



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE AGRONOMÍA (REDISEÑO)**

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

Título del Proyecto de Investigación:

Eficiencia de las rizobacterias antagonicas sobre la estructura de resistencia y propagación
de *Phytophthora palmivora*.

Autora:

Dayanara Nicolle Tapia Quintana

Director del Proyecto de Investigación:

Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD.

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2022

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Dayanara Nicolle Tapia Quintana** 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.

DAYANARA NICOLLE TAPIA QUINTANA

C.I: 120763421-1

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martínez, PhD.** de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **Dayanara Nicolle Tapia Quintana**, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado **“Eficiencia de las rizobacterias antagonicas sobre la estructura de resistencia y propagación de *Phytophthora palmivora*.”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

Ing. Hayron Canchignia Martínez PhD.
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

El suscrito **Ing. Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez, PhD.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado “**Eficiencia de las rizobacterias antagónicas sobre la estructura de resistencia y propagación de *Phytophthora palmivora.***”, perteneciente a la estudiante de la carrera de Agronomía **Dayanara Nicolle Tapia Quintana**, 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 6 %.



Document Information

Analyzed document	TAPIA ANALISIS POR URKUND.docx (D138859767)
Submitted	2022-06-01T16:11:00.0000000
Submitted by	
Submitter email	hcanchignia@uteq.edu.ec
Similarity	6%
Analysis address	hcanchignia.uteq@analysis.urkund.com



HAYRON FABRICIO
CANCHIGNIA
MARTINEZ

Sources included in the report

Ing. Hayron Canchignia Martínez PhD.
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE AGRONOMÍA (REDISEÑO)**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“Eficiencia de las rizobacterias antagonicas sobre la estructura de resistencia y propagación de *Phytophthora palmivora*.”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Silvia Saucedo Aguiar, PhD.

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

Ing. Favio Herrera Eguez, PhD.

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

Ing. Luis Llerena Ramos, MSc.

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2022

AGRADECIMIENTO

Al concluir esta etapa maravillosa de mi vida quiero extender un profundo agradecimiento a las personas que hicieron posible esta meta: a mis padres y aquellos que me brindaron su mano amiga y apoyo incondicional.

A la gloriosa Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjó mis conocimientos en la preparación profesional.

Mi agradecimiento sincero a mi director de tesis, Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD, por impartir sus conocimientos, apoyo y liderazgo para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

Ing. Luis Fernando Vera, MSc. Ángel Cedeño, MSc. Erick García, Ing. Cristhian Macías, Ing. Carlos Cansiong, MSc. Antonio Mendoza, MSc. Joselyn Vilela, Vanessa Arellano, Flavio Valarezo, Teresa Manzo, Ana María, Dayana Delgado por brindarme su amistad, apoyo y confianza en el tiempo que estuve en el laboratorio.

A mis amigos que han formado parte de mi vida profesional y me brindaron apoyo durante este proceso.

Gracias infinitas al miembro del tribunal encargado de la revisión de este documento de investigación conformado por los docentes: Ing. Silvia Saucedo PhD., Ing. Favio Herrera Eguez PhD., Ing. Luis Llerena Ramos MSc, quienes con su apoyo y enseñanzas orientan mi vida profesional.

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico a Dios por brindarme sabiduría y fortaleza para cumplir este anhelado objetivo.

A mis padres que son mi fuente de inspiración Ing. Marlon Tapia y Lcda. Mariela Quintana por apoyarme e incentivar me hacia la superación. A mis hermanos Miguel y Mario por siempre confiar en mí.

A mi enamorado, Ing. Luis Fernando Vera por ser una persona especial en mi vida y brindarme apoyo incondicional día a día en este caminar.

Con cariño.

Dayanara Tapia.

RESUMEN

A nivel mundial, la enfermedad de la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) es causante de los bajos rendimientos del cultivo de cacao. El uso de agroquímicos ocasiona reducción de los microorganismos benéficos y resistencia de patógenos. La aplicación de rizobacterias como agentes de control biológico es una alternativa en la reducción de enfermedades en el cultivo de cacao. La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la “UTEQ”. El objetivo del estudio fue determinar la eficiencia de las rizobacterias antagonistas sobre la estructura de resistencia y propagación de *P. palmivora*. Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial a*b (2x7). Se utilizaron 2 cepas *P. palmivora* y 7 rizobacterias de PGPR, para los experimentos de antagonismo bacteria-patógeno y metabolito-patógeno en mazorcas, estructuras de propagación y resistencia. Las bacterias y metabolitos de las cepas BMR2-4 y BA4-19 en las estructuras del oomycete: zoosporas, clamidosporas y esporangios, alcanzaron porcentajes de lisis 35 y 90%. Las cepas PM3-14, BMR2-4, BA4-19 presentaron porcentajes de protección del 100% en presencia del patógeno, se evidenció una longitud radicular hasta 21.65 cm, peso radicular 2.97 g, humedad foliar 72%, número de hojas con un promedio de 8.6 hojas por planta, peso fresco total y longitud de la planta 7.58 g y 23.5 cm. Los sobrenadantes y bacterias BMR2-4 y BA4-19 alcanzaron porcentajes entre 20% y 90% de inhibición del patógeno en la sección externa de la mazorca y la sección interna entre 50% y 79%.

Palabras claves: Mazorca negra, Metabolitos secundarios, PGPR.

ABSTRACT

Worldwide, black pod disease (*Phytophthora palmivora*) is the cause of low yields in cocoa crops. The use of agrochemicals causes reduction of beneficial microorganisms and resistance of pathogens. The application of rhizobacteria as biological control agents is an alternative in the reduction of diseases in cocoa crops. The present investigation was carried out in the laboratory of Microbiology and Molecular Biology of the "UTEQ". The objective of the study was to determine the efficiency of the antagonistic rhizobacteria on the resistance structure and propagation of *P. palmivora*. A completely randomized design (CRD) with a*b (2x7) factorial arrangement was used. Two *P. palmivora* strains and 7 PGPR rhizobacteria were used, were used for the experiments on bacteria-pathogen and metabolite-pathogen antagonism in ears, propagation structures and resistance. The bacteria and metabolites of the strains BMR2-4 and BA4-19 in the structures of the oomycete: zoospores, chlamydospores and sporangia, reached lysis percentages of 35% and 90%. The PM3-14, BMR2-4, BA4-19 strains presented 100% protection percentages in the presence of the pathogen. root length up to 21.65 cm, root weight 2.97 g, leaf moisture 72%, number of leaves with an average of 8.6 leaves per plant and total fresh weight and length of the plant 7.58 g and 23.5 cm were evidenced. The supernatants and bacteria BMR2-4 and BA4-19 reached percentages between 20 and 90% of pathogen inhibition in the external section of the cob and between 50 and 79% in the internal section.

Keywords: Black cob, Secondary metabolites, PGPR.

TABLA DE CONTENIDO

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO	i
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
TABLA DE CONTENIDO	x
CODIGO DÚBLIN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Problema de la investigación	4
1.1.1. <i>Diagnóstico del problema</i>	4
1.1.2. <i>Planteamiento del problema</i>	4
1.1.3. <i>Sistematización del problema</i>	4
1.2. JUSTIFICACIÓN	6
1.3. OBJETIVOS	7
1.3.1. <i>Objetivo General</i>	7
1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	7
CAPITULO II.....	8
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	8

2.1. Marco conceptual	9
2.1.1. <i>Mazorca negra</i>	9
2.1.2. <i>Metabolitos secundarios</i>	9
2.1.3. <i>PGPR</i>	9
2.2. Marco referencial.....	10
2.2.1. <i>Cultivo de cacao</i>	10
2.2.2. <i>Problemas fitosanitarios en cacao</i>	10
2.2.3. <i>Enfermedades de cacao</i>	10
2.2.4. <i>Phytophthora palmivora en cacao</i>	10
2.2.4.1. <i>Ciclo de la enfermedad</i>	11
2.2.4.2. <i>Sintomatología</i>	12
2.2.4.3. <i>Estructuras de propagación y resistencia</i>	12
2.2.4.3.1. <i>Clamidosporas</i>	12
2.2.4.3.2. <i>Esporangios</i>	12
2.2.4.3.3. <i>Zoosporas</i>	12
2.2.5. <i>Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)</i>	13
2.2.6. <i>Cepas bacterianas PGPR</i>	14
2.2.6.1. <i>Enterobacter asburiae</i>	14
2.2.6.2. <i>Serratia marcescens</i>	14
2.2.6.3. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	14
2.2.6.4. <i>Pseudomonas protegens CHA0</i>	15
2.2.6.5. <i>Pseudomonas veronii (R4)</i>	15
2.2.6.6. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
2.2.6.7. <i>Pseudomonas putida</i>	16
3.1. Localización del experimento.....	18
3.2. Tipo de investigación.....	18
3.3. Método de investigación.....	18

3.4. Fuentes de recopilación de información.....	19
3.4.1. Fuente Primaria.	19
3.4.2. Fuente Secundaria.	19
3.5. Diseño de la investigación.....	19
3.5.1 Descripción de los tratamientos	20
3.5.2. Diseño experimental	21
3.6. Instrumentos de investigación	21
3.6.1. Manejo del experimento	21
3.6.2. Variables evaluadas	23
3.7. Tratamiento de los datos.....	27
3.8. Recursos humanos y materiales.....	27
3.8.1. Recursos humanos.	27
3.8.2. Recursos materiales.	27
3.8.2.1. Materiales.	27
3.8.2.3. Equipos	28
3.8.2.4. Materiales de oficina	29
CAPITULO IV	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Efecto de los metabolitos secundarios de las rizobacterias sobre las estructuras de resistencias y propagación de <i>P. palmivora</i>	26
4.1.1. Degradación de las clamidosporas bajo efecto de los sobrenadantes bacterianos..	26
4.1.2. Degradación de las clamidosporas bajo efecto de las bacterias antagónicas.....	27
4.1.3. Degradación de los esporangios bajo efecto de los sobrenadantes bacterianos.....	28
4.1.4. Degradación de los esporangios bajo efecto de las bacterias antagónicas.....	28
4.1.5. Efecto de los sobrenadantes bacterianos sobre zoosporas	29
4.1.6. Efecto de las bacterias antagónicas sobre zoosporas	31
4.2. Niveles de protección de las rizobacterias en las plantas de cacao (<i>T. cacao</i>). frente a <i>P. palmivora</i>	33

4.2.1. Longitud y peso fresco radicular	34
4.2.2. Longitud de la planta.....	35
4.2.3. Número de hojas por plántulas y humedad foliar	36
4.2.4. Peso fresco y seco de la hoja.....	37
4.3. Actividad antagonista de las rizobacterias sobre <i>P. palmivora</i> . en mazorca de cacao (<i>Theobroma cacao</i>).....	38
4.3.1. Aplicación de sobrenadantes bacterianos en mazorcas inoculadas con <i>P. palmivora</i>	38
4.3.2. Inhibición de <i>P. palmivora</i> en la sección transversal de mazorcas bajo efecto de sobrenadantes bacterianos.....	40
4.4. Aplicación de bacterias antagónicas en mazorcas inoculadas con <i>P. palmivora</i>	41
4.4.1. Inhibición de <i>P. palmivora</i> en la sección transversal de mazorcas bajo efecto de bacterias antagónicas.....	43
4.5. Discusión	45
4.5.1. Efecto de los metabolitos secundarios de las rizobacterias sobre las estructuras de resistencias y propagación de <i>P. palmivora</i>	45
4.5.2. Evaluación de los niveles de protección de las rizobacterias en las plantas de cacao (<i>T. cacao</i>). frente a <i>P. palmivora</i>	47
4.5.3. Actividad antagonista de las rizobacterias sobre <i>P. palmivora</i> . en mazorca de cacao (<i>Theobroma cacao</i>).....	48
CAPÍTULO V.....	50
CONCLUSIONES Y RECOMENACIONES	50
5.1. Conclusiones.....	51
5.2. Recomendaciones	52
CAPÍTULO VI	53
BIBLIOGRAFÍA	53
6.1. Referencias bibliográficas	54
CAPÍTULO VII ANEXOS.....	65
7.1. Anexos	66

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO		Pág.
Tabla 1	Taxonomía del agente causal de la mazorca negra.....	8
Tabla 2	Características de las rizobacterias con producción de metabolitos antagónicos.....	10
Tabla 3	Características agrometeorológicas de la Finca Experimental “La María” UTEQ - Mocache.....	14
Tabla 4	Esquema del Análisis de Varianza.....	16
Tabla 5	Esquema de tratamientos para evaluación de los experimentos...	16

ÍNDICE DE FIGURAS

	CONTENIDO	Pág.
Figura 1	Aplicación de sobrenadantes bacterianos sobre clamidosporas de <i>P. palmivora</i> : a) Porcentaje de lisis en clamidosporas producidos por sobrenadantes bacterianos.....	26
Figura 2	Aplicación de las bacterias sobre clamidosporas de <i>P. palmivora</i> : a) Porcentaje de lisis en clamidosporas producidos por las bacterias.	27
Figura 3	Aplicación de los sobrenadantes bacterianos sobre esporangios de <i>P. palmivora</i>	28
Figura 4	Lisis en estructura de propagación de <i>P. palmivora</i> .: a) Porcentaje lisis en esporangios producido por las bacterias.	29
Figura 5	Porcentaje de zoosporas móviles, lisadas, quistes germinados y no germinados producido por <i>P. palmivora</i> bajo efecto de los sobrenadantes bacterianos. Evaluado durante 3 periodos: a) 24 horas, b) 48 horas, c) 72horas.	30
Figura 6	Eficiencia de los sobrenadantes bacterianos sobre las zoosporas de <i>P. palmivora</i> : a. Zoosporas lisadas (flechas negras), b. Quistes no germinados (flechas rojas), c. Quiste germinado con tubo germinal (flecha blanca).....	31
Figura 7	Porcentaje de zoosporas móviles, lisadas, quistes germinados y no germinados producido por <i>P. palmivora</i> bajo efecto de las bacterias. Evaluado durante 3 periodos: a) 24 horas, b) 48 horas, c) 72horas.	32

Figura 8	Efecto de las rizobacterias sobre las zoosporas de <i>P. palmivora</i> : a. Zoosporas lisadas (flechas negras), b. Quistes no germinados (flechas rojas), c. Quiste germinado con tubo germinal (flecha blanca).....	34
Figura 9	Evaluación de los niveles de protección en plantas de cacao CCN-51. a) efecto de las bacterias en el porcentaje de niveles de protección. porcentaje de niveles de protección.	35
Figura 10	Efecto de las rizobacterias en el incremento de la longitud y peso radicular inoculadas con cepas de <i>P. palmivora</i>	36
Figura 11	Efecto de las rizobacterias en el desarrollo radicular en plantas inoculadas con <i>P. palmivora</i> . a) BA4-19+ L8-1. b) BO3-4+5A. c) control+5A. d) control+L8-1.....	37
Figura 12	Longitud de la planta y peso fresco total de plantas cacao CCN-51 inoculadas con <i>P. palmivora</i> y bacterias seleccionadas.	38
Figura 13	Número de hojas y humedad foliar de plantas de cacao CCN-51 inoculadas con <i>P. palmivora</i> y bacterias seleccionadas.	39
Figura 14	Peso fresco y seco foliar de plantas de cacao CCN-51.	40
Figura 15	Evaluación del efecto inhibitorio de los sobrenadantes bacterianos frente a <i>P. palmivora</i> en mazorcas de cacao CCN-51.	41
Figura 16	Actividad antagonista de los sobrenadantes bacterianos en mazorcas de cacao CCN-51. (C= mazorcas con necrosis, S= mazorcas sin necrosis).....	41

Figura 17	Evaluación del efecto inhibitorio transversal de los sobrenadantes <i>P. palmivora</i> . en mazorcas de cacao CCN-51 evaluados bajo 3 periodos de 24, 48 y 72 horas.....	42
Figura 18	Efecto inhibitorio de los sobrenadantes bacterianos en la sección transversal de las mazorcas de cacao CCN-51. (C= mazorcas con necrosis, S= mazorcas sin necrosis)	43
Figura 19	Evaluación del efecto inhibitorio de los sobrenadantes bacterianos frente a <i>P. palmivora</i> en mazorcas de cacao CCN-51. el porcentaje de inhibición de las rizobacterias en mazorcas de cacao CCN-51, evaluados bajo 3 periodos de 24, 48 y 72 horas.	44
Figura 20	Actividad antagonista de las bacterias en mazorcas de cacao CCN-51. (C= mazorcas con necrosis, S= mazorcas sin necrosis).....	44
Figura 21	Evaluación del efecto inhibitorio transversal de los sobrenadantes frente a <i>P. palmivora</i> en mazorcas de cacao CCN-51 evaluados bajo 3 periodos de 24, 48 y 72 horas.	45
Figura 22	Efecto inhibitorio de las bacterias antagónicas en la sección transversal de las mazorcas de cacao CCN-51. (C= mazorcas con necrosis, S= mazorcas sin necrosis).....	46

ÍNDICE DE ANEXOS

CONTENIDO		Pág.
Anexo 1	Obtención de sobrenadantes bacterianos.	66
Anexo 2	Ensayo efecto inhibitorio de las rizobacterias en las estructuras de resistencia y propagación de <i>Phytophthora palmivora</i>	66
Anexo 3	Ensayo niveles de protección en plantas de cacao CCN-51.....	67
Anexo 4	Ensayo antagonista en mazorcas de cacao CCN-51.	67
Anexo 5	Análisis de varianza de la variable longitud planta.....	68
Anexo 6	Análisis de varianza de la variable peso fresco total.....	68

CODIGO DÚBLIN

Título:	“Eficiencia de las rizobacterias antagonicas sobre la estructura de resistencia y propagación de <i>Phytophthora palmivora</i> .”
Autor:	Tapia Quintana Dayanara Nicolle
Palabras clave:	Actividad antagonista, Mazorca negra, Metabolitos secundarios, PGPR.
Fecha de publicación:	
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2022
Resumen:	<p>A nivel mundial, la enfermedad de la mazorca negra (<i>Phytophthora palmivora</i>) es causante de los bajos rendimientos del cultivo de cacao. El uso de agroquímicos ocasiona reducción de los microorganismos benéficos y resistencia de patógenos. La aplicación de rizobacterias como agentes de control biológico es una alternativa en la reducción de enfermedades en el cultivo de cacao. La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la “UTEQ”. El objetivo del estudio fue determinar la eficiencia de las rizobacterias antagonicas sobre la estructura de resistencia y propagación de <i>P. palmivora</i>. Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial a*b (2x7). Se utilizaron 2 cepas <i>P. palmivora</i> y 7 rizobacterias de PGPR, para los experimentos de antagonismo bacteria-patógeno y metabolito-patógeno en mazorcas, estructuras de propagación y resistencia. Las bacterias y metabolitos de las cepas BMR2-4 y BA4-19 en las estructuras del oomycete: zoosporas, clamidosporas y esporangios, alcanzaron porcentajes de lisis 35 y 90%. Las cepas PM3-14, BMR2-4, BA4-19 presentaron porcentajes de protección del 100% en presencia del patógeno, se evidenció una longitud radicular hasta 21.65 cm, peso radicular 2.97 g, humedad foliar 72%, número de hojas con un promedio de 8.6 hojas por planta y peso fresco total y longitud de la planta 7.58 g y 23.5 cm. Los sobrenadantes y bacterias BMR2-4 y BA4-19 alcanzaron porcentajes entre 20% y 90% de inhibición del patógeno en la sección externa de la mazorca y la sección interna entre 50 y 79%.</p>
Descripción:	
Url:	

INTRODUCCIÓN

El cacao es una planta perenne, se cultiva en América Central, Sudamérica África del Oeste y Asia (1). A nivel mundial se comercializa grandes cantidades de productos primarios de importancia económica, destacando el grano de cacao (2). Los países de la Unión Europea fueron los mayores importadores de cacao a nivel mundial (64%), seguidos por los países de Asia (20%) y Norte América (16%) (3). En el Ecuador la producción de cacao está localizada en 23 de sus 24 provincias y se produce como monocultivo o cultivo asociado con otras especies vegetales. Las provincias productoras son: Los Ríos, Guayas, Manabí, Esmeraldas, El Oro Sucumbíos, Orellana y Napo (4). En la provincia de Los Ríos durante el período 2015 a 2018 obtuvo una creciente producción pasando de un pico máximo de 70.374 Toneladas en el año 2018 a un mínimo en el 2015 de 36.185 Toneladas (5).

La enfermedad mazorca negra, es causada por el oomicete *Phytophthora palmivora*, genera pérdidas en la producción del cultivo de cacao hasta el 60% (6). El mecanismo de infección del oomicete es mediante sus estructuras de propagación y resistencia. Las zoosporas se enquistan en los sitios potenciales de infección, el oomicete segrega enzimas (pectinasas, celulasas, hemicelulasas) que disuelven la pared celular permitiendo la entrada a los tejidos de las plantas (7). El cacao es susceptible *P. palmivora*, durante todas las etapas del desarrollo de la planta, ocasiona manchas necróticas en plántulas y mazorcas, chancros en el tallo y pudrición de los granos (8).

En el suelo existe una gran variedad de microorganismos benéficos, entre ellos los más reportados y estudiados son las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Por sus siglas en inglés PGPR). Las bacterias presentan un efecto antagonista sobre patógenos fúngicos, bacterias patogénicas, promueven el crecimiento vegetal e inducen mecanismos de defensa y resistencia en la planta. La rizobacteria *P. fluorescens* es una de las especies más estudiadas, producen metabolitos como: sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas (9). Los antibióticos como: Plt, Prn, PCA y 2,4 DAPG son los principales controladores biológicos de hongos y bacterias. Estos antibióticos presentan propiedades anti-fúngicas, anti-bacterianos, actividades anti-helmínticas y fitotóxica. Además estimulan la resistencia sistémica inducida en plantas al interaccionar con las raíces de la planta (10).

El estudio de las rizobacterias PGPR como control biológico es un tema de gran relevancia en diversas investigaciones a nivel mundial. La aplicación de las rizobacterias en los cultivos agrícolas es una alternativa viable para los agricultores a nivel económico y social; es amigable con el medio ambiente, contribuye con la seguridad alimentaria en el mundo. Es por esta razón que este proyecto de investigación tiene por objetivo determinar la eficiencia de las rizobacterias sobre la estructura y propagación de *Phytophthora palmivora*. en cultivo de cacao (*Theobroma cacao*).

CAPITULO I
CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación

1.1.1. Diagnóstico del problema

Las enfermedades en las plantas cacaoteras son el factor biótico de mayor impacto para la producción de cacao en Latinoamérica y el mundo. El género *Phytophthora* de nombre común mazorca negra, puede atacar diferentes partes de la planta de cacao incluso desde plántulas hasta fase adulta. Los síntomas más visibles se dan en los frutos presentando manchas pardas oscuras en la superficie, particularmente en los cercanos a la madurez, causando grandes daños en la producción y pérdidas económicas considerables a los productores de este cultivo.

1.1.2. Planteamiento del problema

En el Ecuador existe una amplia diversidad genética de *Phytophthora spp.* distribuidas en el sector cacaotero. El manejo excesivo de agroquímicos y las variabilidades climáticas han ocasionado que el pseudohongo *Phytophthora spp.* Genere resistencia a fungicidas, es el método de control más utilizado por los agricultores para reducir la incidencia de enfermedades de las plantas causadas por hongos.

El uso indiscriminado de agroquímicos sujeta varios impactos negativos, como son los residuos químicos permanecen por un largo periodo de tiempo en suelo, provocando contaminación de la flora y fauna del ecosistema. Los agroquímicos generan una reducción de microorganismos benéficos del suelo, producen adaptación fisiológica de patógenos para resistir el fungicida químicos, provocan una exposición directa a mezclas químicas sobre la salud humana, pérdidas económicas en los agricultores.

1.1.3. Sistematización del problema

¿Cómo las rizobacterias reducen la proliferación en las estructuras de propagación y resistencia de *Phytophthora palmivora*?

¿Qué acción efectúan las rizobacterias para ejercer un control biológico hacia *P. palmivora* en plántulas?

¿Qué efecto antagonista ejercen las rizobacterias y sobrenadantes bacterianos sobre *P palmivora* en mazorcas de cacao?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Las estructuras de resistencia y propagación del patógeno *Phytophthora palmivora* son importantes estudiarlas para lograr una comprensión en la epidemiología, sintomatología, ciclo de vida de la enfermedad, permitirá buscar alternativas necesarias y viables para su control. Esto nos da una pauta para el desarrollo de sistemas de control biológico sobre el agente causal de la enfermedad “Mazorca negra” omycete *Phytophthora palmivora*, beneficiando a productores y comercializadores del cultivo de cacao. En este estudio se va a determinar la eficiencia de las rizobacterias sobre la estructura y propagación de *Phytophthora palmivora*.

La investigación aportará con el desarrollo sostenible y productivo del sector agrario local, promoverá un control biológico mediante el uso de rizobacterias (PGPR), microorganismos que constan con varios beneficios en el control de patógenos que ocasionan daños en plantas de interés agrícola. Es necesario resaltar que la aplicación de las rizobacterias ejercerá un control sobre las estructuras de resistencia y propagación de *Phytophthora palmivora*. de forma directa mediante la competencia de espacio y nutrientes, de forma indirecta la producción de metabolitos secundarios, además promoverán crecimiento y desarrollo de las plantas de cacao obteniendo un mayor rendimiento y producción del cultivo.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

Determinar la eficiencia de las rizobacterias sobre la estructura de resistencia y propagación de *Phytophthora palmivora*.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de los metabolitos secundarios de las rizobacterias sobre las estructuras de resistencia y propagación de *P. palmivora*.
- Establecer los niveles de protección de las rizobacterias en las plantas de cacao (*T. cacao*). frente a *P. palmivora*.
- Identificar la actividad antagonista de las rizobacterias sobre *P. palmivora*. en mazorca de cacao (*T. cacao*).

CAPITULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Mazorca negra

Es una enfermedad causada por el oomicete *Phytophthora palmivora*. Ataca a varias partes de la planta ocasionando daños de importancia económica, produce manchas de color café en el fruto de borde regular y crecimiento acelerado (11).

2.1.2. Metabolitos secundarios

Las rizobacterias PGPR se caracterizan por la producción de metabolitos secundarios o sobrenadantes (antibióticos). Es uno de los principales mecanismos que presentan las rizobacterias para proteger a las plantas frente a enfermedades causadas por agentes patógenos (12).

2.1.3. PGPR

(Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) son bacterias de la rizosfera que han demostrado un control sobre fitopatógenos, debido a su amplia diversidad de compuestos bioactivos y actividad antagonista (13).

2.2. Marco referencial

2.2.1. Cultivo de cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los productos agroalimentarios con mayor demanda en el mercado nacional e internacional y sus exportaciones en grano han representado más de 71% de volumen producido. En la explotación cacaotera solo se aprovecha económicamente la semilla, la cual representa aproximadamente un 10% del peso del fruto fresco (14). Por más de un siglo, el cacao en el Ecuador ha sido fuente importante de ingresos para familias dedicadas a la agricultura y de divisas para el país, dando como resultado uno de los exportadores más grandes a nivel mundial de cacao (15).

2.2.2. Problemas fitosanitarios en cacao

El cultivo de cacao en la Amazonía Ecuatoriana es uno de los rubros de mayor importancia, se manifiesta que en la zona Centro Norte de la Amazonía existen unas 50.000 hectáreas, sin embargo, en el cultivo de cacao inciden varios factores que limitan su rendimiento y producción como son: material genético inadecuados, suelos frágiles, condiciones adversas de clima y manejo deficiente del cultivo, pero el factor que afecta más a este cultivo son problemas fitosanitarios (16)

2.2.3. Enfermedades de cacao

En el Ecuador el rendimiento de cacao es bajo con un promedio de 250 kg ha⁻¹. Esto es debido a diversos problemas que se presentan en el cultivo, uno de los principales son las enfermedades causadas por agentes patógenos: *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciona* y *Phytophthora palmivora* (17) (18). El patógeno vegetal *P. palmivora* causante de la enfermedad denominada "mazorca negra" del cacao, es responsable de una pérdida del 30% de la cosecha mundial del cacao (19).

2.2.4. *Phytophthora palmivora* en cacao

Phytophthora palmivora es un oomycete capaz de infectar más de 200 especies de plantas, incluido uno de los cultivos de mayor importancia económica en nuestro país: *Theobroma*

cacao L., comúnmente conocido como cacao. Este oomycete infecta muchas partes de la planta del cacao, incluidas las mazorcas, causando la enfermedad de la pudrición de la mazorca conocida como mazorca negra (20). El género *Phytophthora* es parte de un grupo distinto de microbios eucariotas similares a hongos. Eso hace referencia a una variedad de características morfológicas con los hongos, pero posee características únicas de las plantas, tales como el componente principal de su pared celular es la celulosa (21). Otra característica de este oomycete es que su micelio está compuesto de hialinas, ramificadas, no septadas (22).

Tabla 1.

Taxonomía del agente causal de la mazorca negra

Dominio:	Eucarya
Reino:	Chromista
Phylum:	Oomycota
Clase:	Oomycete
Orden:	Peronosporales
Familia:	Peronosporaceae
Género:	<i>Phytophthora</i>
Especie:	<i>P. palmivora</i>

Fuente: Vélez Zambrano, (23).

2.2.4.1. *Ciclo de la enfermedad*

La propagación de los oomicetos se basa principalmente en la rápida dispersión de un huésped a otro mediante las zoosporas que nadan libremente. Estas esporas de un solo núcleo se forman en esporangios y solo se liberan en ambientes acuosos (24). El ciclo de vida de *Phytophthora* tiene una fase sexual y otra asexual, la cual inicia al producir esporangios en hojas viejas o residuos de la cosecha. Los esporangios, cuando están sometidos a condiciones de temperatura y humedad, producen zoosporas. Luego estas estructuras germinan e introducen a través de las estomas el tubo germinativo, este tubo se establece en el interior del tejido vegetal. Con el tiempo, las lesiones nuevas comienzan a producir esporangios en el envés de la hoja y pueden infectar la planta (25).

2.2.4.2. Sintomatología

El patógeno puede atacar a varias partes del árbol de cacao, el daño más grave ocurre en las mazorcas. Estas pueden ser atacadas en cualquier etapa de desarrollo. La primera indicación de infección por *Phytophthora palmivora* es una mancha circular que va progresando céntricamente, hasta cubrir toda la mazorca. Otro de los síntomas es que la decoloración va progresando internamente a medida que el fruto se pudre, donde será completamente destruido en un máximo de dos semanas. Además de ocasionar pudrición de la mazorca, causa lesiones cancerosas en el área del tronco y ramas (26).

2.2.4.3. Estructuras de propagación y resistencia

2.2.4.3.1. Clamidosporas

Las clamidosporas son estructuras de resistencia con paredes gruesas pueden sobrevivir grandes periodos de tiempo en el suelo, conservándose adecuadamente en condiciones húmedas y secas. Estas estructuras de 4 a 6 años se mantienen en ausencia del huésped (27), mientras que el micelio es la fuente secundaria de inóculo. Se ha observado que este no sobrevive más de 7 días en suelo seco. Este patógeno vive como saprófito sobre restos de materia orgánica y con humedad constante produce esporangios y zoosporas que son distribuidos por el agua (24).

2.2.4.3.2. Esporangios

Los esporangios son estructuras que presentan forma de saco y su plasma contiene gran cantidad de esporas asexuales endógenas denominadas (zoosporas). Existe diferentes formas de esporangios producidos por diferentes especies de *Phytophthora*. La supervivencia máxima de los esporangios *in vitro* en suelo no estéril fue de 70 a 80 días (28). El crecimiento de micelio y formación de esporangios ocurre en temperaturas de 18 y 30 °C (29).

2.2.4.3.3. Zoosporas

Las zoosporas son unidades de infección en la transmisión de enfermedades, poseen motilidad propia, mediante sus flagelos. En el suelo sobreviven durante 10 días en

temperaturas de 15 y 23°C. (28). Las zoosporas pueden trasladarse de manera pasiva al ser arrastradas por el agua o mediante sus flagelos que les permite nadar, desplazándose entre 3 y 5 cm en aproximadamente 6 horas (30). Son atraídas químicamente hacia las raíces de las plantas por sustancias exudadas, aumentan en condiciones de asfixia (saturación de agua en el suelo). Una vez las zoosporas están en contacto con la planta se enquistan rodeándose de una pared protectora e inicia la infección (31).

2.2.5. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas ya que colonizan la raíz. Están relacionadas con nutrientes como el carbono, fósforo, nitrógeno, hierro y azufre, también producen sustancia llamadas sideróforos, que ayudan a facilitar el hierro de la rizosfera y permite que sea disponible a la planta (32).

Las PGPR, además de promover el crecimiento, son capaces de producir hormonas vegetales, ayudan a controlar un gran número de procesos fisiológicos de la planta. Las bacterias también producen antibióticos para protección de patógenos, liberan enzimas como quitinasas y glucanasas La función de estas enzimas es romper la pared celular de los hongos patógenos o caparazones de insectos, también activan mecanismos de defensas (SAR, ISR) desarrollado por las plantas antes ataque de patógenos (32) (33).

Tabla 2.

Características de las rizobacterias con producción de metabolitos antagónicos

Organismos	Cepas	Metabolitos antagónicos				Sideróforos
		PR	HCN	Prn	DAGP	
<i>Klebsiella variicola</i>	BO3-4	+	+	+		+
<i>Enterobacter asburiae</i>	BA4-19	+				+
<i>Enterobacter asburiae</i>	PM3-14	+	+	+		+
<i>Pseudomonas spp.</i>	PM4-13	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	BMR2-4	+		+		
<i>Pseudomonas putida</i>	PB3-6		+			

Fuente: Chávez Arteaga, (34).

Nota. Productoras de metabolitos secundarios: PR-proteasa, HCN- cianuro de hidrogeno, Prn-pirrolnitrina, 2,4-DAPG *diacetilfloroglucinol*, sideróforos.

2.2.6. Cepas bacterianas PGPR

2.2.6.1. *Enterobacter asburiae*

Las bacterias del género *Enterobacter* son bacilos gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son gram negativa tiene forma de bastón, es anaerobia facultativa y no forman esporas (35). Estas bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se les puede encontrar en el suelo, agua y como parte del microbiota de animales, insectos y tracto gastrointestinal humano (36) (37).

2.2.6.2. *Serratia marcescens*

La bacteria *Serratia marcescens* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, oxidasa negativa, pertenecen a la familia enterobacteriacea. Esta bacteria crece abundantemente en agar chocolate, agar sangre, agar MacConkey, produce colonias que pueden ser pigmentadas y generan un pigmento rojo llamado prodigiosina (38). Se ha reportado que plantas inoculadas con las rizobacterias logran sobrevivir al ataque de *P. palmivora* (39). La cepa bacteriana *S. marcescens* cepa PM2/12 registró un mayor vigor en las plántulas de cacao inoculadas (40). En una investigación la bacteria *S. marcescens* inhibió el 59% de la germinación de clamidosporas (41).

2.2.6.3. *Acinetobacter calcoaceticus*

La bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* pertenece a las PGPR que tiene la capacidad de promover el crecimiento y metabolismo de las plantas. Esta bacteria provoca un efecto positivo en los contenidos endógenos de ABA y GA, aminoácidos, proteínas, producción de ácido succínico, málico en el cultivo en crecimiento (42). En una investigación realizada de cultivo *in vitro* se observó que las bacterias *A. calcoaceticus* BMR-12 y *P. protegens* CHA0 infectadas con *M. incognita* provocaron el menor daño en el tejido radicular con un peso de raíz 1.22 y 1.44 g, logrando obtener actividad antagonista (43).

2.2.6.4. *Pseudomonas protegens* CHA0

Esta bacteria *P. protegens* es una eubacteria de vida libre, aislada de las raíces del tabaco en Suiza (44). Esta PGPR se caracteriza por producir metabolitos secundarios con actividad antibiótica de amplio espectro (cianuro de hidrógeno (HCN), 2,4-diacetilfloroglucinol, pioluteorina y pirrolnitrina), están asociadas a la inhibición de fitopatógenos. Como *P. protegens* Pf-5, la cepa CHA0 tiene un potencial catabólico reducido en comparación con otras *pseudomonas fluorescentes*, lo que indica que *P. protegens* puede haberse especializado en exudados derivados de plantas (45) (46). La evidencia hasta la fecha ha demostrado que la bacteria *P. protegens* CHA0 que es capaz de reducir el crecimiento micelial de *M. fijiensis* con los diferentes extractos estudiados en condiciones *in vitro* (34).

2.2.6.5. *Pseudomonas veronii* (R4)

La bacteria *Pseudomonas veronii* es una PGPR no esporulante gram negativa móvil, pertenece al orden Pseudomonadales de la clase Gammaproteobacteria. Presentan forma de varilla aquellas varían en tamaño con dimensiones de 0.6 µm de ancho y 2.0 µm de longitud (47). Estas bacterias son de rápido crecimiento, donde van formando colonias de 2 mm de diámetro después de 48-72 h cuando se cultiva en medio KB a 28 °C (48) (49). En un estudio reciente se ha demostrado que la aplicación de la bacteria *P. veronii* favoreció al incremento de raíces secundarias y pelos absorbentes en cultivo de cacao reflejando como resultado el aumento en peso y longitud de raíz (50).

2.2.6.6. *Pseudomonas fluorescens*

Esta bacteria pertenece al grupo de Bacterias Promotoras del Crecimiento, cumplen la función de controlar patógenos en las plantas, debido a la producción de sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural de la planta (51). Estas bacterias tienen la capacidad de producir sideróforos y solubilizar fosfato insoluble respalda sus características antagónicas y beneficiosas para el crecimiento de las plantas (52) (53). Se reportó que la bacteria *P. fluorescens* cepas SL1 y SL2 ejercieron actividad antagonista sobre los patógenos *Phytophthora palmivora* y *Moniliophthora roreri*. (54). En un estudio se determinó que *Pseudomonas fluorescentes* presentó inhibición en la germinación de las estructuras de resistencia (clamidosporas) con porcentajes del 36 al 21% (33).

2.2.6.7. *Pseudomonas putida*

Es una bacteria con forma de bacilo gram negativo, aerobio que se puede aislar tanto en el suelo como en el agua (55). Se determinó en trabajos realizados que la aplicación de *P. putida* en plantas de cacao obtuvo efectos positivos en el desarrollo de la planta, generando un mayor número de mazorcas: 15 por planta y con un diámetro 9.75 cm, actividad antagonista sobre *P. palmivora* (56) (57). Estas bacterias *Pseudomonas* promueven el crecimiento de las plantas, intervienen en la reducción del estrés abiótico y biótico, generando una mayor protección contra diversas plagas y enfermedades (58).

CAPITULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización del experimento

El proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular ubicados en la Finca Experimental “La María”, perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo localizada en el Km 7 ½ de la Vía Quevedo – El Empalme, cantón Mocache, provincia de Los Ríos, con coordenadas geográficas 01° 06’ de latitud Sur y 79° 29’ de latitud Oeste. A una altitud de 75 msnm. En la tabla 2, se muestran las características de las condiciones agrometeorológicas del lugar experimental.

Tabla 2.

Características agrometeorológicas de la Finca Experimental “La María” UTEQ - Mocache.

Parámetros	Promedio
Temperatura °C	24.9
Humedad relativa %	87.71
Precipitación anual (mm)	2295.1
Heliofanía, horas sol año ¹	870.2
Zona ecológica	Bh-T
Topografía	Plana

Fuente: INAMHI, (59).

3.2. Tipo de investigación

El proyecto de investigación se utilizó el método experimental, comparando información existente en la literatura y estudios anteriores sobre la eficiencia de las rizobacterias sobre la estructura de resistencia y propagación de *Phytophthora palmivora*. El presente proyecto obtuvo una investigación científica, mediante el uso de actividades metódicas y técnicas para obtener la información y los datos necesarios en la investigación que se efectuó en el laboratorio de biotecnología.

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

3.4.1. Fuente Primaria.

Proviene de la información de campo que se registrará con los implementos de laboratorio en las que se aplicará los tratamientos de estudio e investigación.

3.4.2. Fuente Secundaria.

Estas fuentes provienen de manera investigativa a través de artículos científicos, revistas, tesis, libros entre otros.

3.5. Diseño de la investigación

Para determinar el efecto de los metabolitos secundarios sobre las estructuras de resistencia y propagación de *P. palmivora*, establecer los niveles de protección de las rizobacterias en las plantas de cacao y para identificar la actividad antagonista de las rizobacterias sobre *P. palmivora*. en mazorca de cacao; se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial a*b (2x7), considerando el factor (a) 2 cepas de *P. palmivora* y el factor (b) 7 rizobacterias. Se utilizaron 14 tratamientos con 3 repeticiones y 2 unidades experimentales. Se emplearon en cada uno de los ensayos. Las variables fueron sometidas al análisis de varianza y se empleó la prueba de Duncan al 95% (Tabla 4).

Tabla 4.*Esquema del Análisis de Varianza*

Fuente de variación	Grados de libertad
Factor A (FA-1)	1
Factor B (FB-1)	6
Int Factor AxB (FA-1) (FB-1)	6
Error t(r-1)	28
Total (t*r)-1	41

Elaborado: Autora**3.5.1 Descripción de los tratamientos**

Con la combinación de los dos factores a*b 2x7, (a) cepas de *Phytophthora palmivora* (L8-1 y 5A) y (b) 6 cepas de rizobacterias productoras de metabolitos secundarios (PB3-6, PM3-14, BMR2-4, BA4-19, PM4-13 (control negativo), BO3-4) se establecieron 14 tratamientos en los experimentos (Tabla 5).

Tabla 5.*Esquema de tratamientos para evaluación de los experimentos.*

	Tratamientos
T1	<i>Pseudomonas putida</i> BMR2/4+L8-1
T2	<i>Pseudomonas putida</i> BMR2/4+5A
T3	<i>Pseudomonas putida</i> PB3/6+L8-1
T4	<i>Pseudomonas putida</i> PB3/6+5A
T5	<i>Pseudomonas</i> spp.PM4/13+L8-1
T6	<i>Pseudomonas</i> spp.PM4/13+5A
T7	<i>Enterobacter asburiae</i> PM3/14+L8-1
T8	<i>Enterobacter asburiae</i> PM3/14+5A
T9	<i>Klebsiella variicola</i> BO3-4+L8-1
T10	<i>Klebsiella variicola</i> BO3-4+5A
T11	<i>Enterobacter asburiae</i> BA4/19+L8-1
T12	<i>Enterobacter asburiae</i> BA4/19+5A
T13	Control (Agua)+L8-1
T14	Control (Agua)+5A

Elaborado: Autora

3.5.2. Diseño experimental

Se aplicó el diseño DCA con arreglo factorial 2x7 considerando el factor a) *P. palmivora* y factor b) rizobacterias antagónicas. Las variables fueron sometidas al análisis de varianza y se empleó la prueba de Duncan al 95%.

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Manejo del experimento

- **Obtención de metabolitos secundarios de las rizobacterias para la degradación de estructuras de resistencia y propagación (esporangios, zoosporas y clamidosporas) de *P. Palmivora*.**

Para el siguiente experimento, se utilizó la metodología de Leyton *et al.* (60). Se seleccionaron 6 cepas de rizobacterias productoras de enzimas hidrolíticas (PB3-6, PM3-14, BMR2-4, BA4-19, PM4-13 (control negativo), BO3-4) del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo extensión, “La Maria” (Tabla 4). Se multiplicaron las células bacterianas en 50 ml de medio King B líquido (Peptona 20 g/L, Sulfato de Magnesio 1.5 g/L, Fosfato dipotásico 1.5 g/L) a 180 rpm a 28 °C por 48 h.

El contenido celular se centrifugó en tubos falcon de 15 ml a 8000 g x 3 min. El sobrenadante fue recuperado descartando el pellet, este proceso de centrifugación se realizó tres veces. El sobrenadante se ubicó en tubos eppendorf de 1.5 ml Nalgene Syringe de 0.2 µm y posteriormente sometidos a un choque térmico de 15 min a 90°C y 15 min a -40°C, finalmente se conservó a temperatura de -20°C (Anexo 1). Las cepas de *Phytophthora* se sembró en medio de cultivo V8 (Jugo V8 200 ml/L, carbonato de calcio 0.5 g/L y 15 g/L de agar) durante 96 horas con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la captura de estructura de resistencia y propagación, se aplicó una solución de tween al 0.01% en 10 ml de agua esparciendo totalmente por la caja petri, luego se capturó las estructuras por separados y se depositó en pocillos de 1 cm de diámetro*1 cm de profundidad. Finalmente, se agregó 500 ul de agua para cada repetición.

Para la obtención de las estructuras de *P. palmivora* se siguió la metodología de Cedeño *et al.* (61), el patógeno fue incubado en agar V8, se sometió al fotoperiodo (12 h luz / 12 h oscuridad/ 5 días), posteriormente se adicionó 10 mL de H₂O a 4 °C / 10 min. Este material fue sometido a ondas de choque por ultrasonido (Diamond Back 3Q) / 10 min, para la liberación de zoosporas. Se extrajo 1 ml de la suspensión y ubicado en tubos (Eppendorf) con 20 µl de azul de tripan para su inmovilización. Se obtuvo 10 µL de la solución para la visualización en cámara de Neubauer, donde se realizó el conteo en cinco de los cuadrantes de 0.20 mm², para determinar la concentración de zoosporas= (número de células x 10.000) / (número de cuadros).

Para la degradación de estructuras, se mezcló medio mililitro de metabolitos secundarios individuales de las cepas (PB3-6, PM3-14, BMR2-4, BA4-19, PM4-13, BO3-4) con un volumen igual de suspensión de zoosporas 4×10^5 del patógeno *P. palmivora* cepas 5A y L8-1 (más agresivas) en un tubo de centrifuga de 2 ml, agitado durante 30 sg para facilitar el enquistamiento de las zoosporas, e incubado durante aproximadamente 48 h a temperatura ambiente 22 °C. Durante esta incubación, las zoosporas pueden lisarse, mantener su movilidad, enquistarse por desprendimiento de flagelos o germinar. Se contabilizó el número de zoosporas (lisadas) y quistes (germinados o no germinados). De manera similar, en el ensayo de degradación de esporangios y clamidosporas se utilizó las mismas cepas de rizobacterias y discos miceliales de (1cm Ø) de las dos cepas del patógeno (5A y L8-1), con un promedio de (10.000 U) de esporangios y clamidosporas. Se agregó las rizobacterias individuales y los discos miceliales en un tubo de centrifuga de 2ml. Las evaluaciones fueron realizadas durante las 24, 48 y 72 horas (Anexo 2).

➤ **Niveles de protección de las rizobacterias en las plantas de cacao (*Theobroma cacao*). frente a *Phytophthora palmivora*.**

Se siguió la metodología de Cedeño Moreira (40). Las semillas de cacao CCN-51 fueron desinfectadas con NaClO al 5% por 3 min y sumergidas en H₂O estéril para su escarificación. Se ubicaron en contenedores plásticos con papel absorbente con 5 ml de H₂O destilada estéril a 28 °C / 96 h para su germinación. Las bacterias fueron incubadas en 50 ml de King B líquido a 120 rpm a 27 °C / 24 h, hasta alcanzar la concentración de 1×10^9 (UFC x ml) y

centrifugadas a 6.000 rpm / 5 min, para la recuperación de células y resuspendidas en un mismo volumen de H₂O. Con 10 µl de la suspensión celular se inocularon en la base del hipocótilo de cada semilla pre-germinada y ubicadas en contenedores plásticos con 140 g del sustrato con (50 / 50%) de suelo franco limoso y turba (Novarbo seedling, black C1B), esterilizado por autoclave a 121 °C / 20 min.

Se realizaron aplicaciones de 1 ml de suspensión celular individual de (PB3-6, PM3-14, BMR2-4, BA4-19, PM4-13, BO3-4) al suelo y pulverizado a los (30 días). Se mantuvieron en invernadero con humedad relativa al 75% a 28 ± 2 °C, por un fotoperiodo de (12 h luz / 12 h oscuridad) y plántulas control sin inoculante bacteriano. A los 7 dpi se añadió 20 µl de zoosporas a una concentración de (2,00E+05) al ápice de las plántulas de CCN-51, de la *Phytophthora spp.* de mayor agresividad. Las plántulas fueron transportadas a cámara húmeda para asegurar la supervivencia de las zoosporas. A los 65 dpi se evaluó los niveles de protección, peso fresco de (hojas, raíz y planta), altura de la planta, número de hojas, longitud de raíz (Anexo 3).

➤ **Actividad antagonista de las rizobacterias sobre *Phytophthora palmivora*. en mazorca de cacao (*Theobroma cacao*).**

Para esta actividad se utilizó la metodología de Cedeño Moreira (40), donde se utilizaron mazorcas sanas de CCN-51 con 18 semanas de edad. Se lavaron con H₂O destilada y jabón. Siendo sumergidas en NaClO al 10% / 10 s. Este material se llevó a bolsas de polipropileno más papel absorbente con 10 ml de H₂O estéril para generar cámara húmeda. Se recuperaron discos miceliales de (1cm Ø), con un promedio de (10.000 U) de esporangios. Los discos miceliales de las cepas de *P. pamivora*. se ubicaron en los extremos de la mazorca y almacenadas a temperatura ambiente por un fotoperiodo de (12 h luz / 12 h oscuridad) / 3 días, se registró el avance de infección a uno, dos y tres días post-incubación (dpi), con un calibrador de vernier y fotografía (Anexo 4).

3.6.2. Variables evaluadas

Las variables evaluadas en esta investigación son:

3.6.2.1. Ensayo efecto de los metabolitos secundarios de las rizobacterias sobre las estructuras de resistencia y propagación de *P. palmivora*

➤ Porcentaje de lisis en esporangios y clamidosporas (%).

Se contó el número de los esporangios y clamidosporas lisadas durante 24, 48 y 72 horas con la ayuda de un microscopio de luz con aumento de 40x.

➤ Porcentaje de zoosporas lisadas, móviles, quistes germinados y no germinados (%).

Se contó el número de las zoosporas móviles, quistes germinados y no germinados durante 24, 48 y 72 horas de 100 esporas al azar en cada réplica con la ayuda de la cámara de Neubauer.

3.6.1.2. Ensayo de evaluación de los niveles de protección de las rizobacterias en las plantas de cacao (*T. cacao*). frente a *P. palmivora*.

➤ Niveles de protección (%).

Los niveles de protección se evaluaron identificando la mortalidad y protección de las plantas en los tratamientos.

➤ Longitud de la planta (cm).

Se midió la longitud de la planta utilizando una cinta métrica midiendo desde el cuello del tallo de las plantas hasta el ápice del brote más largo y se expresó en centímetros. Se evaluaron 84 plantas.

➤ Longitud radicular (cm).

Esta variable se evaluó utilizando un calibrador de vernier, la longitud radicular se midió desde el cuello de la raíz hasta el ápice, los datos se registraron en centímetros.

➤ Peso fresco total de la planta (g).

Esta variable se verificó pesando en una balanza electrónica digital el peso fresco total y se expresó en gramos.

➤ **Peso fresco radicular (g).**

Esta variable se verificó pesando en una balanza electrónica digital el peso fresco radicular y se registró en gramos.

➤ **Peso fresco y seco foliar (g).**

Se registró el peso fresco y peso seco de las plántulas, se utilizó una balanza electrónica digital, los datos se expresaron en gramos.

➤ **Número de hojas.**

Esta variable se evaluó contando el número de hojas por plántulas.

➤ **Humedad foliar (%).**

Se utilizó los datos del peso fresco foliar y el peso seco foliar, para calcular el porcentaje de humedad foliar se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad foliar} = \frac{\text{Peso seco de la hoja}}{\text{Peso fresco de la hoja}} \times 100$$

En donde:

% humedad foliar = Porcentaje de humedad de la hoja.

Peso seco de la hoja = Peso seco (g).

Peso fresco de la hoja = Peso fresco (g).

3.6.1.3. Ensayo de la actividad antagonista de las rizobacterias sobre *P. palmivora*. en mazorca de cacao (*Theobroma cacao*).

➤ **Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en mazorcas (%).**

Esta variable se evaluó utilizando una cinta, se midió el crecimiento micelial del oomyete a las 24, 48 y 72 horas calculando la inhibición con un control descrito por (62).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Crecimiento del testigo} - \text{Crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del testigo}} \times 100$$

En donde:

% inhibición = Porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno.

Crecimiento del testigo = Radio de la colonia del patógeno.

Crecimiento del tratamiento = Radio de colonia patógena que crece hacia el agente antagonista (cm)

➤ **Porcentaje de inhibición transversal en mazorcas (%)**

Esta variable se evaluó utilizando una cinta, se midió el crecimiento de infección del oomyete a las 96 horas del diámetro horizontal y vertical transversal de la mazorca, se multiplicó los diámetros esto se expresó en cm², calculando la inhibición con un control descrito por Acebo, (62).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Crecimiento del testigo} - \text{Crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del testigo}} \times 100$$

En donde:

% inhibición = Porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno.

Crecimiento del testigo = Diámetro de la colonia del patógeno (cm²).

Crecimiento del tratamiento = Radio de colonia patógena que crece hacia el agente antagonista (cm²).

3.7. Tratamiento de los datos

En la presente investigación, para el análisis de los datos, se utilizó el procedimiento del ANOVA, análisis de varianza y las medias fueron comparadas usando la prueba de Duncan $p < 0.05$. Se trabajó con un software estadístico de versión libre (INFOSTAT).

3.8. Recursos humanos y materiales.

3.8.1. Recursos humanos.

La investigación se realizó con la orientación metodológica del Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez, docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. El manejo del ensayo toma de variables será realizado por la Srta. Dayanara Nicolle Tapia Quintana, estudiante de la carrera de Agronomía.

3.8.2. Recursos materiales.

3.8.2.1. Materiales.

- Agua destilada
- Alcohol 75%
- Bisturí
- Botellas esterilizables de 500 ml
- Cajas Petri
- Cloro
- Cubreobjetos
- Embudos simples de vidrio
- Frascos Chopp de vidrio (500 ml)
- Fundas de polipropileno
- Gasa estéril
- Guantes Quirúrgicos
- Juego de Micro-pipetas (0.2-10 μ l, 2- 0 μ l, 20-200 μ l y 100-1000 μ l)
- Jugo vegetal V8
- Nitrógeno líquido

- Papel Parafilm
- Papel Toalla
- Piceta de 500 ml
- Portaobjetos
- Pulverizador 500ml
- Puntas amarillas de micro-pipeta (200 μ l)
- Puntas Blancas de micro-pipeta (10 μ l)
- Tijeras Quirúrgicas
- Tubos de Eppendorf (1.5 ml)
- Tubos Falcon (15ml)
- Vasos de precipitación (50 ml, 250 ml y 500ml)

3.8.2.2.Reactivos

- Agar
- Alcohol 75%
- Fosfato de potasio
- Peptona
- Sulfato de magnesio

3.8.2.3.Equipos

- Agitador
- Autoclave
- Balanza de 0.001 gr
- Baño María
- Cámara de flujo Laminar
- Cámara Neubauer
- Centrífuga
- Destilador de agua
- Estufa
- Incubadora
- Microondas

- Microscopio
- Nevera
- Vórtex

3.8.2.4. Materiales de oficina

- Computador
- Cuaderno
- Lapicero
- Pendrive

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

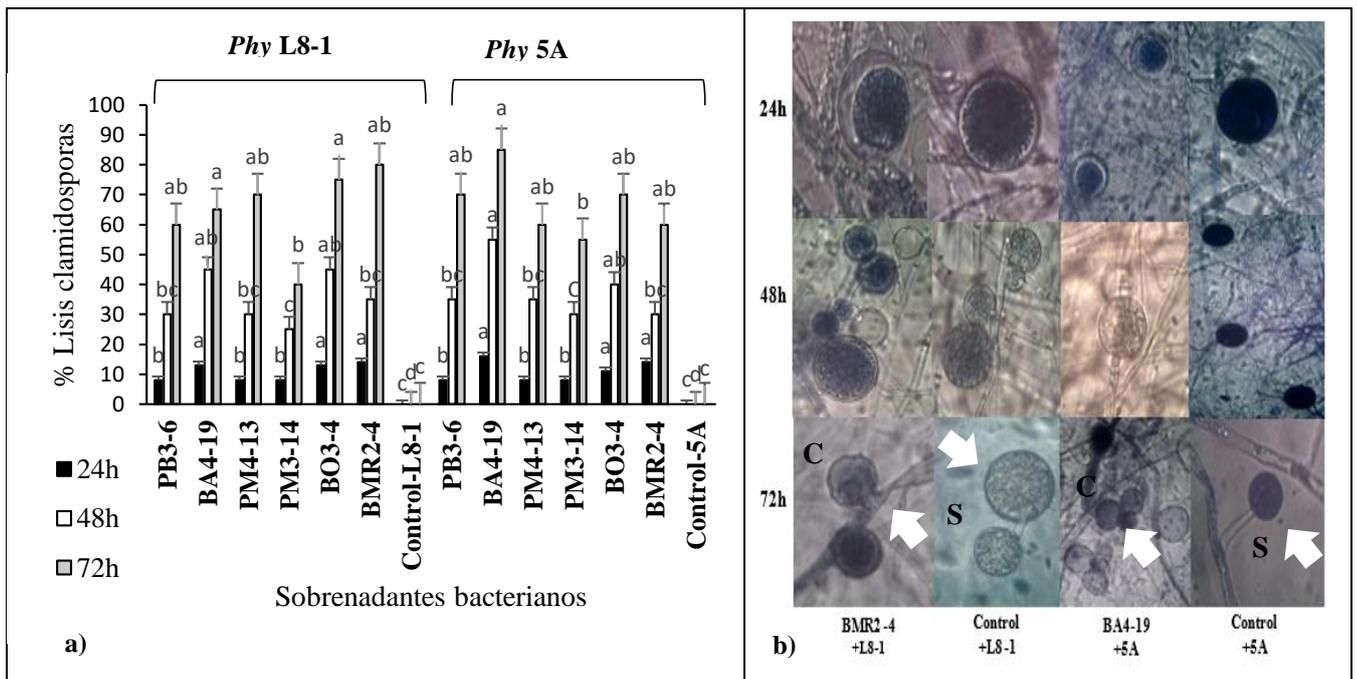
4.1. Efecto de los metabolitos secundarios de las rizobacterias sobre las estructuras de resistencias y propagación de *P. palmivora*.

4.1.1. Degradación de las clamidosporas bajo efecto de los sobrenadantes bacterianos

El porcentaje de lisis en clamidosporas de *P. palmivora*, se evaluó durante un periodo de 24, 48 y 72 horas. Destacando los sobrenadantes de *P. putida* BMR2-4 a *P. palmivora*. L8-1. En los 3 periodos de evaluación presentó mayor porcentaje de lisis entre los demás tratamientos de 14, 35 y 80% respectivamente, *E. asburiae* BA4-19 en presencia de *P. palmivora*. 5A, en los 3 períodos de evaluación expuso el mayor porcentaje de lisis en las clamidosporas entre los demás tratamientos de 16, 55 y 85% respectivamente (Figura 1).

Figura 1.

Aplicación de sobrenadantes bacterianos sobre clamidosporas de *P. palmivora*: a) Porcentaje de lisis en clamidosporas producidos por sobrenadantes bacterianos. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan). b) clamidosporas bajo efecto de sobrenadantes bacterianos durante 24, 48 y 72 horas. (C= clamidosporas con lisis, S= clamidosporas sin lisis).

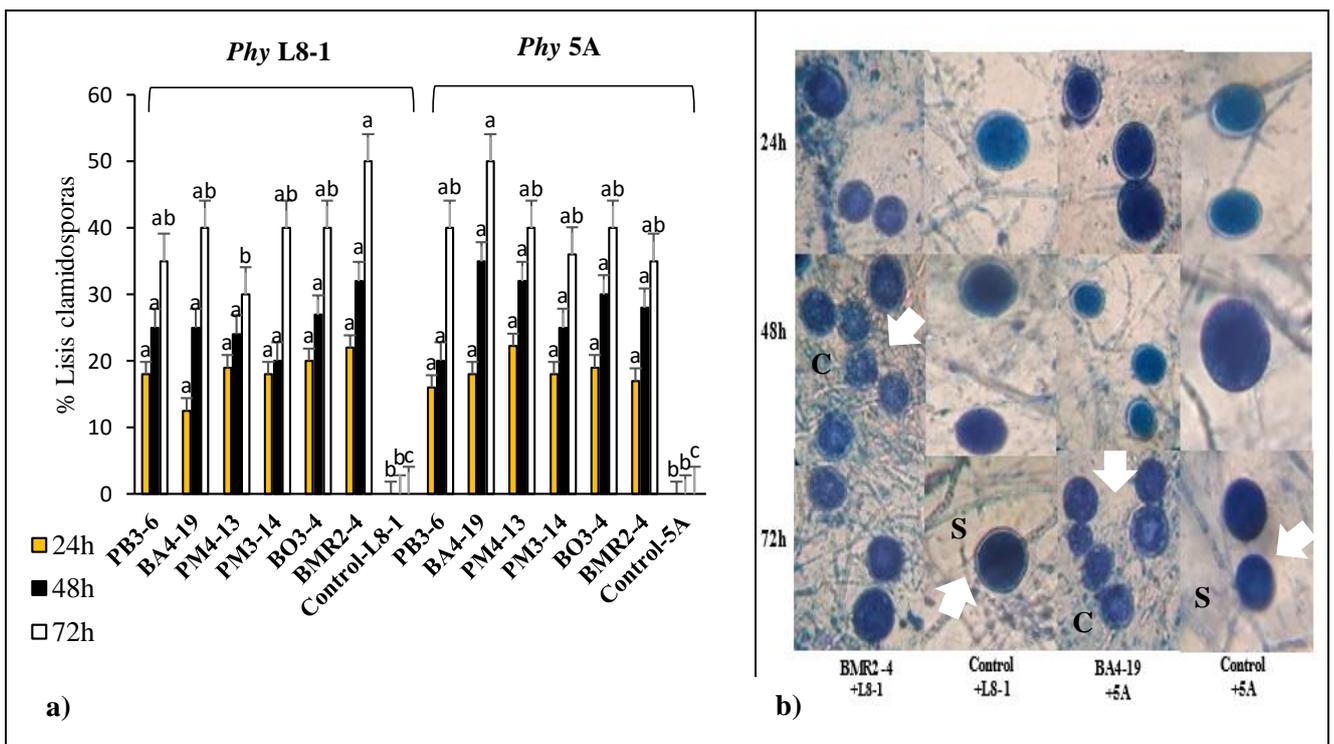


4.1.2. Degradación de las clamidosporas bajo efecto de las bacterias antagónicas

En la evaluación del porcentaje de lisis en clamidosporas de *P. palmivora* con las rizobacterias se evaluó durante un periodo de 24, 48 y 72 horas. Destacando *P. putida* BMR2-4 inoculada con el patógeno *P. palmivora*. L8-1, obtuvo en los 3 periodos de evaluación mayor porcentaje de lisis entre los demás tratamientos de 22, 32 y 50% respectivamente, superando estadísticamente a las demás cepas. La bacteria *E. asburiae* BA4-19 con *P. palmivora*. cepa 5A, presentó el mayor porcentaje de lisis en clamidosporas sobre los demás tratamientos de 18, 35 y 50% respectivamente (Figura 2).

Figura 2.

Aplicación de las bacterias sobre clamidosporas de *P. palmivora*: a) Porcentaje de lisis en clamidosporas producidos por las bacterias. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan). b) clamidosporas bajo efecto de las bacterias, durante 24, 48 y 72 horas. (C= clamidosporas con lisis. S= clamidosporas sin lisis).

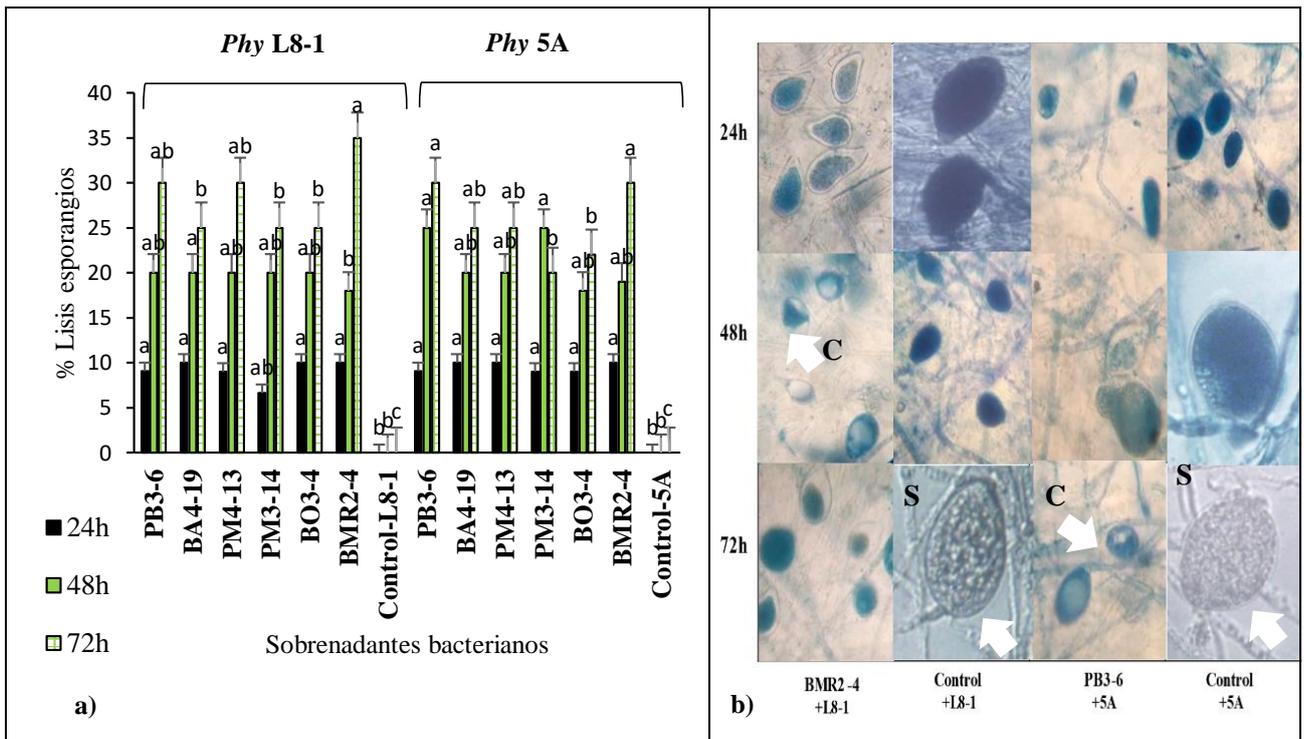


4.1.3. Degradación de los esporangios bajo efecto de los sobrenadantes bacterianos

El porcentaje de lisis en los esporangios de *P. palmivora* tratados con los sobrenadantes bacterianos se evaluó durante 24, 48 y 72 horas. Resaltando las cepas (*P. putida* BMR2-4 y *E. asburiae* BA4-19) inoculadas con *P. palmivora*. L8-1, expresaron a las 72 horas de evaluación un porcentaje de lisis mayor entre los tratamientos de 25 y 35% respectivamente, superando estadísticamente las demás cepas (Figura 3). Las cepas *P. putida* (BMR2-4 y PB3-6) inoculada con *P. palmivora*. 5A, ambas presentaron el mayor porcentaje de lisis a las 72 horas de evaluación de 30%.

Figura 3.

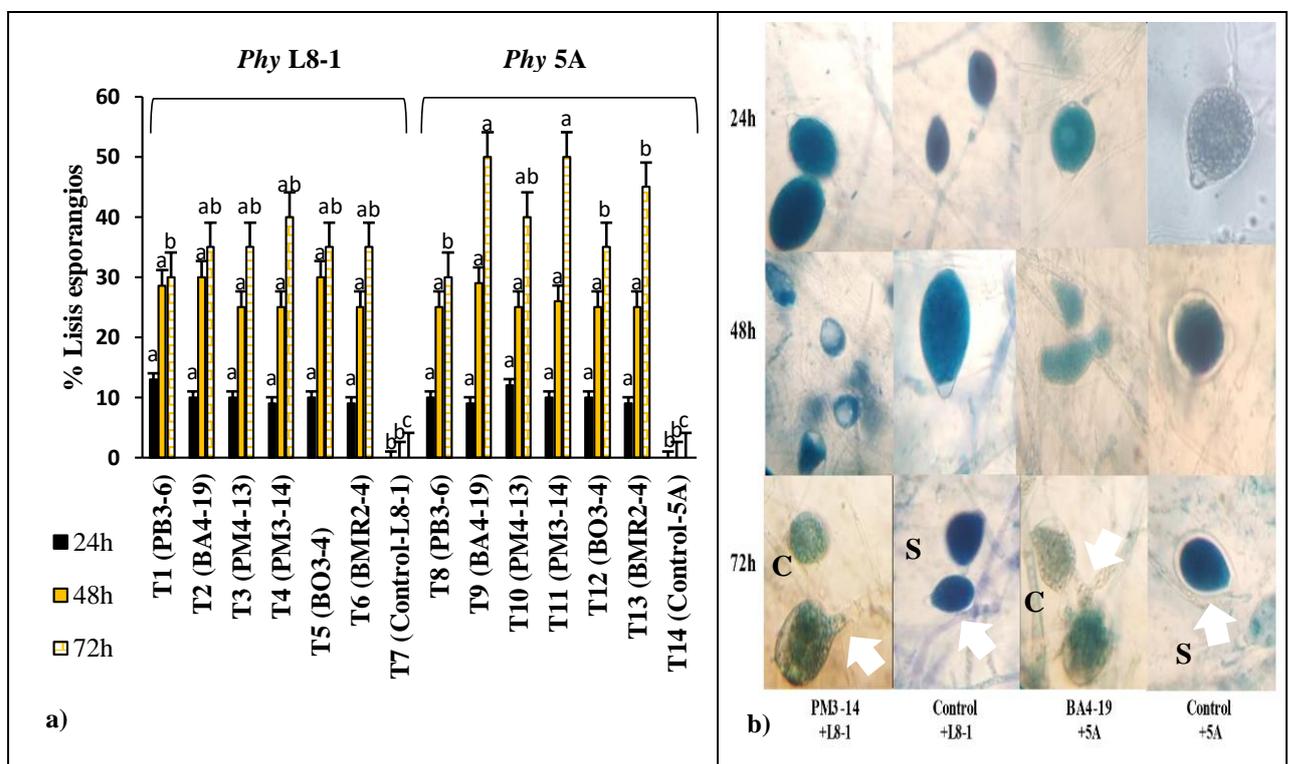
Aplicación de los sobrenadantes bacterianos sobre esporangios de *P. palmivora*. a) Porcentaje lisis en esporangios producidos por sobrenadantes bacterianos. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan). b) esporangios bajo efecto de los sobrenadantes bacterianos durante 24, 48 y 72 horas. (C= esporangios con lisis. S= esporangios sin lisis).



4.1.4. Degradación de los esporangios bajo efecto de las bacterias antagónicas

La efectividad de las bacterias en causar anomalías en los esporangios de *P. palmivora* cepa L8-1, se verificó en presencia de las cepas (BMR2-4, BA4-19 y PM3-14), obteniendo mayor porcentaje lisis celular 35, 35 y 40% respectivamente, superando estadísticamente la demás cepa evaluadas. Las cepas (*P. putida* BMR2-4, *E. asburiae* BA4-19 y *E. asburiae* PM3-14) inoculadas *P. palmivora* cepa 5A, presentaron porcentajes de inhibición a sus 72 horas con porcentajes de lisis celular del 45, 50 y 50%. (Figura 4).

Figura 4. Lisis en estructura de propagación de *P. palmivora*.: a) Porcentaje lisis en esporangios producido por las bacterias. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan). b) Lisis en esporangios bajo efecto de las bacterias durante 24, 48 y 72 horas. (C= esporangios con lisis. S= esporangios sin lisis).



4.1.5. Efecto de los sobrenadantes bacterianos sobre zoosporas

Este ensayo se evaluó varios estados de las zoosporas: zoosporas móviles, zoosporas lisadas, quistes germinados y no germinados durante 24, 48 y 72 horas. Sobre la pérdida de movilidad de las zoosporas se presentó al ser tratadas con los sobrenadantes bacterianos *P. fluorescens* PM3-14 inoculadas con *P. palmivora* 5A y *P. palmivora* L8-1, con un porcentaje

de 70 y 90% respectivamente. A la generación de lisis de las zoosporas presentaron mayor porcentaje de zoosporas lisadas entre un 65 y 70%. La formación de quistes germinados presentó porcentaje del 4% y quistes no germinados del 12%. Mientras que los sobrenadantes de las cepas *K. variicola* BO3-4 y *E. asburiae* PM3-14 tratadas con *P. palmivora* L8-1 y 5A, presentaron menor porcentaje de zoosporas lisadas y retuvieron los flagelos (Figura 5 y 6).

Figura 5.

Porcentaje de zoosporas móviles, lisadas, quistes germinados y no germinados producido por *P. palmivora* bajo efecto de los sobrenadantes bacterianos. Evaluado durante 3 periodos: a) 24 horas, b) 48 horas, c) 72horas. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

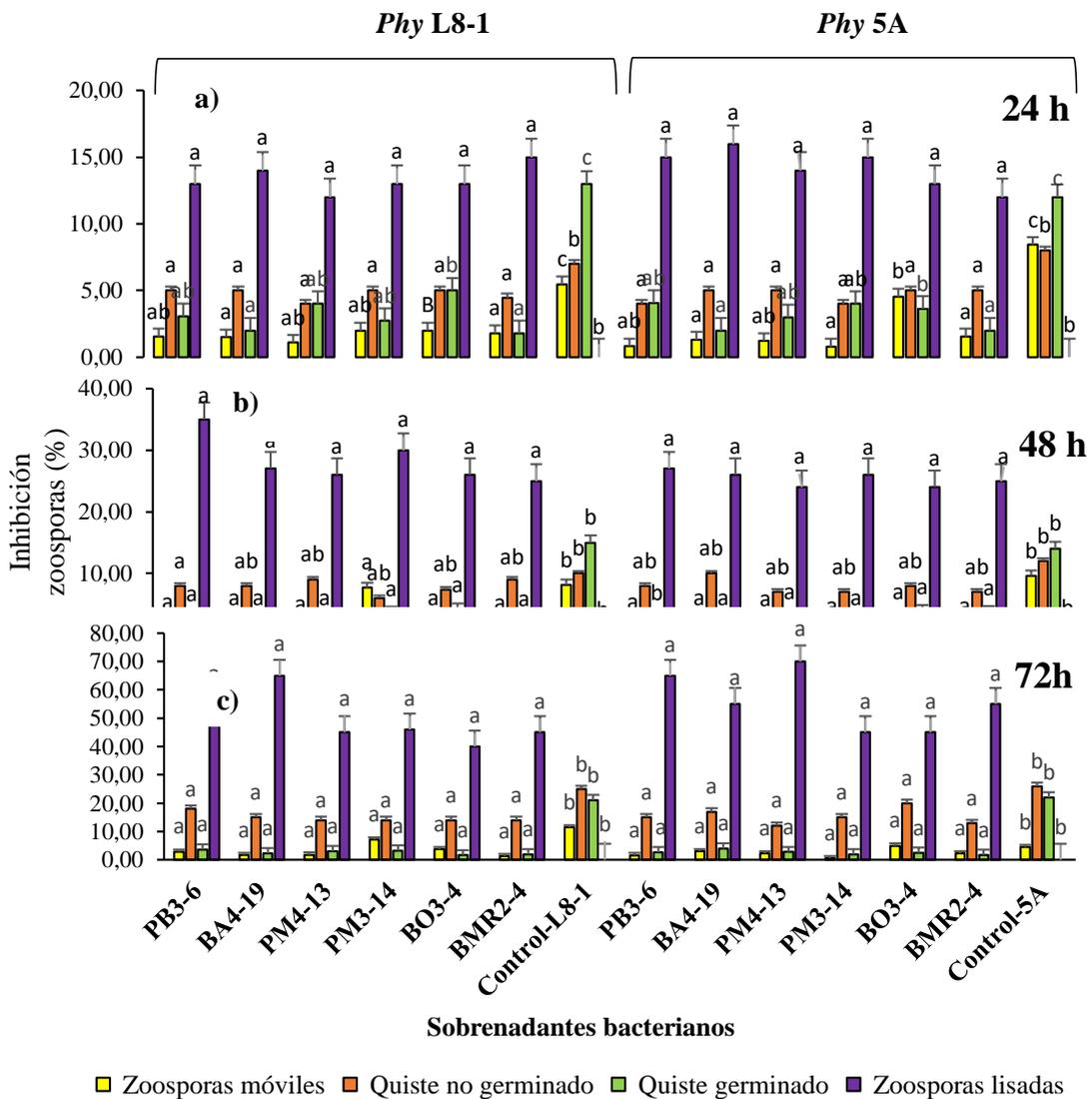
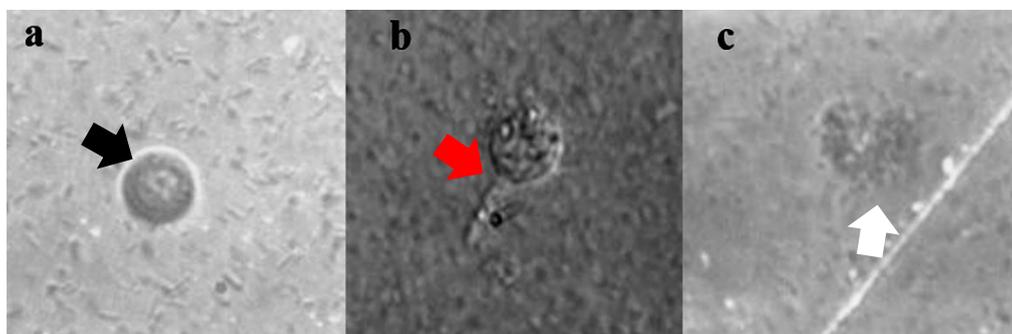


Figura 6.

Eficiencia de los sobrenadantes bacterianos sobre las zoosporas de *P. palmivora*: a. Quiste no germinado (flechas negras), b. Quiste germinado con tubo germinal (flechas rojas), c. Zoosporas lisadas (flecha blanca).



4.1.6. Efecto de las bacterias antagónicas sobre zoosporas

Este ensayo se evaluó varios estados de las zoosporas: zoosporas móviles, zoosporas lisadas, quistes germinados y no germinados durante 24, 48 y 72 horas. Sobre la pérdida de movilidad de las zoosporas se presentó al ser tratadas con bacterias *P. putida* BMR2-4 inoculadas con *P. palmivora* 5A y *P. palmivora* L8-1, con un porcentaje de 75 y 90% respectivamente. A la generación de lisis de las zoosporas presentaron mayor porcentaje de zoosporas lisadas entre un 85 y 90%. La formación de quistes germinados presentó porcentaje del 2% y quistes no germinados del 13%. Mientras que los sobrenadantes de las cepas *K. variicola* BO3-4 y *E. asburiae* PM3-14 tratadas con el patógeno *P. palmivora* L8-1 y *P. palmivora* 5A, presentaron menor porcentaje de zoosporas lisadas, en relación al control sin aplicación de bacterias presentaron mayor porcentaje de zoosporas móviles y lisadas. (Figura 7 y 8).

Figura 7.

Porcentaje de zoosporas móviles, lisadas, quistes germinados y no germinados producido por *P. palmivora* bajo efecto de las bacterias. Evaluado durante 3 periodos: a) 24 horas, b) 48 horas, c) 72horas. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

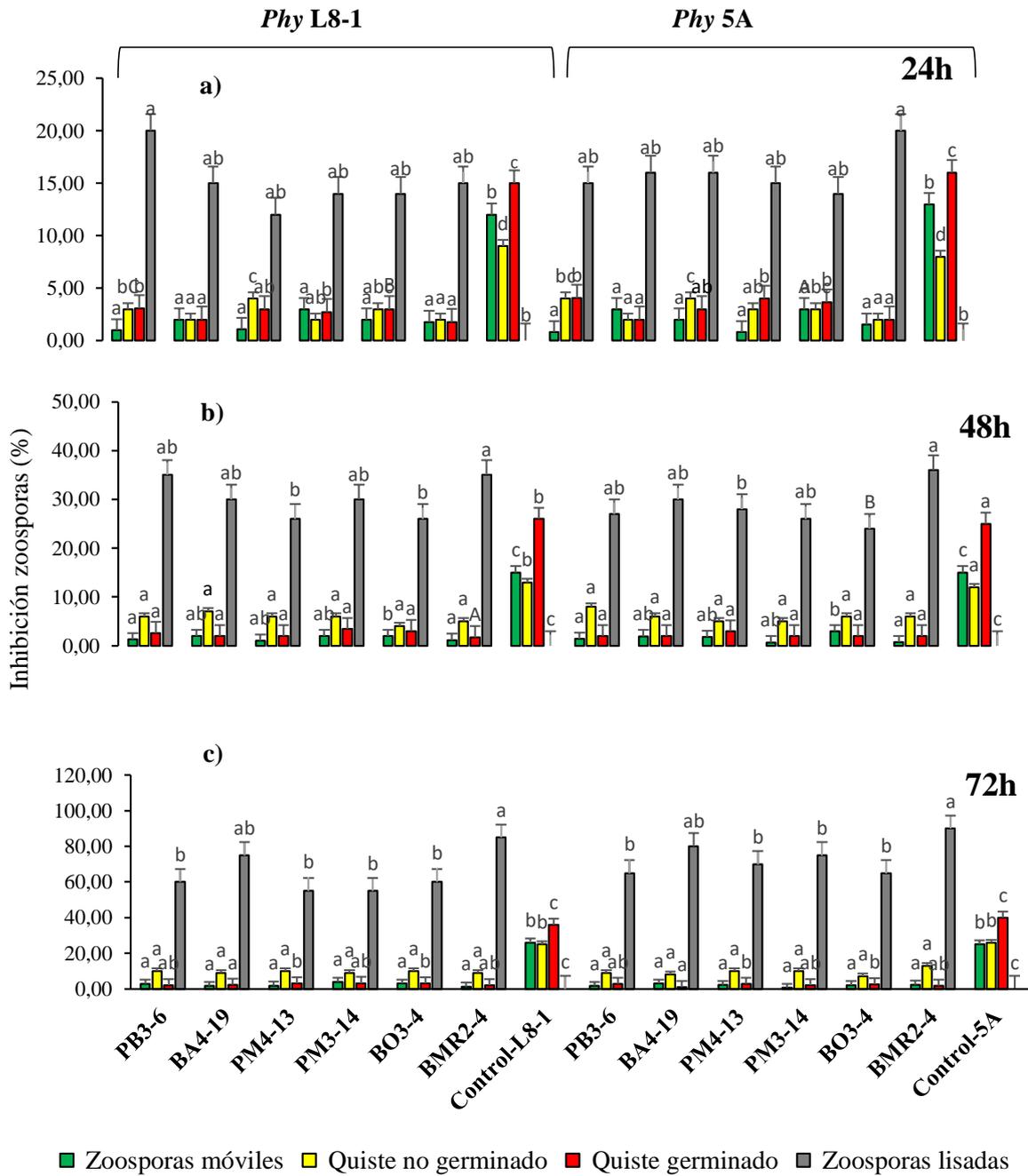
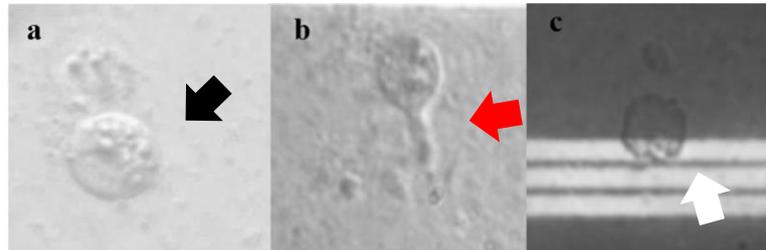


Figura 8.

Efecto de las rizobacterias sobre las zoosporas de *P. palmivora*: a. Quiste no germinado (flechas negras), b. Quiste germinado con tubo germinal (flechas rojas), c. Zoosporas lisadas (flecha blanca).

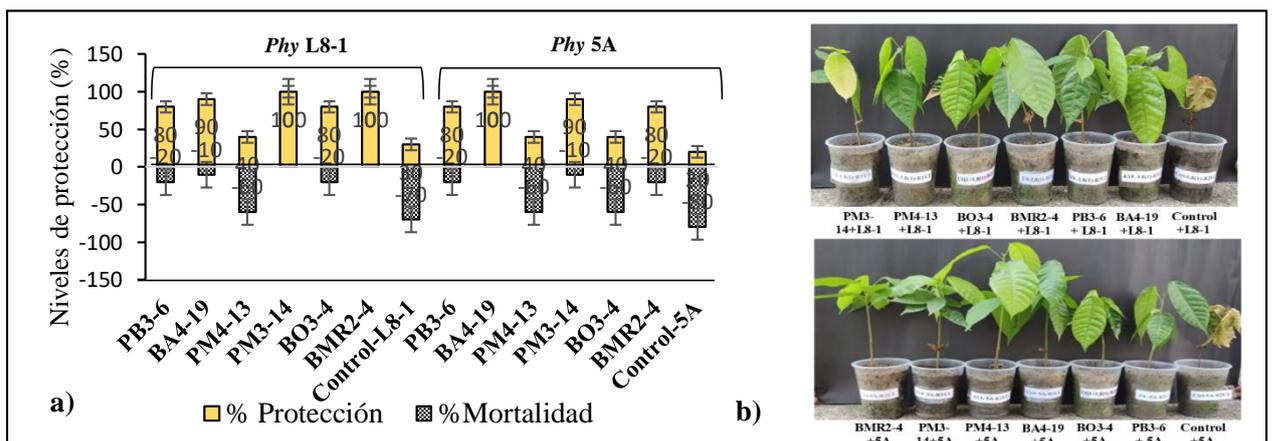


4.2. Niveles de protección de las rizobacterias en las plantas de cacao (*T. cacao*). frente a *P. palmivora*

La evaluación de los niveles de protección en plantas de *T. cacao* CCN-51, se visualizó la mortalidad de plantas por efecto de *P. palmivora*. Se examinaron, al final del experimento, las cepas (*E. asburiae* PM3-14, *P. putida* BMR2-4), alcanzaron un 100 % de protección ante el ataque del patógeno *P. palmivora* cepa L8-1, en relación al control sin bacterias se verificó el 70 % de plantas muertas. La cepa *E. asburiae* BA4-19 presentó un 100% de protección ante el ataque del patógeno *P. palmivora* 5A, alcanzó el 20% de protección, en relación al control sin bacteria se observó el 80% de plantas muertas (Figura 9).

Figura 9.

Niveles de protección en plantas de cacao CCN-51. a) efecto de las bacterias en el porcentaje de niveles de protección. Las barras de error indican \pm Error estándar (test de Duncan). b) niveles de protección en plantas.



4.2.1. Longitud y peso fresco radicular

La aplicación de las rizobacterias seleccionadas promovieron un gran desarrollo del sistema radicular en plántulas de *T. cacao* CCN-51. Se incrementó la longitud radicular con 21.65 cm. por efecto de *E. asburiae* BA4-19 en presencia de *P. palmivora* L8-1 y 5A.

La producción de fitohormonas producidas por la bacteria generó un aumento de peso radicular en las plantas tratadas con la cepa BMR2-4 con el patógeno *P. palmivora* L8-1 obtuvo un mayor promedio entre los tratamientos de 3.18 g, seguidamente las cepas *E. asburiae* BA4-19 y *K. variicola* BO3-4 inoculadas con el patógeno *P. palmivora* 5A presentaron un promedio de 2.97 gr y 2.93 g respectivamente. La cepa *P. putida* PB3-6 inoculadas con L8-1 y 5A obtuvo menor peso radicular con un promedio de 1.57 g y 1.4 g (Figura 10 y 11).

Figura 10.

Efecto de las rizobacterias en el incremento de la longitud y peso radicular en plantas inoculadas con cepas de *P. palmivora*. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

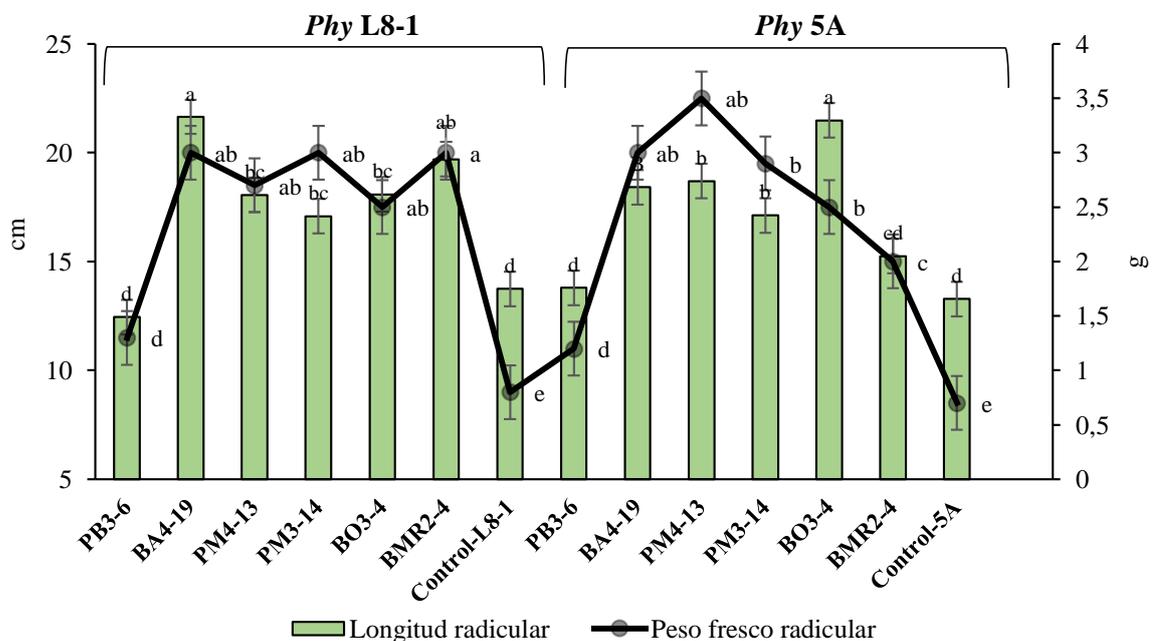
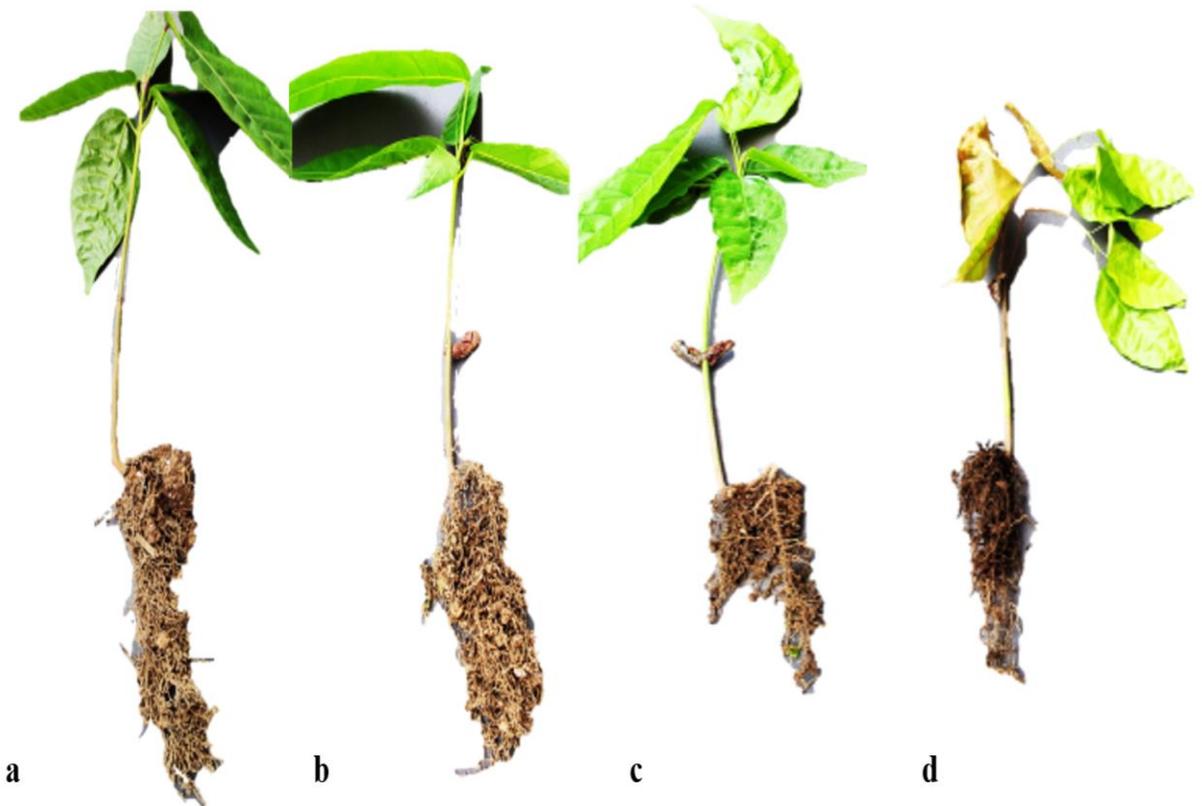


Figura 11.

Efecto de las rizobacterias en el desarrollo radicular en plantas inoculadas con *P. palmivora*.

a) BA4-19+ L8-1. b) BO3-4+5A. c) control+5A. d) control+L8-1.

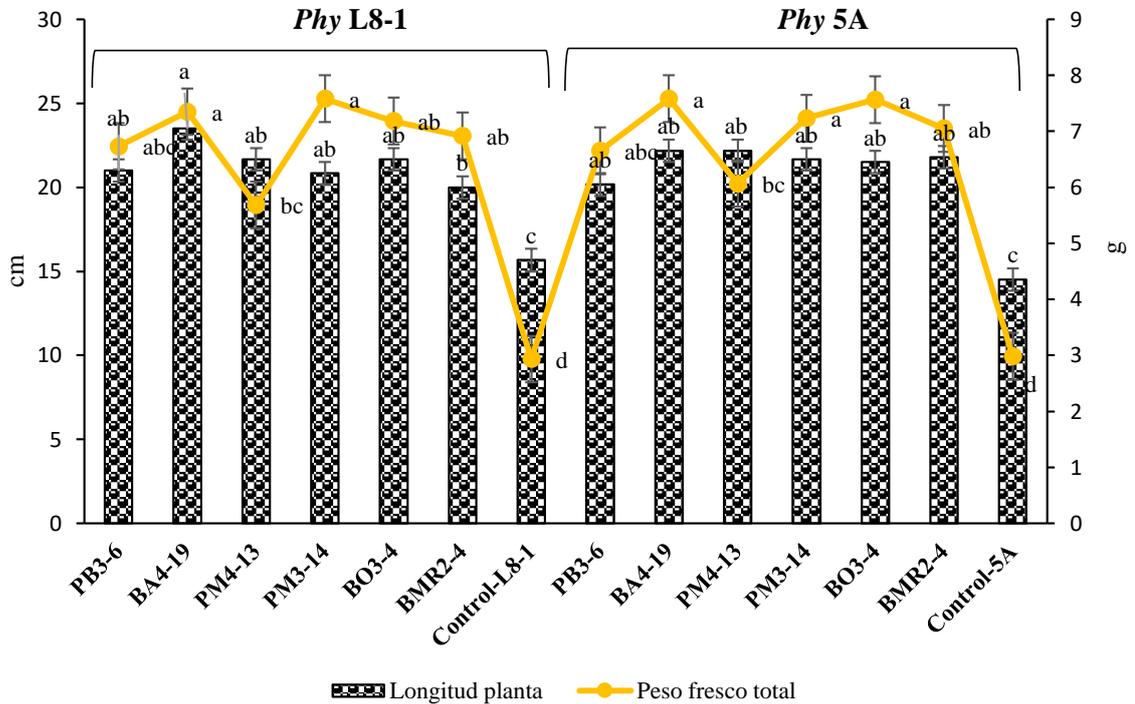


4.2.2. Longitud de la planta

La inoculación de las rizobacterias en las plántulas de *T. cacao* CCN-51 indujo un incremento en la longitud. Se evaluó al final del experimento, La cepa *E. asburiae* BA4-19 inoculada *P. palmivora* L8-1 presentó una longitud superior entre los tratamientos de 23 cm. Las cepas (PB3-6, BA4-19, PM4-13, PM3-14, BO3-4 y BMR2-4), inoculadas con *P. palmivora* 5A obtuvieron una longitud que oscila de 20 y 22 cm. Se evidenció el aumento de peso fresco en las cepas *E. asburiae* (BA4-19 y PM3-14) inoculados con *P. palmivora* L8-1 y 5A con un valor promedio de 7.35 y 7.58 g (Figura 12).

Figura 12.

Longitud de la planta y peso fresco total de plantas cacao CCN-51 inoculadas con *P. palmivora* y bacterias seleccionadas. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).



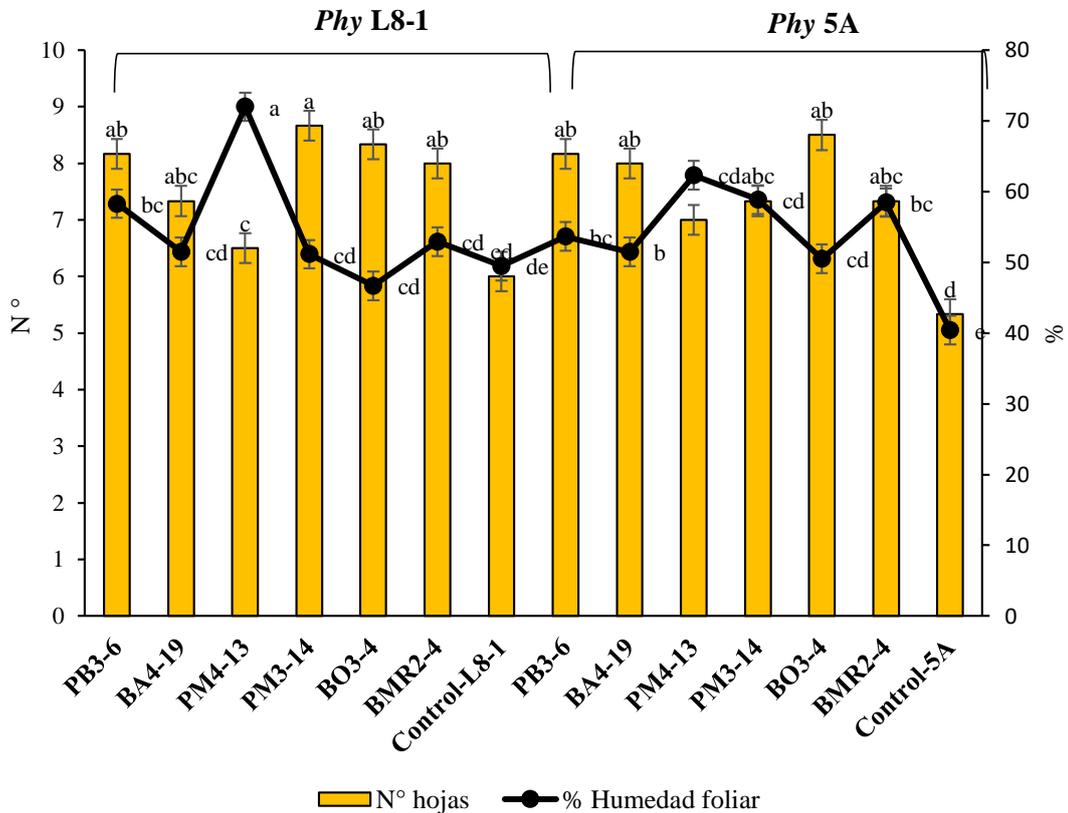
4.2.3. Número de hojas por plántulas y humedad foliar

La aplicación de las rizobacterias generó un incremento en el área foliar de las plantas, la cepa *E. asburiae* PM3-14 inoculada con *P. palmivora* L8-1 presentó un promedio de 8 hojas por planta. Las cepas (PB3-6, BA4-19, BO3-4) con el patógeno *P. palmivora* 5A obtuvieron un promedio de 9 hojas respectivamente. Por el contrario, las plantas sin aplicación de bacterias no superaron las 6 hojas por plantas.

La cepa *E. asburiae* PM3-14 inoculadas *P. palmivora* L8-1 presentó un porcentaje de humedad foliar del 72%. la cepa *E. asburiae* PM3-14 inoculada con 5A *P. palmivora* 5A obtuvo un 62%. La que presentaron un menor porcentaje de humedad fueron *K. variicola* BO3-4 inoculada con *P. palmivora* L8-1 y 5A obtuvieron 46% y 50% (Figura 13).

Figura 13.

Número de hojas y humedad foliar de plantas de cacao CCN-51 inoculadas con *P. palmivora* y bacterias seleccionadas. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).



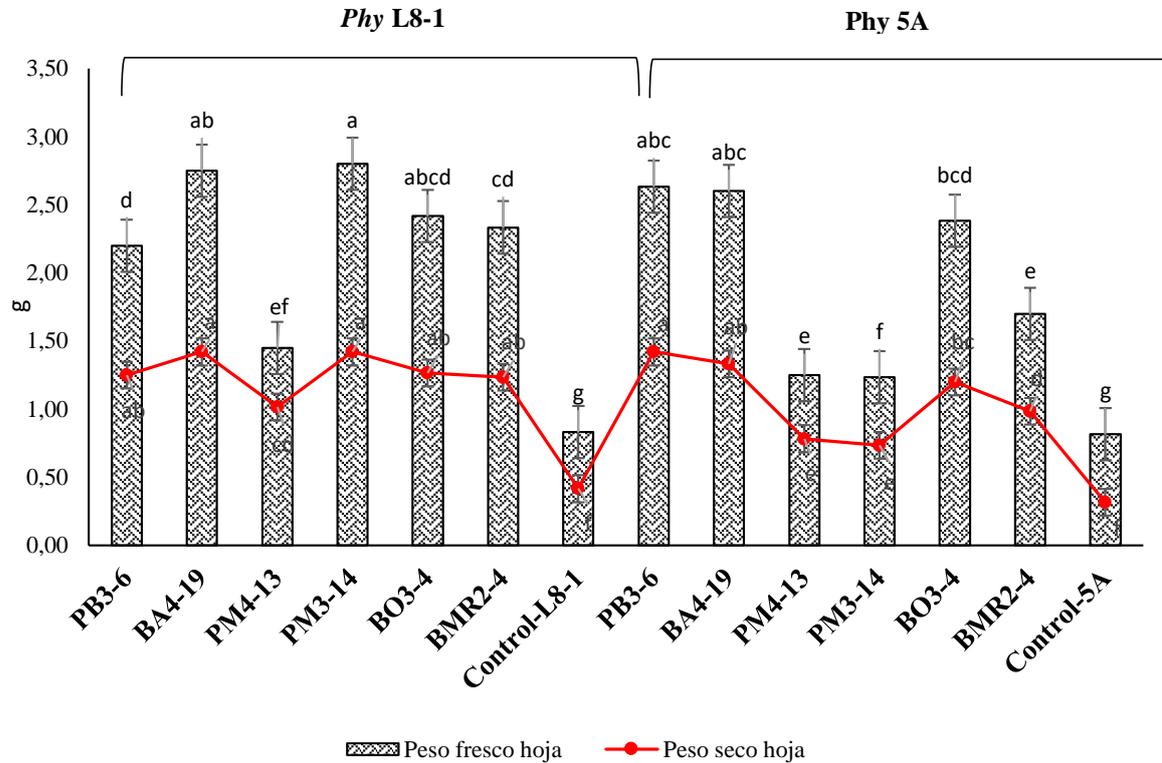
4.2.4. Peso fresco y seco de la hoja

La evaluación de peso fresco de hoja en plántulas de *T. cacao* CC51 se realizó al final del experimento. La cepa *E. asburiae* PM3-14, inoculada con *P. palmivora* L8-1 presentó el mayor peso fresco 2.8 g, seguidamente las cepas *P. putida* PB3-6 y *E. asburiae* BA4-19 con *P. palmivora* 5A obtuvieron un promedio de 2.63 g respectivamente.

La evaluación de peso seco de hoja las cepas *E. asburiae* (BA4-19 y PM3-14) con *P. palmivora* L8- presentaron un promedio de 1.42 g. La cepa *P. putida* PB3-6 con *P. palmivora* 5A presentó un promedio de 1.40 g de peso seco de la hoja. (Figura 14).

Figura 14.

Peso fresco y seco foliar de plantas de cacao CCN-51. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).



4.3. Actividad antagonista de las rizobacterias sobre *P. palmivora*. en mazorca de cacao (*Theobroma cacao*).

4.3.1. Aplicación de sobrenadantes bacterianos en mazorcas inoculadas con *P. palmivora*.

La aplicación de sobrenadantes bacterianos en mazorcas de *T. cacao* CC51 muestran actividad antagonista sobre *P. palmivora*. Para la evaluación de inhibición de *P. palmivora*, se evaluó a las 24, 48 y 72 horas. Los sobrenadantes bacterianos de *P. putida* BMR2-4 con *P. palmivora* L8-1, presentó mayor inhibición entre los demás tratamientos con porcentajes de 16, 50 y 90% respectivamente. Los sobrenadantes bacterianos de *E. asburiae* BA4-19 con *P. palmivora* 5A obtuvo porcentajes de inhibición del 16, 60 y 85%. (Figura 15 y 16).

Figura 15.

Evaluación del efecto inhibitorio de los sobrenadantes bacterianos frente a *P. palmivora* en mazorcas de cacao CCN-51. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

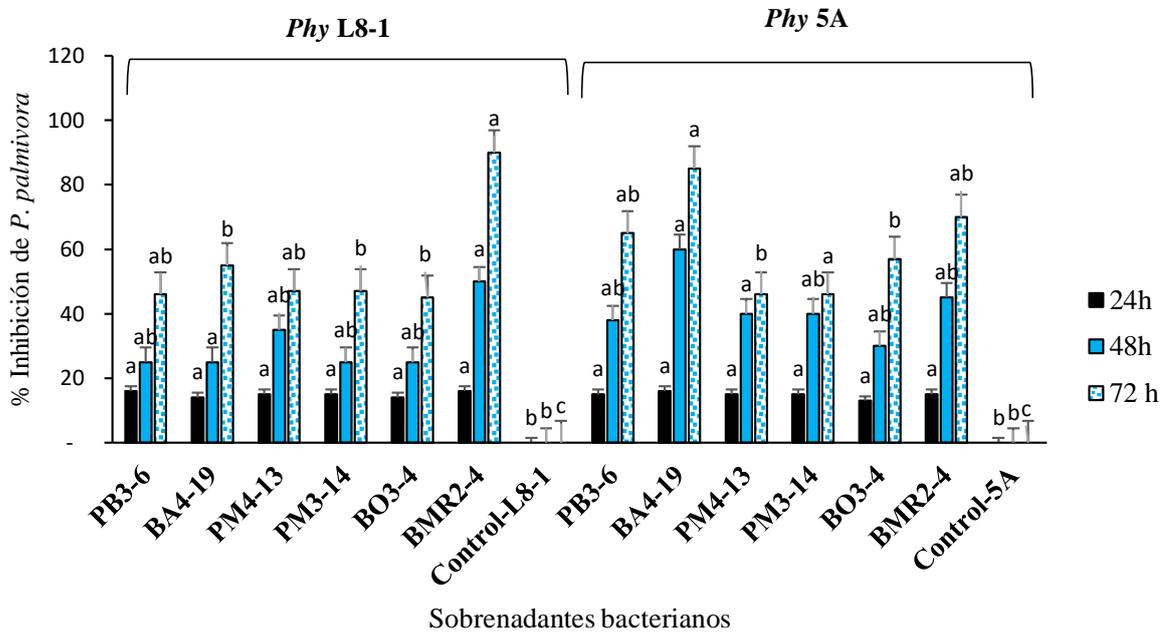
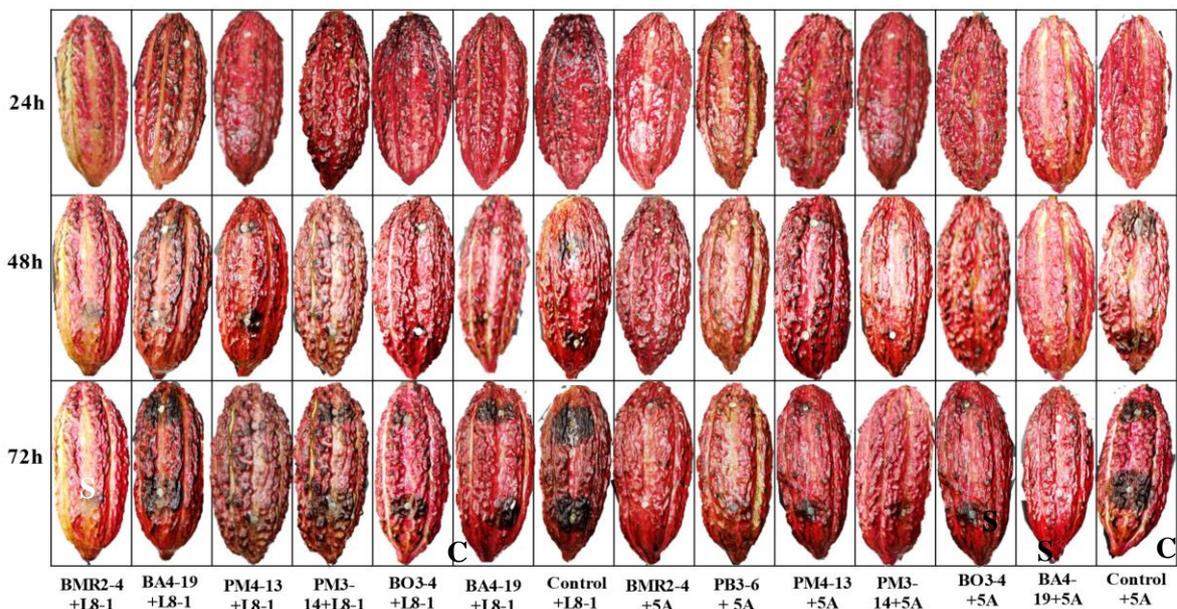


Figura 16.

Actividad antagonista de los sobrenadantes bacterianos en mazorcas de cacao CCN-51. (C= mazorcas con necrosis. S= mazorcas sin necrosis).



4.3.2. Inhibición de *P. palmivora* en la sección transversal de mazorcas bajo efecto de sobrenadantes bacterianos.

La inhibición transversal de mazorcas de cacao se evaluó a las 96 horas después de inocular el patógeno. Los sobrenadantes de la cepa *E. asburiae* BA4-19 con *P. palmivora* 5A presentó 50% de inhibición, mientras que los sobrenadantes de la cepa *P. putida* BMR2-4 con *P. palmivora* L8-1, mostró un porcentaje de inhibición del 40%. A diferencia del control sin aplicación de los sobrenadantes bacterianos se manifestó un crecimiento normal del patógeno (Figura 17 y 18).

Figura 17.

Evaluación del efecto inhibitorio transversal de los sobrenadantes *P. palmivora*. en mazorcas de cacao CCN-51. Evaluado a las 96 horas. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

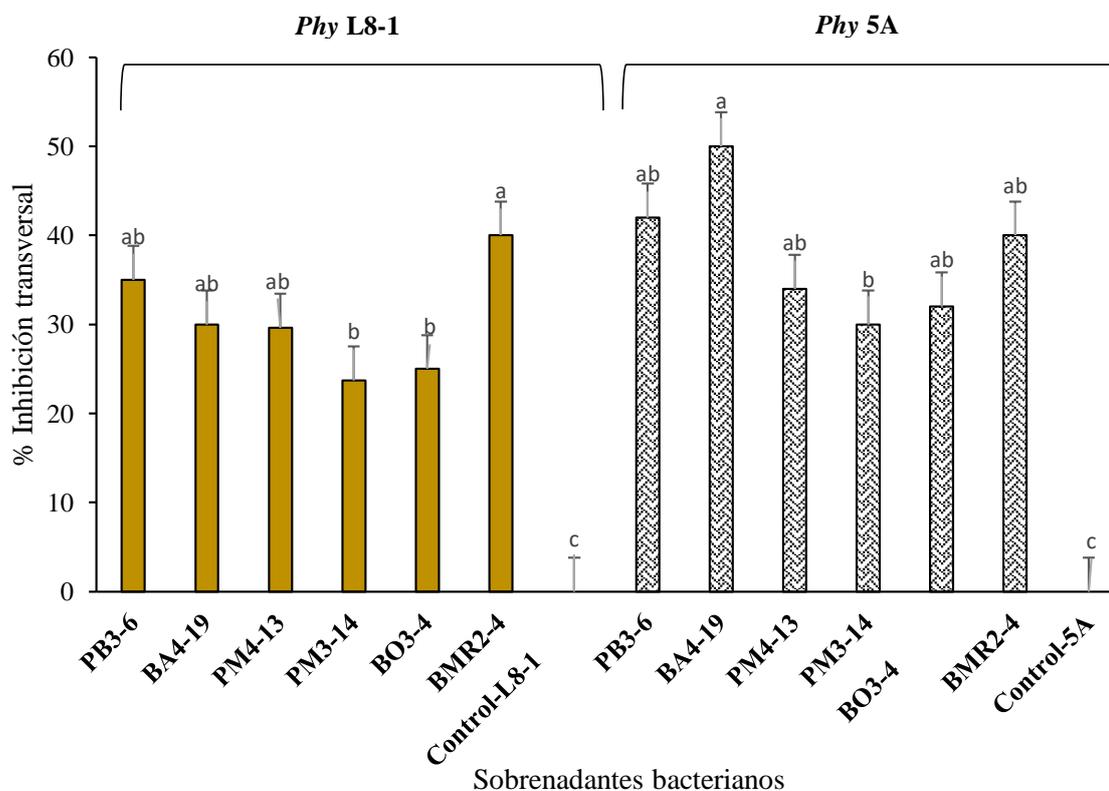
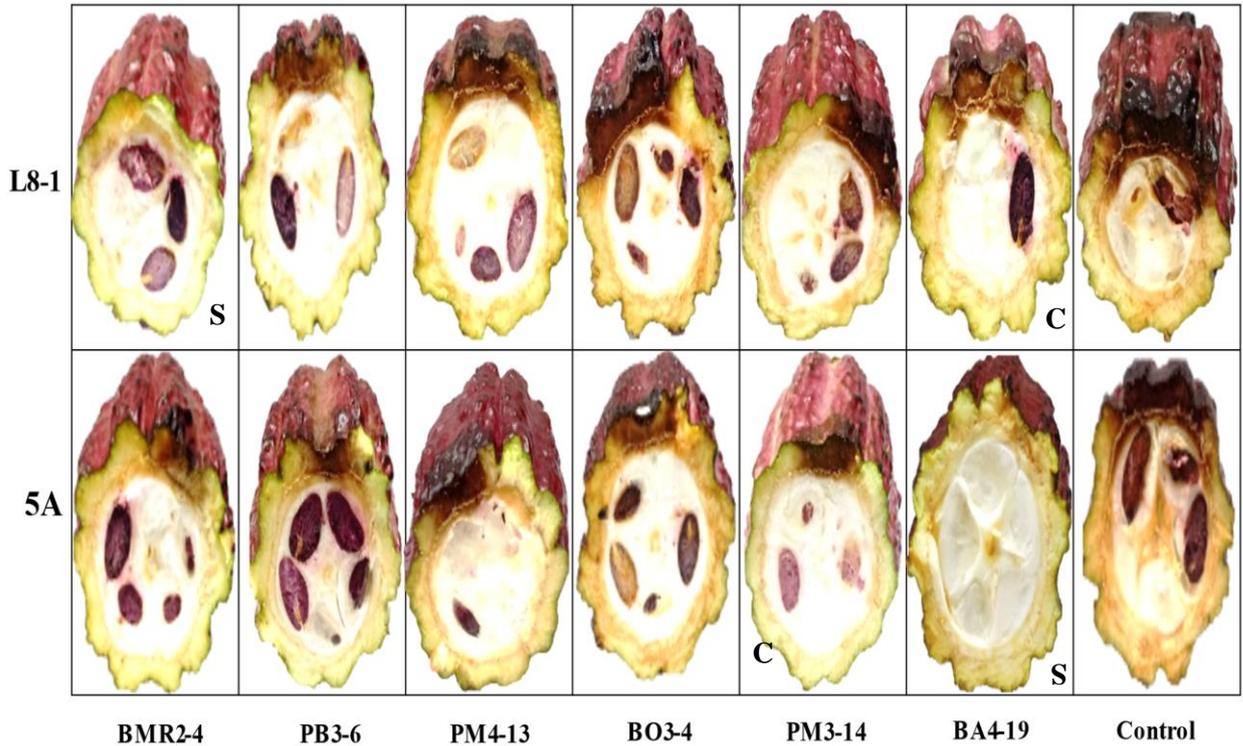


Figura 18

Efecto inhibitorio de los sobrenadantes bacterianos en la sección transversal de las mazorcas de cacao CCN-51. (C= mazorcas con necrosis, S= mazorcas sin necrosis).



4.4. Aplicación de bacterias antagonistas en mazorcas inoculadas con *P. palmivora*

La aplicación de las bacterias en mazorcas de *T. cacao* CC51, muestran actividad antagonista sobre *P. palmivora*. Para la evaluación de inhibición de *P. palmivora* en mazorcas de cacao, se evaluó durante 24, 48 y 72 horas. La bacteria *P. putida* BMR2-4 con *P. palmivora* L8-1, presentó mayor porcentaje inhibición entre los demás tratamientos, con porcentajes de 16, 47 y 80% respectivamente. La bacteria *E. asburiae* BA4-19 con *P. palmivora* 5A obtuvo porcentajes de inhibición del 20, 50 y 90%. En comparación con el control sin aplicación de las bacterias presentó un crecimiento normal de *P. palmivora* (Figura 19 y 20).

Figura 19.

Evaluación del efecto inhibitorio de las bacterias frente a *P. palmivora* en mazorcas de cacao CCN-51. el porcentaje de inhibición de las rizobacterias en mazorcas de cacao CCN-51, evaluados bajo 3 periodos de 24, 48 y 72 horas. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

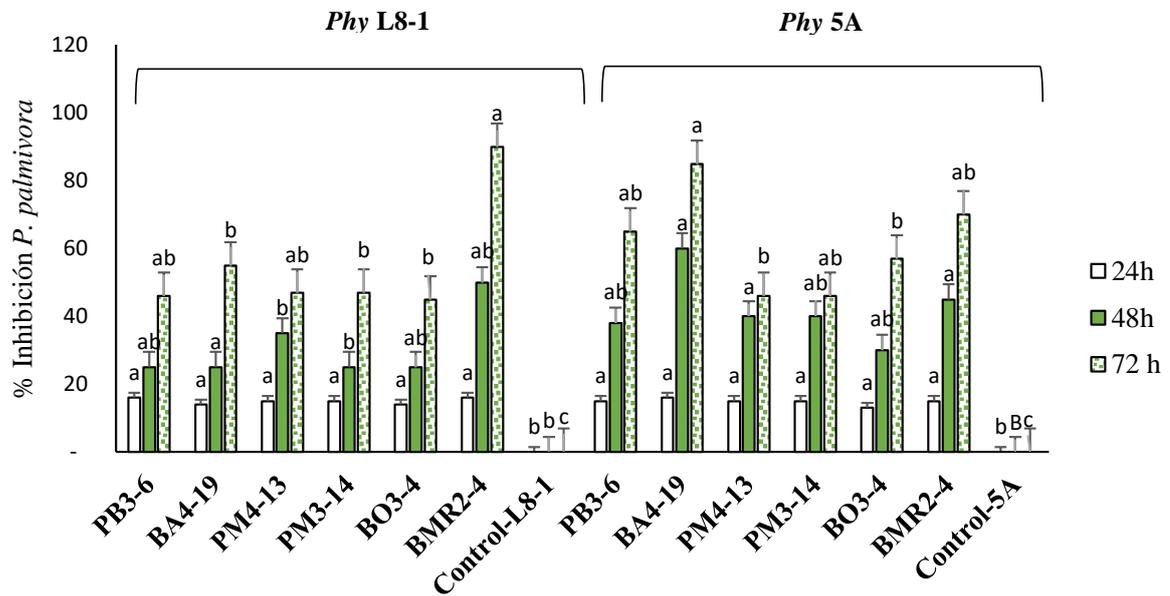
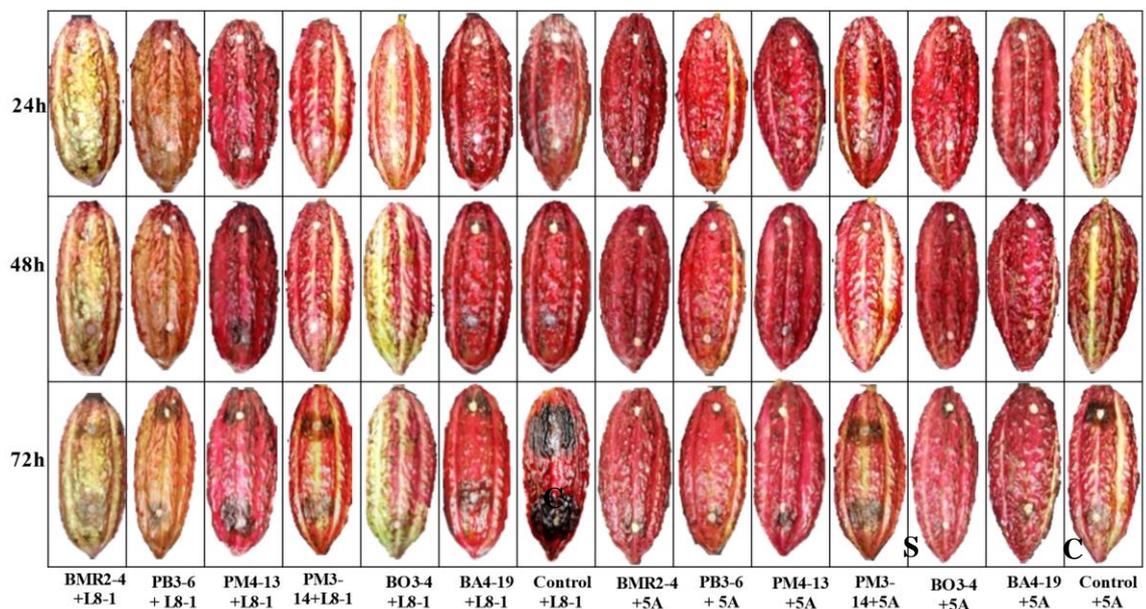


Figura 20.

Actividad antagonista de las bacterias en mazorcas de cacao CCN-51. (C= mazorcas con necrosis. S= mazorcas sin necrosis).



4.4.1. Inhibición de *P. palmivora* en la sección transversal de mazorcas bajo efecto de bacterias antagonicas

La inhibición transversal de mazorcas de cacao se evaluó a las 96 horas después de inocular patógeno. La bacteria cepa *P. putida* BMR2-4 con *P. palmivora* 5A presentó 75% de inhibición, mientras que los sobrenadantes de la cepa *P. putida* BMR2-4 con *P. palmivora* L8-1, mostró un porcentaje de inhibición del 79%. A diferencia del control sin aplicación de las bacterias se manifestó un crecimiento normal del patógeno (Figura 21 y 22).

Figura 21.

Evaluación del efecto inhibitorio transversal de las bacterias frente a *P. palmivora* en mazorcas de cacao CCN-51 evaluado a las 96 horas. Las barras de error indican \pm Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

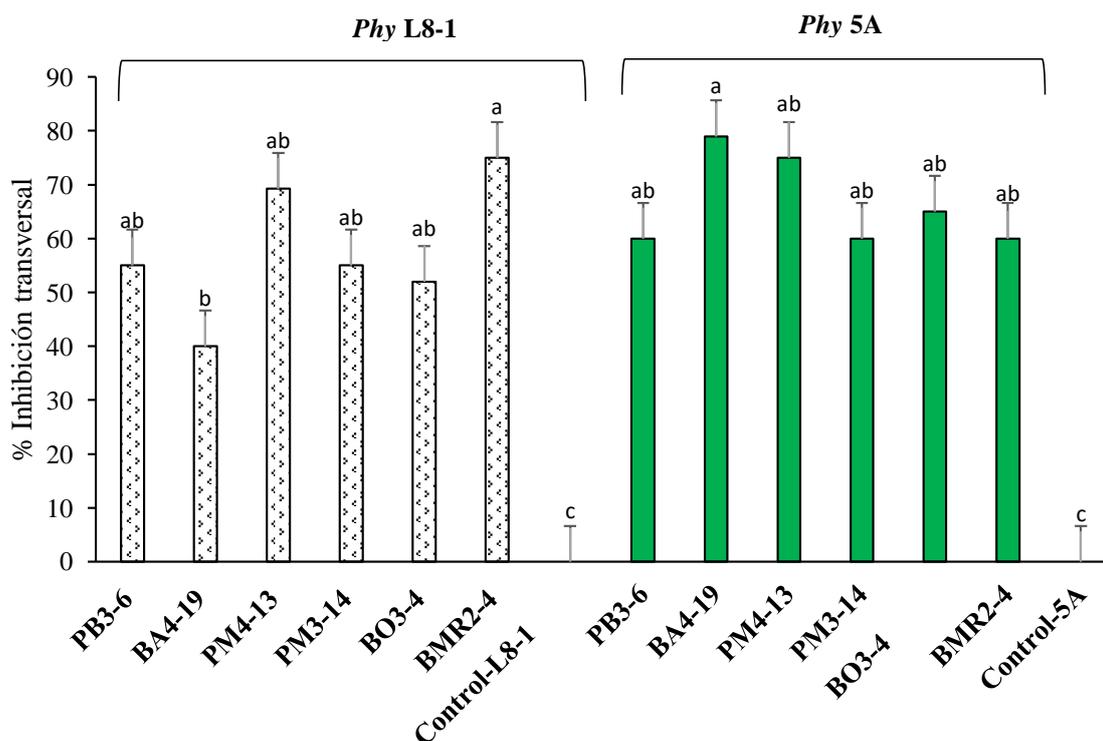
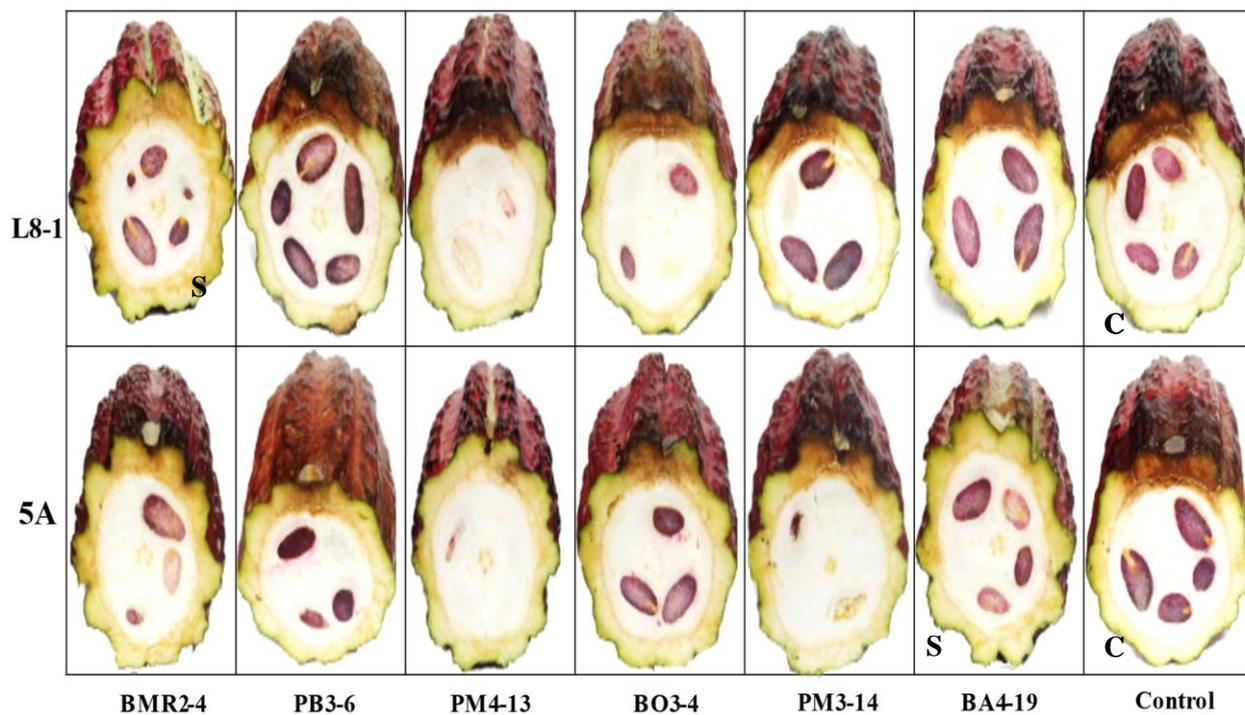


Figura 22.

Efecto inhibitorio de las bacterias antagónicas en la sección transversal de las mazorcas de cacao CCN-51. (C= mazorcas con necrosis, S= mazorcas sin necrosis).



4.5. Discusión

4.5.1. Efecto de los metabolitos secundarios de las rizobacterias sobre las estructuras de resistencias y propagación de *P. palmivora*.

El porcentaje de lisis sobre las clamidosporas de *P. palmivora*, por efecto de los sobrenadantes se evaluaron durante 3 periodos, donde los sobrenadantes de la cepa *P. putida* BMR2-4 con *P. palmivora*. cepa L8-1, presentó el mayor porcentaje de lisis. De manera similar en un estudio de Joon-Hee *et al.*, (52) expuso que la cepa bacteriana *Chromobacterium* sp. JH7 suprimió la formación de conidiación, la germinación de conidios y la formación de clamidosporas, estos microorganismos parecen estar asociado a la secreción de compuestos biológicos. Las PGPR de esta investigación tiene la particularidad de producir compuestos como: Proteasa, HCN- cianuro de hidrogeno, pirrolnitrina, 2,4-DAPG, sideróforos. ocasionan inhibición sobre el crecimiento micelial y estructuras del patógeno. Según Kumari, Khanna y Singh, (31). La degradación o lisis de la pared celular de las clamidosporas de *Phytophthora palmivora* es ocasionada por la acción de los metabolitos secundarios de las rizobacterias.

El porcentaje de lisis en clamidosporas de *P. palmivora*, por efecto de la adición directa de las PGPR ejerce un efecto mayor sobre las clamidosporas, aumentado lisis celular. Esto se debe a la presencia de otros compuesto a metabolitos secundarios que estarían secretando y aumentaron el daño sobre las clamidosporas causando la ruptura de la membrana. La cepa *P. putida* BMR2-4 con el patógeno *P. palmivora*. cepa L8-1, obtuvo el mayor porcentaje de lisis. De manera semejante Baruch *et al.*, (33), en su investigación expuso que aislados de *Pseudomonas fluorescentes* inhibición la germinación de clamidosporas. Así mismo Galeano *et al.*, (41) manifiesta que la bacteria *S. marcescens* cepa GIBI127 inhibió la germinación de clamidosporas de *Fusarium*. Esto coincide con lo descrito por Toyota y Kimura (46), Cuatro aislamientos de *Pseudomonas* spp. suprimieron la formación de clamidosporas a partir del micelio y dos aislamientos identificados como *Pseudomonas stutzerin* redujeron notablemente la germinación de clamidosporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* en agua destilada y en una solución nutritiva, estas bacterias podrían ser agentes efectivos para inducir la muerte del patógeno.

Los componentes como los sideróforos que son producidos por las bacterias y son secretados por las bacterias seleccionadas (BA4-19, PM3-14, BO3-4) corresponderían otros del mecanismo antagónico hacia problemas fúngicos. Trabajos en aplicación de sobrenadantes de *Pseudomonas aeruginosa* producen compuestos que inhiben notablemente la formación de esporangios de *P. capsici* (53). Las rizobacterias tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios entre ellos los sideróforos actúan como secuestradores o quelantes del hierro, ejercen un mecanismo de inhibición a fitopatógenos, las bacterias sintetizan sideróforos regulando la concentración de hierro en el medio a través de su quelación (Fe^{3+} -sideróforo), ocasionando que este metal no se encuentre disponible como alimento para los hongos (21).

Los esporangios tratados con bacterias se evaluaron durante un periodo de 24, 48 y 72 horas. Las cepas (*P. putida* BMR2-4, *P. fluorescens* BA4-19 y *P. fluorescens* PM3-14) inoculada con el patógeno *P. palmivora*, cepa 5A, presentaron el mayor porcentaje de lisis. De igual forma Khatun et al., (53) observaron que aislados bacterianos *B. cepacia*, *B. metallica*, *P. arruginosa* redujeron el número de formación de esporangios en las hifas de *P. capsici*.

Los esporangios presentaron mal formaciones en la membrana celular por la adición de bacterias y sobrenadantes, siendo otro de los efectos secundarios ocasionado de las PGPR hacia esporangios. Esto concuerda con lo descrito por Guyer et al., (57) de forma similar observaron anomalías morfológicas en las estructuras del oomycete como irregularidades en esporangios, hinchazón de hifas y en tubos de germinación, además se determinó una reducción significativa de esporangióforos y esporangios germinados mediante la inoculación de la cepa bacteriana *P. chlororaphis* R47 y *P. protegens* CHA0.

Las zoosporas fueron evaluadas en distintos estados como: zoosporas móviles, lisadas, quistes germinados y no germinados en respuesta a los sobrenadantes producidos por las rizobacterias. Los metabolitos de las cepas PM4-13 inoculadas con 5A y BA4-19 inoculadas con L8-1 se observó el mayor porcentaje de las zoosporas perdieron la movilidad, se presentó zoosporas con quistes germinados y quistes no germinados. De manera similar Khatun et al., (53) en su estudio, observaron zoosporas de *P. capsici* inmóviles y zoosporas lisadas al ser tratadas con sobrenadantes bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad lítica de los sobrenadantes producidos por las cepas *P. fluorescens* 021V y 039t sobre las zoosporas de *P. infestans*, se debe a su composición química que permite una afinidad con

la membrana de la zoospora (63). Los sobrenadantes bacterianos intercalan en la membrana plasmática y generan un desequilibrio en su integridad y permeabilidad, ocasionando ruptura de la membrana y liberación del contenido citoplasmático (64).

Las PGPR en este trabajo son productoras de antibióticos puede estar involucrados en la supresión del agente *P. palmivora* y la inhibición de las zoosporas. De manera similar Howell y Stipanovic (47), menciona que otras cepas de *Pseudomonas* producen al menos siete metabolitos antifúngicos que intervienen en el control biológico sobre patógenos como son: pirrolnitrina, pioluteorina, cianuro hidrogenético, 2-4diacetilflorogucinol, monoacetilfloroglucinol, lipopéptido orfamida A y toxoflavina.

La cepa *P. putida* BMR2-4 inoculada con las dos cepas de *P. palmivora* L8-1 y 5A se determinó que las zoosporas perdieron la movilidad, se observaron porcentajes altos de zoosporas lisadas, quistes germinados, quistes no germinados. Este resultado corrobora con lo descrito por Yang y Hong (49), manifiesta que las bacterias pueden competir con los patógenos por nutrientes o incluso por parasitismo de especies de *Phytophthora*, pueden atacar las estructuras del oomycete como zoosporas, hifas y oosporas. Las bacterias *Pseudomonas fluorescens* productoras de biosurfactante ramnolípidos generan un mecanismo de lisis en las zoosporas de *Phytophthora*, éste se intercala en la membrana plasmática de la zoospora y la interrumpe. Provocando que la zoospora cese su motilidad y luego la zoospora explote impidiendo su propagación (64).

4.5.2. Evaluación de los niveles de protección de las rizobacterias en las plantas de cacao (*T. cacao*). frente a *P. palmivora*.

En este ensayo se observaron los efectos bioestimulantes y protección de las PGPR entre ellos los niveles de protección, peso radicular, longitud de la planta, longitud de raíz, humedad foliar, número de hojas. En la evaluación de los niveles de protección en plántulas de cacao, las cepas que expresaron mayor protección fueron (*P. fluorescens* PM3-14 y *P. putida* BMR2-4) demostraron con un porcentaje inhibitorio del 100% con presencia del patógeno *P. palmivora*. cepa L8-1. Del mismo modo Hernández Rodríguez *et al.*, (17) observó en su investigación que dos cepas *Pseudomonas sp.* presentaron actividad antagonista y son potencialmente eficientes en el control de *Phytophthora* en el cultivo del

cacao. Esto concuerda con lo planteado por Hernández Rodríguez *et al.*, (18) donde se han utilizado diversos géneros bacterianos con el objetivo de beneficiar cultivos de interés agrícola ejerciendo un control biológico hacia patógenos. Las PGPR son bacterias que presentan grandes propiedades entre las más importantes: promueven el crecimiento vegetal, resistencia a la planta, inhiben el crecimiento de agentes causales de enfermedades en plantas y productoras de metabolitos secundarios (65).

La cepa *P. putida* BMR2-4, con el patógeno L8-1 *P. palmivora* obtuvo un mayor promedio de peso radicular entre los tratamientos. Este incremento de peso radicular deriva de la producción de AIA esta hormona son producida por las bacterias *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4. Acorde con los datos de Esmeraldas (50), en cultivo de cacao las rizobacterias ejercieron un efecto estimulante demostrando el mayor desarrollo radicular entre los tratamientos con peso con 0.72 g respectivamente al ser inoculadas con *P. fluorescens*.

Mientras que Macías (66) determinó que la aplicación de las cepas seleccionadas en su experimento (BF-567, MH-18, FZ 9-7, MN 5-20, AC-3, LH 5-10, MH 4-20, MN 5-19 y PV-25) presentaron un efecto bioestimulante en la longitud radicular y peso radicular. En una investigación la aplicación de la cepa de *Pseudomonas* spp. S6 presentó efecto inhibitorio frente a *P. cinnamomi*, seguidamente se observó un mayor desarrollo del sistema radicular en invernadero en plantas inoculadas con la cepa de *Pseudomonas* spp. S10 (22).

La cepa *E. asburiae* BA4-19 obtuvo un aumento de longitud en plantas inoculadas con L8-1 *P. palmivora*. Estos resultados coinciden con Zambrano Guerrero (44) en su investigación, expresó un crecimiento de las plantas de cacao a las 4 semanas con el T3 (*P. protegens* CHA0), T5 y T6 que contenían bacterias y patógeno. Tal como lo indica Canchignia Martínez *et al.*, (13) manifiesta que las plantas expresan señales de defensa, la RSI por activación de bacterias PGPR, induce a la producción de fitohormonas etileno (ET) y ácido jasmónico (JA), aquellas que favorecen a la planta mantener un estado de imprimación con la finalidad de responder al ataque de agentes patógenos.

4.5.3. Actividad antagonista de las rizobacterias sobre *P. palmivora*. en mazorca de cacao (*Theobroma cacao*).

La evaluación en 3 periodos la actividad antagonista de las bacterias sobre el crecimiento de 2 cepas de *P. palmivora* en mazorcas de cacao CCN-51, destacándose la bacteria *E.*

asburiae BA4-19 inoculada con *P. palmivora* 5A presentó altos porcentajes de inhibición y en la sección transversal de las mazorcas. Concordando con los datos de Macías (66), en su investigación revela que la cepa FZ 9-7 inhibió el desarrollo micelial del hongo *Phytophthora palmivora*. Por su parte Hernández Rodríguez (58) demostraron que las cepas CP07 y CP30 de *Pseudomonas* spp. ejercieron un efecto antagónico sobre *P. palmivora* en experimentos in vivo utilizando mazorcas de cacao, donde se evidenció disminución del crecimiento del patógeno. En este sentido Valencia Cantero y Villegas Moreno (39), exponen que los sideróforos participan en el efecto inhibitorio de las rizobacterias *Pseudomonas fluorescens* hacia los patógenos vegetales.

En la evaluación de los sobrenadantes bacterianos con actividad inhibitoria hacia *P. palmivora*, la cepa *P. putida* BMR2-4 obtuvo mayor porcentaje de inhibición frente al *P. palmivora* L8-1 demostró obtener elevados porcentajes de inhibición y en la sección transversal de las mazorcas. Los resultados del presente trabajo contrastan con Harris Valle, *et al.*, (30) quienes al evaluar la actividad antagonista de las rizobacterias sobre el crecimiento del patógeno *Phytophthora infestans*. En otros estudios resaltan que la bacteria *P. putida* es ampliamente estudiada por su potencial aplicación en la biorremediación y por su actividad antagónica, es probable que esta cepa porte genes aún por descubrir, ligados con la inhibición de patógenos (58).

De forma similar, Chávez Arteaga (34), obtuvo en sus resultados que los sobrenadantes bacterianos de *P. protegens* y *P. fluorescens* presentaron mayor actividad antagónica sobre el crecimiento en diámetro del micelio del patógeno. Otro estudio, señala Mamani Huanca (37), que los metabolitos secundarios producidos por *Pseudomonas rhizosphaerae* inhibieron el crecimiento de *Fusarium verticillioides*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENACIONES

5.1. Conclusiones

- Las rizobacterias y sobrenadantes bacterianos ejercieron un control eficiente sobre las estructuras de resistencia y propagación de *Phytophthora palmivora*. Las cepas BMR2-4 y BA4-19, presentaron el mayor porcentaje 35% y 90%, sobre las estructuras de *P. palmivora* (zoosporas, clamidosporas y esporangios).
- La aplicación de las rizobacterias seleccionadas ejercieron un efecto estimulante en plantas de cacao CCN-51. En las variables escogidas, las cepas PM3-14, BMR2-4, BA4-19 presentaron el mayor porcentaje de niveles de protección en un 100% en presencia del patógeno. Asimismo, se evidenció una longitud radicular hasta 21.65 cm, peso radicular 2.97 g, humedad foliar 72%, número de hojas con un promedio de 8.6 hojas por planta y peso fresco total y longitud de la planta 7.58 g y 23.5 cm.
- Los valores alcanzados en los ensayos de inhibición de las cepas de *Phytophthora palmivora* ocasionada por las cepas BMR2-4 y BA4-19, alcanzaron porcentajes 20%, 50% y 90% de inhibición en el crecimiento del oomicete en estudio. En la sección transversal de la mazorca, obtuvo un porcentaje de inhibición hasta 79%, de manera semejante los sobrenadantes bacterianos de las cepas mencionadas anteriormente redujeron el número de esporas en un porcentaje de 16%, 50%, y 90% respectivamente, en la sección transversal presentó un 50% de inhibición.

5.2. Recomendaciones

- Utilizar las cepas bacterianas *P. putida* BMR2-4 y *E. asburiae* BA4-19 que presentaron alto porcentaje de inhibición para *Phytophthora palmivora* en esta investigación, para aplicarlas en ensayos a nivel de campo.
- Realizar análisis cromatográficos, para identificar los metabolitos secundarios producidos por las cepas bacterianas estudiadas vinculadas con la inhibición de *P. palmivora*.
- Aplicar las cepas bacterianas *P. putida* BMR2-4 y *E. asburiae* BA4-19 que presentaron mayor porcentaje de lisis en zoosporas, clamidosporas y esporangios de *P. palmivora*, en las estructuras de otros patógenos fúngicos de interés agrícola.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Referencias bibliográficas

1. Morales J, García A, Méndez E. ¿Qué sabe usted acerca de Cacao? [Internet]. Vol. 43. Revista mexicana ciencias farmacéuticas; 2012. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57928311010.pdf>
2. Quintero R, Díaz Morales K. El mercado mundial del cacao. Agroalimentaria [Internet]. 2004 [citado el 24 de mayo de 2022];9(18):47–59. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542004000100004
3. Sánchez Arizo V, Zambrano Mendoza J, Iglesias C. La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe. Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina 2019; 2019.
4. Santos C, Administrativo F, Académico V, Vargas A, Carlos I, Trejo A, et al. Dra. Leticia de Moral -Presidenta del Consejo de Regentes Gilda Alcívar García, Ph.D. -Rector Universidad ECOTEC [Internet]. Edu.ec. [citado el 24 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://ecotec.edu.ec/content/uploads/investigacion/sociedad-del-conocimiento/2020-memorias-cientificas.pdf>
5. Ibarra Velásquez A. Análisis de la cadena de cacao en la provincia de los ríos, Ecuador. Observatorio de la Economía Latinoamericana [Internet]. 2019 [citado el 24 de mayo de 2022];(noviembre). Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/oel/2019/11/cadena-cacao-ecuador.html>
6. Jácome Romero D. Identificación de *Phytophthora palmivora* como el agente causal de a pudrición del cogollo en palmito (*Bactris gasipaes*) en el Ecuador. PUCE; 2016.

7. González J. Caracterización Morfológica e Identificación Genética de un Oomiceto Fitopatógeno y su Interacción con *C. chinense*. centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de jalisco, a.c; 2017.
8. Bailey B, Meinhardt L. Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters [Internet]. 1a ed. Bailey BA, Meinhardt LW, editores. Basel, Switzerland: Springer International Publishing; 2016. Disponible en: <https://books.google.at/books?id=H2KhCwAAQBAJ>
9. Showkat S. Biological control of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* Sp. By *Pseudomonas fluorescens* isolated from wheat rhizosphere soil of Kashmir. IOSR J Pharm Biol Sci [Internet]. 2012 [citado el 24 de mayo de 2022];1(4):24–32. Disponible en: <https://www.iosrjournals.org/iosr-jpbs/papers/vol1-issue4/G0142432.pdf>
10. Dwivedi D, Johri B. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. Curr Sci [Internet]. 2003;85(12):1693–703. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/24109974>
11. Phillips Mora W, Cerda Bustillo R. Catálogo de enfermedades del cacao en Centroamérica. 2013.
12. Matilla M. Bacterias rizosféricas como fuente de antibióticos. Matilla M, Krell T Bacterias rizosféricas como fuente de antibióticos Alianzas y Tendencias BUAP [Internet] [Internet]. 2017 [citado el 24 de mayo de 2022];2(1):14–21. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/9181>
13. Canchignia Martínez H, Cruz Rosero N, Barrera Alvarez A, Morante Carriel J, Canchignia Malagón G, Peñafiel Jaramillo M. Aplicación de rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género “*Pseudomonas*” spp como controladores

biológicos de insectos y nematodos-plagas. Cienc tecnol [Internet]. 2015 [citado el 24 de mayo de 2022];8(1):25–35. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-y-tecnologia-quevedo/articulo/aplicacion-de-rizobacterias-que-promueven-el-crecimiento-en-plantas-pgpr-del-genero-pseudomonas-spp-como-controladores-biologicos-de-insectos-y-nematodos-plagas>

14. Barazarte H, Sangronis E, Unai E. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): Una posible fuente comercial de pectinas. Arch Latinoam Nutr [Internet]. 2008 [citado el 24 de mayo de 2022];58(1):64–70. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06222008000100009&script=sci_abstract

15. Sánchez Mora F. GFF. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. in the crop of cocoa. Scientia Agropecuaria. 8 de Agosto 2012;3:249–58.

16. Coto R. Conceptos Introdutorios a la Fitopatología. Euned; 1999.

17. Hernández Rodríguez , Ruíz Beltrán Y, Acebo Guerrero Y, Miguélez Sierra , Heydrich Pérez. Microbial antagonists to manage black pod rot in *Theobroma cacao* L. Their present status and perspective use in Cuba. Protección Vegetal. 2014;29:11-19.

18. Hernández Rodríguez A, Heydrich Pérez M, Velázquez del Valle G, Hernández Lauzardo AN., Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. Revista Mexicana de Fitopatología. 2006;42–9.

19. Bailey B, Evans H, Phillips-Mora W, Ali S, Meinhardt LW. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot: Frosty pod rot of cacao. Mol Plant Pathol [Internet].

2018 [citado el 24 de mayo de 2022];19(7):1580–94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12648>

20. Perrine Walker F. *Phytophthora palmivora*–cocoa interaction. J Fungi (Basel) [Internet]. 2020 [citado el 24 de mayo de 2022];6(3):167. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/3/167>

21. Villarreal Delgado F, Villa Rodríguez D, Cira Chávez A, Estrada Alvarado I. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Revista Mexicana de Fitopatología. 2018;36:95-130.

22. Izzeddin N ML. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. Salus. 2011;15:8–12.

23. Vélez zambrano, V. Situación actual de *Phytophthora palmivora* en cultivos de importancia agrícola [Internet]. Cidecuador.org. [citado el 24 de mayo de 2022]. Disponible en: https://cidecuador.org/wp-content/uploads/congresos/2019/x-congreso-latinoamericano-de-agronomia/diapo/situacion-actual-de-phytophthora-palmivora-en-cultivos-de-importancia-agricola_sergio-velez.pdf

24. Guadalupe G. Mecanismos de defensa inducidos por la combinación de *Trichoderma harzianum* y quitosano en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) contra *Phytophthora drechsleri*. [Guadalajara, Jalisco]: Centro de investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.; 2014.

25. Pico J, Bertin O, Yáñez E. Manejo integrado de los principales problemas fitosanitarios del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), en la Amazonía Ecuatoriana. Sacha, EC: INIAP, Estación Experimental Central de la Amazonía, 2014; 2019.

26. Enríquez G. Curso sobre el cultivo de cacao. Turrialba: CATIE; 1985.
27. Blancard, Dominique., Laterrot, Henri, Marchoux, Georges, et al. Enfermedades del tomate: identificar, conocer, controlar. 2011.
28. Porter L, Johnson D. Survival of *Phytophthora infestans* in surface water. *Phytopathology* [Internet]. 2004;94(4):380–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.2004.94.4.380>
29. Guevara R, Pons J, Torres I, González M. Manual práctico para el cultivo del chile. La Villa y Corte de Madrid: Mundi-Prensa Libros; 2018.
30. Harris Valle C, Bonilla Pioquinto E, Palafox Rodríguez M. Antagonismo de microorganismos nativos sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary aislada de *Solanum tuberosum* L. *CIBA Rev Iberoam las Cienc Biol Agropecu* [Internet]. 2020 [citado el 25 de mayo de 2022];9(17):23–43. Disponible en: <https://www.ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/96>
31. Dubey S, Singh S, Singh B. Morphological and pathogenic variability of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceriscausing chickpea wilt. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz* [Internet]. 2010;43(2):174–90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/03235400802021108>
32. Porcel Roldan RC. Eso No Estaba En Mi Libro de Botanica. Almuzara; 2021.

33. Baruch S, Dupler M, Elad Y, Baker R. hlamydospore Germination of *Fusarium Oxysporum* f.sp. cucumerinum as Affected by Fluorescent and Lytic Bacteria from a *Fusarium*-Suppressive Soil. *Ecology y epidemiology*. 1984;74:1115–24.
34. Chávez T. identificación y selección de rizobacterias del género *Pseudomonas* spp de cultivares endémicos de *Musa* spp con actividad antagonista al hongo *Mycosphaerella fijiensis*. [Quevedo]: Universidad Técnica Estatal de Quevedo ; 2016.
35. Mardaneh J, Soltan Dallal MM. Isolation and identification *Enterobacter asburiae* from consumed powdered infant formula milk (PIF) in the neonatal intensive care unit (NICU). *Acta Med Iran [Internet]*. 2016 [citado el 24 de mayo de 2022];54(1):39–43. Disponible en: <https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/5387>
36. Silva , Martínez P. Complejo *Enterobacter cloacae*. *Revista chilena de infectología*. 2018;; p. 297-298.
37. Mamani Huanca L. Bacterias endófitas productoras de metabolitos con efecto antagonico contra *fusarium verticillioides*, principal fitopatógeno de cereales. 2019.
38. Pérez Morales L. Aislamiento de *Serratia marcescens* en herida quirúrgica Isolation of *Serratia marcescens* in a surgical wound. *Medisur*. 2017;15:538–44.
39. Valencia Cantero E VMJ. inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana*. 2005;81–8.

40. Cedeño A. Identificación molecular de *Phytophthora* spp, mediante el empleo de marcadores moleculares (ITS), y efecto antagonista de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). [Quevedo]: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2018.
41. Galeano Vanegas NF, Marulanda Moreno SM, Padilla Hurtado BE, Mantilla Afanador JG, Ceballos Aguirre N, Restrepo Franco GM. Antagonism of plant growth promoting rhizobacteria against the causal agent of the vascular wilting of tomato. Rev Colomb Biotecnol [Internet]. 2020 [citado el 24 de mayo de 2022];22(2):35–43. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752020000200035
42. Kang S, Khan A, Hamayun M, Shinwari Z, Kim Y-H, Joo G, et al. Acinetobacter calcoaceticus ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. 2012 [citado el 24 de mayo de 2022]; Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/f6ba22e71abe61b3fd4d61839edf00802990da1c>
43. Muñoz B. Rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) en el biocontrol del nematodo *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*). [Quevedo]: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2019.
44. Zambrano E. Actividad antagonista de *Pseudomonas veronii* R4 y *Pseudomonas protegens* CHA-0 contra *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao (*Theobroma cacao*). [Quevedo]: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2019.
45. Jousset A, Schuldes J, Keel C, Maurhofer M, Daniel R, Scheu S, et al. Full-genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas protegens* CHA0. Genome Announc [Internet]. 2014 [citado el 24 de mayo de 2022];2(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00322-14>

46. Toyota K, Kitamura M, Kimura M. Suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. raphani PEG-4 in soil following colonization by other *Fusarium* spp. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 1995;27(1):41–6. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003807179400134M>
47. Howell CR, Stipanovic RD. Control of *Rhizoctonia solani* on Cotton Seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and With an Antibiotic Produced by the Bacterium [Internet]. *Apsnet.org*. [citado el 24 de mayo de 2022]. Disponible en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1979Articles/Phyto69n05_480.PDF
48. Montes C, Altimira F, Canchignia H, Castro Á, Sánchez E, Miccono M, et al. A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: a grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. *Stand Genomic Sci* [Internet]. 2016 [citado el 24 de mayo de 2022];11(1):76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s40793-016-0198-y>
49. Yang X, Hong C. Biological control of *Phytophthora* blight by *Pseudomonas protegens* strain 14D5. *Eur J Plant Pathol* [Internet]. 2020;156(2):591–601. Disponible en: <https://www.proquest.com/docview/2343397527>
50. Esmeraldas G. Actividad antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) a *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja) en Cacao (*Theobroma cacao* L.). [Quevedo]: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2019.
51. Pérez Álvarez, Coto Arbelo , Echemendía Pérez , Ávila Quezada. *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Protección Vegetal*. 2015;30:225–34.

52. Han J, Park G, Kim K. Antagonistic Evaluation of *Chromobacterium* sp. JH7 for Biological Control of Ginseng Root Rot Caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Mycobiology* [Internet]. 2017 [citado el 24 de mayo de 2022];45(4):370–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.370>
53. Khatun A, Farhana T, Sabir AA, Islam SMN, West HM, Rahman M, et al. *Pseudomonas* and *Burkholderia* inhibit growth and asexual development of *Phytophthora capsici*. *Z Naturforsch C* [Internet]. 2018;73(3–4):123–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2017-0065>
54. Alarcón Montecé E. Potencial antagonista de rizobacterias *pseudomonas* spp nativas, frente a hongos patogénicos del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* l.). [Quevedo]: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2016.
55. Pinzón A. *Pseudomonas*. *Acta Med Colomb* [Internet]. 2019 [citado el 24 de mayo de 2022];44(1):52. Disponible en: <http://www.actamedicacolombiana.com/ojs/index.php/actamed/article/view/1370>
56. Miranda E. Efecto del residuo de café más la aplicación de *Pseudomonas putida* de forma edáfica en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). [Guayaquil]: Universidad Agraria del Ecuador ; 2020.
57. Guyer A, De Vrieze M, Bönisch D, Gloor R, Musa T, Bodenhausen N, et al. The anti-*Phytophthora* effect of selected potato-associated *Pseudomonas* strains: From the laboratory to the field. *Front Microbiol* [Internet]. 2015;6:1309. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01309>
58. De Vrieze M, Varadarajan AR, Schneeberger K, Bailly A, Rohr RP, Ahrens CH, et al. Linking comparative genomics of nine potato-associated *Pseudomonas* isolates with their

differing biocontrol potential against late blight. *Front Microbiol* [Internet]. 2020;11:857. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00857>

59. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología – INAMHI [Internet]. Gob.ec. [citado el 24 de mayo de 2022]. Disponible en: <http://www.inamhi.gob.ec/>

60. Leyton A, Urrutia H, Vidal JM, de la Fuente M, Alarcón M, Aroca G, et al. Actividad inhibitoria del sobrenadante de la bacteria Antártica *Pseudomonas* sp. M19B en la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum* 19749. *Rev Biol Mar Oceanogr* [Internet]. 2015 [citado el 24 de mayo de 2022];50(2):375–81. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572015000300016

61. Cedeño Moreira ÁV, Romero Meza RF, Auhing Arcos JA, Mendoza León AF, Abasolo Pacheco F, Canchignia Martínez HF. Characterization of *Phytophthora* spp. and application of rhizobacteria with biocontrol potential in black pod disease in *Theobroma cacao* variety CCN-51. *Sci Agropecu* [Internet]. 2020 [citado el 24 de mayo de 2022];11(4):503–12. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172020000400503&script=sci_arttext

62. Acebo Guerrero Y, Hernández-Rodríguez A, Vandeputte O, Miguélez-Sierra Y, Heydrich-Pérez M, Ye L, et al. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* from *Theobroma cacao* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora* (Butler). *J Appl Microbiol* [Internet]. 2015 [citado el 24 de mayo de 2022];119(4):1112–26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26218193/>

63. Rivera H, Martínez E, Osorio J, Martínez E. Evaluation of Biosurfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens* for Potato Late Blight Control (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) Under Controlled Conditions. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*. 2010;11

64. Stanghellini ME, Miller RM. BIOSURFACTANTS: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Dis* [Internet]. 1997 [citado el 24 de mayo de 2022];81(1):4–12. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30870944/>
65. Rifat H, Safdar A, Ummay A, Rabia , Iftikhar A. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbio*. 2010;; p. 579–598.
66. Macías J. Evaluación de bacterias solubilizadoras de minerales en el desarrollo morfológico de cacao CCN-51 y su capacidad protectora contra *Phytophthora palmivora*. [Quevedo]: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2021.

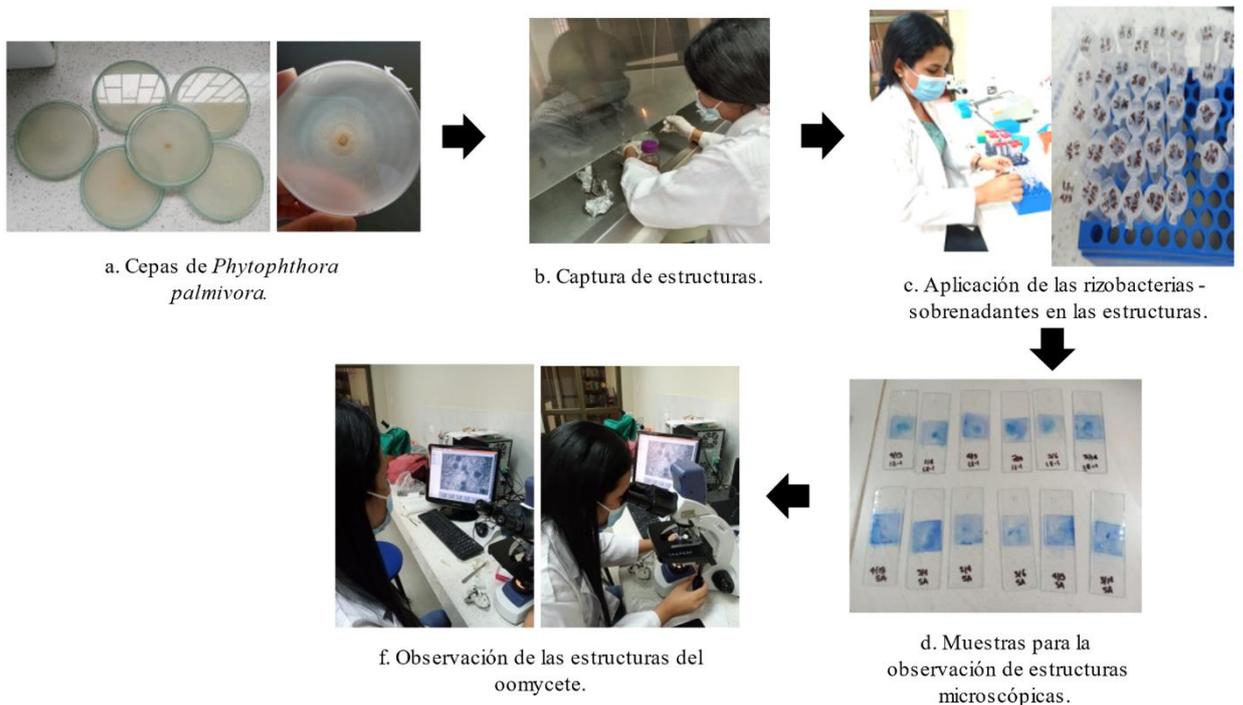
CAPÍTULO VII
ANEXOS

7.1. Anexos

Anexo 1. Obtención de sobrenadantes bacterianos.



Anexo 2. Ensayo efecto inhibitorio de las rizobacterias en las estructuras de resistencia y propagación de *Phytophthora palmivora*.



Anexo 3. Ensayo niveles de protección en plantas de cacao CCN-51.



Anexo 4. Ensayo antagonista en mazorcas de cacao CCN-51.



Anexo 5. Análisis de varianza de la variable Longitud de planta.

Lon planta

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Lon planta	42	0,57	0,37	12,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	270,03	13	20,77	2,86	0,0097
Cepas Phy (Factor a)	1,01	1	1,01	0,14	0,7126
Cepas bact (Factor b)	251,32	6	41,89	5,76	0,0005
Cepas Phy (Factor a)*Cepas..	17,70	6	2,95	0,41	0,8687
Error	203,45	28	7,27		
Total	473,48	41			

Anexo 6. Análisis de varianza de la variable peso fresco total.

Peso fresco total

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso fresco total	42	0,83	0,75	13,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	104,34	13	8,03	10,46	<0,0001
Cepas Phy (Factor a)	2,10	1	2,10	2,74	0,1089
Cepas bact (Factor b)	99,46	6	16,58	21,61	<0,0001
Cepas Phy (Factor a)*Cepas..	2,77	6	0,46	0,60	0,7260
Error	21,48	28	0,77		
Total	125,82	41			