



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Caracterización de bacterias endófitas formadoras de endosporas procedentes de *Theobroma cacao* L. en Quinindé, Esmeraldas, Ecuador

Characterization of endophytes endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* L. in Quinindé, Esmeraldas, Ecuador

María Aracely Vera Loor¹ , Alexander Bernal-Cabrera² , Danilo Vera Coello¹ , Michel Leiva-Mora³ , Alan Rivero Aragón⁴ , Daniel Arturo Román Robalino⁵ 

¹ Estación Experimental Tropical Pichilingue, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, km 5 vía Quevedo, El Empalme, Cantón Mocache, Los Ríos, Ecuador

² Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

³ Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Cantón Cevallos vía a Quero, sector el Tambo-la Universidad, 1801334, Cevallos, Tungurahua, Ecuador

⁴ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

⁵ Departamento de Agronomía, Facultad de Recursos Naturales, Sede Orellana, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Panamericana Sur km 1 ½, Riobamba, Ecuador

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Recibido: 29/06/2020
Aceptado: 22/06/2021

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no existir conflictos de intereses.

CORRESPONDENCIA

María Aracely Vera Loor
mariverloor2007@gmail.com
Alexander Bernal Cabrera
alexanderbc@uclv.edu.cu



RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar morfológica, fisiológica y molecularmente bacterias endófitas formadoras de endosporas procedentes de *Theobroma cacao* L. en Quinindé, Esmeraldas, Ecuador. El aislamiento de las bacterias se realizó a partir de secciones de tejidos de mazorcas y pedicelos de la flor, en cultivares de cacao Criollo tipo Nacional, sin síntomas de enfermedad. Posteriormente, se caracterizaron las bacterias desde el punto de vista cultural, morfológico y fisiológico de acuerdo a metodologías referenciadas en la literatura científica. La confirmación de la identidad de las bacterias se realizó mediante la secuenciación del ADNr 16S. Se obtuvieron 45 aislados de bacterias endófitas formadoras de endosporas, asociados con tejidos del endocarpio. Todas las cepas mostraron características culturales, morfológicas y fisiológicas semejantes al género *Bacillus*. La secuenciación confirmó los criterios anteriores y las principales especies identificadas fueron *Bacillus subtilis*,

Bacillus amyloliquefaciens, *Bacillus mycoides* y *Bacillus cereus* con un 99 % de similitud, mientras otras cepas no produjeron una secuencia consenso óptima, por lo que se clasificaron como *Bacillus* sp.

Palabras clave: *Bacillus*, biocontrol, cacao, endocarpio, pedicelo de flores

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize cultural, morphological, physiological and molecular endospore forming endophytic bacteria associated with *Theobroma cacao* L. in Quinindé canton, Esmeraldas province, Ecuador. Isolation of bacteria was done from healthy pods and flower pedicels from cocoa Criollo Type Nacional cultivar. Bacteria isolates were characterized cultural, morphological, physiological and molecular. Identification of bacteria isolates were analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. Forty-five endospore forming endophytic bacteria were recovered from healthy pods and flowers peduncles, mainly from endocarp. Based on their cultural, morphological and physiological characteristics they were similar to *Bacillus*. According to 16S rDNA sequence alignment isolates were classified like *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus cereus* with 99 % sequence similarity. Some bacteria isolates did not produced optimal consensus sequences and were classified under the genus *Bacillus*.

Keywords: *Bacillus*, biocontrol, cocoa, endocarp, flower pedicel

INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L. es un árbol del sotobosque tropical, de gran importancia económica, pues de sus "semillas" procesadas se obtienen productos como el chocolate. En el año 2020, Ecuador exportó más de 345 000 t de granos de cacao y semielaborados, lo cual constituye el equivalente a 850 millones de dólares. Actualmente la industria chocolatera mundial es valorada en 80 mil millones USD/año (The Guardian, 2021).

En los últimos años se ha informado acerca de la diversidad y el potencial de las bacterias endófitas asociadas a las plantas (organismos que colonizan los tejidos: hojas, frutos, tallos y raíces de plantas, sin causar enfermedad) como agentes de biocontrol y promotores del crecimiento vegetal (Khan *et al.*, 2020). Sin embargo, solo una pequeña parte de la diversidad microbiana ha sido descrita y caracterizada.

El uso de bacterias endófitas en la agricultura tiene un inmenso potencial para reducir los efectos adversos ambientales provocados por el uso indiscriminado de agroquímicos. Estas bacterias son capaces de sintetizar fitohormonas como el ácido-

indolacético (AIA), citoquininas, giberelinas y sideróforos que promueven el crecimiento de las plantas. Además, se ha informado que especies endófitas de los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* son efectivas en la inhibición del crecimiento *in vitro* e *in vivo* de microorganismos fitopatógenos. Mientras tanto, otras especies endófitas de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* e *Isopterocola* mejoran el estrés a la sequía, el calor y la salinidad en diferentes cultivos (Kandel *et al.*, 2017).

Las bacterias endófitas, especialmente el género *Bacillus* spp. ha comenzado a recibir atención para el control de las enfermedades del cacao, aunque menos que el uso de hongos antagonistas (Ten-Hoopen y Krauss, 2016). En este sentido, Melnick *et al.* (2008) demostraron que las bacterias del género *Bacillus* eran capaces de colonizar hojas de cacao, principalmente como epífitas, pero también como endófitas.

Melnick *et al.* (2011), en un estudio sobre el uso de bacterias endófitas formadoras de endosporas para el control de enfermedades

de cacao, encontraron que en este árbol pueden coexistir múltiples especies de bacterias formadoras de endosporas. Las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus cereus* exhibieron antagonismo contra los tres agentes patógenos principales del cacao, *Phytophthora* spp., *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*.

Ouattara *et al.* (2019) demostraron la importancia de seleccionar bacterias endófitas nativas de seis regiones productoras de cacao en Costa de Marfil. Se realizaron estudios “*in vitro*”, así como en invernadero con el objetivo de desarrollar formulaciones que promuevan el crecimiento y desarrollo de plantas de cacao de las variedades P7 y NA32.

En el cantón Quinindé de la provincia Esmeraldas, Ecuador no se habían realizado investigaciones sobre la utilización de bacterias endófitas para el control de las enfermedades del cacao. Sin embargo, dados los resultados interesantes presentados, ciertamente merece mayor atención debido a que pueden ayudar a conservar la estabilidad y diversidad de las comunidades agrícolas, reducir los insumos químicos y ayudar a los agricultores a adaptarse a un mundo en rápido cambio donde la intensificación agrícola, el uso de la tierra y el cambio climático aumentan el riesgo de epifitias devastadoras (Ek-Ramos *et al.*, 2019).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológica, fisiológica y molecularmente cepas de bacterias endófitas

formadoras de endosporas procedentes de *T. cacao* en Quinindé, Esmeraldas, Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología, del departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Tropical Pichilingue. Este laboratorio perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) (1° 05' de Latitud Sur y 79° 26' de Longitud Occidental), Cantón Mocache, provincia Los Ríos, Ecuador.

Las prospecciones de las potenciales bacterias endófitas se realizaron en fincas de producción de cacao que no habían sido sometidas a la aplicación de fungicidas, con diferentes edades y ubicadas en Parroquias dentro del cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas (Tabla 1). Estas se encontraban plantadas con el cultivar de cacao Criollo tipo Nacional. En cada finca se colectaron mazorcas sin síntomas aparentes de la enfermedad y cojines florales mediante un muestreo al azar.

Las muestras, previamente etiquetadas, se trasladaron envueltas en bolsas de papel al laboratorio de Fitopatología. Posteriormente fueron procesadas según lo sugerido por Melnick *et al.* (2011).

Procesamiento de las muestras

Las mazorcas fueron sometidas a un proceso de lavado con agua corriente y detergente por 5 min. Bajo cámara de flujo laminar se procedió a la desinfección de los

Tabla 1. Descripción de los sitios de colecta en Quinindé, provincia de Esmeraldas

Parroquias	Propietario de las fincas	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud (msnm)	Edad del cultivo (años)
Malimpia	Sra. Maura Solis	0°67'45"	0°49'44"	95	13
	Sr. German	0°67'55"	0°48'56"	98	12
	Sr. Walter Alcivas	0°67'56"	0°48'23"	98	1 ½
Rosa Zarate	Sr. Jairo Gómez	0°18'35"	79°24'57"	123	13
	Sr. Quintana	0°18'49"	79°25'32"	118	14
	Sr. Manuel Brizeño	0°19'29"	79°26'23"	116	35
La Unión	Sra. Marta Díaz	0°7'44"	79°24'2"	193	40
	Sr. José Cunalata	0°8'4"	79°23'4"	181	5
	La Marujita	0°13'38"	79°24'46"	154	10

tejidos con hipoclorito de sodio al 0,525 % por 3 min, seguido con alcohol al 70 % (v/v) durante 2 min y por último se realizó un lavado con agua estéril por 1 min. Las muestras se colocaron sobre papel absorbente estéril y se dejaron secar.

Aislamiento de bacterias endófitas

Se tomaron los tejidos de la mazorca (mesocarpio y endocarpio) previamente desinfectados y se colocaron en tubos de ensayo (150 x 22 mm) con 5,0 mL de tampón fosfato de potasio estéril 0,1 M (pH 7) e incubaron a 75 °C en baño de María (Memmert, GmbH, Schwabach, Alemania) durante 15 min. Luego, se procedió a la trituración de los tejidos y siembra en medio de cultivo Agar Triptona Soya (TSA, Difco), por el método de diseminación o extensión con la ayuda de una espátula metálica estéril de Drigalsky (Similar a lo sugerido por Melnick *et al.*, 2011). Las colonias que presentaron características macroscópicas diferentes se subcultivaron independientemente en medio de cultivo TSA e incubaron a 28±1 °C por 24 h, hasta su posterior verificación de crecimiento.

Verificación de la presencia de endosporas

La presencia de bacterias con endosporas se verificó mediante la siembra de las bacterias en tubos de ensayo con 5 mL de medio de cultivo Caldo Triptona Soya (TSB, Difco) e incubadas a 28±1 °C por 3 días. Seguidamente, los cultivos se incubaron a 75 °C durante 15 min. Finalmente, los cultivos bacterianos se extendieron en placas de Petri con medio de cultivo TSA bajo condiciones de incubación de 28±1 °C por 24 h, hasta observar crecimiento bacteriano. Este procedimiento fue repetido para confirmar los resultados. También, se realizaron tinciones de endosporas mediante el método propuesto por Schaeffer y Fulton (Hussey y Zayaitz, 2007), mediante observaciones al microscopio óptico (Karl Zeiss, Alemania) con aceite de inmersión y un aumento de 1000 x.

Características fenotípicas

Se describieron los caracteres morfológicos (forma, agrupación y respuesta a la tinción) mediante tinciones simples y tinción de Gram y observaciones al microscopio óptico (Karl Zeiss,

Alemania) con un aumento 1000 x. A los aislados que resultaron ser bacilos Gram positivos se les realizó la prueba de la catalasa (Reiner, 2010).

Identificación molecular

Se realizó la extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de las cepas de bacterias endófitas sembradas a 28±1 °C por 24 h en medio de cultivo TSA. El proceso de extracción se hizo acorde a las normas de manufactura de PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), con un volumen de elución de ADN final a 100 µL por muestra. A partir del ADN total se amplificó la región ADN_r 16S mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usando los cebadores universales: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (Hogg y Lehane, 1999) y 1492R (5'-GGTACCTTGTTCGACTT-3') (Turner *et al.*, 1999), a una concentración de 25 pmol.

Las condiciones de la PCR fueron: 35 ciclos, con desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de los ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, temperatura de anillamiento a 50 °C por 30 s, con extensión a 72 °C por 2 min, seguido de una extensión final a 72 °C por 10 min. El volumen de reacción de la PCR fue de 25 µL: 2,5 µL de 10x Pfx tampón de amplificación, 17,4 µL de agua desionizada, destilada estéril, 0,8 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de 10 mM MgSO₄, de cada cebador 0,8 µL, 0,8 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,2 µL de Platinum Pfx® de Invitrogen y 2 µL de ADN.

Los productos de amplificación mediante PCR se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % más 1x GelRed® Safe Nucleid Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, EE. UU.). Las condiciones de corrida fueron: 128 V, 3000 mA por 20 min. Se utilizó 2 µL de marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen), en el gel se cargó 2 µL del producto de PCR más 3 µL de bromo fenol azul. El tampón de corrida fue SB 1X. Los productos de PCR fueron purificados con el protocolo para PureLink™ PCR Purification Kit, obteniendo un volumen final de 60 µL. Los productos positivos fueron enviados a secuenciar en Macrogen (Seoul-Korea).

Los cromatogramas de las secuencias obtenidas se verificaron Sequencher 4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, EE. UU.). Las

secuencias correctas fueron comparadas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), los alineamientos con las secuencias desde la base de datos se realizaron usando G-INS-i implementado en MAFFT v5.667. Las filogenias se construyeron mediante el método de vecino más cercano y con una máxima verosimilitud (ML) implementado en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), donde los valores ubicados en los diferentes clados y nodos fueron mayores al 50 %.

Para establecer relación entre la frecuencia de los aislados bacterianos con la altitud y edad del cultivo se usaron los coeficientes de correlación

de Spearman y Tau de Kendal. Se empleó el paquete estadístico STATISTICA versión 12.0 sobre Windows.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias endófitas

A partir del método de aislamiento descrito se obtuvieron 45 aislados bacterianos asociados a los tejidos vegetales muestreados. La mayoría de ellos (55,5 %) procedieron del endocarpio, algunos del mesocarpio (26,7 %) y solo unos pocos (17,8 %) del pedicelo de la flor (Figura 1). No se encontró asociación significativa entre el número de aislados bacterianos con la altitud de

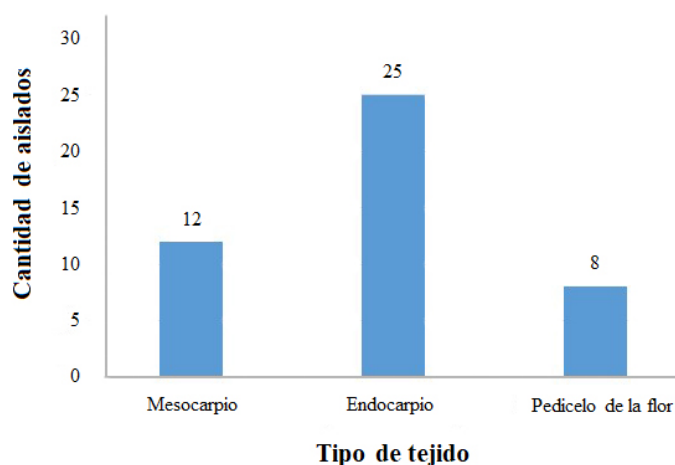


Figura 1. Frecuencia de distribución de bacterias endófitas aisladas de secciones de tejidos de *Theobroma cacao*

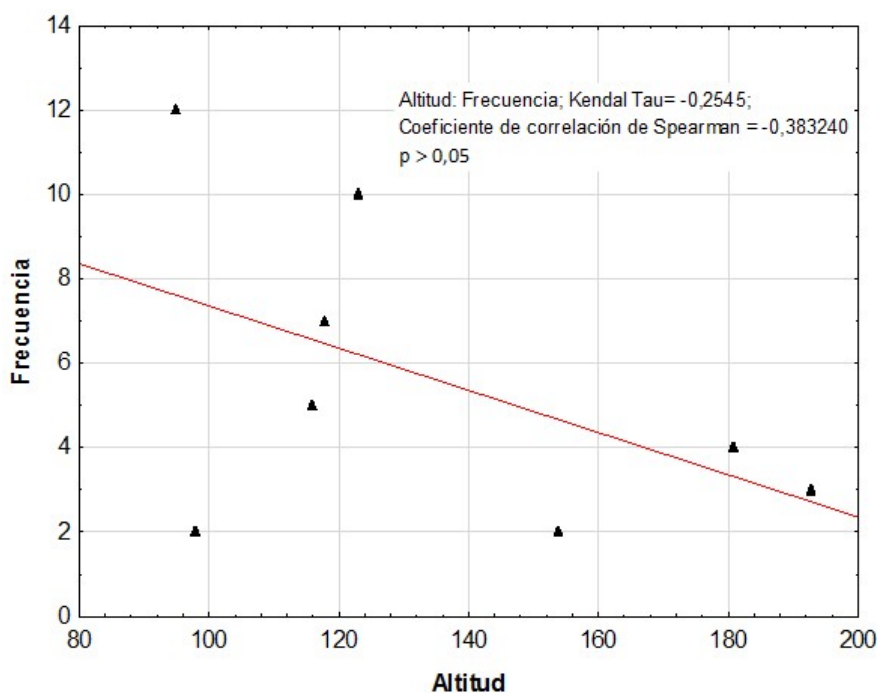


Figura 2. Correlación entre la frecuencia de aislados bacterianos y la altitud del cultivo

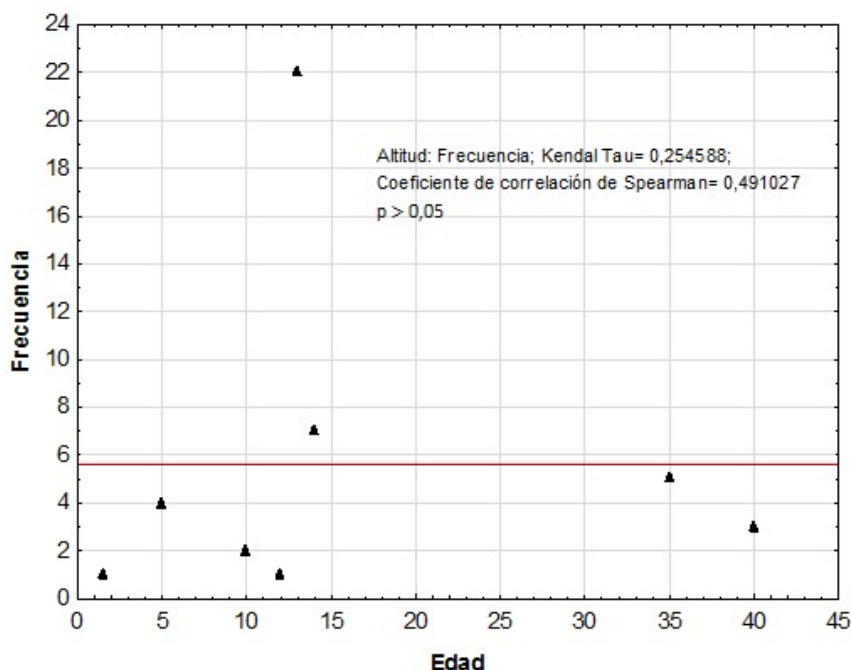


Figura 3. Correlación entre el número de aislados bacterianos y la edad del cultivo

la finca y edad del cultivo (Figuras 2 y 3), aunque hubo una ligera tendencia a la disminución de los aislados hacia los sitios de mayor altitud (Figura 1).

Por otro lado, no se encontró relación entre el número de aislados bacterianos con la altitud y edad del cultivo (Kendal Tau = 0,2545) (Figuras 2 y 3).

Características fenotípicas

Se observó que las colonias de bacterias aisladas en medio de cultivo TSA a las 72 h tenían características culturales y morfológicas

macroscópicas semejantes a las del género *Bacillus*, tales como tamaño mediano-grande, borde irregular, elevación planoconvexa y color blanquecino (Figura 4 A). Después de realizar la tinción de Gram, se constató a nivel microscópico, que todos los aislados resultaron ser bacilos Gram positivos (Figura 4 B), formadores de endosporas (Figura 5 A) y catalasas positivas (Figura 5 B).

Este resultado puede atribuirse al método de aislamiento utilizado (tratamiento térmico), el cual eliminó todas las bacterias que no produjeron endosporas, y probablemente la

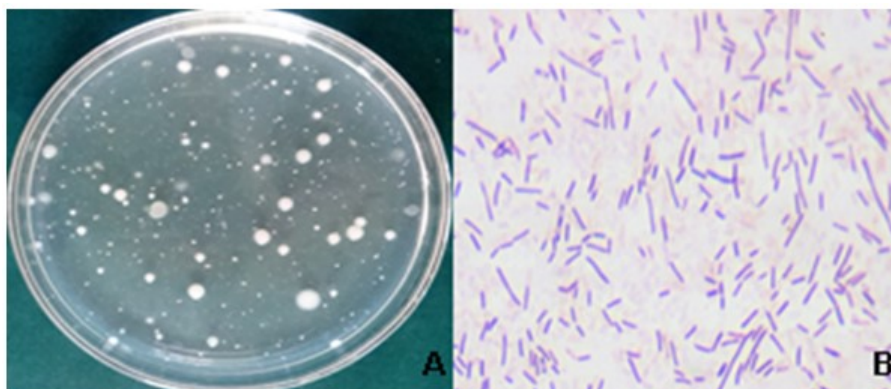


Figura 4. Características culturales y morfológicas de *Bacillus* sp. (aislado # 33), con aumento de 1000 X
A) Morfología macroscópica; B) Células bacilares Gram positivas

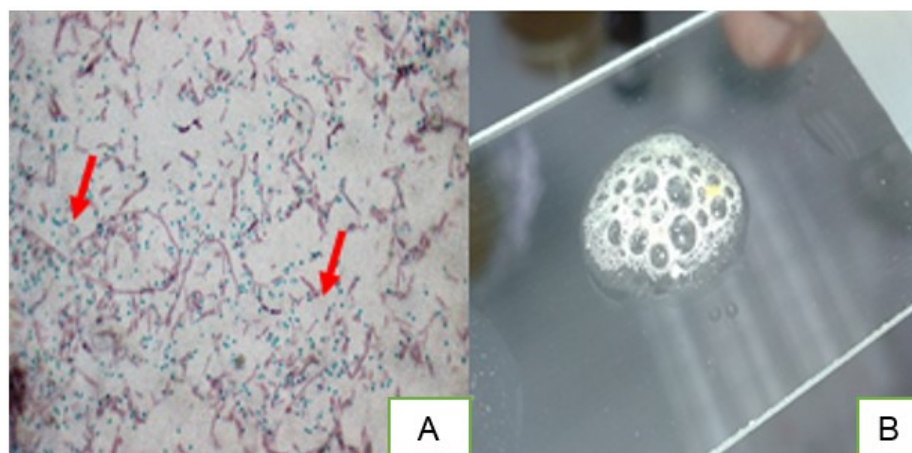


Figura 5. Características fisiológicas de *Bacillus* sp. (aislado # 33), con aumento de 1000 X
A) endosporas (flechas rojas); B) prueba de la enzima catalasa (positiva)

mayoría de los géneros bacterianos, incluyendo bacterias formadoras de endosporas que estaban creciendo en una etapa vegetativa en el momento del muestreo. De forma semejante, Földes *et al.* (2000) consideraron muy apropiadas estas técnicas de aislamiento del género *Bacillus* donde es importante caracterizar la termoresistencia de las endosporas bacterianas pues estas le pueden garantizar mayor persistencia a las bacterias en los tejidos vegetales, lo cual es una condición necesaria para seleccionar candidatos promisorios para el control biológico de agentes fitopatógenos.

En el estudio de Melnick *et al.* (2008), para la caracterización fenotípica de *Bacillus* en el medio de cultivo TSA, se tomó en cuenta el tamaño, forma, elevación, margen y color, obteniendo como resultado colonias medianas a grandes, de borde irregular, elevación planoconvexa y color blanco/crema, corroborando estas características para el género *Bacillus* como las observadas en la presente investigación.

De los aislados obtenidos, la mayoría fueron del endocarpio de la mazorca del cacao (Figura 1). Este hallazgo pudiera explicarse por la interrelación entre la flor y el fruto, así como la composición química del mucílago del cacao, el cual posee un alto contenido de agua y es rico en azúcares, proteínas y pectinas, sustancias que conforman un medio favorable para la multiplicación de bacterias.

Por otro lado, este resultado no concuerda con informes publicados por Hallmann (2001), quien planteó que los endófitos bacterianos son colonizadores poco abundantes en los tejidos de flores, frutos y semillas de diferentes especies de plantas. Este mismo autor afirmó que, en condiciones naturales, la mayoría de las flores y frutos no contienen bacterias endófitas o solo pueden alcanzar densidades de población muy bajas (10^2 - 10^3 UFC g^{-1} de masa fresca de tejido vegetal).

De los árboles de *T. cacao* se han aislado bacterias asociadas a los tejidos; sin embargo, como colonizadores endófitos solo se informa el trabajo realizado por Melnick *et al.* (2011) en la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EET-Pichilingue) en la provincia Los Ríos, Ecuador. Estos investigadores obtuvieron 69 aislados de bacterias endófitas formadoras de endosporas pertenecientes al género *Bacillus*, a partir de los tejidos de hojas, ramas, cojines florales y mazorca, de una colección de clones de *T. cacao* tipo Nacional procedente del programa de mejoramiento genético del cultivo con fines de emplear en el control biológico de los principales hongos patógenos que afectan la mazorca de cacao.

Asimismo, Macagnan *et al.* (2006) aislaron bacterias formadoras de endosporas del rizoplano y rizósfera de la planta, aunque no especifican sobre su identificación; de manera contraria a los actinomicetos de la carpósfera de mazorcas de cacao, los cuales pertenecen a

varias especies del género *Streptomyces* (Barreto *et al.*, 2008).

A pesar de que los investigadores citados anteriormente trabajaron con bacterias asociadas a las plantas, ninguno de ellos analizó el aislamiento de bacterias endófitas procedentes de secciones de tejido de mazorcas de cacao. Este aspecto constituye una novedad del presente trabajo, al obtener en los frutos más jóvenes la mayor cantidad de bacterias. La explicación a este resultado tiene relación con el grosor de la epidermis de los frutos jóvenes, la cual se encuentra menos esclerotizada y facilita una mejor colonización por las bacterias, fenómeno que se dificulta a medida que avanza el crecimiento y desarrollo del fruto. Además, si se toma en cuenta que las mazorcas de cacao son más susceptibles a *M. roleri* en los tres primeros meses de desarrollo, este resultado aseguraría una mayor probabilidad de protección del fruto contra este hongo basidiomicete fitopatógeno.

Identificación molecular

El árbol filogenético construido con secuencias del gen *ADNr 16S* de las cepas aisladas del cacao reveló que todas pertenecían al género *Bacillus* (Figura 6). La identificación basada en criterios morfológicos coincidió con los criterios moleculares correspondientes a la secuenciación del gen que codifica para el *ARNr 16S* y las principales especies identificadas fueron *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mycoides* y *B. cereus* con un 99 % de similitud, mientras otras cepas no produjeron una secuencia consenso óptima, por lo que se clasificaron como *Bacillus* sp. (Figura 6).

El género *Bacillus* comprende actualmente más de 336 especies, por lo que la clasificación basada en un gen único tiene bajo poder de resolución a este nivel. El *ADNr 16S* cumple con varias propiedades que lo hacen el marcador molecular simple más utilizado para la clasificación de organismos procariontes por ser altamente conservador, ubicuo, homólogo, funcionalmente constante, estable, poco sujeto a mecanismos de transferencia lateral de genes,

contiene regiones variables e hipervariables y ofrece buena concordancia con los estudios basados en el genoma (LPSN, 2016). No obstante, la secuenciación del *ADNr 16S* no puede diferenciar de forma confiable entre dos especies bacterianas estrechamente relacionadas, es necesario la combinación de otros genes esenciales tales como *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoD*, *gyrA*, *gyrB*, *recA*, *recB* que son igualmente útiles para la identificación de especies del género *Bacillus* (Glazunova *et al.*, 2009).

Este estudio contribuyó a un mejor entendimiento del conocimiento del microbioma del cacao, al encontrar, por primera vez en muestras de frutos del cultivar Criollo tipo Nacional (autóctono de Ecuador), varias especies de bacterias endófitas formadoras de endosporas del género *Bacillus* asociados a los tejidos de los órganos reproductivos (flores y mazorcas). De manera semejante, otros autores como Hanada *et al.* (2010) han encontrado una gran diversidad de hongos endófitos que coexisten con las bacterias.

Estos resultados constituyen el primer paso hacia la selección de cepas eficientes de bacterias endófitas formadoras de endosporas como agentes de control biológico contra los principales hongos fitopatógenos que afectan el cultivo del cacao. De esta forma se continúan los estudios para esclarecer sus relaciones microbianas que se establecen entre estas especies y su respuesta en la interacción con la planta.

CONCLUSIONES

Se caracterizaron e identificaron cepas endófitas de *Bacillus* spp. asociadas con frutos y pedicelos florales de *T. cacao*, que pudieran ser empleadas en el futuro como agentes de control biológico de las principales enfermedades fúngicas que limitan la producción cacaotera en Quinindé, Esmeraldas, Ecuador.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

María Aracely Vera Loor: Concibió la idea de la investigación. Colaboró en el diseño de la

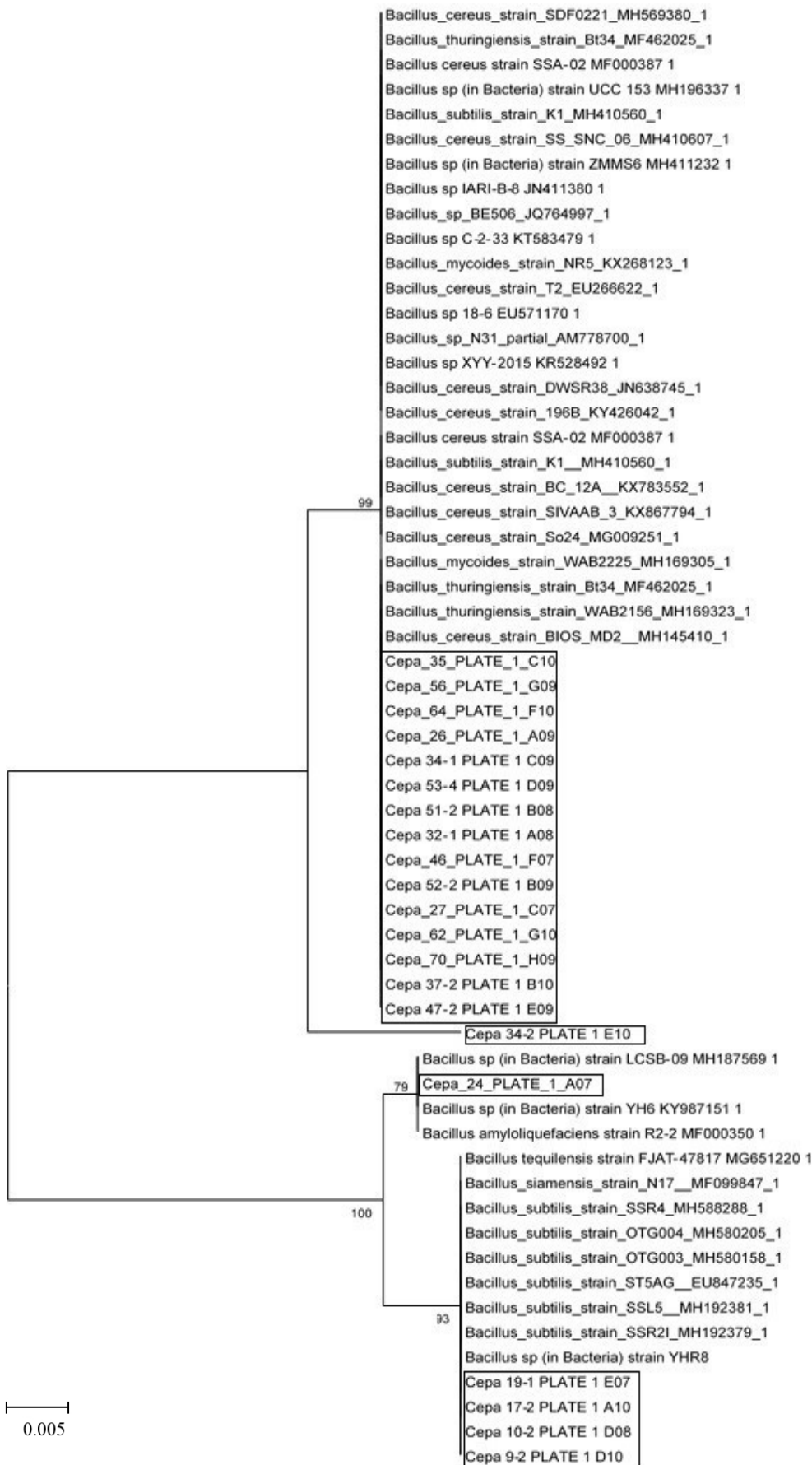


Figura 6. Árbol filogenético de Máxima probabilidad, basado en la secuencia de los genes *ADNr 16S*, que muestra la relación entre las cepas endófitas de *Bacillus* aisladas de *Theobroma cacao* L. Árbol construido por el método de máxima probabilidad en MEGA 7. Valores de Bootstrap ≥ 50 (basado en 1000 réplicas) para cada nodo

investigación. Participó en la búsqueda de información. Participó en el análisis e interpretación de los resultados y escritura del manuscrito final.

Alexander Bernal Cabrera: Concibió la idea de la investigación. Realizó contribuciones en el análisis e interpretación de los datos. Participó en la búsqueda de información, en el diseño de la investigación, en la recolección de los datos. Realizó pruebas para evaluar los resultados. Participó en el análisis, revisión y redacción del manuscrito final.

Danilo Vera Coello: Participó en el diseño de la investigación. Participó en el análisis de los resultados y la revisión crítica del contenido del manuscrito para la aprobación final.

Michel Leiva Mora: Participó en la búsqueda de información. Participó en el análisis de los resultados y la revisión crítica del contenido del manuscrito para la aprobación final.

Alan Rivero Aragón: Participó en el procesamiento estadístico de los datos e interpretación de los resultados.

Daniel Arturo Román Robalino: Colaboró en la investigación. Participó en la búsqueda de información, en el diseño de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

BARRETO, T., SILVA, A., SOARES, A. and SOUZA, J. 2008. Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rhizosphere of *Theobroma cacao*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39 (3): 464-470.

EK-RAMOS, M., GOMEZ-FLORES, R., OROZCO-FLORES, A., *et al.* 2019. Bioactive Products from plant-endophytic Gram-Positive Bacteria. *Frontier in Microbiology*, 10: 463.

FÖLDES, T., BANHEGYI, I., HERPAI, Z., *et al.* 2000. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 89 (5): 840-846.

GLAZUNOVA, O. O., RAOULT, D. and ROUX, V. 2009. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2317-2322.

HALLMANN, J. 2001. Plant interactions with endophytic bacteria. In: CABI Publishing, New York, pp. 87-119.

HANADA, R., POMELLA, A., COSTA, H., *et al.* 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology*, 114 (11-12): 901-910.

HOGG, J. and LEHANE, M. 1999. Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4227-4229.

HUSSEY, M. and ZAYAITZ, A. 2007. Endospore stain protocol. Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3112.pdf> Consultado: 17/6/2019.

KANDEL, S. L., FIRRINCIELI, A., JOUBERT, P. M., *et al.* 2017. An *in vitro* study of biocontrol and plant growth promotion potential of Salicaceae endophytes. *Frontier in Microbiology*, 8: 1e16.

KHAN, S. S., VERMA, V. and RASOOL, S. 2020. Diversity and the role of endophytic bacteria: a review. *Botanica Servica*, 44 (2): 103-120.

KUMAR, S., STECHER, G. and TAMURA, K. 2016. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33 (7): 1870-1874.

LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature). 2016. Genus *Bacillus*.

- Microbiology Society, United Kingdom. Disponible en: <http://www.bacterio.net/bacillus.html> Consultado: 10/03/2020.
- MACAGNAN, D., ROMEIRO, R., DE-SOUZA, J. and POMELLA, A. 2006. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*, 34 (2): 122-132.
- MELNICK, R., ZIDACK, N., BAILEY, B., *et al.* 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*, 46 (1): 46-56.
- MELNICK, R., SUÁREZ, C., BAILEY, B. and BACKMAN, P. 2011. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57 (3): 236-245.
- OUATTARA, A., COULIBALY, K., KONATE, I., *et al.* 2019. Selection of cocoa tree (*Theobroma cacao* Linn) endophytic bacteria solubilizing tri-calcium phosphate, isolated from seedlings grown on soils of six producing regions of Côte d'Ivoire. *Advances in Microbiology*, 9 (9): 842-852.
- REINER, K. 2010. Catalase test protocol. American Society For Microbiology, ASM Microbe Library.
- TEN-HOOPEN, G. and KRAUSS, U. 2016. Biological control of cacao diseases. In: Bailey, B. A. and Meinhardt, L. W. (eds.). *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 511-566.
- THE GUARDIAN. 2021. The future of chocolate: Why cocoa production is at risk. Disponible en: <http://www.theguardian.com/sustainablebusiness/fairtrade-partnerzone/chocolatecocoa-production-risk>. Consultado: 26/05/2021.
- TURNER, S., PRYER, K. M., MIAO, V. P. W. and PALMER, J. D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46 (4): 327-338.



Artículo de libre acceso bajo los términos de una *Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional*. Se permite, sin restricciones, el uso, distribución, traducción y reproducción del documento, siempre que la obra sea debidamente citada.