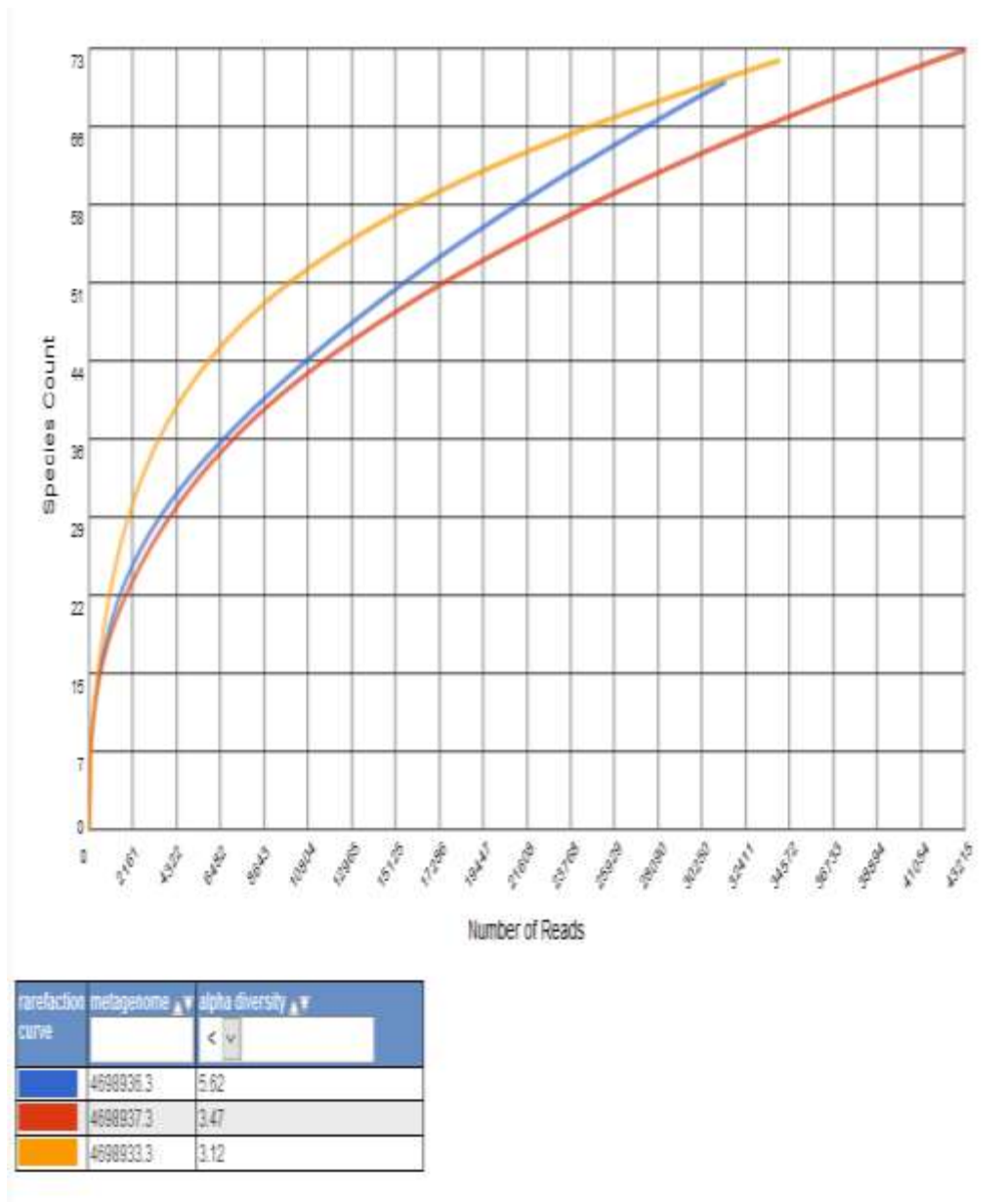


Figura 8: Curva de rarefacción de los co-cultivos a partir de frutos sanos y enfermos.

Figura 9: Curvas de rarefacción de co-cultivos y de muestra directa partir de la rizósfera de plantas sanas de *T. cacao*; el meta genoma RmBS (4678173.3) es mucho mayor, en comparación al número de especies del metagenoma RcoCS (4698934.3)

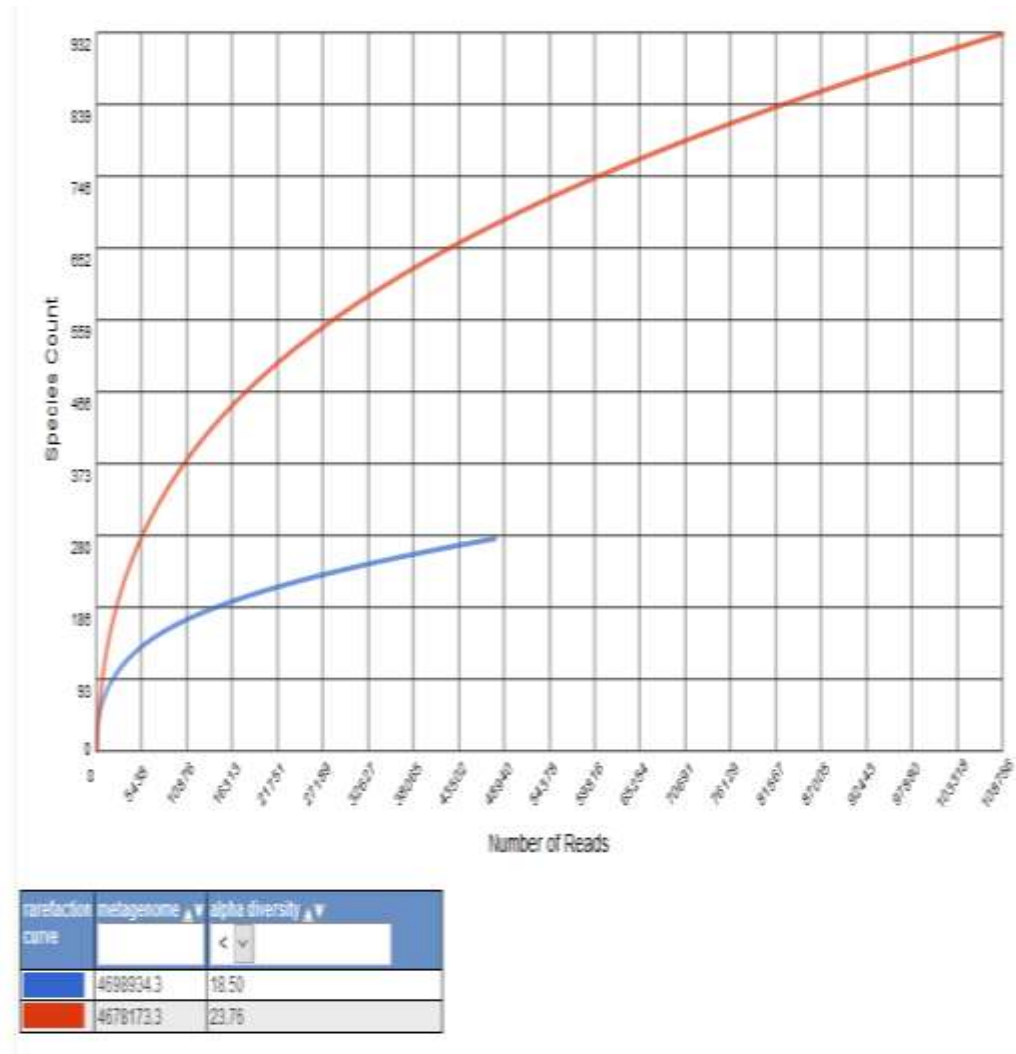


Figura 9: Curva de rarefacción de los co-cultivos a partir de frutos sanos y enfermos.



Figura 10: Extracción de muestras en plantas de *T. cacao*. a. Extracción de muestras de rizósfera. b. Extracción de tejidos de la parte aérea (Filósfera) de *T. cacao*.

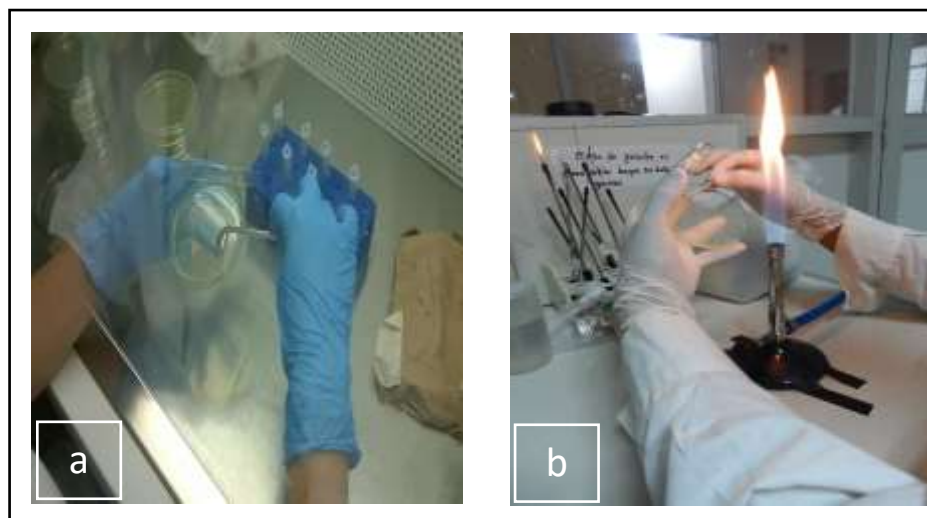


Figura 11: Siembra y purificación bacteriana. a. Esparcimiento de las alícuotas de las diluciones del cultivo madre. b. Siembra por agotamiento de las colonias bacterianas.

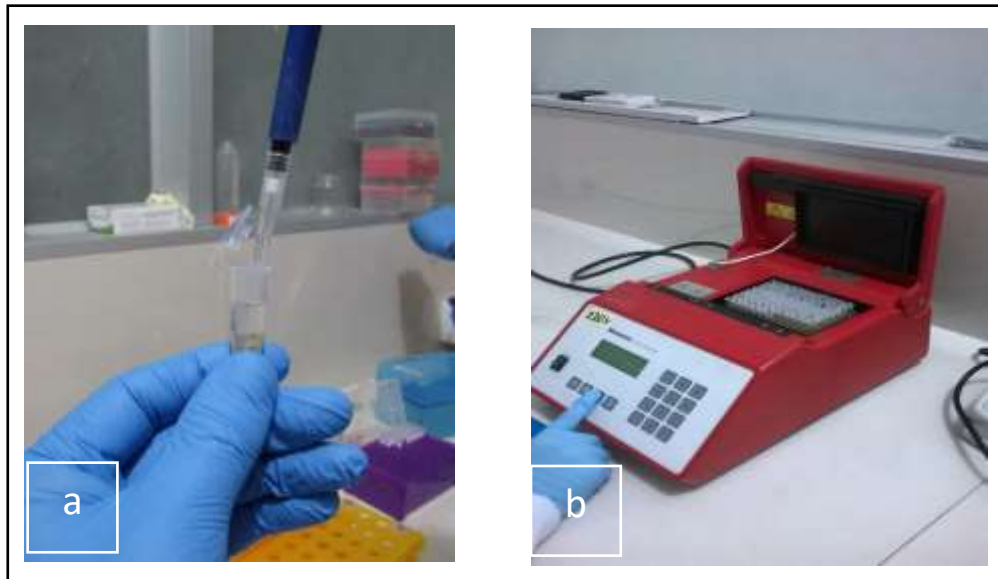


Figura 12: Extracción de ADN y PCR. a. Purificación de ADN. b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

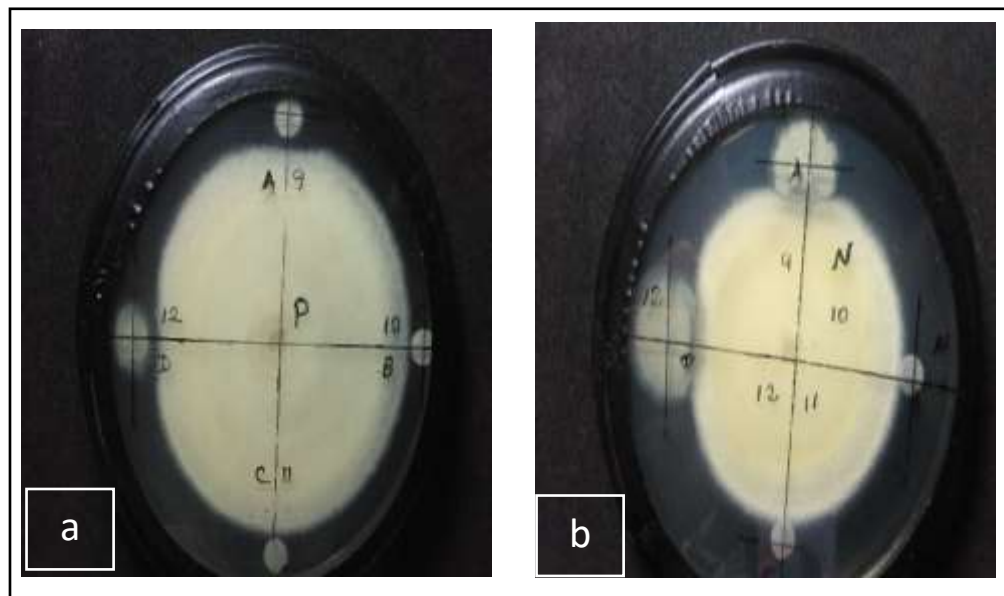


Figura 13: Ensayos de antagonismo bacteria-hongo. a. Foto tomada a las primeras 24 hr del antagonismo bacteria-hongo b. Fotos tomadas a las 48 hr del antagonismo bacteria hongo.