



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE AGRONOMÍA

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniero Agrónomo.

Título del Proyecto de Investigación:

“Evaluación de la viabilidad de bio formulaciones a base de PGPRs y sus
efectos en plantaciones de *Theobroma cacao* L. CCN51”

AUTOR:

García Gallirgos Víctor Jorge

Director del Proyecto de Investigación:

Hayron Fabricio Canchignia Martínez *PhD.*

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **GARCIA GALLIRGOS VICTOR JORGE** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

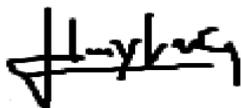
La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.



GARCIA GALLIRGOS VICTOR JORGE
CI: 76543442

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Egresado **García Gallirgos Víctor Jorge**, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado “Evaluación de la viabilidad de bio formulaciones a base de PGPRs y sus efectos en plantaciones de *Theobroma cacao* L. CCN51”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.



Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito **Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado “Evaluación de la viabilidad de bio formulaciones a base de PGPRs y sus efectos en plantaciones de *Theobroma cacao* L. CCN51”, de autoría del estudiante **García Gallirgos Víctor Jorge** de la carrera de Agronomía (Rediseño).

CERTIFICA: el cumplimiento de los parámetros establecidos por el SENESCYT, y se evidencia el reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico (URKUND) con un porcentaje de coincidencia del 5 %.



Document Information

Analyzed document	TESIS VICTOR GARCIA	5-8-21 URKUND.docx (D111010422)
Submitted	8/5/2021 3:40:00 PM	
Submitted by		
Submitter email	hcanchignia@uteq.edu.ec	
Similarity	5%	
Analysis address	hcanchignia.uteq@analysis.orkund.com	

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Hayron Fabricio Canchignia Martínez".

Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMIA

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Evaluación de la viabilidad de bio formulaciones a base de PGPRs y sus efectos en plantaciones de *Theobroma cacao* L. CCN51”

Presentado al Consejo Académico como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Aprobado por:

Fernando Abasolo Pacheco, PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Marisol Rivera Herrada, Msc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Luis Godoy Montiel, PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Quevedo – Los Ríos- Ecuador

2021

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mi padre Cecilio García Quispe quien es mi guía, el motor y motivo para seguir adelante todos los días. A mi madre Lidia Callirgos por darme la vida.

A las dos mujeres que formaron parte fundamental de mi vida, mis madres queridas Bersabe Quispe† y Ramona Román†, hoy solo me quedan recuerdos y sus consejos, sé que desde el cielo ellas me cuidan, me guían y se sienten orgullosas de mi como yo de ellas.

Víctor Jorge García Gallirgos

AGRADECIMIENTO

El autor del presente trabajo quiere dejar constancia su sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones, que hicieron posible la culminación de la misma:

Al estado de Perú y Ecuador los cuales a través de su programa de Becas en el marco de cooperación internacional me han permitido poder culminar mis estudios universitarios

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agropecuarias que me abrió sus puertas para pertenecer a esta gran familia de profesionales formados en sus aulas.

Al Decano Ing. Leonardo Matute uno de los principales motivadores para que el estudiante sea generador de ciencia a través de las investigaciones.

Al equipo de biotecnología de la UTEQ Ing. Antonio Mendoza León, Ing. Ángel Cedeño Moreira, Ing. Luis Vera Benites, quienes a través de sus experiencias y conocimientos me guiaron para aprender y desarrollar habilidades dentro del área, así mismo a los futuros colegas, Viviana Suarez Chichande, Victor Tubay Muñoz, Cristhian Macías Holguín, quienes me brindaron su amistad sincera y estuvieron prestos a compartir sus conocimientos conmigo, aconsejarme en cualquier duda que tenía.

A todos los compañeros y amigos que hice durante mi formación profesional de los cuales aprendí la diversidad de culturas que existen entre diversos pueblos y nacionalidades.

A todos los docentes que estuvieron durante mi formación profesional, quienes brindaron todo su conocimiento para poder desarrollarnos en el ámbito de la carrera profesional.

Mi sincero agradecimiento a mi director de tesis, Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD, por ser el guía durante todo este proceso, por apoyarme brindándome sus conocimientos.

RESUMEN

La presente investigación evalúa el estudio de cinco cepas bacterianas o PGPRs, dichas cepas viven en asociación con las plantas generando una simbiosis, crecimiento y protección de la misma, las cepas usadas son *Pseudomonas protegens* CHA0, *Serratia marcenses* 3/8, *Acinetobacter calcoaceticus* BM2/12 *P. veronii* R4 y *Enterobacter asburiae* 3/14, todas obtenidas del cepario del Laboratorio de Biotecnología de la UTEQ, con el objetivo de determinar la viabilidad de bio formulaciones a base de PGPRs y sus efectos en plantaciones de *Theobroma cacao* L. CCN51. La viabilidad de las cepas bacterianas fue evaluada al colocarlas en los medios de cultivos establecidos en la investigación, determinándose posteriormente las UFC/ml de medio hasta 26 días. También se evaluó la actividad quinolítica, degradación de quitina, producción de ureasa, solubilización de potasio y de fosfato. La presencia del gen *ChiA* fue determinada mediante PCR con cebadores específicos. Los ensayos de campos se realizaron en la finca “Ignolia”, Cotopaxi, La Maná, el Moral. Los ensayos en el cultivo de *T. cacao* CCN51 consistieron en diferentes formas de aplicación de consorcios bacterianos al 20%. Los tratamientos en estudio fueron: foliar, inyección, edáfico, químico y testigo. Para la evaluación de la viabilidad de las rizobacterias se empleó un DCA y para el comportamiento agronómico se empleó BCA. Las cepas 3/8, BM2/12, R4 y 3/14 presentaron el gen *ChiA*, dentro de las pruebas para degradación de quitina, 3/8 y BM2/12 poseen un mayor dominio catalítico en degradación. En la solubilización de minerales (N, P, K) se determinó que BM2/12 tiene la capacidad de solubilizar fósforo y potasio, CHA0 solubiliza un gran contenido de nitrógeno y fósforo en diferencia a las demás cepas. La aplicación de estas formulaciones redujo la incidencia de *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora spp* y Cherelle wilt lo que indica que estas formulaciones se pueden considerar como una alternativa para su manejo y control. En las variables agronómicas y de rendimiento se evidenció un mayor aumento con 25,2 cojines florales, 107,9 emisiones foliares, 1270,63 kg en rendimiento en comparación al testigo con 20,3 cojines florales, 83,7 emisiones foliares y un rendimiento de 473 kg.

Palabras claves: Rizobacterias, biocontrol, solubilización de minerales, viabilidad.

ABSTRAC

The present research evaluates the study of five bacterial strains or PGPRs, these strains live in association with plants generating a symbiosis, growth and protection of the same, the strains used are *Pseudomonas protegens* CHA0, *Serratia marcescens* 3/8, *Acinetobacter calcoaceticus* BM2/12 P. veronii R4 and *Enterobacter asburiae* 3/14, all obtained from the strains of the Biotechnology Laboratory of the UTEQ, with the objective of determining the viability of bio formulations based on PGPRs and their effects on plantations of *Theobroma cacao* L. CCN51. The viability of the bacterial strains was evaluated by placing them in the culture media established in the research, subsequently determining the CFU/ml of medium up to 26 days. Quinololytic activity, chitin degradation, urease production, potassium and phosphate solubilization were also evaluated. The presence of the ChiA gene was determined by PCR with specific primers. Field trials were carried out at "Ignolia" farm, Cotopaxi, La Maná, El Moral. The trials on T. cacao CCN51 consisted of different forms of application of bacterial consortia at 20%. The treatments under study were: foliar, injection, edaphic, chemical and control. A DCA was used to evaluate the viability of the rhizobacteria and BCA was used for agronomic performance. Strains 3/8, BM2/12, R4 and 3/14 presented the ChiA gene, within the tests for chitin degradation, 3/8 and BM2/12 have a higher catalytic domain in degradation. In the solubilization of minerals (N, P, K) it was determined that BM2/12 has the capacity to solubilize phosphorus and potassium, CHA0 solubilizes a high content of nitrogen and phosphorus in contrast to the other strains. The application of these formulations reduced the incidence of *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora spp* and *Cherelle wilt*, which indicates that these formulations can be considered as an alternative for their management and control. The agronomic and yield variables showed a greater increase with 25.2 floral cushions, 107.9 foliar emissions, 1270.63 kg in yield compared to the control with 20.3 floral cushions, 83.7 foliar emissions and a yield of 473 kg.

Key words: Rhizobacteria, biocontrol, mineral solubilization, viability.

INDICE DE CONTENIDO

PORTADA	
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS	i
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	ii
REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA	
Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iii
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN	vii
ABSTRAC.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	
1.1. Problematización	4
1.1.1. Diagnostico	4
1.1.2. Planteamiento del problema	4
1.1.3. Sistematización del Problema.....	4
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo General.....	5
1.2.2. Objetivos Específicos	5
1.3. Justificación	6
CAPÍTULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	
2.1. Marco Conceptual.....	8
2.1.1. Cacao	8
2.1.2. Comportamiento agronómico del cacao CCN-51.....	8
2.1.3. Hongos fitopatógenos en cacao	8
2.1.3.1. <i>Phytophthora palmivora</i>	8

2.1.3.2. <i>Moniliophthora perniciosa</i>	9
2.1.3.3. <i>Moniliophthora roreri</i>	9
2.1.3.4. <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	9
2.1.4. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPRs)	9
2.1.5. Cepas de PGPRs	10
2.1.5.1. <i>Enterobacter asburiae</i>	10
2.1.5.2. <i>Serratia marcescens</i>	10
2.1.5.3. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	11
2.1.5.4. <i>Pseudomonas protegens CHA0</i>	11
2.1.5.5. <i>Pseudomonas veronii</i>	11
2.1.6. Componentes enzimáticos de las PGPRs	11
2.1.6.1. Quitinasa.....	11
2.1.6.2. Ureasa.....	11
2.1.6.3. Solubilización de Potasio	12
2.1.6.4. Solubilización de Fósforo.....	12
2.1.6.5. Ácido indolacético.....	13
2.1.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	13
2.1.8. Antagonismo.....	13
2.1.9. Viabilidad	13
2.1.10. Biofermentador	14

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización de la investigación.....	16
3.2. Tipo de investigación.....	16
3.3. Método de investigación.....	16
3.4. Fuentes de recopilación de información	17
3.5. Materiales	17

3.6.	Diseño de los experimentos	19
3.6.1.	Experimento 1. Determinación de la viabilidad de las cepas PGPRs en distintos medios de cultivo.....	19
3.6.2.	Experimento 2. Efecto del bio producto en base a PGPRs en el cultivo de cacao .	21
3.7.	Características del área de investigación	22
3.8.	Manejo del experimento	22
3.8.1.	Evaluación de la viabilidad de rizobacterias PGPRs.....	22
3.8.2.	Medios de cultivo	23
3.8.3.	Actividad quinolítica en las PGPRs en estudio	23
3.8.4.	Inducción a la producción de enzima ureasa por parte de las PGPRs	24
3.8.5.	Solubilización de potasio en las PGPRs en estudio	24
3.8.6.	Solubilización de fosfato en las PGPRs en estudio	24
3.8.7.	Determinación por PCR la presencia del gen ChiA en las cepas PGPRs.....	25
3.9.	Comportamiento agronómico del cacao mediante aplicación de PGPRs.....	25
3.10.	Cojines florales	27
3.11.	Emisiones florales.....	27
3.12.	Incidencia de Cherville wilt o marchitez de chereles.....	27
3.13.	Incidencia de Phytophthora spp.....	27
3.14.	Incidencia de Moniliophthora roreri	27
3.15.	Cantidad de mazorcas maduras	28
3.16.	Número de granos.....	28
3.17.	Peso de mazorca	28
3.18.	Rendimiento del cacao.....	28
3.19.	Clorofila total.....	28

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Resultados.....	30
------	-----------------	----

4.1.1.	Viabilidad de las rizobacterias en los bioformulados	30
4.1.1.1.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2-12	30
4.1.1.2.	<i>Serratia Marcenses</i> 3-8	31
4.1.1.3.	<i>Enterobacter asburiae</i> 3-14.....	32
4.1.1.4.	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0.....	33
4.1.1.5.	<i>Pseudomonas veronii</i> R4.....	34
4.1.2.	Pruebas bioquímicas	35
4.1.3.	Detección del gen ChiA en las PGPRs mediante PCR.....	37
4.1.4.	Análisis morfológico	38
4.1.4.1.	Cojines florales.....	38
4.1.4.2.	Emisiones florales	39
4.1.4.3.	Incidencia de Cherelle wilt o marchitez de chereles	40
4.1.5.	Incidencia de <i>Phytophthora spp</i>	41
4.1.6.	Incidencia de <i>Moniliophthora roreri</i>	42
4.1.7.	Cantidad de mazorcas maduras	43
4.1.8.	Número de granos.....	44
4.1.9.	Peso de mazorca	45
4.1.10.	Rendimiento del cacao.....	46
4.1.11.	Clorofila total.....	47
4.2.	Discusión	48
4.2.1.	Viabilidad de las rizobacterias en los diferentes bioformulados	48
4.2.2.	Actividad quinolítica, ureasa, fosfatasa y ácidos orgánicos de las PGPRs.....	49
4.2.3.	Determinación de la presencia del gen ChiA mediante PCR	50
4.2.4.	Aplicación en campo del bioformulado BIOQPGPRs	51

CAPÍTULO V:CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	Conclusiones.....	53
------	-------------------	----

5.2. Recomendaciones	54
----------------------------	----

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía.....	56
------------------------	----

CAPÍTULO VII: ANEXOS	65
----------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Viabilidad de rizobacterias PGPRs en distintos medios de cultivos alternativos.	20
Tabla 2. Esquema del análisis de varianza	21
Tabla 3. Tratamientos del consorcio PGPRs (R4, BMR 2-12, 3-8, CHA0, 3-14)	21
Tabla 4. Esquema del análisis de la varianza	21
Tabla 5. Actividad quinolítica, ureasa, fosfatasa y ácidos orgánicos de las PGPRs	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evaluación de la viabilidad de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2-12 en diferentes bioformulados.	30
Figura 2. Evaluación de la viabilidad de <i>Serratia Marcenses</i> 3-8 en diferentes bioformulados.	31
Figura 3. Evaluación de la viabilidad de <i>Enterobacter asburiae</i> 3-14 en diferentes bioformulados.	32
Figura 4. Evaluación de la viabilidad de <i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 en diferentes bioformulados.	33
Figura 5. Evaluación de la viabilidad de <i>Pseudomonas veronii</i> R4 en diferentes bioformulados.	34
Figura 6. Pruebas bioquímicas de cepas PGPRs	36
Figura 7. Amplificación del gen ChiA	37
Figura 8. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la formación de cojines florales.	38
Figura 9. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la emisión foliar ...	39
Figura 10. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la incidencia de Cherelle wilt.....	40
Figura 11. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la incidencia de <i>Phytophthora spp</i>	41
Figura 12. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la incidencia de <i>Moniliophthora roreri</i>	42
Figura 13. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la cantidad de mazorcas maduras.....	43
Figura 14. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en los números de granos por mazorca.....	44
Figura 15. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en el peso de las mazorcas	45
Figura 16. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en el rendimiento	46
Figura 17. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la clorofila total... ..	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación y crecimiento de las rizobacterias en medio líquido King B.....	66
Anexo 2. Crecimiento de rizobacterias en biofermentadores.....	66
Anexo 3. Matraces con cultivos obtenido de los biofermentadores.....	67
Anexo 4. Tratamientos en campo Cacao CCN - 51	67
Anexo 5. Recolección de cherelles enfermos y mazorcas de cacao.....	68
Anexo 6. Protocolo del DNeasy® Plant Mini Kit.....	69
Anexo 7. Realización de PCR	70
Anexo 8. Diseño y bloques de los tratamientos en distintos sectores de estudio en la finca "Ignolia" del Cantón La Maná.....	71

Código Dublín

Título:	“Evaluación de la viabilidad de bio formulaciones a base de PGPRs y sus efectos en plantaciones de <i>Theobroma cacao</i> L. CCN51”
Autor:	García Gallirgos Victor Jorge
Palabras clave:	Rizobacterias, biocontrol, solubilización de minerales, viabilidad.
Fecha de publicación:	
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2021
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>En este estudio se seleccionaron 5 cepas bacterianas, <i>Pseudomonas protegens</i> CHA0, <i>Serratia marcescens</i> 3/8, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BM2/12 <i>P. veronii</i> R4 y <i>Enterobacter asburiae</i> 3/14 provenientes del cepario del Laboratorio de Biotecnología de la UTEQ, con el objetivo de determinar la viabilidad de bio-formulaciones a base de PGPRs y sus efectos en plantaciones de <i>Theobroma cacao</i> L. CCN51. La viabilidad de las cepas bacterianas fue evaluada al colocarlas en los medios de cultivos establecidos en la investigación, determinándose posteriormente las UFC/ml de medio hasta 26 días. También se evaluó la actividad quinolítica, degradación de quitina, producción de ureasa, solubilización de potasio y de fosfato. La presencia del gen <i>ChiA</i> fue determinada mediante PCR con cebadores específicos. Los ensayos de campos se realizaron en la finca “Ignolia”, Cotopaxi, La Maná, el Moral. Los ensayos en el cultivo de <i>T. cacao</i> CCN51 consistieron en diferentes formas de aplicación de consorcios bacterianos al 20%. Los tratamientos en estudio fueron: foliar, inyección, edáfico, químico y testigo. Para la evaluación de la viabilidad de las rizobacterias se empleó un DCA con arreglo factorial 4x5 y para el comportamiento agronómico se empleó BCA. Las cepas 3/8, BM2/12, R4 y 3/14 presentaron el gen <i>ChiA</i>, dentro de las pruebas para degradación de quitina, 3/8 y BM2/12 poseen un mayor dominio catalítico en degradación. En la solubilización de minerales (N, P, K) se determinó que BM2/12 tiene la capacidad de solubilizar fósforo y potasio, CHA0 solubiliza un gran contenido de nitrógeno y fósforo en diferencia a las demás cepas. La aplicación de estas formulaciones redujo la incidencia de <i>Moniliophthora roreri</i>, <i>Phytophthora spp</i> y Cherville wilt lo que indica que estas formulaciones se pueden considerar como una alternativa para el manejo y control. En las variables agronómicas y de rendimiento se evidenció un mayor aumento en comparación al testigo.</p>
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162
URI:	

INTRODUCCIÓN

El cacao es originario de Sudamérica específicamente de la cuenca del Río Amazonas, perteneciente a la familia de las Esterculiáceas, de acuerdo con (Anecacao,2019; ESPAC,2018) cerca de 600.000 personas dependen de la cadena alimentaria del cacao en Ecuador. La producción cacaotera está basada por diferentes estratificaciones de productores: pequeños (70%), medianos (20%) y grandes (10%), en 573.832 ha sembradas y 504916 ha en cosecha (contribuyendo el 5% de la población nacional económicamente activa). Ecuador representa el 7 % de la producción mundial total con 315.571 mil toneladas.

En el Ecuador existen dos variedades de relevancia económica y productiva, el tipo Nacional (fino de aroma) y el clon CCN-51 sin embargo, debido a la diferencia en productividad y la facilidad del manejo agronómico los productores optan por el clon CCN-51, para Enríquez (2010), las plantaciones cacaoteras son productivas por las características genéticas, estas características genéticas dependen del factor ambiente, suelo y nutrición. En definitiva, si un factor está en desbalance la eficiencia productiva es afectada, perjudicando las características fisiológicas y morfológicas de la planta, ocasionando la proliferación de enfermedades como Monilia (*Moniliophthora roreri*), Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y Mazorca Negra (*Phytophthora spp.*) que aprovechan para infectar los distintos órganos de las plantas.

La implementación de la agricultura moderna o convencional tiene grandes costos de producción debido al uso y la aplicación de diferentes productos sintéticos tales como: fertilizantes, fungicidas, bioestimulantes, herbicidas, insecticidas, de acuerdo a Celis *et al.*, (2020) el uso de estos agroquímico viene ocasionando un grave impacto ambiental, en este contexto producen efectos negativos en el sistema productivo cacaotero como: resurgencia de patógenos, eliminación de polinizadores, reducción de agentes biológicos, degradación del suelo, contaminación de acuíferos y atmósfera.

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal son bacterias que viven en socios con las plantas generando una simbiosis, crecimiento y protección de las plantas, según Berendsen, Pieterse y Bakker (2012) las PGPRs tienen la capacidad de colonizar activamente el sistema radicular para favorecer y/o mejorar su crecimiento y rendimiento.

Las PGPRs ejercen efectos benéficos en las plantas a través de mecanismos directos e indirectos, o una combinación de ambos lo que conlleva a mejorar los aspectos de desarrollo como de producción de los cultivos, de acuerdo a Reséndez *et al.*, (2018) los mecanismos directos ocurren cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilitan a las plantas, o bien cuando éstas incrementan la disponibilidad de diferentes elementos nutritivos, requeridos para su metabolismo y para mejorar su proceso de nutrición. Entre los mecanismos directos destacan: la fijación de nitrógeno (N); la síntesis de fitohormonas, vitaminas y enzimas, la solubilización de fósforo (P) inorgánico y la mineralización de fosfato orgánico, la oxidación de sulfuros, el incremento en la permeabilidad de la raíz, la producción de nitritos, la acumulación de nitratos, la reducción de la toxicidad por metales pesados y de la actividad de la enzima ACC desaminasa, la secreción de sideróforos, la reducción de los niveles de etileno en los suelos, y el incremento de la permeabilidad de las raíces.

Los mecanismos indirectos se caracterizan porque ocasionan la disminución o eliminación de microorganismos fitopatógenos, ya sea a través de la producción de sustancias antimicrobianas o de antibióticos, de enzimas líticas o una combinación de éstas; por competencia de nutrimentos o de espacio en el nicho ecológico, así como por estimulación de las defensas naturales de la planta mediante mecanismos de biocontrol; la inducción de resistencia sistémica (IRS) a un amplio espectro de organismos patógenos y la producción de sideróforos, como mecanismo para secuestrar el Fe disponible en los suelos y con esto limitar el desarrollo y la presencia de dichos fitopatógenos; producción de antibióticos y cianuros de hidrógeno que impactan sobre los fitopatógenos Reséndez *et al.*, (2018), es muy importante conocer como los microorganismos interactúan dentro del ecosistema y como este actuar genera un beneficio para mejorar el desarrollo y producción de los cultivos.

La siguiente investigación contribuirá con el desarrollo productivo del sector agrícola, generando aportes de importancia agronómica en el cultivo de cacao mediante la utilización de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs), disminuyendo así el uso de agroquímicos, manteniendo el entorno agrícola y la salud humana.

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problematización

1.1.1. Diagnostico

Las plantaciones cacaoteras del clon CCN-51 sufren el ataque de *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri* ya que son las principales enfermedades del cultivo de cacao CCN-51 , en este contexto la influencia del ambiente y la variabilidad climática ayuda a cumplir el ciclo de vida del patógeno llegando a causar graves daños, sumado a esto la falta de nutrientes en el suelo causado por las malas prácticas agrícolas trayendo como consecuencia deficiencias nutricionales en los distintos periodos fenológicos del cultivo ocasionando pérdidas económicas para el productor.

1.1.2. Planteamiento del problema

El uso de pesticidas está aumentando a nivel mundial, en este contexto la producción de cacao sigue dependiendo de los productos químicos para alcanzar niveles aceptables de producción, sin embargo, los impactos al medio ambiente por el uso excesivo de compuestos ocasionan problemas en los factores abióticos (radiación, temperatura, humedad, dióxido de carbono y salinidad) y bióticos (hongos, insectos, malezas, bacterias) causando una disminución en el rendimiento del cultivo de cacao. La utilización de rizobacterias PGPRs reducen estos problemas y por ende mejoraría las condiciones morfológicas y fisiológicas en la planta.

1.1.3. Sistematización del Problema

¿Cómo influirá la aplicación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPRs) en el comportamiento agronómico del *T. cacao* L.?

¿Las bio-formulaciones de rizobacterias promueven el crecimiento vegetal en las plantaciones de cacao CCN-51 en un corto plazo?

¿Se puede ejercer un control biológico eficiente mediante la aplicación de bio-formulaciones de rizobacterias en las plantaciones cacaoteras?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Determinar la viabilidad de bio-formulaciones a base de PGPRs y sus efectos en plantaciones de *Theobroma cacao* L. CCN51.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Establecer la viabilidad de las PGPRs en su bio-formulación para diferentes medios de cultivo.
- Identificar por PCR si en los bioformulados de aislados bacterianos existe el gen ChiA.
- Evaluar el comportamiento agronómico de plantaciones *Theobroma cacao* L. CCN51 tras la aplicación de las bio-formulaciones a base de PGPRs.

1.3. Justificación

Los bio formulados a base de microorganismos PGPR ayudan a obtener datos de importancia tales como evolución de cultivo, consumo de sustrato, acumulación de productos del cultivo, comparación de crecimiento en distintos medios los cuales posibilitan la producción a mayor escala. El empleo de PGPRs reduce el impacto que tiene el uso de productos químicos, ya que poseen capacidad antagonista hacia un amplio rango de patógenos entre ellos por la producción de metabolitos secundarios además de la producción de fitohormonas que favorecen el desarrollo de las plantas. Esta investigación pretende la utilización de PGPRs como biocontroladores ya que estos se presentan como una opción viable para el control de patógenos (*Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri*) así también como promotores del crecimiento de las plantas sin alterar el equilibrio microbiológico del suelo, además esta investigación sirve para conocer los efectos de la aplicación de bio-formulados a nivel de campo y así contribuir a solucionar los problemas que los agricultores presentan en dicha área.

El uso de rizobacterias PGPRs a nivel *in vitro* tiene gran importancia en los distintos trabajos investigativos. La falta de información a nivel de campo sobre las PGPRs permite generar nuevas interrogantes sobre su comportamiento en cultivos con fines agrícolas, el estudio del comportamiento agronómico del cultivo de cacao mediante la aplicación de estas rizobacterias representa una nueva alternativa para productores porque permite reducir las aplicaciones de agroquímicos y favorece a una agricultura más ecológica con el medio ambiente.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual

2.1.1. Cacao

El cacao es originario de los bosques de la cuenca del Amazonas y Centroamérica. Recientemente esto fue definido por estudios moleculares. El cacao fue ampliamente cultivado por los pueblos mayas de América Central tropical antes de la conquista española del siglo XVI, desde hace 1000 años atrás los mayas conocían esta semilla y la utilizaban como fuente de energía para sus labores diarias. Las semillas de cacao producían un aroma tan divino, ellos denominaban como un regalo del dios Quetzacoatl (Vos *et al.*, 2003).

Brasil y Ecuador son los principales productores de cacao en América Latina, sin embargo, a nivel mundial Costa de Marfil y Ghana lideran las mayores producciones cacaoteras (Franzen y Borgerhoff 2007). El efecto adverso de los pesticidas influye directamente en la macro y micro fauna, desfavoreciendo su uso (Vos, Ritchie y Julie, 2003). Según Suárez y Alba, (2013) el uso de microorganismos antagonistas para el control biológico de patógenos en cultivos agrícolas despierta el interés de los productores como alternativa para la reducción de agroquímicos

2.1.2. Comportamiento agronómico del cacao CCN-51

Es la capacidad de un material genético que tiende a comportarse a diferentes factores de un ambiente. Chang y Baquerizo, (2015). El CCN-51 tiene un mayor potencial de rendimiento y resistencia a las enfermedades fungosas comunes. Si el proceso de fermentación es el adecuado puede llegar a tener buenas características de calidad. Este clon puede alcanzar a un rendimiento de 4 000 kg de semillas secas por hectárea bajo exposición solar y alta densidad. Sus características favorecen un alto rendimiento industrial, la siembra de la variedad resulta altamente rentable para la producción y comercialización (López 2016).

2.1.3. Hongos fitopatógenos en cacao

2.1.3.1. *Phytophthora palmivora*

Phytophthora palmivora es un hongo *Oomycetes* de la familia de *Peronosporaceae*. Causa daño directamente a las mazorcas en distintos estadios, incluso la muerte de la planta por pudrición. Su estructura asexual está compuesta por: clamidiosporas, esporangios, zoosporas. Mientras su estructura sexual está compuesta por anteridio y oogonios. (Waterhouse *et al.*, 1983).

2.1.3.2. *Moniliophthora perniciosa*

Moniliophthora perniciosa (Stahel) Aime y Mora, (2005) es un hongo *Basidiomicetes*, pertenece a las familias de las *Marasmiaceae*. Fue detectado en Ecuador, en el año de 1917, la producción se redujo 40 % en un período de cinco años. Es endémico de las zonas tropicales de Sudamérica. Afecta diferentes especies de los géneros: Según Aime y Mora, (2005) afecta a *Theobroma* (22 especies), *Herrania* (17 especies). CABI, (2016) determinó la presencia de *Moniliophthora perniciosa* en *Bixa orellana*. Las basidiosporas del hongo infectan los tejidos meristemáticos y ocasionan daños a brotes, botones florales, flores y frutos en desarrollo. La producción de basidiocarpos y formación de esporas ocurre a partir del tejido necrótico (Silva *et al.*, 2002; Scarpari *et al.*, 2005)

2.1.3.3. *Moniliophthora roreri*

Moniliophthora roreri es un hongo *Basidiomycota*, pertenece a las familias de las *Marasmiaceae*. (Contreras y Riaño, 2013). Es causante del “Mal de Quevedo” o *Moniliasis*. *Moniliophthora roreri* reduce hasta 60% de la producción anualmente. Las conidias o esporas reproductivas tienen la capacidad de infectar la parte exterior de la mazorca causando hipertrofia causando un daño a la calidad física y organoléptica del fruto (Krauss *et al.*, 2003).

2.1.3.4. *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae es un hongo *Ascomycota*, pertenece a las familias *Botryosphaeriaceae* (Phillips *et al.*, 2013). Su estructura está compuesta por picnidios, ascosporas y conidios (Alves *et al.*, 2008). Los conidios tienen la capacidad de dispersarse, llegan al hospedero degenerando el sistema vascular, por ende, causa la muerte de la planta la infección de *Lasiodiplodia theobromae* a un sin número de cultivos agrícolas cacao, guayaba, cítricos (Phillips *et al.*, 2013).

2.1.4. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPRs)

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) son microorganismos que viven en el suelo, en las raíces de las plantas o dentro de la planta. Las PGPR sintetizan productos químicos para estimular el crecimiento de las plantas y promover la absorción de nutrientes, ayudar a degradar los

contaminantes del suelo y evitar los patógenos (Benhamou *et al.*, 1996). Creus *et al.* (2004) llevo a cabo inoculaciones de rizobacterias bajo estrés por sequía, determinó que el rendimiento de grano y alta calidad de mineral (Mg, K y Ca) mejoró sustancialmente con un contenido alto de potencial de agua, la fracción de agua apoplástico y menor elasticidad de la pared celular volumétricas siendo crucial a la tolerancia a la sequía en las plantas.

La PGPR puede incluir cepas productoras de sideróforos competitivamente asegura la falta de disponibilidad de Fe^{++} al patógeno, por lo tanto, contribuyen a la supresión de la enfermedad. Los sideróforos puede estimular directamente el metabolismo de otro compuesto anti-microbiano mediante el aumento de la disponibilidad de minerales a la bacteria. La producción de HCN también juega un papel importante en el control biológico de patógenos y actuar como rasgos PGPR (Joseph *et al.*, 2007).

Cortés *et al.*, (2015) aplicaron PGPR del género *Bacillus sp.* RzCO44 y *Bacillus sp.* RzCO26 con inoculante comercial en plántulas de *T. cacao*, en efecto los tratamientos mostraron características morfológicas y fisiológicas superiores a los testigos absoluto y químico.

2.1.5. Cepas de PGPRs

2.1.5.1. *Enterobacter asburiae*

Enterobacter spp. está involucrado como patógenos en humanos (Brenner *et al.*, 1986). Sin embargo, la mayoría de las cepas reportadas recientemente han sido aisladas de fuentes ambientales y estudiadas por sus diversas actividades beneficiosas como promotoras de crecimiento de las plantas (Zakria *et al.*, 2008). El biocontrol de enfermedades en plantas (Al-Mughrabi, 2010). Incluso la conversión de compuestos de carbohidratos en hidrolizados ácidos de hemicelulosa en etanol y otros productos de fermentación (Bi *et al.*, 2009).

2.1.5.2. *Serratia marcescens*

S. marcescens es una bacteria gram negativa en forma de bastón con una temperatura de crecimiento óptima de 28 ° C (Khan *et al.*, 2017). Khan *et al.*, (2015) determinó la solubilización de fosfato mineral de *S. marcescens* rsc-14 en un medio químico que contiene fosfato insoluble. Varias enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, la catalasa y el glutatión peroxidasa, y el glutatión reducida producida por RSC-14 pueden permitir que las plantas toleren y desintoxiquen Cd, las enzimas antioxidantes también pueden contribuir

colectivamente al alivio del estrés oxidativo causado por la acumulación intracelular de Cd (Khan *et al.*, 2015).

2.1.5.3. *Acinetobacter calcoaceticus*

Acinetobacter calcoaceticus es una PGPR que tiene la capacidad de promover el crecimiento y el metabolismo de las plantas, provoca un efecto positivo en los contenidos endógenos de ABA y GA, aminoácidos, proteínas, producción de ácido succínico, málico en el cultivo en crecimiento (Kang *et al.*, 2012).

2.1.5.4. *Pseudomonas protegens* CHA0

La cepa CHA0 de *Pseudomonas protegens* es una cepa modelo de biocontrol. Originalmente se aisló de un suelo supresor de la pudrición de la raíz del tabaco y tiene un amplio espectro de actividad de biocontrol contra las enfermedades de las raíces de las plantas tales como *Phytophthora spp*, *Fusarium spp*, *Verticillium spp* (Stutz *et al.*, 1986; Keel y Défago 1997; Sharifi *et al.*, 1998). Producen metabolitos como sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles fitohormonas (Oberhänsli *et al.*, 1991; Voisard *et al.*, 1994; Sacherer *et al.* 1994).

2.1.5.5. *Pseudomonas veronii*

P. veronii tiene la capacidad para la bioabsorción de metales, en particular cadmio (Vullo *et al.*, 2008). La aplicación de *P. veronii* está involucrado en el proceso de degradación del AIA (Peñañiel *et al.*, 2015).

2.1.6. Componentes enzimáticos de las PGPRs

2.1.6.1. Quitinasa

La quitinasa es una enzima que hidroliza la pared celular de los hongos y juega un papel importante en la descomposición de la quitina (Kuddus y Ahmad, 2013). Existen cepas como *Aeromonas sp.* que tienen la capacidad de producir quitinasa entre 22 y 40 ° C (Oberhänsli *et al.* 1991). El uso de la quitina sirve para mitigar la presencia de hongos, nemátodos e insectos que reducen la producción agrícola (Kuddus y Ahmad, 2013).

2.1.6.2. Ureasa

Según Braun, (2010) la ureasa es una enzima que hidroliza la urea a dióxido de carbono y liberando el amonio. Kurtz y Paulson, (1969) afirman que la ureasa en el suelo es

esencialmente para el origen microbiano, además cumple la función de ser una enzima extracelular adsorbida sobre partículas de arcilla o encapsuladas en complejos húmicos

2.1.6.3. Solubilización de Potasio

El uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), incluidas las bacterias solubilizadoras potasio (KSB) como biofertilización, es una solución sostenible para mejorar el crecimiento de las plantas, la nutrición de las plantas, el patrón de crecimiento de las raíces, la competitividad de las plantas y las respuestas a los factores externos. factores de estrés (Setiawati y Handayanto, 2010; Ekin, 2010). Zapata y Roy, (2004) determinó que materiales de roca con contenido de P y K son fuentes más baratas en comparación de los químicos; sin embargo, la mayoría de ellos no están disponibles para una planta porque los minerales se liberan lentamente y su uso como fertilizante a menudo causa bajos rendimientos de la cosecha actual. Las PGPRs del género *Bacillus* intervienen en la producción de ácidos succínico, oxálico y cítrico para la solubilización del potasio de las rocas, como micas, illita y ortoclasas (Friedrich et al. 1991; Ullman *et al.*, 1996). Sheng *et al.*, (2002) demostró que las bacterias solubilizadoras de potasio, como *Bacillus mucilaginosus*, aumentó la disponibilidad de K en los suelos y el contenido mineral en la planta.

2.1.6.4. Solubilización de Fósforo

Morrissey *et al.*, (2004).manifestó que el fosforo es un recurso de relevancia agrícola para el desarrollo de las plantas, forma parte de la molécula del ADN y genera energía en la planta (ATP) sin embargo, los recursos no renovables de fósforo extraíble a nivel mundial se agota rápidamente y los ecosistemas naturales se ven perjudicados por la acumulación de fósforo y metales pesados asociados progresivamente, explorar los enfoques alternativos para recuperar P de rocas se ha convertido en una necesidad. De Freitas et al, (1997) determinó, los microorganismos que disuelven P fijo pobremente soluble se denominan microorganismos solubilizadores de fosfato (PSM) y convierten estos fosfatos insolubles en formas solubles a través del proceso de acidificación, quelación y producción de ácidos orgánicos como acético, glucónico, glicólico, isobutírico, isovalérico, láctico, malónico, oxálico y succínico, este proceso ayuda a movilizar los componentes fosfóricos, particularmente con fertilizantes inorgánicos agregados al suelo. Rodríguez y Fraga, (1999) estableció que las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal del género *Pseudomonas*,

Bacillus y *Rhizobium* tienen la capacidad de solubilizar fósforo, se aprovecha sus exudados de ácidos orgánicos como citrato, oxalato, glutamato, lactato y succinato para solubilizar el fosfato de hierro, aluminio y rocas con contenido de P como la apatita.

2.1.6.5. Ácido indolacético

En este sentido, Bharucha *et al.*, (2013) define las auxinas bacterianas como un potencial de cambiar cualquiera proceso al alterar el conjunto de auxinas de la planta, las raíces son los órganos más sensibles y responden a los niveles cambiantes de IAA mediante el alargamiento de las raíces primarias, la formación de raíces adventicias y laterales o el cese del crecimiento. Patten y Glick, (2002) estableció que ácido indol-3-acético no funciona como una hormona en las células bacterianas, pero su capacidad para producir el mismo puede haber evolucionado, ya que es importante en la relación planta bacteria. Agbodjato *et al.*, (2018) identificó PGPRs de las especies *Bacillus polymyxa*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pantothenicus*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* y *Serratia marcescens* tienen la capacidad de producir ácido indolacético.

2.1.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR (“Polymerase Chain Reaction” o “Reacción en Cadena de la Polimerasa”) es la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima polimerasa, la reacción se basa en el apareamiento y polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos iniciadores sintetizados artificialmente para que su secuencia sea complementaria a la que delimita la secuencia de ADN doble cadena objetivo, blanco o “target” de la amplificación (Landry, 1993; Weising, Nybom, & Wolff, 1995).

2.1.8. Antagonismo

Según Infante *et al.* (2009) el antagonismo se define como la interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos, como la acción de los antibióticos frente a las bacterias.

2.1.9. Viabilidad

La viabilidad es la capacidad de subsistencia de un microorganismo en un ambiente exterior o controlado con una fuente nutritiva. (López *et al.*, 2010). Mediante esta técnica permite

conocer el contenido de UFC en un intervalo de tiempo, en cepas comerciales es muy usada para fines farmacéutico, químico, industriales, agrícolas (Aguilera *et al.*, 2011).

2.1.10. Biofermentador

Un Biofermentador es un recipiente donde se realiza el proceso industrial de fermentar sustancias químicas producidas por microorganismos (París, 2009). Díaz, (2017) realizó las pruebas para el consorcio bacterianos en condiciones obtenidas en el laboratorio a nivel de biofermentador semi industrial, donde determinó la permanencia en el tiempo de las cepas formadoras del consorcio.

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización de la investigación

La investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Finca Experimental “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizado en el kilómetro 7 ½. de la vía Quevedo El Empalme, Cantón Mocache, Provincia de Los Ríos, cuya ubicación geográfica es de 1° 3’18” de latitud sur y 79° 25’ 24” de longitud Oeste, a una altura de 73 msnm.

El trabajo de campo se llevó a cabo en La finca “Ignolia”, propiedad del señor Hernán Canchignia, localizada en el recinto el Moral, cantón La Maná, provincia de Cotopaxi. sus coordenadas son: -0.960256, -79.272725 que comprende de un terreno plano a una altitud de 187 msnm. La edad del material genético CCN-51 es de 3 años.

3.2. Tipo de investigación

El proyecto de investigación es de tipo experimental. Se determinó el comportamiento agronómico del cultivo de cacao mediante la aplicación de PGPRs. Se procedió a realizar evaluaciones de las características morfológicas y fisiológicas a nivel de campo, viabilidad del microorganismo PGPRs, pruebas bioquímicas.

3.3. Método de investigación

En la investigación se emplearon los métodos deductivos, analíticos y de observación teniendo en cuenta la bibliografía mencionada en este proyecto.

- **Método deductivo:** El método se inicia con el análisis de los teoremas, leyes, postulados y principios de aplicación universal y de comprobada validez, para aplicarlos a soluciones o hechos particulares.
- **Método analítico:** Consiste en descomponer un objeto de estudio separando cada una de las partes del todo para estudiarlas en forma individual.
- **Método de observación:** Consiste en saber seleccionar aquello que queremos analizar.

3.4. Fuentes de recopilación de información

Las fuentes utilizadas para la obtención de información fueron secundarias ya que se obtuvieron de: revistas, publicaciones científicas, libros y tesis.

3.5. Materiales

Materiales de Laboratorio

- ❖ dNTPs
- ❖ Buffer 10X
- ❖ Primers
- ❖ Agua ultra pura
- ❖ Papel toalla
- ❖ Papel Kleenex
- ❖ Botellas esterilizables de 500 ml
- ❖ Puntas blancas de micro-pipeta (0.2-10 μ l)
- ❖ Puntas amarillas de micro-pipeta (2-20 μ l y 20-200 μ l)
- ❖ Puntas azules de micro-pipeta (100-1000 μ l)
- ❖ Vidrio de reloj
- ❖ Juego de Micro-pipetas marca “CORNING” (0.2-10 μ l, 2- 20 μ l, 20-200 μ l y 100-1000 μ l)
- ❖ Tamices (criba de 475 μ m, 90 μ m y 25 μ m)
- ❖ Frascos chopp de vidrio (500 ml)
- ❖ Microtubos (0.6 ml y 1.5 ml)
- ❖ Papel parafilm
- ❖ Vasos de precipitación (50 ml, 250 ml y 500ml)
- ❖ Cajas petri
- ❖ Guantes quirúrgicos talla M
- ❖ Pipeta de 500 ml
- ❖ Tijeras quirúrgicas
- ❖ Frascos de vidrio tapa amarilla de 250 ml
- ❖ Embudos simples de vidrio
- ❖ Llave de paso metálica
- ❖ Kit de extracción de ADN, PureLink® Genomic DNA

- ❖ King B
- ❖ Quitina comercial
- ❖ Sulfato de magnesio heptahidratado
- ❖ Bacto™ Peptona
- ❖ Fosfato de Potasio dibásico
- ❖ Glicerol
- ❖ Azul de bromofenol
- ❖ Purpura de bromocresol

Equipos de Laboratorio

- ❖ Balanza de 0,001 gr
- ❖ Cámara de flujo Laminar
- ❖ Microscopio
- ❖ Microondas
- ❖ Nevera
- ❖ Vortex
- ❖ Destilador de agua
- ❖ Autoclave
- ❖ Estufa
- ❖ Centrifuga
- ❖ UV transluminador
- ❖ Incubadora
- ❖ Foto documentador
- ❖ Termociclador
- ❖ Fuente de poder
- ❖ Baño María
- ❖ Cubeta electroforética
- ❖ Bomba al vacío
- ❖ Espectrofotómetro MARCA “UNICO” modelo 1205

Materiales de Oficina

- ❖ Cuaderno
- ❖ Computador

- ❖ Lapicero
- ❖ Lápiz
- ❖ USB
- ❖ Pendrive
- ❖ Impresora
- ❖ Papel

Materiales de Campo

- ❖ Macetas plásticas
- ❖ Bomba a mochila
- ❖ Bomba a motor
- ❖ Machetes
- ❖ Botas
- ❖ Equipo de protección
- ❖ Cintas
- ❖ Etiqueta
- ❖ Marcadores
- ❖ Baldes
- ❖ Taladro
- ❖ Broca

3.6. Diseño de los experimentos

3.6.1. Experimento 1. Determinación de la viabilidad de las cepas PGPRs en distintos medios de cultivo

Para la evaluación de la viabilidad de las rizobacterias promotoras de crecimiento se utilizaron cinco cepas en cuatro medios de cultivos, se empleó el diseño completamente al azar DCA, para este experimento se establecieron dos diferentes factores en el cual el factor A representa los medios de cultivos a utilizar y el factor B está constituido por las diferentes cepas de las rizobacterias. Al realizar la combinación de los dos factores se establecieron 20 tratamientos con tres repeticiones. Todas las variables en estudio se sometieron a la prueba de rangos múltiples de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos.

Tabla 1. Tratamientos de viabilidad de cepas de rizobacterias PGPRs en distintos medios de cultivos alternativos.

Tratamientos	
1	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + BIO M3
2	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + PGPRS 4N
3	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + BIO IMPULSE
4	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + BIOQPGPRs
5	<i>Serratia Marcenses</i> 3-8 + BIO M3
6	<i>Serratia Marcenses</i> 3-8+ PGPRS 4N
7	<i>Serratia Marcenses</i> 3-8 + BIO IMPULSE
8	<i>Serratia Marcenses</i> 3-8 + BIOQPGPRs
9	<i>Pseudomonas veronii</i> R4 + BIO M3
10	<i>Pseudomonas veronii</i> R4 + PGPRS 4N
11	<i>Pseudomonas veronii</i> R4 + BIO IMPULSE
12	<i>Pseudomonas veronii</i> R4 + BIOQPGPRs
13	<i>Enterobacter asburiae</i> 3-14 + BIO M3
14	<i>Enterobacter asburiae</i> 3-14 + PGPRS 4N
15	<i>Enterobacter asburiae</i> 3-14 + BIO IMPULSE
16	<i>Enterobacter asburiae</i> 3-14 + BIOQPGPRs
17	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2-12 + BIO M3
18	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2-12+ PGPRS 4N
19	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2-12 + BIO IMPULSE
20	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2-12 + BIOQPGPRs

Tabla 2. Esquema del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	19
Error	40
Total	59

3.6.2. Experimento 2. Efecto del bio producto en base a PGPRs en el cultivo de cacao

Para la evaluación del comportamiento agronómico del cultivo de cacao se empleó el diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), estableciéndose cinco tratamientos en cuatro bloques y seis repeticiones. Todas las variables fueron sometidas a la prueba de rangos múltiples de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos.

Tabla 3. Tratamientos del consorcio PGPRs (R4, BMR 2-12, 3-8, CHA0, 3-14) para su aplicación en el cultivo de cacao.

Tratamientos	
1	Inyección BIOQPGPRs - concentración al 20%
2	Foliar BIOQPGPRs – concentración al 20%
3	Edáfico BIOQPGPRs – concentración al 20%
4	Químico (oxicloruro de cobre) - (Oxithane)
5	Testigo (agua)

Tabla 4. Esquema del análisis de la varianza

Fuentes de variación	Grados de libertad
Bloques	5
Tratamientos	4
Error experimental	20
Total	119

3.7. Características del área de investigación

Características	
Número de parcelas:	20
Número de plantas por parcela:	20
Número de planta para registro de datos	6
Área de la parcela	180 m²
Largo de parcela	15 m
Ancho de parcela	12 m
Área de parcela útil	54 m²
Forma de la parcela	Romboide
Área útil del ensayo:	1080
Área total del experimento:	3600 m²

3.8. Manejo del experimento

3.8.1. Evaluación de la viabilidad de rizobacterias PGPRs

Se seleccionaron cinco cepas PGPRs para el estudio procedentes del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la UTEQ. El crecimiento microbiano inició a partir del pre inóculo en medio de cultivo líquido King B (ver anexo 1), el crecimiento microbiano fue detenido en la fase exponencial definido por Rodríguez, (2019).

El pre inóculo se trasladó a un medio de cultivo M3 (Rodríguez, 2019), y tres medios en evaluación definido por el autor. El crecimiento bacteriano se desarrolló durante 48 horas en biofermentadores semi industriales de 50 lt, luego se procedió a realizar diluciones seriadas. Para el ensayo se empleó la técnica de la microgota y pH.

El conteo de microorganismos se lo hizo a las 24 horas después de su plaqueo, cada muestra fue plaqueada en el intervalo de cinco días hasta los 26 días. La cantidad de microorganismo se determinó con la fórmula: $UFC/ml = \text{Colonias enumeradas/ml sembrados} \times \text{Factor de dilución}$. Cada variable del tratamiento fue sometida al ANOVA. Los promedios fueron separados utilizando la prueba de rangos múltiples de Tukey ($P < 0.05$).

3.8.2. Medios de cultivo

Para el crecimiento bacteriano y determinar la viabilidad del producto se definieron tres medios de cultivo y uno definido por Rodríguez, (2019), (ver anexo 2).

BIO M3

Melaza: 5%(P/V)

Harina de maíz: 20g/l

Sal en grano: 0,50%

Glicerina: 15ml/l

pH inicial: 6,5

PGPRs 4N

Melaza: 5%(P/V)

Harina de maíz: 20g/l

Sal en grano: 0,50%

Glicerina: 15ml/l

Roca fosfórica: 1.5gr/lt

pH inicial: 6.5

BIOIMPULSE

Melaza: 5%(P/V)

Harina de maíz: 20g/l

Sal en grano: 0,50%

Glicerina: 15ml/l

Roca fosfórica: 1.5gr/lt

Fijador: 5 ml/1lt

pH inicial: 6.5

BIOQPGPRs

Melaza: 2.5%(P/V)

Harina de maíz: 20g/l

pH inicial: 6,5

Sal en grano: 0,50%

Glicerina: 15ml/l

Roca fosfórica: 1.5gr/lt

Jugo de raquis de banano:

160ml

pH inicial: 6,

3.8.3. Actividad quinolítica en las PGPRs en estudio

Se determinó la actividad quinolítica para cada una de las rizobacterias en estudio, la quitina coloidal se preparó con el método descrito por Berger y Reynolds, (1958). Primero, se añadieron 50 gramos de quitina en polvo a 120 ml de ácido clorhídrico a una concentración de (1.5 M), se hicieron reaccionar durante dos horas a 25 °C. Luego la mezcla se le añadió etanol al 50% y se agito constantemente. Posteriormente, la quitina coloidal se lavó varias veces con agua destilada hasta mantener un pH 7,0 y se mantuvo a cuatro °C en la oscuridad.

Para el estudio de degradación de quitina se realizó con la metodología de Moon et al., (2017), se seleccionaron 5 cepas de rizobacterias PGPRs y un control (*Escherichia coli*)

todas procedente del laboratorio de microbiología y biología molecular de la UTEQ. Las cepas con actividad quinolítica se caracterizaron después de la incubación en un medio de agar de quitina coloidal al 0,5% K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.05%, extracto de levadura 0.05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001%, $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.001 %, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, agar 1.5%, luego se incubó a 30 ° C durante 4 días. Para evaluar la actividad quinolítica, se rayó cuatro colonias de bacterias de las placas en medio de agar de quitina coloidal al 0,5% y nuevamente se incubaron a 30 ° C durante tres días para confirmar que se formaron zonas de degradación de quitina. Para la determinación de quitinasa se utilizó la metodología de Garrity, (2005), donde los valores se registraron de acuerdo a su presencia (+) o ausencia (-).

3.8.4. Inducción a la producción de enzima ureasa por parte de las PGPRs

Se procedió a realizar el crecimiento bacteriano siguiendo la metodología de Rodríguez, (2019). Luego del crecimiento bacteriano se tomó un ml del inoculo y se centrifugó a 13000 rpm durante cinco min. El sobrenadante fue descartado y se tomó el pellet para introducirlo en el medio de cultivo Christensen Agar (Dextrosa 1 gr, Agar bacteriológico 15 gr, Peptona de gelatina 1gr, Fosfato monopotásico dos gr, Rojo fenol 0.012 gr, Cloruro sódico 5 gr, ajustado a un pH de 7.2 a 25 °C). A las 72 horas se determinó la prueba ureasica de los microorganismos PGPRs en estudio. Para determinación de ureasa se utilizó la metodología de Holt *et al.*, (1994) los valores se registraron de acuerdo a su presencia (+) o ausencia (-).

3.8.5. Solubilización de potasio en las PGPRs en estudio

Se utilizó la metodología de Sheng (2005) para determinar la solubilización de potasio de las PGPRs, se empleó el medio de cultivo agar Aleksandrov el cual contenía: Sulfato de magnesio 0.500 gr, carbonato de calcio 0.100 gr, silicato de aluminio y potasio 2.000 gr, glucosa 5.000 gr, cloruro férrico 0.005 gr, fosfato de calcio 2.000 gr, agar 20.000 gr, con un pH final de 25 ° C 7.2 ± 0.2 . Cada cepa bacteriana se incubo en cajas petri de tres a cinco días, como indicativo de degradación el medio debía pasar de un color morado hacia amarillo. Para poder determinar la solubilización de potasio se utilizó la metodología de Holt *et al.*, (1994) donde los valores se registraron de acuerdo a su presencia (+) o ausencia (-).

3.8.6. Solubilización de fosfato en las PGPRs en estudio

Para determinar la capacidad fosfosolubilizante de las bacterias se recurrió a la metodología de Rodríguez y Fraga (1999). Se preparó un medio de cultivo agar Pikovskaya (PVK) para

cada litro de medio se empleó los siguientes reactivos: 10 g de glucosa; 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,2 g KCl; 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g de NaCl; 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,002 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 15 g de Bactoagar. Cada cepa bacteriana se incubó de tres a cinco días, como indicativo de degradación las bacterias convierten el medio de un color transparente a un amarillo el cual se intensifica más en los halos de crecimiento de las cepas. Para la determinación de solubilización de fosfato se realizó con la metodología de Holt *et al.*, (1994) donde los valores se registraron de acuerdo a su presencia (+) o ausencia (-).

3.8.7. Determinación por PCR la presencia del gen ChiA en las cepas PGPRs.

Las rizobacterias crecieron durante 24 horas en medio M3, luego se tomó un ml del cultivo bacteriano y se centrifugó a 13300 rpm por cinco minutos, después el pellet se recolectó para la extracción de DNA mediante el kit PureLink Genomic DNA (Life Technologies) (ver anexo 6). La cuantificación del DNA fue determinada por electroforesis en gel de agarosa al 1% por 10 minutos, luego se transfirió a un fotodocumentador e-gel imager de THERMO FISHER SCIENTIFIC. Para la determinación del gen ChiA se utilizó la metodología de Ramaiah *et al.* (2000), los cebadores corresponden a las regiones conservada de quitinasa (ChiA) usadas en *Serratia Marcenses* forward 5'-GATATCGACTGGGAGTTCCC-3' y reverse 5'-CATAGAAGTCGTAGGTCATC-3'. Para la preparación del Buffer se utilizaron los siguientes reactivos: 9.7 µl de agua ultra pura, 2µl de Buffer 10 x (Mg Cl +), 3 µl Buffer 10 x (Mg Cl -), 1 µl de forward ChiA, 1 µl reverse ChiA, 1 µl de dNTPs, 0.3 µl de Taq Polimerasa, 2 µl de DNA. El termociclador fue configurado de la siguiente manera: 94 °C durante cuatro min; 35 ciclos de desnaturalización a 92 °C; alineamiento a 58 °C; y extensión a 72 °C durante un minuto cada uno, seguido de una extensión de siete minutos a 72 °C. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Para identificar la presencia del gen ChiA la amplificación es de 225 bp.

3.9. Comportamiento agronómico del cultivo de cacao mediante aplicación de PGPRs

El crecimiento de PGPRs de forma masiva para las aplicaciones en las parcelas de *T. cacao* bajo estudio se desarrolló en el medio de cultivo de mayor concentración celular a las 24 horas de crecimiento definido en el experimento de viabilidad, donde se estableció que BIOQPGPRs fue el mejor bioformulado el cual se utilizó para la investigación de campo,

por lo que se procedió a mezclar las cinco bacterias de este estudio en un solo consorcio PGPRs.

Las aplicaciones de PGPRs se realizaron en diferentes formas de aplicación, en esto la concentración celular fue reducido a un 20% de su concentración total (800 ml H₂O en 200 ml consorcio bacteriano). Los tratamientos en estudio fueron: foliar, inyección, edáfico, químico (sin aplicación de bacterias), testigo (sin aplicación de bacterias) (ver anexo 4).

- a) Inyección. - Para aplicar este tratamiento se taladraron cuatro agujeros de cinco centímetros de profundidad y un centímetro de diámetro en distintas partes de la base del tallo, previamente la broca fue desinfectada, en cada agujero se adicionaron cinco ml del producto bacteriano mediante una jeringa de 10 ml y finalmente se selló con plastilina estéril.
- b) Edáfica. - La aplicación edáfica se realizó a una distancia de 80 cm de diámetro de la planta, cada planta recibió 300 ml del consorcio bacteriano.
- c) Foliar. - La aplicación foliar consistió en esparcir al área foliar de cada planta 300 ml del consorcio bacteriano mediante una bomba de fumigar a motor CENTURY 20 a una presión de 40 libras por pulgada cuadrada.
- d) Aplicación de pesticidas químicos. - El tratamiento químico se aplicó a razón de 3kg/ha de oxiclورو de cobre (Oxithane) con una bomba a motor al área foliar durante tres veces al año y el control absoluto se asperjo agua cada 30 días.

El lote de Cacao CCN-51 al momento de realizar la investigación tenía tres años de establecido, la distancia de siembra del cultivo es de tres por tres metros, para el manejo agronómico de la plantación se realizó control de maleza de forma mecánica y química así mismo se realizó podas de formación y mantenimiento del cultivo durante el tiempo que duro la investigación. La fertilización se realizó según la metodología de Iñiguez, (2007) se aplicaron 80 gr de N, 60 gr de P₂O₅, 45 gr de K₂O de manera fragmentada en cuatro ocasiones. El terreno presenta una topografía plana con precipitaciones variables durante el año.

3.10. Cojines florales

Para la evaluación de esta variable se contabilizo la aparición de los cojines florales tomando una sección del tronco de 50 cm todas en dirección al sol de 12 plantas por tratamiento.

3.11. Emisiones florales

Esta variable se procedió a contar las flores o emisiones florales presentes en los cojines de la planta, tomando en cuenta los tejidos foliares más jóvenes, se le realizo el conteo a 12 plantas por tratamiento

3.12. Incidencia de Cherele wilt o marchitez de chereles

Se realizó la evaluación cada mes en 12 plantas de cada tratamiento en estudio. Se determinó el porcentaje de incidencia usando la siguiente formula:

$$\frac{\text{Número de mazorcas dañadas}}{\text{Número de mazorcas sanas}} \times 100$$

3.13. Incidencia de *Phytophthora spp*

Se evaluó cada mes en 12 plantas cada tratamiento en estudio. Se determinó el porcentaje de incidencia con la formula siguiente:

$$\frac{\text{Número de mazorcas dañadas}}{\text{Número de mazorcas sanas}} \times 100$$

3.14. Incidencia de *Moniliophthora roreri*

Esta variable se evaluó cada mes en 12 plantas de cada tratamiento en estudio. Se determinó el porcentaje de incidencia con la formula siguiente:

$$\frac{\text{Número de mazorcas infectadas}}{\text{Número de mazorcas sanas}} \times 100$$

3.15. Cantidad de mazorcas maduras

Para la evaluación de esta variable se realizó un conteo del número de mazorcas maduras y sanas de 12 plantas por cada tratamiento, esto se realizó cada 15 días iniciada la producción.

3.16. Número de granos

Para evaluar el número de granos, se cosecho 12 mazorcas maduras de cada tratamiento, posterior a ello se procedió a abrir las mazorcas y contabilizar el número de granos que contenían.

3.17. Peso de mazorca

Se procedió a cosechar 12 mazorcas maduras de cacao por cada tratamiento, una vez cosechados se procedió a pesar en una balanza digital la cual expreso sus unidades de medida en gramos.

3.18. Rendimiento del cacao

Se realizó la cosecha del cacao de cada tratamiento de la investigación, se tomaron 100 mazorcas al azar por tratamiento, se contabilizo mil semillas para determinará el peso fresco de la semilla de cacao en cada tratamiento.

3.19. Clorofila total

Para la determinación de clorofila se utilizó el método de extracción con etanol al 96% (Wintermans y Motts, 1965) en discos foliares de 1.3 cm² tomados de la zona media de la tercera hoja emitida contando desde la hoja cigarro. La extracción se realizó macerando cada disco foliar en un mortero con 4.0 ml de la solución fría de etanol 96% + MgCO₃ (0.5 g l⁻¹) luego se traspasó el extracto a un tubo de ensayo, se procedió a lavar el mortero con otros 4.0 ml de la solución, completando así un volumen final de 8 ml. Se procedió a separar el extracto por centrifugación a 3000 rpm, durante cinco minutos, luego de obtener el extracto se realizó las lecturas de absorbancias a 665 y 649 nm en un espectrofotómetro MARCA “UNICO” modelo 1205. A partir de estos datos se calculó las concentraciones de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) y clorofila total (Clt), según las siguientes formulas:

$$Cla = [(13.7 \times A_{665}) - (5.76 \times A_{649})] \times V/PD$$

$$Clb = [(25.8 \times A_{649}) - (7.6 \times A_{665})] \times V/PD$$

$$Clt = [(6.10 \times A_{665}) + (20.04 \times A_{649})] \times V/PD$$
 Donde: V = volumen final extracto etanólico

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Viabilidad de las rizobacterias en los bioformulados

4.1.1.1. *Acinetobacter calcoaceticus* 2-12

La cepa *Acinetobacter calcoaceticus* 2-12 incrementa el desarrollo morfológico y fisiológicos de los cultivos, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Las UFC en los bioformulados fue variable. El bioformulado BIOQPGPRs mantuvo una mayor concentración celular con valores de 1.11×10^{10} , 1.6×10^8 , 4.37×10^7 y 3.2×10^6 , en los días 1,6,11 y 16 respectivamente. A los 21 días, se evidencio un decrecimiento celular, sin embargo, el bioformulado PGPRS-4N mantuvo una concentración celular con valores promedios inferiores a 1.0×10^6 . Finalmente, A los 26 días, el bioformulado BIOQPGPRs con un valor de 6.3×10^4 fue el tratamiento con mayor concentración de células (Figura 1A). El pH es uno de los factores importante dentro de la sobrevivencia del microorganismo, en los bioformulados en estudio el pH fue variable, El formulado BIO M3 mantuvo los valores de pH entre 5,10 y 4,12 entre los días 1 y 16 respectivamente. Del día 21 y 26 el bioformulado BIOQPGPRs incrementó los niveles de pH con valores de 4,34 a 4,43 (Figura 1B).

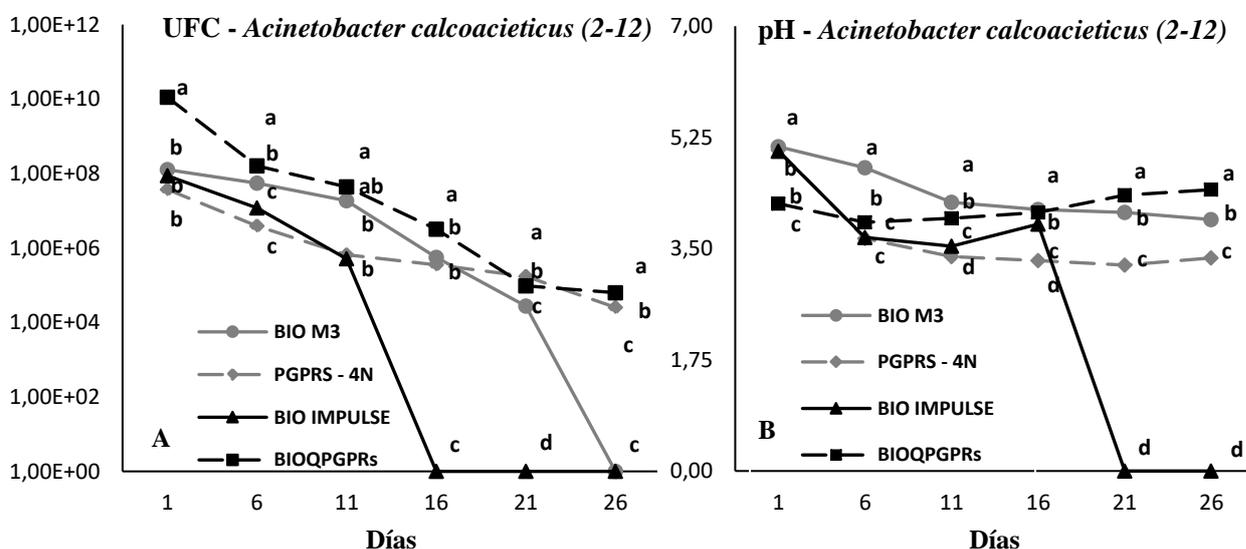


Figura 1. Evaluación de la viabilidad de *Acinetobacter calcoaceticus* 2-12 en diferentes bioformulados.

La figura **A.** indica las unidades formadoras de colonias (UFC), la Figura **B.** muestra los diferentes niveles pH. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.1.2. *Serratia Marcenses* 3-8

Los bioformulados de la cepa *Serratia Marcenses* 3-8 fue variable, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El bioformulado BIO-IMPULSE mantuvo una mayor concentración celular en el día 1, con valores superiores a 1.05×10^{10} . En los días 6 y 11, el bioformulado BIOQPGPRs evidenció una concentración celular de $2,57 \times 10^8$ y 6.07×10^7 siendo superior a los demás tratamientos. A los 16 días, bioformulado BIO IMPULSE a los 16 días decae su crecimiento. Finalmente, A los 21 y 26 días, el bioformulado BIOQPGPRs con valores de 2.10×10^5 y $1,63 \times 10^5$ fue el tratamiento con mayor crecimiento celular a mayores días (Figura 2A). El pH del bioformulado BIO M3 en la cepa *S. Marcenses* concentró los valores más altos con 4,86 y 3,98 entre el día 1 y 26 respectivamente (Figura 2B).

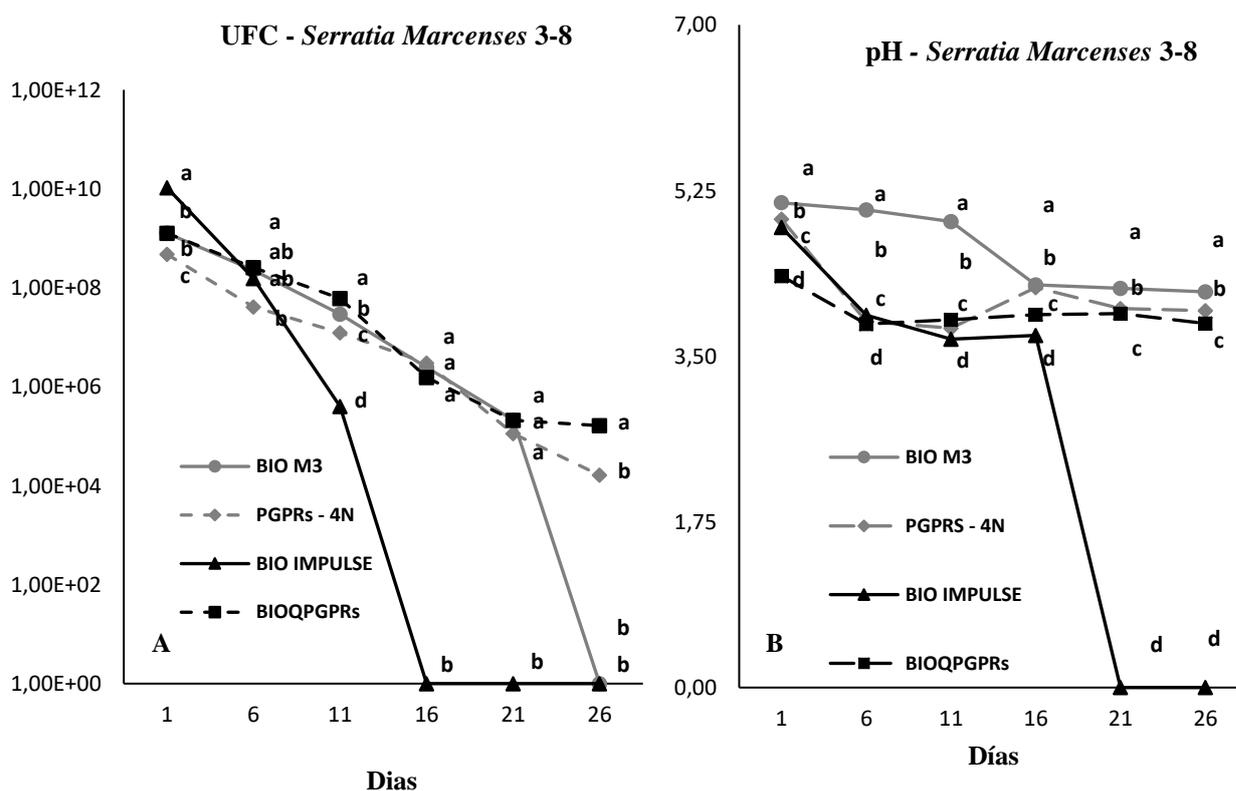


Figura 2. Evaluación de la viabilidad de *Serratia Marcenses* 3-8 en diferentes bioformulados.

La figura **A.** indica las unidades formadoras de colonias (UFC), la Figura **B.** muestra los diferentes niveles pH. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.1.3. *Enterobacter asburiae* 3-14

La cepa *Enterobacter asburiae* 3-14 es una cepa con capacidad adaptativa a los medios de cultivo alternativos, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. La concentración celular UFC/ml en los bioformulados en el día 1, el bioformulado BIOQPGPRs mantuvo una mayor concentración celular con valores de $6,17 \times 10^9$. A los 6 días, el bioformulado BIO M3 mantuvo una concentración celular con valores promedios a $3,5 \times 10^8$. Durante los días 11 y 16 el bioformulado BIOQPGPRs mantuvo valores entre $5,4 \times 10^7$ y $1,10 \times 10^7$, el bioformulado BIO M3 fue el tratamiento con mayor concentración de células con valores $2,63 \times 10^7$ durante los 21 días, (Figura 3A). Dentro del pH el formulado BIO M3 mantuvo los valores de pH entre 5,43 y 4,14 entre los días 1 y 16 respectivamente. Del día 21 y 26 el bioformulado BIOQPGPRs obtuvo niveles de pH con valores de 3,99 y 3,93 (Figura 3B).

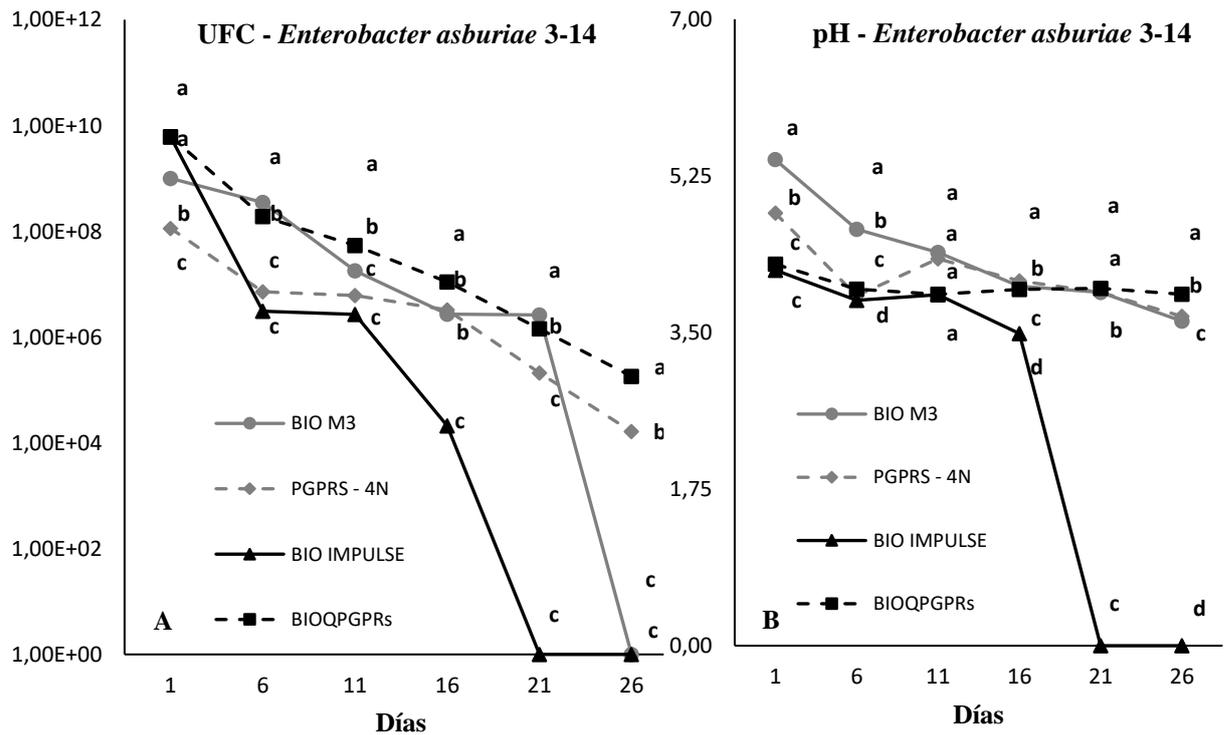


Figura 3. Evaluación de la viabilidad de *Enterobacter asburiae* 3-14 en diferentes bioformulados.

La figura **A.** indica las unidades formadoras de colonias (UFC), la Figura **B.** muestra los diferentes niveles pH. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0,05$ (prueba de Tukey).

4.1.1.4. *Pseudomonas protegens* CHA0

La cepa *Pseudomonas protegens* CHA0 incrementa el desarrollo radicular de las plantas, se observaron diferencias significativas entre tratamientos. El bioformulado BIOQPGPRs mantuvo una mayor concentración celular con valores de 7.87×10^{11} , 3.83×10^9 y 4.7×10^7 , en los días 1,6,11 respectivamente. A los 16 y 21 días, BIO M3 se evidenció un desarrollo celular con valores de 2.70×10^7 y $3,62 \times 10^6$, sin embargo, a los 26 días, el bioformulado BIOQPGPRs con valores superiores a 1.90×10^5 fue el tratamiento con mayor concentración de células (Figura 4A). El pH es uno de los factores importante dentro de la sobrevivencia del microorganismo, en los bioformulados en estudio el pH fue variable desde el día 1 y 21 mantuvo valores 5.04 y 4.10. Finalmente, el formulado BIOQPGPRs mantuvo los valores pH de 3.83 a los 26 días (Figura 4B).

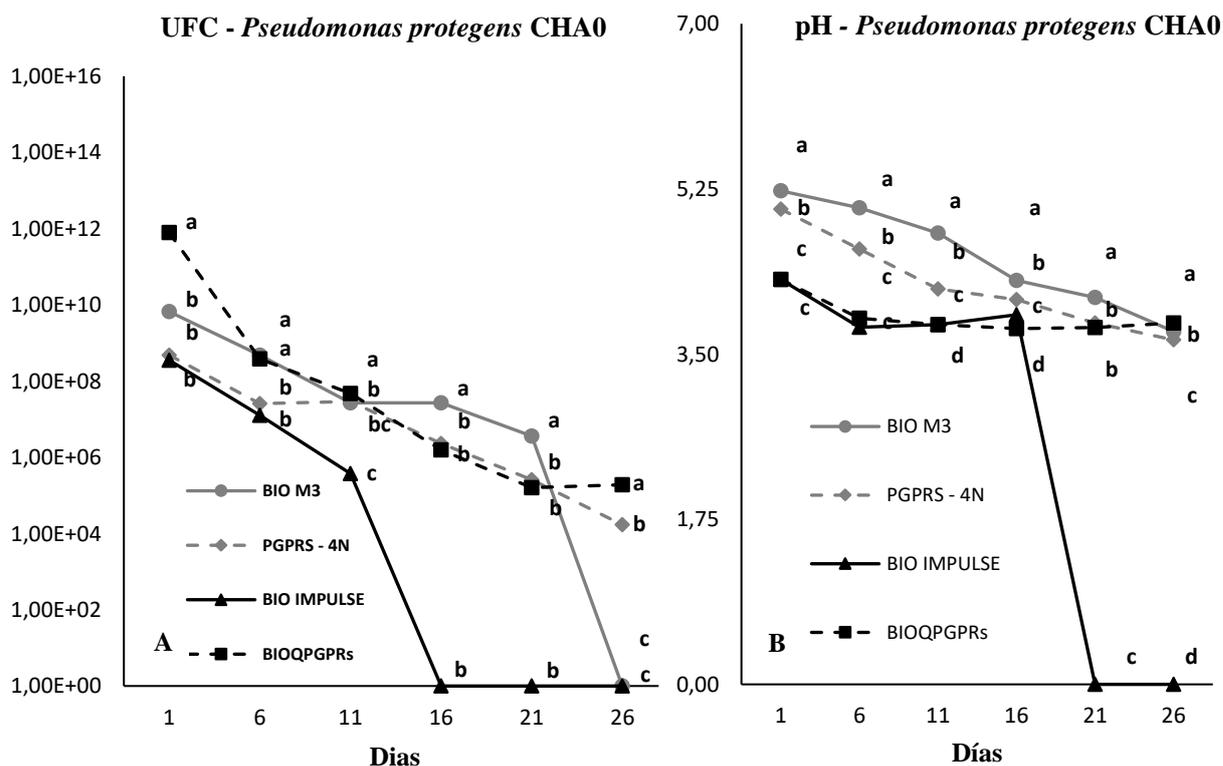


Figura 4. Evaluación de la viabilidad de *Pseudomonas protegens* CHA0 en diferentes bioformulados.

La figura **A.** indica las unidades formadoras de colonias (UFC), la Figura **B.** muestra los diferentes niveles pH. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.1.5. *Pseudomonas veronii* R4

Las UFC en los bioformulados la cepa *Pseudomonas veronii* R4 fue variable, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El bioformulado BIO IMPULSE en el día 1 mantuvo el mayor crecimiento celular con 1.05×10^{10} , el formulado BIOQPGPRs en los días 6 y 11 mantuvo concentración celular con valores de 2.57×10^8 y 6.07×10^7 , evidenciándose una caída del crecimiento celular en el día 16 del bioformulado BIO IMPULSE, el bioformulado BIOQPGPRs con valores de 1.27×10^9 y 1.63×10^5 fue el tratamiento con mayor concentración de células durante los 26 días (Figura 5A). El pH es uno de los factores importante dentro de la sobrevivencia del microorganismo, en los bioformulados en estudio el pH fue variable, El formulado BIOQPGPRs mantuvo los valores de pH entre 4,13 y 3,73 entre los días 1 y 26 respectivamente (Figura 5B).

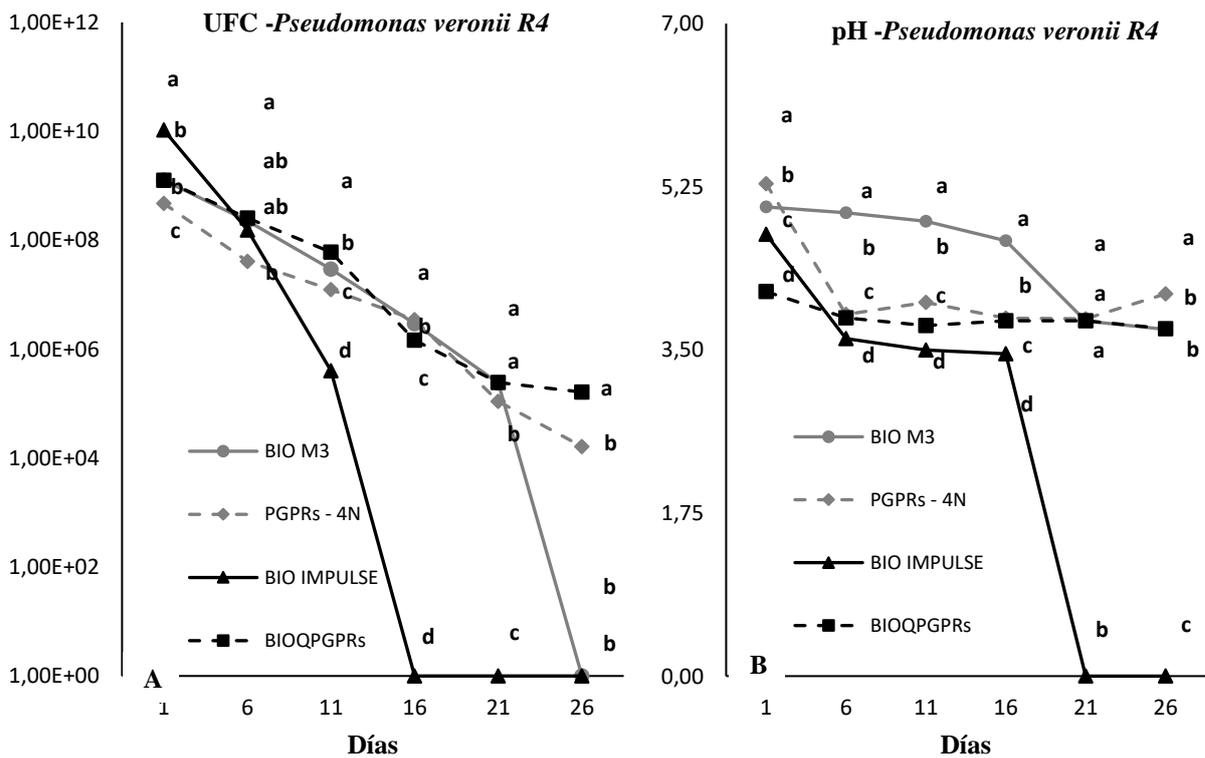


Figura 5. Evaluación de la viabilidad de *Pseudomonas veronii* R4 en diferentes bioformulados.

La figura **A.** indica las unidades formadoras de colonias (UFC), la Figura **B.** muestra los diferentes niveles pH. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.2. Pruebas bioquímicas

El uso de microorganismos PGPRs para la solubilización de minerales y componentes orgánicos ayuda a la disponibilidad de nutrientes en las plantas para su óptimo desarrollo. Dentro de las pruebas para degradación de quitina 2 cepas correspondiente a las especies *Serratia marcescens* 3/8 y *Acinetobacter calcoaceticus* BM2/12 tienen un mayor dominio catalítico en degradación en comparación a las demás cepas a las 168 horas. En la solubilización de minerales (N, P, K) cada cepa PGPRs solubiliza un elemento en común, sin embargo, la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* BM2/12 tiene la capacidad de solubilizar fósforo y potasio, a las 120 y a las 96 horas, finalmente la cepa *Pseudomonas protegens* CHAO solubiliza un gran contenido de nitrógeno y fósforo en diferencia a las demás cepas en 48 y 96 horas respectivamente, Tabla 5.

Tabla 5. Actividad quinolítica, ureasa, fosfatasa y ácidos orgánicos de las rizobacterias promotoras de crecimiento.

Nombre y número de especie	Sustrato			
	Quitina	Urea	Fósforo	Potasio
<i>Serratia marcescens</i> 3/8	++	+	+	++
<i>Enterobacter asburiae</i> 3/14	+	+	+	++
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BM2/12	++	+	++	++
<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0	+	++	++	+
<i>Pseudomonas veronii</i> R4	+	++	+	+

Los signos indican: (-) ausencia, (+) presencia, (++) mayor presencia.

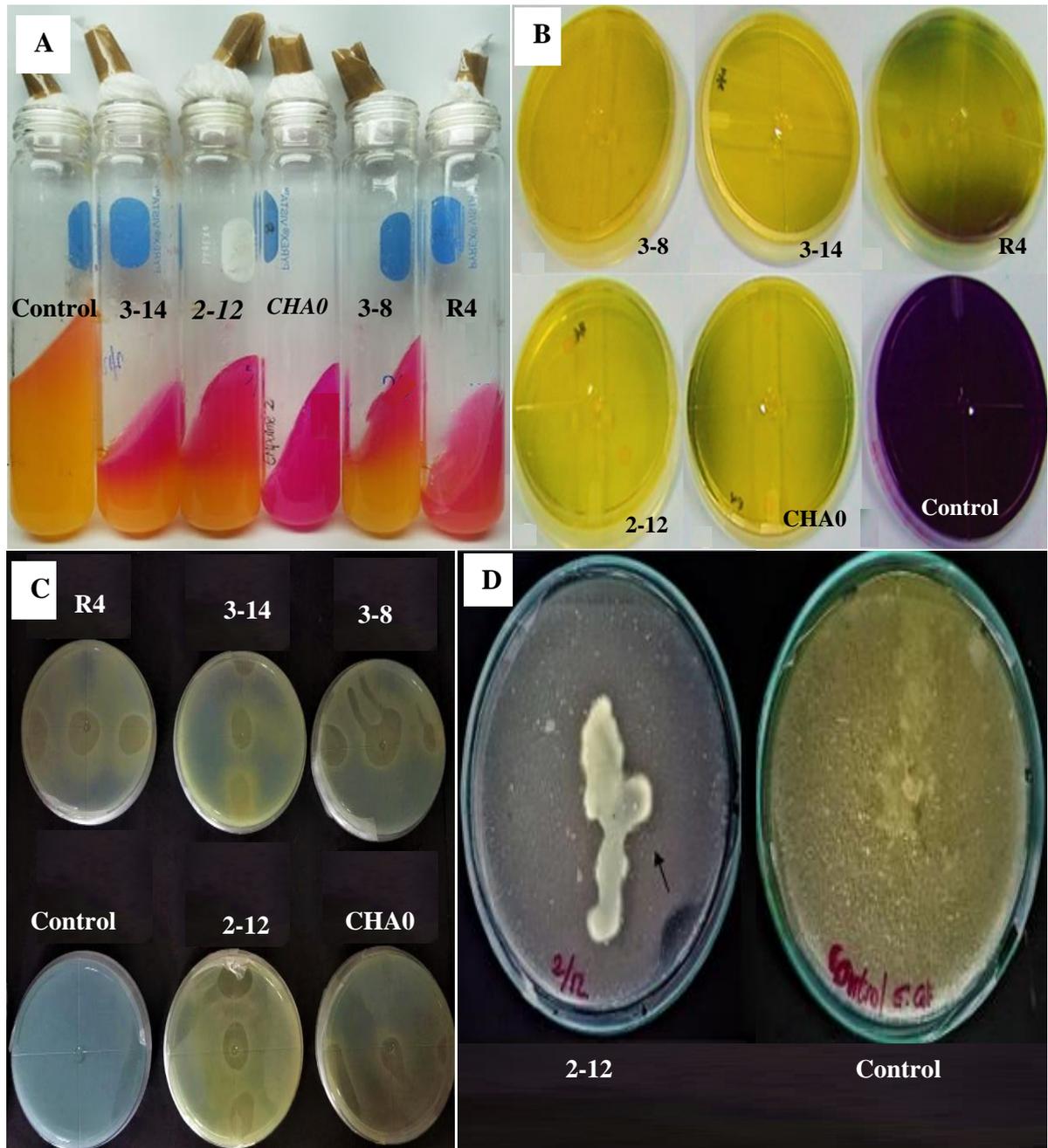


Figura 6. Pruebas bioquímicas de cepas PGPRs en estudio sobre la solubilización de minerales y componentes orgánicos.

Las letras en mayúscula de cada figura indica una actividad realizada por las cepas bacterianas en estudio: **A.** solubilización de urea, a mayor intensidad del color rosa indica más degradación **B.** solubilización de potasio, el medio de cultivo tiene un color morado mientras más amarillo se vuelve indica más degradación, **C.** solubilización de fosforo, el medio de cultivo cambia a un color amarillo lo que indica la actividad degradadora por parte de las cepas **D.** Quitina, la cepa de rizobacterias forman un halo de degradación a medida que se desarrolla.

4.1.3. Detección del gen ChiA en las PGPRs mediante PCR

El gen ChiA tiene mayor presencia en la enzima quitinasa para la degradación de quitina. Dentro del estudio, la presencia del gen fue identificada en diferentes cepas de las de rizobacterias promotoras de crecimiento tales como: *Serratia marcescens* 3/8, *Acinetobacter calcoaceticus* BM2/12, *Pseudomonas veronii* R4 y *Enterobacter asburiae* 3/14 siendo tres de ellas nativas del Ecuador y una nativa de Chile. La cepa CHA0 y *E. coli* no amplificó los 225 pares de base pb correspondiente al gen en estudio por lo que nos lleva a deducir que dicha cepa no presenta el gen estudiado dentro de su estructura génica (Figura 7).

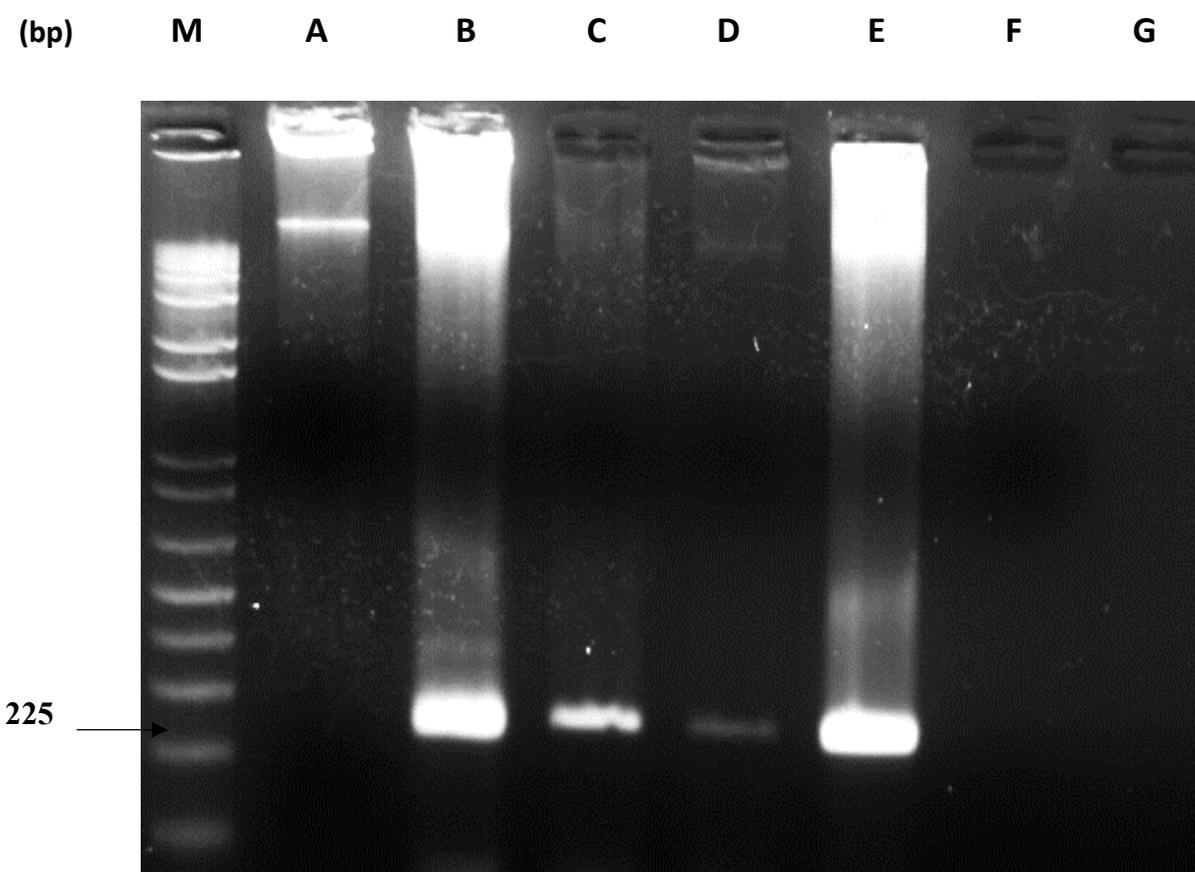


Figura 7. La amplificación del gen ChiA corresponde a 225 bp,

En la figura de la amplificación de las bandas del gen ChiA realizadas mediante la extracción de ADN las letras en mayúsculas indican las cepas utilizadas en la investigación: **A.** *Pseudomonas protegens* CHA0 **B.** *Serratia marcescens* 3/8 **C.** *Acinetobacter calcoaceticus* BM2-12 **D.** *Pseudomonas veronii* R4 **E.** *Enterobacter asburiae* 3-14 **F.** control (*E. coli*) **G.** control (agua), **M.** marcador molecular 100 bp.

4.1.4. Análisis morfológico

4.1.4.1. Cojines florales

La evaluación de los cojines florales se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca, no se observaron diferencias significativas para esta variable. De acuerdo a los datos de la viabilidad el mejor bioformulado fue el BIOQPGPRs el cual fue aplicado en la investigación de campo. En la valoración realizada en la época lluviosa para los tratamientos en estudio, existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados vía foliar con BIOQPGPRs y edáfico con BIOQPGPRS con medias de 25,2 y 25,0 cojines florales cada uno, el tratamiento control obtuvo una media de 20,3 cojines florales, sin embargo, no existieron diferencias estadísticas entre ellos. En la época seca se realizó otra evaluación, resultando diferencias estadísticas entre tratamientos, siendo el tratamiento químico aplicado mediante la vía foliar con oxithane el mayor, con 19 cojines florales, y el menor fue el tratamiento control con 14,3 cojines florales (Figura 8).

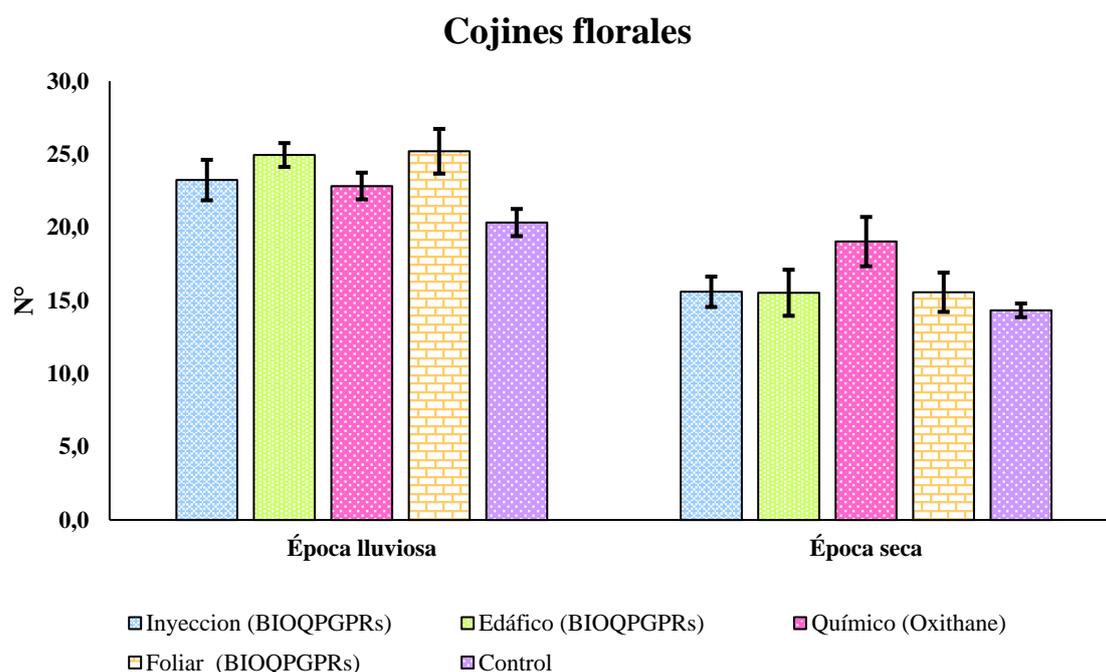


Figura 8. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la formación de cojines florales.

Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en una plantación de *Theobroma cacao* L. CCN51 durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Las barras indican el error estándar.

4.1.4.2.Emisiones foliares

La evaluación de las emisiones foliares se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca, se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos. En la época lluviosa los tratamientos aplicados vía inyección con BIOQPGPRs y edáfico con BIOQPGPRs obtuvieron los mayores promedios de emisiones foliares con 107,9 y 99,6 respectivamente, el tratamiento que presentó menores promedios de emisiones foliares fue el químico aplicado vía foliar con Oxithane teniendo una media de 72,9 respectivamente. Durante la época seca la cantidad de emisiones foliares decayeron, el mejor tratamiento fue el aplicado por vía foliar con BIOQPGPRs teniendo un promedio de 61,0 emisiones foliares; el tratamiento control presentó el promedio más bajo durante esta época con una media de 34,8 (Figura 9).

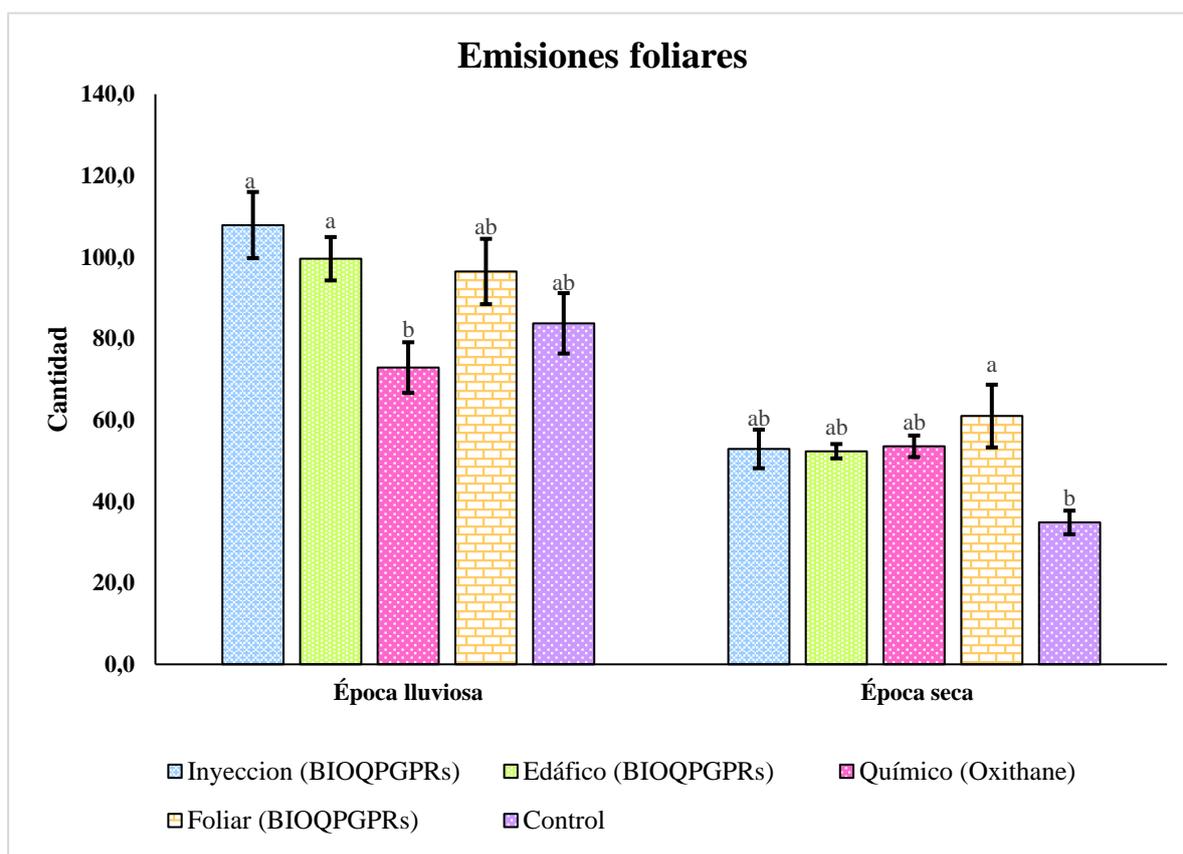


Figura 9. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la emisión foliar

Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en una plantación de *Theobroma cacao* L. CCN51 durante dos épocas del año: lluviosa y seca Las barras indican el error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.4.3. Incidencia de Cherelle wilt o marchitez de cereales

La evaluación de la incidencia de Cherelle wilt o marchitez de cereales se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca. En la época lluviosa y entre los tratamientos se observaron diferencias significativas. Los tratamientos aplicados vía foliar con BIOQPGPRs y la de inyección con BIOQPGPRs presentaron la menor incidencia de la patología, con promedios de 2,8 y 3,1 respectivamente. El tratamiento que presentó alta incidencia de Cherelle wilt fue el tratamiento control realizado a base de agua con un promedio de 10,1 cereales afectados. Durante la época seca, el mejor tratamiento fue el de vía inyección con BIOQPGPRs, con un promedio de 3,8 cereales afectados; mientras que el tratamiento realizado vía foliar con BIOQPGPRs presentó el promedio más alto de incidencia de cereales afectados durante esta época con una media de 11,4 (Figura 10)

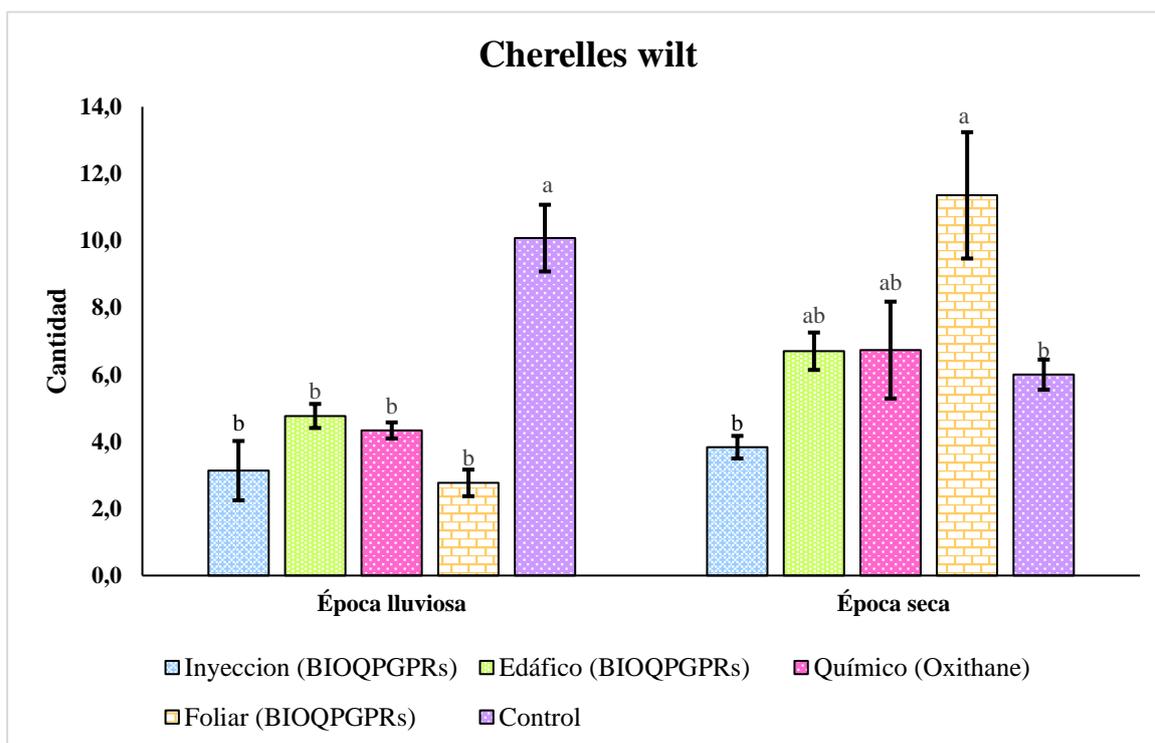


Figura 10. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la incidencia de Cherelle wilt.

Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en una plantación de *Theobroma cacao* L. CCN51 durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Las barras indican el error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0,05$ (prueba de Tukey).

4.1.5. Incidencia de *Phytophthora spp*

La evaluación de la incidencia de *Phytophthora spp* se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca. En la época lluviosa, se observan diferencias significativas, el tratamiento químico aplicado mediante vía foliar con oxithane presentó la menor incidencia de *Phytophthora spp*, con un promedio de 2,7 %, mientras que el tratamiento que presentó la más alta incidencia del hongo fue el realizado vía inyección con BIOQPGPRs alcanzando un promedio de 8.3 %. En la evaluación realizada durante la época seca, el mejor tratamiento fue el aplicado vía inyección con BIOQPGPRs el cual presentó 0,0 % de incidencia de *Phytophthora spp*; mientras que el tratamiento control presentó el promedio más alto de incidencia de *Phytophthora spp* durante esta época con 9,7 % (Figura 11).

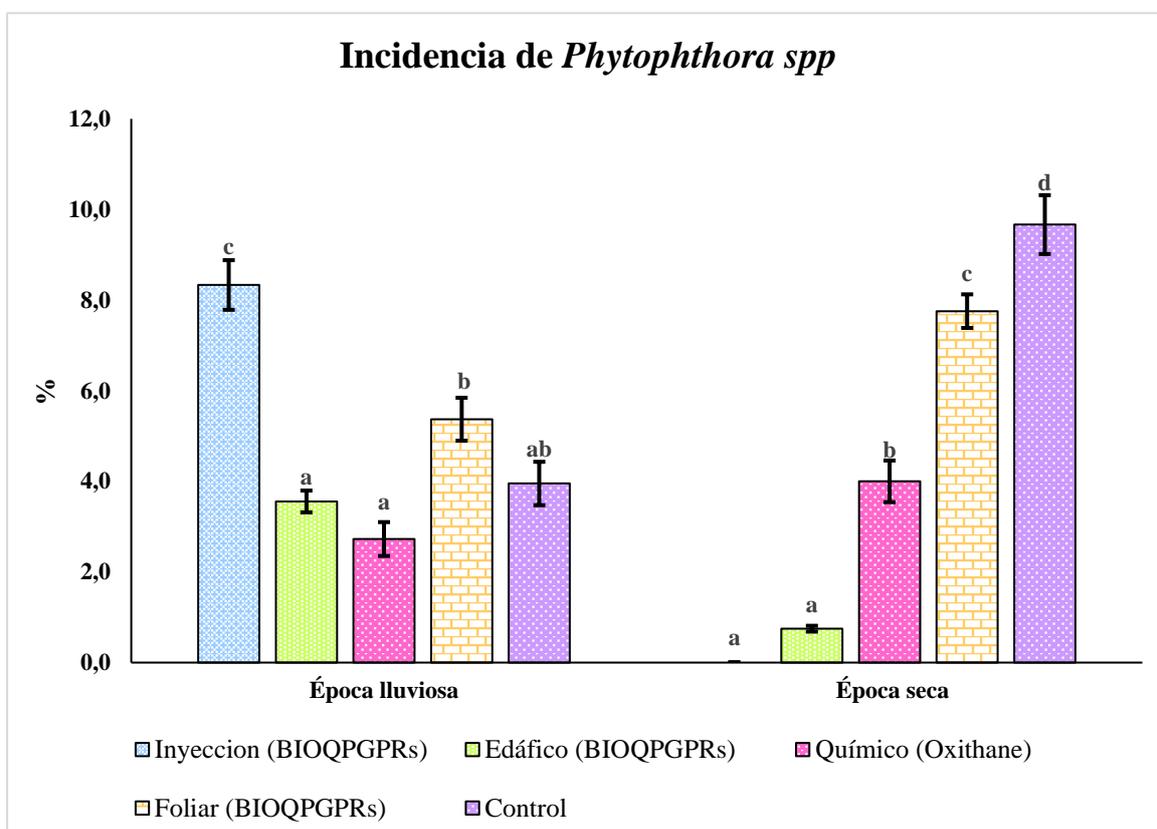


Figura 11. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la incidencia de *Phytophthora spp*

Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en una plantación de *Theobroma cacao L. CCN51* durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Las barras indican el error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.6. Incidencia de *Moniliophthora roreri*

La evaluación de la incidencia de *M. roreri* se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca. En la época lluviosa, entre los tratamientos se muestra diferencias significativas. El tratamiento químico aplicado mediante la vía foliar con oxithane presentó la menor incidencia de *M. roreri*, con un promedio de 3,6 %. El tratamiento que presentó la más alta incidencia fue el aplicado mediante la vía de inyección con BIOQPGPRs, con un promedio de 30,7 %. En la evaluación realizada durante la época seca, el mejor tratamiento fue el aplicado vía inyección con BIOQPGPRs, el cual presentó un promedio de 20,9 % de incidencia de *M. roreri*; el tratamiento control realizado a base de agua presentó el promedio más alto de incidencia de *M. roreri* durante esta época con 40,9 % (Figura 12).

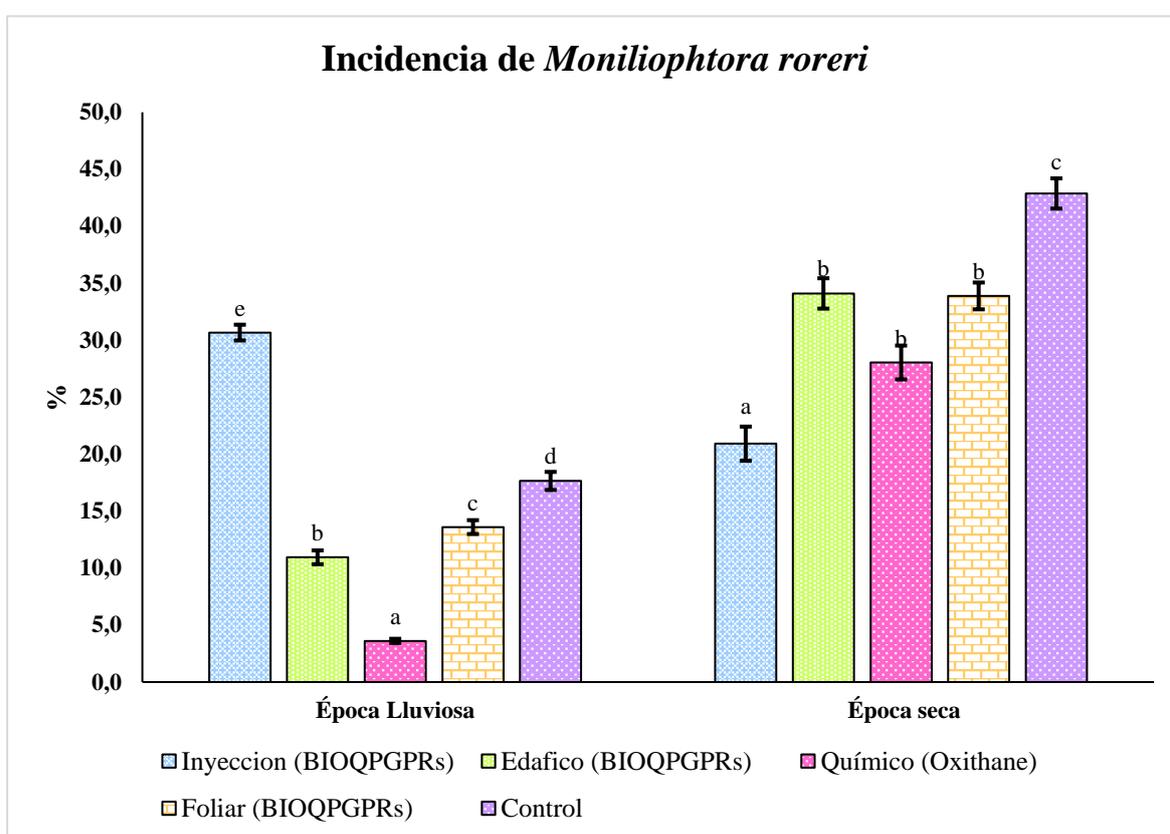


Figura 12. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la incidencia de *Moniliophthora roreri*.

Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en una plantación de *Theobroma cacao* L. CCN51 durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Las barras indican el error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.7. Cantidad de mazorcas maduras

La evaluación de la cantidad de mazorcas maduras se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca, se observa diferencia significativa entre tratamientos de la época seca. En la valoración realizada en la época lluviosa para los tratamientos en estudios existió diferencias matemáticas entre los tratamientos, siendo el aplicado vía edáfico con BIOQPGPRs el mayor con un promedio de 1,4 mazorcas maduras y el tratamiento control realizado a base de agua el menor con un promedio de 0,77 mazorcas maduras, sin embargo, no existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudios. En la época seca se realizó otra evaluación, resultando el tratamiento aplicado por la vía edáfico con BIOQPGPRs el mayor, con un promedio de 10,53 mazorcas maduras, y el menor fue el tratamiento control con 4,2 mazorcas maduras, se observan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de esta época (Figura 13).

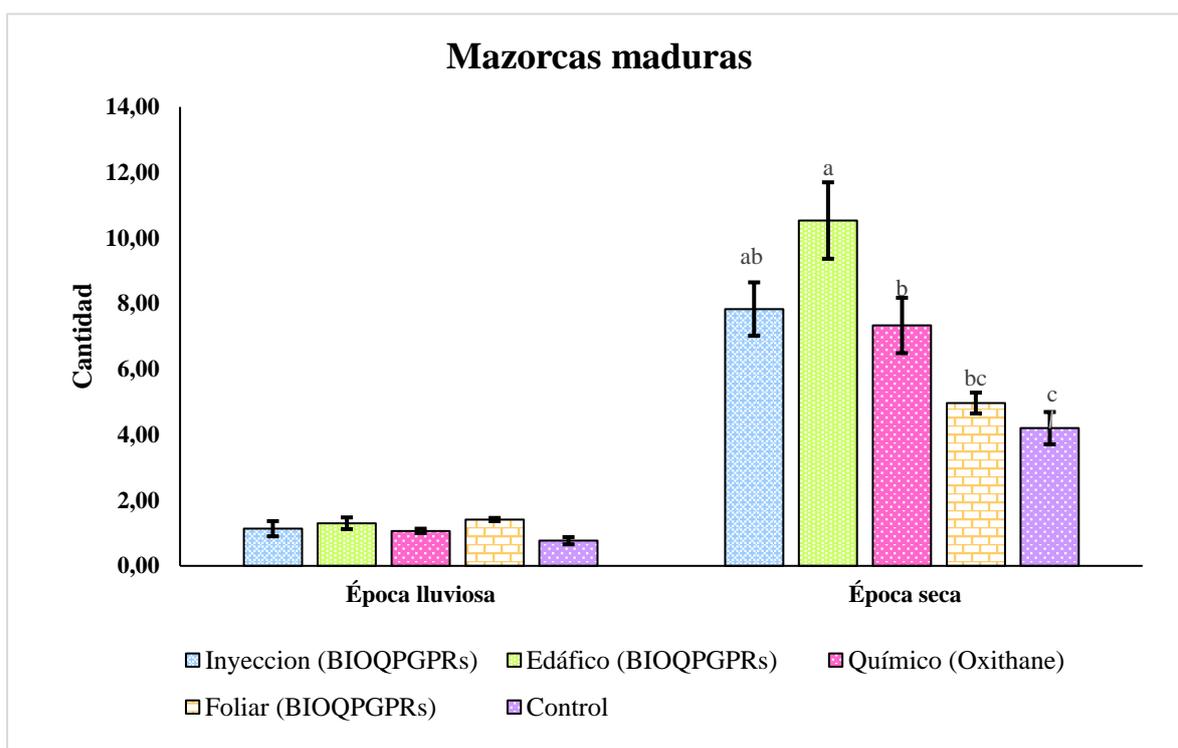


Figura 13. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la cantidad de mazorcas maduras.

Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en plantación de *Theobroma cacao* L. CCN51 durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Las barras indican el error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.8. Número de granos

La evaluación del número de granos se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Los resultados obtenidos en la época lluviosa mostraron diferencias significativas, el tratamiento químico aplicado por la vía foliar con oxithane obtuvo los promedios mayores con 44,97 granos por mazorca, mientras que el tratamiento aplicado vía inyección con BIOQPGPRs obtuvo el menor promedio de granos por mazorca con 36,81. En la época seca se realizó otra evaluación observándose diferencias significativas, el tratamiento aplicado por la vía edáfica con BIOQPGPRs obtuvo el mayor promedio con 50,99 granos por mazorca, y el menor fue el tratamiento control con 36,44 granos por mazorca (Figura 14).

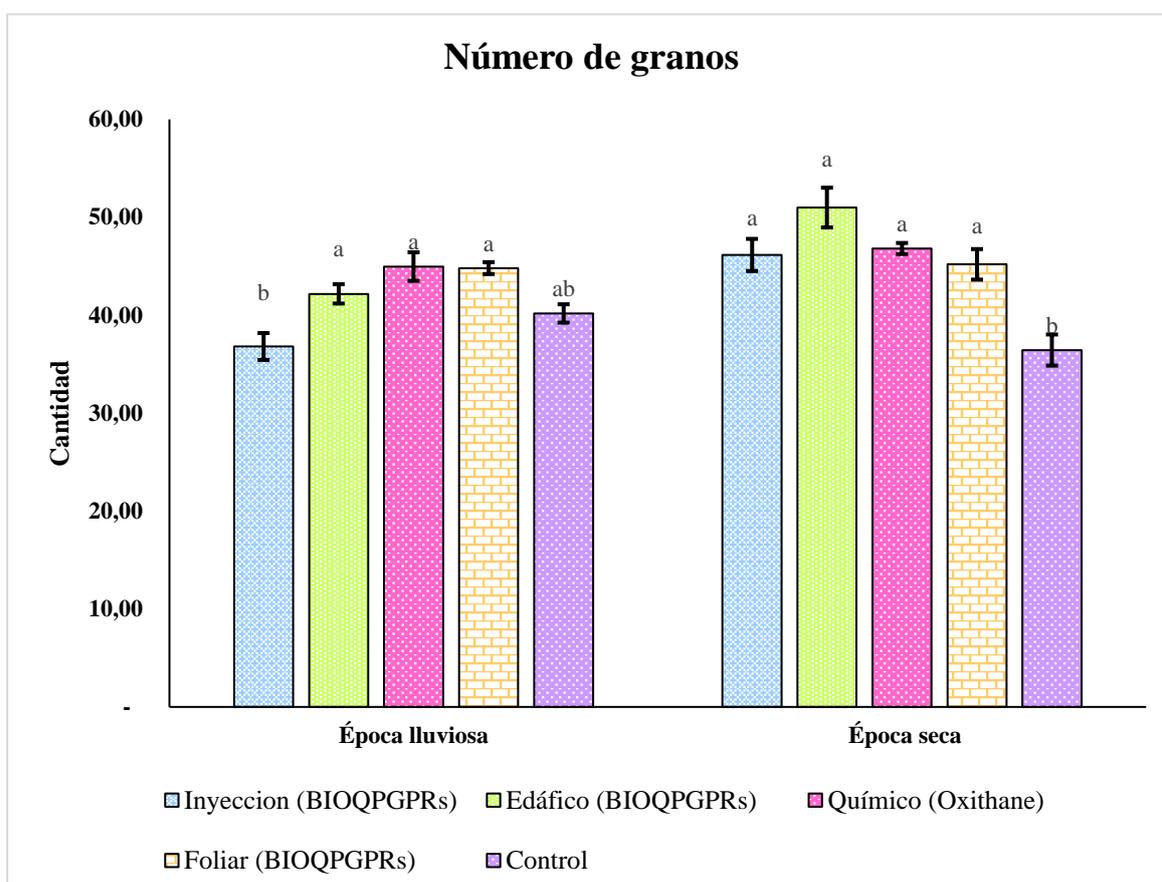


Figura 14. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en los números de granos por mazorca.

Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en una plantación de *Theobroma cacao* L. CCN51 durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Las barras indican el error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.9. Peso de mazorca

La evaluación del peso de las mazorcas se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca. En la valoración realizada en la época lluviosa no se muestran diferencias significativas. El tratamiento aplicado por la vía foliar con BIOQPGPRs obtuvo el mayor promedio con 694 gramos de peso de mazorca, el tratamiento aplicado vía inyección con BIOQPGPRs alcanzó el menor promedio con 638 gramos en peso de mazorca, sin embargo, no existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudios. En la época seca se observan diferencias significativas, siendo el tratamiento aplicado vía inyección con BIOQPGPRs el de mayor promedio respecto al peso de mazorca, con 844 gramos, y el de menor promedio fue el tratamiento aplicado vía foliar con BIOQPGPRs con 573 gramos en peso de mazorca (Figura 15).

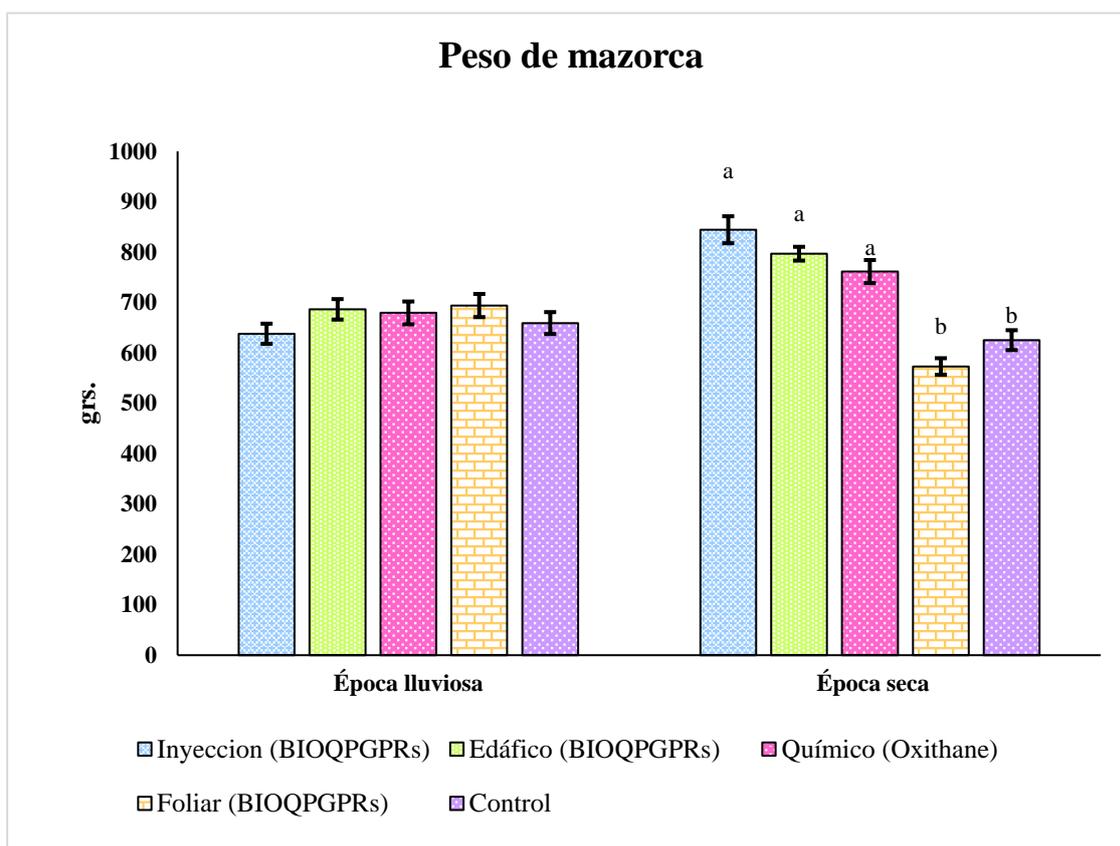


Figura 15. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en el peso de las mazorcas. Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en una plantación de *Theobroma cacao* L. CCN51 durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Las barras indican el error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.10. Rendimiento del cacao

La evaluación del rendimiento del cacao se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca, se observan diferencia significativa entre los tratamientos. En la valoración realizada en la época lluviosa, el tratamiento aplicado por la vía edáfica con BIOQPGPRs obtuvo el promedio más alto con 157,31 Kg de cacao y el tratamiento control obtuvo el menor rendimiento con 60,7 Kg. En la época seca se realizó otra evaluación, obteniendo como resultado que el tratamiento aplicado por la vía edáfica logro obtener el mayor promedio con 1270,63 Kg de cacao, y el tratamiento con menor promedio fue el control con 473 Kg de cacao, se observan diferencias estadísticas de entre los tratamientos evaluados en ambas épocas del año (Figura 16).

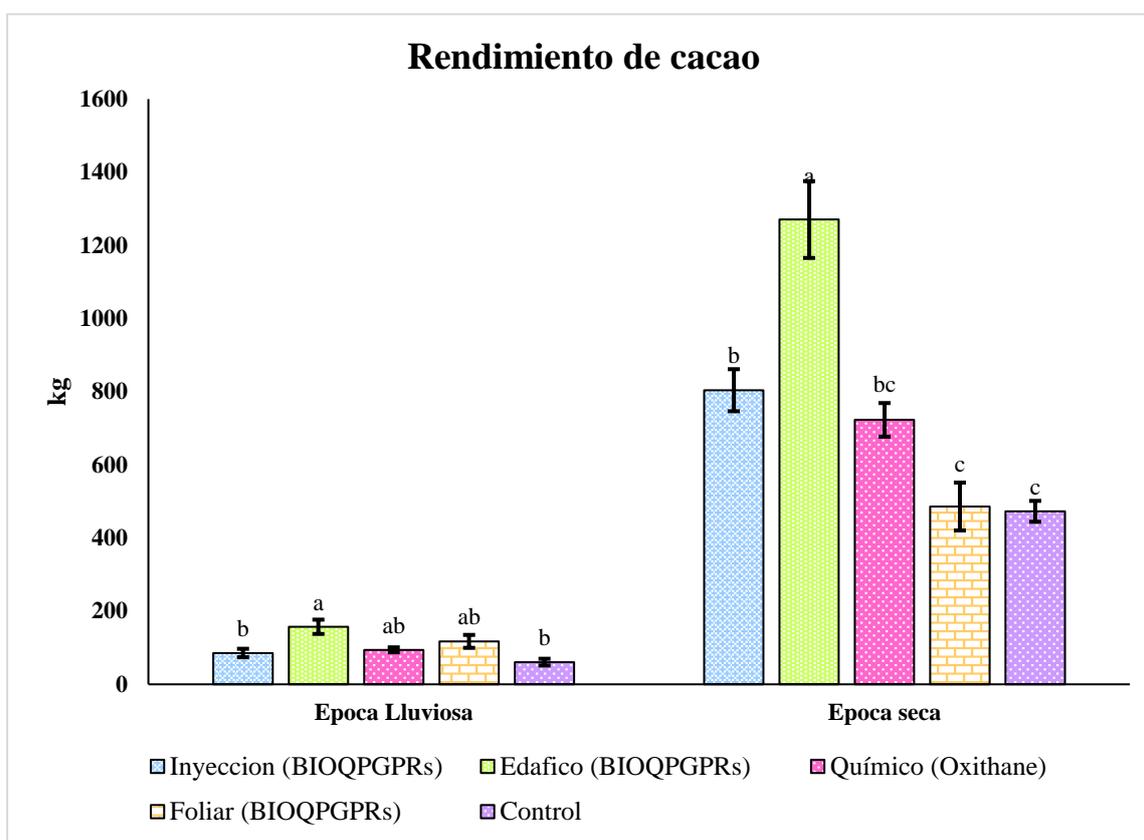


Figura 16. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en el rendimiento del cacao.

Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en una plantación de *Theobroma cacao* L. CCN51 durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Las barras indican el error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.11. Clorofila total

La evaluación de la clorofila total se realizó durante dos épocas del año: lluviosa y seca, se observaron diferencia significativa entre los tratamientos. La valoración realizada en la época lluviosa en la cual se observan diferencias estadísticas entre sus tratamientos, el tratamiento químico aplicado por la vía foliar con oxithane obtuvo el mayor promedio con 18,55 mg/cm² de clorofila total, el tratamiento control obtuvo el menor de los promedios con 7,93 mg/cm². En la época seca se realizó otra evaluación, el tratamiento aplicado por la vía foliar con BIOQPGPRs alcanzo el mayor promedio con 11,36 mg/cm², y el que obtuvo menor promedio fue el tratamiento control con 6,78 mg/cm² de clorofila total, para la época seca se observan diferencias estadísticas entre los tratamientos (Figura 17).

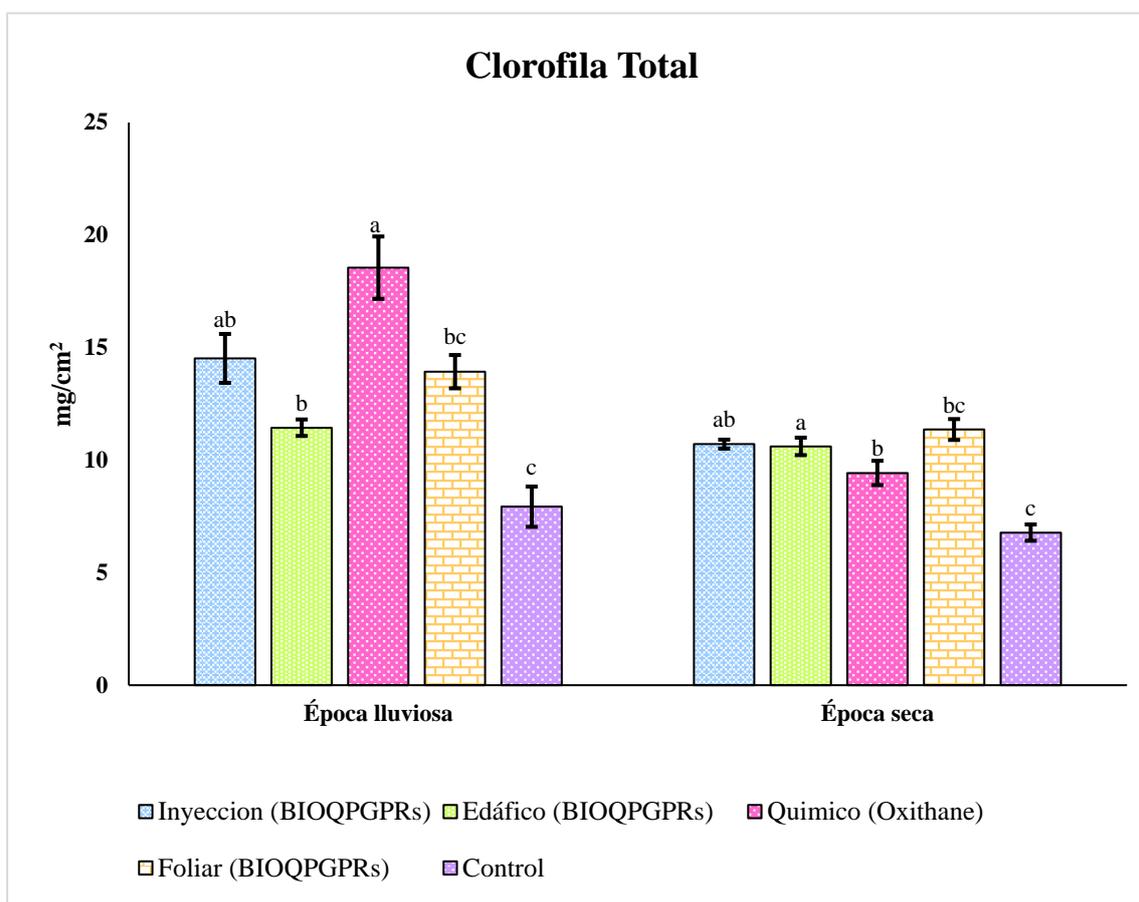


Figura 17. Efecto de la aplicación del bioformulado BIOQPGPRs en la clorofila total.

Aplicación de BIOQPGPRs a base de PGPRs bajo distintos métodos, en una plantación de *Theobroma cacao* L. CCN51 durante dos épocas del año: lluviosa y seca. Las barras indican el error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.2. Discusión

4.2.1. Viabilidad de las rizobacterias en los diferentes bioformulados

El medio BIOQPGPRs se destacó en cada bacteria utilizada pues las UFC se mantenían estables hasta los 26 días, de igual manera sucedió con el pH. Este contexto, Feijoo (2016) manifestó que los componentes utilizados en la producción del medio permiten brindar nutrientes a los microorganismos, mientras que Vanegas y Ramírez (2016) concluyeron que las concentraciones de melaza entre 1 y 4% (P/V) en *Pseudomonas* sp promueven el crecimiento y producción de polihidroxicanoatos de cadena media, pero que en concentraciones mayores al 4% (P/V) se lograba inestabilidad en las fases de crecimiento incluso una baja concentración celular, esto debido a la presencia de componentes como los fenoles por lo que se lograba inestabilidad en las fases de crecimiento.

Rodríguez (2018) dice que de acuerdo a los resultados obtenidos en su investigación respecto a la concentración celular hallada en los medios de cultivos alternativos se estableció que a mayores concentraciones de melaza como fuente de carbono la concentración celular aumenta de manera significativa, esto difiere de la investigación ya que el medio con mejor viabilidad fue BIOQPGPRs que contenía el 2,5 % de melaza, pero se mantiene en la media establecida por Vanegas y Ramírez (2016) para lograr un crecimiento bacteriano.

El uso de diferentes fuentes comerciales de sustancias minerales es una alternativa para obtener medios de cultivos a escalas industriales que permitan el adecuado crecimiento de microorganismos a bajo costo, según Guerra y Zúñiga (2018) al modificar el medio sintético LMC por fuentes comerciales de sacarosa y glutamato para producción de *Pseudomonas* sp. Encontraron hasta un 48% de concentración celular más respecto al medio control LMC.

El uso de la melaza como fuente de carbono no debe ser muy excesiva, de acuerdo a Fajardo y Sarmiento (2007) al evaluar diferentes concentraciones para producción de *Lactobacillus plantarum* determinaron que solo hasta de un 25% de melaza (p/v) usada como fuente de carbono propiciaba a una alta producción de biomasa ya que concentraciones mayores a esto se reflejaba en una menor cantidad de UFC/ml. Esto es porque las bacterias alcanzan la fase estacionaria más rápido, antes de consumir todo el sustrato, lo que hace que el microorganismo no produzca más biomasa, por el estado de saturación del medio.

4.2.2. Actividad quinolítica, ureasa, fosfatasa y ácidos orgánicos de las PGPRs

Varios agentes de control biológico producen enzimas que hidrolizan la quitina, la proteína, la celulosa y la hemicelulosa, que contribuyen directamente a la inhibición de los patógenos vegetales (Nega, 2014; Vinale *et al.*, 2008). *S. marcescens* es una de las bacterias con mayor capacidad quinolítica hasta ahora conocidas (Ruíz *et al.*, 2003). A lo largo de los años, se han estudiado varias especies bacterianas que producen quitinasa para diversas aplicaciones, incluidas *Serratia*, *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Streptomyces* y *Bacillus* (Islam *et al.*, 2012), sin embargo, en la investigación, la bacteria *P. protegens* CHA0 no presentó el gen ChiA, esto concuerda con Ramaiah *et al.* (2000) donde identificó que las cepas *Alteromonas* sp. cepa O-7, *Pseudomonas* *siringae* y *putida* no están ligadas a la expresión del gen ChiA por no tener dominio catalítico a compuestos quinolíticos.

Cuando no existe presencia del Gen ChiA, incrementa la presencia de genes ChiB, ChiC, ChiD y tres N-acetilglucosaminidasas (glucanasasA, glucanasasB y glucanasasC que se producen en presencia de quitina (Ramaiah *et al.*, 2000; Chernin *et al.* 1997; Downing y Thomson, 2000). El uso de microorganismos PGPRs para la solubilización de minerales y componentes orgánicos ayuda a la disponibilidad de nutrientes en las plantas para su óptimo desarrollo. Dentro de las pruebas para degradación de quitina las cepas *S. marcescens* 3/8 y *A. calcoaceticus* BM2/12 tienen un mayor dominio catalítico en degradación en comparación a las demás cepas a las 168 horas. Las bacterias quitinolíticas de los géneros *Aeromonas* y *Serratia* son agentes potenciales como agentes de control biológico de varios hongos fitopatógenos (Chernin *et al.*, 1995). Los genes que codifican ChiA, ChiB y ChiC de *Serratia marcescens* se han clonado y expresado en *E. coli* BL21, respectivamente (Danismazoglu *et al.*, 2015).

En la solubilización de minerales (N, P, K). la cepa *calcoaceticus* BM2/12 y CHA0 tiene la capacidad de solubilizar fósforo y potasio, a las 120 horas y 96 horas, esto coincide con Antoun y Prevost (2005), quienes indican que además de su potencial para reducir directamente la incidencia de enfermedades, algunos productos microbianos también tienen otros efectos positivos en los cultivos, como promover el crecimiento y la nutrición de las plantas (biofertilizantes y fitoestimuladores). Una gran cantidad de nutrientes presentes en el suelo se encuentran en una forma insoluble que no está disponible para los cultivos. Los

biofertilizantes actúan a través de la mejora directa de la nutrición de las plantas, ya sea solubilizando estos nutrientes o fijando N² atmosférico. En el caso de la solubilización, pueden estar involucrados varios mecanismos.

Dependiendo de la naturaleza del nutriente. Por ejemplo, el fosfato puede ser liberado de formas orgánicas insolubles por varias enzimas microbianas como fitasas o fosfatasas inespecíficas, mientras que las reservas de fósforo inorgánico se solubilizan mediante la producción de ácidos orgánicos por las bacterias beneficiosas. La fitoestimulación es la promoción directa del crecimiento de la planta a través de la modulación del equilibrio hormonal de la planta. Varios microorganismos son capaces de producir y excretar una variedad de compuestos similares a las hormonas vegetales, incluidas auxinas, giberelinas, citoquininas, etc. Algunos agentes microbianos producen enzimas que degradan un precursor del etileno, lo que limita los niveles de esta hormona en la planta, lo que aumenta especialmente el crecimiento de la planta. en condiciones de estrés (Francis *et al.* , 2010).

Tanto la biofertilización como la fitoestimulación son fenómenos importantes en el contexto de la necesidad constante de producir más alimentos en menos superficies con la idea de reducir la dependencia de fertilizantes químicos. Bent (2006) señala que un microorganismo que posee una combinación de estas actividades promotoras del crecimiento y potencial de biocontrol ofrece la ventaja de suministrar al cultivo en una sola aplicación un biopesticida y un biofertilizante. Además, una mejor nutrición de la planta a menudo mejora su resistencia general contra patógenos y otros factores de estrés. Según observado en esta investigación, donde las respuestas fisiológicas de *T. cacao* hacia la aplicación de bioformulados con las bacterias anteriormente descritas fueron altas.

4.2.3. Determinación de la presencia del gen ChiA mediante PCR

Se determinó mediante PCR la presencia del gen ChiA en *S. marcenses* 3/8, *A. calcoaceticus* BM2/12, *P. veronii* R4 y *E. asburiae* 3/14 mediante la amplificación de 250 pb específicos para el gen. *P. protegens* CHA0 no evidenció la presencia del gen. La presencia del gen ChiA en bacterias del género *Serratia* es confirmada por Rahmi (2018), quien evidenció que *S. plymuthica* UBCF_01 produce enzimas quitinasa, una de las cuales es la quitinasa A (ChiA), siendo esta un tipo de quitinasa que juega un papel importante en la degradación de la quitina, la cepa UBCF_01 es utilizada como un agente de control biológico para el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la antracnosis en varios tipos de plantas.

4.2.4. Aplicación en campo del bioformulado BIOQPGPRs

El bioformulado BIOQPGPRs tuvo los mejores resultados en las distintas variables agronómicas y de rendimiento en el cultivo, además de disminuir la incidencia de enfermedades comunes como Cherville wilt, escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), monilla (*M. roreri*) y mazorca negra (*Phytophthora* spp.), esto corrobora a Valencia y Valencia (2008) que indica que la acción de una PGPR genera un efecto antagónico frente a hongos patógenos. Según Kokalis. *et al.* (2006) el concepto de introducir PGPRs en la rizosfera se basa en el establecimiento en el medio ambiente de poblaciones estables de microorganismos las cuales producirán efectos benéficos para la plantación, elevando las cualidades agronómicas como crecimiento, floración, producción, resistencia a factores bióticos y abióticos. Schippers *et al.* (1987) manifiesta que las cepas de biocontrol aplicadas en diversos cultivos ayuda a suprimir el establecimiento de patógenos que pueden causar daño a la planta y generar reducciones en la producción.

Dentro de los rendimientos en el cultivo de cacao, la aplicación edáfica de bioformulados BIOQPGPRs logró un mayor promedio con 1270,53 Kg/Ha de cacao, equivalente a 27,97 quintales este rendimiento es muy efectivo tomando en cuenta la media nacional de producción del cacao en el Ecuador, según Lema (2015) en país el cacao tiene en general un rendimiento de 4 a 6 quintales por hectárea al año por el predominio de plantaciones viejas y mal manejadas; sin embargo, usando material adecuado y buen manejo va de 20 a 30 quintales o más, de acuerdo al suelo, las condiciones de cultivo y material empleado. Una plantación bien manejada y en buen terreno puede tener una vida útil de más de 20 años y se puede prolongar aún más con una rehabilitación del suelo.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Las cinco cepas de rizobacterias utilizadas en la presente investigación mostraron viabilidad en el crecimiento de UFC hasta los 26 días en el bioformulado BIOQPGPRs.
- Tras la aplicación de los bioformulados el cultivo de cacao CCN51, BIOQPGPRs respondió con las mejores características agronómicas logrando los más altos promedios en cuanto a, emisiones florales con 107,9 unidades, numero de mazorcas maduras 10,53 unidades, numero de granos 50,99 unidades, peso de mazorca con 844 gramos, entre otras.
- El gen ChiA estuvo presente en diversas cepas bacterianas tales como *Serratia marcescens* 3/8, *Acinetobacter calcoaceticus* BM2/12, *Pseudomonas veronii* R4 y *Enterobacter asburiae* 3/14.

5.2. Recomendaciones

- Identificar nuevas cepas de rizobacterias que sean procedentes o nativas de la zona con la finalidad de ser usadas para nuevos estudios.
- Incentivar más estudios sobre rizobacterias biocontroladoras con capacidad antagonista a diversos patógenos que atacan los cultivos y dañan la producción y rendimiento.
- Realizar la búsqueda de diversos genes presentes en las rizobacterias para ampliar el conocimiento sobre que producen y cómo estas actúan en beneficio de la planta.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- Acebo-Guerrero, y., Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., El Jaziri, M., y Hernández-Lauzardo, A. (2012). Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. *Fruits*, 67(1), 41-48.
- Aguilera, L., Zapata, J., y De la Cruz, E. (2011). Aislamiento e identificación de microorganismos en biopelículas provenientes del Castillo de Chapultepec, Ciudad de México. *Nexo Revista Científica*, 24(2), 83-91.
- Aguirre-Medina, J., Mendoza-Lopez, A., Cadena-Iniguez, J., y Avendano-Arrazate, C. (2007). Effect of cocoa (*Theobroma cacao* L.) biofertilization in nursery with *Azospirillum brasilense* Tarrand, krieg et dobereiner AND *Glomus intraradices* Schenk et Smith. *Interciencia*, 32(8), 541-546.
- Aime M, Phillips-Mora W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97(1), 1012– 1022.
- Al-Mughrabi, K. (2010). Biological control of *Fusarium* dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. *Biological Control*, 53(3), 280-284.
- Alves, A., Crous, P., Correia, A., y Phillips, A. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal diversity*, 28(1), 1-13.
- Amaíz, L., Vargas, R., Medina, L., Izzeddin, N., y Valbuena, O. (2015). Evaluación del efecto antagonista de un consorcio bacteriano sobre *Rhizoctonia solani* Kühn en cultivos de arroz. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 6(1), 1-12.
- Antoun, Hani, y Prévost, Danielle. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Pp. 1-38 en *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Springer.
- Bent, Elizabeth. 2006. Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). Pp. 225-58 en *Multigenic and induced systemic resistance in plants*. Springer.

- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*, 17(8), 478-486. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001.
- Berger, L. R., & Reynold, D. M. (1958). The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochimica et biophysica acta*, 29(3), 522-534.
- Bharucha, U., Patel, K., y Trivedi, U. (2013). Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural research*, 2(3), 215-221.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A., y Gupta, R. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical reviews in biotechnology*, 27(1), 21-28.
- Bi, C., Zhang, X., Ingram, L., y Preston, J. (2009). Genetic engineering of *Enterobacter asburiae* strain JDR-1 for efficient production of ethanol from hemicellulose hydrolysates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(18), 5743-5749.
- Braun, R. (2010). Comportamento conformacional da urease de *Canavalia ensiformis*. Tesis de Doctorado, Universidad de federal do Rio Grande do Sul, 54-56.
- Brenner, D., McWhorter, A., Kai, A., Steigerwalt, A. G., y Farmer, J. J. (1986). *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. *Journal of clinical microbiology*, 23(6), 1114-1120.
- Bric J, Bostock R, Silverstone SE (1991) Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl Environ Microbiol* 57:535– 538
- CABI. (2016). *Crop Protection Compendium. Global module 7nd. Edition* CAB International. UNK 3(9), 89-96.
- Celis-Tarazona, R., Florida-Rofner, N., y Rengifo-Rojas, A. (2020). Impacto sobre indicadores físicos y químicos del suelo con manejo convencional de coca y cacao. *CIENCIA UNEMI*, 13(33), 1-9.
- Chang, J., y Baquerizo, A. G. (2015). Comportamiento agronómico, calidad física y sensorial de 21 líneas híbridas de cacao (*Theobroma cacao* L.). *La Técnica*, (15), 26-37.

- Chernin, Leonid, Ismailov, Zafar, Haran, Shoshan, y Chet, Ilan. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5):1720-26.
- Chernin, Leonid S., De La Fuente, Leonardo, Sobolev, Vladimir, Haran, Shoshan, Vorgias, Constantin E., Oppenheim, Amos B., y Chet, Ilan. 1997. Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Applied and environmental microbiology* 63(3):834-39.
- Cortés-Patiño, S., Vesga-Ayala, N., Sigarroa-Rieche, A., Moreno-Rozo, L., y Cárdenas-Caro, D. (2015). Sustratos inoculados con microorganismos para el desarrollo de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en etapa de vivero. *Bioagro*, 27(3), 151-158.
- Contreras, L., y Riaño, A. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Monilophthora roreri*. *Acta agronómica*, 62(4), 370-378.
- Creus, C., Sueldo, R., y Barassi, C. (2004). Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany*, 82(2), 273-281.
- Danismazoglu, Mehtap, Demir, İsmail, Sezen, Kazım, Muratoğlu, Hacer, y Nalçacıoğlu, Remziye. 2015. Cloning and expression of chitinase A, B, and C (*chiA*, *chiB*, *chiC*) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. *Turkish Journal of Biology* 39(1):78-87. doi: 10.3906/biy-1404-31.
- De Freitas, J., Banerjee, M., y Germida, J.(1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 24(4), 358-364.
- Diaz Mora, C. (2007). Cinética bacteriana de cinco cepas degradadoras de hidrocarburos y su consorcio, en diferentes condiciones de PH y temperatura, a nivel de laboratorio y biofermentador para la producción piloto semindustrial. PEPDA, Petroproducción, campo Sacha, Ecuador 2007 (Bachelor's thesis, SANGOLQUÍ/ESPE/2007), 24-25.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy*. Springer, Berlin, Heidelberg, 9(2), 283-293.

- Downing, Katrina J., y Thomson, Jennifer A. 2000. Introduction of the *Serratia marcescens* *chiA* gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi. *Canadian journal of microbiology* 46(4):363-69.
- ESPAC., (2018). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua.
- Ekin Z., (2010) Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in the presence of phosphorus fertilizer. *Afr. J. Biotech*, 9(25), 3794–3800.
- Enríquez, G. (2010). Cacao orgánico guía para productores ecuatorianos (No. F08 20). Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
- Fajardo, E., & Sarmiento, S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universidad Pontificia Javeriana*, (Tesis doctoral), 24–25.
- Francis, Isolde, Holsters, Marcelle, y Vereecke, Danny. 2010. The Gram-positive side of plant-microbe interactions: Minireview. *Environmental Microbiology* 12(1):1-12. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01989.x.
- Franzen, M., y Mulder, M. (2007). Ecological, economic and social perspectives on cocoa production worldwide. *Biodiversity and Conservation*, 16(13), 3835-3849.
- Friedrich S., Platonova N., Karavaiko G., Stichel E., Glombitza F., (1991). Chemical and microbiological solubilization of silicates. *Acta Biotechnol.*, 11: 187–196.
- Garrity, G. M. (2005). Systematic bacteriology. *The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics*, 2.
- Guerra Lopez, M., & Zúñiga Dávila, D. (2018). Producción de *Pseudomonas* sp. LMTK32 en medio modificado para peletizar semillas de maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Revista Peruana de Biología*, 25(2), 161.
- Holt J, Krieng N, Sneath P, Staley J, Williams S (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edn. Williams and Wilkins Publishers, Baltimore.

- Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21.
- Islam, Rezuanul, Jeong, Yong Tae, Lee, Yong Se, y Song, Chi Hyun. 2012. Isolation and identification of Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 Inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40(1):59-66. doi: 10.5941/MYCO.2012.40.1.059.
- Joseph, B., Patra, R., Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicerarietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, 2: 141-152.
- Kang, S., Khan, A., Hamayun, M., Shinwari, Z., Kim, y. H., Joo, G., y Lee, I. (2012). *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. *Pak. J. Bot.*, 44(1), 365-372.
- Keel, C., y Défago, G. (1997). Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. *Multitrophic interactions in terrestrial system*, 27-47.
- Khan, A., Park, G., Asaf, S., Hong, S., Jung, B., y Shin, J. (2017). Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PloS one*, 12(2), 171-184.
- Khan, A., Ullah, I., Khan, A., Park, G., Waqas, M., Hong, S., y Shin, J. (2015). Improvement in phytoremediation potential of *Solanum nigrum* under cadmium contamination through endophytic-assisted *Serratia* sp. RSC-14 inoculation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 14032-14042.
- Krauss, U., ten Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, J., y Sánchez, V. (2003). Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*, 10(37-38), 52-58.
- Kuddus, M., y Ahmad, I. (2013). Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1), 39-46.

- Landry, B. (1993). DNA mapping in plants. In *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press.
- Lema Martínez, J. O. (2015). "*Zazagan*"; *Centro de Acopio de Cacao CCN-51 en Carrizal Ciudad de Milagro* (Master's thesis, Espol).
- López, S., Pastorino, G., y Balatti, P. (2010). Ensayo de biocidas sobre microorganismos presentes en formulados comerciales. *CIC digital*, 5(2), 20.
- Martínez, H., Rosero, N., Álvarez, A., Morante-Carriel, J., Malagón, G., y Jaramillo, M. (2015). Aplicación de Rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas spp* como controladores biológicos de insectos y nemátodos-plagas. *Revista Ciencia y Tecnología*, 8(1), 25-30.
- Meyer, J., Azelvandre, P., y Georges, C. (1992). Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *BioFactors* (Oxford, England), 4(1), 23-27.
- Moon, C., Seo, D. J., Song, Y. S., Hong, S. H., Choi, S. H., & Jung, W. J. (2017). Antifungal activity and patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide degradation via chitinase produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. *Microbial pathogenesis*, 113, 218-224.
- Morrissey, J., Dow, J., Mark, G., y O'Gara, F. (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production? *EMBO reports*, 5(10), 922-926.
- Nega, Alemu. 2014. Review on Concepts in Biological Control of Plant Pathogens. 4(27):33-55.
- París Ripoll, X. (2009). Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeatos.
- Patten, C., y Glick, B. (2002). Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Canadian journal of microbiology*, 48(7), 635-642.
- Paulson K, Kurtz L. (1969). Locus of urease activity in soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 33: 897-901
- Peñafiel Jaramillo, M., Barrera Álvarez, A. E., Torres Navarrete, E. D., Canchignia Martínez, H. F., Prieto-Encalada, H., & Morante Carriel, J. (2016). Producción de

- ácido indol-3-acético por *Pseudomonas veronii* R4 y formación de raíces en hojas de vid “Thompson seedless” in vitro. *Ciencia Y Tecnología*, 9(1), 31-36.
- Phillips, A., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M., Groenewald, J., y Crous, P. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in mycology*, 76, 51-167.
- Rahmi, Ulfa Nadiatur. 2018. Ekspresi dan analisis fungsional gen chiA dari *Serratia plymuthica* strain UBCF_01 ke dalam *Escherichia coli* BL21. Doctoral Thesis, Univeritas Andalas.
- Reséndez, A. M., Mendoza, V. C., Carrillo, J. L. R., Arroyo, J. V., & Ríos, P. C. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83.
- Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319–339.
- Rodríguez, Jorge. 2018. Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia *Meloidogyne incognita* «in vitro». Tesis, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- Ruíz, Alejandro, Cruz, Ramón, Salcedo, Rubén, y Barboza, J. 2003. *Serratia marcescens*: de patógeno oportunista al control de insectos que afectan cultivos agrícolas. *BioTecnología* 8(January 2003):31-37.
- Sacherer, P., Défago, G., y Haas, D. (1994). Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiology Letters*, 116(2), 155-160.
- Scarpari, L, Meinhardt L, Mazzafera P, Pomella A, Schiavinato M, Cascardo J. (2005). Biochemical changes during the development of witches’ broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *Journal of Experimental Botany* 56:865–877.
- Sharifi-Tehrani, A., Zala, M., Natsch, A., Moënné-Loccoz, y., y Défago, G. (1998). Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *pseudomonas* with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *European Journal of Plant Pathology*, 104(7), 631-643.

- Setiawati, A., Handayanto, E., (2010). Role of phosphate solubilizing bacteria on availability phosphorus in Oxisols and tracing of phosphate in corn by using. In: 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, Brisbane, Australia.
- Sheng, X., 2005, Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1918-1922.
- Sheng X., Huang W.Y., (2002). Mechanism of potassium release from feldspar affected by the strain NBT of silicate bacterium. *Acta Pedol. Sin.*, 39: 863–871.
- Silva S, Luz E, Almeida O, Gramacho K, Bezerra J. (2002). Redescricao da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero. *Agrotropica* 1:1–23.
- SIPA, (2018). Superficie y producción INEC Continua. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/sipa-estadisticas/estadisticas-productivas>.
- Stutz, E., Défago, G., y Kern, H. (1986). Naturally Occurring *Pseudomonas Fluorescens* involved in suppression. *Phytopathology*, 76, 181-185.
- Systematic bacteriology. The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics, 4(1), 65-75.
- Ullman W., Kirchman D.L., Welch S., (1996). Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chem. Geol.*, 132: 11–17.
- Valencia, Ana, y Valencia, Victoria. 2008. Desarrollo de una formulación con base en rizobacterias para la promoción del crecimiento del banano. Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Vanegas, Diana M., y Ramírez, Margarita E. 2016. Correlación del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la producción de polihidroxicanoatos de cadena media (PHAMCL) mediante modelos primarios de Gompertz, logístico y baranyi. *Informacion Tecnologica* 27(2):87-96. doi: 10.4067/S0718-07642016000200011.
- Vinale, Francesco, Sivasithampam, Krishnapillai, Ghisalberti, Emilio L., Marra, Roberta, Woo, Sheridan L., y Lorito, Matteo. 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40(1):1-10. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.07.002.

- Vos, J., y Ritchie, B. (Eds.). (2003). Discovery learning about cocoa: An inspirational guide for training facilitators. CABI Bioscience, 120-121.
- Voisard, C., Bull, C. T., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., Schnider, U., ... y Haas, D. (1994). Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs, 67-89.
- Vullo, D., Ceretti, H. M., Daniel, M., Ramírez, S., y Zalts, A. (2008). Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. Bioresource Technology, 99(13), 5574-5581.
- Waterhouse G, Newhook F, Stamps D, 1983. Present criteria for classification of Phytophthora. In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH, eds. *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. St Paul, MN, USA: APS Press, 139–47.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., y Meyer, W. (1994). DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC press, 6(1), 84-89.
- Wintermans, J., y De Mots, A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis, 109(2), 448-453.
- Zakria, M., Ohsako, A., Saeki., Yamamoto, A., y Akao, S. (2008). Colonization and growth promotion characteristics of *Enterobacter* sp. and *Herbaspirillum* sp. on *Brassica oleracea*. Soil science and plant nutrition, 54(4), 507-516.
- Zapata, F., Roy, R. (2004). Use of Phosphate Rock for Sustainable Agriculture. FAO and IAEA, Rome, Italy, 3(1), 78-82.

CAPÍTULO VII
ANEXOS

Anexo 1. Preparación y crecimiento de las rizobacterias en medio líquido King B



Anexo 2. Crecimiento de rizobacterias en biofermentadores



Anexo 3. Matraces con cultivos obtenido de los biofermentadores



Anexo 4. Tratamientos en campo Cacao CCN - 51



Anexo 5. Recolección de cherelles enfermos y mazorcas de cacao



Anexo 6. Protocolo del DNeasy® Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year. For more information, please refer to the DNeasy Plant Handbook, which can be found at www.qiagen.com/handbooks. For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at www.qiagen.com/contact.

Notes before starting ,,

Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C). ,,

If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AP3/E concentrates.

Add ethanol to Buffer AW and Buffer AP3/E concentrates. ,, Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser, or a mortar and pestle. 80
2. Add 400 μ l Buffer AP1 and 4 μ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation. Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.
3. Add 130 μ l Buffer AP2. Mix and incubate for 5 min on ice.
4. Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E, and mix by pipetting.
7. Transfer 650 μ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Discard the flowthrough. Repeat this step with the remaining sample.
8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 μ l Buffer AW, and centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g. Discard the flowthrough.

9. Add another 500 μ l Buffer AW. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g. Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.

10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.

11. Add 100 μ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15– 25°C). Centrifuge for 1 min at \geq 6000 x g. 12. Repeat step 11.

Anexo 7. Realización de PCR



Anexo 8. Diseño y bloques de los tratamientos en distintos sectores de estudio en la finca "Ignolia" del Cantón La Maná

