



Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

**Capacidad de control biológico *in vitro* de levaduras del Parque Nacional
Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor frente al hongo *Moniliophthora roreri*,
agente causal de la moniliasis en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*)**

Tesis presentada por:

Vargas Carbajal, Ivet

ORCID: 0009-0005-1341-5365

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Mag. Barreda del Carpio, Jaime Ernesto

ORCID: 0000-0003-4050-7466

Arequipa – Perú

2026

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 03 de Septiembre del 2025

Dictamen: 011785-C-EPIB-2025

Visto el borrador del expediente 011785, presentado por:

2017250422 - VARGAS CARBAJAL IVET

Titulado:

**CAPACIDAD DE CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE LEVADURAS DEL PARQUE NACIONAL
ICHIGKAT MUJA-CORDILLERA DEL CÓNDOR FRENTE AL HONGO MONILIOPHTHORA RORERI,
AGENTE CAUSAL DE LA MONILIASIS EN EL CULTIVO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L.)**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**29630612 - TERAN DIANDERAS ADILMI MILAGRO
DICTAMINADOR**



**45945764 - YUGRA CONDORI MONICA MEYLIN
DICTAMINADOR**



**71093620 - JOHNSON CORRALES FABRIZIO
DICTAMINADOR**



CAPACIDAD DE CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE LEVADURAS DEL PARQUE NACIONAL ICHIGKAT MUJA-CORDILLERA DEL CÓNDOR FRENTE AL HONGO MONILIOPHTHORA RORERI, AGENTE CAUSAL DE LA MONILIASIS

INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

[doczz.es](#)

Fuente de Internet

1%

2

[hdl.handle.net](#)

Fuente de Internet

1%

3

[repositorio.unu.edu.pe](#)

Fuente de Internet

1%

4

[pubs.acs.org](#)

Fuente de Internet

1%

5

[repository.agrosavia.co](#)

Fuente de Internet

1%

6

[orcid.org](#)

Fuente de Internet

1%

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi refugio y fortaleza en cada paso de mi vida.

A mis padres, German y Victoria, por ser mi apoyo constante y sus sacrificios me han permitido alcanzar cada logro en mi vida a pesar de las dificultades

A mi hermana Sofía, por su cariño y alegría.

A mi hermano Eric, quien, aunque muchas veces fue exigente y poco paciente, me enseñó con palabras directas a ser más fuerte, enfrentar los retos de la vida con valentía. Sus enseñanzas, aunque a veces duras, han sido para mí hasta ahora una de las mejores guías.

A mi familia le dedico con amor y gratitud esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis.

A LABISANV, el laboratorio donde realicé mi tesis, por brindarme el espacio, los recursos y el apoyo necesario para desarrollar este trabajo. Agradezco especialmente a sus investigadores y colaboradores, quienes me guiaron y me permitieron llevar a cabo mis experimentos en un ambiente de aprendizaje y profesionalismo.

A mi asesor, Jaime Barreda, que me ayudó a resolver mis dudas.

A mis coasesores, Kelvin Llanos y el Dr. Jorge Díaz, por su valioso apoyo, conocimientos y orientación a lo largo de este proceso. Su acompañamiento fue fundamental para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco al Proyecto N.º PE501088572-2024-PROCIENCIA, ejecutado por el Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), en el marco del Contrato N.º PE501088572-2024-PROCIENCIA, por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo de investigación.

A todas aquellas personas que, de una u otra manera, contribuyeron en el desarrollo de este trabajo, brindándome su apoyo, conocimientos y palabras de aliento.

RESUMEN

Las levaduras son microorganismos poco conocidos que cuentan con potencial para su uso como alternativas sostenibles de biocontrol. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad biocontroladora de levaduras aisladas del Parque Nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor frente a *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis en el cacao (*Theobroma cacao* L.).

Se emplearon dos métodos para evaluar dicha capacidad: **Método N°01 (Ensayo de confrontación dual)**, basado en la posible emisión de compuestos volátiles, y **Método N°02 (Ensayo de confrontación directo)**, basado en la interacción física de ambos microorganismos.

Los resultados mostraron que existen levaduras que ejercen un efecto inhibitorio significativo sobre el desarrollo de *M. roreri*, cuyo resultado de inhibición varía según el método usado y la cepa de procedencia del patógeno (Cusco, Bagua e Iquitos).

En el método de contacto indirecto, las especies *M. guilliermondii* (EGZ-01, EGZ-23, EGZ-33, EGZ-41, EGZ-53), *Kwoniella heveanensis* (EGZ-64) y *Wickerhamomyces edaphicus* (EGZ-38) alcanzaron porcentajes de inhibición de hasta 99.87%, por posible emisión de compuestos orgánicos volátiles.

Por otro lado, en el método de contacto directo, se registraron áreas mínimas de crecimiento del hongo patógeno de hasta 47.20 mm² al interactuar con las especies *M. guilliermondii*, *W. edaphicus* y *Candida* sp. (EGZ-03). Se deduce como posible mecanismo de acción fue la competencia por nutrientes y espacio, además de la producción de enzimas hidrolíticas y micoparasitismo.

Por último, las levaduras que lograron inhibir la germinación de las esporas del patógeno fueron *M. guilliermondii* (EGZ-01, EGZ-33, EGZ-41, EGZ-53 y EGZ-63), *Candida* sp. (EGZ-03), *W. edaphicus* (EGZ-38), siendo la especie *M. guilliermondii* la que llegó a inhibir hasta el 100% las esporas del patógeno.

Además, se observaron levaduras que tuvieron efecto en ambos métodos, lo que indica que dichas levaduras pueden ejercer más de un mecanismo para la inhibición de crecimiento micelial como *M. guilliermondii* y *W. edaphicus* (EGZ-38).

Los resultados evidencian el potencial de las levaduras como agentes de biocontrol frente a *M. roreri*. Sin embargo, es fundamental profundizar en la caracterización de los mecanismos de acción involucrados y validar el efecto bajo condiciones de campo.

Palabras clave: Biocontrol, levaduras, *Moniliophthora roreri*.

ABSTRACT

Yeasts are little-known microorganisms that have potential for use as sustainable biocontrol alternatives. The present study aimed to evaluate the biocontrol capacity of yeasts isolated from the Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor National Park against *Moniliophthora roreri*, the causative agent of moniliasis in cacao (*Theobroma cacao* L.).

Two methods were used to evaluate this capacity: Method No. 1 (Dual Confrontation Assay), based on the potential emission of volatile compounds, and Method No. 2 (Direct Confrontation Assay), based on the physical interaction of both microorganisms.

The results showed that some yeasts exert a significant inhibitory effect on the development of *M. roreri*, with the inhibition rate varying depending on the method used and the strain of origin of the pathogen (Cusco, Bagua, and Iquitos).

In the indirect contact method, the species *M. guilliermondii* (EGZ-01, EGZ-23, EGZ-33, EGZ-41, EGZ-53), *Kwoniella heveanensis* (EGZ-64), and *Wickerhamomyces edaphicus* (EGZ-38) achieved inhibition percentages of up to 99.87%, due to potential emission of volatile organic compounds.

On the other hand, in the direct contact method, minimum growth areas of up to 47.20 mm² of the pathogenic fungus were recorded when interacting with the species *M. guilliermondii*, *W. edaphicus*, and *Candida sp.* (EGZ-03). Possible mechanisms of action are inferred to be competition for nutrients and space, in addition to the production of hydrolytic enzymes and mycoparasitism.

Finally, the yeasts that successfully inhibited pathogen spore germination were *M. guilliermondii* (EGZ-01, EGZ-33, EGZ-41, EGZ-53, and EGZ-63), *Candida sp.* (EGZ-03), and *W. edaphicus* (EGZ-38), with *M. guilliermondii* inhibiting up to 100% of pathogen spores.

Furthermore, yeasts were observed to be effective in both methods, indicating that these yeasts can exert more than one mechanism for inhibiting mycelial growth, such as *M. guilliermondii* and *W. edaphicus* (EGZ-38).

The results demonstrate the potential of yeasts as biocontrol agents against *M. roreri*. However, further characterization of the mechanisms involved and validation of their effect under field conditions is essential.

Keywords: *Biocontrol, yeasts, Moniliophthora*

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	4
VARIABLES E INDICADORES	5
CAPÍTULO I.....	6
1. Marco teórico	7
1.1. Cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>)	7
1.1.1. Clasificación taxonómica	7
1.1.2. Importancia económica y social del cultivo	8
1.1.3. Principales enfermedades que afectan al cultivo de cacao.....	9
1.1.4. Mecanismos de ensamblaje del microbioma de la filósfera.....	10
1.2. <i>Moniliophthora roreri</i>	10
1.2.1. Clasificación taxonómica	10
1.2.2. Origen y distribución de la enfermedad	11
1.2.3. Morfología.....	11
1.2.4. Síntomas	12
1.2.5. Ciclo de la enfermedad.....	14
1.3. Estrategias de control.....	15
1.3.1. Métodos convencionales	15
1.3.2. Control biológico.....	16
1.4. Levaduras evaluadas y sus antecedentes	24

1.4.1.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	24
1.4.2.	<i>Candida sp</i>	24
1.4.3.	<i>Hannaella phetchabunensis</i> y <i>H. taiwanensis</i>	25
1.4.4.	<i>Rhodosporidiobolus ruineae</i>	25
1.4.5.	<i>Moeszyomices sp</i>	25
1.4.6.	<i>Sporobolomyces japonicus</i>	25
1.4.7.	<i>Debaromyces hansenii</i>	25
1.4.8.	<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>	26
1.5.	Parque Nacional Ichigkat Muja	26
CAPÍTULO II		28
1.	Materiales y métodos	29
1.1.	Lugar de ejecución.....	29
1.2.	Materiales	29
1.2.1.	Material biológico	29
1.2.2.	Insumos	31
1.2.3.	Reactivos químicos	31
1.2.4.	Materiales de laboratorio.....	31
1.2.5.	Aparatos y equipos	32
1.3.	Métodos	32
1.3.1.	Subcultivos de las cepas de levaduras y el patógeno levaduras	32
1.3.2.	Determinación de actividad antagónica	33
1.3.3.	Determinación de la inhibición de la germinación de esporas de <i>Moniliophthora roreri</i>	35
1.3.4.	Determinación del crecimiento radial	36
1.3.5.	Variables de evaluación	37
1.3.6.	Determinación del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)	38

1.4. Diagrama de flujo de actividades	39
CAPÍTULO III	40
2. Resultados.....	41
2.1. Desarrollo de <i>Moniliophthora roreri</i>	41
2.1.1. Evaluación de ritmo de crecimiento.....	41
2.1.2. Tipo de crecimiento micelial.....	46
2.2. Identificación morfológica de levaduras antagonistas.....	47
2.3. Análisis estadístico	51
2.3.1. Comparación entre los ensayos de confrontación	53
2.3.2. Diferencia de las cepas de <i>Moniliophthora roreri</i> procedentes de: Loreto, Amazonas, y Cusco	54
2.3.3. Resultados de efectos en el Método N°01 y Método N°02.....	56
2.3.4. Inhibición de germinación de esporas.....	66
2.3.5. Levaduras más destacadas y su interacción	70
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Variables establecidas	5
Tabla 2 Aislados de levaduras que se utilizarán en este estudio.	29
Tabla 3 Resultado del ritmo de crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i>	45
Tabla 4 Características macroscópicas de las colonias de aislados de <i>Moniliophthora roreri</i> en medio de cultivo de PDA	46
Tabla 5 Descripción morfológica de levaduras evaluadas	48
Tabla 6 Resultados de supuestos estadísticos para el análisis de área de crecimiento a los 15 días.....	51
Tabla 7 Resultados de ART ANOVA.	52
Tabla 8 Tamaño del efecto (n^2 parcial) de los factores e interacciones, a través de ANOVA ART, sobre el área de crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	52
Tabla 9 Comparación de respuesta entre métodos para determinar el método con mejor respuesta de actividad biocontroladora de levaduras contra <i>M. roreri</i>	53
Tabla 10 Contraste de medias entre los métodos.	53
Tabla 11 Comparaciones entre procedencia del hongo.....	54
Tabla 12 Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial en Método N°01.....	60
Tabla 13 Resultado del área de <i>Moniliophthora roreri</i> (Iquitos, Cusco y Bagua) en el Método N°02.	65
Tabla 14 Resultado del conteo de esporas sobre <i>Moniliophthora roreri</i> (Iquitos, Cusco y Bagua).....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Principales nodos de producción del cacao	8
Figura 2 A) Moniliasis, B) Mancha Negra, C) Antracnosis, D) Mal de machete, E) Bubas, F) Pudrición de raíz.	9
Figura 3 Distribución mundial de la moniliasis del cacao mostrando el año de incidencia de la enfermedad	11
Figura 4 Estructura morfológica de <i>M. roleri</i> (A) Micelio septado. (B) Esporas de tipo globosa	12
Figura 5 Estructuras microscópicas de <i>Moniliophthora roleri</i> (A) micelio con septo doliporo; (B) micelio dicariótico con septo doliporo; (C) meiosporas	12
Figura 6 Evolución de síntomas de la moniliasis (A) frutos jóvenes con protuberancias o gibas; (B) y (D) síntomas de puntos aceitosos; (C) y (E) configuración de mancha; (F) crecimiento del área necrosada o mancha.....	13
Figura 7 Síntomas internos de la moniliasis en mazorcas de cacao (A) y (B) puntos necróticos; (C) pudrición acuosa de la mazorca	14
Figura 8 Ciclo de vida de <i>Moniliophthora roleri</i> en cacao.....	15
Figura 9 <i>Trichoderma</i> spp. en medio de cultivo.....	19
Figura 10 Crecimiento de <i>Clonostachys rosea</i> en medio de cultivo.....	20
Figura 11 Mecanismo de acción ejercido por agentes de control biológico para el manejo de enfermedades en plantas	22
Figura 12 Mapa Parque Ichigkat Muja: Extensión inicial programada / extensión final.....	27
Figura 13 Mapa ubicación de procedencia de las levaduras utilizadas en este estudio	30
Figura 14 Metodología de siembra y aislamiento de microorganismos; A) Levaduras antagónicas (Estría) y B) <i>M. roleri</i> con un disco de 0.7mm de diámetro (Disco micelial).....	33
Figura 15 Estandarización de la concentración de inóculo de levaduras y <i>Moniliophthora roleri</i>	34

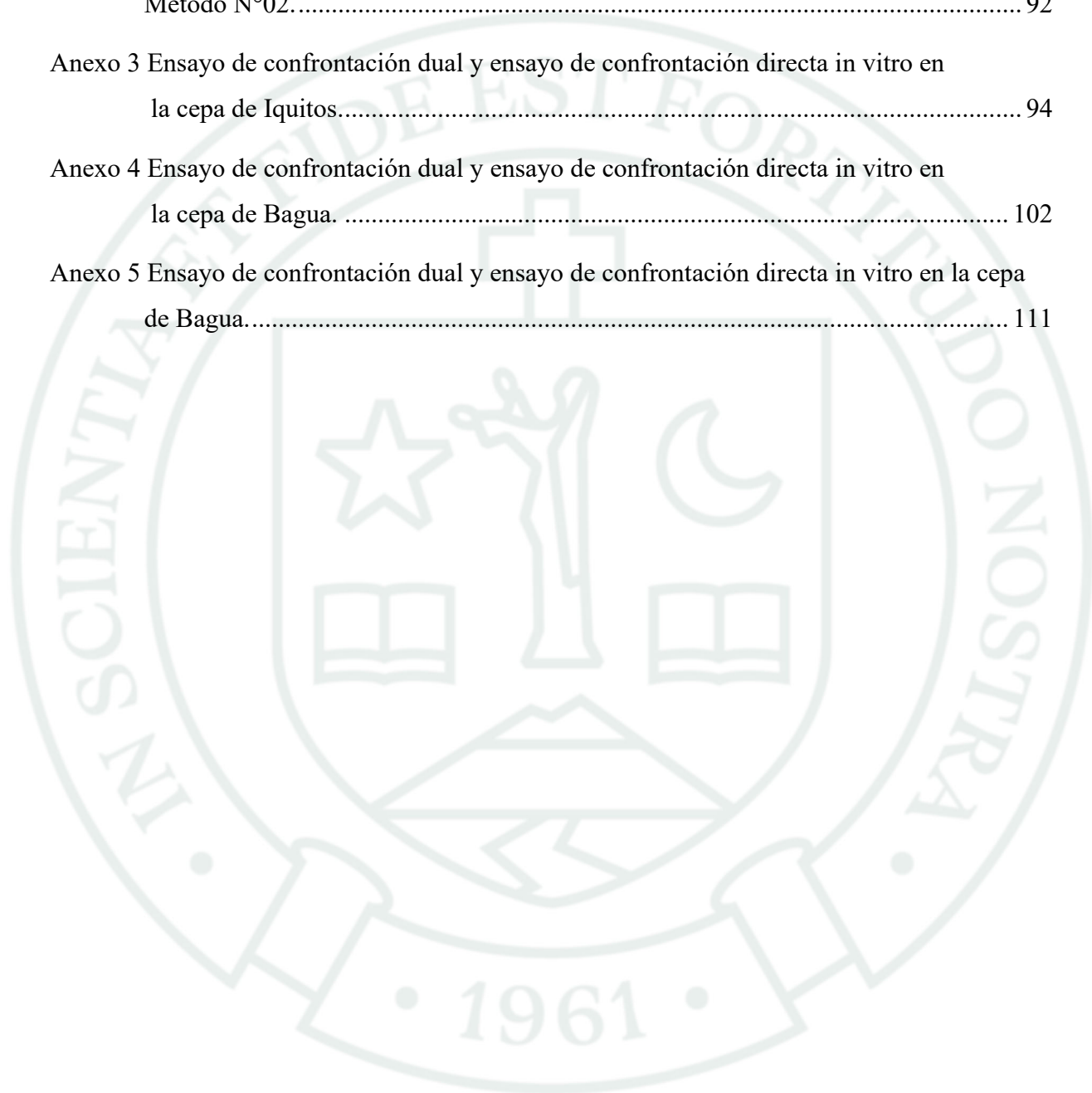
Figura 16 Método usado para la determinación de actividad antagónica levadura vs. <i>Moniliophthora roreri</i> A) Primer Método (Ensayo de confrontación directa)	
B) Segundo Método (Ensayo de confrontación dual).....	35
Figura 17 Cámara de Neubauer A) Cuadrícula de recuento	
B) Cuadrante de conteo de esporas.	36
Figura 18 Cepa <i>Moniliophthora roreri</i> con 15 días de crecimiento A) Anverso	
B) Reverso (H) Disco de 0.7 mm de diámetro (1.1; 2.1; 3.1; 4.1)	
Radio de 7 días de crecimiento (1.2; 2.2; 3.2; 4.2)	
Radio de 15 días de crecimiento.	36
Figura 19 Diagrama de flujo de actividades.....	39
Figura 20 Área de crecimiento micelial promedio de <i>Moniliophthora roreri</i> a concentración OD _{600nm} =0.5, expresado en mm ² , del departamento de Cusco....	41
Figura 21 Área de crecimiento micelial promedio de <i>Moniliophthora roreri</i> , concentración OD _{600nm} = 0.5, expresada en mm ² , del departamento de Amazonas...	42
Figura 22 Área de crecimiento micelial promedio de <i>Moniliophthora roreri</i> , concentración OD _{600nm} = 0.5, expresada en mm ² , del departamento de Loreto.....	42
Figura 23 Área de crecimiento micelial promedio de <i>Moniliophthora roreri</i> con sacabocado de 7 mm de diámetro, expresado en mm ² , del departamento de Cusco	43
Figura 24 Área de crecimiento micelial promedio de <i>Moniliophthora roreri</i> con sacabocado de 7 mm de diámetro, expresado en mm ² , del departamento de Amazonas.....	44
Figura 25 Área de crecimiento micelial promedio de <i>Moniliophthora roreri</i> con sacabocado de 7 mm de diámetro, expresado en mm ² , del departamento de Loreto	44
Figura 28 Diagrama de caja del área promedio a los 15 días entre la cepa de Iquitos y Cusco.....	55
Figura 29 Diagrama de caja del área promedio a los 15 días entre la cepa de Bagua e Iquitos	55
Figura 30 Diagrama de caja del área promedio a los 15 días entre la cepa de Cusco y Bagua.	56

Figura 31 Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Iquitos a través del Método N°01	57
Figura 32 Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Bagua a través del Método N°01.....	58
Figura 33 Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Cusco a través del Método N°01.....	59
Figura 34 Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Iquitos a través del Método N°02.....	62
Figura 35 Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Cusco a través del Método N°02.....	63
Figura 36 Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Bagua a través del a través del Método N°02.....	64
Figura 37 Efecto de levaduras sobre la esporulación de <i>M. roreri</i> (Cepa Iquitos).	67
Figura 38 Efecto de levaduras sobre la esporulación de <i>M. roreri</i> (Cepa Cusco).	67
Figura 39 Efecto de levaduras sobre la esporulación de <i>M. roreri</i> (Cepa Bagua).	68
Figura 38 Respuesta de EGZ-41 (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>) frente a <i>Moniliophthora roreri</i> (Cepa Iquitos) A) Metodo N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación directa)	71
Figura 39 Respuesta de EGZ-33(<i>Meyerozyma guilliermondii</i>) frente a <i>Moniliophthora roreri</i> (Cepa Bagua) A) Metodo N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).	71
Figura 40 Respuesta de EGZ-41 (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>) frente a <i>Moniliophthora roreri</i> (Cepa Cusco) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).	72
Figura 41 Respuesta de EGZ-07 (<i>Kwoniella heveanensis</i>) frente a <i>Moniliophthora roreri</i> (Cepa Iquitos) A) Método N°01	

(Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).	72
Figura 42 Respuesta de EGZ-07 (<i>Kwoniella heveanensis</i>) frente a <i>Moniliophthora roreri</i> (Cepa Bagua) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).	73
Figura 45 Respuesta de EGZ-07 (<i>Kwoniella heveanensis</i>) frente a <i>Moniliophthora roreri</i> (Cepa Cusco) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).	73
Figura 44 Respuesta de EGZ-38 (<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>) frente a <i>Moniliophthora roreri</i> (Cepa Iquitos) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).	74
Figura 45 Respuesta de EGZ-38 (<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>) frente a <i>Moniliophthora roreri</i> (Cepa Bagua) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).	75
Figura 46 Respuesta de EGZ-38 (<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>) frente a <i>Moniliophthora roreri</i> (Cepa Cusco) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).	75

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Crecimiento radial in vitro de hongos fitopatógenos en el crecimiento dual en Método N°01.....	89
Anexo 2 Crecimiento radial in vitro de hongos fitopatógenos en el crecimiento dual en Método N°02.....	92
Anexo 3 Ensayo de confrontación dual y ensayo de confrontación directa in vitro en la cepa de Iquitos.....	94
Anexo 4 Ensayo de confrontación dual y ensayo de confrontación directa in vitro en la cepa de Bagua.	102
Anexo 5 Ensayo de confrontación dual y ensayo de confrontación directa in vitro en la cepa de Bagua.....	111



INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es cultivado en regiones tropicales. El cacao peruano es reconocido a nivel internacional debido a sus características organolépticas, siendo el Perú el octavo productor mundial de cacao en grano, representando el 1.7% de producción mundial y el tercer productor a nivel de América del Sur debido a las condiciones climáticas favorables de producción como la Amazonía (1). Su cultivo se concentra en 7 de los 16 departamentos del país que representan el 96% de la producción total como lo son: San Martín, Junín, Cusco, Ucayali, Huánuco, Ayacucho y Amazonas. La producción nacional de cacao viene aumentando desde hace 12 años a una tasa de crecimiento promedio anual del 14% (2). A nivel nacional, existen 100.000 pequeños productores en 20 regiones del país que se dedican a su cultivo. En el departamento de Amazonas, la producción del cacao representa el 5% de producción nacional que se comercializa a través de cooperativas, comités, o productores no asociados (3). La mayor parte de la producción ocurre en las provincias de Bagua, Utcubamba y Condorcanqui (4).

Durante la década ochenta e inicios de los noventa, fue donde el cultivo de cacao en Perú se vio afectado por distintos factores como la caída del precio internacional del cacao y la diseminación de enfermedades (5). Entre las enfermedades destacan la moniliasis, cuyo agente causal es *Moniliophthora roreri*, el cual fue detectado en Perú desde 1988; asimismo, la escoba de bruja es otra enfermedad causada por *M. perniciosa*. Ambas enfermedades causan grandes pérdidas de producción. Actualmente, las principales causas de su bajo rendimiento y calidad nutricional del fruto radican en el mal manejo de plantaciones como las distancias de siembra, poco manejo agronómico, poca fertilización y alta incidencia de enfermedades. El patógeno (*Moniliophthora roreri*) infecta a los frutos jóvenes menores de dos meses, pueden o no presentar síntomas, pero en cuanto alcanzan la madurez evidencian decoloración acuosa y grasienta (hidrosis), tumefacción y necrosis. Su etapa finaliza con el recubrimiento de una masa blanca de esporas y, momificación del fruto. Un fruto infectado produce hasta 144 millones de esporas que pueden sobrevivir hasta siete meses, siendo un peligro inminente de contaminación (6).

Diversas investigaciones se han centrado en la evolución y el desarrollo de métodos alternativos que permitan controlar de manera eficiente y ecológica la incidencia de la moniliasis. Entre dichas estrategias, resalta la identificación de microorganismos de interés agrícola, particularmente levaduras epífitas presentes en ambientes naturales y agrícolas (7). Se ha observado que algunas de estas levaduras poseen una notable capacidad de biocontrol frente a patógenos como el causante de la moniliasis del cacao (8). Asimismo, ciertos organismos

antagonistas son capaces de generar metabolitos secundarios, tanto volátiles como difusibles, que limitan el crecimiento del patógeno (9). Desde esta perspectiva, las levaduras se proponen como agentes de biocontrol prometedores, representando una alternativa más económica, segura y ambientalmente sostenible. Además, presentan un elevado potencial competitivo debido a su capacidad para liberar toxinas asesinas, secretar enzimas hidrolíticas y resistir condiciones ambientales extremas (10).

El estudio se realizará con levaduras provenientes del Parque Nacional Ichigkat Muja – Cordillera del Condor (PNICC) ubicado en la provincia de Condorcanqui en el departamento de Amazonas con una extensión de 88, 477 hectáreas, que se caracteriza por ser un bosque tropical estacional y tiene una vegetación dominante que varía con las gradientes altitudinales; Las levaduras identificadas fueron aisladas de 3 parientes silvestre de cultivo de cacao *Theobroma cacao L.*, *Theobroma bicolor* y *Herrania nycterodendron* (11).

Así, el objetivo de este estudio se enfoca en determinar la actividad antagónica de aislados epifíticos de levaduras ya identificadas morfológica, fenotípica y genéticamente, para evaluar su efecto ante *Moniliophthora roreri*, la principal enfermedad del cultivo de cacao en el Perú.

HIPÓTESIS

Dado que *Moniliophthora roreri* es un fitopatógeno de gran impacto que conlleva pérdidas económicas en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) y que las levaduras aisladas a nivel epifítico representan la primera línea de defensa del cultivo, es posible que las cepas aisladas presenten actividad biocontroladora contra el patógeno e inhiban significativamente el área de crecimiento micelial y la germinación de esporas a través de la producción de compuestos volátiles o la interacción directa con el patógeno.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad *in vitro* antagónica de cepas de levaduras nativas del Parque Nacional Ichigkat-Muja-Cordillera del Cóndor frente *Moniliophthora roreri* agente causal de la moniliasis del cacao.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el ritmo de crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* de procedencia Bagua, Cusco e Iquitos a través de dos métodos: concentración ajustada a $OD_{600nm}=0.5$ y disco de 7 mm de diámetro para así establecer el periodo óptimo de evaluación.
2. Comparar la respuesta inhibitoria del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* entre el Método N°01 (Ensayo de confrontación dual) y Método N°02 (Ensayo de confrontación directa), comprobando los posibles mecanismos de cada especie.
3. Determinar si la respuesta de inhibición de crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* depende intrínsecamente de la cepa de procedencia del patógeno.
4. Identificar las levaduras con mayor efecto biocontrolador en el Método N°01 y Método N°02
5. Evaluar el efecto en la germinación de esporas en el Método N°01 (contacto indirecto).
6. Seleccionar cepas de levaduras con capacidad de control biológico frente a *Moniliophthora roreri*.

VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1

Variables establecidas

Variables independientes	
Variable	Indicador
Patógeno (<i>Moniliophthora roreri</i>)	Origen del hongo (Bagua, Cusco e Iquitos)
Ensayo de biocontrol	Método N°01 (Ensayo de confrontación dual) y Método N°02 (Ensayo de confrontación directa)
Levaduras con supuesto potencial de biocontrol	Especie de levaduras
Período de evaluación	15 días
Variables dependientes	
Crecimiento micelial	Área de crecimiento (mm ²)
Germinación de esporas	Esporas/placa



1. Marco teórico

1.1. Cacao (*Theobroma cacao* L.)

1.1.1. Clasificación taxonómica

Existe un gran número de parientes silvestres de cultivo de cacao en el mundo, lo cual es importante para la agricultura, ya que permite establecer estrategias de conservación, programas de mejoramiento de cultivos y tener variedades de cultivos domesticados. A nivel de Latinoamérica, Colombia presenta mayor diversidad y distribución de parientes silvestres del cacao. Dentro de ellas se encuentra el género *Theobroma* y *Herrania*. La diversidad genética de cacao silvestre está compuesta por 22 especies en *Theobroma*, y 21 especies en *Herrania*. Dentro de las cuales la especie de *T. cacao* y *T. bicolor* son las más similares en rasgos agronómicos (12).

Además, se lograron identificar ecotipos a nivel de Latinoamérica, clasificados a partir del germoplasma del cacao, siendo los grupos genéticos: Maraón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guiana (13). En Perú, existen 3 cultivares de cacao nativo siendo: cacao 'Chuncho', 'Cacao Amazonas Perú' y 'Blanco Piurano'. Su sistema de clasificación del cacao es la siguiente:

- **Reino:** Plantae
- **Tipo:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Malvales
- **Familia:** Sterculiaceae
- **Género:** *Theobroma*
- **Especie:** *Cacao* L (14).

1.1.2. Importancia económica y social del cultivo

El comercio de *Theobroma cacao L.* es de gran importancia a nivel nacional y dentro de América Latina y el Caribe ya que constituye una de las fuentes o materia prima para diversos productos de la industria farmacéutica, alimentaria e industrial (15).

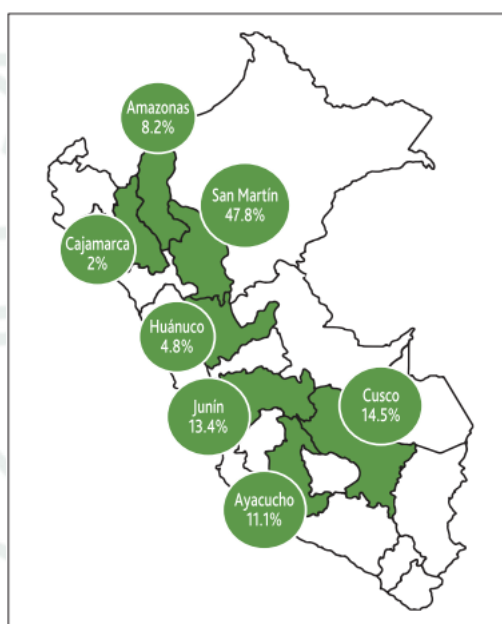
Los departamentos de San Martín, Amazonas y Cajamarca representan el 58% de la producción nacional. Según PROMPERU el Perú es el segundo exportador mundial del cacao orgánico. En el departamento de Amazonas tiene una participación de más del 30 % de la producción nacional (16).

Figura 1

Principales nodos de producción del cacao

FIGURA 7. PRINCIPALES NODOS DE PRODUCCIÓN DEL CACAO

(% de la producción nacional en TM, campaña 2013-2014)



Amazonas	(8.2%)	Ayacucho	(11.1%)
Provincias		Provincias	
Bagua	(6.8%)	La Mar	(7%)
Ucayabamba	(1.4%)	Huanta	(4.1%)
Cajamarca	(2%)	Cusco	(14.5%)
Provincias		Provincias	
Jaén	(1.4%)	La Convención	(14.2%)
San Ignacio	(0.4%)	Calca	(0.4%)
Cutervo	(0.2%)		
Huánuco	(4.8%)	San Martín	(47.8%)
Provincias		Provincias	
Leoncio Prado	(3.2%)	Tocache	(15.6%)
Marañón	(0.5%)	Mariscal Cáceres	(11.6%)
Pachitea	(0.5%)	Huallaga	(5.4%)
Puerto Inca	(0.4%)	Lamas	(5.4%)
Humalies	(0.2%)	San Martín	(3%)
Junín	(13.4%)	El Dorado	(2.7%)
Provincias		Bellavista	(2.2%)
Satipo	(13.4%)	Picota	(0.9%)
		Moyobamba	(0.7%)
		Rioja	(0.4%)

Nota: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (16).

El cultivo inicia su producción al tercer año. A pesar de ser productivo hasta los 45 años, su máximo rendimiento se encuentra entre 8 y 10 años. Al año se realizan dos cosechas: principal e intermedia (16).

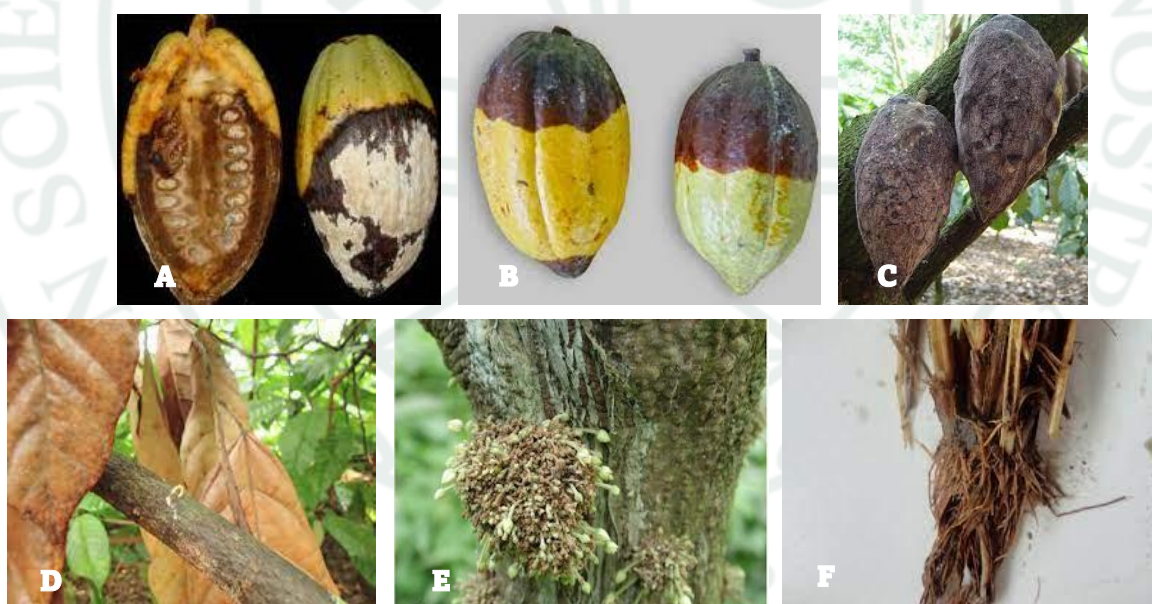
Según el World Integrated Trade Solution, el comercio de cacao y su exportación presentan un crecimiento estable. En el año 2023 Perú exportó 71 271,8 toneladas de la materia prima valorizado en 224,98 millones de dólares (17). Para inicios del año 2024 a finales las exportaciones aumentaron un 203% alcanzando 1189 millones de dólares (18).

1.1.3. Principales enfermedades que afectan al cultivo de cacao

Destacan tres enfermedades como la moniliasis causado por los basidiomicetos *Moniliophthora roreri* y *M. perniciosa*, además de la mancha negra provocado por oomiceto *Phytophthora sp* (19).

Figura 2

A) Moniliasis, B) Mancha Negra, C) Antracnosis, D) Mal de machete, E) Bubas, F) Pudrición de raíz.



Nota: Alamy (20).

1.1.4. Mecanismos de ensamblaje del microbioma de la filósfera

La filósfera es el área más propensa a la invasión de patógenos debido a la baja disponibilidad de agua y nutrientes, exposición ultravioleta y las fluctuaciones de temperatura; además de factores ambientales como la interacción de viento, lluvia e insectos. La filósfera alberga diversos taxones microbianos que ejercen un papel positivo o negativo en el hospedante. Su mecanismo de defensa indirecto hacia la planta huésped se manifiesta o con la interacción entre microbios, modulación de metabolismo y activación de la inmunidad vegetal (21), teniendo así un fuerte efecto sobre el desarrollo microbioma de la filósfera entre patógenos y no patógenos, como la cepa de *Sphingomonas*, que compite por azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, limitando el desarrollo de *P. syringae* (22). Por otro lado, también puede secretar exógenamente metabolitos secundarios que pueden promover o inhibir sus actividades microbianas, metabolitos como 3-metilbutan-1-ol producido por *Enterobacter cloacae*, inhibiendo el desarrollo de *Botrytis cinerea* (23).

1.2. *Moniliophthora roreri*

1.2.1. Clasificación taxonómica

También se le conoce como mancha, paludismo o polvillo. Su agente causal es la *Moniliophthora roreri*.

De acuerdo a National Center for Biotechnology Information, la clasificación de *M. roreri* es la siguiente:

- **Reino:** Fungi
- **Filo:** Basidiomycota
- **Clase:** Agaricomycetes
- **Subclase:** Agaricomycetidae
- **Orden:** Agaricales
- **Familia:** Marasmiaceae
- **Género:** *Moniliophthora*
- **Especie:** *M. roreri* (24).

1.2.2. Origen y distribución de la enfermedad

Hasta el año 1950, la enfermedad moniliasis fue reportada en Colombia, Ecuador y el oeste de Venezuela (25). En Perú, fue reportado inicialmente en el norte en el año 1988, por el sur en 1998 (14).

Figura 3

Distribución mundial de la moniliasis del cacao mostrando el año de incidencia de la enfermedad



Nota: Pérez (26).

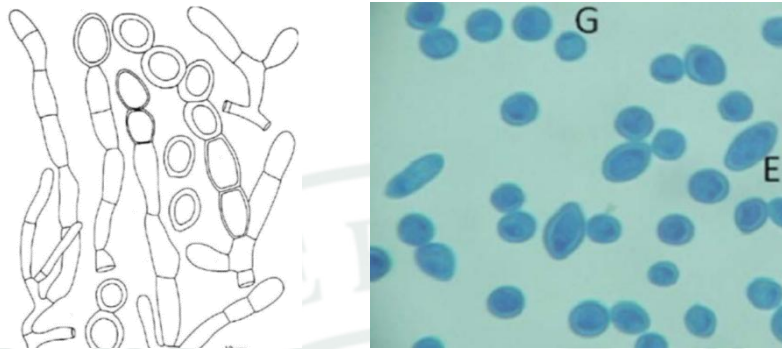
1.2.3. Morfología

Su colonia es de aspecto lanudo, algodonoso de color salmón, tiene hifas hialinas, de paredes delgadas, septadas e irregulares. Tiene conidióforos ramificados que dan cadenas de conidias de maduración basípeta de pared gruesa, amarillo pálido. También se encuentran conidias cilíndricas de paredes delgadas. Tiene dos formas de germinación a través del poro germinativo o directamente a través de su pared (27).

Las esporas viejas desarrollan paredes gruesas y se tornan oscuras, y marcan el inicio de la fase de dormancia. El tubo germinativo presenta en el extremo distal una estructura similar a un apresorio y la hifa infectiva (28).

Figura 4

Estructura morfológica de *M. roreri* (A) Micelio septado. (B) Esporas de tipo globosa



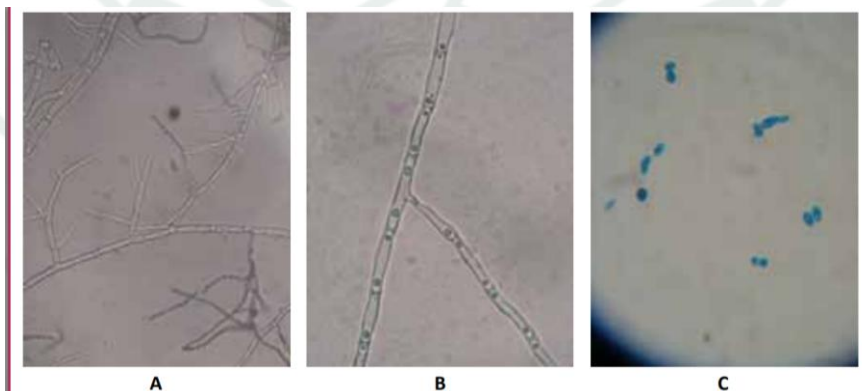
Nota: Arbelaez (29).

1.2.4. Síntomas

En los primeros estadios florales es donde las mazorcas son más propensas a la infección del basidiomiceto, que se evidencia primero como pequeñas protuberancias y zonas claras, luego se extiende una mancha café y llega cubrirse de un manto blanco siendo el micelio del hongo. Luego de 3 a 7 días emergen esporas de color crema que son disipadas por viento o lluvias. En frutos de 3 meses presentan maduración prematura, marchitez, secamiento, deformaciones y puntos verdes oscuros. Los primeros síntomas aparecen entre 15 – 20 días luego de haber sido infectados (30).

Figura 5

Estructuras microscópicas de *Moniliophthora roreri* (A) micelio con septo doliporo; (B) micelio dicariótico con septo doliporo; (C) meiosporas



Nota: Suárez; Hernández (28).

Por otro lado, en frutos maduros se evidencia la infección como puntos aceitosos, falsa maduración parcial, manchas cafés extendidas sobre todo el fruto similar a *Phytophthora sp.* Pero se diferencia por presentar borde irregular cubierta de una masa blanca de micelio y esporas algodonosas (31).

Figura 6

Evolución de síntomas de la moniliasis (A) frutos jóvenes con protuberancias o gibas; (B) y (D) síntomas de puntos aceitosos; (C) y (E) configuración de mancha; (F) crecimiento del área necrosada o mancha



Nota: Suárez; Hernández (28).

Figura 7

Síntomas internos de la moniliasis en mazorcas de cacao (A) y (B) puntos necróticos; (C) pudrición acuosa de la mazorca



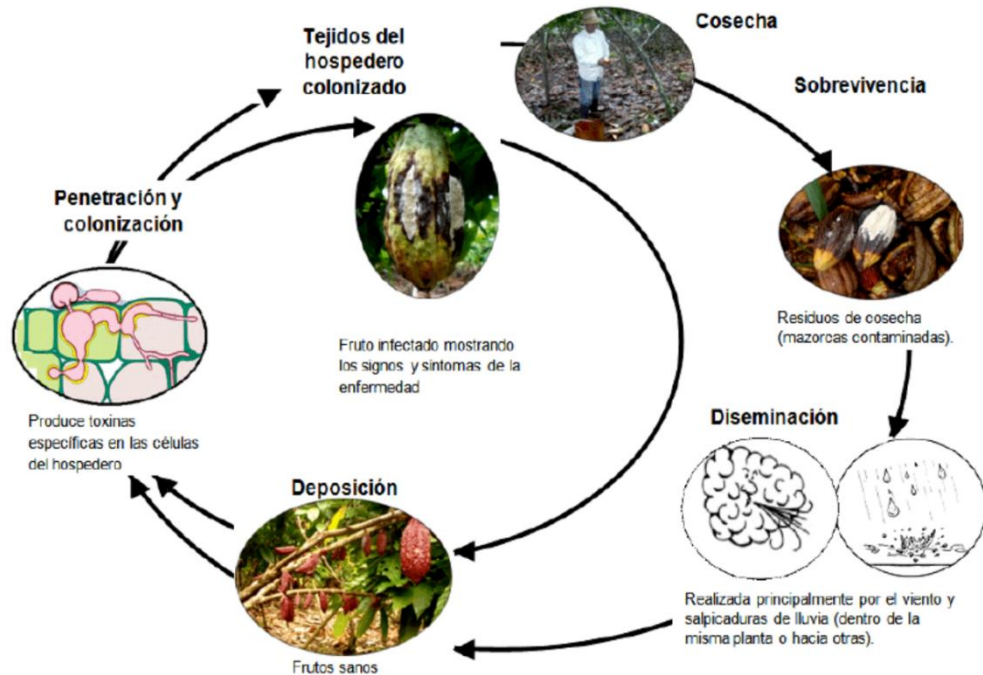
Nota: Suárez; Hernández (28).

1.2.5. Ciclo de la enfermedad

En las áreas productoras de cacao, el patógeno *Moniliophthora roreri* empieza en frutos contaminados, en plantaciones donde no se da un adecuado manejo agronómico, como árboles sin poda y libre crecimiento, que favorecen un ecosistema húmedo y oscuro (32). A través de las mazorcas contaminadas, las conidias son diseminadas por el viento y la lluvia. Según Sánchez et al, el ciclo inicia desde la liberación y diseminación de esporas favorecida por humedad relativa baja (época seca), temperatura mayor a 26°C y lluvias intensas (33). A partir de la dispersión de las hifas infectivas se penetran sobre el fruto, germinan si hay agua o mueren si no hay humedad suficiente, a través de las células del parénquima cortical crecen en las células del córtex, reproduciéndose tanto dentro como fuera de la mazorca se dirigen hacia el mesodermo y semillas (34). El tiempo de infección varía de 3 a 8 semanas dependiendo de la edad del fruto, ya que en frutos tiernos el periodo de incubación es de tres semanas. Sin embargo, la infección se evidencia a partir de la presencia de puntos aceitosos de 0.2 cm que van aumentando de tamaño, luego de 2 a 3 meses las manchas aceitosas color café producen protuberancias en las mazorcas, hasta que finalmente las esporas infectivas invaden el fruto observando un micelio blanco (35).

Figura 8

Ciclo de vida de *Moniliophthora roreri* en cacao



Nota: Sánchez; Garcés (33).

1.3. Estrategias de control

1.3.1. Métodos convencionales

- Control cultural. El material genético y manejo de cultivos forman parte del manejo agroecológico. Es importante además tomar en cuenta las medidas que se deben tomar para evitar la propagación de plagas como la rotación de cultivos, eliminación de cultivos enfermos, uso de viveros, esterilización del suelo, termoterapia, aplicación de radiaciones
- Control químico. Se recomienda usar sustancias químicas inorgánicas, también la fumigación del suelo y semillas (36).

1.3.1.1. Limitaciones de los métodos convencionales (cultural y químico)

1.3.1.1.1. Impacto ambiental y en la salud

El uso de plaguicidas ha significado por un tiempo hasta la actualidad una ayuda para el manejo de cultivos, sin embargo, diversos estudios nos indican que el uso de compuestos organofosforados compromete y pone en riesgo los cultivos agrícolas, además, se ha convertido en un peligro para los sistemas bióticos (animales y plantas) y abióticos (suelo, agua y aire). Además de comprometer la salud mediante intoxicaciones o efectos carcinogénicos (37).

1.3.1.1.2. Resistencia y resurgencia de plagas

La incidencia sobre las plagas hace que estas tengan resistencia genética, ya que al ser unas moléculas pesadas para su metabolismo, provoca que dichos microorganismos desarrollen resistencia a las familias químicas debido a las fuerzas evolutivas (selección artificial) (38).

1.3.1.1.3. Degradación del suelo

A largo plazo, dichos compuestos alteran la estabilidad del suelo, llegando a la acumulación de sales y sustancias tóxicas. Además, de disminuir la capacidad de retener agua y nutrientes, afectando la actividad biológica de organismos beneficiosos que son los encargados de descomponer la materia orgánica para reciclar nutrientes (39).

1.3.2. Control biológico

Es un método que usa organismos vivos para controlar agentes patógenos que afectan a la calidad del cultivo como: parásitos depredadores, patógenos, extracto de plantas fungicidas y además microorganismos antagónicos, entre los que destacan hongos y bacterias (40).

Uno de los agentes microbiológicos más estudiados son las especies del género *Trichoderma* que no presentan requerimientos nutricionales exigentes y es de desarrollo rápido. Su mecanismo de acción son la competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis, secreción de enzimas, producción de compuestos inhibidores (41).

1.3.2.1. Desafíos del control biológico

El control biológico significa una alternativa prometedora que usa enemigos naturales que son importantes para la reducción de la incidencia o severidad de la enfermedad. De hecho, el control biológico surge antes de la aparición de pesticidas porque es una respuesta espontánea para el equilibrio natural. A pesar del potencial, aún existen desafíos para incrementar su uso; su aplicación se ve poco efectiva por distintos factores como: el ambiente, temperaturas desfavorables, el pH del suelo (puede inhibir la reproducción de sus células del patógeno), composición del suelo, densidad del patógeno y periodo de aplicación. Es importante destacar que para la efectividad del uso del biocontrolador depende del tipo de formulado a usar y el periodo de aplicación, ya que debe estar presente en el momento de mayor susceptibilidad con tiempo suficiente para su acción biocontroladora, tipo de cultivo, patógeno a controlar. Lo que se debe tener en cuenta es que el control biológico no elimina el patógeno, por lo que debe ser aplicado antes de que el patógeno se desarrolle sobre la planta (42).

1.3.2.2. Situación actual del control biológico en Perú

El control biológico dentro del manejo integrado cumple más de 100 años. Sin embargo, resalta un impulso desde el año 1995 juntamente con el aumento de las exportaciones de productos hortícolas. En Perú, mediante el SENASA se usó por primera vez el control biológico que usaron organismos como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Actinomyces*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* (3). Además, por la zona norte junto con la Asociación Peruana de Control Biológico en el año 2009 se logró incluir el uso de agentes biológicos uniendo a 20 empresas del rubro de biotecnología productoras de hongos entomopatógenos y demás antagonistas, cuyos consumidores son empresas agroindustriales que exportan espárrago, palto, vid y capsicum cuyo principal problema fitosanitario son nematodos (*Meloidogyne*) (44).

1.3.2.3. Hongos como controlador biológico

Según antecedentes, el hongo *Trichoderma* tiene un efecto biocontrolador indirecto sobre hongos fitopatógenos, compitiendo por espacio, nutrientes, modificando condiciones ambientales y compuestos antagonicos. También tiene un control directo a través de micoparasitismo. El potencial de antagonismo de *Trichoderma spp* contra *Moniliophthora* a nivel in vitro que registró altos valores de antibiosis mayores al 50% (45).

Pérez et al determinaron que *Bacillus subtilis* tiene efecto biofungicida sobre *Moniliophthora roreri*, reportando un 42% de frutos sanos con relación al testigo (46).

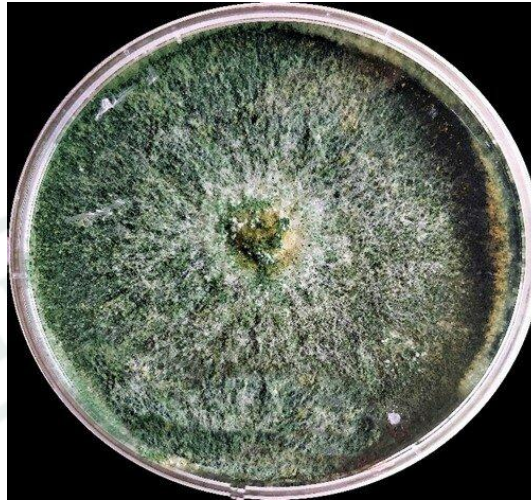
Por otro lado, Rodríguez, Rodrigo evaluó el efecto de dos bioformulados como BACTHON SC (*Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*) junto a TRICHO-D (esporas y nutrientes de *Trichoderma harzianum*) aplicado cada dos meses presentando un alto porcentaje de mazorcas sanas con alto peso (47).

1.3.2.3.1. *Trichoderma spp*

El género comprende especies de rápida colonización, filamentosos, de reproducción asexual, aislados frecuentemente de suelos. Algunas de sus principales estrategias incluyen:

- Micoparasitismo. Que parasitan a otros hongos una vez en contacto, se adhieren y se enrollan formando apresorios en su superficie, disolviendo las paredes celulares (48).
- Producción de metabolitos secundarios. Produce enzimas degradadoras de la pared celular o compuestos antifúngicos volátiles como 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) (49).
- Competencia por espacio y nutrientes. Debido a su reproducción acelerada y su naturaleza resistente a compuestos tóxicos, es capaz de limitar la presencia de hierro y de nutrientes primarios (50).

Figura 9
Trichoderma spp. en medio de cultivo



Nota: Sood et al (51).

1.3.2.3.2. *Clonostachys rosea*

Es un hongo filamentoso perteneciente al grupo de los ascomicetos, de naturaleza saprófita y micoparásita, que se desarrolla en el suelo (52). Presenta una notable capacidad antagonista frente a diversos hongos fitopatógenos, nemátodos e insectos, entre los que se incluyen *Alternaria dauci*, *A. radicina*, *Botrytis cinerea*, *B. aclada*, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera teres*, *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *Helminthosporium solani*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Rhynchosporium commune* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Este comportamiento se fundamenta en diversos mecanismos de acción (53).

- Competencia por nutrientes. Según investigaciones recientes, *Clonostachys rosea* compite por nutrientes a través de la licuefacción de las esporas que ocurre en la zona del tejido herido y hojas en senescencia (54,55).
- Micoparasitismo. Se confirmó que el hongo biocontrolador es capaz de adherirse a las hifas del hospedador y desarrollar estructuras especiales y absorber nutrientes desintegrando las células del patógeno (56).

- Resistencia inducida. Reduce efectos de patógenos aumentando la actividad de enzimas de defensa como fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), y glutatión S-transferasas (GST) y la producción de ácido indol acético (AIA) (57).

Figura 10

Crecimiento de *Clonostachys rosea* en medio de cultivo



Nota: Hasan et al (56).

1.3.2.4. Levadura como controlador biológico

Las levaduras, entre otros microorganismos antagonicos y otros tipos de control biológico son una alternativa prometedora porque: no producen esporas alergénicas ni antibióticos como las bacterias antagonistas. Además, no son nutricionalmente exigentes, colonizan superficies secas por largos períodos de tiempo, pueden resistir plaguicidas en postcosecha, crecen rápidamente en sustratos pobres, y son fáciles de producir en grandes cantidades (58).

Diversos estudios han evaluado el uso de levaduras como agentes de biocontrol en diversos cultivos como:

A) *Candida oleophila*. Que inhibe la germinación de conidios y es fungistático de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* a través de la competencia por nutrientes y espacio (55); además, que existen enzimas que degradan la pared celular como exo- β -1,3-glucanasa, quitinasa y proteasa teniendo efecto inhibitorio en la elongación del tubo germinativo (59).

- B) *Metschnikowia pulcher.rima*. Es una de las especies más estudiadas como agentes de biocontrol, capaces de inhibir *Botrytis cinerea* a través de la inhibición del desarrollo de esporas, degenerando así el micelio (60). Según diversos estudios, su mecanismo de acción se basa en la reducción del hierro, secreción de enzimas extracelulares y emisión de compuestos volátiles (61).
- C) *Debaryomyces hansenii*. Ha sido ampliamente estudiada como agente biocontrolador en frutas y hortalizas, además se presume que usa mecanismos de acción como secreción de enzimas hidrolíticas que combaten *Penicillium citrinum* y *Mucor fragilis*. Gran ventaja del microorganismo es que es halófilo, e inmunoestimulante (62).
- D) *Candida tropicalis*. Por otro lado, existen levaduras cuyo mecanismo se basa en la estimulación del desarrollo de la planta, es decir, actúa indirectamente sobre el patógeno, estimulando la germinación, elongación de raíces, y síntesis de etileno (63).

1.3.2.4.1. Mecanismos de acción del control biológico mediado por levaduras

Debido a que los microorganismos tienen distinta capacidad de interacción con el patógeno vegetal, es importante definir su mecanismo de defensa del antagonista sobre el fitopatógeno para desarrollar futuras formulaciones. En general, los microorganismos antagonistas pueden tener múltiples mecanismos de acción como (64).

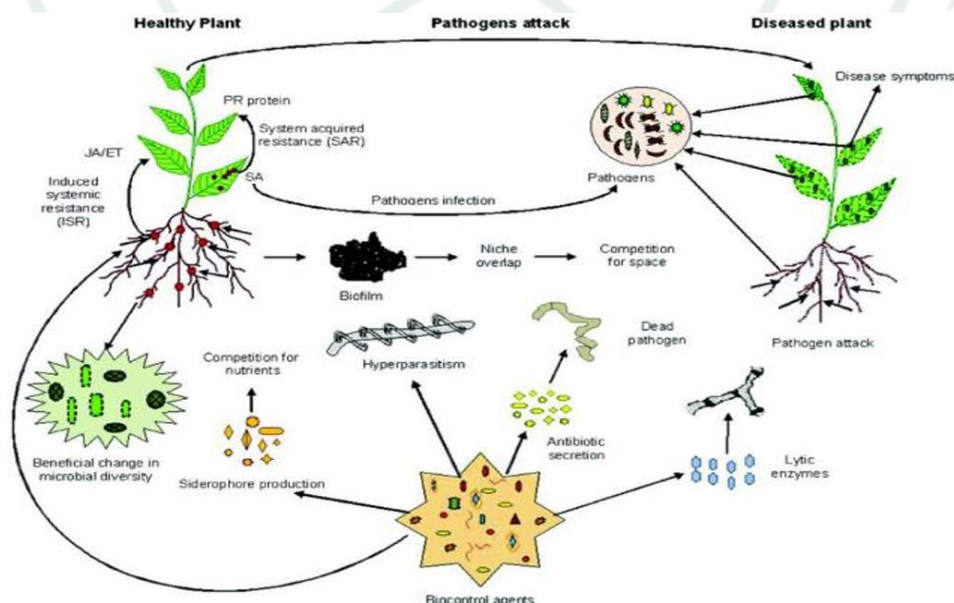
- **Competencia:** La competencia se define como una situación donde existe la demanda simultánea de recursos. Existen 2 tipos de competencia por nutrientes que son donde el antagonista limita la cantidad de elementos y otra competencia por espacio donde el antagonista produce materiales extracelulares como polisacáridos que restringen el espacio para la colonización de otros organismos. Por otro lado, la levadura tiene una evidente ventaja debido a que puede formar una biopelícula de polisacárido extracelular que permite la adhesión del microorganismo a la superficie del fruto.
- **Antibiosis:** Es la inhibición de un microorganismo por metabolitos del antagonista como agentes líticos o enzimas, que pueden o no ser de carácter volátil, actúan a bajas concentraciones menos de 10 ppm (65).

- **Micoparasitismo:** En este caso, las levaduras son las que se alimentarán del patógeno inicialmente degradando la pared celular con enzimas como β -1,3-glucanasa (GLU), quitinasa (CHT) y proteasas.
- **Inducción de resistencia del huésped:** Según distintas fuentes las levaduras antagónicas actúan como inductores biológicos y aumentan la expresión de genes relacionado a las defensas como CHT, GLU, fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y POD (66).

En la actualidad, se ha demostrado que las levaduras son más utilizadas que las bacterias para controlar enfermedades. Su mecanismo de acción es a través de la antibiosis, enzimas líticas, parasitismo, competencia por nutrientes (67). Se ha demostrado que el uso de levaduras representa una de las alternativas más viables. Tienen características que las hacen efectivas en el biocontrol contra hongos filamentosos, crecen rápidamente en sustratos baratos, fermentadores, no producen esporas alérgicas, coloniza superficies secas, tienen la habilidad de secretar proteínas o glicoproteínas, tiene una proporción favorable de relación superficie/volumen por ello coloniza la superficie vegetal por largo periodo de tiempo y crecen a temperaturas bajo cero (68).

Figura 11

Mecanismo de acción ejercido por agentes de control biológico para el manejo de enfermedades en plantas



Nota: Tsegaye et al (69).

1.3.2.5. Bacterias como controlador biológico

1.3.2.5.1. *Bacillus spp*

Su género se destaca por ser bacterias bacilo gram positivas, de movilidad flagelar con tamaño variable 8.5 a 10 um, crecimiento en pH neutro, mesófilo (72). Destaca por evidenciar que las especies *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* y *B. sphaericus* reducen significativamente el crecimiento de diversos huéspedes. El género ejerce su efecto biocontrolador a través de diversos mecanismos como (70).

- **Producción de metabolitos secundarios.** Sintetiza una variedad de moléculas biológicamente activas como la kanosamina, zwittermicina, surfactina, iturina y fengicina que poseen uso potencial reconocido por sus propiedades surfactantes. Específicos metabolitos secundarios no solo tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos, también pueden reforzar la resistencia del huésped hacia el hospedero (71).
- **Inducción de resistencia sistémica en plantas (ISR).** Se demostró que la cepa *B. subtilis* induce resistencia contra el hongo *Aspergillus niger* en el cultivo de maní (*Arachis hypogaea*) induciendo la producción de fenilalana amoniaco liasa y peroxidasa generando resistencia sistémica inducida (ISR) que fortalece su respuesta frente a infecciones.
- **Producción de enzimas hidrolíticas.** Se encuentran oligopéptidos cíclicos y/o lineales; La molécula más simple destaca el dipéptido bacilisina con efecto bactericida (72).

1.3.2.5.2. *Pseudomonas spp*

Son bacterias aeróbicas, gram negativas, quimioheterotróficas, móviles de forma bacilar. Son particularmente adecuadas como agente de control biológico y biofertilizantes; Presenta una elevada densidad poblacional debido a su alta tasa de reproducción. Dicha actividad antagonista es ejercida a través de (73).

- **Producción de antibióticos.** Produce compuestos modulados por factores exógenos como fertilizantes, minerales y/o azúcares como el 2,4-diacetilfluoroglucinol (DAFG), la mupirocina, la pioluteorina,

pirrolnitrina, fenazina controlando hongos fitopatógenos como *Thielaviopsis basicola*, *Pythium ultimum*, *Gaeumannomyces graminis*.

- **Enzimas celulolíticas.** Otro de los mecanismos es a través de la síntesis de proteínas encargadas de la degradación de la pared celular como β -1,3-glucanasa, quitinasas, celulasas y proteasas, producidas por cepas de *P. aureginosa* y *P. fluorescens* (74).
- **Competencia por nutrientes y espacio.** Coloniza indirectamente a través de la producción de sideróforos que son los encargados de limitar la concentración de nutrientes agotando el acceso al hierro (75).

1.4. Levaduras evaluadas y sus antecedentes

1.4.1. *Meyerozyma guilliermondii*

Anteriormente conocida como *Picchia* o *Candida guilliermondii*, es una levadura Ascomycota aislada comúnmente de frutos, piel humana y la microflora mucosa (76). Tiene característica biotecnológica por ser usada como biocontrolador (77). Diversos estudios concluyen que *Meyerozyma guilliermondii* tiene eficacia sobre la pudrición del moho azul causada por *Penicillium expansum* y *Penicillium italicum*, pudrición por antracnosis por *Colletotrichum acutatum* (78,79).

1.4.2. *Candida sp*

Diversas especies del género *Candida* son un gran potencial biocontrolador como la levadura *Candida oleophila* que es usada para el control de la pudrición postcosecha de cítricos, causada por *Penicillium digitatum*, cuyo principal modo de acción es la competencia por nutrientes y producción de enzimas (59). *Candida saitoana* restringe la actividad patógena de *Botrytis cinerea* cuyo mecanismo de acción es a través de la lisis de la pared celular del patógeno (80). Por último, *Candida kunwunensis* que produce compuestos antifúngicos e inhibe el desarrollo de *Botrytis cinerea* (81).

1.4.3. *Hannaella phetchabunensis* y *H. taiwanensis*

En general en el género de *Hannaella* se han identificado y caracterizado 12 especies que están ampliamente distribuidas en la superficie de hojas de arroz, trigo, y árboles frutales. Como característica de microorganismos que habitan en la filósfera se destaca por tener un papel importante en la promoción de crecimiento de plantas y biocontrol (82). Por ejemplo, la levadura antagónica *Hannaella sinensis* que tiene un efecto biocontrolador sobre el moho azul de la manzana, inhibiendo la germinación de esporas, y la longitud del tubo germinativo de *Penicillium expansum* (83).

1.4.4. *Rhodosporidiobolus ruineae*

Esta especie, a diferencia de otras, no presenta muchos estudios de su potencial antagónico. Aún así, se demostró en un estudio que es una levadura antagónica por tener enzimas exógenas que pueden minimizar el efecto fitopatógeno de algunos hongos como *Penicillium expansum* (84).

1.4.5. *Moesziomyces* sp

La capacidad de biocontrol no es una característica general propia de *Moesziomyces*, que es una levadura ambiental aislada de hojas de plantas, flores y suelo; no obstante, en investigaciones recientes se determinó que es capaz de controlar la enfermedad del moho verde en mandarinas y la infección por *Botrytis cinerea* en manzanas (85).

1.4.6. *Sporobolomyces japonicus*

Aunque la especie no presenta antecedentes de su capacidad antagonista, aún así, su género, como *Sporidiobolus pararoseus*, es capaz de producir enzimas extracelulares involucradas en la degradación de la pared celular, como la lipasa (86).

1.4.7. *Debaromyces hansenii*

Está ampliamente distribuido en distintos ecosistemas como plantas, aire, agua, y en la microbiota gastrointestinal (90); Además, ha sido probado eficientemente en control biológico de enfermedades fúngicas encontradas en cosechas de frutas. Por lo tanto, según diversos estudios, es capaz de controlar biológicamente a *Penicillium digitatum* con alta efectividad en la incidencia del moho verde (87).

1.4.8. *Wickerhamomyces edaphicus*

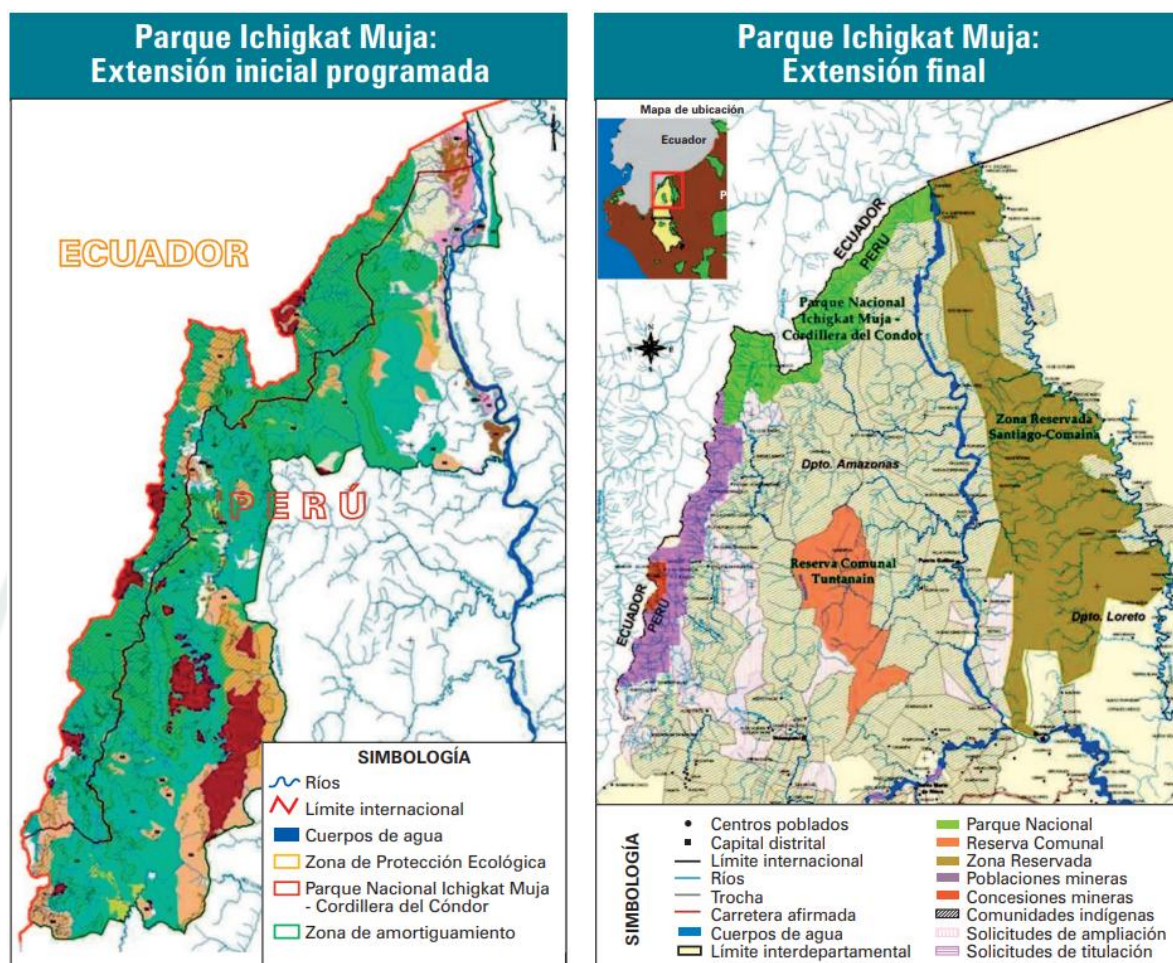
Entre las especies antagónicas, *Wickerhamomyces anomalus* inhibe eficazmente la descomposición causada por *B. cinerea* y sobre la infección por antracnosis por tener capacidad de hidrolizar la pared celular del hongo y producir metabolitos volátiles antifúngicos (88).

1.5. Parque Nacional Ichigkat Muja

Se ubica en la zona nororiental del Perú, específicamente en la provincia de Condorcanqui, departamento de Amazonas, y limita con el territorio ecuatoriano. Abarca una superficie aproximada de 88 mil hectáreas. El Parque Nacional fue creado el 10 de agosto de 2007 y destaca por conservar la única muestra representativa de la ecorregión de los Bosques Montanos de la Cordillera Real Oriental. El PNCC presenta un clima tropical húmedo, con precipitaciones concentradas entre los meses de octubre y marzo, y una temperatura media anual que oscila entre los 24 °C y 25 °C. Más del 75 % de su extensión corresponde al Bosque Pluvial Premontano Tropical (bp-PT), mientras que en las zonas de menor altitud predomina el Bosque Muy Húmedo Tropical (bmh-PT). La Cordillera del Cóndor abarca una amplia variedad de pisos altitudinales, que van desde los 200 hasta los 2600 metros sobre el nivel del mar. Además, presenta un régimen natural de perturbaciones, como avalanchas y procesos de erosión en los cauces de los ríos, los cuales favorecen la elevada diversidad de especies vegetales, los distintos tipos de bosque y la variedad de hábitats que sustentan su rica flora y fauna (89,90).

Figura 12

Mapa Parque Ichigkat Muja: Extensión inicial programada / extensión final



Nota: Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado (90).



CAPÍTULO II

1. Materiales y métodos

1.1. Lugar de ejecución

Las pruebas *in vitro* se realizaron en el laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal del Instituto de Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, de la UNTRM en la ciudad de Chachapoyas región de Amazonas.

1.2. Materiales

1.2.1. Material biológico

Se utilizaron 17 aislamientos de levaduras las cuales fueron suministradas por el cepario del Departamento de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza del proyecto de pre-grado “Diversidad de levaduras epífitas asociadas a los géneros *Theobroma* y *Herrania* del Parque Nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor” fueron aisladas de plantas silvestres de los géneros vegetales como: *Theobroma cacao*, *Theobroma bicolor* y *Herrania nycterodendron*; Para el presente proyecto se realizó una búsqueda bibliográfica intensiva para identificar aquellas levaduras con antecedentes antagónicos. Además, durante la ejecución del proyecto se tomaron en cuenta las características de cada levadura como género, especie, estado del explante (hoja) y especie de cultivo que están descritas en la Tabla 2.

Tabla 2
Aislados de levaduras que se utilizarán en este estudio.

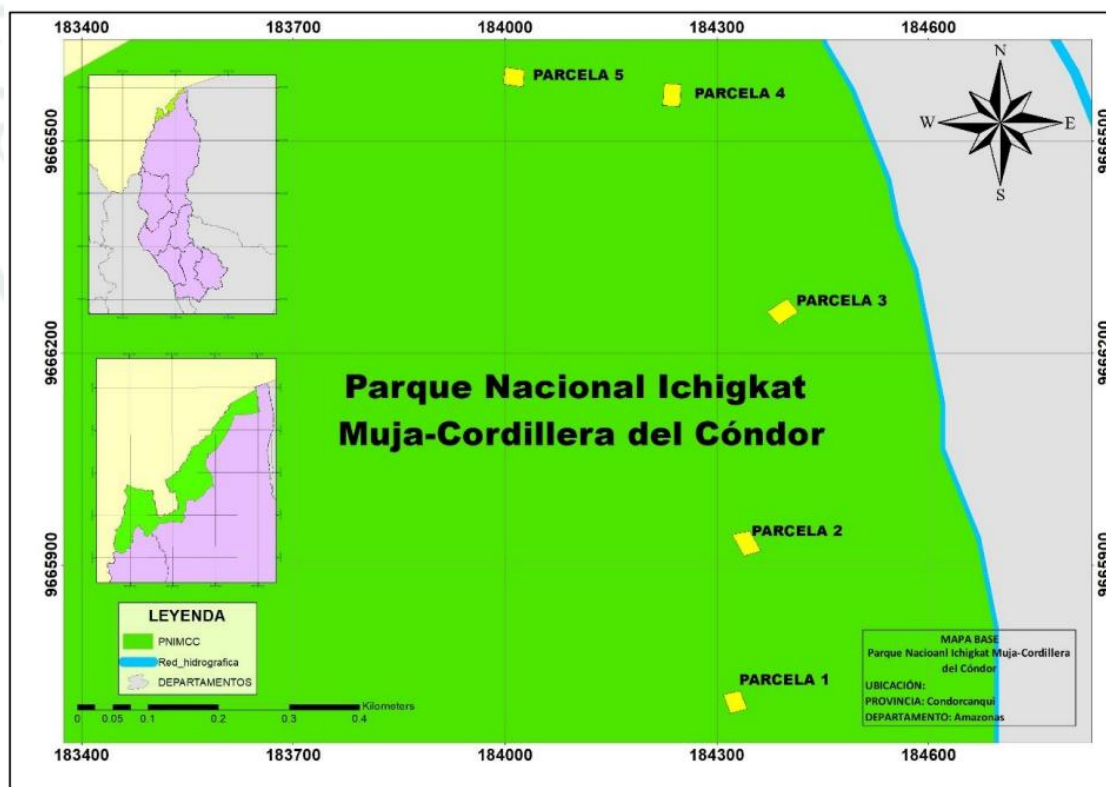
Ítem	Género	Especie	Estado	Nro. de Cepas	Cepa	Cacao
1	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	HD	4	EGZ-01	<i>T. cacao</i> L.
			HS		EGZ-23	
			HD		EGZ-33	<i>H. nycterodendron</i>
			HS		EGZ-41	
			HD		EGZ-53	<i>T. bicolor</i>
			HS		EGZ-63	
2	<i>Candida</i> sp.	<i>Candida</i> sp.	HD	1	EGZ-03	<i>T. cacao</i>
3	<i>Hannaella</i>	<i>H. phetchabunensis</i>	HD	3	EGZ-06	<i>T. cacao</i> L.

4		<i>H. taiwanensis</i>	HD		EGZ-48	<i>H.</i> <i>Nycterodendron</i>
5		<i>Hannaella sp.</i>	HD		EGZ-51	<i>T. bicolor</i>
6	<i>Kwoniella</i>	<i>K. heveanensis</i>	HD	1	EGZ-07	<i>T. cacao L.</i>
			HS	1	EGZ-64	<i>T. bicolor</i>
7	<i>Rhodosporidiobolus</i>	<i>R. ruineae</i>	HS	1	EGZ-39	<i>H.</i> <i>nycterodendron</i>
8	<i>Moiszyomices</i>	<i>Moiszyomices</i> <i>sp.</i>	HS	1	EGZ-20	<i>T. cacao L.</i>
9	<i>Sporobolomyces</i>	<i>S. japonicus</i>	HD	1	EGZ-49	<i>H.</i> <i>nycterodendron</i>
10	<i>Debaromyces</i>	<i>D. hansenii</i>	HD	1	EGZ-31	<i>H.</i> <i>nycterodendron</i>
11	<i>Wickerhamomyces</i>	<i>W. edaphicus</i>	HS	1	EGZ-38	<i>H.</i> <i>nycterodendron</i>

Nota: HD = Hoja Deteriorada, HS = Hoja Sana.

Figura 13

Mapa ubicación de procedencia de las levaduras utilizadas en este estudio



Nota: Gaslac (91).

1.2.2. Insumos

- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Caldo LB
- Glicerol
- Papel toalla
- Mondadientes
- Parafilm
- Perlas de vidrio

1.2.3. Reactivos químicos

- Cloranfenicol
- Alcohol 96°
- Alcohol 70°
- Agua destilada
- Tween 80

1.2.4. Materiales de laboratorio

- Matraz Erlenmeyer
- Placas Petri
- Asa de Digrafsky
- Tubos Falcon
- Micropipetas 100-1000 uL, 10-100 uL, 5uL
- Bisturí
- Celdas de cuarzo
- Mechero
- Tubos Eppendorf
- Asa de Kolle

- Sacabocado 0.7 cm
- Perlas de vidrio
- probeta

1.2.5. Aparatos y equipos

- Vortex
- Shaker
- Espectrofotómetro
- Autoclave
- Centrifugadora
- Sala de incubación
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Microscopio
- Balanza
- Cocinilla

1.3. Métodos

1.3.1. Subcultivos de las cepas de levaduras y el patógeno levaduras

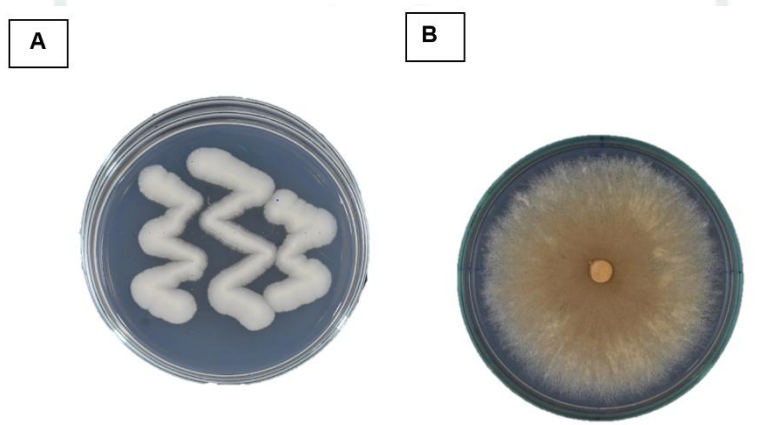
Inicialmente, las levaduras evaluadas estaban criopreservadas en glicerol al -80 °C, se reactivaron en caldo Luria Bertani a 28 °C, 180 rpm y se colocó 10 uL del inóculo en placas Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA suplementado con cloranfenicol 0.1%, diseminando con la ayuda de perlas de vidrio. Con las levaduras ya reactivadas, se realizaron 3 subcultivos por levadura con asa de Kolle previamente flameada en medio PDA suplementado con cloranfenicol 0.1%, sembrado por estría. Se realizaron subcultivos entre 7 a 15 días de edad para evitar trabajar con cultivos no muy viejos.

1.3.1.1. *Moniliophthora roreri*

En el caso de la *Moniliophthora roreri*, al ser un hongo y por su misma fisiología de crecimiento se sembró con un disco micelial de 7 mm de diámetro en una placa Petri con Agar PDA suplementado con cloranfenicol 0.1%, se observó el crecimiento a través del diámetro micelial del hongo proveniente de Iquitos, Bagua y Cusco; Cada hongo tuvo distinta velocidad de crecimiento, esto debido a la procedencia y condiciones expuestas. Sin embargo, las 3 cepas fueron incubadas en la reactivación y determinación de velocidad de crecimiento micelial a 26 °C.

Figura 14

Metodología de siembra y aislamiento de microorganismos; A) Levaduras antagonistas (Estría) y B) *M. roreri* con un disco de 0.7mm de diámetro (Disco micelial).



Nota: Elaboración propia.

1.3.2. Determinación de actividad antagonista

1.3.2.1. Ajuste de la concentración de inóculo de levaduras antagonistas y *Moniliophthora roreri*

Como etapa previa, se tuvo tanto cultivo de las diecisiete levaduras como el hongo (*Moniliophthora roreri*) en placas petri con medio PDA + antibiótico. Para obtener los inóculos, se prepararon tubos Falcon de 15 mL de capacidad con 6 mL de medio líquido LB estéril. Se inoculó la levadura dejando en agitación orbital en el shaker a 180 rpm por 24 horas a 26 °C, por otro lado, el hongo se inocula el mismo día del ensayo

A partir de los inóculos, se midió la concentración de levadura y hongo en el Bioespectrofotómetro. Desde la concentración inicial, se diluyó con agua destilada estéril para que tanto levadura como hongo alcancen la concentración final de OD600= 0.5, para la dilución se usó la siguiente fórmula hasta llegar al volumen final de 1 mL.

$$C_0 \times V_0 = C_F \times V_F$$

Donde:

C_0 = Concentración Inicial

V_0 = Volumen Inicial

C_F = Concentración Final

V_F = Volumen Final

Figura 15

Estandarización de la concentración de inóculo de levaduras y *Moniliophthora roreri*



Nota: Elaboración propia

- **Primer Método (ENSAYO DE CONFRONTACIÓN DIRECTA)**

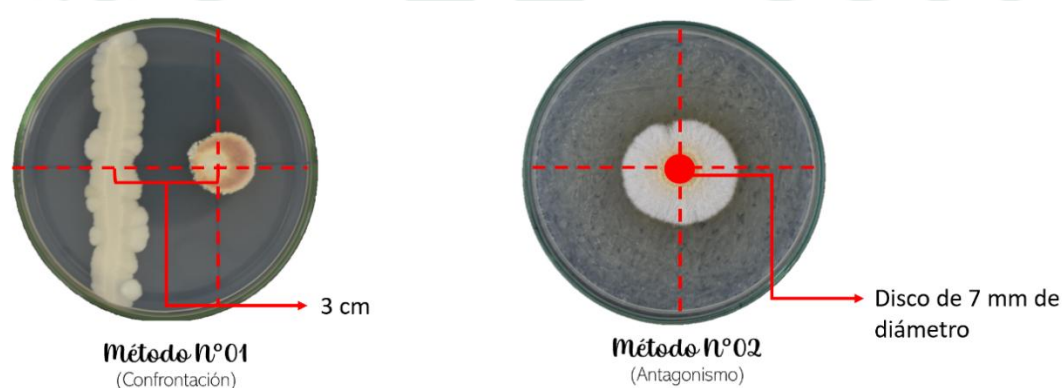
Una vez con los inóculos de ambos microorganismos con concentración conocida, se diseminó 20 µL de la levadura antagónica puesta como una línea paralela a 3 cm del cultivo de 10 uL de *Moniliophthora roreri* en medio PDA con cloranfenicol 0.01%.

- **Segundo Método (ENSAYO DE CONFRONTACIÓN DUAL)**

Se inoculó 100 uL de levadura a concentración $OD_{600\text{ nm}}=0.5$. Se esparció usando perlas de vidrio y un disco de *M. roreri* de 7 mm de diámetro a partir de una placa de mínimo 15 días de crecimiento, con un grosor de 20 mm^3 colocado en el centro de la placa (92).

Figura 16

Método usado para la determinación de actividad antagónica levadura vs. *Moniliophthora roreri* A) Primer Método (Ensayo de confrontación directa) B) Segundo Método (Ensayo de confrontación dual).



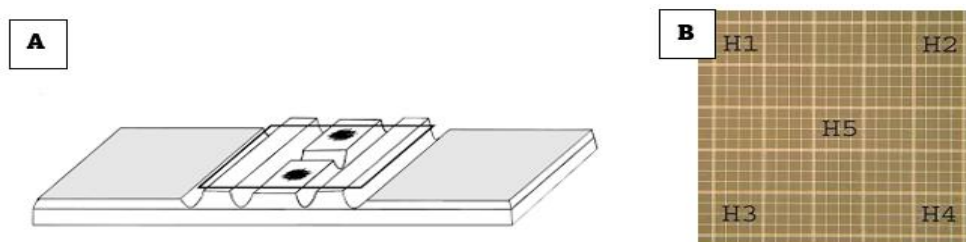
Nota: Elaboración propia.

1.3.3. Determinación de la inhibición de la germinación de esporas de *Moniliophthora roreri*

Para determinar la capacidad antagónica sobre la germinación de esporas, se usaron las placas del segundo método (Ensayo de confrontación dual) con 15 días de crecimiento, con la ayuda de un mechero, en condiciones estériles, se retiró 3 sacabocados de 5 mm de radio que fueron colocados en medio líquido LB con Tween 80 al 0.1% (para el desprendimiento de esporas), se usó el vórtex por 10 seg a 3000 rpm para homogenizar las esporas suspendidas. Para el conteo de esporas se usó la cámara de neuabuer con 10 uL de la suspensión de esporas, se contó el cuadrante central junto a los cuadrantes adyacentes, en total se contaron dos cuadrantes de los cuales se sacó el promedio para extrapolar el número de esporas hasta determinar el número total de esporas. Por otro lado, hubo repeticiones donde el área de crecimiento no abarcaba el diámetro del sacabocado, por lo tanto, se consideró que hubo 0 esporas.

Figura 17

Cámara de Neubauer A) Cuadrícula de recuento B) Cuadrante de conteo de esporas.



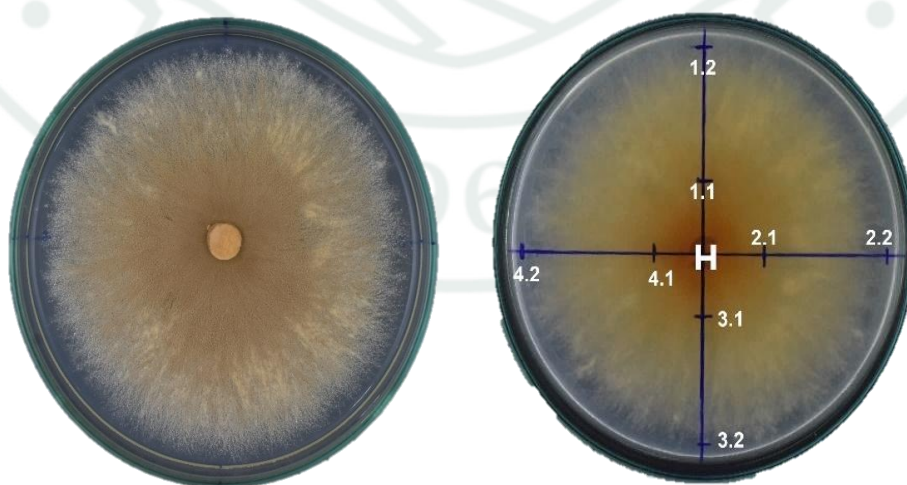
Nota: Elaboración propia

1.3.4. Determinación del crecimiento radial

Se determinó el área de crecimiento de la cepa pura de *Moniliophthora roreri* con un sacabocado de 7 mm de diámetro, se realizaron subcultivos en cajas petri de 9 cm de diámetro, con el sacabocado ubicado en el centro. Después de 24 horas, se empezaron a efectuar las correspondientes mediciones del crecimiento radial de forma transversal y longitudinal, marcando al reverso de la placa con cuatro radios equidistantes a partir del centro durante 7 a 15 días. Se determinó así el ritmo de crecimiento de cada cepa de *Moniliophthora roreri* (Cusco, Loreto y Amazonas). Es así como se demostró que las 3 cepas tienen distinta morfología y ritmo de crecimiento, a pesar de ser del mismo género y especie.

Figura 18

Cepa *Moniliophthora roreri* con 15 días de crecimiento A) Anverso B) Reverso (H) Disco de 0.7 mm de diámetro (1.1; 2.1; 3.1; 4.1) Radio de 7 días de crecimiento (1.2; 2.2; 3.2; 4.2) Radio de 15 días de crecimiento.



Nota: Elaboración propia.

1.3.5. Variables de evaluación

1.3.5.1. Área de crecimiento

Para el procesamiento de datos se desarrolló la fórmula descrita a continuación donde se consideró el diámetro longitudinal y transversal de la *Moniliophthora roreri*, y a partir de los datos se halló el radio 15 días del hongo en los ensayos confrontación directa y del mismo en ausencia de la levadura.

$$A_{15D} = \pi \times r_{1,15d} \times r_{2,15d}$$

Donde:

A_{15D} = Área de crecimiento de *Moniliophthora roreri* a los 15 días de crecimiento

$r_{1,15d}$ = Radio longitudinal de *Moniliophthora roreri* a los 15 días de evaluación

$r_{2,15d}$ = Radio transversal de *Moniliophthora roreri* a los 15 días de evaluación

1.3.5.2. Numero de esporas

Para determinar el efecto de las levaduras antagónicas contra la esporulación de esporas se extrapolo con los datos del conteo de esporas hasta tener:

Número de esporas por área. Número de esporas halladas a partir del área y número de sacabocados.

$$\#esp_mm^2 = \frac{P \times A_{15D}}{A_{SB}}$$

Donde:

$\#esp_mm^2$ = Numero de esporas por área

P= promedio del conteo de esporas en los dos cuadrantes

A_{15D} = Área de crecimiento de *Moniliophthora roreri*

A_{SB} = Área del sacabocado

$$\#Total_esp = \frac{\#esp_mm^2 \times A_{15D}}{A_{SB}}$$

Donde:

#Total_esp= Numero de esporas por área

#esp_mm²= Número de esporas por área

A_{15D}= Área de crecimiento de *Moniliophthora roreri* de 15 días

A_{SB}= Área del sacabocado

Número total de esporas. Esporas en total de la *Moniliophthora roreri* considerando el área total de crecimiento a los 15 días.

1.3.6. Determinación del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

La variable evaluada mide la inhibición del crecimiento de *Moniliophthora roreri* en presencia de las levaduras antagonicas, se calculó a través de la formula desarrollada por Skidmore y Dickinson (93).

$$PICR (\%) = \left[\frac{R_1 - R_2}{R_1} \right] \times 100\%$$

Donde:

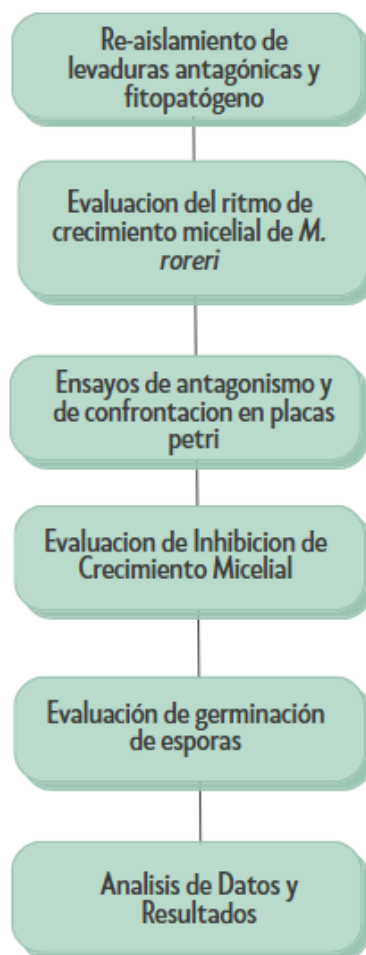
R1: Crecimiento radial de *M. roreri* (Control positivo)

R2: Crecimiento radial de *M. roreri* en cultivo dual (presencia de levaduras)

1.4. Diagrama de flujo de actividades

Figura 19

Diagrama de flujo de actividades



Nota: Elaboración propia.



CAPÍTULO III

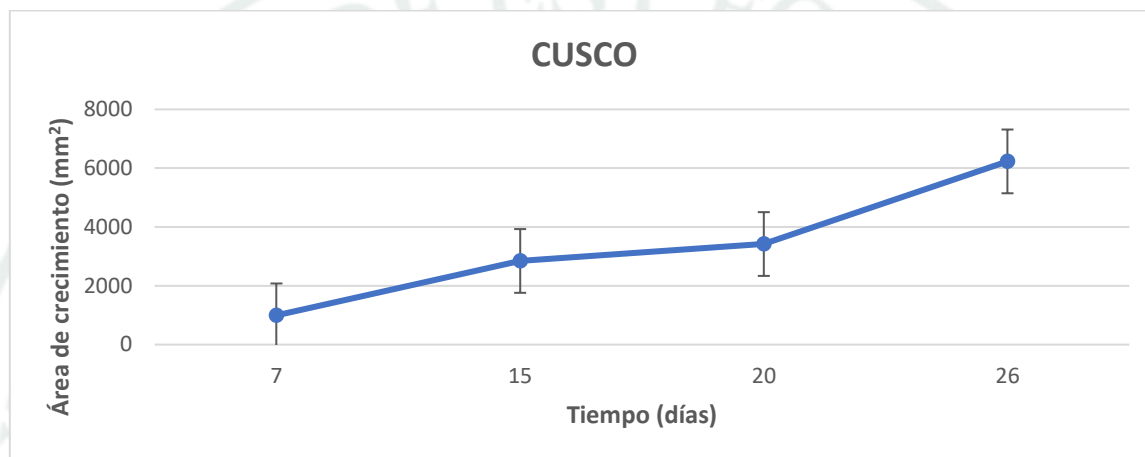
2. Resultados

2.1. Desarrollo de *Moniliophthora roreri*

2.1.1. Evaluación de ritmo de crecimiento

Figura 20

Área de crecimiento micelial promedio de *Moniliophthora roreri* a concentración OD_{600nm}=0.5, expresado en mm², del departamento de Cusco.

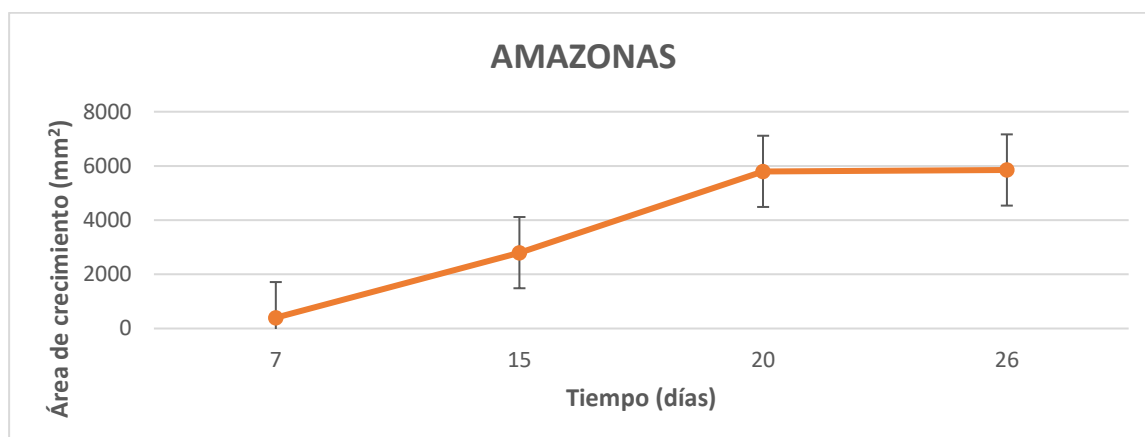


Nota: Elaboración propia.

La **Figura 20** presenta el crecimiento micelial promedio de los tres hongos de *Moniliophthora roreri* de Iquitos, Bagua y Cusco. En el Método N°01 (OD_{600nm}=0.5), el área promedio micelial a los 15 días alcanzó 6376, 5792 y 6312 mm² para las cepas de Cusco, Bagua e Iquitos, respectivamente. Según el gráfico el hongo proveniente de Iquitos fue el que llegó a su máxima capacidad de crecimiento en placa Petri a los 15 días.

Figura 21

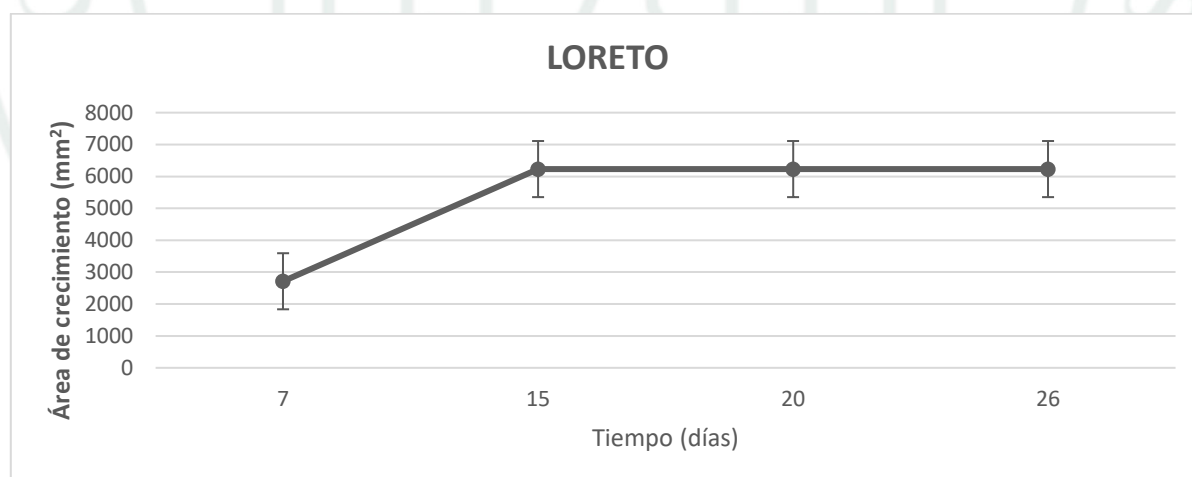
Área de crecimiento micelial promedio de *Moniliophthora roreri*, concentración OD_{600nm} = 0.5, expresada en mm², del departamento de Amazonas.



Nota: Elaboración propia.

Figura 22

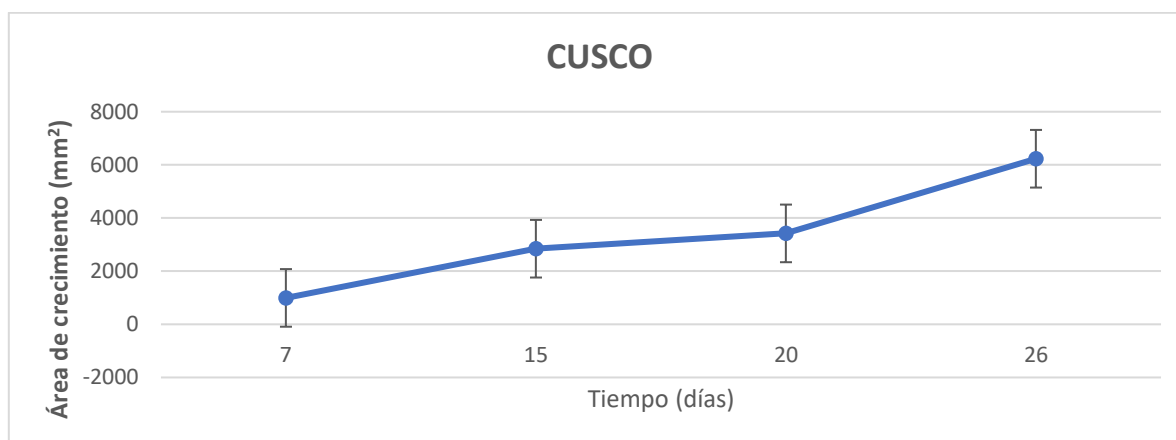
Área de crecimiento micelial promedio de *Moniliophthora roreri*, concentración OD_{600nm} = 0.5, expresada en mm², del departamento de Loreto



Nota: Elaboración propia.

Figura 23

Área de crecimiento micelial promedio de *Moniliophthora roreri* con sacabocado de 7 mm de diámetro, expresado en mm², del departamento de Cusco

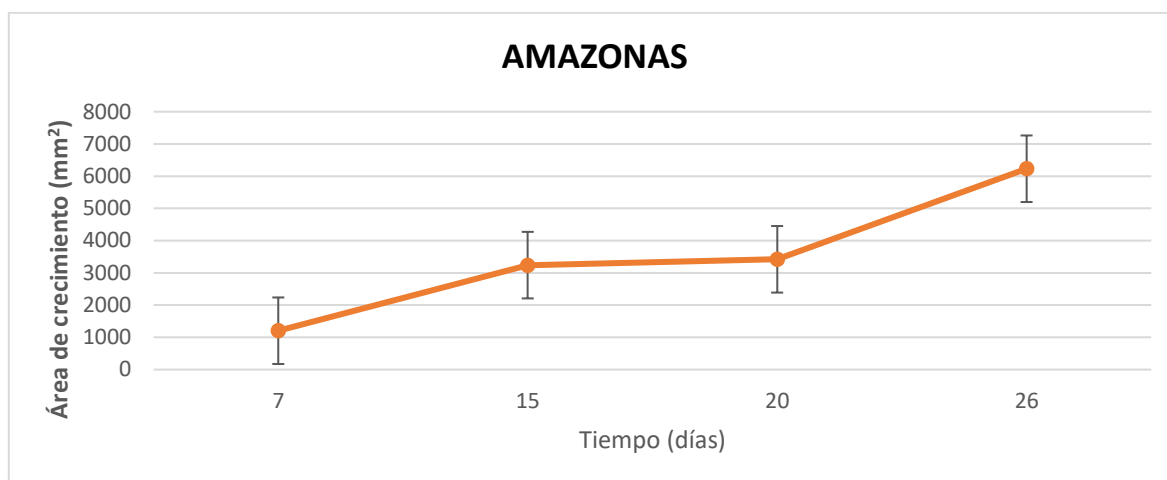


Nota: Elaboración propia.

La **Figura 23.** muestra el crecimiento micelial de *M. roreri* usando un disco infectado de 7 mm de diámetro. En este ensayo se evidenció el mismo resultado que el anterior ensayo, el patógeno del departamento de Cusco mostró menor ritmo de crecimiento, alcanzando su área máxima a los 25 días, seguido del departamento de Amazonas y Loreto. Se evidencian diferencias en el desarrollo del mismo patógeno de distinto origen, que nos indica cuán influyente es el origen geográfico sobre las características fisiológicas de un microorganismo.

Figura 24

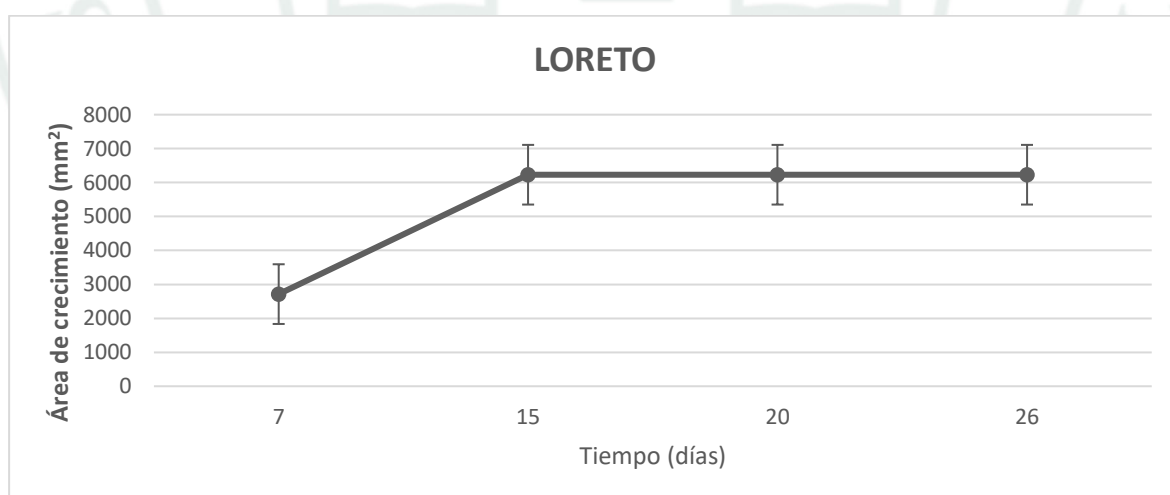
Área de crecimiento micelial promedio de *Moniliophthora roreri* con sacabocado de 7 mm de diámetro, expresado en mm², del departamento de Amazonas.



Nota: Elaboración propia.

Figura 25

Área de crecimiento micelial promedio de *Moniliophthora roreri* con sacabocado de 7 mm de diámetro, expresado en mm², del departamento de Loreto



Nota: Elaboración propia.

Tabla 3

Resultado del ritmo de crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*

	OD_{600 nm}=0.5	SACABOCADO 5 mm²
CUSCO	245.23 mm ² /día	239.65 mm ² /día
AMAZONAS	289.60 mm ² /día	238.46 mm ² /día
LORETO	415.40 mm ² /día	420.80 mm ² /día

Nota: Elaboración propia.

En base a los datos obtenidos de ritmo de crecimiento a través del disco de 7 mm y espectrofotometría OD_{600nm}=0.5, se estableció como periodo de evaluación 15 días para los ensayos de confrontación dual y confrontación directa. Los resultados indican que el origen geográfico del patógeno influye sobre su ritmo de crecimiento (Iquitos > Bagua > Cusco). *M. roreri* de Iquitos fue el de ritmo de crecimiento más acelerado (aproximadamente con ritmo de crecimiento radial de 3.2 mm/día), cuyo dato coincide según Krauss (92), que describe el ritmo de crecimiento radial se encuentra dentro del comportamiento esperado, que varía entre 1.3 y 6.2 mm/día. Considerando que Cusco presenta un crecimiento lento después de Bagua, estos datos indican que la diferencia de velocidad puede deberse a su adaptación debido a las condiciones distintas de cultivo in vitro a diferencia de su condición in situ.

Finalmente, estas evaluaciones se realizaron en condiciones controladas a nivel in vitro; no se puede definir completamente el comportamiento del patógeno a diferencia de evaluarlo en un fruto infectado en campo, ya que existen diversos factores externos y/o limitaciones (97) que promueven o limitan el crecimiento del patógeno como competencia microbiana natural, respuesta de la planta, variación climática que modifican el comportamiento ya evaluado.

2.1.2. Tipo de crecimiento micelial

Se realizó una caracterización general de sus características morfofisiológicas, determinando la apariencia de crecimiento que presenta el hongo, color, forma y bordes.

A pesar de ser el mismo género y especie tuvieron las siguientes diferencias:

Tabla 4
Características macroscópicas de las colonias de aislados de *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo de PDA

CÓDIGO DE LA CEPA	IMAGEN DE LA COLONIA	CARACTERISTICAS
MR_I (<i>Moniliophthora roreri</i> , Iquitos)		Inicialmente presenta una coloración blanca, que se torna al color beige y finalmente color marrón con bordes claros. Tiene hifas aéreas de esporulación moderada distribuida homogéneamente.
MR_B (<i>Moniliophthora roreri</i> , Bagua)		Presenta una coloración central oscura marrón con bordes hacia una transición color beige con esporulación uniforme.

MR_C (<i>Moniliophthora roreri</i> , Cusco)		Tiene un centro pigmentado con bordes más claros, y crecimiento radial difuso.
--	---	--

Nota: Elaboración propia.

De forma general, el hongo *Moniliophthora roreri*, según Philips et al, las colonias del fitopatógeno presentan áreas de crecimiento concéntrico con esporulación localizada, susceptible a presentar variabilidad fenotípica bajo condiciones de cultivo in vitro, reflejada en diferencias morfofisiológicas (25).

En el patógeno de Iquitos, su esporulación fue más homogénea y abundante junto a su crecimiento radial (3.2 mm/día), dadas dichas características, se puede inferir que su capacidad de propagación es más rápida debido a la esporulación uniforme. Este hallazgo, según detalla Golan, Jacob; Pringle, Anne afirman que a mayor densidad, facilita la propagación, es mucho más rápida. En contraste con el patógeno de Cusco, su desarrollo fue más lento ya que tiene una menor densidad de esporulación por su crecimiento difuso (94).

2.2. Identificación morfológica de levaduras antagonistas

En total se evaluaron 17 levaduras que fueron aisladas a nivel de hoja de cultivos de cacao cuya característica morfológica constó de:

Tabla 5
Descripción morfológica de levaduras evaluadas

LEVADURAS	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN MACROSCOPICA	FOTO
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	EGZ-01; EGZ-23; EGZ-33; EGZ-41; EGZ-53; EGZ-63	Colonia de tonalidad blanco cremoso, superficie uniforme con bordes irregulares y presencia de pseudomicelio.	
<i>Candida sp.</i>	EGZ-03	Colonia de color blanco y uniforme, con textura algodonosa, con bordes irregulares, y elevación sutilmente convexa.	
<i>Hannaella phetchabunensis</i>	EGZ-06	Colonia de color amarillo, superficie uniforme, de borde irregular con textura suave y pegajosa de aspecto húmedo.	
<i>Hannaella taiwanensis</i>	EGZ-48	Presenta un tono amarillo suave, superficie y bordes irregulares, de aspecto húmedo.	

<i>Hannaella sp.</i>	EGZ-51	Colonia de tono amarillo dorado, de textura uniforme con bordes de forma irregular al igual que la especie anterior de consistencia pegajosa con aspecto húmedo.	
<i>Kwoniella heveanensis</i>	EGZ-07	De tonalidad blanco cremoso, superficie rugosa, con contornos irregulares de apariencia húmeda.	
<i>Rhodospiridiobolus ruineae</i>	EGZ-39	Colonia de color rojo pálido de apariencia áspera con bordes irregulares, de forma abultada o convexa y de aspecto seco.	
<i>Moiszyomices sp.</i>	EGZ-20	De color rosa pálido, superficie de textura irregular y agrietada, con contornos irregulares, de aspecto seco con presencia de cuerpo fructífero.	

<i>Sporobolomyces japonicus</i>	EGZ-49	De apariencia naranja suave, con superficie agrietada y borde irregular de elevación sutil con aspecto opaco.	
<i>Debaromyces hansenii</i>	EGZ-31	Colonia de color blanco con apariencia suave y esponjosa, de superficie uniforme, de bordes irregulares y apariencia húmeda.	
<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>	EGZ-38	Colonia de aspecto completamente blanco, con superficie irregular y borde curvado, forma plana y aspecto seco.	

Nota: Elaboración propia.

El análisis morfológico de las 11 se observó la presencia de estructuras como *Meyerozyma guilliermondii*, se observó la presencia de pseudomicelio que le brinda una capacidad que favorece a la colonización y competencia por espacio (96). Así se demostró en la levadura *Candida albicans*, que sus pseudohifas mejoran su adhesión y colonización (98). *Rhodospiridiobolus ruineniae*, presenta una coloración roja asociada a los carotenoides, cuya producción es influenciada por factores de estrés exógeno (99). Estos pigmentos favorecen la supervivencia en diversos ambientes por tener una característica protectora. El resto de las levaduras no presenta estudios previos y/o antecedentes previos que relacionen sus características morfofisiológicas con la mejora de su actividad biocontroladora.

2.3. Análisis estadístico

A partir de la prueba de Shapiro-Wilk y Levene se determinó si los resultados respondían a pruebas paramétricas o no paramétricas, siendo ($W = 0.723$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$) y ($F = 3.0808$, $p = 1.247 \times 10^{-15}$), respectivamente. Ambas pruebas fueron rechazadas ($p < 0.05$), para el área de 15 días de enfrentamiento (mm^2). Dado que es un diseño factorial completo con 5 repeticiones por tratamiento además de su violación de supuestos, se usó una variante de ANOVA que es usado para modelos donde no se cumple los supuestos estadísticos es decir una prueba no paramétrica que evaluara los efectos principales y sus interacciones, ART ANOVA fue el más preciso para la evaluación de los objetivos en RStudio con el paquete ARTool.

La marcada diferencia de supuestos estadísticos está relacionada a la naturaleza de la investigación ya que en la parte experimental, al determinar el radio del patógeno, se trabajó con unidades de medida pequeñas usando el vernier, que es susceptible a variaciones mínimas, que contribuyen a la dispersión de datos.

Mediante la **Tabla 7**, se determina que todos los factores intervienen significativamente sobre nuestra variable de respuesta ($p < 0.05$).

Tabla 6
Resultados de supuestos estadísticos para el análisis de área de crecimiento a los 15 días

SUPUESTO EVALUADO	PRUEBA USADA	ESTADÍSTICO	VALOR P	CONCLUSIÓN
Normalidad de residuos	Shapiro-Wilk	$W=0.72336$	$P=2.2E-16$	No se cumple la normalidad ($p<0.05$)
Homogeneidad de varianzas	Prueba de Levene	$F=3.0808$	$P=1.247e-15$	No se cumple la homogeneidad de varianzas ($p<0.05$)

Nota: Elaboración propia.

Tabla 7
Resultados de ART ANOVA.

EFFECTO	GL	GL.RES	F	P-VALOR
Método	1	408	812.040	< 2.22e-16
Levadura	16	408	81.435	< 2.22e-16
Procedencia del hongo	2	408	74.586	< 2.22e-16
Procedencia del hongo: Método	2	408	84.786	< 2.22e-16
Levadura: Método	16	408	66.235	< 2.22e-16
Procedencia del Hongo: Levadura	32	408	19.724	< 2.22e-16
Procedencia del Hongo: Método: Levadura	32	408	17.382	< 2.22e-16

Nota: Elaboración propia.

A través de la **Tabla 8**, se determinó el tamaño del efecto de los factores (η^2 parcial) sobre el área de crecimiento de 15 días, siendo la levadura (η^2 parcial = 0.73) y el método (η^2 parcial = 0.63) los factores con mayor influencia sobre la inhibición del hongo *M. roreri*. Otros efectos como la Procedencia del Hongo también tuvieron influencia (η^2 parcial = 0.21), pero no tan marcada como los demás factores.

Tabla 8
Tamaño del efecto (η^2 parcial) de los factores e interacciones, a través de ANOVA ART, sobre el área de crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

FACTOR	η^2 PARCIAL	IC 95%
Método	0.67	0.63, 1.00
Levadura	0.76	0.73, 1.00
Procedencia del hongo	0.27	0.21, 1.00
Procedencia del hongo: Método	0.29	0.23, 1.00
Levadura: Método	0.72	0.69, 1.00
Procedencia del Hongo: Levadura	0.58	0.51, 1.00

Nota: Elaboración propia.

2.3.1. Comparación entre los ensayos de confrontación

Según la **Tabla 10**. Existe diferencia entre el Método N°02 con respecto al Método N°01 ($p < 0.05$) con una diferencia de 238 mm². Obteniendo que en condiciones de contacto directo las levaduras ejercen un mayor efecto biocontrolador teniendo una menor área de crecimiento por parte del patógeno. Dichos efectos son atribuidos a la acción de mecanismos directos, los cuales son interacciones físicas o químicas entre el agente biocontrolador (levadura) y el patógeno (64,95). Entre estos mecanismos ejercidos por levaduras se incluyen: la competencia por nutrientes y espacio (86), producción de enzimas hidrolíticas (96), secreción de compuestos antimicrobianos (97) y, por último, micoparasitismo (98), a pesar de ser poco común en levaduras, igual se involucra como un mecanismo directo.

Tabla 9

Comparación de respuesta entre métodos para determinar el método con mejor respuesta de actividad biocontroladora de levaduras contra *M. royeri*.

MÉTODO	MEDIA ESTIMADA	ERROR ESTÁNDAR	GRADOS DE LIBERTAD	LÍMITE INFERIOR 95%	LÍMITE SUPERIOR 95%
1	374	5.9	408	363	386
2	137	5.9	408	125	148

Nota: Elaboración propia.

Tabla 10

Contraste de medias entre los métodos.

CONTRASTE	ESTIMACIÓN DIFERENCIA	SE	DF	T VALOR	P VALOR
Método 1 – Método 2	238	8.34	408	28.5	<0.0001

Nota: Elaboración propia.

En síntesis, el método de confrontación directa tiene una mejor respuesta biocontroladora, probablemente porque permite que la levadura ejerza mecanismos de acción no solo directo sino también indirecto. Sin embargo, es importante complementar esa observación realizando estudios donde se evalúen y caractericen los compuestos volátiles o metabolitos secundarios.

2.3.2. Diferencia de las cepas de *Moniliophthora roreri* procedentes de: Loreto, Amazonas, y Cusco

A través de análisis post-hoc se comparó si entre niveles en el origen del patógeno existe diferencia significativa o presentan un comportamiento similar mediante un análisis post-hoc realizado entre grupos. Los análisis post-hoc realizados entre grupos (Iquitos vs. Cusco) **Figura 3.**, (Iquitos vs. Bagua) **Figura 4.**, (Cusco vs. Bagua) **Figura 5.**, se demostró así que:

- Para Iquitos vs. Cusco y Cusco vs. Bagua ambos presentan un valor $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula, es decir, que no son significativamente similares.
- Para Iquitos vs. Bagua el valor p es $p \geq 0.05$, son significativamente similares.

Tabla 11

Comparaciones entre procedencia del hongo

COMPARACIÓN	ESTIMACIÓN DE CONTRASTE	SE	T-RATIO	P-VALOR
Iquitos – Cusco	160.71	14.9	10.801	<0.5
Iquitos – Bagua	6.89	14.9	0.463	0.889
Cusco – Bagua	-153.82	14.9	-10.338	<0.5

Nota: Elaboración propia.

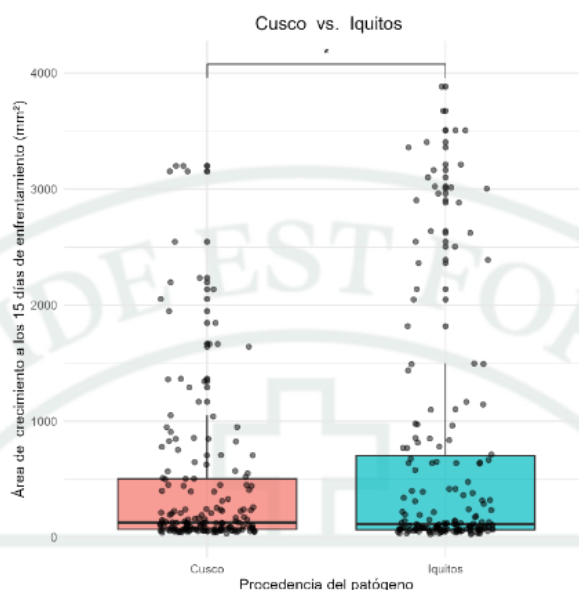
Las comparaciones determinaron que el comportamiento del patógeno del departamento de Cusco presenta variabilidad frente a Iquitos y Bagua, el resultado es coherente con lo reportado en Perú, donde se ha descrito una elevada diversidad genética y fenotípica según el origen geográfico (95). Esto indica que el origen geográfico de un patógeno es además un factor influyente sobre el comportamiento de biocontrol por parte del antagonista.

Dicha hipótesis es sustentada por un estudio que evaluó la actividad antagónica de *Trichoderma* frente a *Sclerotinia sclerotiorum* de Brasil y EE.UU que reveló que la susceptibilidad de un método de control varía de acuerdo al origen geográfico del patógeno (96).

Este hallazgo resalta la importancia de tomar en cuenta la diversidad intraespecífica en estudios de biocontrol, debido las diferencias de diversidad pueden influir significativamente en la respuesta biocontroladora, como las levaduras. Y demuestra la necesidad de adaptar los métodos de biocontrol considerando la procedencia del patógeno y las condiciones de crecimiento.

Figura 26

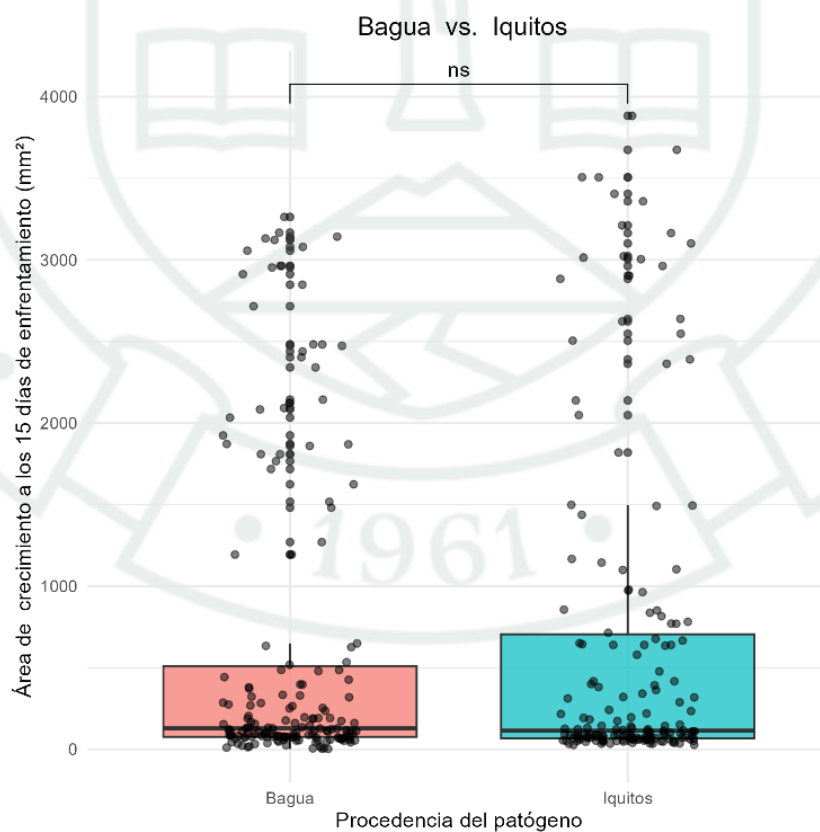
Diagrama de caja del área promedio a los 15 días entre la cepa de Iquitos y Cusco.



Nota: Elaboración propia.

Figura 27

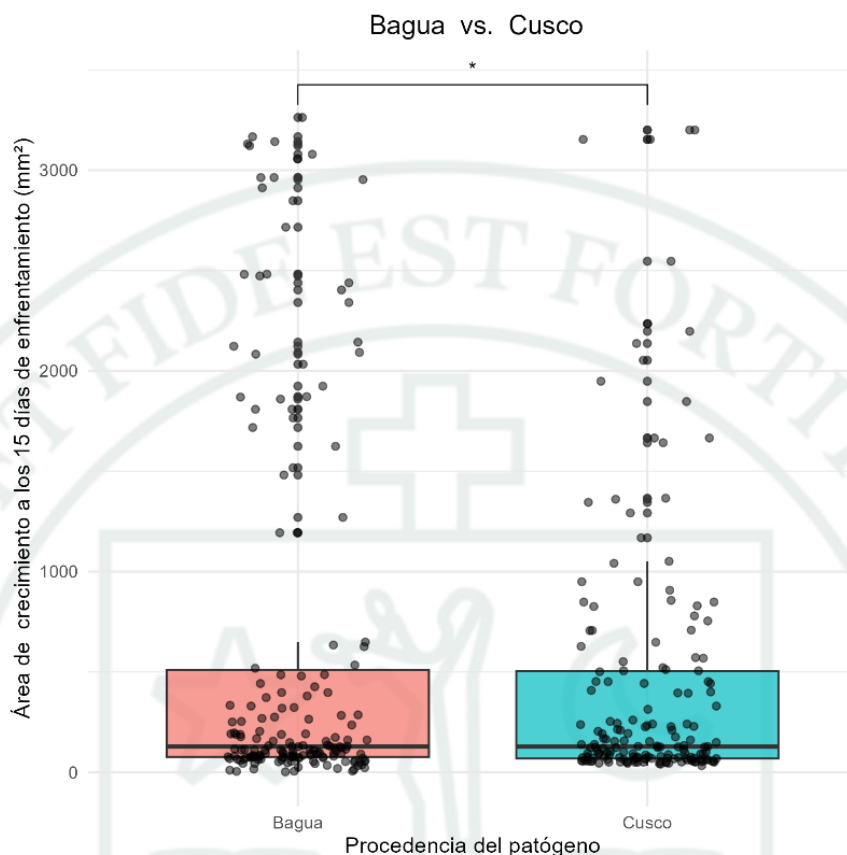
Diagrama de caja del área promedio a los 15 días entre la cepa de Bagua e Iquitos .



Nota: Elaboración propia.

Figura 28

Diagrama de caja del área promedio a los 15 días entre la cepa de Cusco y Bagua.



Nota: Elaboración propia.

2.3.3. Resultados de efectos en el Método N°01 y Método N°02

Las 17 levaduras evaluadas aisladas del Parque Nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor tienen efecto inhibitorio significativo sobre *Moniliophthora roreri*, presentando una distinta respuesta según el método utilizado (directo e indirecto) y la procedencia del patógeno (Cusco, Bagua e Iquitos).

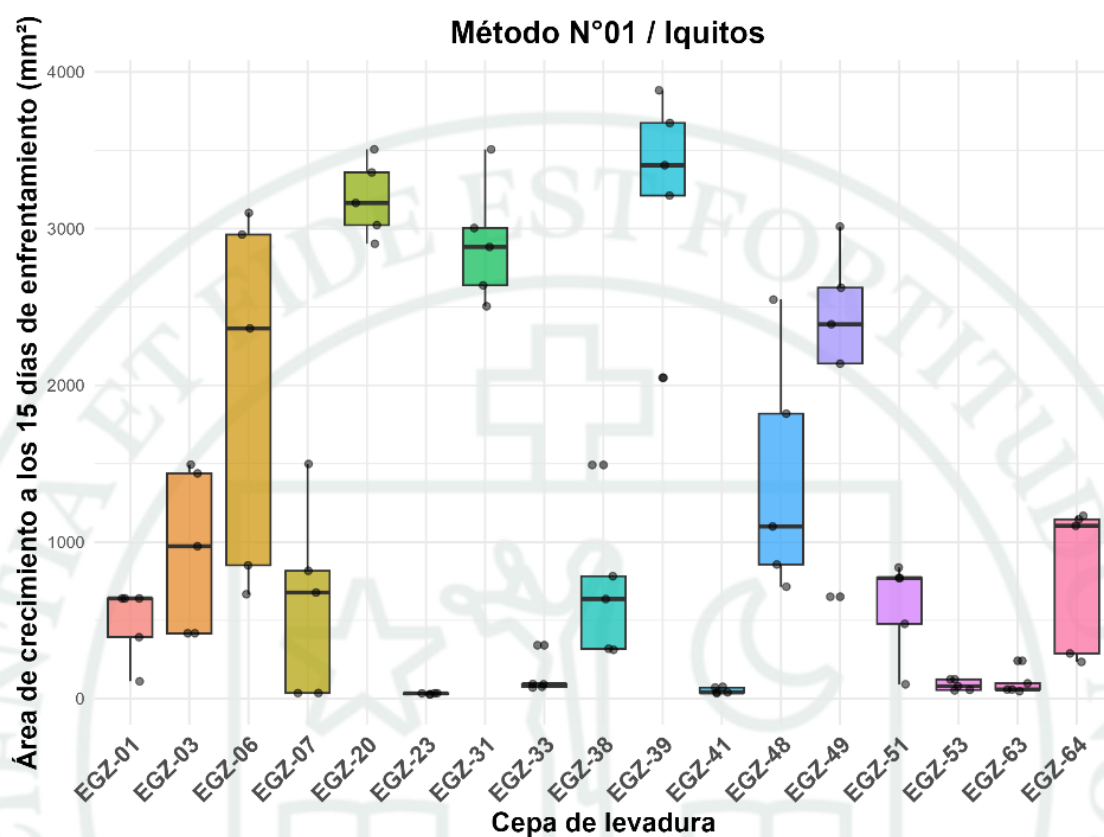
2.3.3.1. Método N°01 (Indirecto)

Ejerce actividad biocontroladora sobre el patógeno pero no tan fuerte como el Método N°01

En el departamento de Loreto, las levaduras EGZ-41, EGZ-53, EGZ-23, EGZ-33, EGZ-63 son las que presentan un mejor comportamiento en el ensayo indirecto superando el 95% de Porcentaje de Inhibición de Crecimiento. Y las levaduras EGZ-20 (42.67%) y EGZ-39 (38.31%) son las de bajo efecto inhibitorio

Figura 29

Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Iquitos a través del Método N°01

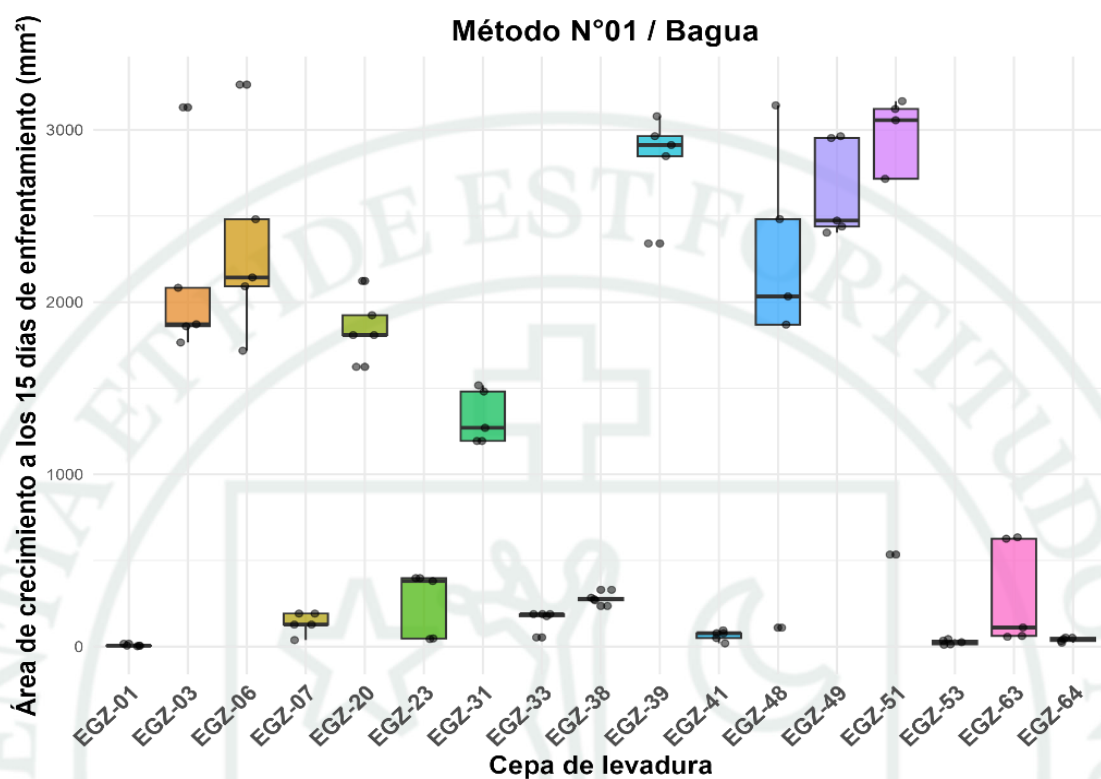


Nota: Elaboración propia.

En Bagua, mostró mejor comportamiento las levaduras EGZ-01 (99.87%), EGZ-53 (99.42%), EGZ-64 (99.00%), EGZ-38 (93.71%). Y las levaduras EGZ-51 (30.04%) EGZ-39 (33.34%) son las que ejercen bajo efecto inhibitorio.

Figura 30

Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Bagua a través del Método N°01.

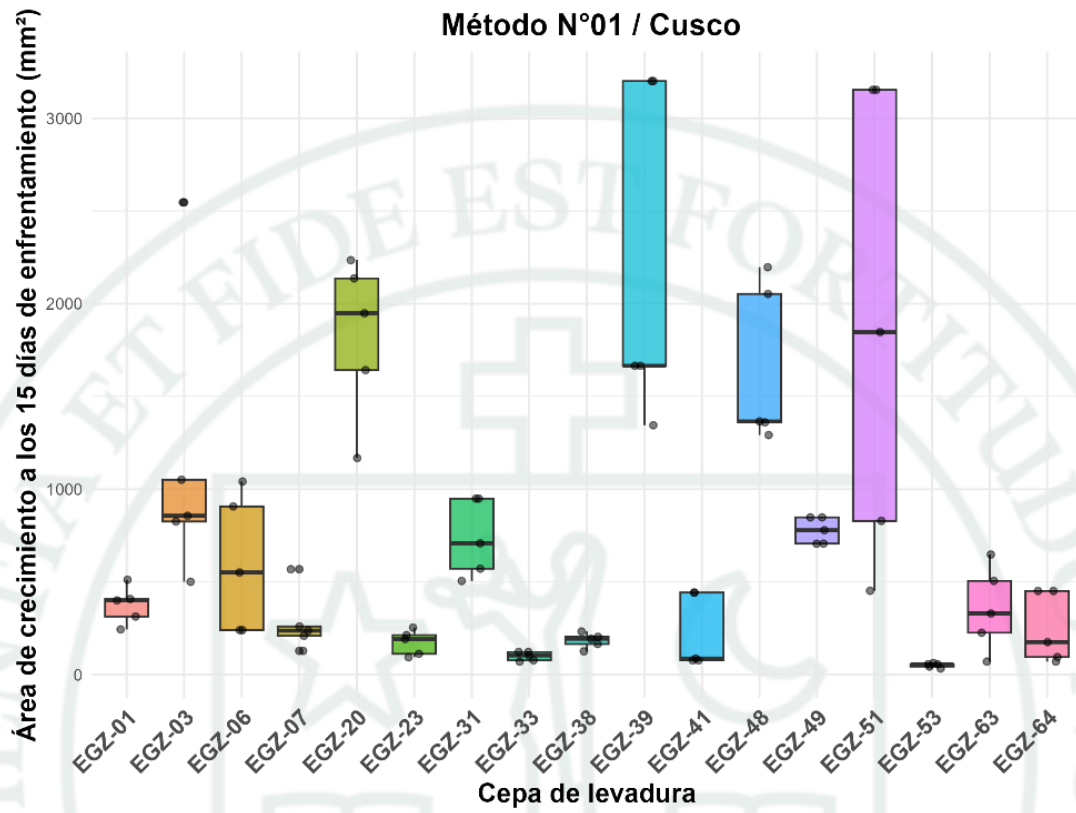


Nota: Elaboración propia.

En Cusco, mostró mejor comportamiento las levaduras EGZ-53 (98.46%) y EGZ-33 (97.19%). Por otro lado, las levaduras con bajo efecto inhibitorio fueron EGZ-20 (47.10%), EGZ-39 (54.78%) y EGZ-51 (49.85%).

Figura 31

Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Cusco a través del Método N°01.



Nota: Elaboración propia.

Tabla 12

Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial en Método N°01.

LEVADURA	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN MICELIAL (PIC%)		
	IQUITOS	BAGUA	CUSCO
EGZ-01	88.41	99.87	89.12
EGZ-03	82.37	57.16	76.74
EGZ-06	57.18	50.94	85.03
EGZ-07	87.73	97.08	93.55
EGZ-20	42.67	58.6	47.1
EGZ-23	99.39	91.3	94.78
EGZ-31	47.76	70.93	80.77
EGZ-33	98.33	95.69	97.19
EGZ-38	88.48	93.71	94.74
EGZ-39	38.31	33.34	54.78
EGZ-41	99.28	98.22	97.63
EGZ-48	80.08	53.46	62.92
EGZ-49	56.7	43.39	78.85
EGZ-51	86.06	30.04	49.85
EGZ-53	98.56	99.42	98.46
EGZ-63	98.94	97.46	91.04
EGZ-64	80.01	99.00	95.22

Nota: Elaboración propia.

En resumen, se evidencia que con el Método N°01 que es el ensayo de confrontación dual identifica a: *Meyerozyma guilliermondii*, *Kwoniella heveanensis*, *Wickerhamomyces edaphicus* como las levaduras con mejor comportamiento en la inhibición del patógeno. A través del ensayo se puede inferir que las levaduras de efecto biocontrolador emiten COV's grupos como alcoholes, aldehídos, ácidos orgánicos o cetonas (102), y/o moléculas específicas como 3-metil-1-butanol, alcohol feniletílico, acetato de etilo o isoamilo (97,98). Su mecanismo de los compuestos es a través de la interacción con la membrana celular del patógeno alterando la difusión de iones y metabolitos primarios de su membrana (99).

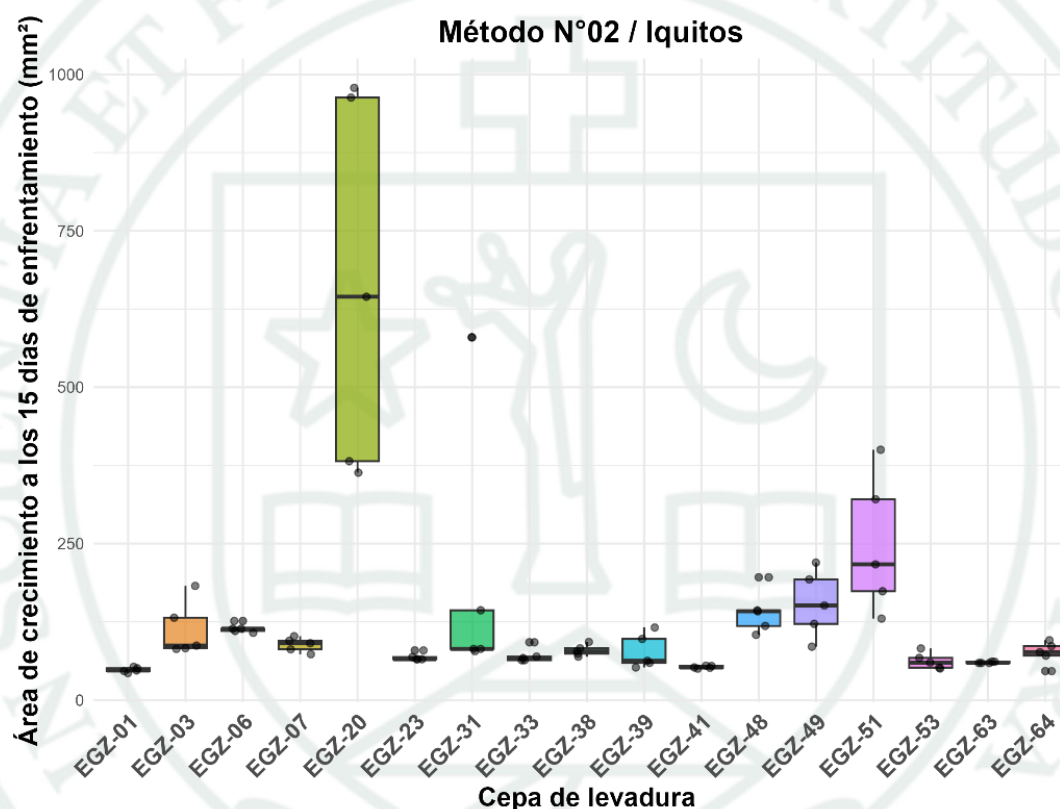
Sin embargo, dichos datos fueron avalados junto con el Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial (% PICM), que permite comparar el área de crecimiento que es inversamente proporcional al % PICM. En este sentido, se demuestra que *Meyerozyma guilliermondii*, *Kwoniella heveanensis* y *Wickerhamomyces edaphicus* presentan capacidad para inhibir el desarrollo de *M. roreri*, alcanzando porcentajes que superan el 85% en el ensayo de confrontación directa. Dichos resultados coinciden con lo reportado previamente, donde se reportaron valores de PICR% entre 86% y 95% respecto a *Kwoniella heveanensis* (100). Por último, *Wickerhamomyces edaphicus* tiene información escasa sobre PICR%; sin embargo, su antecedente antagónico se ve reportado en el apartado 3.3.5.

2.3.3.2. Método N°02 (Directo)

En Iquitos, mostró una menor área de crecimiento del patógeno EGZ-01 (47.20 mm²), EGZ-33 (47.94 mm²), EGZ-41 (52.04 mm²); las levaduras con bajo efecto inhibitorio es decir las de mayor área del patógeno fueron **EGZ-20** (644.66 mm²) y EGZ-51 (216.81 mm²).

Figura 32

Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Iquitos a través del Método N°02.



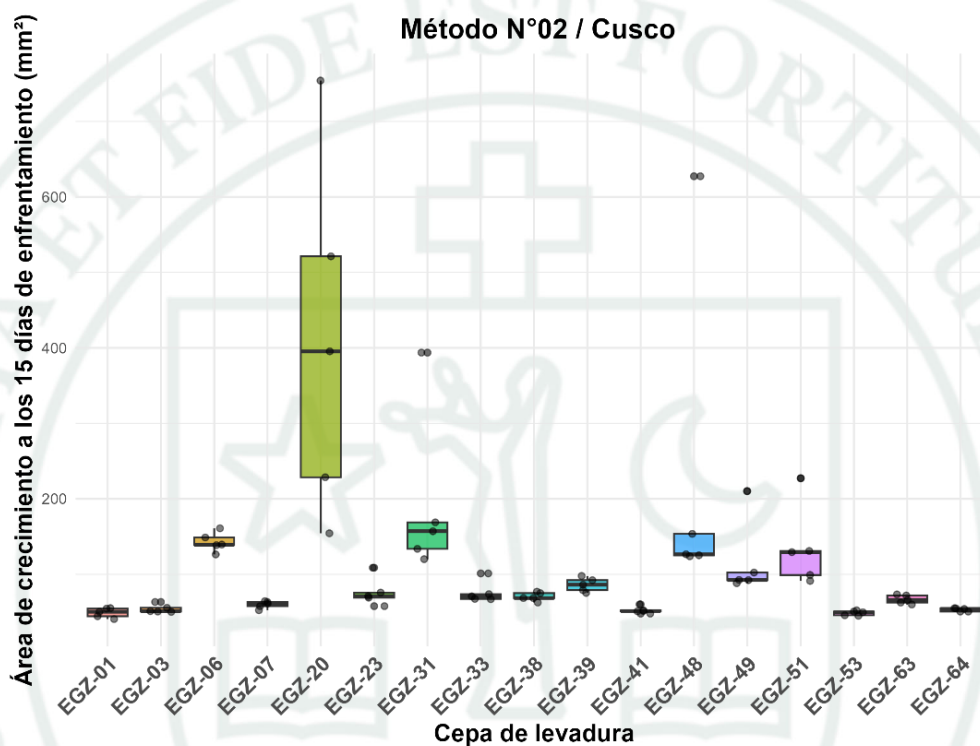
Nota: Elaboración propia.

En Cusco, las levaduras con baja área de crecimiento fueron EGZ-01 (50.45 mm²), EGZ-53 (48.69 mm²), EGZ-03 (51.20 mm²), las levaduras gran área de crecimiento del hongo fueron: EGZ-31 (157.03 mm²) y EGZ-20 (395.38 mm²).

Figura 33

Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Cusco a través del Método

N°02.

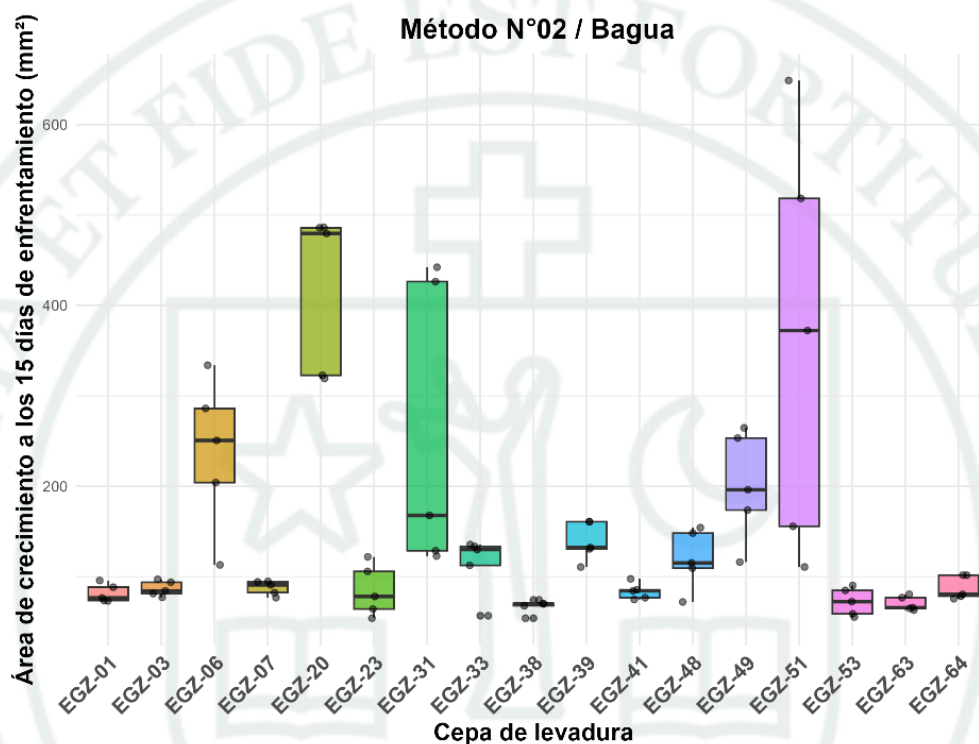


Nota: Elaboración propia.

En Bagua, las levaduras con capacidad de biocontrol fueron: EGZ-53 (72.37 mm²), EGZ-63 (65.76 mm²), **EGZ-38 (69.84 mm²)**; las levaduras con bajo efecto biocontrolador fueron: **EGZ-20 (479.61 mm²)** y EGZ-51 (372.30 mm²).

Figura 34

Cuadro de cajas y su comparación de efectos en la cepa de Bagua a través del a través del Método N°02



Nota: Elaboración propia.

Tabla 13
Resultado del área de *Moniliophthora roreri* (Iquitos, Cusco y Bagua) en el Método N°02.

	Área 15 días (mm ²)		
LEVADURA	IQUITOS	CUSCO	BAGUA
EGZ-01	47.20	50.45	76.51
EGZ-41	47.94	52.52	84.37
EGZ-53	52.04	48.69	72.37
EGZ-23	59.11	71.06	78.15
EGZ-33	62.63	70.88	130.04
EGZ-63	65.19	66.04	65.76
EGZ-03	76.58	51.20	84.19
EGZ-06	77.66	139.40	250.70
EGZ-48	81.69	126.54	115.15
EGZ-51	86.94	129.36	372.30
EGZ-07	90.75	61.23	90.96
EGZ-64	92.25	54.11	80.36
EGZ-39	113.88	86.18	132.24
EGZ-20	141.81	395.38	479.61
EGZ-49	151.02	92.56	196.10
EGZ-31	216.81	157.03	167.72
EGZ-38	644.66	68.59	69.84

Nota: Elaboración propia.

Como resultado, se concluye que las levaduras con actividad biocontroladora más destacadas en el método directo son las especies: *Meyerozyma guilliermondii* (EGZ-01, EGZ-33, EGZ-41, EGZ-53 y EGZ-63), *Candida sp.* (EGZ-03), *Wickerhamomyces edaphicus* (EGZ-38). Dichas levaduras demostraron mejores resultados, es decir, una menor área de crecimiento del patógeno, lo que sugiere la acción de mecanismos que actúan físicamente con el patógeno, como la competencia por nutrientes y espacio, y la producción de enzimas hidrolíticas. Por otro lado, las levaduras con bajo efecto antagónico

fueron: *Moiszyomices sp.* (EGZ-20), *Hannaella sp.* (EGZ-51), *Debaromyces hansenii* (EGZ-31)

Ambas metodologías confirman la efectividad de especies validando así su uso para estrategias sostenibles en la agricultura, como es el caso de *M. guilliermondii* y *Wickerhamomyces edaphicus*, que mostraron actividad inhibitoria en ambos métodos. Además, es importante señalar que en el Método N° 01 se usó el % PICR como determinante para identificar a la levadura antagonica, mientras que en el Método N° 02, basado en el contacto directo, se usa como resultado el área de crecimiento debido a que el % PICR arroja valores extremadamente altos. Esto se justifica porque se usa un método donde se puede evaluar tanto sus mecanismos directos como indirectos.

Por otro lado, la elevada actividad biocontroladora puede estar influenciada por diversos factores como la concentración de levadura y/o la baja concentración o el cultivo viejo de células del hongo patógeno. Para descartar dichas hipótesis, es necesario realizar nuevamente ensayos controlando la concentración de la levadura antagonista.

2.3.4. Inhibición de germinación de esporas.

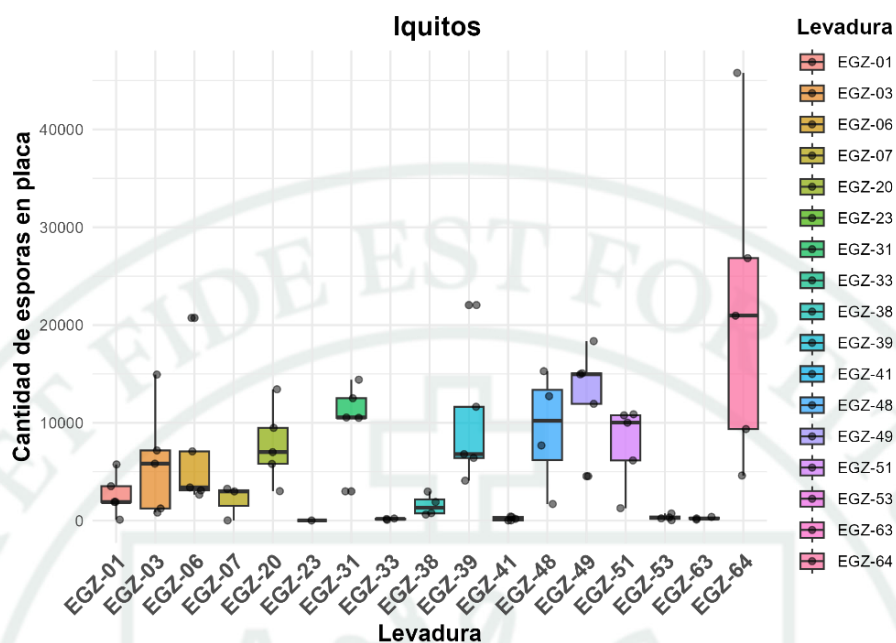
La prueba solo se realizó en el Método N°01 debido a las condiciones del ensayo de confrontación directa.

Obteniendo los siguientes resultados:

En el Método N°01 en presencia del patógeno del departamento de Loreto, las levaduras EGZ-23 (0 esporas/placa), EGZ-07 (35 esporas/placa) y EGZ-33 (93 esporas/placa) demostraron un alto potencial biocontrolador, demostrando el mínimo número de esporas en total.

Figura 35

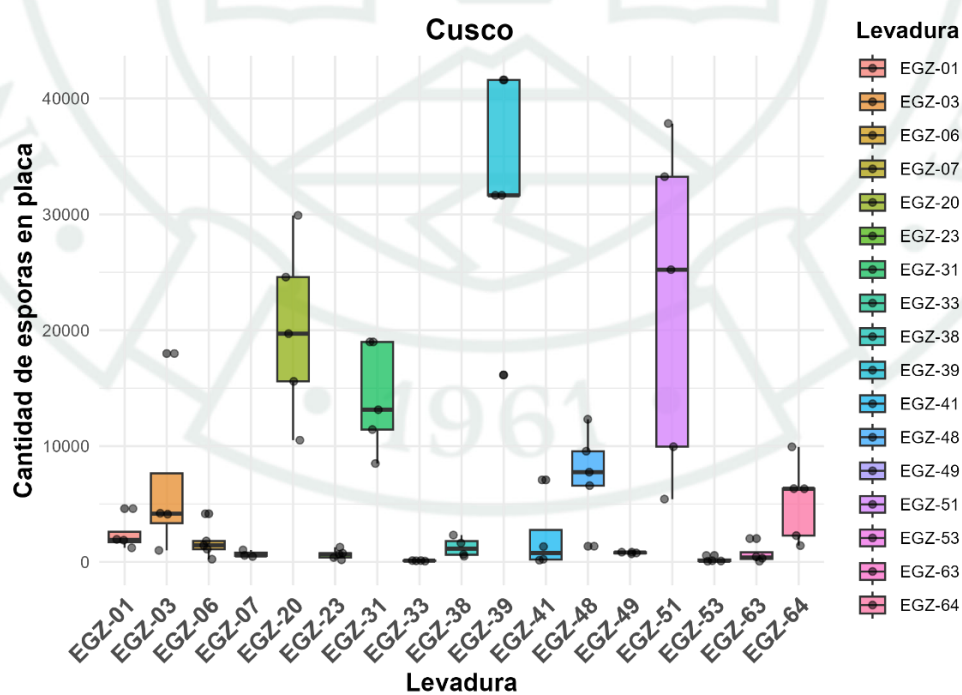
Efecto de levaduras sobre la esporulación de *M. roreri* (Cepa Iquitos).



Nota: Elaboración propia.

Figura 36

Efecto de levaduras sobre la esporulación de *M. roreri* (Cepa Cusco).



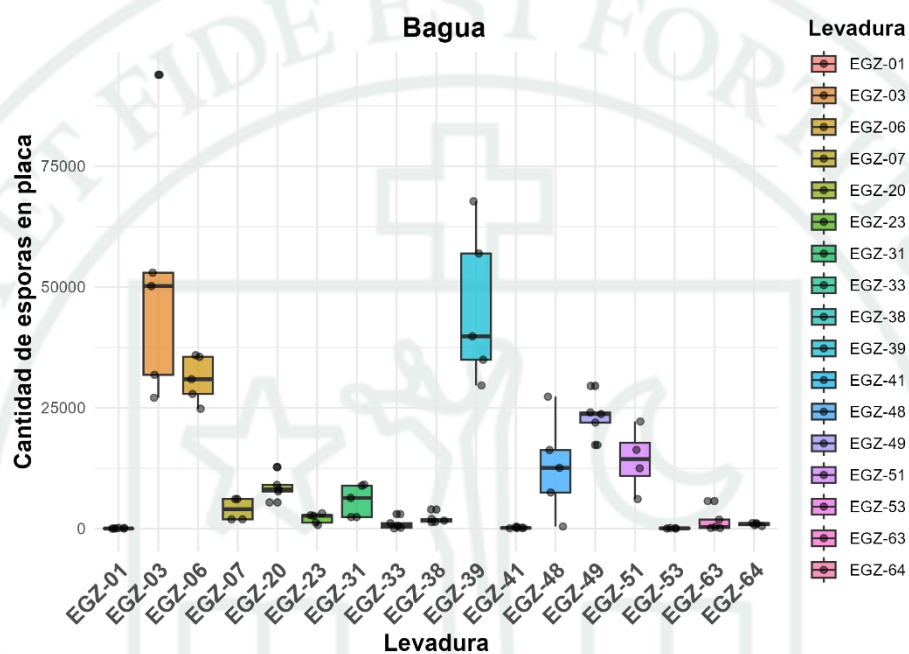
Nota: Elaboración propia.

Para el departamento de Cusco las levaduras que ejercieron una mejor inhibición de esporas en el patógeno fueron EGZ-53, EGZ-33 y EGZ-41.

Por último para el departamento de Amazonas los mejores resultados se obtuvieron con EGZ-01, EGZ-53 y EGZ-41.

Figura 37

Efecto de levaduras sobre la esporulación de *M. royeri* (Cepa Bagua).



Nota: Elaboración propia.

Tabla 14

Resultado del conteo de esporas sobre *Moniliophthora roreri* (Iquitos, Cusco y Bagua)

LEVADURA	Número de esporas/ placa		
	IQUITOS	CUSCO	BAGUA
EGZ-01	1919	1881	26
EGZ-41	198	233	150
EGZ-53	239	87	26
EGZ-23	0	673	2660
EGZ-33	93	103	565
EGZ-63	116	329	333
EGZ-03	5837	4129	50209
EGZ-06	3404	1441	30920
EGZ-48	7695	7752	12569
EGZ-51	10026	25227	12486
EGZ-07	35	475	1914
EGZ-64	20964	6322	957
EGZ-39	6809	31643	39793
EGZ-20	7013	19705	8121
EGZ-49	14968	779	23706
EGZ-31	10552	13140	6349
EGZ-38	781	660	1649

Nota: Elaboración propia.

El estudio evidencia que gran parte de las levaduras antagonistas reducen tanto el área de crecimiento micelial como la producción de esporas de *Moniliophthora roreri* en el ensayo de contacto indirecto (Método N°01). Es decir que la inhibición no solo afecta al desarrollo vegetativo, sino a la vez su capacidad de esporulación y dispersión del patógeno, lo que refuerza su capacidad biocontroladora.

Durante la evaluación de germinación de esporas se determino que *Meyerozyma guilliermondii* (EGZ-01, EGZ-23, EGZ-33, EGZ-41, EGZ-53) y *Kwoniella heveanensis* (EGZ-07) muestran mejores resultados

En este ensayo se refuerza la efectividad de dichas levaduras y sugiere así determinar intensamente sus efectos sobre el patógeno para un manejo integrado contra *M. roreri*.

Visualmente hay una notable dispersión de datos, no son uniformes y esto puede deberse a que en el conteo se consideró el número de esporas sin diferenciar entre esporas viables y no viables. Además, en el microscopio es difícil distinguir la

espora de un hongo a la estructura reproductiva de una levadura. También es posible que, durante el conteo, algunas esporas hayan quedado sedimentadas en el fondo del Tubo Eppendorf debido a una mala técnica del operador.

Por estas razones, el número de esporas es una forma adicional para corroborar los resultados del Método N°01 y Método N°02, pero no debe ser el único.

Se recomienda realizar tinciones para diferenciar esporas viables de las no viables, así como usar una cantidad y concentración adecuada de Tween para el desprendimiento de esporas.

2.3.5. Levaduras más destacadas y su interacción

Las especies más destacadas en ambos métodos son:

A) *Meyerozyma guilliermondii*

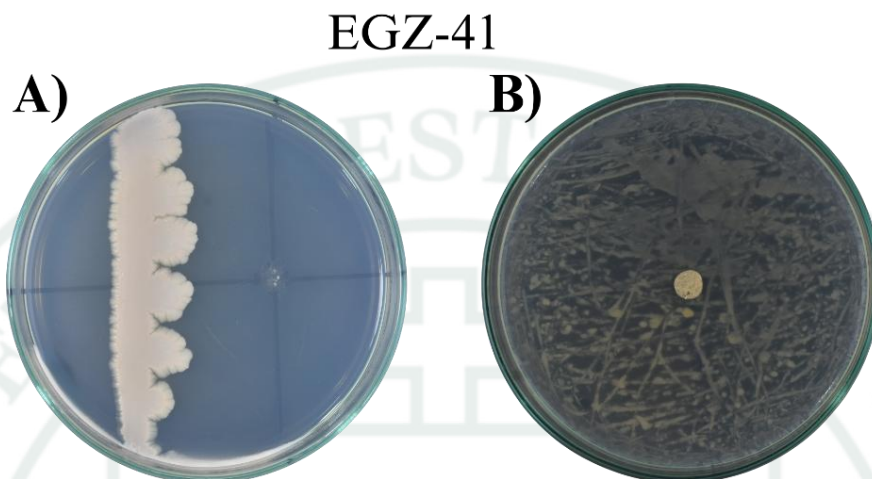
Fue la especie más destacada en ambos métodos (directo e indirecto) sobre todas las cepas del patógeno a biocontrolar. Su porcentaje de inhibición contra *Moniliophthora roreri* fue entre 88.41% - 99.87%. Los resultados en ambos métodos expresan que *M. guilliermondii* es capaz de ejercer múltiples mecanismos de acción. Dichos resultados son avalados por antecedentes que indican la levadura ejerce un gran efecto inhibitorio contra *C. gloeosporioides* y *L. theobromae* mediante la producción de compuestos volátiles (COV's) como 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, alcohol feniletílico y 2-metil-1-propanol siendo efectivo contra antracnosis y pudrición del pedúnculo de frutos de mango (101,102).

Adicionalmente, *M. guilliermondii* ejerce biocontrol contra *P. digitatum* y *C. gloeosporioides* mediante la competencia por espacio y nutrientes, al tener un crecimiento acelerado, son capaces de formar biopelículas que permiten una fácil adhesión al fruto, reduciendo eficazmente la infección y colonización del patógeno (103).

Se ha confirmado que *M. guilliermondii* además inhibe el crecimiento de *P. digitatum* y *P. funiculosus* ampliando su espectro de acción (104). Asimismo, se ha reportado que *M. guilliermondii* produce enzimas hidrolíticas como B-1,3- glucanasa y quitinasa. Además, se observó efecto de parasitismo directo, donde la levadura se adhiere y actúa sobre el patógeno, reforzando así su capacidad biocontroladora (105).

Figura 38

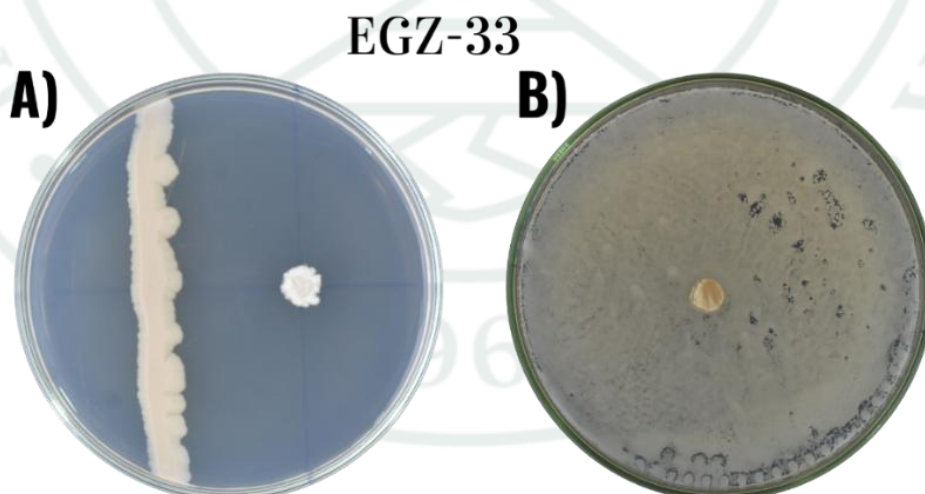
Respuesta de EGZ-41 (*Meyerozyma guilliermondii*) frente a *Moniliophthora roreri* (Cepa Iquitos) A) Metodo N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación directa)



Nota: Elaboración propia.

Figura 39

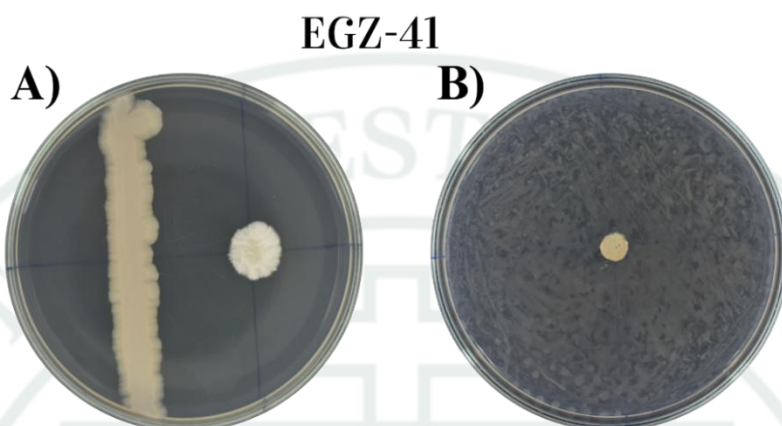
Respuesta de EGZ-33 (*Meyerozyma guilliermondii*) frente a *Moniliophthora roreri* (Cepa Bagua) A) Metodo N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).



Nota: Elaboración propia.

Figura 40

Respuesta de EGZ-41 (*Meyerozyma guilliermondii*) frente a *Moniliophthora roreri* (Cepa Cusco) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).



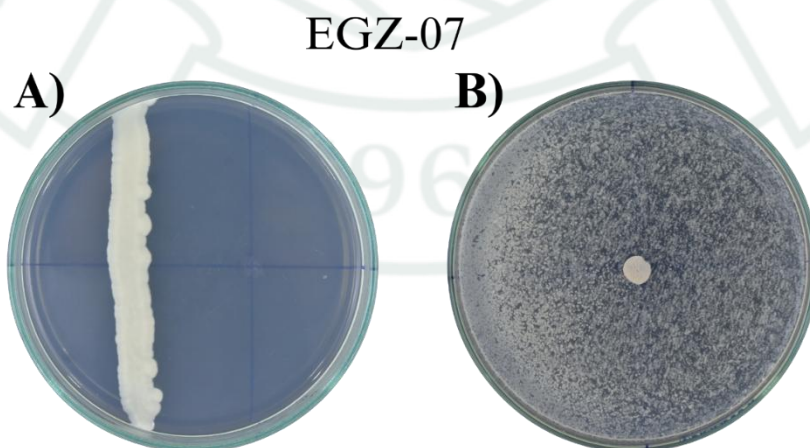
Nota: Elaboración propia.

B) *Kwoniella heveanensis*

Destacó como otra especie con gran actividad controladora presentando un porcentaje de inhibición entre 80,01% y 99,00%. Cuya capacidad es atribuido a COV's como 3-metilbutan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, 1,1-dimetilhidrazina y ácido 3-metilbutanoico, reduciendo la patogenicidad de *Aspergillus flavus* (2).

Figura 41

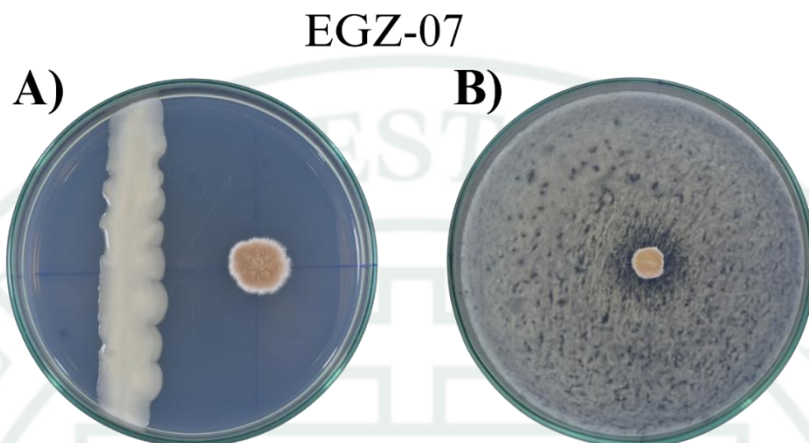
Respuesta de EGZ-07 (*Kwoniella heveanensis*) frente a *Moniliophthora roreri* (Cepa Iquitos) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).



Nota: Elaboración propia.

Figura 42

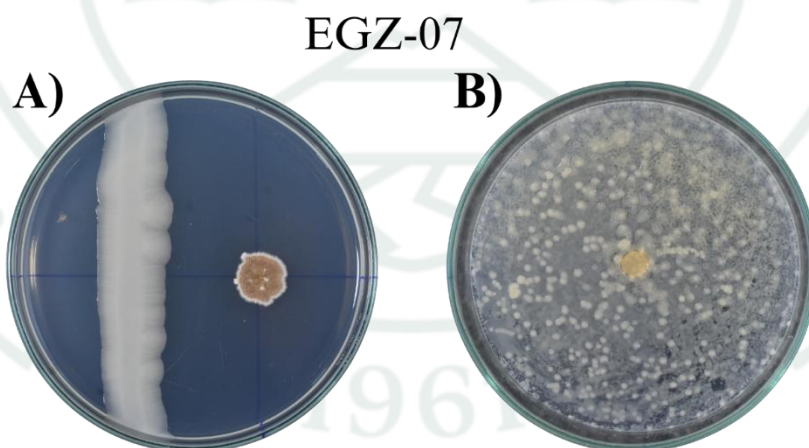
Respuesta de EGZ-07 (*Kwoniella heveanensis*) frente a *Moniliophthora roreri* (Cepa Bagua) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).



Nota: Elaboración propia.

Figura 43

Respuesta de EGZ-07 (*Kwoniella heveanensis*) frente a *Moniliophthora roreri* (Cepa Cusco) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).



Nota: Elaboración propia.

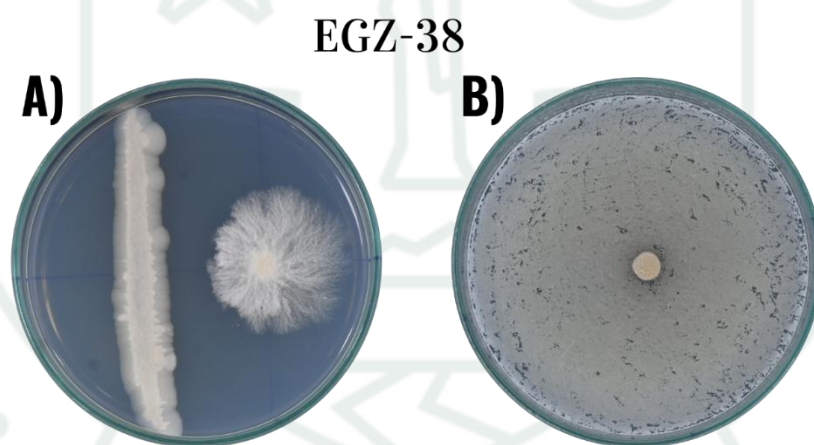
C) *Wickerhamomyces edaphicus*

Su PIC(%) estuvo entre 88,48% y 94,74%, demostrando una actividad biocontroladora consistente en ambos métodos. Dichos resultados resaltan el potencial como agente biocontrolador. Sin embargo, hasta la fecha, no existen referencias específicas que indiquen su uso en el manejo de enfermedades en plantas.

A pesar de la falta de antecedentes bibliográficos, otras especies del mismo género, como *W. anomalus* han demostrado propiedades antifúngicas como la producción de glucanasas que degradan la pared celular (107). Este mecanismo podría sugerir que comparte características similares a *W. edaphicus*, pero sería valioso evaluar pruebas adicionales para determinar y validar su eficacia.

Figura 44

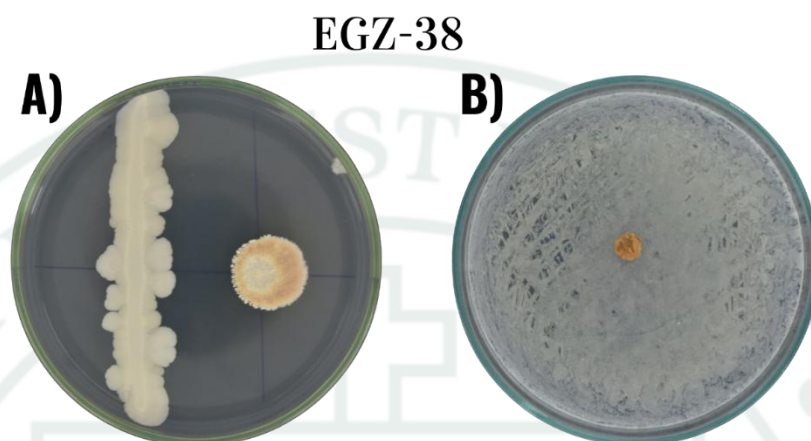
Respuesta de EGZ-38 (*Wickerhamomyces edaphicus*) frente a *Moniliophthora roreri* (Cepa Iquitos) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).



Nota: Elaboración propia.

Figura 45

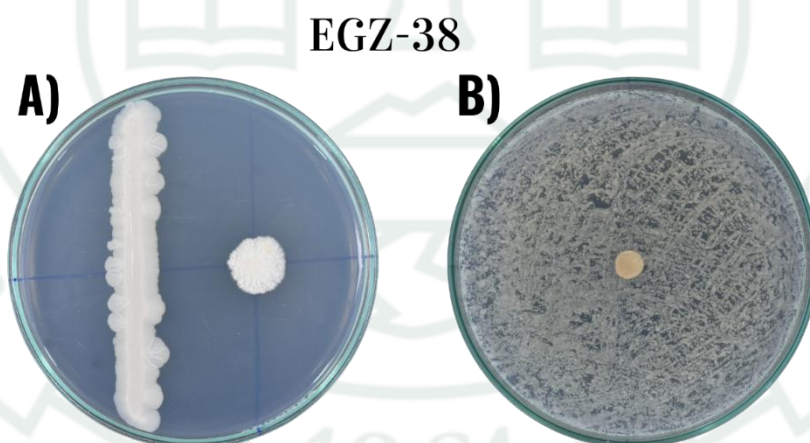
Respuesta de EGZ-38 (*Wickerhamomyces edaphicus*) frente a *Moniliophthora roreri* (Cepa Bagua) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).



Nota: Elaboración propia.

Figura 46

Respuesta de EGZ-38 (*Wickerhamomyces edaphicus*) frente a *Moniliophthora roreri* (Cepa Cusco) A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa), B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual).



Nota: Elaboración propia.

CONCLUSIONES

- PRIMERA:** El ritmo de crecimiento medido con espectrofotometría fue el siguiente: Cusco (245.23 mm²/día), Amazonas (289.60 mm²/día) y Loreto (415.40 mm²/día), y mediante un disco de 7 mm de diámetro Cusco (239.65 mm²/día), Amazonas (238.46 mm²/día) y Loreto (420.80 mm²/día).
- SEGUNDA:** Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el método N°01 (contacto indirecto) y Método N°02 (contacto directo). Es decir, sus resultados en cuanto al área de crecimiento micelial difieren de acuerdo con el método demostrado a través de la prueba de muestras independientes. Además, existe una mejor respuesta de inhibición según el Método N°02, presentando una menor área de crecimiento del patógeno.
- TERCERA:** A través de las pruebas post hoc se determinó que las cepas de *Moniliophthora roreri* de Iquitos y Bagua ($p=0.889$) comparten un comportamiento similar en los ensayos de biocontrol, mientras que Cusco ($p < 0.05$) demuestra una variabilidad notable, y esto debido a factores como condiciones ambientales específicas de origen, genética o adaptación. Lo que sugiere que tanto la cepa de Iquitos y Bagua ($p \geq 0.05$) tienen condiciones de crecimiento homogéneas.
- CUARTA:** En el Método N°01, ensayo de confrontación dual, presenta a *Meyerozyma guilliermondii* (EGZ-01, EGZ-23, EGZ-33, EGZ-41, EGZ-53), *Kwoniella heveanensis* (EGZ-64) y *Wickerhamomyces edaphicus* (EGZ-38) como levaduras con actividad biocontroladora cuya inhibición mostró valores entre 80.01% a 99.87%. En el Método N°02 (contacto directo) se observó a *Meyerozyma guilliermondii* (EGZ-01, EGZ-33, EGZ-41, EGZ-53 y EGZ-63), *Candida sp.* (EGZ-03), *Wickerhamomyces edaphicus* (EGZ-38) con una mínima superficie de crecimiento de 47.20 mm².
- QUINTA:** Se evidenció que las levaduras no solo inhibieron el crecimiento del patógeno en placa, sino también la germinación de esporas. Entre las especies evaluadas, *Meyerozyma guilliermondii* destacó por presentar el menor número de esporas, lo que indica una mayor capacidad inhibitoria sobre la germinación del patógeno.
- SEXTO:** La especie más destacada durante los ensayos experimentales fue *Meyerozyma guilliermondii*, que evidencia su amplio espectro de acción.

RECOMENDACIONES

PRIMERA: Durante la evaluación se estableció como variable de respuesta el área de crecimiento y el número de esporas, sin embargo, no se pudo hacer un estudio comparativo para la variable de número de esporas en el Método N°02 debido a que en la placa tanto la levadura como patógeno estaban en una misma área, por lo cual el conteo hubiera sido inexacto. Por ello, se recomienda buscar métodos para diferenciar las esporas de un hongo y las células de una espora.

SEGUNDA: A través de los ensayos se determinan los posibles tipos de mecanismos de acción del agente biocontrolador, sin embargo, a partir de la información dada se subraya la necesidad de continuar investigando cómo se da la interacción con el patógeno para así optimizar la aplicación en el manejo de enfermedades agrícolas.

TERCERA: Con esta información y los resultados se puede llegar a formular nuevos métodos de control biológico de la moniliasis en el cultivo de cacao. Se sugiere usar los resultados para validarlos bajo condiciones de campo.

CUARTA: Este estudio abre nuevas posibilidades para desarrollar estrategias sostenibles de biocontrol frente a patógenos de las plantas; por ende, se recomienda seguir investigando la efectividad y estabilidad de sus mecanismos en condiciones reales del cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Productores beneficiarios del MINAGRI expondrán en el Salón del Cacao y Chocolate 2018. [Online].; 2018. Available from: www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/16855-productores-beneficiarios-del-minagri-expondran-en-el-salon-del-cacao-y-chocolate-2018?utm_source=.com.
2. León, José Carlos. Producción peruana de cacao alcanzó las 157.859 toneladas en 2021. [Online].; 2022.
3. Guimac L, Verastegui L. Características y producción de cacao: caso de la zona productora de Amazonas-Perú. Global Business Administration Journal. 2022; 6(1): 3-13.
4. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual. Denominación de origen "Cacao Amazonas Perú" beneficia a más de 1200 familias de Bagua y Utcubamba. [Online].; 2022. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/indecopi/noticias/629806-denominacion-de-origen-cacao-amazonas-peru-beneficia-a-mas-de-1200-familias-de-bagua-y-utcubamba>.
5. Ministerio de Agricultura. Caracterización de las zonas productoras de cacao en el Perú y su competitividad; 2003.
6. Ministerio Agropecuario y Forestal. Diagnóstico del sector cacao de Nicaragua; 2010.
7. Hernández et al. Las moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del Cacao: búsqueda de estrategias del manejo. Agro productividad. 2012; 5(6).
8. Llanos K. Diversidad de levaduras epífitas asociadas a plantaciones de cacao nativo (*Theobroma cacao* L.) con potencial de biocontrol frente a moniliasis (*Moniliophthora roreri*), en la región Amazonas-Perú: [Tesis de Postgrado]; 2023.
9. Llanos et al. La superficie de las hojas y frutos del cacao peruano alberga varias especies de levadura *Hannaella* , incluida la nueva especie *Hannaella theobromatis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2024; 117(1): 43.
10. Villamil et al. 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*. 2015; 68(1): 7441-50 Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472015000100005&script=sci_arttext.

11. Pimenta et al. Yeasts associated with aerial parts of *Theobroma cacao* L. in southern Bahia, Brazil, as prospective biocontrol agents against *Moniliophthora perniciosa*. *Tropical Plant Pathology*. 2021; 46(1): 109-128.
12. González et al. Exploring the diversity and distribution of crop wild relatives of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Colombia. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2020; 67(8): 2071-2085.
13. Motamayor et al. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PloS one*. 2008; 3(10): e3311.
14. Díaz et al. The history of cacao and its diseases in the Americas. *Phytopathology®*. 2020; 110(10): 1604-1619.
15. Quintero ML, Díaz K. El mercado mundial del cacao. *Agroalimentaria*. 2004; 9(8): 47-59.
16. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo. Análisis Integral de la Logística en el Perú -Cinco Cadenas de Exportación - Metodología; 2019.
17. Wits World Bank. Peru: Exports of cocoa beans (HS code 180100). [Online].; 2023.
18. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo. Exportaciones de cacao registran nuevo récord al superar los US\$ 1000 millones entre enero y noviembre del 2024. [Online].; 2025.
19. Pereira et al. Genomic and Pathogenicity Mechanisms of the Main *Theobroma cacao* L. Eukaryotic Pathogens: A Systematic Review. *Microorganisms*. 2023; 11(6): 1567.
20. Alamy. Enfermedad del Cacao. [Online].; 2023. Available from: <https://www.alamy.es/imagenes/enfermedad-del-cacao.html?sortBy=relevant>.
21. De Manda S, Jeon J. Phyllosphere Microbiome in Plant Health and Disease. *Plants*. 2023; 12(19): 3481.
22. Innerebner et al. Protection of *Arabidopsis thaliana* against Leaf-Pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* Strains in a Controlled Model System. *Applied and environmental microbiology*. 2011; 77(10): 3202-3210.
23. Chaouachi et al. Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*. 2021; 172: 111389.

24. Schoch et al. Taxonomía de NCBI: una actualización completa sobre curación, recursos y herramientas.; 2020.
25. Phillips et al. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant pathology*. 2007; 56(6): 911-22.
26. Pérez L. *Moniliophthora roreri* H.C. Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. *Rev. Protección Veg.* 2018; 33(1): 00-00 Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522018000100007&lng=es&nrm=iso.
27. Cubillos et al. La moniliasis del Cacao: daños, síntomas, epidemiología y manejo; 2019.
28. Suárez Y, Hernández F. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*): Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA; 2010.
29. Arbelaez L. Análisis de la diversidad intraespecie de *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. por medio de marcadores morfológicos y genéticos: [Tesis de Magister]; 2010.
30. Reyes G. Evaluación de métodos de control cultural y químico de *Moniliophthora roreri* evans Marasmiaceae "Moniliasis" en huertos *Theobroma cacao* Sterculiaceae "Cacao" en San Antonio Suchitepéquez: [Tesis de Maestría; 2014.
31. Villavicencio M. Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la costa ecuatoriana: [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrícola y Biológica]; 2010.
32. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. Identificación y control de la moniliasis del cacao; 2003.
33. Sánchez F, Garcés F. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*. 2012; 3(3): 249-258.
34. Correa et al. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthota roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*. 2014; 63(4): 388-399.
35. Dalla M, Camargo L. Doenças do Cacaueiro (*Theobroma cacao*). 1 Manual de Fitopatologia Doenças das Plantas Cultivadas. Manual de Fitopatologia Doenças das Plantas Cultivadas. 1997;; 176-83.

36. Agrios, G. Plant Pathology: Elsevier Academic Press; 2005.
37. Del Puerto et al. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 2014; 52(3): 372-87.
38. García et al. Metabolic resistance to pesticides. Revista Bio Ciencias. 2017; 4(6): 1-16.
39. Muñoz et al. El impacto del uso inadecuado de agroquímicos y riego intensivo en la degradación del suelo: del cultivo al yermo El impacto del uso inadecuado de agroquímicos y riego intensivo en la degradación del suelo: del cultivo al yermo. Revista Alianzas y Tendencias BUAP. 2024; 9(34): 65-70.
40. Barbeta A. Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* (CPA-1); 1995.
41. Infante et al. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de protección vegetal. 2009; 24(1): 14-21.
42. Santos et al. Control biológico de plagas y enfermedades. Un encuadre crítico. Cuad. Estud. Agroaliment. 2010; 1: 61-72.
43. Apaza W. Manejo Integrado de cultivo de Palto. Curso de asociación de propietarios de terrenos de Chamovic, Trujillo; 2012.
44. Bettiol et al. Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe; 2014.
45. Ramirez J. Potencial de biocontrol de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre la moniliasis (*Moniliophthora* sp) del cacao nativo fino de aroma, de la provincia de Bagua, Amazonas-2017: [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo]; 2019.
46. Pérez et al. Biofungicidas para el control de moniliasis en el cultivo de *Theobroma cacao* l. Clon 575 en la ESPAM MFL: [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo]; 2017.
47. Rodríguez R. Efecto de la aplicación de bioreguladores para el control de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora pamivora* en cacao CCN-51 (*Theobroma cacao*). KILLKANA TÉCNICA Учредители: Revistas Killkana. 2020; 4(2): 13-20.
48. Harman et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature reviews microbiology. 2004; 2(1): 43-56.

49. Mukherjee et al. Trichoderma Research in the Genome Era. Annual review of phytopathology. 2013; 51(1): 105-129.
50. Benítez et al. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. International microbiology. 2004; 7(4): 249-260.
51. Sood et al. Identification of disease suppressive potential of Trichoderma virens and Jasmonic acid against fusarium wilt and damping-off in “Seed Primed” tomato plants: Plant Science Today; 2023.
52. Nygren et al. El hongo micoparásito Clonostachys rosea responde con expresión genética tanto común como específica durante interacciones interespecíficas con presas fúngicas. Aplicaciones evolutivas. 2018; 11(6): 931-949.
53. Sun et al. Biology and applications of Clonostachys rosea. Journal of Applied Microbiology. 2020; 129(3): 486-495.
54. Vásquez M. Acción antagónica in vitro de Clonostachys rosea F. sobre el crecimiento de Botrytis cinerea Pers. y Fusarium oxysporum F. procedente de Asparagus officinalis L. Sagasteguiana. 2013; 1(1): 19-28.
55. Giménez G, Silvera N. Caracterización y selección de aislados de Clonostachys Spp. para el control biológico del moho gris en tomate: [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo]; 2023.
56. Hasan et al. Monitoring Mycoparasitism of Clonostachys rosea against Botrytis cinerea Using GFP. Journal of Fungi. 2022; 8(6): 567.
57. Ongouya et al. Análisis de la resistencia inducida por Clonostachys rosea a la enfermedad del moho gris del tomate en hojas de tomate. PLoS One. 2014; 9(7): e102690.
58. Rivera S. Capacidad antagónica a 4° cy mecanismos de acción de levaduras nativas contra penicillium expansum link en manzana en poscosecha: [Tesis para optar el Grado Académico de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos]; 2009.
59. Bar et al. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent Candida oleophila. Current Genetics. 2004; 45(3): 140-148.

60. Mendoza MG. Evaluación de aislados microbianos para el control biológico de la podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea* en fruto de uva: [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroquímico]; 2022.
61. Pando et al. Cepas autóctonas de *Metschnikowia pulcherrima* como posibles Agentes de Control Biológico. Tecnología agroalimentaria: Boletín informativo del SERIDA. 2022; 26: 53-58.
62. Martínez R. *Debaryomyces hansenii* como agente de control biológico y modulador del contenido de compuestos bioactivos en microgreens como plataforma alimentaria: [Tesis para optar el Grado Académico de Maestro en Ciencias]; 2016.
63. Amprayn et al. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*. 2012; 61: 295-299.
64. Larrea Vega O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario; 2001.
65. Jamalizadeh et al. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *Eppo Bulletin*. 2011; 41(1): 65-71.
66. Xiaokang et al. Antagonistic yeasts: A promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. *Journal of fungi*. 2020; 6(3): 158.
67. El Ghaouth A. Biologically-based technologies for the control of postharvest diseases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1997; 19(3): 160-162.
68. Perez et al. Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *PloS one*. 2016; 11(10).
69. Tsegaye et al. Concept, Principle and Application of Biological Control and Their Role in Sustainable Plant Disease Management Strategies. *International Journal of Research Studies in Biosciences*. 2018; 6: 18-34.
70. Kloepper et al. Resistencia sistémica inducida y promoción del crecimiento de las plantas por *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 2004; 94(11): 1259-1266.
71. Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*. 2008; 16(3): 115-125.
72. Cawoy et al. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases: In Pesticides in the Modern World–Pesticides Use and Management.; 2011.

73. Kumar et al. Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture: Volume 2: Applications in Crop Production and Protection*. 2017;: 195-215.
74. Sánchez R, Guerra P. *Pseudomonas* spp. benéficas en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 2022; 13(4): 715-725.
75. Mercado J, Bakker P. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007; 92(4): 367-389.
76. Papon et al. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Current genetics*. 2013; 59(3): 73-90.
77. Rosales et al. Crecimiento dimórfico y caracterización molecular de *Candida Guilliermondii* aislado de *Panicum maximum*. *Revista Tecnología en Marcha*. 2018; 31(1): 120-130.
78. Yan et al. Control of postharvest blue mold decay in pears by *Meyerozyma guilliermondii* and its effects on the protein expression profile of pears. *Postharvest Biology and Technology*. 2018; 136: 124-131.
79. Liu et al. Effect of hot air treatment in combination with *Pichia guilliermondii* on postharvest anthracnose rot of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2010; 58(1): 65-71.
80. El-Ghaouth et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*. 1998; 88(4): 282-291.
81. Medina et al. Respuesta fisiológica y capacidad antagonista de aislamientos filamentosos de levaduras obtenidos en cultivos de mora (*Rubus glaucus*). *Acta Biológica Colombiana*. 2009; 14(3): 181-198.
82. Li et al. Characterization of the Complete Mitochondrial Genome of Basidiomycete Yeast *Hannaella oryzae*: Intron Evolution, Gene Rearrangement, and Its Phylogeny. *Frontiers in Microbiology*. 2021; 12: 646567.

83. Ruling et al. Study on the biocontrol effect and physiological mechanism of *Hannaella sinensis* on the blue mold decay of apples. *International Journal of Food Microbiology*. 2022; 382: 109931.
84. Ji Y. Patulin Removal Mechanism of *Rhodosporidiobolus ruineniae* PJM3 isolated from peaches: Graduate School of Hanyang University; 2023.
85. Nur et al. Biocontrol potential of antagonistic yeasts on in vitro and in vivo *Aspergillus* growth and its AFB1 production. *Toxins*. 2023; 15(6): 402.
86. Smaniotto et al. Synthetic lipase'production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012; 43: 1490-1498.
87. Medina et al. The potential use of *Debaromyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biological Control*. 2018; 121(216-222).
88. Raynaldo et al. Investigación de la potencialidad de biocontrol de *Wickerhamomyces anomalus* contra la pudrición del moho gris poscosecha en tomates cherry. *Scientia Horticulturae*. 2021; 285: 110137.
89. Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado. Parque Nacional Ichigkat Muja - Cordillera del Condor. [Online].; 2019. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/sernanp/informes-publicaciones/1949358-parque-nacional-ichigkat-muja-cordillera-del-condor>.
90. Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado. Diagnóstico del proceso de elaboración del Plan Maestro del Parque Nacional Ichigkat Muja – Cordillera del Cóndor 2011 – 2016. [Online].; 2011.
91. Gaslac E. Diversidad de levaduras epífitas asociadas a los géneros *Theobroma* Y *Herrania* del parque nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor: [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Forestal]; 2023.
92. Tejera et al. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L). *Revista de Protección Vegetal*. 2012; 27(2): 117-122.
93. Skidmore A, Dickinson C. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 1976; 6(1): 57-64.

94. Golan J, Pringle A. Long-Distance Dispersal of Fungi. *Microbiology spectrum*. 2017; 5(4): 10.
95. Quispe Z. Análisis de la diversidad genética de monilia (*Moniliophthora roreri* [Cif y Par] Evans et al.) mediante marcadores microsatélites en cuatro regiones del Perú: [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo]; 2018.
96. Macena et al. Antagonism of *Trichoderma*-based biofungicides against Brazilian and North American isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion of soybean. *BioControl*. 2019; 65(2): 235-246.
97. De Clerk C, Borrero F. Los volátiles microbianos y su potencial en el control biológico de fitopatógenos e insectos: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA); 2018.
98. Contarino et al. Compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por levaduras de biocontrol. *Food microbiology*. 2019; 82: 70-74.
99. Hernández et al. Potencial antagónico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 2018; 9(no SPE20): 4311-4321.
100. Agirman BEH. Biocontrol ability and action mechanisms of *Aureobasidium pullulans* GE17 and *Meyerozyma guilliermondii* KL3 against *Penicillium digitatum* DSM2750 and *Penicillium expansum* DSM62841 causing postharvest diseases. *Yeast*. 2020; 37(9-10): 437-448.
101. Kaewkrajay C, Dethoup T. Capacidad de biocontrol de levaduras marinas contra enfermedades poscosecha en mangos causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae*. *European Journal of Plant Pathology*. 2023; 168(503): 709-721.
102. Rivas T. Mecanismos de acción de microorganismos marinos y el inductor de resistencia ulvan para el control de *Fusarium proliferatum* en frutos de *Cucumis melo* L. var: [Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias]; 2018.
103. Spadaro D, Droby S. Desarrollo de productos de biocontrol para enfermedades poscosecha de la fruta: La importancia de dilucidar los mecanismos de acción de los antagonistas de levadura. *Trends in Food Science & Technology*. 2016; 47: 39-49.

104. Cruz et al. Capacidad antagonista in vitro de la levadura *Meyerozyma guilliermondii* LCBG contra hongos *Penicillium* spp. patógenos del limón: Instituto Politecnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica; 2024.
105. Chanchaichaovivat et al. Supuestos modos de acción de la cepa R13 de *Pichia guilliermondii* en el control de la antracnosis del chile después de la cosecha: Control Biológico; 2008.
106. Jaibangyang S, Nasanit R, Limtong S. Control biológico de *Aspergillus flavus* productor de aflatoxinas mediante levaduras antagonistas productoras de compuestos orgánicos volátiles.: BioControl; 2020.
107. Parafati et al. Potential role of exoglucanase genes (WaEXG1 and WaEXG2) in the biocontrol activity of *Wickerhamomyces anomalus*. Microbial ecology. 2017; 73(4): 876-884.
108. Delgado C. Primer registro de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Evans et al.) del *Theobroma cacao* en la región de la triple frontera, Loreto, Perú. Ciencia Amazónica (Iquitos). 2021; 9(2).
109. Mannazzu et al. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015; 31(11): 1665-1673.
110. López et al. Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora Roreri* (Cif. y Par.) en Tapachula, Chiapas, Mexico. Acta Agrícola y Pecuaria. 2014.
111. Sudbery P. Growth of *Candida albicans* hyphae. Nature Reviews Microbiology. 2011; 9(10): 737-48.
112. Di Francesco et al. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? Journal of Plant Pathology. 2016; 145: 711-717.
113. Villareal et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Revista mexicana de fitopatología. 2018; 36(1): 95-130.



Anexo 1

Crecimiento radial in vitro de hongos fitopatógenos en el crecimiento dual en Método N°01.

LEVADURA	CEPA	MEDIANA	DESVIACIÓN ESTANDAR	ERROR ESTANDAR	INTERVALO BAJO DE CONFIANZA	INTERVALO ALTO DE CONFIANZA	MÍNIMO	MÁXIMO
EGZ-01	Bagua	5.498	5.48008732	2.45076955	2.5602	15.3783	2.356	16.415
EGZ-01	Cusco	400.617	101.840671	45.5445327	250.8904	501.656	243.927	512.056
EGZ-01	Iquitos	639.852	234.990937	105.091142	138.5567	639.852	110.364	639.852
EGZ-03	Bagua	1871.661	564.816845	252.593772	1775.0617	3026.2535	1765.667	3131.027
EGZ-03	Cusco	856.749	801.870767	358.607509	533.5113	2397.0096	501.013	2546.529
EGZ-03	Iquitos	972.884	524.856049	234.722761	417.21	1488.274	417.21	1493.894
EGZ-06	Bagua	2143.164	582.859096	260.662512	1755.2012	3184.618	1717.791	3262.771
EGZ-06	Cusco	551.351	370.882711	165.863791	240.332	1028.0097	240.332	1041.44
EGZ-06	Iquitos	2363.393	1158.44137	518.070731	684.9234	3087.0569	666.457	3100.905
EGZ-07	Bagua	127.613	63.0940104	28.2164992	46.7525	191.393	37.768	191.393
EGZ-07	Cusco	237.593	168.384218	75.3037116	136.5937	537.7941	128.474	568.647
EGZ-07	Iquitos	677.253	611.412191	273.431844	35.6596	1429.9814	35.63	1498.196
EGZ-20	Bagua	1808.776	183.086344	81.8787021	1642.6639	2103.0654	1624.207	2122.936
EGZ-20	Cusco	1948.529	431.643408	193.036801	1215.5929	2225.1041	1168.203	2234.931

EGZ-20	Iquitos	3164.128	244.691982	109.429581	2915.4498	3491.9402	2903.505	3506.718
EGZ-23	Bagua	380.134	189.701035	84.8368819	44.2962	397.412	43.982	397.412
EGZ-23	Cusco	192.423	67.8646656	30.3500011	96.0544	249.6785	94.248	253.684
EGZ-23	Iquitos	33.902	3.87852842	1.73453064	27.3219	34.875	27.274	34.875
EGZ-31	Bagua	1269.992	157.07209	70.2447741	1193.808	1513.7801	1193.808	1517.393
EGZ-31	Cusco	708.257	207.514078	92.803117	512.0273	949.63	505.411	949.63
EGZ-31	Iquitos	2883.416	388.198758	173.607763	2518.0985	3455.7081	2504.776	3505.889
EGZ-33	Bagua	188.496	59.3162509	26.5270339	65.7378	188.496	53.407	188.496
EGZ-33	Cusco	103.673	24.3952205	10.9098743	71.3929	122.522	70.686	122.522
EGZ-33	Iquitos	91.953	115.719725	51.7514343	71.6014	316.1961	71.143	340.929
EGZ-38	Bagua	274.89	33.9615966	15.1880877	238.9187	325.2341	235.62	329.868
EGZ-38	Cusco	193.778	40.6878024	18.1961384	129.8699	230.0381	125.94	232.893
EGZ-38	Iquitos	635.649	483.109055	216.052938	312.3172	1420.709	311.612	1491.726
EGZ-39	Bagua	2912.244	285.700443	127.769122	2391.4688	3067.8988	2340.774	3079.491
EGZ-39	Cusco	1665.443	908.548151	406.315085	1377.1388	3200.164	1345.105	3200.164
EGZ-39	Iquitos	3404.765	715.887293	320.154531	2164.7841	3862.2986	2048.48	3883.173
EGZ-41	Bagua	77.755	29.7571979	13.3078235	21.913	92.5987	18.85	94.248
EGZ-41	Cusco	87.194	198.281161	88.6740311	77.674	442.788	77.674	442.788
EGZ-41	Iquitos	39.687	19.4644667	8.70477412	35.214	75.0944	34.717	75.556

EGZ-48	Bagua	2033.22 2	1129.4238	505.09367 7	285.7229	3076.425 4	109.75	3142.472
EGZ-48	Cusco	1365.67 9	434.25753 4	194.20587 3	1298.919 5	2182.707 5	1292.06 9	2197.133
EGZ-48	Iquitos	1099.29	766.16796 4	342.64073	728.5324	2474.560 2	714.33	2547.379
EGZ-49	Bagua	2473.22 5	285.80164 5	127.81438 1	2406.858 3	2962.293	2403.32 4	2963.314
EGZ-49	Cusco	779.117	70.887199 3	31.701719 3	706.1535	848.232	706.075	848.232
EGZ-49	Iquitos	2389.93 6	905.02695 8	404.74036	799.1225	2974.999 7	650.318	3014.112
EGZ-51	Bagua	3056.39 6	1123.6479	502.51061 9	752.2974	3162.410 7	534.115	3166.942
EGZ-51	Cusco	1847.26 1	1263.4953 9	565.05231 7	490.0892	3153.381	452.39	3153.381
EGZ-51	Iquitos	769.621	311.10276 5	139.12938 6	130.1164	830.4768	91.526	837.115
EGZ-53	Bagua	25.368	13.873152 7	6.2042625 1	10.8622	42.4508	10.603	43.354
EGZ-53	Cusco	56.549	12.187551 2	5.4504385 7	34.0865	62.9102	32.987	63.617
EGZ-53	Iquitos	79.744	34.807209 7	15.566257 4	52.7498	123.189	52.42	123.189
EGZ-63	Bagua	111.034	304.00312	135.95432 8	57.4142	633.3356	56.946	634.121
EGZ-63	Cusco	329.868	227.27373 9	101.63990 6	86.2369	633.7393	70.686	647.955
EGZ-63	Iquitos	58.359	81.072656 7	36.256794 3	48.6201	227.2697	47.538	241.663
EGZ-64	Bagua	43.543	12.734050 2	5.6948403 9	23.528	52.0567	22.551	52.151
EGZ-64	Cusco	175.93	189.03605	84.539491 6	73.1207	451.605	70.686	451.605
EGZ-64	Iquitos	1103.38 4	481.24966	215.22139 1	239.7556	1164.904	234.344	1167.171

Anexo 2

Crecimiento radial in vitro de hongos fitopatógenos en el crecimiento dual en Método N°02.

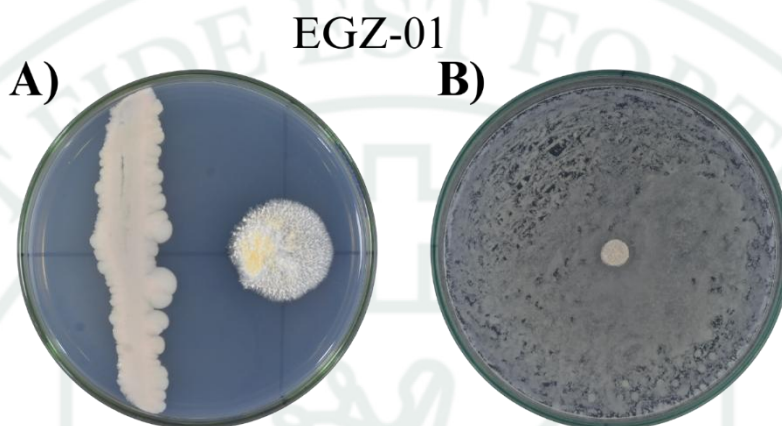
LEVADURA	CEPA	MEDIANA	DESVIACIÓN ESTANDAR	ERROR ESTANDAR	INTERVALO BAJO DE CONFIDENCIA	INTERVALO ALTO DE CONFIANZA	MÍNIMO	MÁXIMO
EGZ-01	Bagua	76.51	10.0764453	4.50632334	73.197	94.999	73.15	95.74
EGZ-01	Cusco	50.454	6.34130796	2.83591914	41.085	55.1297	40.715	55.195
EGZ-01	Iquitos	47.201	3.942404	1.76309667	43.2518	52.8041	42.918	53.038
EGZ-03	Bagua	84.19	8.45369919	3.78060921	77.513	96.702	77.1	97.02
EGZ-03	Cusco	51.204	5.54325951	2.47902102	50.246	62.5556	50.202	63.328
EGZ-03	Iquitos	86.944	43.9614597	19.6601625	81.7472	177.3027	81.624	182.387
EGZ-06	Bagua	250.7	84.3331575	37.7149346	122.093	329.105	112.98	333.88
EGZ-06	Cusco	139.398	12.9020242	5.76996062	127.5686	159.7523	126.335	160.969
EGZ-06	Iquitos	113.877	7.22084159	3.22925853	107.6597	125.1061	107.348	126.351
EGZ-07	Bagua	90.96	7.92747753	3.54527573	77.328	94.695	76.78	94.75
EGZ-07	Cusco	61.23	4.85453273	2.17101304	52.954	64.3161	52.414	64.428
EGZ-07	Iquitos	90.755	11.3721331	5.08577251	73.9451	101.242	73.166	101.963
EGZ-20	Bagua	479.61	89.3337807	39.9512813	319.566	486.407	319.21	486.46
EGZ-20	Cusco	395.379	239.410146	107.067472	161.7596	730.8182	154.333	754.102
EGZ-20	Iquitos	644.663	299.514216	133.946829	365.2671	977.1209	363.435	978.678
EGZ-23	Bagua	78.15	28.4204974	12.7100328	55.087	120.317	54.07	121.93
EGZ-23	Cusco	71.063	19.1957306	8.58459171	58.9423	105.4527	57.815	108.746
EGZ-23	Iquitos	65.187	6.08694295	2.72216364	65.187	78.1826	65.187	79.244
EGZ-31	Bagua	167.72	162.38966	72.6228638	123.405	440.72	122.82	442.31
EGZ-31	Cusco	157.031	112.898493	50.489741	121.4434	371.2333	120.08	393.721
EGZ-31	Iquitos	81.693	217.980629	97.4839008	78.4305	536.1617	78.068	579.801
EGZ-33	Bagua	130.04	33.0843525	14.7957722	62.325	135.314	56.75	135.52
EGZ-33	Cusco	70.882	14.3080767	6.3987664	67.0887	98.429	67.052	101.175
EGZ-33	Iquitos	67.024	12.0341516	5.38183619	63.61	89.9591	63.61	92.251
EGZ-38	Bagua	69.84	7.76394037	3.47213969	55.387	73.877	54.01	74.27
EGZ-38	Cusco	68.588	5.75859881	2.57532368	63.1891	76.7839	62.599	76.976
EGZ-38	Iquitos	77.66	9.03541077	4.04075854	69.6539	91.7508	69.18	92.76
EGZ-39	Bagua	132.24	21.6251728	9.6710713	112.649	160.82	110.64	160.82
EGZ-39	Cusco	86.177	9.23082598	4.12815088	75.7243	97.3235	75.35	97.894

EGZ-39	Iquitos	62.634	27.7356638	12.4037659	52.7728	114.0135	52.057	115.835
EGZ-41	Bagua	84.37	9.00367314	4.02656504	74.963	96.347	74.77	97.56
EGZ-41	Cusco	51.465	4.53993851	2.03032223	48.2442	59.3183	47.938	60.124
EGZ-41	Iquitos	52.04	2.04511386	0.91460272	50.2083	54.8452	50.076	54.891
EGZ-48	Bagua	115.15	33.1625967	14.8307641	75.738	153.549	72.01	154.15
EGZ-48	Cusco	126.544	221.73447	99.1626698	124.0271	579.982	123.896	627.358
EGZ-48	Iquitos	141.812	35.0535038	15.6764035	105.6171	190.8749	104.199	196.17
EGZ-49	Bagua	196.1	60.7431525	27.1651636	121.873	263.48	116.12	264.61
EGZ-49	Cusco	92.56	52.2865804	23.3832696	88.6054	199.402	88.194	210.187
EGZ-49	Iquitos	151.025	53.8513013	24.0830341	88.8143	216.9614	85.157	219.654
EGZ-51	Bagua	372.3	230.520506	103.091905	115.209	635.814	110.71	648.86
EGZ-51	Cusco	129.361	54.2132948	24.2449225	92.053	217.6215	91.266	227.254
EGZ-51	Iquitos	216.807	110.442309	49.3913021	134.528	392.1322	130.161	400.049
EGZ-53	Bagua	72.37	15.3530844	6.86610807	55.718	89.632	55.37	90.17
EGZ-53	Cusco	49.68	3.15524635	1.41106906	45.1327	52.134	45.067	52.297
EGZ-53	Iquitos	59.887	13.1274438	5.87077133	50.5213	80.9127	50.388	82.432
EGZ-63	Bagua	65.76	7.89589957	3.53115364	63.208	80.17	63.02	80.55
EGZ-63	Cusco	66.043	5.80996297	2.59829443	60.2114	73.2077	59.95	73.345
EGZ-63	Iquitos	59.106	1.18426762	0.52962058	59.106	61.3425	59.106	61.362
EGZ-64	Bagua	80.36	13.031079	5.82767569	75.86	101.747	75.58	101.76
EGZ-64	Cusco	54.106	2.28992725	1.0240866	50.59	55.0685	50.59	55.081
EGZ-64	Iquitos	76.575	18.6867926	8.35698771	48.622	94.5965	46.143	95.541

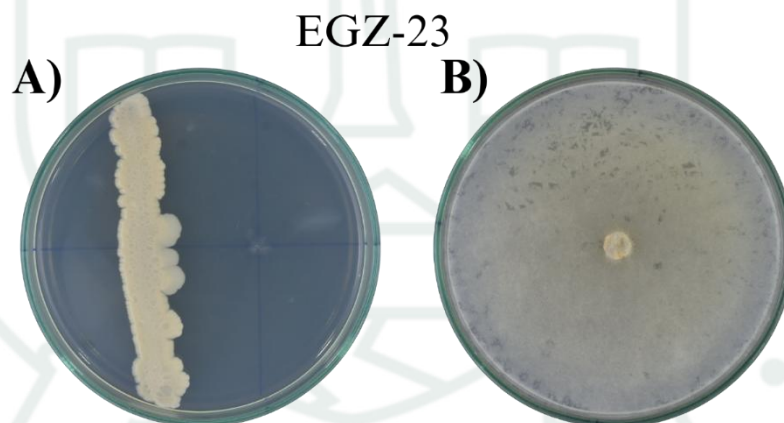
Anexo 3

Ensayo de confrontación dual y ensayo de confrontación directa in vitro en la cepa de Iquitos.

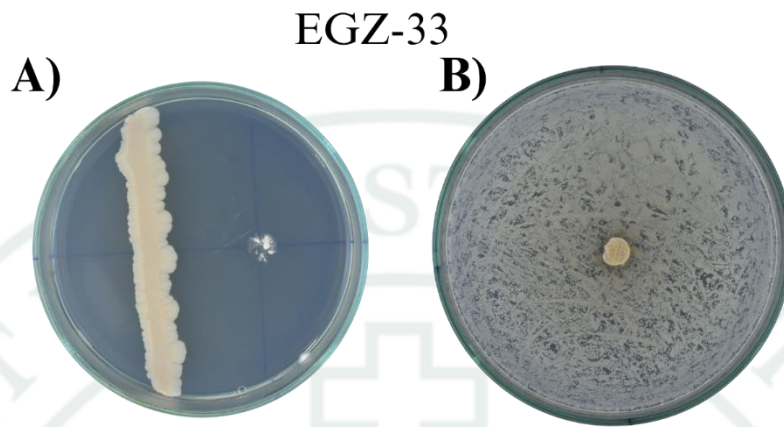
- a) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-01 (*Meyerozyma guilliermondii*).



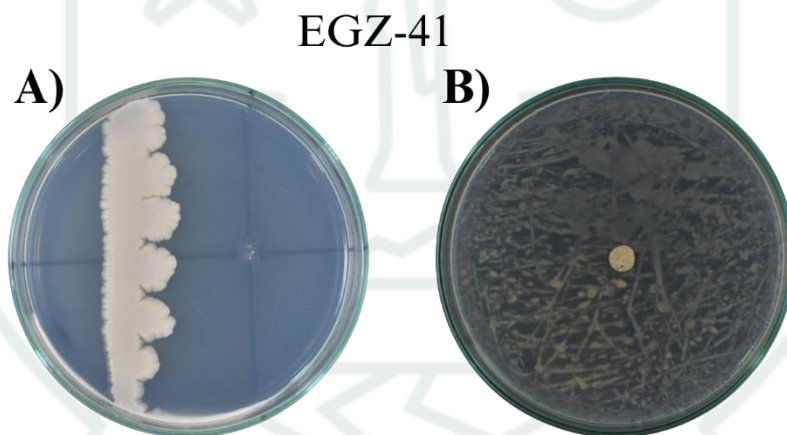
- b) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (antagonismo) de la cepa EGZ-23 (*Meyerozyma guilliermondii*).



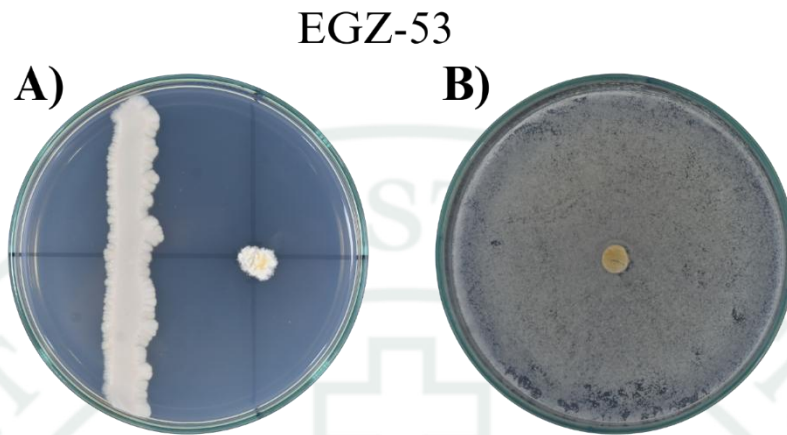
- c) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación dual) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación directa) de la cepa EGZ-33 (*Meyerozyma guilliermondii*).



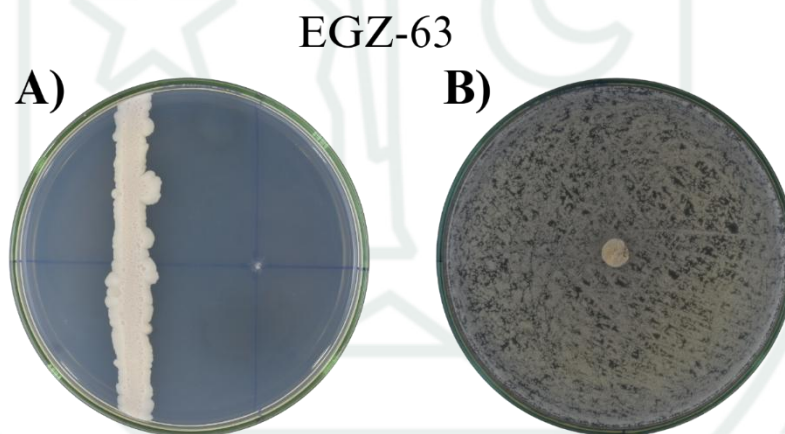
- d) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-41 (*Meyerozyma guilliermondii*).



- e) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-53 (*Meyerozyma guilliermondii*).

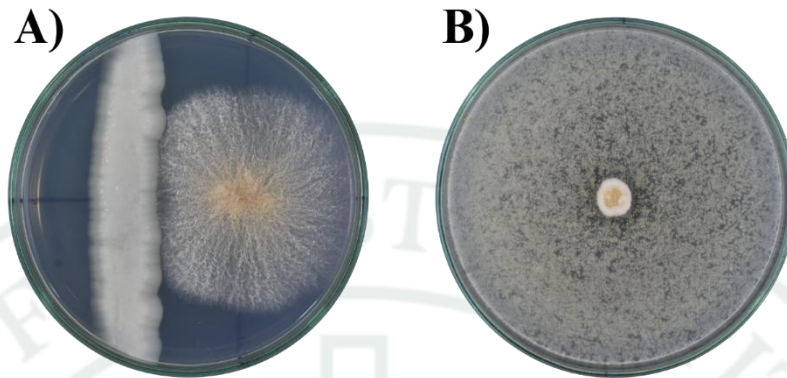


- f) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-63 (*Meyerozyma guilliermondii*).



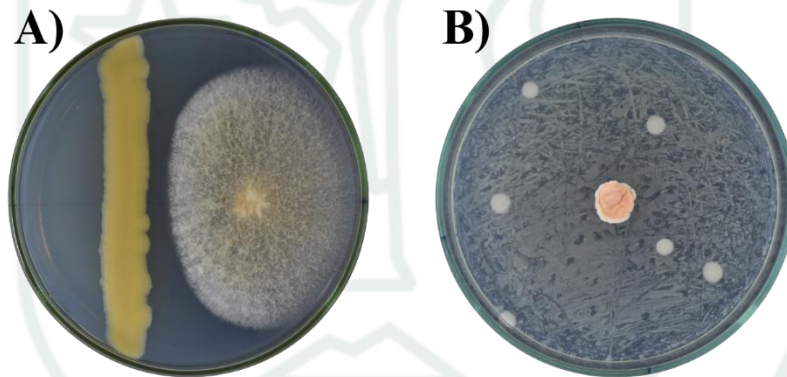
- g) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-03 (*Candida sp.*).

EGZ-03



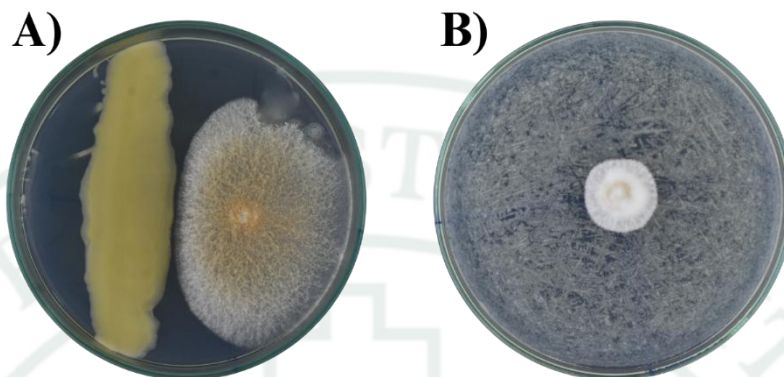
- h) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-06 (*Hannaella phetchabunensis*).

EGZ-06



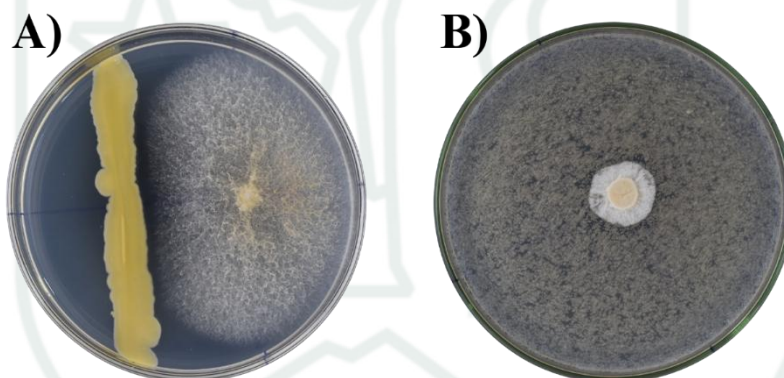
- i) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-48 (*Hannaella taiwanensis*).

EGZ-48

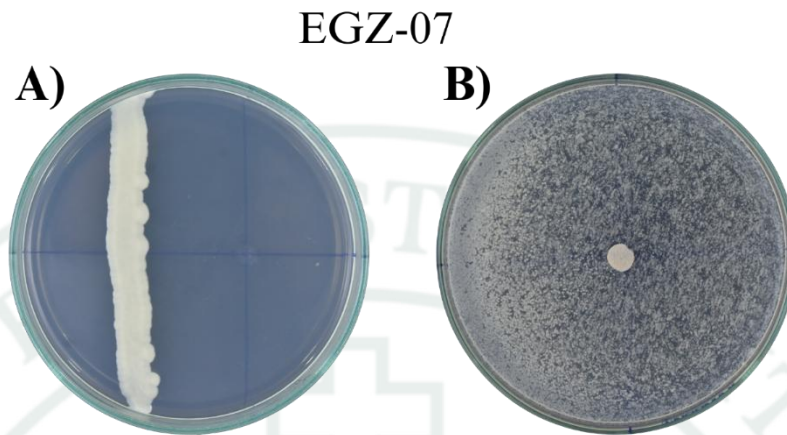


- j) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-51 (*Hannaella sp.*).

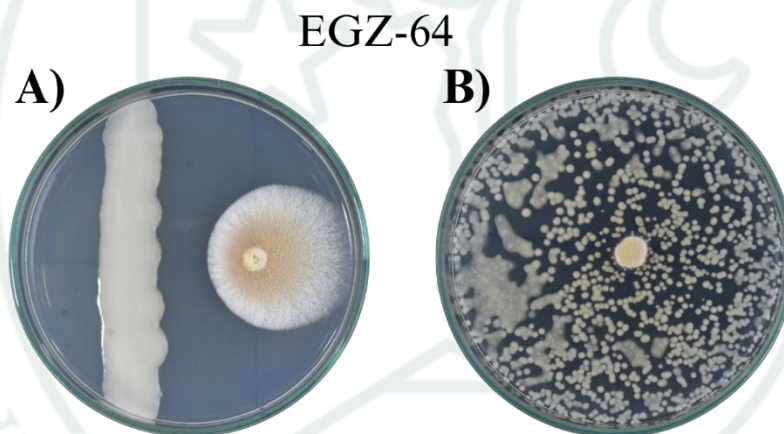
EGZ-51



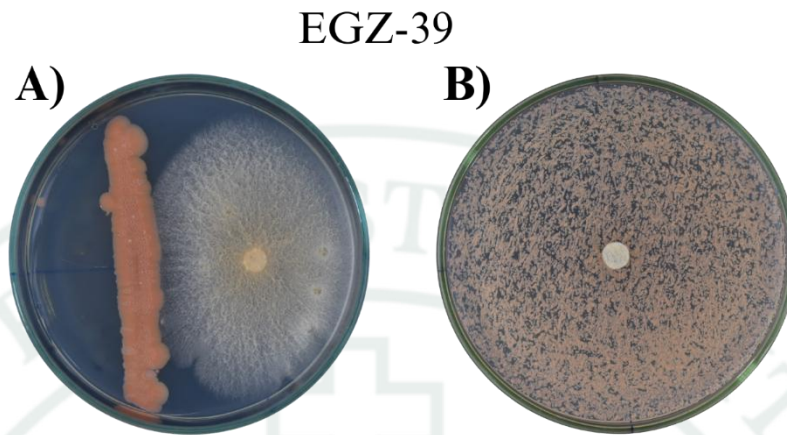
- k) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-07 (*Kwoniella heveanensis*).



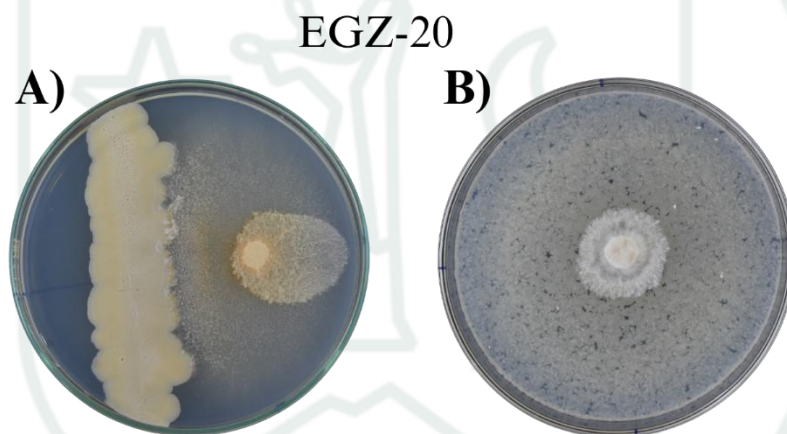
- l) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-64 (*Kwoniella heveanensis*).



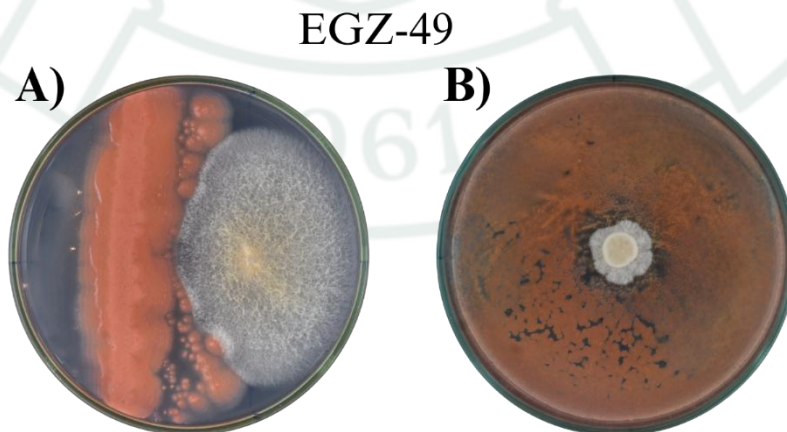
- m) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-39 (*Rhodospiridiobolus ruineae*).



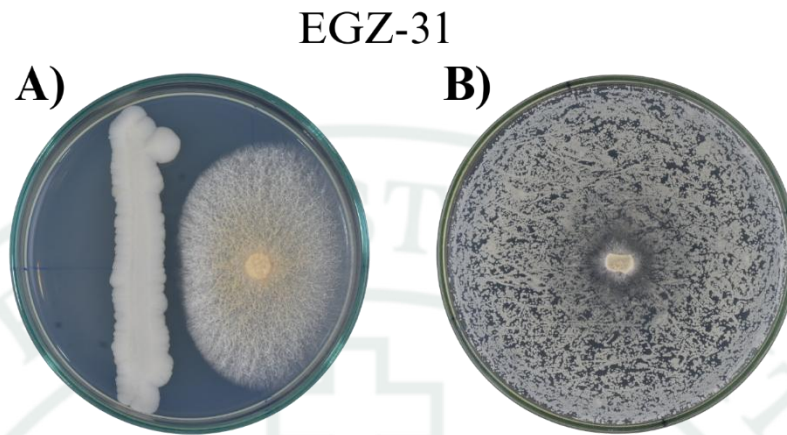
- n) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-20 (*Moiszyomyces sp.*).



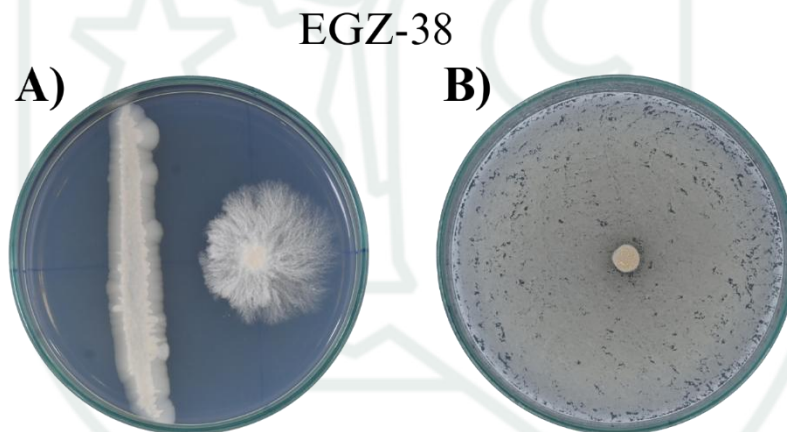
- o) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-49 (*Sporobolomyces japonicus*).



- p) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-31 (*Debaromyces hansenii*).



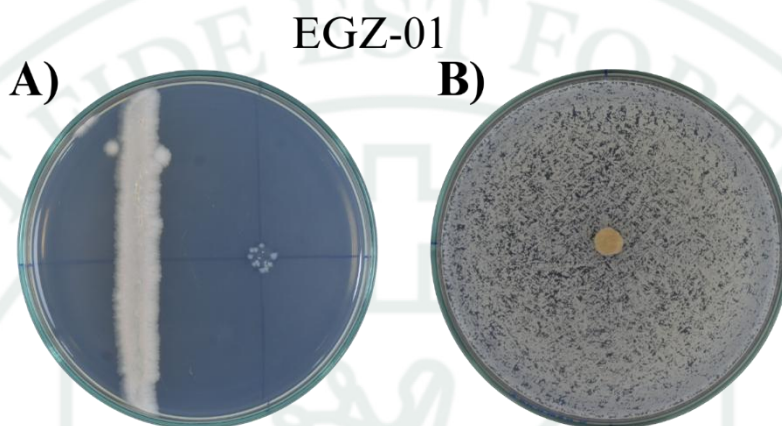
- q) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-38 (*Wickerhamomyces edaphicus*).



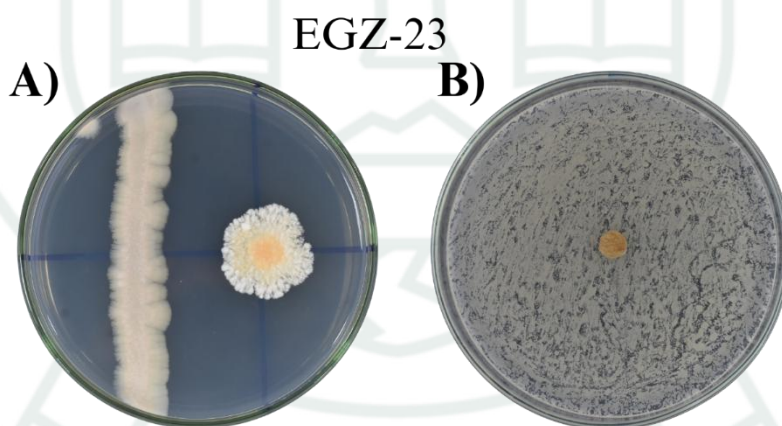
Anexo 4

Ensayo de confrontación dual y ensayo de confrontación directa in vitro en la cepa de Bagua.

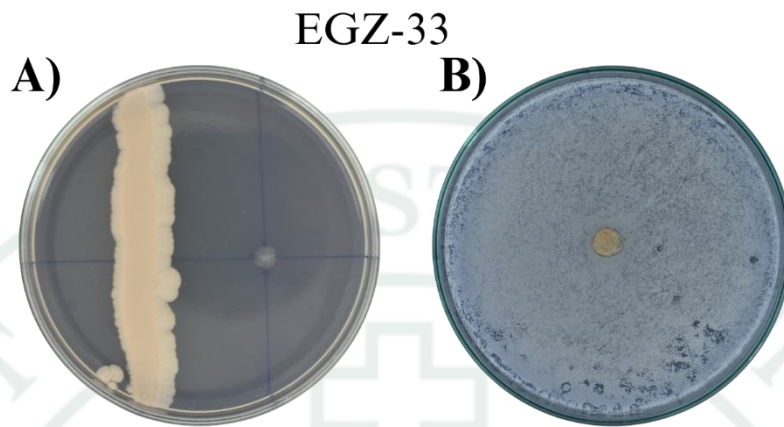
- a) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-01 (*Meyerozyma guilliermondii*).



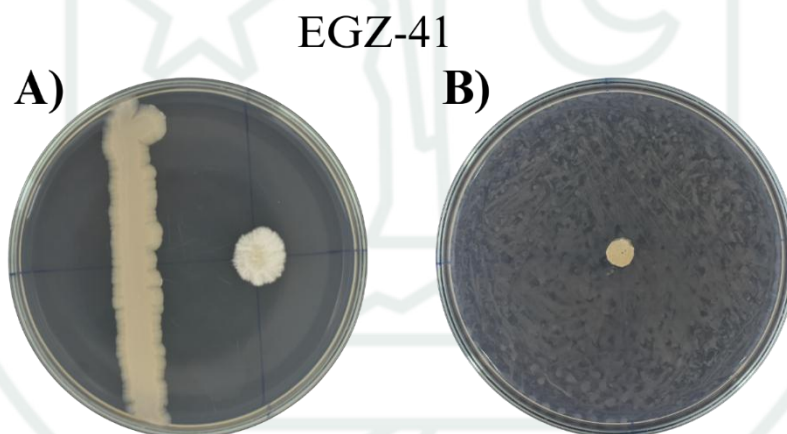
- b) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-23 (*Meyerozyma guilliermondii*).



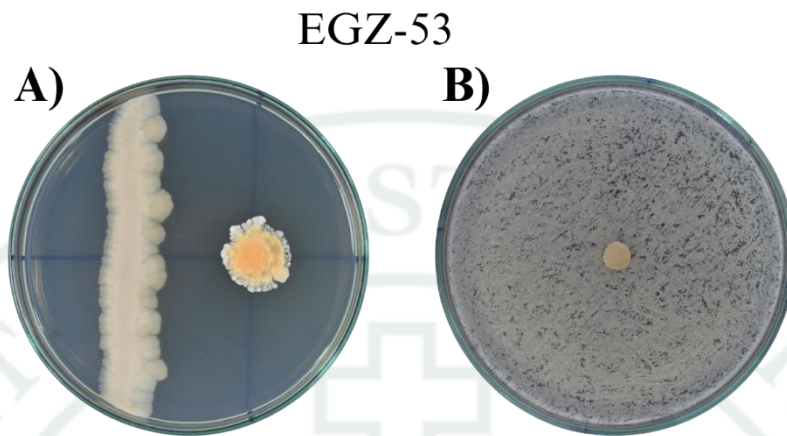
- c) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-33 (*Meyerozyma guilliermondii*).



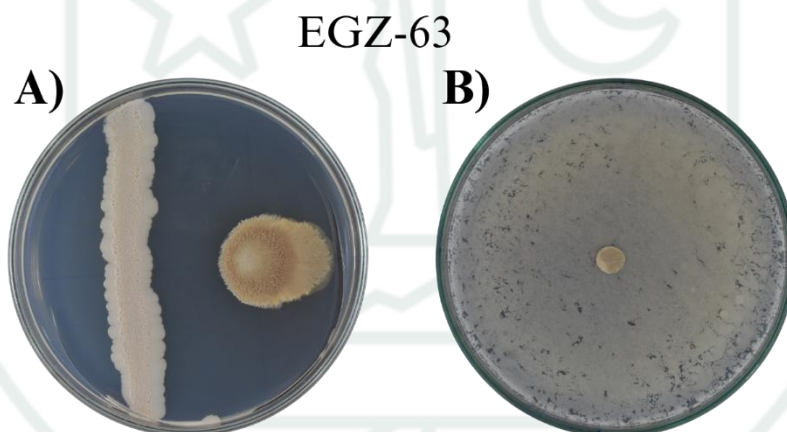
- d) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-41 (*Meyerozyma guilliermondii*).



- e) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-53 (*Meyerozyma guilliermondii*).

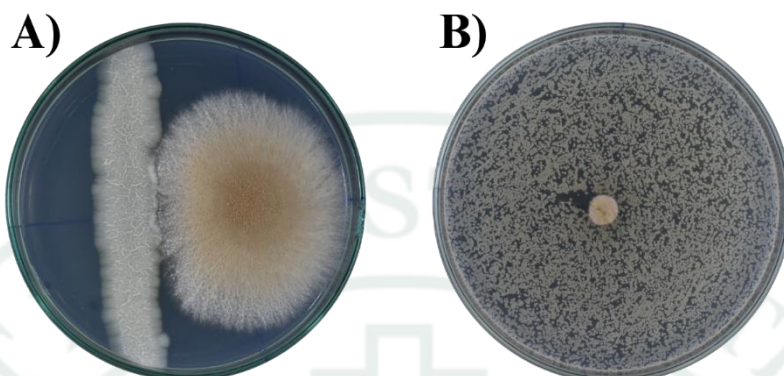


- f) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-63 (*Meyerozyma guilliermondii*).



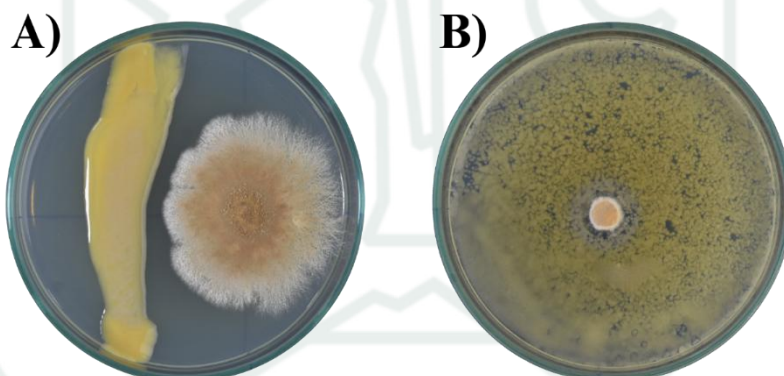
- g) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-03 (*Candida sp.*).

EGZ-03

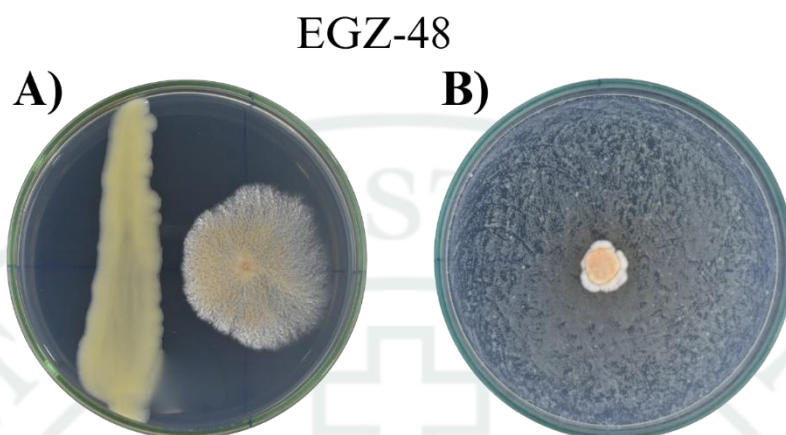


- h) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-06 (*Hannaella phetchabunensis*).

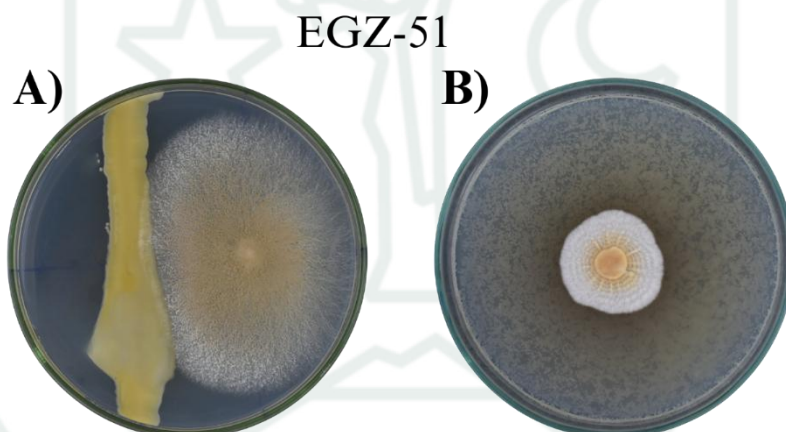
EGZ-06



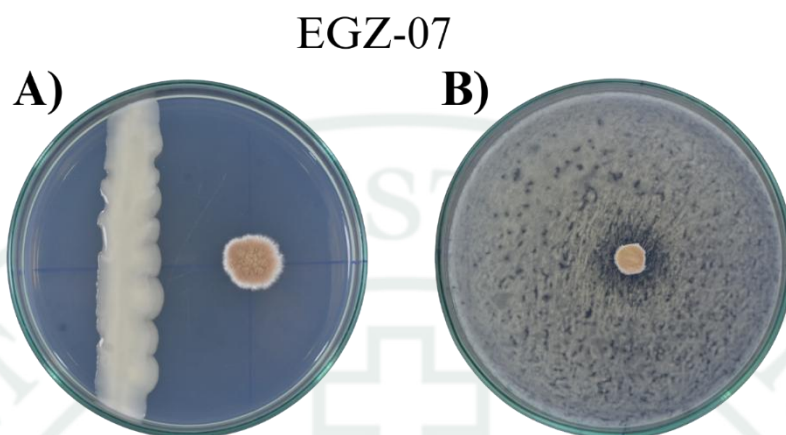
- i) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-48 (*Hannaella taiwanensis*).



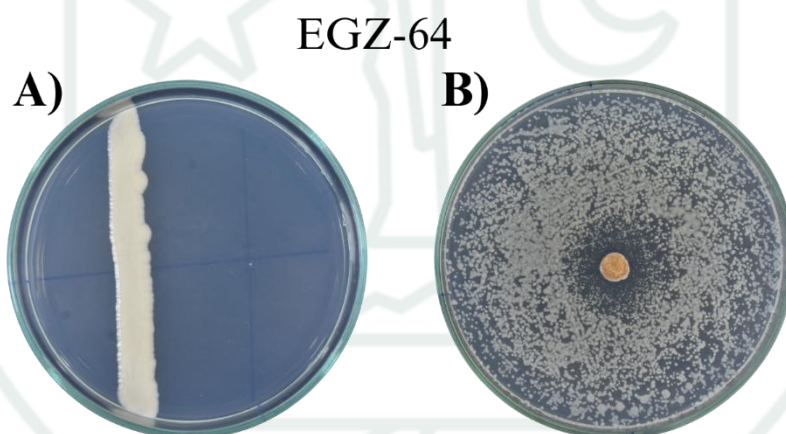
- j) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-51 (*Hannaella sp.*).



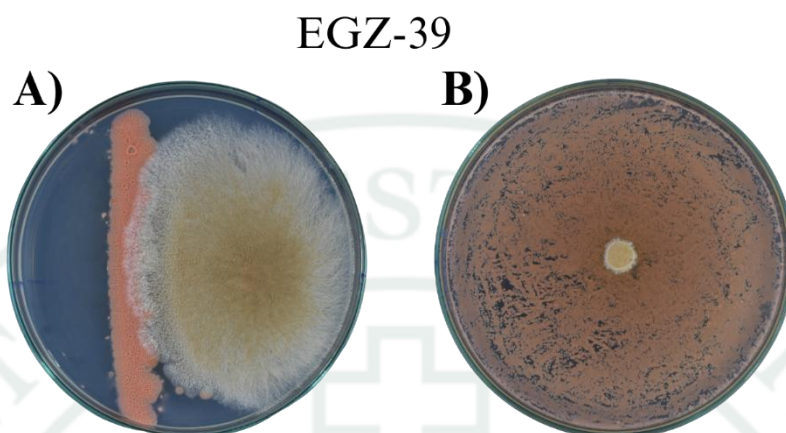
- k) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-07 (*Kwoniella heveanensis*).



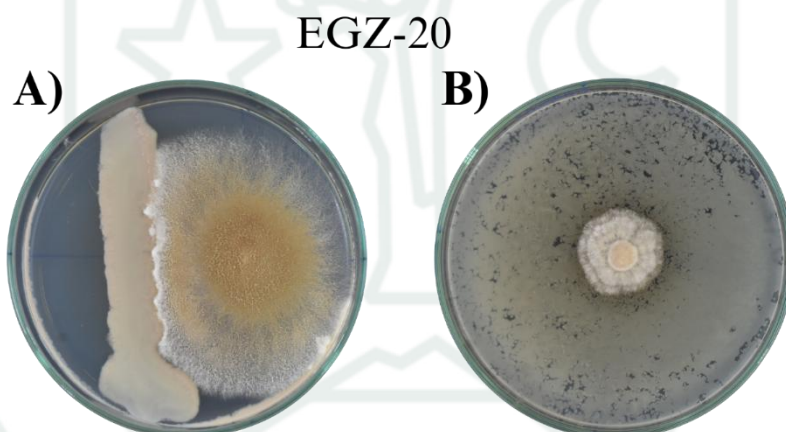
- l) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-64 (*Kwoniella heveanensis*).



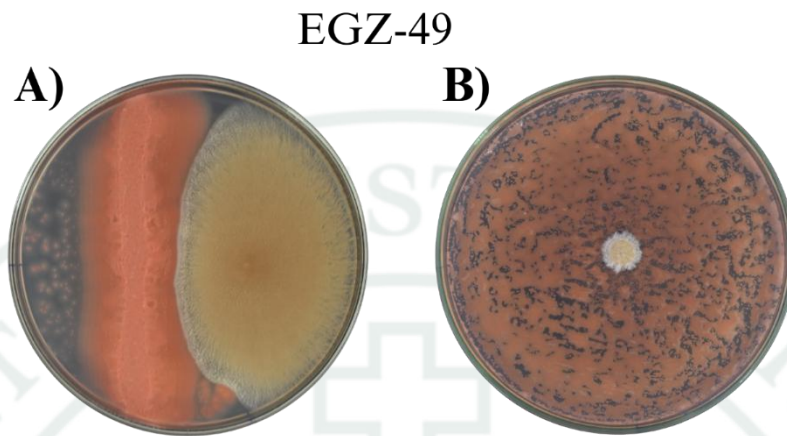
- m) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-39 (*Rhosporidiobolus ruineae*).



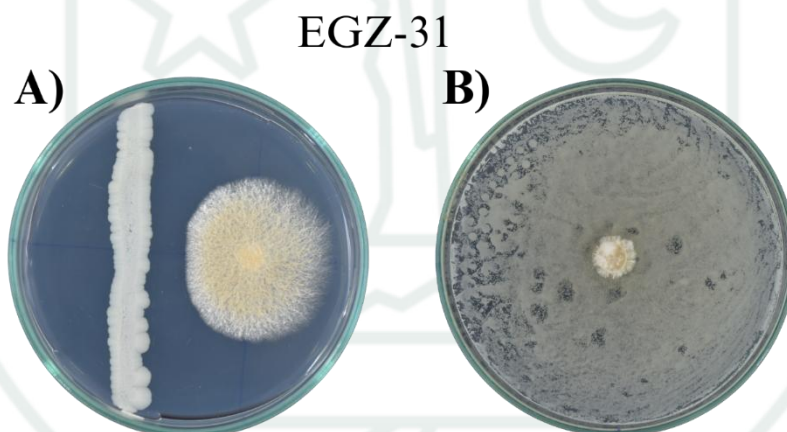
- n) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-20 (*Moiszyomices sp.*).



- o) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-49 (*Sporobolomyces japonicus*).

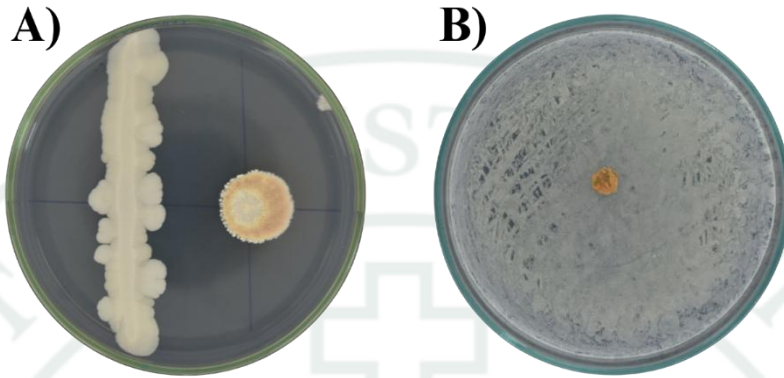


- p) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-31 (*Debaromyces hansenii*).



- q) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-38 (*Wickerhamomyces edaphicus*).

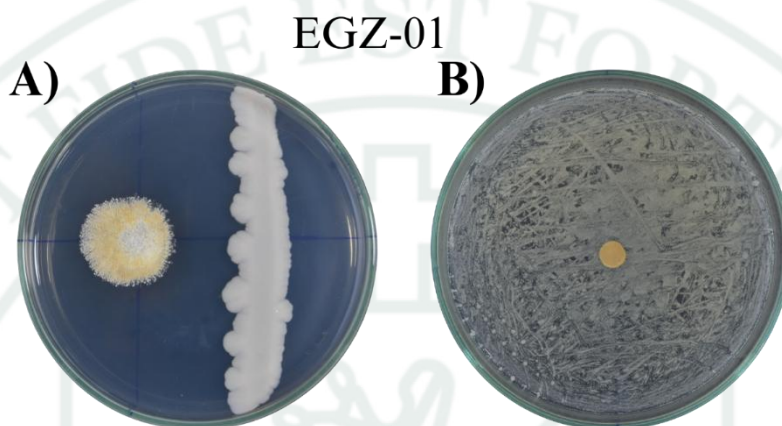
EGZ-38



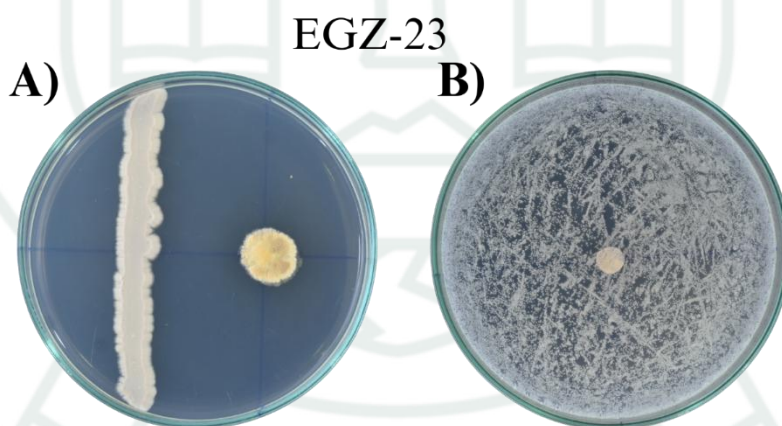
Anexo 5

Ensayo de confrontación dual y ensayo de confrontación directa in vitro en la cepa de Bagua.

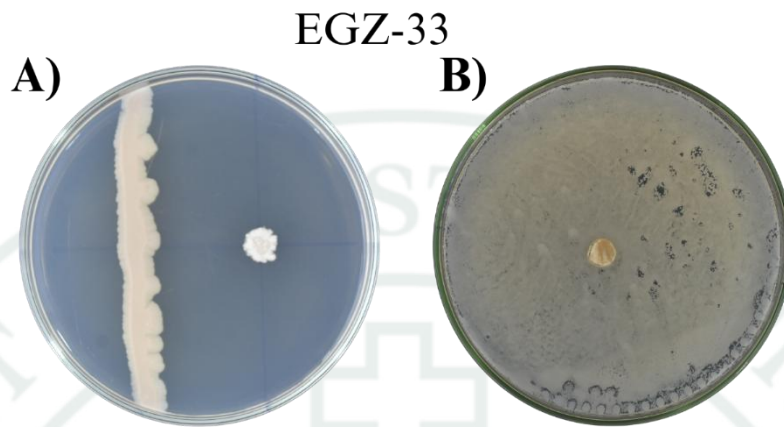
- a) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-01 (*Meyerozyma guilliermondii*).



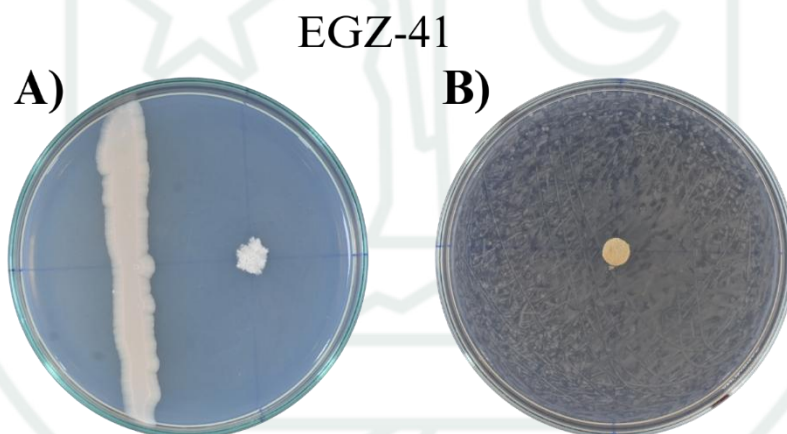
- b) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-23 (*Meyerozyma guilliermondii*).



- c) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-33 (*Meyerozyma guilliermondii*).

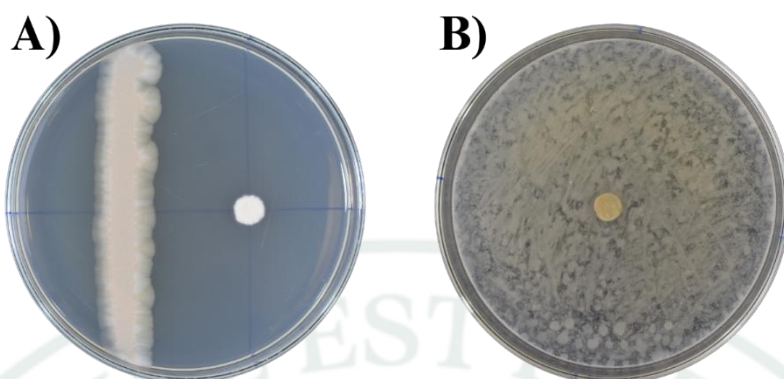


- d) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-41 (*Meyerozyma guilliermondii*).



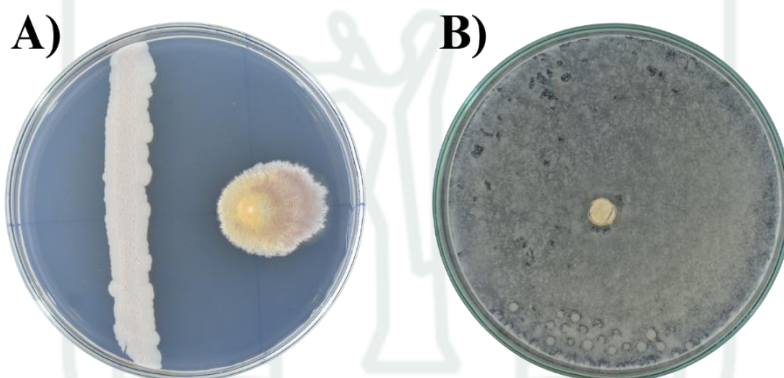
- e) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-53 (*Meyerozyma guilliermondii*).

EGZ-53



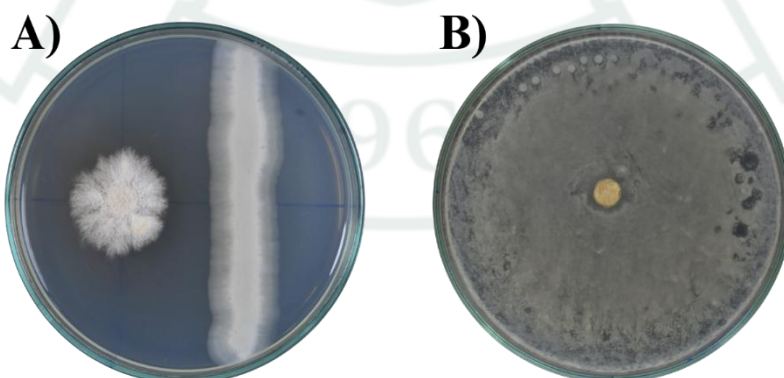
- f) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-63 (*Meyerozyma guilliermondii*).

EGZ-63

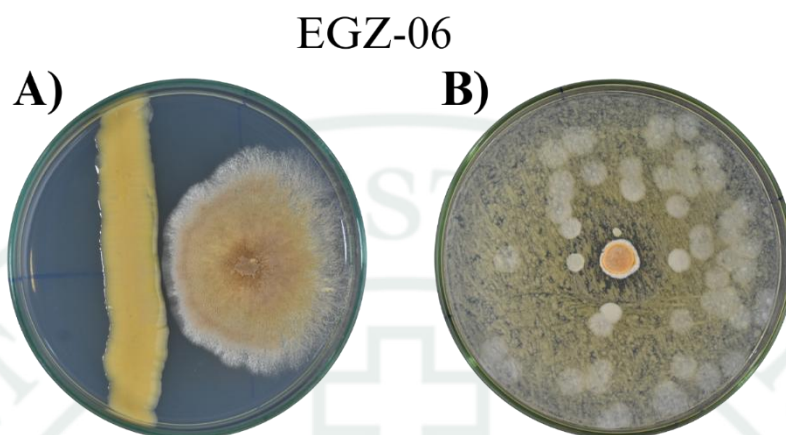


- g) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-03 (*Candida sp.*).

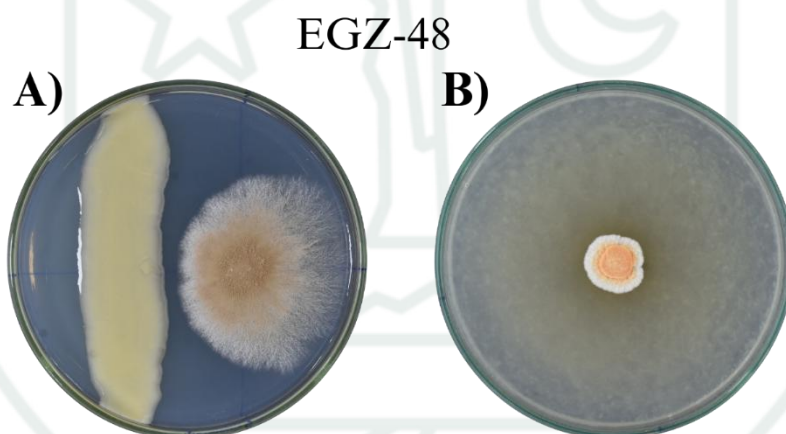
EGZ-03



- h) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-06 (*Hannaella phetchabunensis*).

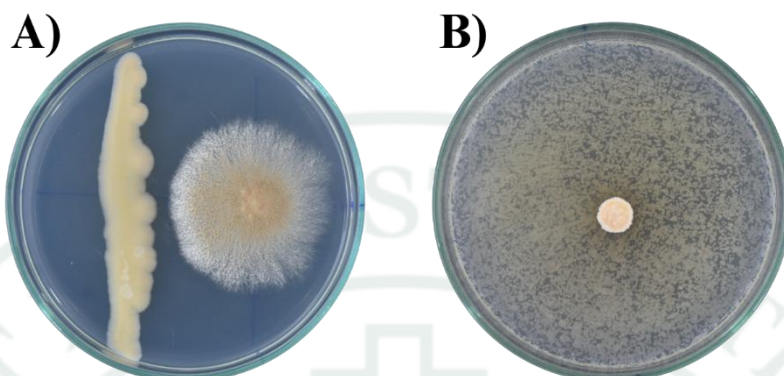


- i) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-48 (*Hannaella taiwanensis*).



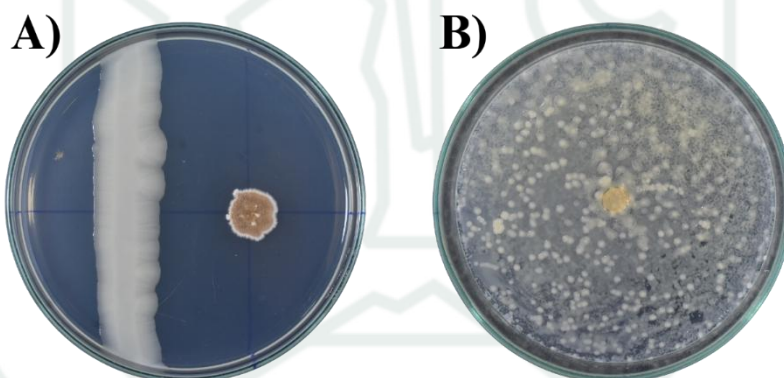
- j) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-51 (*Hannaella sp.*).

EGZ-51

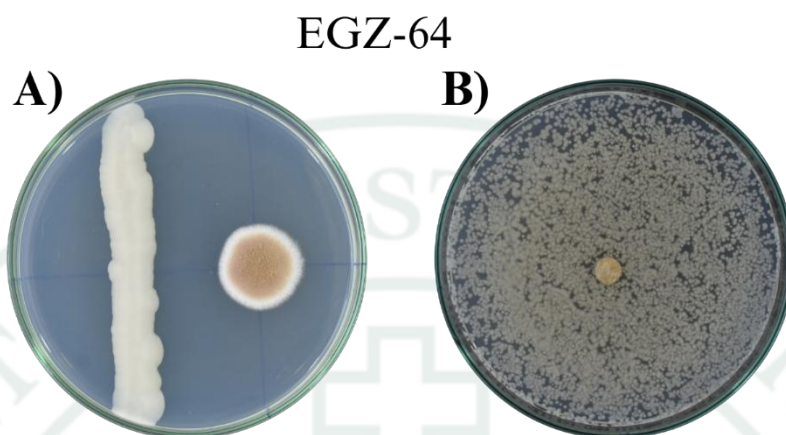


- k) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-07 (*Kwoniella heveanensis*).

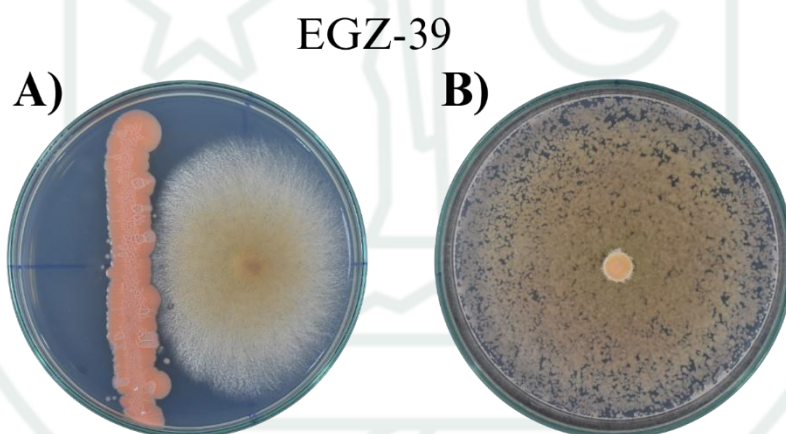
EGZ-07



- l) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-64 (*Kwoniella heveanensis*).

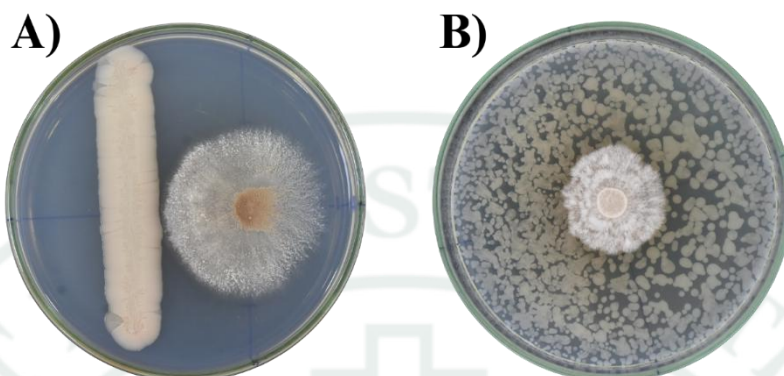


- m) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-39 (*Rhosporidiobolus ruineae*).



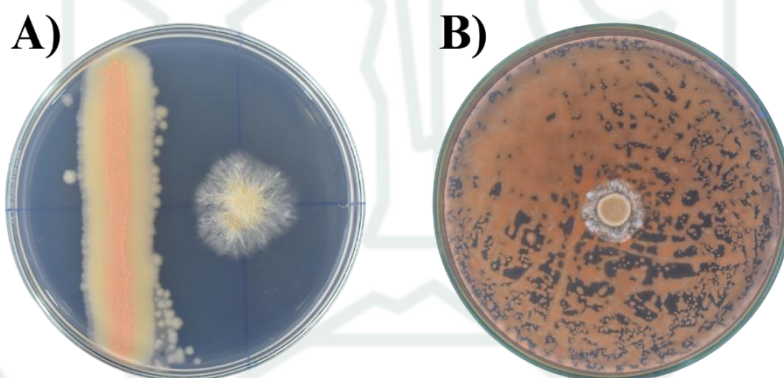
- n) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-20 (*Moisyomyces sp.*).

EGZ-20

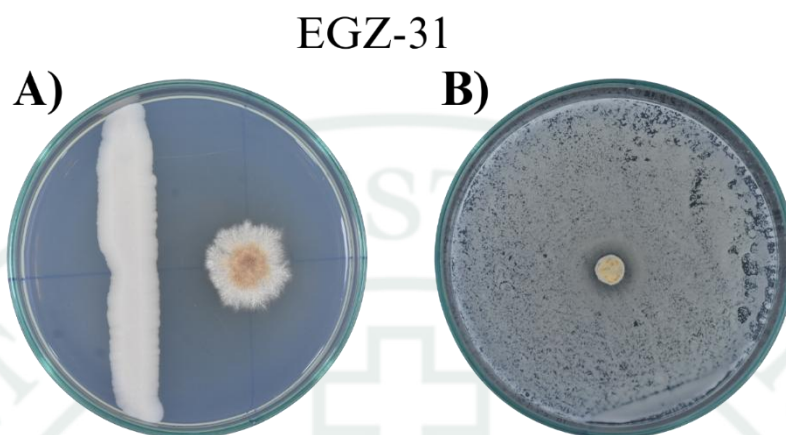


- o) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-49 (*Sporobolomyces japonicus*).

EGZ-49



- p) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-31 (*Debaromyces hansenii*).



- q) Placas Petri con ensayos de A) Método N°01 (Ensayo de confrontación directa) y B) Método N°02 (Ensayo de confrontación dual) de la cepa EGZ-38 (*Wickerhamomyces edaphicus*).

