

Efecto de *Bacillus* sp. sobre la incidencia y severidad de la moniliasis del cacao

Víctor Jesús Albores-Flores*, Saily Lizbet Mejía-Velázquez, Julieta Grajales-Conesa, Dory Gledys Ramos-Pérez, Martha Alicia Tlatelapa-Díaz, José Alfonso López-García

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

La moniliasis (*Moniliophthora roreri*), genera pérdidas económicas en la producción de frutos del cacao (*Theobroma cacao* L.). El control de la enfermedad ha sido con productos químicos y manejo integrado, con reducida eficiencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Bacillus* sp. sobre la incidencia y severidad de moniliasis en cacao. Se utilizaron 50 plantas de cacao Trinitario por tratamiento. Se establecieron 24 tratamientos donde se evaluaron semanalmente la incidencia y severidad de la enfermedad, considerando como factores principales 1) aplicación cada 7 días, 2) aplicación cada 14 días y 3) testigo. Una de las dos condiciones del manejo en campo fue la cubierta protectora plástica colocada a cada fruto y la segunda fue sin ella. El orden obtenido de los tratamientos, considerando menor incidencia, incidencia media y mayor incidencia, queda como sigue: "Cada siete días" < "Testigo" < "Cada 14 días". Por lo anterior, la suspensión de *Bacillus*, inhibe el desarrollo de la moniliasis en frutos de cacao con aplicaciones cada siete días, sin importar si se coloca la cubierta plástica o no, a los frutos. La cubierta utilizada provocó efecto inductor en el desarrollo de los frutos de cacao, además de alargar el tiempo de la etapa de incubación de la enfermedad.

Palabras clave:

Bacillus sp.
Biocontrol
Fitopatógenos
Fitopatología
Fruto

Keywords:

Bacillus sp.
Biocontrol
Plant pathogens
Plant pathology
Fruit

Effect of *Bacillus* sp. on the incidence and severity of frosty pod rot of cocoa

Abstract

Moniliasis (*Moniliophthora roreri*), generates an economic loss in the production of cocoa fruits (*Theobroma cacao* L.). The control of the disease has been with chemical products and integrated management, with reduced efficiency. The objective of this work was to evaluate the effect of *Bacillus* sp. on the incidence and severity of moniliasis in cocoa. 50 Trinitario cocoa plants were used per treatment. 24 treatments were established where the incidence and severity of the disease were evaluated weekly, considering as main factors 1) application every 7 days, 2) application every 14 days and 3) control. One of the two conditions of field management was the plastic protective cover placed on each fruit and the second was without it. The order obtained from the treatments, considering lower incidence, average incidence, and highest incidence, is as follows: "Every seven days" < "Control" < "Every 14 days". Therefore, the *Bacillus* suspension inhibits the development of moniliasis in cocoa fruits with applications every seven days, regardless of whether or not the plastic cover is placed on the fruits. The cover used caused an inductive effect on the development of cocoa fruits, in addition to lengthening the time of the incubation stage of the disease.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas. Boulevard Príncipe
Akishino sin número,
Colonia Solidaridad 2000
C.P. 30798. Tapachula
Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
alboresflores@gmail.com

1. Introducción

Theobroma cacao L. se cultiva principalmente en la franja Equatorial de América, Asia y África. Las semillas del cultivo de cacao son utilizadas para la elaboración de chocolate y derivados (Espinosa et al., 2015; Sánchez-Mora y Garcés-Fiallo, 2012). En México, el área cultivada es de aproximadamente 55 950 ha distribuidos principalmente en Tabasco, Chiapas, Puebla, Veracruz y Oaxaca (SIAP, 2020). Sin embargo, en los últimos diez años, el rendimiento de los frutos de cacao ha disminuido a un 20%, debido a que estos se ven fuertemente afectados por una enfermedad conocida como “moniliasis”, cuyo agente etiológico es *Moniliophthora roreri*, hongo hemibiotrófo que posterior a la penetración en el fruto del cacao genera inicialmente la fase biotrófica, posteriormente se produce la fase necrotrofica que es la destructiva y se expresa después de la tercera u octava semana de haber infectado el fruto (Albores et al., 2018; Phillips-Mora et al., 2006). Los principales síntomas que expresa el fruto posterior a la infección del hongo son: mancha aceitosa, decoloración, momificación, entre otros (López-Báez et al., 2015; Melnick et al., 2013).

El manejo agronómico del cultivo de cacao fue el procedimiento preferente para la reducción de la incidencia de enfermedades producidas por hongos (Ramírez-González et al., 2011). En el área de productos fitosanitarios la aplicación de agroquímicos se reducía al caldo Bordelés y fungicidas químicos (sistémicos y de contacto) para ejercer control a la enfermedad (Torres-Cruz et al., 2011). Sin embargo, la repentina aparición, y rápida diseminación de *M. roreri* trajo como consecuencias el descontrol (no había conocimiento para el manejo de la enfermedad) y disminución de la producción de cacao (Espinosa et al., 2015).

Entre las alternativas de manejo de la enfermedad sostenida para su control se encuentra el uso de microorganismos antagónicos, pertenecientes al género *Trichoderma*, *Streptomyces* y *Bacillus*, debido a que han mostrado efectos significativos, reduciendo la enfermedad a valores de incidencia del 70% y 50%, respectivamente (Cuervo-Parra et al., 2011; Villamil et al., 2015) marcando una diferencia del 10% al compararlo con tratamientos convencionales.

El género *Bacillus*, ha presentado resultados satisfactorios en el control de hongos fitopatógenos, al reducir valores de incidencia que oscilan entre 30 y 50% en contra de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, entre otros (Gong et al., 2015; Han et al., 2016; Mercado-Flores et al., 2014; Yáñez- Mendizábal et al., 2012; Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2013). Sin embargo, escasa es la información sobre el uso de cepas bacterianas en el control de la moniliasis del cacao a nivel de campo y el comportamiento en el crecimiento del fruto debido a este tipo de microorganismos, por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de *Bacillus* sp. sobre la incidencia y severidad de la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*), y en la dinámica del crecimiento del fruto.

2. Materiales y métodos

2.1. Área de estudio y establecimiento de los tratamientos.

El trabajo se realizó en el municipio de Tuxtla Chico, Chiapas México, (N 14°54.539 W 092°10.897; 314 msnm; temperatura media anual 26.4 °C; lluvia media de 4037 mm) en un cacaotal sembrado con la variedad Trinitario. En una hectárea del cultivo fueron establecidos 24 tratamientos (Cuadro 1) con 50 plantas cada uno. Los tratamientos estuvieron separados por dos hileras de plantas. En cada tratamiento se utilizó dos condiciones, la primera consistió en proteger los frutos con bolsas de celofán dulce sujetos al pedúnculo con hilo flexible y la segunda sin esta bolsa. Todos los tratamientos se ubicaron en el centro de la hectárea. Previo al establecimiento de los tratamientos se realizó el saneo general del área de estudio, eliminando todos los frutos enfermos. Para mantener aireación en el sistema productivo, se realizó una poda de los árboles. El aseguramiento de sanidad de los frutos se realizó desde el amarre de estos con la bolsa de celofán.

Cuadro 1. Tratamientos empleados en este estudio.

Tratamientos	Sin bolsa	Con bolsa	Aplicación (Días)	Clave
	Edad	Edad		
1	2		7	T7SB2
2	4		7	T7SB4
3	6		7	T7SB6
4	8		7	T7SB8
5		2	7	T7CB2
6		4	7	T7CB4
7		6	7	T7CB6
8		8	7	T7CB8
9	2		14	T14SB2
10	4		14	T14SB4
11	6		14	T14SB6
12	8		14	T14SB8
13		2	14	T14CB2
14		4	14	T14CB4
15		6	14	T14CB6
16		8	14	T14CB8
17	2		T	TTSB2
18	4		T	TTSB4
19	6		T	TTSB6
20	8		T	TTSB8
21		2	T	TTCB2
22		4	T	TTCB4
23		6	T	TTCB6
24		8	T	TTCB8

2.2. Antifúngico utilizado

La cepa de *Bacillus* sp. fue proporcionada por El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), la producción de biomasa y antifúngico fue realizada en caldo dextrosa papa pH 6.5, 27 °C de temperatura y 180 rpm de agitación rotatoria. El adherente utilizado fue INEX-A®.

2.3. Aplicación del antifúngico a los frutos

La aplicación del antifúngico fue realizada cada 7 y 14 días por un periodo de un semestre de producción. El antifúngico

fue aplicado manualmente (2 mL por fruto) con una bomba aspersora de 5 L. La aplicación fue únicamente a frutos aparentemente sanos.

2.4. Desarrollo de la enfermedad

Se evaluó semanalmente la dinámica de la enfermedad junto a la eliminación de material enfermo que fungió como fuente de inóculo. La incidencia se determinó mediante la fórmula $I (\%) = (IF/TF) \times 100$; donde I = incidencia, IF = número de frutos enfermos y TF = Total de frutos. Para determinar la severidad de la enfermedad se utilizó la escala propuesta por Aránzazu et al. (2009) y Phillips-Mora et al. (2005), en la cual: 1 = Fruto sano; 2=1 a 25% del área necrosada; 3 = 26 a 50% del área necrosada; 4=51 a 75% del área necrosada y 5 = 76 a 100% del área necrosada.

2.5. Índice de severidad (ISE)

El índice de severidad se calculó utilizando la ecuación de Townsend y Heuberguer (1943). Se expresa como sigue: $ISE = \sum [(nb / (N-1) T) \times 100]$. Donde “n” es el número de frutos de cada grado, “b” es el grado, “N” es el número de grados empleados en la escala y “T” es el total de frutos evaluados.

2.6. Dinámica de crecimiento del fruto

Se determinó la cinética de crecimiento del fruto. Se medió con cinta métrica el largo del fruto, considerando a sanos y enfermos (hasta alcanzar necrosis completa). Se determinó la

velocidad de crecimiento de los frutos con los datos obtenidos.

2.7. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA. Donde existió diferencias significativas se aplicó una comparación de medias por Tukey (p=0.05). El software utilizado fue Infostat 2019 con conversión a R.

3. Resultados y Discusión

La semana en apareceré el síntoma de moniliasis, la longitud del fruto al inicio del síntoma de giba y de incidencia se presenta en el Cuadro 2. En la mayoría de los tratamientos el síntoma de enfermedad de moniliasis se observó a partir de la segunda semana después del inicio de las aplicaciones. En el tratamiento T7SB6, el síntoma apareció entre la tercera y cuarta semana post-inicio, en el T7CB2 el síntoma apareció a la cuarta semana y en el tratamiento T7CB6, fue en la quinta semana post-inicio. Únicamente en los tratamientos T7SB8 y T7CB8 no se presentó ningún síntoma de la enfermedad de la moniliasis.

En los tratamientos T14, correspondientes a SB2, CB2, SB4 y CB4, el síntoma de moniliasis apareció entre la segunda y tercera semana posterior al inicio del estudio. En el tratamiento T14SB8 el síntoma se observó entre la primera y segunda semana post-inicio del tratamiento.

Cuadro 2. Valores promedios de longitud de fruto, tiempo en aparecer los síntomas de Moniliasis e incidencia. (SDM: Semana en que se detecta el síntoma de moniliasis, LIDS: Longitud inicial del fruto al detectar el síntoma).

Tratamiento	Condición	Edad	SDM	LIDS (cm)	Incidencia
C. 7 días	SB	2	2.00±0.50 c	3.05±0.30 g	13.33±8.3 fg
		4	2.00±0.50 c	5.20±0.48cde	6.66±4.3 gh
		6	3.50±0.47 bc	9.85±0.30 ab	13.33±8.3 fg
		8	0.00±0.0 e	0.00±0.0 h	0.00±0.0 i
	CB	2	4.00±0.57 ab	5.05±0.30 def	13.33±8.3 fg
		4	2.00±0.50 c	4.60±0.46 def	6.66±4.3 gh
		6	5.00±0.50 a	10.07±0.46 a	6.66±4.3 gh
		8	0.00±0.0 e	0.00±0.0 h	0.00±0.0 i
C. 14 días	SB	2	2.38±0.28 bc	4.15±0.40 ef	86.66±6.3 a
		4	2.54±0.29 bc	6.56±0.46 bcde	73.33±5.2 bc
		6	2.00±0.50 c	7.82±0.50 bcd	46.66±8.2 d
		8	1.33±0.48 cd	9.53±0.73 ab	20.00± 5.2 ef
	CB	2	2.18±0.30 c	4.41±0.44 ef	73.33±5.2 bc
		4	2.16±0.28 c	5.94±0.42 cde	80.00±8.6 ab
		6	1.90±0.30 cd	7.82±0.46 bcd	66.66±5.3 c
		8	2.00±0.50 c	9.48±0.55 abc	46.66±8.2 d
Testigo	SB	2	2.66±0.55 bc	3.96±0.84 fg	26.66±6.6 e
		4	3.00±0.60 bc	6.40±0.30 bcde	30.00±5.3 de
		6	2.50±0.48 bc	8.00±0.70 abcd	30.00±5.3 de
		8	2.00±0.50 c	9.50±0.46 abc	13.33± 8.6 fg
	CB	2	4.00±0.57 ab	5.75±0.30 cde	26.66±6.6 e
		4	2.00±0.50 c	5.20±0.30 def	26.66±6.6 e
		6	4.00±0.57 ab	10.80±0.46 a	13.33±8.6 fg
		8	2.00±0.50 c	8.60±0.44 abc	13.33±8.6 fg

En los tratamientos testigo, en ambas condiciones, el síntoma apareció entre la segunda y la cuarta semana post-inicio, en

todas las edades. La diferencia entre tratamientos fue significativa (F: 5.51, gl: 2, p=0.0058), y entre edades

también (F: 4.58, gl: 3, $p=0.0458$). Únicamente entre condiciones no existió diferencias estadísticas (F: 0.1, gl: 1, $p=0.7539$).

El tiempo de incubación observado en este estudio es similar a lo reportado por Albores et al. (2018), quienes indican que el tiempo de incubación es el reflejo de la agresividad de la cepa presente en el área de estudio, dando un valor menor a las cinco semanas ya reportadas para esta enfermedad. En frutos de edad de dos, cuatro o seis semanas, la duplicación celular es mayor haciéndolos más susceptibles a la infección, caso contrario a la de ocho semanas de edad, donde los cambios en la composición del pericarpio es mayor al coincidir con la transición del estado inmaduro al estado juvenil, que según Ando et al. (2009) y Ten Hoopen et al. (2012), los tipos de componentes fenólicos y flavonoides cambia, volviéndose un tejido represivo para el desarrollo de hongos Fitopatógenos, como *M. royeri*. Explicación que soporta la falta de frutos enfermos en el tratamiento de 8 semanas de edad donde la aplicación de la suspensión de *Bacillus* fue cada siete días, en ambas condiciones. Sin embargo, la existencia de frutos enfermos de 8 semanas en los tratamientos correspondientes a T14, hacen pensar que la aplicación semanal (la mejor) de la suspensión ejerce una inhibición sobre la germinación de conidios de *M. royeri* presentes en la superficie de los frutos de cacao embolsados o no, y que no es recomendable realizarlo cada 14 porque se pierde el efecto. Lo anterior es similar a lo observado por Ley-López et al. (2018), en plántulas de tomate, donde explican que la incidencia de plantas enfermas por *Phytophthora capsici* fue menor en los tratamientos donde se aplicó suspensión de *B. thuringiensis* y *B. amyloliquefaciens* comparado con el tratamiento testigo, dejó inactivas o muertas a las esporas de este hongo, demostrándose con muestras de tejido bajo observación en microscopio.

De manera general la longitud del fruto de cacao al momento de observar la presencia del síntoma de moniliasis osciló de 3.05 a 10.80 cm. Se observó que la longitud del fruto está asociado a la edad de este y a la condición (Cuadro 2). Los frutos de cacao envueltos en bolsa tuvieron una diferencia mayor en mm respecto a los que estuvieron sin envoltura. De acuerdo con el tiempo de aplicación (cada 7 y 14 días) y el testigo, la longitud de los frutos por cada edad fue similar entre ellos y la excepción se centró en el tratamiento T7SB2 y en el testigo TTSB2.

La diferencia entre edades fue altamente significativa (F: 54.7, gl: 3, $p<0.0001$), entre condición fue significativa (F: 2.03, gl: 1, $p=0.03132$) y entre tratamientos no se encontró diferencias estadísticas (F: 0.04, gl: 2, $p=0.6692$).

En cacao, la variedad más resistente a la moniliasis es forastero (Takam et al., 2013), pero en el presente estudio la variedad fue trinitario y las condiciones fisicoquímicas del pericarpio del fruto de esta variedad es mayor a la de Criollo (Albores et al., 2018), y menor al forastero, considerando esta capacidad fisicoquímica como un efecto de barrera, no fue totalmente efectiva. Los frutos de menor edad son más susceptibles a la infección por *M. royeri*, lo que no les

permite seguir creciendo y por la falta de metabolitos con actividad antifúngica, el tejido tiende a morir fácilmente por la presencia del micelio necrotrófico que lo consume (Agrios, 2005).

La diferencia significativa en tamaño y tiempo de incubación, en la edad de dos semanas del tratamiento T7SB2 comparado con el T7CB2 y del testigo TTSB2 con respecto al T7CB2, está asociada a la presencia de la bolsa de celofán dulce. Está envoltura tiene la propiedad de ser moderadamente permeable al CO_2 y O_2 , al vapor de agua e impide la desecación, lo que la convierte en un empaque factible para la conservación de alimentos (Plank, 2005; Yunga, 2011). Por lo anterior proponemos que ejerció un efecto incubador - retrasador induciendo cambios fisiológicos en los frutos infectados, retrasando la generación de la necrosis en el tejido del pericarpio donde reprimió la generación del micelio necrotrófico (hipotético) y el almacenamiento de fenoles dañinos en el tejido (Bailey et al., 2013), reflejándose en el tamaño del fruto al momento de expresar el síntoma y en el tiempo de incubación.

Respecto a la incidencia, los tratamientos con aplicación de cada siete días del *Bacillus*, presentaron menores valores de incidencia que el tratamiento testigo y del que recibió aplicación cada 14 días. Los valores más altos de incidencia se observaron en los tratamientos que recibieron la aplicación del *Bacillus* cada 14 días, tanto en la condición embolsada como en la no embolsada. Estadísticamente, existió diferencias altamente significativas entre tratamientos (F: 1088.68, gl: 2, $p<0.0001$), y entre edades (F: 139.57, gl: 3, $p<0.0001$), pero no entre condiciones (F: 0.05, gl: 1, $p=0.8249$).

Respecto a los valores de incidencia y como se mencionó en párrafos anteriores, la aplicación de la suspensión de *Bacillus* en los tratamientos T7 está relacionado con la inhibición de conidios en la superficie del pericarpio. Por lo anterior, el número de frutos infectados, traducido a valores de incidencia fue menor, aunque el tiempo de incubación en frutos que si se infectaron haya sido de dos semanas. Lo antes expuesto se comparó con los tratamientos que recibieron aplicación de la suspensión del *Bacillus* cada 14 días, donde la incidencia de la enfermedad fue mayor y es posible que no haya existido suficiente inhibición de conidios, tal como lo reporta Ley-López et al. (2018), en plantas de tomate.

Por otro lado, los frutos enfermos observados en los tratamientos T7, pudieron tener menor tiempo de exposición a la suspensión de *Bacillus* en la zona próxima al pedúnculo, incluyendo que algunos conidios no se hayan lavado durante el escurrimiento del líquido. Además, la adherencia de la suspensión a la superficie del pericarpio no haya permitido que existiera mayor residualidad del mismo y hubieran quedado áreas de tejido sin exposición a la suspensión, lo que dio como resultado algunos frutos infectados.

En lo que respecta al momento en que se presentó la necrosis total de los frutos de cacao estudiados, de manera general osciló entre la quinta y octava semana post-inicio (Cuadro 3). Estadísticamente no existieron diferencias significativas

entre tratamientos (F: 2.63, gl: 2, $p=0.0526$), entre condición (F: 0.16, gl: 1, $p=0.0688$), pero sí entre edades (F: 4.78, gl: 3, $p<0.0042$).

De manera general, el tiempo de vida (Tv) que tuvieron los frutos después de detectar que estaban infectados, independientemente de la aplicación del *Bacillus* o no, fue de 2 a 3 semanas. Con excepción de los tratamientos de 8 semanas de edad con aplicación cada 7 días, no existieron diferencias significativas entre tratamientos, entre edades y entre condición. Según Phillips-Mora et al. (2007), después

de que el fruto es infectado transcurren de tres a cinco semanas para que se exprese la enfermedad y una vez expresado el síntoma, transcurren de 2 a 3 semanas antes de alcanzar una necrosis completa. En el presente estudio estuvimos dentro de rango de vida del fruto y que los frutos de cacao infectados, independientemente de la edad, inician el proceso de necrosis de 5 a 8 semanas después de la infección. Lo anterior les permite crecer un poco, pero no suficiente como lo hacen los frutos no infectados.

Cuadro 3. Valores promedios de longitud de fruto, tiempo de vida del fruto después de aparecer síntoma de Moniliasis, semana con total necrosis y severidad. (STN: Semana con total necrosis, LFTN: Longitud final del fruto al alcanzar total necrosis, Tv: tiempo de vida del fruto).

T	Condición	Edad	STN	LFTN (cm)	Tv	Severidad
C. 7 días	SB	2	5.5±0.64 b	3.90±0.83 e	2.5±0.28 a	25.00
		4	6.0±0.91 b	6.50±0.83 d	3.0±0.39 a	8.33
		6	7.5±0.64 ab	10.70±1.16 bc	3.0±0.28 a	16.66
		8	0.0±0.0 c	0.00±0.0	0.0±0.0 b	0.00
	CB	2	7.0±0.64 ab	5.55±1.16 de	2.0±0.28 a	16.66
		4	6.0±0.91 b	5.60±0.92 de	3.0±0.39 a	8.33
		6	8.0±0.91 a	12.40±0.92 b	3.0±0.39 a	8.33
		8	0.0±0.0 c	0.00±0.0	0.0±0.0 b	0.00
C. 14 días	SB	2	6.0±0.24 b	7.56±0.83 cd	3.0±0.10 a	50.00
		4	5.4±0.29 b	9.17±0.76 c	2.9±0.12 a	33.33
		6	5.7±0.37 b	13.27±1.16 b	3.0±0.16 a	33.33
		8	5.8±0.41 b	16.74±1.18 a	2.8±0.18 a	25.00
	CB	2	5.8±0.29 b	8.47±0.83 cd	2.5±0.12 a	41.66
		4	5.7±0.26 b	10.45±0.76 bc	2.4±0.11 a	41.66
		6	5.8±0.30 b	14.96±0.88 ab	2.8±0.13 a	58.33
		8	6.0±0.34 b	16.13±1.00 a	2.7±0.15 a	33.33
Testigo	SB	2	6.0±0.53 b	4.70±1.52 e	3.0±0.23 a	25.00
		4	6.3±0.53 b	7.63±1.52 cd	2.7±0.23 a	16.66
		6	7.0±0.53 ab	11.03±1.52 bc	2.7±0.23 a	41.66
		8	6.0±0.91 b	10.40±2.64 bc	3.0±0.39 a	8.33
	CB	2	7.0±0.64 ab	6.15±1.86 d	2.0±0.28 a	16.66
		4	6.0±0.64 b	6.45±1.86 d	3.0±0.28 a	16.66
		6	7.0±0.91 ab	11.30±2.64 bc	2.0±0.39 a	8.33
		8	6.0±0.91 b	9.70±2.64 c	3.0±0.39 a	8.33

Al término de vida de los frutos de cacao infectados, la longitud alcanzada de estos hasta la presencia de necrosis total fue mayor en los tratamientos correspondientes a T14, específicamente en los tratamientos CB6, SB6, CB8 y SB8. Respecto a la condición, de manera general los frutos que fueron embolsados fueron más grandes que los frutos no embolsados, independientemente del tratamiento. Los tratamientos donde los frutos fueron menores en longitud correspondieron a los tratamientos de T7. Se encontraron diferencias significativas la condición de manejo de los frutos (F: 6.14, gl: 1, $p=0.0154$) y diferencias altamente significativas entre tratamientos (F: 16.78, gl: 2, $p<0.0001$) y entre edades del fruto (F: 42.64, gl: 3, $p<0.0001$).

De manera general, los tratamientos de edades dos y cuatro, fueron las más susceptibles a la enfermedad, y la menos susceptibles es la de ocho semanas de edad. Se puede observar que, de manera jerárquica, tomando como criterio de selección los de menor incidencia, incidencia media y

mayor incidencia, los tratamientos quedan de la siguiente manera “Cada siete días” < “Testigo” < “Cada 14 días”.

La diferencia en los tamaños del fruto de cacao estuvo asociada a la envoltura protectora, que a pesar de ser una cubierta moderadamente permeable al CO₂ y O₂, al vapor de agua e impide la desecación (Plank, 2005; Yunga, 2011), proporcione un efecto incubación - retrasador que indujo cambios fisiológicos en los frutos infectados, y por ello la expresión de la enfermedad se retrasó, incluyendo la necrosis total de estos. Considerando los resultados de los tratamientos correspondiente a los T7, se recomienda aplicar la suspensión de *Bacillus* cada siete días, sin importar estar o no embolsados.

El mayor daño observado, medidos como ISE, a los frutos de cacao producido por síntomas de moniliasis, se presentó en los tratamientos que recibieron aplicación cada 14 días. En los tratamientos que recibieron aplicación cada 7 días, fueron los que menor daño tuvieron en los frutos de cacao. Al igual que en la incidencia, el ISE estuvo asociado a la capacidad

de infección del fruto, a las propiedades fisicoquímicas del fruto de cacao, al efecto inhibitorio que ejerció la suspensión del *Bacillus* y a la resistencia bioquímica o genética que tuvo la variedad de cacao utilizada, respecto a lo anterior Albore et al. (2018) indicaron que la concentración de fenoles, flavonoides y actividad peroxidasa, juegan un papel relevante contra el desarrollo del patógeno y que esta capacidad se encuentra sustentada por la resistencia genética del fruto.

En la velocidad de crecimiento (Figura 1), se observó que los frutos de los tratamientos de 2 y 4 semanas de edad, que recibieron la aplicación de la suspensión de *Bacillus* sp., cada 7 o 14 días, presentaron valores superiores a los observados en los frutos que no recibieron la aplicación de la bacteria, sin importar si estaban o no protegidos por la envoltura. Se observaron dos picos de velocidad máxima en las semanas cuatro y seis, donde el segundo valor máximo no se observó en el tratamiento testigo.

Lo anterior hace pensar que la cepa bacteriana al interactuar con el tejido del exocarpo del fruto de cacao puede expresar, además del efecto protector contra la infección del fruto por el patógeno que provoca la moniliasis, un efecto como promotor del crecimiento de tejido vegetal (PCTV), proponiendo posibles mecanismos: a) que la cepa penetre la cutícula y llegue a la capa epidérmica del exocarpo colonizándola, ocupando un espacio que no permita la penetración del patógeno, como lo menciona Chowdhury et al. (2015), Villareal-Delgado et al. (2018) y Yu et al. (2011), b) la producción de compuestos de bajo peso molecular con efecto directo sobre el crecimiento del patógeno limitando o inhibiendo su crecimiento (Jaafar et al., 2017; Villareal-Delgado et al., 2018; Zhang et al., 2016), c) que durante la interacción planta - *Bacillus* sp., se estimularon respuestas en el tejido induciendo la producción de fitohormonas (Bustos-Vázquez et al., 2020, Chowdhury et al., 2015; Yu et al., 2011), que promovieron la división celular en el fruto de cacao. A lo antes expuesto, Torres-de los Santos et al. (2020) indica que a nivel endógeno durante la interacción microorganismo - planta, se orquesta una variedad de respuestas donde se producen metabolitos que estimulan el crecimiento vegetativo, producción de metabolitos con actividad antimicrobiana y contra herbívoros, y es posible que esto haya ocurrido en el presente estudio en frutos de cacao después de la aplicación de la suspensión bacilar. A lo anterior no se ha demostrado que la cepa de *Bacillus* sp. utilizada hubiera colonizado el tejido del fruto.

El efecto observado en los frutos correspondientes al tratamiento de 8 semanas de edad (Figura 1 A y B), donde se reduce la velocidad de crecimiento a la semana tres, en ambos tratamientos (aplicación de 7 y 14 días), este comportamiento podría estar asociado a la etapa 2 de cambio que sufre los frutos de cacao donde se reduce la división celular y comienza el alargamiento de las células existentes en todo el tejido del fruto, acompañado de actividad metabólica involucrada a la síntesis de sustancias implicadas en la defensa del fruto; en el interior del mismo fruto se activa el desarrollo del óvulo a expensas del crecimiento del

embrión (Ten Hoopen et al., 2012). Lo anterior, necesitó aproximadamente de una semana, lo que hace pensar que estuvo asociado a la redirección - distribución de nutrientes indispensables en el fruto, dándole prioridad al inicio de la formación de semillas. La envoltura plástica de celofán funcionó como una cámara de incubación donde las condiciones ambientales ejercieron función de elicitar en las células del tejido del fruto la activación de esta etapa entre la semana 10 a la 11, muy marcada en los tratamientos con la envoltura comparado con el tratamiento sin envoltura.

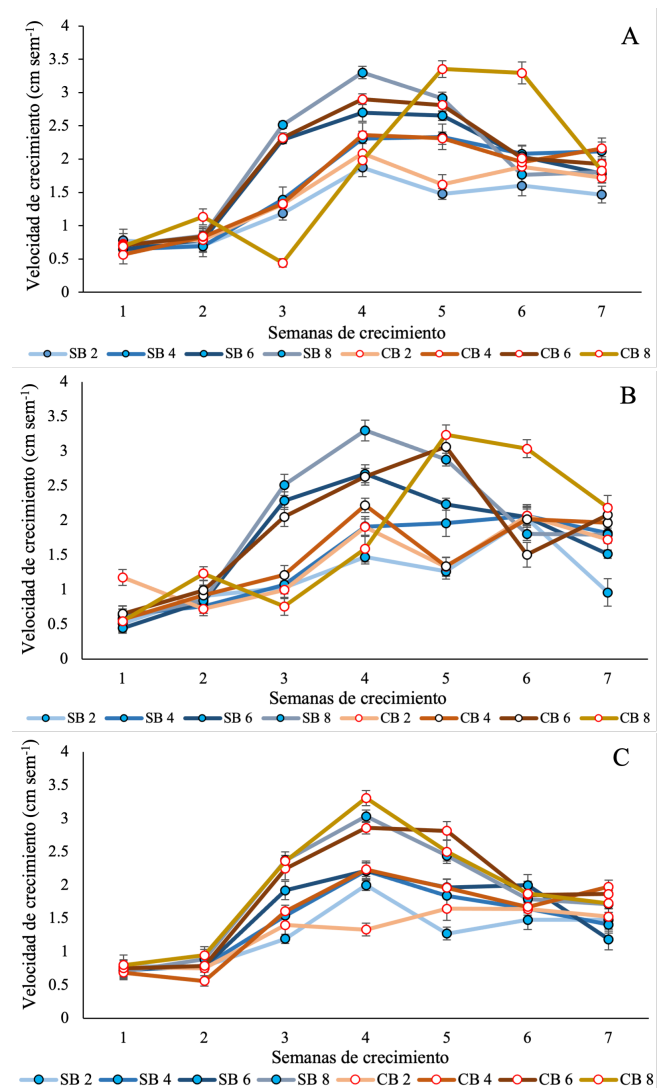


Figura 1. Velocidad de crecimiento de los frutos de cacao (A: con aplicación cada 7 días, B: con aplicación cada 14 días y C: Testigo). Los números 2, 4 y 6 son las edades de los frutos de cacao al inicio del estudio, para cada tratamiento.

4. Conclusión

La suspensión de *Bacillus* inhibe el desarrollo de la moniliasis en los frutos de cacao, cuando se realizó aplicaciones cada siete días, sin importar si se embolsan o no los frutos. La envoltura utilizada provocó un efecto inductor

en el desarrollo de los frutos de cacao, además el efecto de alargar el tiempo de la etapa de incubación de la enfermedad.

Agradecimientos

Los autores agradecen a El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) y al Instituto de Biociencias (IBC).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Albores-Flores VJ, García-Guzmán G, Espinoza-García FJ, Salvador-Figueroa M. 2018. Degree of domestication influences susceptibility of *Theobroma cacao* to frosty pod rot: a severe disease devastating Mexican cacao. *Botanical Sciences* 96(1): 84-94.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edn. New York. Elsevier Academic Press.
- Ando K, Hammar S, Grumet R. 2009. Age-related resistance of diverse cucurbit fruit to infection by *Phytophthora capsici*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134(2): 176-182.
- Aránzazu, F., N. Martínez, D. Guarín, and G. Palencia. 2009. Materiales de cacao en Colombia, su compatibilidad sexual y Modelos de siembra. Unión temporal de cacao de Colombia uno, Fedecacao-Corpoica. Bucaramanga. Pp. 8-9.
- Bailey BA, Crozier J, Sicher RC, Strem MD, Melnick R, Carazzolle MF, Costa G, Pereira GAG, Zhang D, Maximova S, Guiltinan M, Meinhardt L. 2013. Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 81, 84-96.
- Bustos-Vázquez GM, Torres ARI, Sánchez PS, Acosta CEY. 2020. Capítulo II: Microorganismos promotores de del crecimiento vegetal. Rhizobium, Azospirillum, Bacillus, Micorrizas arbusculares. En: Torres de los S. R. Interacciones en la rizosfera de las plantas. Importancia y señalización bioquímica y molecular. Consejo de Publicaciones UAT. Impreso en México. Pp. 27-59.
- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriss R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology* 6: 780.
- Cuervo-Parra JA, Ramírez SM, Sánchez LV, Ramírez ML. 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.
- Espinosa GJA, Urestil GJ, Vélez IA, Moctezuma LG, Inurreta AHD, Gongora GSF. 2015. Productividad y rentabilidad potencial del cacao (*Theobroma cacao*) en el trópico mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6(5): 1051-1063.
- Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He W, Zhang JB, Liao YC. 2015. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 10(2): e0116871.
- Han T, You C, Zhang L, Feng C, Zhang C, Wang J, Kong F. 2016. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank. *BioControl* 61: 195-205.
- Jaaffar AKM, Parejko JA, Paulitz TC, Weller DM, Thomashow LS. 2017. Sensitivity of *Rhizoctonia* isolates to phenazine-1-carboxylic acid and biological control by phenazine-producing *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 107: 692-703.
- Ley-López N, Márquez-Zequera I, Carrillo-Fasio JA, León-Felix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS, Allende-Molar R. 2018. Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 215-232.
- López-Báez O, Ramírez-González SI, Espinosa-Zaragoza S, Moreno-Martínez JL, Ruiz-Bello C, Villarreal-Fuentes JM, González-Mejía O. 2015. Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. *Acta Agrícola y Pecuaria* 1(1): 16-23.
- Melnick LR, Strem MD, Crozier J, Sicher RC, Bailey BA. 2013. Molecular and metabolic changes of cherrille wilt of cacao and its effect on *Moniliophthora roreri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 84: 153-162.
- Mercado-Flores Y, Cárdenas-Álvarez IO, Rojas-Olvera AV, Pérez-Camarillo JP, Leyva-Mir SG, Anducho-Reyes M.A. 2014. Application of *Bacillus subtilis* in the biological control of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*. *Biological Control* 76: 36-40.
- Phillips-Mora W, Castillo J, Krauss U, Rodríguez E, Wilkinson M J. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology* 54(4): 483-490.
- Phillips-Mora W, Coutiño A, Ortiz CF, López AP, Hernández J, Aime MC. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology* 55(4): 584.
- Phillips-Mora W, Wilkinson MJ. 2007. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97: 1644-1647.
- Plank R. 2005. El empleo del frío en la industria de la alimentación. Editorial Reverte. México. Pp. 807.
- Ramírez-González SI, López-Báez O, Guzmán-Hernández TJ, Munguía-Ulloa S y Moreno Martínez JL. 2011. El polisulfuro de calcio en el manejo de la moniliasis *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). *Evans et al. del cacao Theobroma cacao* L. *Tecnología en Marcha* 24(4): 10-18.
- Sánchez-Mora FD, Garcés-Fiallo. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.* en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria* 3:249-258.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Cierre de la producción agrícola por cultivo SAGARPA. México. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Disponible en línea en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (consulta julio 2020).
- Takam-Soh P, Ndoumbé-Nkeng M, Sache I, Ndong-Nguema EP, Gwet H, Chadoeuf J. 2013. Development stage – dependent susceptibility of cocoa fruit to pod rot caused by *Phytophthora megakarya*. *European Journal Plant Pathology* 135: 363-370.

- Ten Hoopen GM., Deberdt P, Mbenoum M, Cilas C. 2012. Modelling cacao frosty pod growth: implications for disease control. *Annals Applied Biology* 160: 260-272.
- Torres-Cruz M, Ortiz-García CF, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A, Nava-Díaz C. 2011. Efecto de Azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(1): 65–69.
- Torres-De los Santos R, Lourenco JDL, García DMA, Ruiz TJ. 2020. Capítulo III: Señalización bioquímica y molecular en el proceso de interacción microorganismo-raíz. En: Torres de los S. R. Interacciones en la rizósfera de las plantas. Importancia y señalización bioquímica y molecular. Consejo de Publicaciones UAT. Impreso en México. Pp. 61- 86.
- Townsend GK, Heuberger JW. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter* 27: 340-343.
- Villamil-Carvajal JE, Viteri-Rosero SE, Villegas-Orozco WL. 2015. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 68(1): 7441-7450.
- Villareal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130.
- Yáñez-Mendizábal V, Zeriouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, Pérez-García A, Teixidó N. 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology* 132(4): 609-619.
- Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology* 47(2): 138-145.
- Yunga M. 2011. Empaques y técnicas de la conservación de todo tipo de alimentos. Monografía para la obtención de título de Ingeniero Químico. Universidad Católica de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Zhang B, Qin Y, Han Y, Dong C, Li P, Shang Q. 2016. Comparative proteomic analysis reveals intracellular targets for bacillomycin L to induce *Rhizoctonia solani* Kühn hyphal cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Proteins and Proteomics* 1864: 1152-1159.
- Zhang X, Zhou Y, Li Y, Fu X, Wang Q. 2017. Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. *Crop Protection*. 96:173-179.
- Zhao Q, Ran W, Wang H, Li X, Shen Q, Shen S, Xu Y. 2013. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IV1. *BioControl* 58: 283-292.