



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

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

Título del Proyecto de Investigación:

“Actividad antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) a *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja) en Cacao (*Theobroma cacao* L.)

Autor:

Esmeraldas Garcia Gabriel Alejandro

Director del Proyecto de Investigación:

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2019

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, GABRIEL ALEJANDRO ESMERALDAS GARCÍA 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.

GABRIEL ALEJANDRO ESMERALDAS GARCIA

C.I: 131140002-0

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Egresado Gabriel Alejandro Esmeraldas Garcia, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado “Actividad antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) a *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja) en Cacao (*Theobroma cacao* L.)”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

Dr. Hayron Canchignia Martínez

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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



Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis Esmeraldas CTM.docx (D49119891)
Submitted: 3/14/2019 5:35:00 PM
Submitted By: hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance: 6 %

Sources included in the report:

ANTEPROYECTO sr. esmeraldas.docx (D42939579)
6.1 ESQUEMA REFERENCIAL DEL MARCO TEÓRICO - AUHING ARCOS JAVIER.docx (D36978624)
CAPÍTULO II Tesis de Grado Ricardo Romero.docx (D36763339)
tesiskarenchavezurkum-1.docx (D23242491)

Dr. Hayron Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Actividad antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) a *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja) en Cacao (*Theobroma cacao* L.)

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

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dra. Silvia Saucedo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Fernando Abasolo Pacheco

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Favio Herrera Eguez

Quevedo – Los Ríos - Ecuador

2019

DEDICATORIA

A Dios por acoplar todo para mi existencia.

A mis padres: “Marcos y Estrella”, sin sus células, sus enseñanzas, y sus esfuerzos, no hubiese realizado este trabajo.

Laura y Silvia, por brindarme su apoyo en todo sentido, por ayudarme en los momentos de angustia y siempre estar para mí a pesar de todo. A mis sobrinos y a mis cuñados que han aportado en mi desarrollo personal.

A mis pocos, pero reales amigos.

Y, por último, pero no menos importante (dicen que lo mejor se deja para lo último) a un ser humano estupendo, inigualable, humilde y radiante que donde quiera que esté, siempre estará conmigo.

Y bueno también a mí.

AGRADECIMIENTO

El autor de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A la ciudad de Quevedo y a su Universidad (UTEQ), por haberme acogido por alrededor de 6 años, mi gratitud inmensa.

A mi Tutor, Dr. Canchignia por confiar en mí, por su constancia y a pesar de que sus ideas suelen ser discrepadas y muchas veces no aceptadas continúa con lo que piensa y lo hace (más docentes así necesita la “U”)

A mis compañeros y amigos, Byron y Crespo, por estar a lo largo de este camino investigativo y aprendizaje, por los 6 años de amistad, así también a mis apreciados compañeros y maestros Ángel Cedeño, Javier Auhing. Ricardo Romero, Jorge Rodríguez, Paulina, Tubay, Víctor, Verdesoto y al Ingeniero Antonio.

A mis amigas Magdaly y Mariuxi por dedicarme su tiempo es algo que no regresa y no a cualquier persona se le da. A ella por incorporarme la capacidad lectora, tildar las palabras, razonar antes de emitir palabras, vivir como si no hubiese mañana y atreverme hacer cosas que no imagina que podría hacer.

A esos profesores que en realidad se involucraron en mi educación, que me enseñaron a pensar y no solo escribir, que trasladaron sus ideas al campo e hicieron relucir sus conocimientos y lo supieron transmitir.

Y gracias a las personas que lean este documento, ojalá les sirva.

Gabriel Esmeraldas García

RESUMEN

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (por sus siglas en inglés PGPR) se han descrito por su capacidad de inducir en la planta resistencia y protección ante agentes patógenos y medio ambientales que atenúan contra su normal fisionomía, así también al desarrollo mediante el estímulo con fitohormonas. El hongo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* es el agente causante de la enfermedad denominada como ‘escoba de bruja’ en Cacao (*Theobroma cacao*) presentando síntomas en brotes jóvenes, cojinetes florales, yemas vegetativas y en frutos; donde el desarrollo de sistemas de control eficaces y perdurables es una medida sustitutiva ante el uso de pesticidas. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de las PGPR ante el patógeno *Moniliophthora perniciosa*, aplicándolas bajo sistema foliar y a la rizósfera, además en semillas para verificar los efectos de las rizobacterias. Se utilizaron PGPR aisladas de musas endémicas pertenecientes al laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, mientras la obtención de las esporas del patógeno se realizó con la desinfección de ramas secas infectadas y cámara húmeda. Se observaron los efectos de cinco cepas bacterianas en semillas pregerminadas las cuales fueron colocadas en recipientes plásticos a una temperatura de 26°C, las PGPR fueron lavadas con el buffer PBS (Phosphate Buffered Saline) e inoculadas dos veces con 400 µl y en plantas de cacao que fueron trasplantadas se inoculó al 10% de la concentración bacteriana durante un mes. La rizobacteria *Acinetobacter calcoaceticus* (BMR2-12) presentó los mayores resultados con una longitud radicular 8.29 cm y peso radicular 0.72 g en semillas, y la aplicación de PGPR en plantas demostró que hay un efecto estimulante con el incremento del desarrollo radicular esto por aplicación *Pseudomonas veronii* (R4) con 6.77g. Por consiguiente la aplicación de las bacterias vía foliar en presencia de *Moniliophthora perniciosa* demuestran que el patógeno ejerce sintomatología característica como la es la reducción del diámetro del hipocótilo donde la aplicación de *S. marcescens* (PM3-8) obtuvo el mayor promedio de 0.44 cm de diámetro, por el contrario por efecto de inoculación edáfica no se observaron cambios significativos.

Palabras claves: *Hipocotilo*, *Rizobacterias*, *Acinetobacter calcoaceticus*.

ABSTRACT

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) have been described for their ability to induce resistance and protection against pathogens and environmental agents in the plant, which attenuate their normal appearance, as well as their development through phyto-plant stimulation. . The basidiomycete fungus *Moniliophthora perniciosa* is the causative agent of the disease known as 'witch's broom' in Cacao (*Theobroma cacao*) presenting symptoms in young shoots, floral bearings, vegetative buds and fruits; where the development of effective and lasting control systems is a substitute measure when using pesticides. The objective of this investigation was to evaluate the effects of the PGPR against the pathogen *Moniliophthora perniciosa*, applying them under the foliar system and the rhizosphere, in addition in seeds to verify the effects of the rhizobacteria. PGPR isolated from endemic muses belonging to the Microbiology laboratory of the State Technical University of Quevedo were used, while the spores of the pathogen were obtained with the disinfection of infected dry branches and humid chamber. The effects of five bacterial strains were observed in pregerminated seeds which were placed in plastic containers at a temperature of 26 ° C, the PGPR were washed with PBS buffer (Phosphate Buffered Saline) and inoculated twice with 400 µl and in plants of Cocoa that were transplanted was inoculated to 10% of the bacterial concentration for a month. The rhizobacteria *Acinetobacter calcoaceticus* (BMR2-12) presented the highest results with a root length of 8.29 cm and root weight 0.72 g in seeds, and the application of PGPR in plants showed that there is a stimulating effect with the increase in root development this by application *Pseudomonas veronii* (R4) with 6.77g. Therefore the application of the bacteria via foliar in the presence of *Moniliophthora perniciosa* shows that the pathogen exerts characteristic symptoms such as the reduction of the hypocotyl diameter where the application of *S. marcescens* (PM3-8) obtained the highest average of 0.44 cm of diameter, on the contrary by effect of edaphic inoculation no significant changes were observed.

Keywords: *Hypocotyl*, *Rhizobacteria*, *Acinetobacter calcoaceticus*.

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DE REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS	xvii
CÓDIGO DUBLÍN	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I. CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación	3
1.1.1. Diagnóstico.....	3
1.1.2. Planteamiento del problema	3
1.1.3. Sistematización del problema.....	3
1.2. Objetivos.....	4
1.2.1. Objetivo General.....	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
1.2. Justificación	5

CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.	Marco conceptual.....	7
2.1.1.	Escoba de bruja conceptualización.....	7
2.1.2.	Banco de cepas de ecotipos de <i>M. perniciosa</i> a diferentes pisos altitudinales.....	8
2.1.3.	Factores que inciden en el desarrollo de la enfermedad.....	9
2.1.3.1.	Concentración de basidiosporas del patógeno.....	9
2.1.3.2.	Tamaño del brote (Hospedero).....	9
2.1.3.3.	Ambiente de inoculación.....	9
2.1.4.	Método a nivel de invernadero en inoculaciones al meristemo apical.....	9
2.1.5.	Efecto del patógeno en la planta.....	10
2.1.6.	Reacción de la planta al patógeno.....	10
2.1.7.	Interacción planta – patógeno.....	11
2.1.8.	Sintomatología.....	11
2.1.8.1.	Hipertrofia del hipocótilo.....	12
2.1.8.2.	Hipertrofia del nudo cotiledonal.....	12
2.1.8.3.	Elongamiento de la yema terminal.....	12
2.1.8.4.	Superbrotamiento.....	12
2.1.9.	Control de la enfermedad.....	12
2.1.10.	Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR).....	13
2.1.10.1.	<i>Pseudomonas</i> spp.....	13
2.1.10.2.	<i>Enterobacter</i> spp.....	15
2.1.10.3.	<i>Acinetobacter</i> spp.....	15
2.1.10.4.	<i>Serratia</i> spp.....	16

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

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.....	18
3.5.	Material genético.....	18
3.6.	Materiales y Equipos.....	19
3.7.	Diseño de la investigación.....	20
3.7.1.	Diseño para evaluar los efectos de las PGPR obtenidas en biofermentadores sobre semillas pregerminadas y plántulas de cacao.....	21
3.7.2.	Diseño para evaluar el efecto de las rizobacterias por su inoculación sobre el área foliar en plántulas de cacao en presencia de <i>M. pernicioso</i>	21
3.7.3.	Diseño para evaluar la actividad antagonista de las rizobacterias sobre la inoculación edáfica en plántulas de cacao frente a <i>M. pernicioso</i>	22
3.8.	Manejo del experimento.....	22
3.8.1.	Selección y crecimiento de las rizobacterias.....	22
3.8.2.	Almacenamiento de esporas de <i>M. pernicioso</i>	23
3.8.3.	Preparación de las soluciones para la colección y almacenamiento de las basidiosporas.....	24
3.9.	Inoculación de PGPR en semillas y plantas de cacao.....	26
3.9.1.	Aplicación en semillas.....	26
3.9.1.1.	Variables a evaluar en semillas inoculadas con PGPR.....	27
3.9.2.	Aplicación edáfica en plantas de cacao.....	27
3.9.2.1.	Variables a evaluar en la aplicación edáfica de PGPR.....	27
3.10.	Inoculación foliar y edáfica de rizobacterias en plántulas de cacao infectadas con <i>M. pernicioso</i>	28
3.10.1.	Inoculación foliar y edáfica en plantas de cacao con PGPR.....	28
3.10.2.	Inoculación de <i>M. pernicioso</i> en plantas de cacao.....	28
3.10.3.	Variables a evaluar en los tratamientos con PGPR en presencia de <i>M. pernicioso</i>	29

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Evaluación de respuestas morfológicas en semillas pregerminadas en aplicación de PGPR	32
4.1.1.	Longitud radicular (semillas pre-germinadas).....	32
4.1.2.	Peso radicular (semillas pre-germinadas).....	32
4.2.	Evaluación de respuesta morfológica de plantas de cacao por aplicación a la rizósfera de PGPR	34
4.2.1.	Diámetro del hipocótilo	34
4.2.2.	Peso foliar	34
4.2.3.	Longitud del tallo	36
4.2.4.	Peso del tallo.....	36
4.2.5.	Longitud radicular	37
4.2.6.	Peso radicular	38
4.3.	Evaluación de los caracteres morfológicos de plantas cacao por aplicación foliar de las PGPR en presencia de <i>M. pernicioso</i>	39
4.3.1.	Diámetro del hipocótilo	39
4.3.2.	Longitud radicular	39
4.3.3.	Peso radicular	40
4.4.	Evaluación de los caracteres morfológicos de plantas cacao por aplicación a la rizósfera de las PGPR en presencia de <i>M. pernicioso</i>	41
4.4.1.	Diámetro del hipocótilo	41
4.4.2.	Longitud radicular	41
4.4.3.	Peso radicular	42
4.5.	Discusión	44
4.5.1.	Evaluación de respuestas morfológicas en semillas pre-germinadas en aplicación de PGPR	44
4.5.2.	Evaluación de respuestas morfológicas de plantas de cacao en aplicación a	

la rizósfera de PGPR	44
4.5.3. Evaluación de los caracteres morfológicos de plantas de cacao por aplicación foliar de las PGPR en presencia de <i>M. pernicioso</i>	45
4.5.4. Evaluación de los caracteres morfológicos de plantas de cacao por aplicación a la rizósfera de las PGPR en presencia de <i>M. pernicioso</i>	45

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	47
5.2. Recomendaciones	48

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

CAPITULO VII. ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conteo de esporas en cámara Neubauer y formula para el cálculo de la concentración.....	25
Figura 2. Evaluación de las PGPR aplicadas en semillas pregerminadas de cacao sobre el carácter longitud radicular.	32
Figura 3. Evaluación de las PGPR aplicadas en semillas pregerminadas de cacao sobre el carácter peso radicular.	33
Figura 4. Efectos de las PGPR en la longitud y el peso radicular; aplicadas en semillas pregerminadas (2 días).	33
Figura 5. Evaluación del diámetro del hipocótilo por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao.....	34
Figura 6. Evaluación del peso foliar por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao. ...	35
Figura 7. Efecto de las rizobacterias en los caracteres morfológicos en plantas de cacao	35
Figura 8. Evaluación de la longitud del tallo por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao	36
Figura 9. Evaluación del peso del tallo por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao. ...	37
Figura 10. Evaluación de la longitud radicular por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao	37
Figura 11. Evaluación del peso radicular por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao..	38
Figura 12. Efecto de las rizobacterias en los caracteres morfológicos: longitud y masa radicular.....	38
Figura 13. Evaluación del diámetro del hipocótilo por aplicación foliar de rizobacterias en presencia de <i>M. pernicioso</i>	39
Figura 14. Evaluación de la longitud radicular por aplicación foliar de rizobacterias en presencia de <i>M. pernicioso</i>	40
Figura 15. Evaluación del peso radicular por aplicación foliar de rizobacterias en presencia de <i>M. pernicioso</i>	40
Figura 16. Evaluación del diámetro del hipocótilo por aplicación edáfica de rizobacterias en presencia de <i>M. pernicioso</i>	41
Figura 17. Evaluación de la longitud radicular por aplicación edáfica de rizobacterias en presencia de <i>M. pernicioso</i>	42
Figura 18. Evaluación del peso radicular por aplicación edáfica de rizobacterias en presencia de <i>M. pernicioso</i>	42

Figura 19. Efectos de las PGPR sobre los caracteres morfológicos de plantas de cacao en presencia de <i>M. pernicioso</i>	43
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Banco de cepas de ecotipos de <i>M. pernicioso</i> a diferentes pisos altitudinales....	8
Tabla 2. Banco de cepas bacterianas UTEQ (Lab. Microbiología y Bio.Molecular).....	19
Tabla 3. Esquema del Análisis de Varianza de los efectos de las PGPR obtenidas de biofermentadores en semillas pregerminadas.....	21
Tabla 4. Esquema de Tratamientos en semillas pregerminadas de cacao	21
Tabla 5. Esquema del Análisis de Varianza de los efectos de la aplicación de PGPR en plántulas de cacao.....	21
Tabla 6. Esquema del Análisis de Varianza de la evaluación de la actividad antagonista de las rizobacterias por su inoculación al follaje en plántulas de cacao frente a <i>M. pernicioso</i>	22
Tabla 7. Esquema del Análisis de Varianza de la evaluación de la actividad antagonista de las rizobacterias por su inoculación a la rizosfera en plántulas de cacao frente a <i>M. pernicioso</i>	22

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR's) y sus efectos	56
Anexo 2. Metodología de la aplicación de Pgr's vía edáfica contra la aplicación de esporas de <i>M. perniciosa</i>	56
Anexo 3. Conteo de esporas en cámara Neubauer	56
Anexo 4. Crecimiento de PGPR's en medio de cultivo alternativo (Bomba, bandeja sujetadora, shock, mangueras plásticas, filtros)	57
Anexo 5. Metodología de la aplicación de PGPR's vía foliar contra la aplicación de esporas de <i>M. perniciosa</i>	57
Anexo 6. Disolución de los buffer's (A-B-C) para aplicar las esporas en plantas.....	57
Anexo 7. Detalle de la preparación de inóculo de <i>M. perniciosa</i> :	58
Anexo 8. Efecto de <i>M. perniciosa</i> alargando el periodo de evaluación a los 60 días después de la inoculación con el patógeno.....	59

CÓDIGO DUBLÍN

Título	Actividad antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) a <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Escoba de bruja) en Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L).		
Autor	Esmeraldas Garcia Gabriel Alejandro		
Palabras clave	<i>Hipocótilo</i>	<i>Rizobacterias</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ,
Editorial	Quevedo: UTEQ 2019		
Resumen (hasta 300 palabras)	<p>La Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (por sus siglas en inglés PGPR) se han descrito por su capacidad de inducir en la planta resistencia y protección ante agentes patógenos y medio ambientales que atenúan contra su normal fisionomía, así también al desarrollo mediante el estímulo con fitohormas. El hongo basidiomiceto <i>Moniliophthora perniciosa</i> es el agente causante de la enfermedad denominada como ‘escoba de bruja’ en Cacao (<i>Theobroma cacao</i>) presentando síntomas en brotes jóvenes, cojinetes florales, yemas vegetativas y en frutos; donde el desarrollo de sistemas de control eficaces y perdurables es una medida sustitutiva ante el uso de pesticidas. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de las PGPR ante el patógeno <i>Moniliophthora perniciosa</i>, aplicándolas bajo sistema foliar y a la rizósfera, además en semillas para verificar los efectos de las rizobacterias. Se utilizaron PGPR aisladas de musas endémicas pertenecientes al laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, mientras la obtención de las esporas del patógeno se realizó con la desinfección de ramas secas infectadas y cámara húmeda. Se observaron los efectos de cinco cepas bacterianas en semillas pregerminadas las cuales fueron colocadas en recipientes plásticos a una temperatura de 26°C, las PGPR fueron lavadas con el buffer PBS (Phosphate Buffered Saline) e inoculadas dos veces con 400 µl y en plantas de cacao que fueron trasplantas se inoculó al 10% de la concentración bacteriana durante un mes. La rizobacteria <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (BMR2-12) presento los mayores resultados con una longitud radicular 8.29 cm y peso radicular 0.72 g en semillas, y la aplicación de PGPR en plantas demostró que hay un efecto estimulante con el incremento del desarrollo radicular esto por aplicación <i>Pseudomona veronii</i> (R4) con 6.77g. Por consiguiente la aplicación de las bacterias via foliar en presencia de <i>Moniliophthora perniciosa</i> demuestran que el patógeno ejerce sintomatología características como la es la reducción del diámetro del hipocótilo donde la aplicación de <i>S. marcescens</i> (PM3-8) obtuvo el mayor promedio de 0.44 cm de diámetro, por el contrario por efecto de inoculación edáfica no se observaron cambios significativos.</p>		
Descripción:	dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
URI:			

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador existe un tipo de cacao (*Theobroma cacao L.*) único en el mundo conocido con el nombre de “Nacional”, reconocidos por tener una fermentación muy corta y dar un chocolate suave de buen sabor y aroma, reconocido a nivel mundial con la clasificación fino de aroma. Persistiendo así las enfermedades del cacao representan un factor importante en la economía y cultura de nuestro país, ellas causan pérdidas en la producción y altos costos para su control.

La enfermedad conocida como “Escoba de Bruja” del cacao, causada por el hongo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, fue reportada por primera vez en Surinam en 1895, luego se movió rápidamente, extendiéndose a Guyana en 1906, Ecuador en 1918, Trinidad en 1928, Colombia en 1929, Granada en 1948 y Bahía-Brasil en 1989. Freire *et al.*, (2017) destaca que *M. perniciosa* junto con *M. roreri* causan una disminución en el rendimiento del 50-90%

En su ataque a los frutos puede asociarse con otras enfermedades como la Moniliasis y Antracnosis. El patógeno ataca tejidos meristemáticos en crecimiento e induce hipertrofias e hiperplasias, síntomas que varían de acuerdo a las condiciones ambientales esencialmente.

La variedad Nacional de cacao cultivada en el país es susceptible al ataque del patógeno *M. perniciosa* en cuanto a las medidas estratégicas de control no logran ser eficaces lo cual genera aumento de los costos de producción y un declive en la productividad.

El control químico tiende a ser el principal medio de control de patógenos, los cuales generan resistencia y amplían el problema. Nuevas alternativas de control son necesarias para el reemplazo de los pesticidas tradicionales. Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) tienen la capacidad de producir efectos benéficos en estadíos tempranos de las especies vegetales, mejorando el desarrollo de la biomasa de las raíces y brotes en plantas, aumentando la germinación de las plántulas, vigor, altura, contenido de nutrientes presencia de clorofila, acelerando el tiempo de floración y brindando protección frente a fitopatógenos radicales. Entre los géneros bacterianos que han sido descritos como PGPR se encuentran *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp*

CAPITULO I

CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación

1.1.1. Diagnóstico

El hongo *M. pernicioso* es el responsable de la enfermedad escoba de bruja que se manifiesta con síntomas en brotes vegetativos, cojinetes florales y frutos; ocasionando la formación de escobas vegetativas y malformaciones en frutos conocidos como chirimoyas o frutos zanahoria, con una reducción en la producción.

El inadecuado control de la enfermedad, sumado con la susceptibilidad del cacao tipo “Nacional”, ha generado que el patógeno se desarrolle fácilmente, debido a la capacidad para adaptarse a los cambios del entorno, repercutiendo en cuantiosas pérdidas económicas.

1.1.2. Planteamiento del problema

Los ineficientes métodos de control hacia *M. pernicioso*, por aplicación de pesticidas conllevan a la generación de resistencia del patógeno y la pérdida de la biodiversidad de los microorganismos que habitan en el suelo entre ellos las rizobacterias que benefician al desarrollo de las plantas. Esto sumado con la mayor incidencia del patógeno en la época lluviosa donde es propicio para la producción de basidiosporas e infección en brotes tiernos.

La enfermedad escoba de bruja producida por el patógeno *M. pernicioso* genera la reducción en la producción del cultivo de cacao esto con la susceptibilidad a la variedad Nacional.

1.1.3. Sistematización del problema

- ¿Cuál de las rizobacterias presenta la mejor actividad antagónica a *M. pernicioso*?
- ¿Cuál método de aplicación de rizobacteria es el más eficiente; edáfico o foliar?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Determinar los efectos de PGPR a *Moniliophthora perniciosa* (escoba de bruja) en Cacao (*Theobroma cacao L.*)

1.2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar los efectos de las PGPR obtenidas en biofermentadores sobre semillas pre-germinadas y plántulas de cacao.
- Establecer el grado de acción de las rizobacterias por su inoculación al follaje en plántulas de cacao frente a *M. perniciosa*.
- Evaluar el grado de acción de las rizobacterias por su inoculación a la rizósfera en plántulas de cacao frente a *M. perniciosa*.

1.3. Justificación

El cacao Nacional tiene características distintivas de aroma y sabor buscadas por los fabricantes de chocolate siendo uno de los rubros de mayor importancia para el agricultor y el país, donde se busca alternativas al empleo de pesticidas y permitan un manejo eficiente de los patógenos en el cacao.

El constante empleo de pesticidas está ocasionando cambios en la fisiología y generan resistencia al control del patógeno *M. perniciosa*. El sector agrícola ha iniciado con trabajos al empleo de PGPR, esto permite ejercer un control a patógenos y sin causar daño y cambios al medio ambiente. La investigación aportará con el desarrollo de tecnología que permitan el control al hongo *M. perniciosa*, por la aplicación de rizobacterias y de esta manera tener información a la forma de aplicación para un manejo adecuado de la enfermedad escoba de bruja, beneficiando a: agricultores, productores y futuros estudios que continúen en esta línea investigativa.

CAPITULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Escoba de bruja conceptualización

La escoba de bruja causada por el hongo *M. perniciosa* infecta brotes jóvenes, cojinetes florales, yemas vegetativas y en frutos jóvenes. La enfermedad combinada con la monilia del fruto *M. rozeri*, causan pérdidas anuales que superan en ocasiones el 50% del total de frutos producidos y en casos extremos pueden llegar hasta el 90% de pérdidas (Freire *et al.*, 2017).

El micelio del hongo en el interior del tejido muerto de la escoba seca, forma masas y bajo condiciones de alta humedad relativa (80%), precipitación de 1000 a 2000 mm. En el laboratorio se puede simular las condiciones en cámara húmeda con rociadores de agua (8 horas de humedad y 16 horas de secado) (Pozo, 2006); y temperatura entre 22 a 28 °C (Purdy y Schimidt, 1996).

Los basidiocarpos son el estado sexual del hongo, poseen un color púrpura intenso, cuyo píleo presenta un diámetro de 5 a 30 mm con surcos radiales convexos y deprimidos en el centro. La lámela (estructuras laminares existentes bajo el sombrero de algunos hongos) es blanquecina con más de 15 laminillas correspondientes a los surcos del píleo. El estipe es hueco de color blanco cremoso y mide de 5 a 10 mm, su base es engrosada de color pardo (Evans, 1978)

La enfermedad comienza cuando los hongos germinan e infectan tejidos meristemáticos, convirtiéndose en hifas biotróficas monocarióticas sin conexiones que ocupan lentamente el espacio intercelular. Esta etapa se caracteriza por la aparición de ramas anormales hipertróficas e hiperplásicas, y la formación de frutos partenocárpicos. Las ramas infectadas, conocidas como "escobas verdes", crecen sin dominancia apical, con orientación fototrópica y mostrando epinastia de hojas. Después de dos o tres meses, el tejido infectado se vuelve necrótico (escobas secas) y las hifas se vuelven saprotróficas con dos núcleos por célula y conexiones de pinza (Mondego *et al.*, 2008).

M. perniciosa se caracteriza por una fase biotrófica sintomática y de larga duración, que puede durar más de 60 días en los tejidos vivos del cacao y es responsable de los síntomas más distintivos de la enfermedad, que comprenden cambios morfológicos drásticos en los brotes infectados (Teixeira *et al.*, 2014).

2.1.2. Banco de cepas de ecotipos de *M. pernicioso* a diferentes pisos altitudinales

El banco de cepas de ecotipos de *M. pernicioso* a diferentes pisos altitudinales de *Theobroma cacao* demuestra la diversidad de especies a diferentes pisos altitudinales.

Tabla 1. Banco de cepas de ecotipos de *M. pernicioso* a diferentes pisos altitudinales (Auhing, 2018)

Piso	Rango	Altura (m.s.n.m)	Código	Coordenada	Cantón	Provincia
1	0-100	8	MpLRBA-101	1°40'40.4"S 79°38'37.4"W	Baba	Los Ríos
		32	MpLRVE-102	1°21'22.4"S 79°24'04.0"W	Ventanas	Los Ríos
		74	MpLRMO-103	1°05'04.5"S 79°29'54.5"W	Mocache	Los Ríos
2	100-200	80	MpGUBA-104	2°57'9"S 79°39'11"W	Balao	Guayas
		117	MpLRBF-105	0°47'11.0"S 79°28'44.7"W	Buena Fe	Los Ríos
		140	MpLRBF-106	0°40'03.6"S 79°27'08.3"W	Buena Fe	Los Ríos
3	200-400	193	MpBOLN-107	1°16'20.5"S 79°19'20.7"W	Las Naves	Bolívar
		299	MpSDSD-108	0°24'18.0"S 79°18'10.0"W	Sto. Domingo	Santo Domingo de los Tsáchilas
		358	MpSDSD-109	0°21'38.3"S 79°15'55.1"W	Sto. Domingo	Santo Domingo de los Tsáchilas
4	400-500	455	SDSD-110	0°20'40.4"S 79°14'18.7"W	Sto. Domingo	Santo Domingo de los Tsáchilas
		470	MpSDSD-111	0°19'59.3"S 79°14'10.2"W	Sto. Domingo	Santo Domingo de los Tsáchilas
		518	MpSDSD-112	0°18'46.1"S 79°13'43.5"W	Sto. Domingo	Santo Domingo de los Tsáchilas

Auhing (2018) determina al realizar ensayos de severidad en semillas pregerminadas y evaluar los síntomas, la cepa ubicada en el cantón Balao perteneciente a la provincia del Guayas a 80 msnm, como la que más destaca al generar daños en plantas de cacao sometidas a esporas de *M. pernicioso*.

2.1.3. Factores que inciden en el desarrollo de la enfermedad

2.1.3.1. Concentración de basidiosporas del patógeno

El patógeno tiene una considerable capacidad de producción de basidiosporas que favorecen a su diseminación de la enfermedad, pero existen pocos datos que indiquen su eficiencia, o por la genética del cacao. Además, el porcentaje de infección se ve reducido con el decrecimiento de la dosis del inóculo (Revelo, 2010).

Inoculaciones con alta concentraciones de basidiosporas (37,500 a 200,000 esporas/ml) resultan cerca del 100% de infección en todas las familias evaluadas y las diferencias en el porcentaje de plantas enfermas entre familias resistentes y susceptibles fueron detectadas con concentraciones de inóculo de 12,500 basidiosporas/ml, en las condiciones de Ecuador (Pozo, 2006).

2.1.3.2. Tamaño del brote (Hospedero)

La edad del tejido de cacao en la inoculación también influencia directamente la infección, brotes jóvenes particularmente yemas desarrollándose son más susceptibles, pero a medida que el brote madura llega a ser más resistente y las inoculaciones de brotes con hojas duras y yemas en dominancia usualmente no son exitosas. Las mejores diferencias entre familias resistentes y susceptibles en brotes de tamaño de la hoja de 0.3 a 1.5 cm en la inoculación (Pozo, 2006).

2.1.3.3. Ambiente de inoculación

Se sugiere mantener las plántulas inoculadas en cámara húmeda bajo condiciones de 24-25°C y 100% de humedad relativa, donde se asegurará la máxima germinación y penetración del tubo germinativo (Revelo, 2010). Se recomienda largos tiempos de incubación (<48 horas), para evitar el escape incluso en genotipos susceptibles (Wheeler y Suárez, 1993).

2.1.4. Método a nivel de invernadero en inoculaciones al meristemo apical

Frías (1987) propuso el “sistema semiautomático de inoculación”, o “belt spray”, el cual se desarrolló a partir del método usado por Schmidt *et al.*, (1999) para evaluar resistencia del *Pinnus spp.* a la roya fusiforme causada por *Cronartium quercuum* en Florida. El método consiste en la aspersion de una cantidad medida del inóculo sobre plántulas de

cacao transportadas a velocidad uniforme por una banda mecánica. Se ha planteado una metodología para la evaluación de la resistencia a *M. pernicioso* utilizando discos de hojas, que se basa en visualizar el crecimiento del hongo sobre hojas desprendidas, por la acción de un compuesto fitotóxico (Glicerol) mezclado con la suspensión del inóculo (Schmidt *et al.*, 1999).

La inoculación en yemas usando una gota de inóculo en agar, Sreenivasan y Dabydeen (1989) usaron este método para estudios en plántulas de cacao. Posterior se modificó al depositar sobre el meristemo apical de plántulas, una gota (30 µl) de inóculo de *M. pernicioso* conteniendo 350.000 esporas/ml, cuya solución final estaba diluida en 0.3% de agar de agar (Revelo, 2010).

2.1.5. Efecto del patógeno en la planta

La enfermedad interfiere con la fisiología normal de tejidos meristemáticos del cacao. Al interior el hongo, este degrada las moléculas de almacenamiento de carbohidratos y lípidos (Teixeira *et al.*, 2014).

En respecto al desbalance hormonal: las auxinas en plantas infectadas (escobas verdes) se registra una alta concentración de la misma, por los transportadores de auxinas (PIN) se manifiestan fuertemente. Las Giberelinas se expresan altamente debido a la elongación y expansión celular y su expresión aumentada está de acuerdo con las alteraciones morfológicas observadas en los brotes de cacao infectados. La Citocinina no se expresa diferencialmente, ya que genes relacionados con la degradación de las citoquininas (citoquininas oxidasas) o la inactivación muestran un aumento en los niveles e inactivando en la etapa. De manera similar a otras interacciones planta-patógeno (Walters y McRoberts, 2006), la manipulación de la vía de la citoquinina del cacao por *M. pernicioso* podría favorecer la movilización de nutrientes hacia el sitio de la infección y podría explicar la pérdida de dominancia apical.

2.1.6. Reacción de la planta al patógeno

Los tejidos infectados de cacao parecen asignar carbono y energía a la producción de metabolitos secundarios indicadores de estrés y están implicados en la respuesta a microbios y animales (flavonoles, antocianinas, terpenoides y alcaloides). Además, en tejidos infectados existe la presencia de lignina posiblemente como parte de un intento de

limitar la colonización de patógenos, los análisis histológicos revelan la existencia de refuerzo de la pared celular en los tejidos infectados (Teixeira *et al.*, 2014).

2.1.7. Interacción planta – patógeno

Al colonizar el apoplasto de la planta y al carecer de estructuras especializadas de alimentación (es decir, haustorio), el micelio biotrófico de *M. pernicioso* podría tener la capacidad de absorber compuestos solubles que se transportan a través del apoplasto. Muchas proteinasas fúngicas junto con un transportador de oligopéptidos son altamente expresadas durante la infección lo que indica que este hongo degrada las proteínas vegetales secretadas en el apoplasto y captura los péptidos resultantes. Además, es probable que los sacáridos derivados de la degradación de los azúcares complejos de la pared celular de la planta, como la pectina, la celulosa y la hemicelulosa, y los azúcares traslocados durante la etapa de escobas verdes puedan ser absorbidas por *M. pernicioso* y usarse como fuentes de energía. La célula vegetal interrumpe la comunicación entre las partes sanas e infectadas de la planta, interceptando la translocación de nutrientes al brote enfermo. En consecuencia, los tejidos infectados se aíslan de la planta y se ven obligados a utilizar sus propios almacenes y estructuras para la producción de energía. Como resultado, puede ocurrir una privación de carbono, que culmina con el inicio de un proceso de senescencia desencadenado por la falta de nutrientes., la senescencia, que es un proceso altamente controlado y regulado por el desarrollo que conduce a la muerte del tejido vegetal, parece ser responsable de la muerte inicial de las partes infectadas durante el desarrollo de la enfermedad (Teixeira *et al.*, 2014).

Curiosamente, un subproducto del catabolismo de pectina es el metanol, y un informe reciente de Oliveira *et al.* (2012) demostraron que *M. pernicioso* puede crecer en metanol como única fuente de carbono, incluso en concentraciones elevadas de este alcohol.

2.1.8. Sintomatología

A nivel *in vivo* con inoculaciones artificiales, se han observado síntomas en plántulas a partir de los 9 días después de la inoculación en semillas germinadas y el período de incubación de 19 días en cruces muy susceptibles. En plántulas inoculadas en las hojas primarias del meristemo apical en período de incubación es de 18 a 22 días (Pozo, 2006; Revelo, 2010).

Los principales síntomas en plántulas inoculadas en diferentes estados de desarrollo se describen a continuación:

2.1.8.1.Hipertrofia del hipocótilo

Las semillas pregerminadas e inoculadas artificialmente (3 – 4 mm de longitud), dan origen a plántulas hipertrofiadas en la base del hipocótilo (Tovar, 1991).

2.1.8.2.Hipertrofia del nudo cotiledonal

Según Holliday (1954), este síntoma se presenta en algunos casos con el incremento del tamaño del nudo a casi de su diámetro normal y los cotiledones permanecen adheridos al nudo.

También se destacan:

2.1.8.3.Elongamiento de la yema terminal

En algunos genotipos, después de la inoculación en la yema terminal, el elongamiento exagerado de los entrenudos en un crecimiento acentuado de las plántulas en relación a las demás (Silva *et al.*, 2002).

2.1.8.4.Superbrotamiento

Se ha observado también en algunos genotipos un desenvolvimiento de los entrenudos a partir del punto inoculado. Las hojas desarrollan en cada una de los entrenudos un brote terminal un aspecto de superbrotamiento (Silva *et al.*, 2002).

2.1.9. Control de la enfermedad

En términos generales, hay cuatro estrategias principales que pueden adoptarse: fitosanitaria, control químico, resistencia genética y control biológico.

Se ha demostrado que la fitosanización, es decir, la eliminación y destrucción de partes de plantas enfermas, retrasa la epifiticia de la enfermedad (Meinhardt *et al.*, 2008)

El control químico con protectores y fungicidas sistémicos no es una práctica habitual en la producción de cacao debido a los altos costos y riesgos asociados con la contaminación de la almendra de cacao y la salud ambiental. Además, gran parte de la investigación

sobre el uso de fungicidas para el control de enfermedades del cacao no se ha publicado formalmente (Meinhardt *et al.*, 2008).

Laker y Ram (1992) señalan que, al evaluar el efecto de fungicidas como el óxido cuproso, tebuconazol o clorotalonil y mezclas, conjunto con prácticas culturales como la poda, demostró que ninguna de las formulaciones probadas protegió los brotes vegetativos de la infección.

Existe resistencia del hospedero a la enfermedad en una serie de accesiones de cacao, tanto en cacao silvestre como en selecciones de agricultores (Meinhardt *et al.*, 2008).

2.1.10. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR)

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés, que viene de la denominación Plant Growth Promoting Rhizobacteria) tienen tres características: 1) capacidad para colonizar la raíz, 2) sobrevivir y multiplicarse en microhábitats asociados a la superficie radical en competencia con la microbiota nativa, al menos con tiempo para expresar su actividad promotora de crecimiento y 3) poseer capacidad para promover dicho desarrollo (Bach y Díaz, 2008) (Ver Anexo 1).

Gutiérrez *et al.*, (2003) señala que el efecto promotor de las PGPR al estimular la germinación del frejol (*Phaseolus vulgaris*) y el desarrollo de raíces secundarias.

2.1.10.1. *Pseudomonas spp*

Es una bacteria gram negativa en forma de bastoncillo aislada de los suelos y las raíces de las plantas, también se ha estudiado ampliamente en las últimas décadas por sus capacidades de control biológico y mayor valor de aplicación en la agricultura. Produce metabolitos secundarios con actividad antibiótica de amplio espectro (cianuro de hidrógeno [HCN], 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), pirolonorina y pirrolnitrina) asociada con la inhibición de fitopatógenos (Jousset *et al.*, 2014).

Ciertas cepas también son capaces de colonización endofítica. Dentro de los tejidos, se encuentran principalmente en los espacios intercelulares de la epidermis y la corteza (Duijff *et al.*, 1997). Son eficaces en la utilización de exudados de semillas y raíces para el crecimiento y pueden colonizar la rizosfera de manera agresiva.

La competencia puede referirse a la adquisición de sustratos orgánicos liberados por las semillas y las raíces (Kamilova *et al.*, 2005), así como los micronutrientes como el hierro soluble, que a menudo es una cantidad limitada en el suelo. La adquisición de hierro implica la producción de transportadores de hierro (sideróforos), piroverdinas notablemente fluorescentes. Una vez complejados con el hierro férrico en el suelo o en la zona de la raíz, los sideróforos se toman mediante los receptores de la membrana externa. En un contexto de control biológico, la competencia por el hierro implica la síntesis de sideróforos de mayor afinidad en comparación con los sideroforos utilizados por los fitopatógenos (Lemanceau *et al.*, 1992)

El antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) puede actuar como una señal mediadora en la comunicación de interpoblación entre dos cepas de *Pseudomonas* en su hábitat de rizosfera. Maurhofer *et al.*, (2004) apunta a un mecanismo de control de retroalimentación mutua que permite *P. fluorescentes* CHA0 para mantener la producción de estos antibióticos clave en niveles homeostáticamente equilibrados.

La producción de antibióticos no solo es un mecanismo importante en la supresión de enfermedades de las plantas por pseudomonas asociadas a la raíz, sino que probablemente también es de suma importancia para la competencia rizosférica de estas bacterias. La regulación de la producción de antibióticos es muy compleja e involucra mecanismos de control de retroalimentación positivo y negativo que responden a diversos factores ambientales (Hass y Keel, 2003). Este complejo sistema regulador puede permitir que estas bacterias se adapten rápidamente a los cambios en su hábitat de la rizósfera, por ejemplo. Favoreciendo la producción de uno u otro antibiótico. Por lo tanto, la sensibilidad de las pseudomonas a los cambios en su entorno probablemente sea también una de las razones principales de su inconsistente desempeño de control biológico en el campo. Bajo condiciones *in vitro*, se encontró que la cepa *P. veronii* produce Ácido indolacético (IAA) a partir de triptófano. Además de producir dos enzimas secretoras, una proteasa y una lipasa (Montes *et al.*, 2016).

Al aplicarla *P. fluorescens* CHA0, en semillas pre-germinadas de soja, tiene efecto inhibitorio en número de raíces y además la alteración de la arquitectura del sistema radicular en longitud de soja, está vinculado a la producción de fitohormona tipo auxínica IAA (Saavedra *et al.*, 2017).

2.1.10.2. *Enterobacter* spp

Cepas del género *Enterobacter* interactúan y ejercen beneficiosos efectos sobre el crecimiento de las plantas. Los efectos de las bacterias beneficiosas pueden ocurrir a través de mecanismos directos o indirectos que incluyen la producción de fitohormonas o enzimas que promueven el crecimiento de las plantas, aumento de la absorción de nutrientes y prevención de daños fitopatógenos incluido nematodos (Glick *et al.*, 1999).

Estudios realizados por Ye *et al.*, (2009) muestran que al inocular *E. asburiae* en la rizosfera para el control de Salmonella (*Salmonella javiana*) en tomate de 6 meses ejerce una disminución la infección (radicular) en un periodo de 4 semanas.

Esta cepa tiene la capacidad de solubilizar fosfato y mediante este proposito la planta pueda incorporarlo de forma eficiente, ademas de la produccion de giberelinas (Kang *et al.*, 2009).

2.1.10.3. *Acinetobacter* spp

Es un género bacteriano omnipresente ampliamente distribuido en ambientes de suelo y agua y actualmente incluye 17 especies válidamente descritas y 14 especies genómicas sin nombre (Berlanga, 2008)

A. calcoaceticus es un novedosa PGPR por su capacidad para promover el crecimiento de las plantas causando una mejora por el Ácido Abscísico (ABA) y Giberelinas (Gas) (Kang *et al.*, 2012).

Varios cepas de *Acinetobacter* promueven el crecimiento de la planta y pueden hacerlo secretando giberelinas en el ambiente de la planta y convirtiendo el fósforo insoluble en el suelo en formas solubles que están fácilmente disponibles para la planta. Ademas poseen propiedades como la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales, sideróforo y la producción de amoníaco (Kang *et al.*, 2009).

Según Sachdev *et al.*, (2010) en una evaluación en trigo tienen un efecto positivo en la altura y longitud de la raíz. La cepa prospera en los exudados liberados por las raíces de la misma planta, posterior la multiplicación de estas poblaciones bacterianas en la rizosfera con la liberación de IAA puede mejorar la rizogénesis (Rokhbakhsh, *et al.*, 2011)

2.1.10.4. *Serratia* spp

Es un bacilo gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Existen estudios donde *Serratia marcescens* actúan como PGPR para activar el crecimiento en plantas para el control de *P. parasitica* en cítricos, donde redujo el 50% de la incidencia al activar el Sistema de Resistencia Inducido (ISR) de la planta (Queiroz y Melo, 2006).

Cuando se aplican en la parte superior del suelo, las bacterias se establecen cerca de la base de la raíz, en el proceso disminuyen su concentración hasta llegar a la punta de las raíces donde aumentan las mismas. La eficiencia de la bacteria se muestra al introducirla mediante el sistema de goteo, donde al agregar bacterias diariamente se aumenta la densidad de población en el suelo (Ordentlich, 1987).

En la aplicación de las bacterias al suelo se demostró un aumento en el tallo y la longitud de la raíz de las plántulas de té en 6.0 cm y 4.7 cm respectivamente en plantas tratadas en condiciones de suelo estéril después de 45 días de plantación (Purkayastha *et al.*, 2018).

Las quitinasas, junto con otras enzimas hidrolíticas, degradan las paredes celulares de los hongos e inhiben su crecimiento. *Serratia* es uno de los productores más competentes de quitinasas, cuya producción, actividad y regulación génica están bien estudiadas, al evaluarla con *R. solani* se observó que el micelio fúngico en la zona de interacción en cultivos duales se distorsionó, mostrando abultamiento, lisis y estallido de las hifas. Debido a la degradación de la pared celular fueron prominentes (Purkayastha *et al.*, 2018).

Otros estudios han demostrado que las cepas *Serratia* poseían atributos promotores del crecimiento, como la capacidad de solubilización con fosfato y la producción de IAA, y mostraron un efecto beneficioso en varias plantas como el coco, el arrozal y el garbanzo (Purkayastha *et al.*, 2018).

Someya *et al.*, (2000) señala que plántulas de Violeta (*Cyclamen persicum*) tratadas con bacteria (*S. marcescens*) a partir de semillas para el control de *R. solani* y *F. oxysporum f. sp. Cyclaminis* ejercen un control con 19% de incidencia de la enfermedad a diferencia de las plantas evaluadas con suelo tratado con la suspensión bacteriana o benomyl.

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización del experimento

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y de Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo. Sus coordenadas geográficas son 01° 01” de latitud Sur y 79° 47” de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm.

3.2. Tipo de investigación

Esta investigación fue de tipo experimental comparando información existente en la literatura y ensayos anteriores sobre agentes antagonistas, con los resultados alcanzados en la acción concreta de la eficacia de las bacterias hacia *M. pernicioso*, en el cultivo de Cacao (*Theobroma cacao L.*).

3.3. Método de investigación

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

3.4. Fuentes de recopilación de información

Las fuentes utilizadas para la obtención de información fueron primarias mediante los ensayos y resultados realizados en el laboratorio y secundarias ya que se obtuvieron de: revistas, publicaciones, libros e internet.

3.5. Material genético

Se utilizó el clon EET-19 de tipo Nacional fueron colectadas desde la finca experimental “La María” perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, las cuales se seleccionaron de acuerdo al color amarillo característico de su madurez fisiológica. La selección de este clon para los ensayos se lo hizo por su alta susceptibilidad a *M. pernicioso*.

Para los ensayos antagonistas se utilizaron PGPR de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia* y *Enterobacter*.

Tabla 2. Banco de cepas bacterianas UTEQ (Lab. Microbiología y bio.molecular)

Cepas	Fluorescente	Proteasa	HCN	Pirrolnitrina	Catalasa
<i>A. calcoaceticus</i> BMR 2-12	+			+	+
<i>S. marcescens</i> PM 3-8	+	+	+		+
<i>E. asburiae</i> PM 3-14	+	+	+	+	+
<i>P. protegens</i> CHA0	+		+		+
<i>P. veronii</i> R4	+		+	+	+

Para los estudios *in vivo* e *in vitro* se utilizaron PGPR de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Bacillus* obtenidos del banco de Germoplasma del laboratorio de microbiología y biotecnología vegetal de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (Chávez, 2016).

3.6. Materiales y Equipos

➤ Instrumentos de investigación

- Puntas amarillas 5-200 µl. Pk/1000
- Papel toalla
- Microtubos 1.5 ml. Pk/1000
- Puntas azules 1000 µl. Pk/1000
- Cajas petri
- Guantes quirúrgicos talla M
- Vasos de precipitación
- Papel Parafilm
- Papel aluminio
- Juego de micro-pipetas (5 unidades: 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 5 µl, 2 µl)
- Vasos plásticos (1 lt)
- Plástico transparente

➤ Material de oficina

- Cuaderno
- Computador
- Lapiceros
- USB predrive

- Notas adhesivas
- Calculadora
- Tijeras

➤ **Equipos de Laboratorio**

- Nevera de -20 °C
- Balanza 0.001 g
- Campana extractora de gases
- Cámara fotográfica
- UV transiluminador
- Centrífuga
- Congelador -40 °C
- Vortex
- Horno Microondas
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Agitador
- Estufa
- Destilador de agua
- Microscopio

➤ **Reactivos**

- PDA (Papa Dextrosa Agar)
- Agar
- Buffer MES
- King B
- Medio 3 “M3” (Melaza, sal en grano, harina de maíz, glicerol)

3.7. Diseño de la investigación

AnálisisJ estadístico. Todas las variables estudiadas fueron sometidas al análisis de varianza (ADEVA). Se establecieron las diferencias estadísticas entre las medias para los ensayos la prueba de Duncan al 95% de probabilidad. El procesamiento de datos fue llevado al programa estadístico Infostat (versión 2018).

3.7.1. Diseño para evaluar los efectos de las PGPR obtenidas en biofermentadores sobre semillas pregerminadas y plántulas de cacao

Se empleó un diseño completamente al azar DCA; para la evaluación del efecto de las rizobacterias en semillas pre-germinadas, generando 6 tratamientos de 3 repeticiones cada uno con cinco unidades experimentales, mientras para las plántulas se generó 6 tratamientos de 5 repeticiones cada uno con 3 unidades experimentales.

Tabla 3. Esquema del análisis de varianza de los efectos de la aplicación de las PGPR sobre semillas pregerminadas

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	17
Tratamientos	5
Error	12

Tabla 4. Esquema de tratamientos en semillas pregerminadas de cacao

TRATAMIENTOS	
1	<i>A. calcoaceticus</i> BMR 2-12
2	<i>S. marcescens</i> PM 3-8
3	<i>E. asburiae</i> PM 3-14
4	<i>P. protegens</i> CHA0
5	<i>P. veronii</i> R4
6	Control (PBS)

Tabla 5. Esquema del análisis de varianza de los efectos de la aplicación de PGPR en plántulas de cacao.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	29
Tratamientos	5
Error	24

3.7.2. Diseño para evaluar el efecto de las rizobacterias por su inoculación sobre el área foliar en plántulas de cacao en presencia de *M. pernicioso*

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de las

rizobacterias hacia el hongo *M. pernicioso*, generando 6 tratamientos de 5 repeticiones cada uno con tres unidades experimentales.

Tabla 6. Esquema del análisis de varianza de la evaluación de la actividad antagonista de las rizobacterias por su inoculación al follaje en plántulas de cacao frente a *M. pernicioso*.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	29
Tratamientos	5
Error	24

3.7.3. Diseño para evaluar la actividad antagonista de las rizobacterias sobre la inoculación edáfica en plántulas de cacao frente a *M. pernicioso*

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de las rizobacterias hacia el hongo *M. pernicioso*, generando 6 tratamientos de 5 repeticiones cada uno con tres unidades experimentales.

Tabla 7. Esquema del análisis de varianza de la evaluación de la actividad antagonista de las rizobacterias por su inoculación a la rizosfera en plántulas de cacao frente a *M. pernicioso*.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	29
Tratamientos	5
Error	24

3.8. Manejo del experimento

3.8.1. Selección y crecimiento de las rizobacterias

Las bacterias fueron seleccionadas para los ensayos antagónicos por su producción de metabolitos secundarios. Las cepas *P. veroni* R4, *E. asburiae* PM3-14 y *P. protegens* CHA0 producen proteasa, catalasa, HCN y pirrolnitrina. *A. calcoeticus* BMR2-12 produce catalasa y pirrolnitrina. La cepa *S. marcescens* PM3-8 produce proteasa, HCN y catalasa. (Chávez, 2016; Guato, 2017).

Los aislados bacterianos fueron incubados en el medio de cultivo King B líquido, (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5; agua destilada (pH 7.2)].

Las rizobacterias se incubaron 600 mL del medio de cultivo (M3) descrito por Rodríguez (2018), establecido como medio alternativo para crecimiento de las PGPR consideradas en esta investigación y que cuenta con los siguientes componentes:

- 50 g/L de Melaza
- 20 g/L de harina de maíz
- 5 g/L de sal en grano
- 15 ml/L de glicerina

Se realizó un pre-inoculo en matraz Erlenmeyer, las bacterias fueron incubadas en medio de cultivo King B en agitación constante a 150 rpm a 26 °C por 12 horas. Se esterilizó mediante autoclave el medio de cultivo (M3). Y se incubo las rizobacterias al 1% individualmente. Para el efecto se siguió la metodología descrita por Rodríguez (2018) la cual consiste en tomar la relación 1ml ($\pm 2.56+E09$ UFC/ml a 12 horas) en 99 mL de medio alternativo (1%). El volumen final de incubación de 600 ml. Las rizobacterias fueron recuperadas hasta su fase exponencial según lo descrito por Rodríguez (2018) hasta alcanzar la concentración bacteriana de $3.52+E08$ UFC/mL (Ver Anexo 4).

3.8.2. Almacenamiento de esporas de *M. pernicioso*

De los ecotipos de *M. pernicioso* presentes en el banco de cepas del laboratorio de microbiología y biotecnología vegetal de la UTEQ, se seleccionó la cepa de Balao (MpGUBA-104) debido a lo expresado por Auhing (2018) como la de mayor severidad (Ver tabla 1).

Tejidos infectados por *M. pernicioso* fueron seleccionados de acuerdo a las características típicas: crujiente a la ruptura y con el lumen de color café claro (Pozo, 2006). Se recolectaron y almacenaron en un cuarto con humedad relativa inferior al 50% permaneciendo por un período de 7 a 15 días, para retirar la humedad retenida en el interior de la escoba. Luego fueron sumergidas en una solución de Benomyl al 2% por 24 horas, para eliminar otros microorganismos especialmente saprófitos y estimular la producción de basidiocarpos.

En un umbráculo denominado “Escobero” en el cual se brindan las condiciones necesarias para la producción de basidiocarpos se usaron rociadores de agua y bajo una simulación de periodos alternados de humedad 8 horas y 16 horas de secado (Rocha y

Wheeler,1985); según Purdy y Schmidt (1996) las condiciones óptimas para estimular la producción de basidiocarpos son: alta humedad relativa (80%), precipitación de 1000 a 2000 mm y temperatura entre 22 a 28 °C (característica del inicio de la época lluviosa en Ecuador).

Al transcurrir aproximadamente un mes, se procedió a la recolección de los basidiocarpos, operación que se realizó en horas de la tarde con la ayuda de una pinza quirúrgica y una caja petri con papel estéril en su interior.

3.8.3. Preparación de las soluciones para la colección y almacenamiento de las basidiosporas

- **Solución A (Colectora):** usada para recolectar basidiosporas de *M. pernicioso* y mantenerlas sin germinar (Frias, 1989).

Reactivos:

- M MES y Glicerol al 16%
- 1.95 g. de buffer MES (2-N-Morpholinoethanesulfonic acid)
- 160 ml de Glicerol.
- 840 ml de agua destilada
- 0.01% de Tween-20
- El pH fue ajustado a 6.2

Para la preparación se agregó 1.95 g de MES en 840 ml de agua destilada estéril y aforo a 1000 ml con 160 ml de Glicerol, en agitación constante, el pH fue ajustado a 6.2 utilizando K (OH) concentrado. La solución fue autoclavada por 15 min. A 17 kg/cm² de presión y una temperatura de 130°C. Al momento de usarla se añadió Tween 20 – 0.01%.

- **Solución B (Diluyente):** usada para bajar la concentración de Glicerol de la solución colectora del 16 al 3%

Reactivos:

- M MES y Glicerol al 3%
- 1.95 g. de buffer MES (2-N-Morpholinoethanesulfonic acid)
- 970 ml de agua destilada
- 30 ml de Glicerol.

Para la preparación se agregó 1.95 g de MES en 970 ml de agua destilada y con los 30 ml de Glicerol se aforó a 1000 ml la solución que está en constante agitación, se ajustó el pH a 6.2 con la utilización de K (OH) concentrado. La solución fue esterilizada en una autoclave por 2 horas a 17 kg/cm² de presión y una temperatura de 130 °C, al momento de usarla se añadió Tween 20 – 0.01%

- **Solución C (Diluyente): usada para bajar la concentración de Glicerol de la solución colectora y permitir la germinación de las basidiosporas**

Reactivos:

- M MES
- 1.95 g de buffer MES (2-N-Morpholinoethanesulfonic acid)
- 1000 ml de agua destilada
- El pH ajustado a 6.2 con K (OH)

Para la preparación agregó 1.95 g. de MES en 1000 ml de agua destilada estéril en constante agitación, el pH de 6.2 con el uso de K (OH) concentrado. La solución fue autoclavada por 15 minutos a 17 kg/cm² de presión y una temperatura de 130 °C, al momento del uso se añadió Tween 20 al 0.01% (Ver Anexo 6).

- **Conteo de basidiosporas**

Se utilizó una cámara Neubauer, se procedió a contar el área de 0.20 x 0.20 mm., evaluado en 5 cuadros (Ver Anexo 3), para aplicar la siguiente fórmula (Celeromics, 2008).

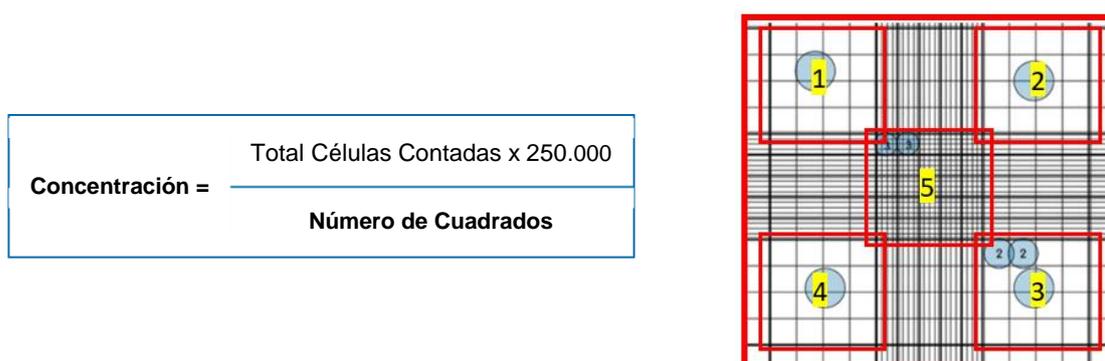


Figura 1. Conteo de esporas en cámara Neubauer y fórmula para el cálculo de la concentración.

- **Recolección y almacenamiento de basidiosporas y conservación en nitrógeno líquido (N₂)**

La descarga de las esporas se realizó a una temperatura ambiente de 25 °C. Se adhirió el

píleo de los basidiocarpos con vaselina a la superficie de una tapa de caja Petri para luego ser colocada sobre la base de la misma, conteniendo de 10 ml de solución colectora (solución A) para concentrar el inóculo. El conjunto de caja petri con la solución colectora se envolvió en papel aluminio, por la razón que el basidiocarpo realiza la descarga de basidiosporas en la oscuridad y se colocó sobre un agitador magnético para mantener la solución en agitación constante durante la noche y así obtener la mayor descarga posible de esporas de los basidiocarpos (Suarez, 1977).

Se determinó la calidad de las esporas recogidas, colocando 4 gotas de la solución en caja petri conteniendo 5 ml de agar agua. Al cabo de dos horas se corroboró la germinación y se añadió tripanblue para detener el proceso y realizar el coteo en el microscopio. En este caso, se observaron 5 campos ópticos al azar, contando el total de esporas y el número de esporas germinadas, para luego calcular el porcentaje de germinación.

Se estableció la concentración de esporas de la solución mediante la Cámara de Neubauer. Para la conservación se procedió a colocar la (Solución A) en tubos viales 2 ml de capacidad, para posteriormente ser conservadas y almacenadas en tanques de nitrógeno líquido a una temperatura de $-320\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Frías, 1987).

3.9. Inoculación de PGPR en semillas y plantas de cacao

3.9.1. Aplicación en semillas

Para el efecto de aplicación en semillas, se recuperó las rizobacterias en su fase exponencial, las mismas que fueron resuspendidas en el buffer PBS (Phosphate Buffered Saline). Se recuperó 10 ml del cultivo bacteriano, para ser centrifugado a 3000 rpm/5min y lavadas dos veces con un mismo volumen de PBS estéril (pH 6.5) y resuspendidas en la misma solución para obtener como producto final únicamente la bacteria para los ensayos de inoculación.

Con ayuda de un bisturí se retiró la testa a las semillas, posteriormente se desinfectaron con NaClO al 2% por 1 min y posteriores lavadas con agua. Para acelerar el proceso de pregerminado, estas fueron colocadas en recipientes plásticos con papel humedecido en su base y ubicado en una incubadora a 26°C , una vez verificada la emisión de la radícula (2 días). Se realizó dos inoculaciones de 400 μl con la bacteria por semilla, para su evaluación a los 8 días.

3.9.1.1. Variables a evaluar en semillas inoculadas con PGPR

➤ Longitud de la radicular

Para el efecto, se cortó con un bisturí el punto de inserción de la radícula y el cotiledón, y se utilizó una regla (cm).

➤ Peso radicular

Luego de la emisión de la radícula y observar diferencias. Para el efecto, se cortó el punto de inserción de la radícula y el cotiledón, y se usó una balanza electrónica.

3.9.2. Aplicación edáfica en plantas de cacao

En plantas se realizó el proceso de pre-germinación y aplicación de los aislados bacterianos durante 3 días. Una vez realizado se trasplantaron en maceteros en suelo franco arcilloso y turba (2/1) en invernadero. Las PGPR se aplicaron en fase exponencial al 10 % de concentración, las inoculaciones fueron realizadas con una micropipeta 2 veces por semana durante un mes en dosis de 1 ml/ planta (Ver Anexo 2).

3.9.2.1. Variables a evaluar en la aplicación edáfica de PGPR

Para todas las variables la evaluación se realizó 77 días a partir de la siembra de las plantas.

➤ Diámetro basal del hipocótilo en plántulas

Con la ayuda de un calibrador vernier se efectuó la lectura del diámetro del hipocótilo.

➤ Peso fresco foliar

Se tomó como referencia hojas completamente verdes y se pesaron en una balanza electrónica.

➤ Longitud del tallo

Se cortó el punto de inserción de la radícula y el cotiledón y se tomó lectura hasta el meristemo apical, con la ayuda de una regla (cm).

➤ Peso del tallo

Se lo realizó mediante el uso de una balanza electrónica.

➤ **Longitud radicular**

Para el efecto, se cortó el punto de inserción de la radícula y el cotiledón, y se utilizó una regla (cm).

➤ **Peso radicular**

Luego de la emisión de la radícula y observar diferencias. Para el efecto, se cortó el punto de inserción de la radícula y el cotiledón, y se usó una balanza electrónica.

3.10. Inoculación foliar y edáfica de rizobacterias en plántulas de cacao infectadas con *M. pernicioso*

3.10.1. Inoculación foliar y edáfica en plantas de cacao con PGPR

- Aplicación foliar: Las semillas se desinfectaron con NaClO al 2%, luego fueron trasplantadas en maceteros conteniendo suelo franco arcilloso y turba (2/1). A la emisión de hojas a (25 días) se efectuó la aplicación de las bacterias al 10%, la superficie del suelo fue protegida con plástico para evitar la caída de partículas del inóculo bacteriano en el suelo, se realizaron 8 aplicaciones por un mes, de 1ml por planta con el uso de un atomizador (Ver Anexo 5).
- Aplicación edáfica: Las PGPR se aplicaron en fase exponencial (Rodríguez, 2018) al 10 % de concentración, las inoculaciones fueron realizadas con una micropipeta 2 veces por semana durante un mes en dosis de 1 ml/ planta (Ver Anexo 2).

3.10.2. Inoculación de *M. pernicioso* en plantas de cacao

Se realizó 35 días después de la siembra de las plantas, el inóculo fue de 1ml/planta en el meristemo apical en horas de la tarde, mediante cámara húmeda. Se realizó la preparación de la fuente de inóculo de *M. pernicioso* para efectuar las aplicaciones de la siguiente manera:

Cálculo en el número de esporas en la suspensión original

$$X_n = \% \text{ de germinación} \times \text{concentración.}$$

Cantidad de solución A (esporas – inóculo)

$$Sol. A = \frac{X_{ci} \times CD}{X_n}$$

X_{ci}: Cantidad de inóculo deseado

CD: Concentración deseada.

X_n: Número de esporas / ml en la suspensión original.

Cantidad de solución B (diluyente)

$$Sol. B = X_{sa} \times 5.33$$

X_{sa}: Cantidad de solución A

5.33 Coeficiente de dilución

Cantidad de solución C (diluyente)

$$Sol. C = X_{ci} - (X_{sa} + X_{sb})$$

X_{ci}: Cantidad de inóculo deseado

X_{sa}: Cantidad de solución A.

X_{sb}: Cantidad de solución B.

Determinada la cantidad de solución B se colocó en una bureta, dispensando gota a gota (aproximadamente 35 a 45 gotas / minuto) en forma gradual sobre la solución C colocada en un matraz y mantenida en agitación constante, durando el proceso aproximadamente 10 minutos.

Se colectó la mezcla de las Soluciones B y solución C, y se colocó nuevamente en la bureta para ir dispensando gota a gota (aproximadamente 35 a 45 gotas/minutos) sobre la solución A que contiene a las esporas, contenida en otro matraz estéril cubierto de papel aluminio para mantener la oscuridad por la fotosensibilidad de las esporas y sometidas a una lenta y constante agitación.

3.10.3. Variables a evaluar en los tratamientos con PGPR en presencia de *M. perniciosus*

➤ Diámetro basal del hipocótilo de las plántulas

Con la ayuda de un calibrador vernier se efectuó la lectura del diámetro del hipocótilo.

➤ **Longitud radicular**

Para el efecto, se cortó el punto de inserción de la radícula y el cotiledón, y se utilizó una regla (cm).

➤ **Peso radicular**

Se registró luego de la emisión de la radícula, para el efecto se cortó el punto de inserción de la radícula y el cotiledón, y se usó una balanza electrónica.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de respuestas morfológicas en semillas pregerminadas en aplicación de PGPR

4.1.1. Longitud radicular (semillas pre-germinadas)

La aplicación de las PGPR a semillas pregerminadas ejerció cambios en la estructura del sistema radicular, encontrando diferencia estadística entre los tratamientos. Verificando la mayor longitud radicular con 8.29 cm por aplicación de *A. calcoaceticus* (BMR2-12) y observando también el incremento en longitud radicular de 7.67 cm por la aplicación de *S. marcescens* (PM3-8). No se observó cambios en la arquitectura del sistema radicular en longitud por aplicación de las cepas *E. asburiae* (PM3-14), *P. protegens* (CHA0) y las semillas sin inóculo bacteriano. Además, se observó un efecto negativo por aplicación de *P. veronii* (R4) que afecta al sistema radicular con la disminución de la misma en comparación de las semillas no tratadas (Figura 2).

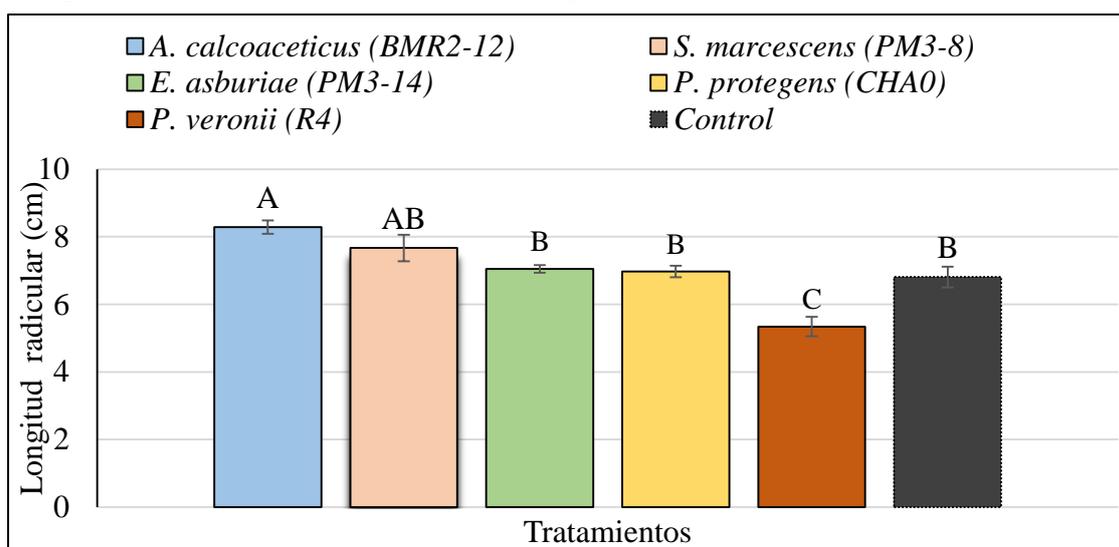


Figura 2. Evaluación de las PGPR aplicadas en semillas pregerminadas de cacao sobre el carácter longitud radicular. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.1.2. Peso radicular (semillas pre-germinadas)

La inoculación de las rizobacterias en semillas pregerminadas indujo un incremento en el peso del sistema radicular, por aplicación de *A. calcoaceticus* (BMR2-12) obteniendo el mayor peso de 0.72 g., sin diferir estadísticamente de las demás cepas. En semillas sin inóculo bacteriano se observó el menor peso radicular de 0.55 g (Figura 3).

Los resultados por inoculación de las bacterias a semillas pregerminadas de cacao se verifica una efectividad de colonización de las mismas, donde se verificó con el aumento

al número de raíces secundarias y el incremento en longitud. Esto se observa en la Figura 4, con la aplicación de BMR2-12 y PM3-8, el incremento de número de raíces secundarias corroboraría el proceso de formación de simbiosis, donde las bacterias captan los aminoácidos radiculares para su desarrollo y colonización radicular

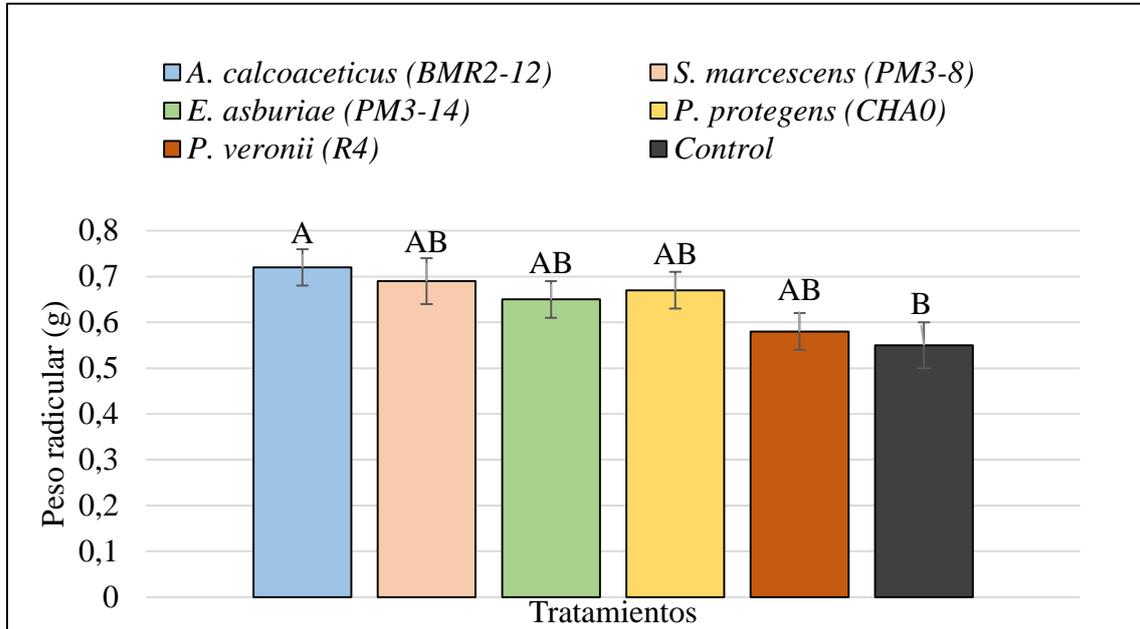


Figura 3. Evaluación de las PGPR aplicadas en semillas pregerminadas de cacao sobre el carácter peso radicular. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

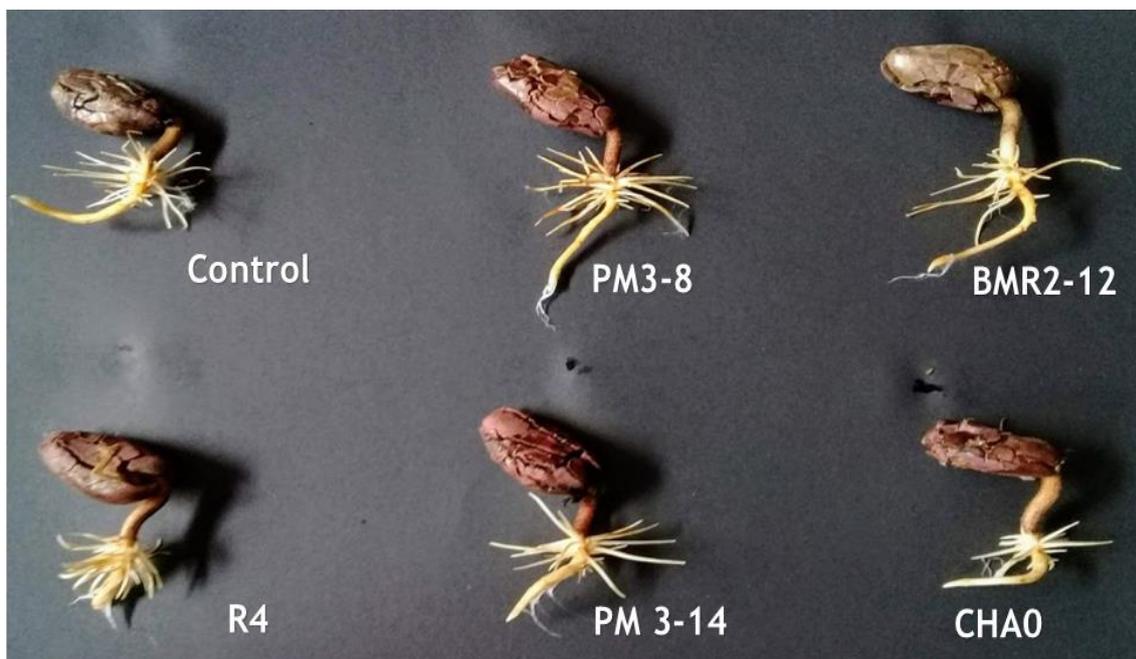


Figura 4. Efectos de las PGPR en la longitud y el peso radicular; aplicadas en semillas pregerminadas (2 días).

4.2. Evaluación de respuesta morfológica de plantas de cacao por aplicación a la rizósfera de PGPR

4.2.1. Diámetro del hipocótilo

La evaluación del carácter fenotípico al diámetro del hipocótilo por la aplicación de rizobacterias en plantas de cacao ejerció cambios en la morfología, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos. Las plantas inoculadas con *S. marcescens* (PM3-8) determinó el mayor diámetro de 0.63 cm estadísticamente superior a los demás tratamientos. Por las aplicaciones de *A. calcoaceticus* (BMR2-12), *P. protegens* (CHA0) y *P. veronii* (R4), *E. asburiae* (PM 3-14) se verifican un incremento que superan los 0.52 cm diámetro. Donde las plantas sin el inoculante bacteriano se observó un diámetro basal de 0.50 cm diámetro (Figura 5).

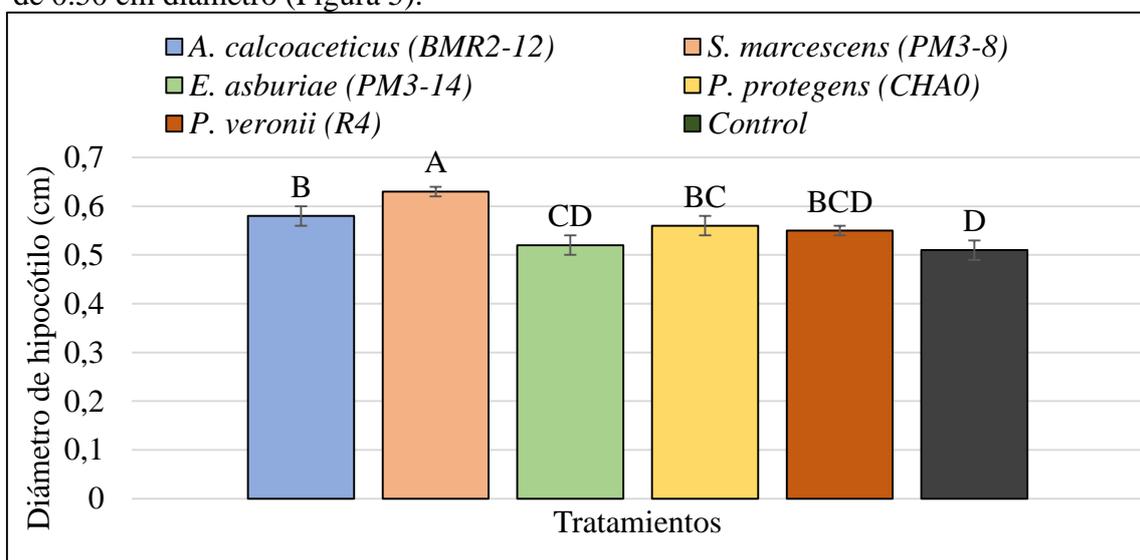


Figura 5. Evaluación del diámetro del hipocótilo por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.2.2. Peso foliar

Al peso foliar se observaron cambios sustanciales por la inoculación de PGPR en plantas de cacao, verificando un efecto estimulante entre los tratamientos, existiendo diferencia estadística. La aplicación de *A. calcoaceticus* (BMR2-12) se observó el mayor incremento en peso de 6.37 g. Las aplicaciones con las bacterias *P. veronii* (R4), *S. marcescens* (PM3-8), *P. protegens* (CHA0) se observa un incremento en pesos foliar que oscila entre los 4.46 y 5.35 g. Este carácter morfológico al incremento del peso foliar estaría regulado por el incremento al número de hojas, reflejado por la adición edáfica de las bacterias. Las

plantas que no fueron tratadas con bacterias el peso foliar oscila entre los 3.9 g (Figura 6).

Los resultados por inoculación de las bacterias en plantas de cacao vía edáfica evidencian una efectividad de colonización de las mismas, donde se observa con el incremento de características morfológicas como el tamaño y cantidad de follaje. Esto se observa en la Figura 7, con la aplicación de BMR2-12 y R4, este incremento de número hojas verificando el proceso de formación de simbiosis y desarrollo de plantas.

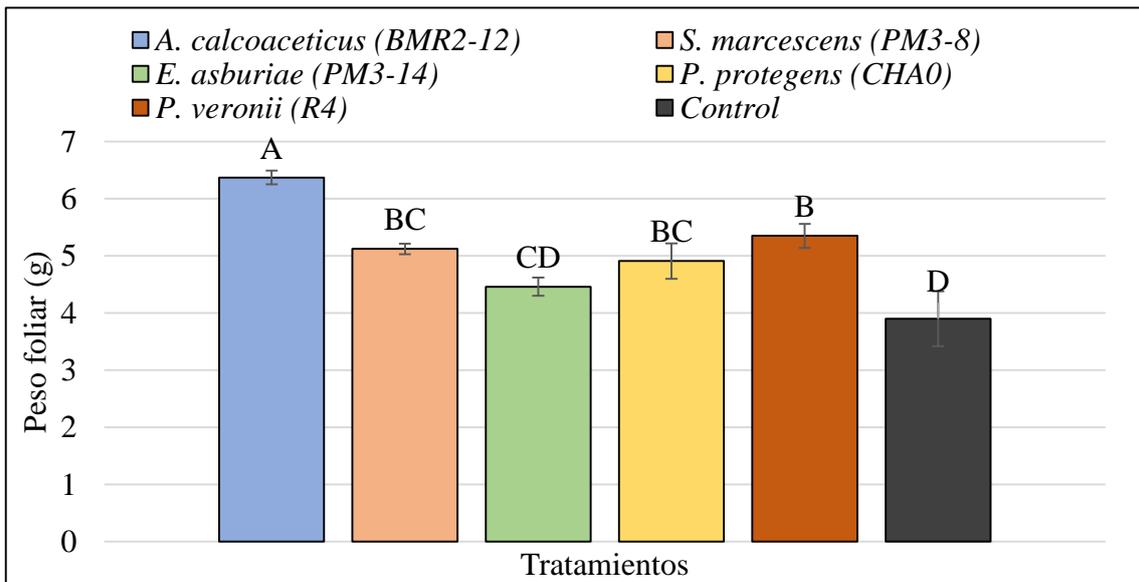


Figura 6. Evaluación del peso foliar por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).



Figura 7. Efecto de las rizobacterias en los caracteres morfológicos en plantas de cacao.

4.2.3. Longitud del tallo

Este carácter morfológico de longitud del tallo en cacao se ve influenciado por la aplicación de las bacterias, observando diferencias significativas entre los tratamientos. La aplicación edáfica en plántulas de cacao de las rizobacterias incrementó su longitud entre 31 a 35.87 cm, en relación a las plantas que no fueron inoculadas se observó una longitud que no supera los 29.57 cm.

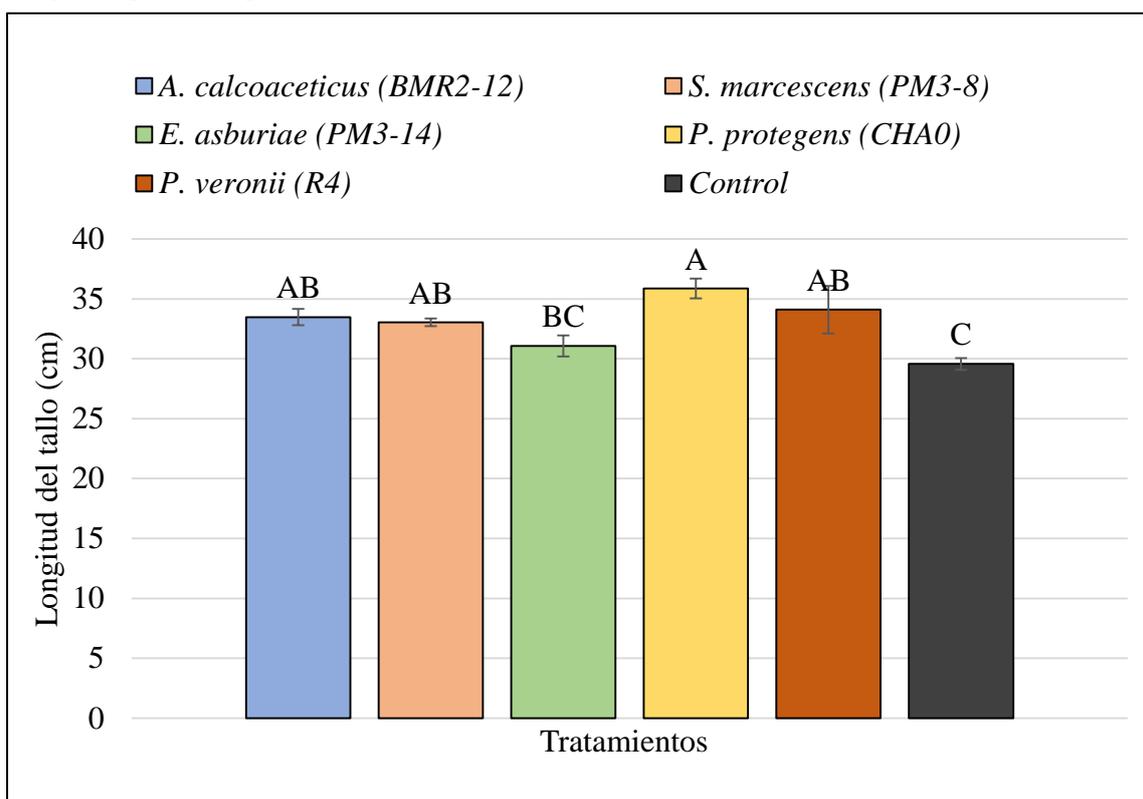


Figura 8. Evaluación de la longitud del tallo por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.2.4. Peso del tallo

La aplicación edáfica de las rizobacterias al evaluarlas en plantas de cacao posterior a 77 después de la inoculación ejerció cambios en el peso del tallo, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos. Observando los mayores promedios de peso de tallo con 4.36 y 5.04 g., por aplicación de *P. veronii* (R4), *S. marcescens* (PM3-8), *P. protegens* (CHA0) Y *A. calcoaceticus* (BMR2-12). A diferencia, las plantas tratadas con *E. asburiae* (PM3-14) no ejerció cambios significativos en el peso del tallo de las plantas, resultado similar a aquellos tratamientos que no se añadió el inoculo bacteriano con 3.96 g de peso de tallo.

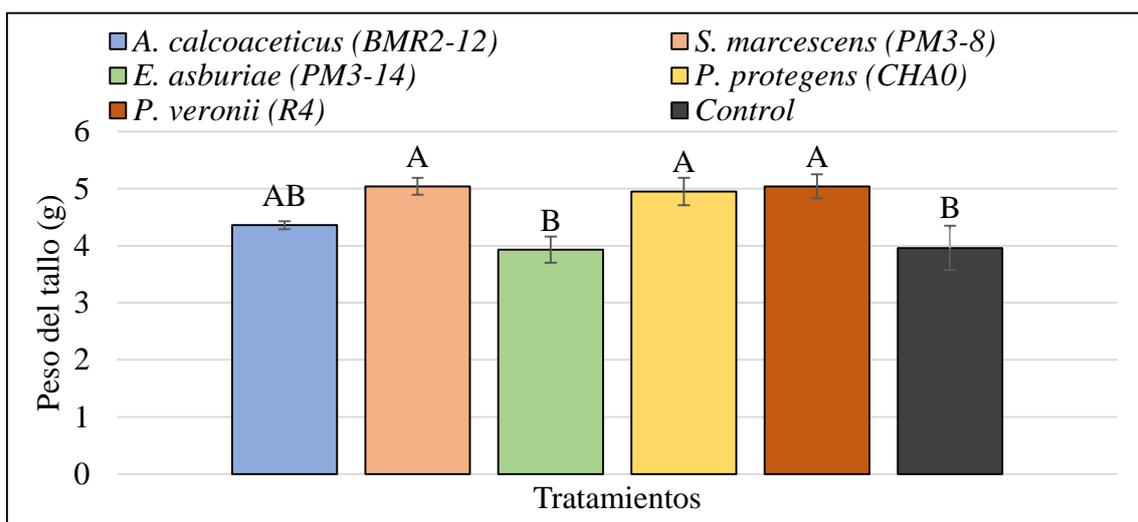


Figura 9. Evaluación del peso del tallo por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.2.5. Longitud radicular

La aplicación edáfica de las rizobacterias en plantas de cacao ejerció cambios en la arquitectura del sistema radicular, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos. Generando efectos característicos de la longitud radicular por la aplicación de *A. calcoaceticus* (BMR2-12) y *P. veronii* (R4) con valores mayores a 21.43 cm. A diferencia de las plantas sin el inóculo bacteriano y con la aplicación de *S. marcescens* (PM3-8) y *E. asburiae* (PM3-14) obtuvieron valores entre 18.97 y 20 cm. Además, se observó un efecto negativo por aplicación de *P. protegens* (CHA0) que afecta al sistema radicular con la disminución de la misma en comparación de las semillas no tratadas.

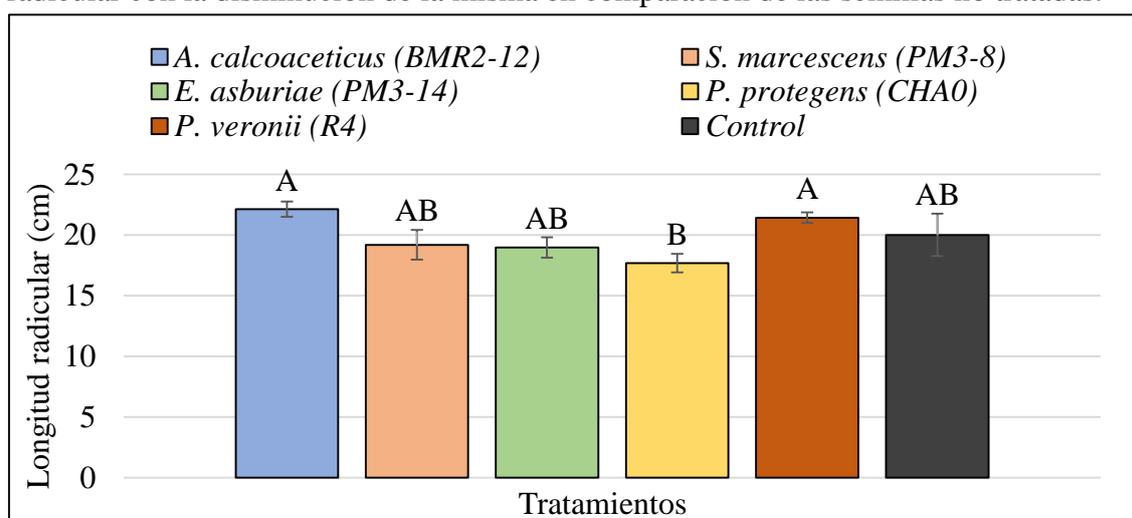


Figura 10. Evaluación de la longitud radicular por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.2.6. Peso radicular

En el peso radicular se verificó diferencia significativa, logrando establecer una marcada diferencia en esta variable por la aplicación edáfica de *P. veronii* (R4) con 6.77 g de peso radicular. Caso contrario por aplicación de las bacterias *A. calcoaceticus* (BMR2-12), *P. protegens* (CHA0), *E. asburiae* (PM3-14) y *S. marcescens* (PM3-8) no ejercieron cambios al incremento del peso radicular, donde no superan 3.6 g, siendo similar a las plantas que no fueron tratadas con las bacterias (Figura 11).

Los resultados por inoculación de las bacterias en plantas de cacao vía edáfica verifican la colonización de las mismas, donde se observa el incremento al desarrollo del sistema radicular (Figura 12). Verificando cambios significativos en los caracteres morfológicos del cacao por aplicación de R4, con incremento de la masa radicular y masa foliar determinando un exitoso proceso de formación de simbiosis.

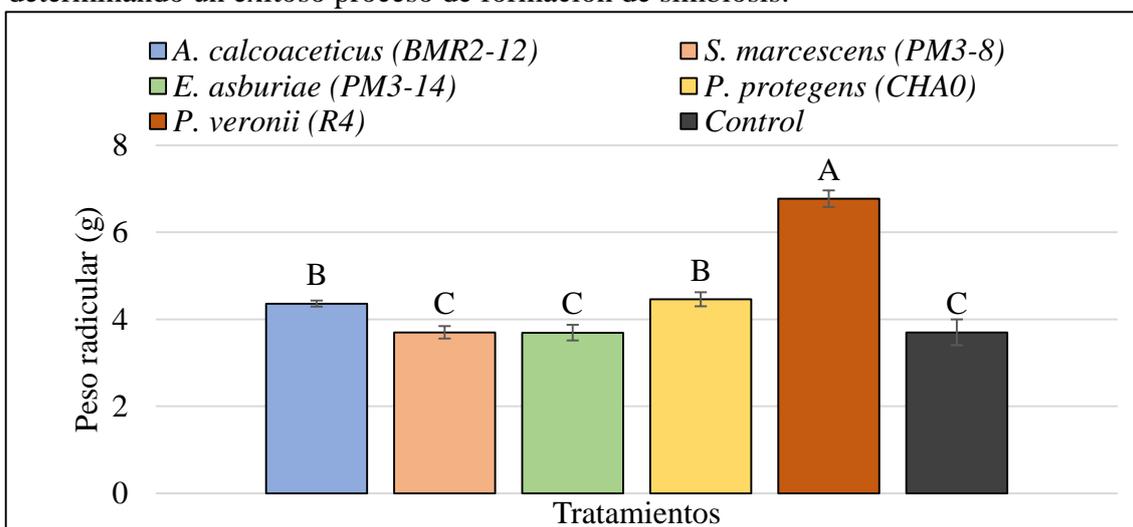


Figura 11. Evaluación del peso radicular por aplicación edáfica de rizobacterias en cacao. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).



Figura 12. Efecto de las rizobacterias en los caracteres morfológicos: longitud y masa radicular

4.3. Evaluación de los caracteres morfológicos de plantas cacao por aplicación foliar de las PGPR en presencia de *M. pernicioso*

4.3.1. Diámetro del hipocótilo

Se observaron cambios al diámetro del hipocótilo, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos tratados con las bacterias en presencia del patógeno. En plantas de cacao en inoculación de las bacterias por vía foliar y el patógeno; en presencia de *S. marcescens* (PM3-8) se verificó el mayor diámetro con un promedio de 0.44 cm. Por consiguiente, la aplicación de *P. protegens* (CHA0), *A. calcoaceticus* (BMR2-12), *P. veronii* (R4) y los tratamientos sin inóculo bacteriano se obtuvieron valores que oscilaron entre 0.41 y 0.42 cm. La aplicación de *E. asburiae* (PM3-14) no se observó un efecto sinérgico al control de la enfermedad por la aplicación de la bacteria.

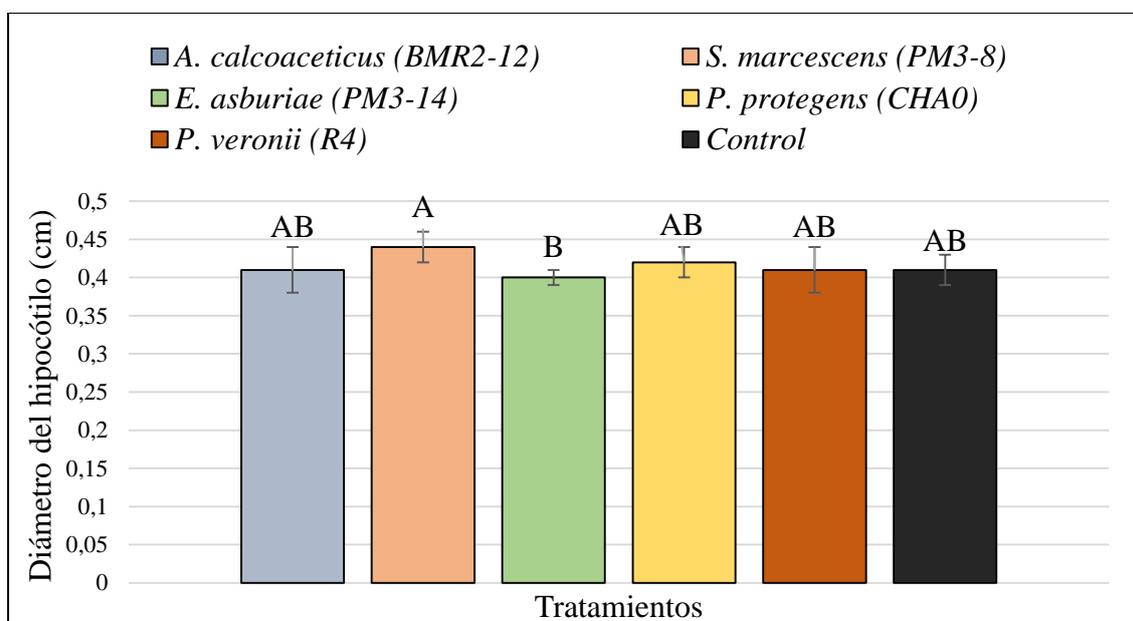


Figura 13. Evaluación del diámetro del hipocótilo por aplicación foliar de rizobacterias en presencia de *M. pernicioso*. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.3.2. Longitud radicular

La aplicación foliar de las rizobacterias en plantas de cacao en presencia de *M. pernicioso* no ejerció cambios sustanciales a la arquitectura del sistema radicular en longitud. En esta variable se observó diferencia estadística entre los tratamientos marcando diferencias entre las aplicaciones de las bacterias y las plantas que no fueron tratadas con la misma, observando una longitud entre 23 a 27 cm.

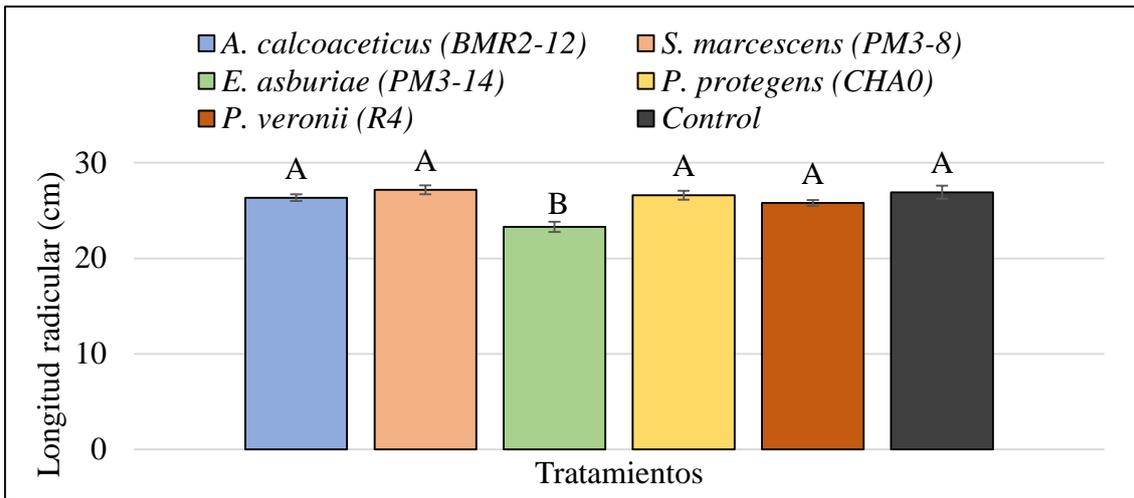


Figura 14. Evaluación de la longitud radicular por aplicación foliar de rizobacterias en presencia de *M. pernicioso*. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.3.3. Peso radicular

La aplicación de PGPR aplicadas vía foliar en presencia de *M. pernicioso* al evaluar el peso radicular, se determinó que existe diferencia significativa entre los tratamientos. La aplicación de *S. marcescens* (PM3-8) y *E. asburiae* (PM3-14) se observó la mayor formación de pelos absorbentes lo que favoreció al incremento en peso radicular de las plantas de cacao con 2.85 y 2.77 (g). A diferencia de las plantas tratadas con *A. calcoaceticus* (BMR2-12), *P. protegens* (CHA0), *P. veronii* (R4) que alcanzaron valores entre 2.32 y 2.85 cm en peso radicular, además no se observaron cambios sustanciales sin el inóculo bacteriano.

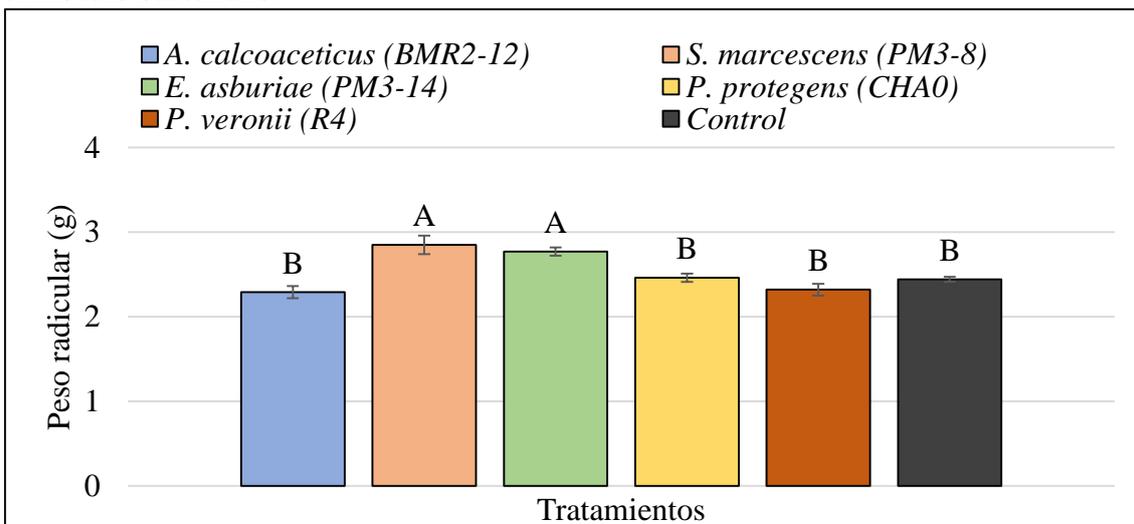


Figura 15. Evaluación del peso radicular por aplicación foliar de rizobacterias en presencia de *M. pernicioso*. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.4. Evaluación de los caracteres morfológicos de plantas cacao por aplicación a la rizósfera de las PGPR en presencia de *M. pernicioso*

4.4.1. Diámetro del hipocótilo

La aplicación edáfica de las PGPR en la evaluación del carácter morfológico al diámetro del hipocótilo en presencia de *M. pernicioso* en plantas de cacao, se aprecia que no existieron cambios sustanciales con la aplicación de *P. veronii* (R4), *E. asburiae* (PM3-14), plantas sin inóculo bacteriano y *S. marcescens* (PM3-8) obtuvieron los mayores promedios entre 0.41 y 0.40 (cm), caso contrario la aplicación de *A. calcoaceticus* (BMR2-12) y *P. protegens* (CHA0) corresponden a los menores promedios de diámetro.

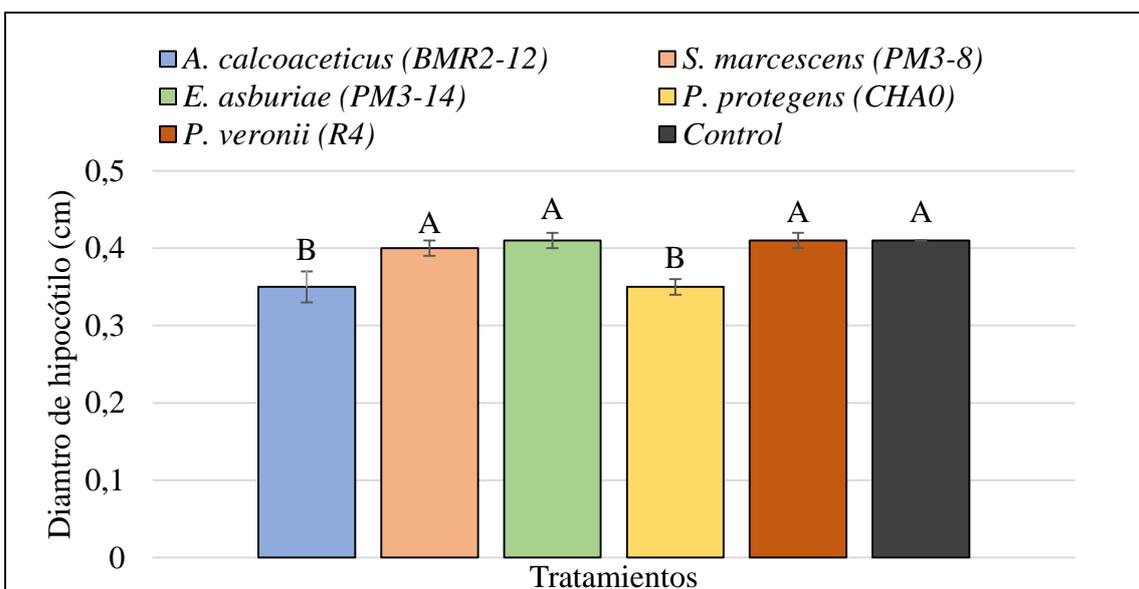


Figura 16. Evaluación del diámetro del hipocótilo por aplicación edáfica de rizobacterias en presencia de *M. pernicioso*. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.4.2. Longitud radicular

Las aplicaciones de rizobacterias vía edáfica, en presencia del patógeno *M. pernicioso* en plantas de cacao, se observó diferencia significativa entre los tratamientos, dando como resultado que la aplicación de *E. asburiae* (PM3-14), *A. calcoaceticus* (BM2-12) y *S. marcescens* (PM3-8), obtuvieran los mayores valores a longitud radicular, por

consiguiente con *P. veronii* (R4) y las demás no alcanzaron efectos significativos en esta variable.

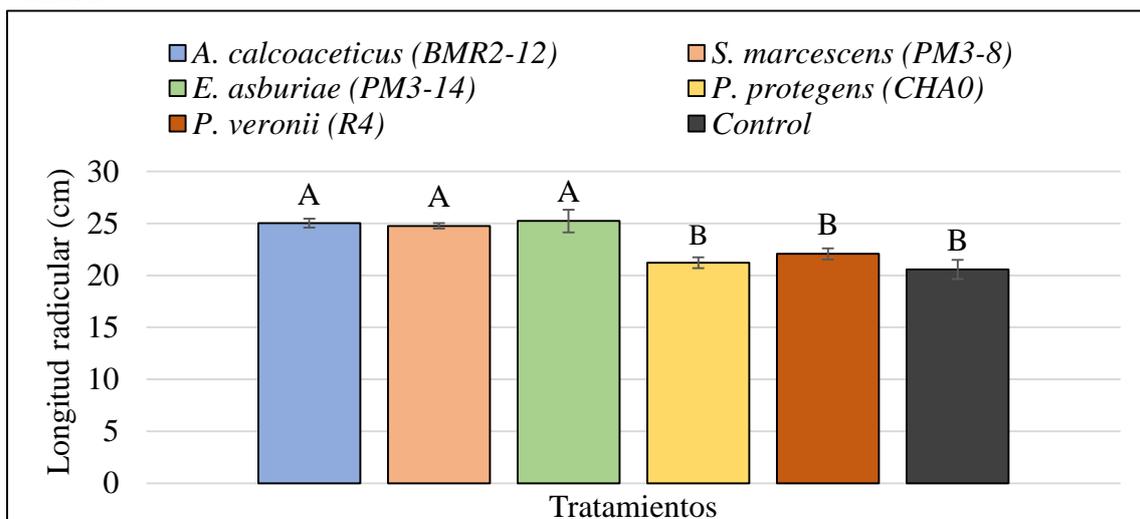


Figura 17. Evaluación de la longitud radicular por aplicación edáfica de rizobacterias en presencia de *M. pernicioso*. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

4.4.3. Peso radicular

La aplicación de PGPR vía edáfica en plantas de cacao en antagonismo a *M. pernicioso* al evaluar esta variable se verificó diferencia significativa entre los tratamientos, determinando que las plantas sin inóculo bacteria se observó el mayor peso radicular con 3.76 g, las plantas de cacao bajo los tratamientos en presencia de los inóculos bacterianos se verifica el menor peso al sistema radicular entre 2.35 y 3.07 g.

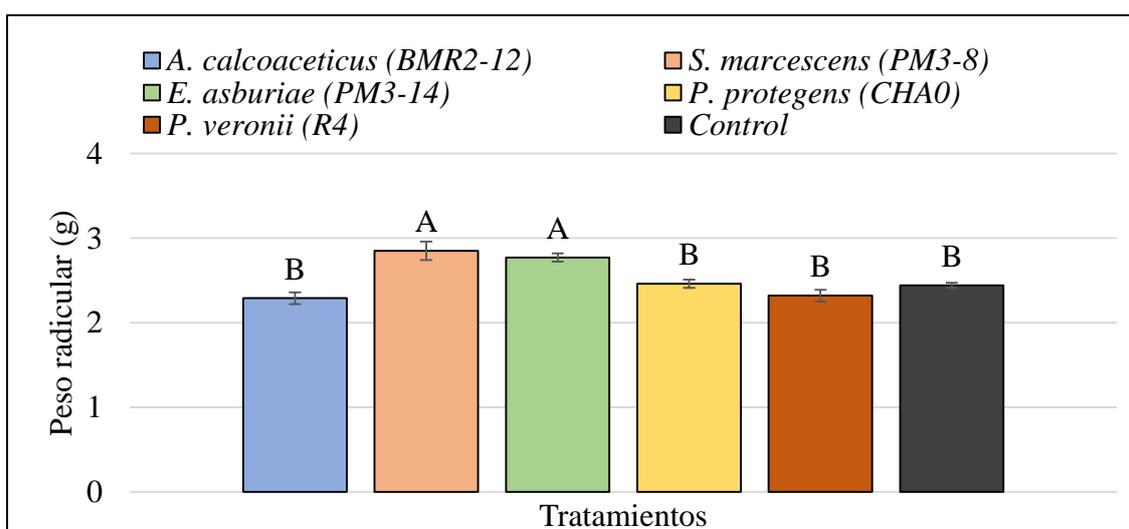


Figura 18. Evaluación del peso radicular por aplicación edáfica de rizobacterias en presencia de *M. pernicioso*. Las barras de error indican \pm ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).



Figura 19. Efectos de las PGPR sobre los caracteres morfológicos longitud y peso radicular de plantas de cacao en presencia de *M. pernicioso*.

4.5. Discusión

4.5.1. Evaluación de respuestas morfológicas en semillas pre-germinadas en aplicación de PGPR

Las semillas que fueron inoculadas con *A. calcoaceticus* (BMR 2-12), *S. marcescens* (PM 3-8), *E. asburiae* (PM 3-14), *P. protegens* (CHA0), *P. veronii* (R4) reflejaron que hay un efecto estimulante del desarrollo en peso y longitud radicular. Se tiene que considerar que la aplicación específica de *A. calcoaceticus* (BMR2-12) ejerce un cambio sustancial en el desarrollo del sistema radicular, debido a la generación de simbiosis en el estadio temprano de germinación de la semilla. Esto concuerda a lo expresado por Sachdev *et al.*, (2010), donde al evaluar el sistema radicular de trigo los efectos por aplicación *A. calcoaceticus* ejerce mayor longitud de raíz 31.4 cm. La cepa prospera en los exudados liberados por las raíces de la misma planta, posterior la multiplicación de estas poblaciones bacterianas en la rizosfera con la liberación de IAA puede mejorar la rizogénesis. Además según Kang *et al.*, (2009), afirma que la cepa *A. calcoaceticus* secreta giberelinas en el ambiente de la planta, donde la giberelina induce al crecimiento además del ensanchamiento de tejidos. Gutierrez *et al.*, (2003) corrobora el efecto que tienen las PGPR al estimular la germinación en semillas de frejol y el desarrollo de raíces secundarias.

Mientras la aplicación de *Pseudomonas veronii* (R4) minimiza el incremento en longitud de tejido radicular con resultados “menor al control” entre los ensayos evaluados, sin embargo favoreció al incremento de raíces secundarias y pelos absorbentes, resultado que refleja el aumento en peso de raíz. Sería importante destacar que la aplicación de esta bacteria a esquejes de cacao en fase de enraizamiento favorecería el proceso de prendimiento debido a la cantidad de raíces secundaria que genera.

4.5.2. Evaluación de respuestas morfológicas de plantas de cacao en aplicación a la rizósfera de PGPR

La aplicación de las PGPR's a plantas de cacao destacó que la variable peso de hoja y peso radicular generó diferenciación entre las plantas evaluadas, donde la cepa *A. calcoaceticus* (BMR2-12) obtuvo mayor peso foliar. Las características de esta cepa se ven reflejadas por la capacidad de producir reguladores de crecimiento de tipo vegetal,

donde estos promueven el desarrollo de las plantas, *A. calcoaceticus* ha reportado producir hormonas como ABA y Gas (Kang *et al.*, 2010)

4.5.3. Evaluación de los caracteres morfológicos de plantas de cacao por aplicación foliar de las PGPR en presencia de *M. pernicioso*

La presencia del patógeno en plantas de cacao ejerce cambios sustanciales a los caracteres morfométricos y morfológicos con la disminución al diámetro de hipocótilo, siendo así que la aplicación foliar de forma temprana de *S. marcescens* (PM3-8) reduce los efectos causados por *M. pernicioso*. Purkayastha *et al.*, (2018), manifiestan que las PGPR son productoras de quitinasas, enzimas hidrolíticas, degradan las paredes celulares de los hongos e inhiben la colonización del patógeno, por efecto de la bacteria al evitar la expansión en el sistema intracelular del tejido foliar. Además, es evidente que una de la sintomatología reflejada en este trabajo fue la reducción del diámetro del hipocótilo por efecto del patógeno. Teixeira *et al.*, (2014) explica que el hongo degrada las moléculas de almacenamiento de carbohidratos y lípidos existiendo además un desbalance hormonal por ende la privación de estos elementos genera la reducción de los órganos de la planta en este caso reflejado en el hipocótilo.

4.5.4. Evaluación de los caracteres morfológicos de plantas de cacao por aplicación a la rizósfera de las PGPR en presencia de *M. pernicioso*

Según lo evaluado por Auhing (2018) una de las sintomatologías características del patógeno en plantas es el atrofiamiento de la raíz, resultados que físicamente concuerdan con lo expresado en plantas a las que solo se aplicó el patógeno (control). Teixeira *et al.*, (2014), afirma que en plantas infectadas se registra una alta concentración de “auxinas” la cuales al ser sintetizadas en los brotes apicales su campo de acción se registra en las raíces, lo que demuestra que en el presente trabajo al evaluar el peso radicular el control (planta + *M. pernicioso*) presente los mayores valores. Además, el atrofiamiento de la raíz da como resultado un mayor volumen en peso lo cual se registra ante esta evaluación.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Las rizobacterias ejercen un efecto estimulante en semillas pregerminadas, demostrado así por el mayor desarrollo a nivel de las variables; peso con 0.72 g., y longitud radicular con 8.29 cm., en relación al control (PBS). En plantas inoculadas con *A. calcoaceticus* se obtuvo mayor peso de hoja con 6.37 g., y longitud radicular con 22.13 cm.
- Por aplicación de bacterias “vía foliar” en presencia de *M. pernicioso* en plantas, los tratamientos con *Serratia marcescens* (PM3-8) obtuvo el mejor promedio de diámetro de hipocótilo con 0.44 cm., demostrando ser la rizobacteria que mayor diámetro genera.
- La aplicación de PGPR “vía edáfica” ante el accionar con *M. pernicioso* demuestra que no existe diferencia en la variable diámetro del hipocótilo con valores entre 0.41 y 0.40 cm, al comparar los tratamientos con PGPR y el control.

5.2. Recomendaciones

- Realizar reaislamiento de las bacterias en las plantas inoculadas a partir de; hojas, raíces o suelo para corroborar su presencia y efecto.
- Aumentar los días de evaluación de las plantas hasta 70 días después de la inoculación con *M. perniciosa* para verificar los síntomas.
- Instalaciones adecuadas para la ejecución de los ensayos a nivel in vivo (luz, temperatura, humedad principalmente).

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Auhing, Javier (2018). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de *Moniliophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L., y el efecto antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs').
- Bach, A. T., y Díaz, M. (2008). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la agricultura. Revista Agricultura Orgánica, (3), 35-38.
- Berlanga, Mercedes. (2008). *Acinetobacter*. Molecular Biology. Ulrike Gerischer (ed.). International Microbiology; Vol. 11, Núm. 2 (2008); 147-148.
- Celeromics (2008). Fórmula de la Cámara de Neubauer. obtenido de: <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion.php>
- Chavez, K. (2016). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. “Identificación y selección de rizobacterias del género *Pseudomonas* spp de cultivares endémicos de *Musa* spp con actividad antagonista al hongo *Mycosphaerella fijiensis*”.
- de Oliveira, B. V., Teixeira, G. S., Reis, O., Barau, J. G., Teixeira, P. J. P., do Rio, M. C. S. y Pereira, G. A. (2012). A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. Fungal genetics and biology, 49(11), 922-932.
- Evans, HC (1978). Enfermedad de la escoba de bruja del cacao (*Crinipellis perniciosa*) en Ecuador. Annals of Applied Biology, 89(2), 185-192.
- Freire, O., Cantos, I. A., Mendoza J. C., Zamora., Avellán, L., y Flores, F. G. Z. (2017). Selección de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con resistencia a escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en Los Ríos, Ecuador. Revista Ciencia y Tecnología, 10(1), 17-26.
- Frias, G. A. (1989). Universidad de Florida. An inoculation method to evaluate resistance to witches' broom disease of cacao. 33-34.
- Glick, BR, Patten, CL, Holguin, G., y Penrose, DM (1999). Mecanismos utilizados por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Guato, Jefferson (2017). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. “Rizobacterias nativas de *Pseudomonas* spp con potencial antagonista in vitro a hongos patogénicos: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, y *Moniliophthora roreri*”

Gutierrez, R. T., Navarro, C. P., y Canino, N. S. (2003). Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 30(2), 56.

Haas, D., y Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 117-153.

Holliday, P. C. (1954). A test for resistance to *Marasmius perniciosus* Stahel. A Test for Resistance to *Marasmius Perniciosus* Stahel., 50–55.

Rodríguez, Luis (2018). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia *Meloidogyne incognita* “in vitro”.

Jousset, A., Schuldes, J., Keel, C., Maurhofer, M., Daniel, R., Scheu, S., y Thuermer, A. (2014). Full-genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas protegens* CHA0. *Genome announcements*, 2(2).

Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I., y Lugtenberg, B. (2005). Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1809-1817.

Kang, S. M., Gil-Jae, J., Hamayun, M., Na, C.-I., Shin, D.-H., Kim, H y Lee, I.-J. (2009). Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnol Lett*, 277–281. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9867-2>

Kang, S. M., Khan, A. L., Hamayun, M., Shinwari, Z. K., Kim, Y. H., Joo, G. J., y Lee, I. J. (2012). *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. *Pak. J. Bot*, 44(1), 365-372.

King, E. O., Ward, M. K., y Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 51-301–307. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:002221435490222X>

Laker, H. A., y Ram, A. (1992). Investigations on integrated control of witches' broom disease off cocoa in Rondonia State, Brazil. *International Journal of Pest Management*, 38(4), 354-358.

Lemanceau, P., Bakker, P. A., De Kogel, W. J., Alabouvette, C., y Schippers, B. (1992). Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Applied and environmental microbiology*, 58(9), 2978-2982.

Maurhofer, M., Baehler, E., Notz, R., Martinez, V., y Keel, C. (2004). Cross talk between 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol pseudomonads on wheat roots. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 1990-1998.

Meinhardt, L. W., Rincones, J., Bailey, B. A., Aime, M. C., Griffith, G. W., Zhang, D., y Pereira, G. A. G. (2008). *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology*, 9(5), 577–588.

Mondego, J. M., Carazzolle, M. F., Costa, G. G., Formighieri, E. F., Parizzi, L. P., Rincones, J., ... & Vidal, R. O. (2008). A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC genomics*, 9(1), 548.

Montes, C., Altimira, F., Canchignia, H., Castro, Á., Sánchez, E., Miccono, M., y González, C. (2016). Un borrador de la secuencia del genoma de *Pseudomonas veronii* R4: una cepa asociada a la raíz de vid (*Vitis vinifera* L.) con alto potencial de control biológico. *Estándares en ciencias genómicas*, 11 (1), 76.

Ordentlich, A., Elad, Y., y Chet, I. (1987). Rhizosphere colonization by *Serratia marcescens* for the control of *Sclerotium rolfisii*. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), 747-751.

Pozo Nájera, (2006). Comparación de métodos para evaluación temprana de resistencia a escoba de bruja (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) en cacao (*Theobroma cacao* L.). (No.

Tesis N° 421). Universidad Central del Ecuador.

Purdy, L. H., y Schmidt, R. A. (1996). Status of cacao witches'broom: Biology, Epidemiology, and Management. *Annual review of phytopathology*, 34(1), 573-594.

Purkayastha, G. D., Mangar, P., Saha, A., y Saha, D. (2018). Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PloS one*, 13(2), e0191761.

Queiroz, B. P. V., y Melo, I. S. D. (2006). Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 448-450.

Revelo, Stalin (2010). Ajuste de Metodologías de Evaluación Temprana para la Búsqueda de Resistencia. INIAP Archivo Historico.

Rocha, H. M., y Wheeler, B. E. J. (1985). Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology*, 34(3), 319-328.

Rokhbakhsh-Zamin, F., Sachdev, D., Kazemi-Pour, N., Engineer, A., Pardesi, K. R., Zinjarde, S y Chopade, B. A. (2011). Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *J Microbiol Biotechnol*, 21(6), 556-566.

Saavedra, D. A. C., Martínez, H. F. C., Rosero, N. C., Cuenca, F. F. G., Fernández, R. G., y Moreira, Á. V. C. (2017). Rizobacterias que promueven el desarrollo e incremento en productividad de *Glycine max* L. *Revista Ciencia y Tecnología*, 10(1), 7-15.

Sachdev, D., Nema, P., Dhakephalkar, P., Zinjarde, S., y Chopade, B. (2010). Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of *Acinetobacter* community from the rhizosphere of wheat. *Microbiological research*, 165(8), 627-638.

Schmidt, R. A., Miller, T., Resources, F., y Sci-, A. (1999). Influence of Inoculum Concentration on Production of Spermogonia and Aecia on Pine Seedlings Infected by

Basidiospores of *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*. Plant Disease, (13), 83:367-370.

Silva, S., Luz, E., Almeida, O., Gramacho, K., y Bezerra, J. (2002). Redescrición de la sintomatología causada por *C. pernicioso* en cacao. Agotrópica, 14, 7-28.

Sreenivasan, T. N., y Dabydeen, S. (1989). Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by *Crinipellis pernicioso*. Plant Disease, 73(6), 478-481. <https://doi.org/10.1094/PD-73-0478>

Someya, N., Kataoka, N., Komagata, T., Hirayae, K., Hibi, T., y Akutsu, K. (2000). Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. Plant Disease, 84(3), 334-340.

Suarez-Capello, C. (1977). The growth of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in vivo and in vitro.

Teixeira, P. J. P. L., de Toledo Thomazella, D. P., Reis, O., Do Prado, P. F. V., Do Rio, M. C. S., Fiorin, G. L., y Mieczkowski, P. (2014). High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora pernicioso*. The Plant Cell, tpc-114.

Tovar, G. (1991). La escoba de bruja del cacao [*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer]: descripción de síntomas de la enfermedad. Agronomía colombiana, 8(1), 227-239.

Walters, D., y McRoberts, N. (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? Trends in Plant Science, 11(12), 581-586.

Wheeler, BEJ, y Suárez, C. (1993). El pathosistema. En Manejo de enfermedades en cacao (pp. 9-19). Springer, Dordrecht.

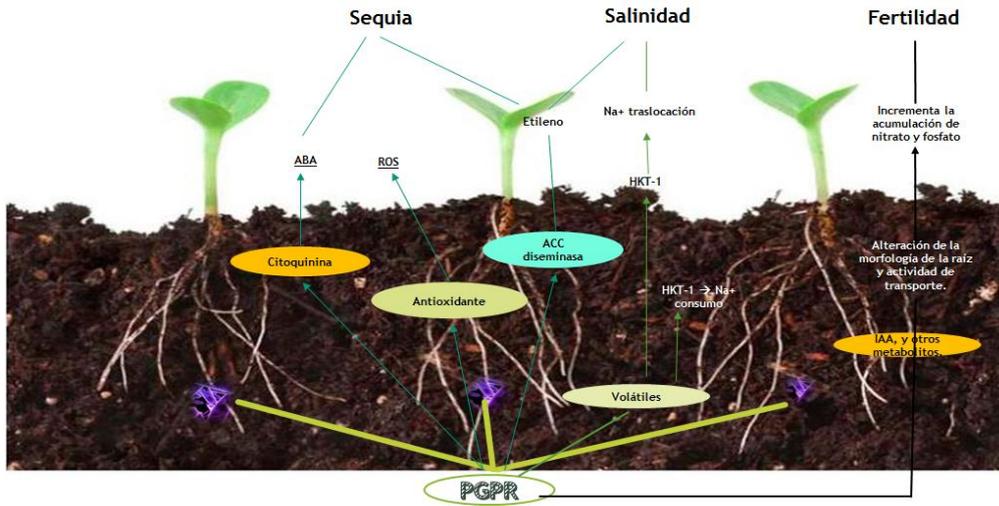
Ye, J., Kostrzynska, M., Dunfield, K., & Warriner, K. (2009). Evaluation of a biocontrol preparation consisting of *Enterobacter asburiae* JX1 and a lytic bacteriophage cocktail to suppress the growth of *Salmonella javiana* associated with tomatoes. Journal of food protection, 72(11), 2284-2292.

CAPÍTULO VII

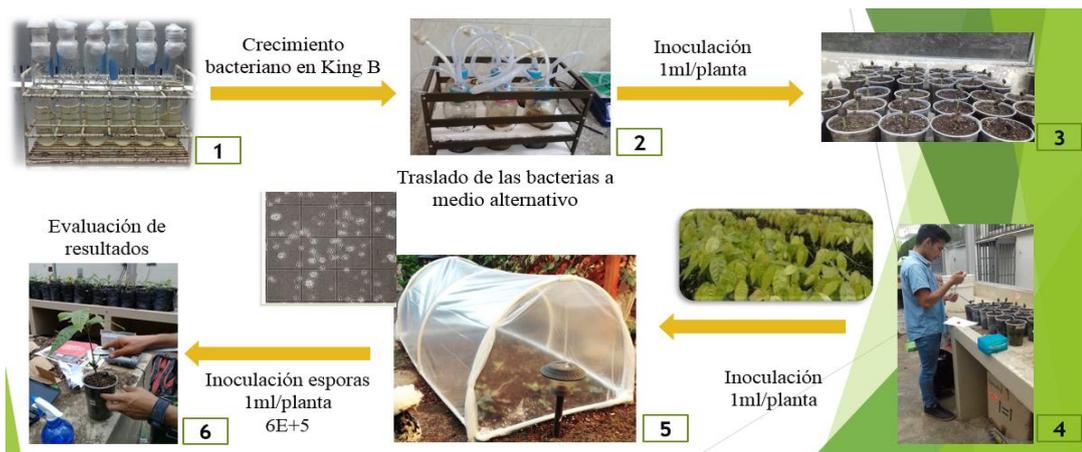
ANEXOS

ANEXOS

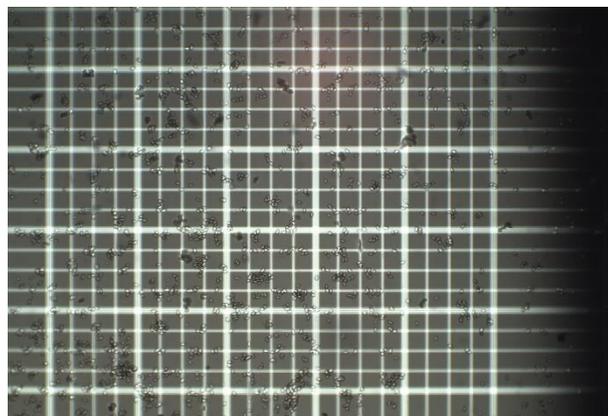
Anexo 1. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR's) y sus efectos



Anexo 2. Metodología de la aplicación de PGPR's vía edáfica contra la aplicación de esporas de *M. perniciosa*



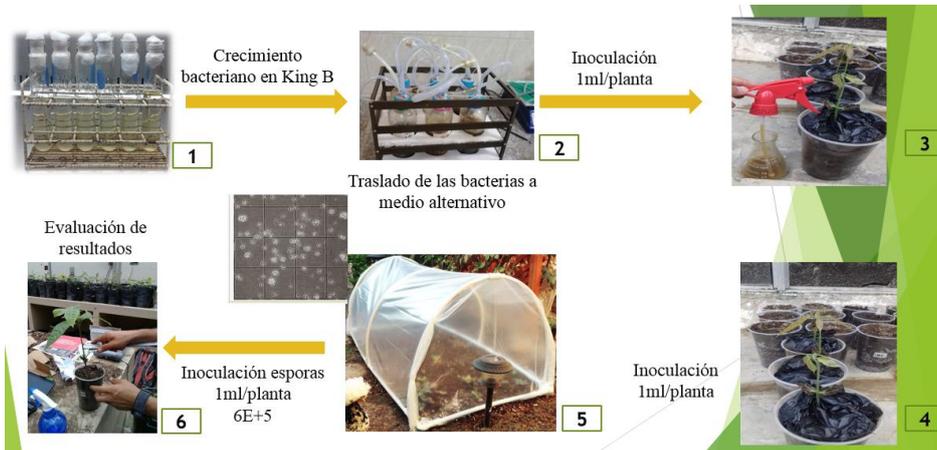
Anexo 3. Conteo de esporas en cámara Neubauer



Anexo 4. Crecimiento de PGPR's en medio de cultivo alternativo (Bomba, bandeja sujetadora, shock, mangueras plásticas, filtros)



Anexo 5. Metodología de la aplicación de PGPR's vía foliar contra la aplicación de esporas de *M. perniciosa*.



Anexo 6. Disolución de los buffer's (A-B-C) para aplicar las esporas en plantas



Anexo 7. Detalle de la preparación de inóculo de *M. pernicioso*:

Determinar el número de basidiosporas viables en la solución A; asumiendo que contenga 6'741.500 esporas/ml con 89% germinación, o 6'000.000 esporas viables/ml

- Determinar el volumen de la solución A necesario para la preparación; esto se consigue multiplicando el volumen del inóculo necesario a preparar por la concentración de esporas a utilizarse dividido por el número de esporas viables/ml en la solución A.

$$\frac{90 \text{ ml} \times 150.000 \text{ esporas/ml}}{6'000.000 \text{ esporas/ml}} = 2.25 \text{ ml de la solución A.}$$

- La solución B se determina por la siguiente operación: el número de ml de la solución A (suspensión de esporas) multiplicado por 5,33 (factor de conversión), menos el número de ml de la solución A.

$$(2.25 \text{ ml} \times 5.33) - 2.25 = 9.74 \text{ ml}$$

- El volumen de la solución c se establece mediante la siguiente fórmula: Volumen de inóculo necesario a preparar menos el volumen de la solución A. más el volumen del sol b.

$$90 \text{ ml} - (2.25 \text{ ml} + 9.74) = 78.04$$

- La cantidad de la solución b se coloca en una bureta y se alude gradualmente (35 a 45 gotas/minuto) a un Erlenmeyer que contiene la solución C, esta última se mantiene en agitación lenta con una barra agitadora y plato agitador magnético.
- Posteriormente, las soluciones B y C combinada se colocaron en una bureta y se dispensaron gradualmente sobre la solución A con basidiosporas contenida en un Erlenmeyer forrado con papel aluminio y mantenida en constante agitación.

Anexo 8. Efecto de *M. pernicioso* alargando el periodo de evaluación a los 60 días después de la inoculación con el patógeno



Financiamiento

El financiamiento para el desarrollo del proyecto de investigación “Actividad antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) a *M. pernicioso* en Cacao (*Theobroma cacao* L.)” fue con el Fondo Competitivo de Investigación Científica y tecnológica “FOCICYT”. Realizado en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.