



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

Proyecto de investigación Previo a la  
obtención del título de Ingeniero  
Agrónomo

**Título del Proyecto de Investigación:**

**POTENCIAL ANTAGONISTA DE RIZOBACTERIAS *Pseudomonas spp* NATIVAS,  
FRENTE A HONGOS PATOGENICOS DEL CULTIVO DE CACAO (*Theobroma  
cacao L.*)**

**Autor**

Edwin Oswaldo Alarcón Montecé

**Director de Proyecto de Investigación**

Ing. Msc. Pedro Alberto Rosero Tufiño

**Quevedo – Los Ríos – Ecuador**

**2016**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS**

Yo **EDWIN OSWALDO ALARCON MONTECE**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, el cual no ha sido presentado por ninguna institución dedicada a la investigación, mi grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

Por medio de la presente declaro y cedo los derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, por su reglamento y normativa vigente.

---

Edwin Oswaldo Alarcón Montecé

**AUTOR**

## **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

El suscrito, Ing. Msc. **PEDRO ALBERTO ROSERO TUFÍÑO**, docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el egresado. Edwin Oswaldo Alarcón Montecé realizó el Proyecto de Investigación titulado: **POTENCIAL ANTAGONISTA DE RIZOBACTERIAS *Pseudomonas spp* NATIVAS, FRENTE A HONGOS PATOGÉNICOS DEL CULTIVO DE CACAO, (*Theobroma cacao L.*)**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Msc. **PEDRO ALBERTO ROSERO TUFÍÑO**  
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

## CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y PLAGIO ACADEMICO

Yo Ing. PEDRO ALBERTO ROSERO TUFÍÑO Msc., en calidad de tutor de trabajo de investigación titulada `` **POTENCIAL ANTAGONISTA DE RIZOBACTERIAS *Pseudomonas spp* NATIVAS, FRENTE A HONGOS PATOGENICOS DEL CULTIVO DE CACAO, (*Theobroma cacao L.*)**, Perteneciente al Estudiante Edwin Oswaldo spp Alarcón Montece de la Carrera de Ingeniería Agronómica, cumpro con informar a usted el desarrollo y culminación del Proyecto de Investigación, así como el reporte del Sistema Nacional Urkund. El mismo que refleja un 6%.

<b>Document</b>	<a href="#">ALARCON OSW. Tesis.docx</a> (D23136248)
<b>Submitted</b>	2016-11-08 11:12 (-05:00)
<b>Submitted by</b>	prosero@uteq.edu.ec
<b>Receiver</b>	prosero.uteq@analysis.arkund.com
<b>Message</b>	Revision Plagio Tesis <a href="#">Show full message</a>
	6% of this approx. 24 pages long document consists of text present in 1 sources.



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

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TÍTULO:**

**POTENCIAL ANTAGONISTA DE RIZOBACTERIAS *Pseudomonas spp* NATIVAS,  
FRENTE A HONGOS PATOGENICOS DEL CULTIVO DE CACAO  
(*Theobroma cacao L.*)**

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

**Aprobado por:**

---

**Ing. Ramiro Gaibor, M.Sc.**  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

**Dr. Fernando Abasolo**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

**Ing. Ludvick Amores**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR**  
**AÑO 2016**

## AGRADECIMIENTO

A mis padres, a mis hermanos que sin el apoyo de ellos no podría haber logrado esta gran meta como lo es la culminación de mis estudios y la obtención de mi título.

Quiero agradecer a mi amada familia Alarcón Montecé por su amor y confianza, por haberme acompañado en cada paso que di para lograr mi objetivo.

A mis adorados padres, Abg. Luis Fernando Alarcón Calderón y la Abg. Nery Esperanza Montecé Rizzo, que son los pilares fundamentales en mi vida y que han estado conmigo para celebrar este gran triunfo, ellos me han enseñado que las metas si se pueden cumplir.

Al igual a mi gran maestro que sin su enseñanza y guía me han permitido salir adelante.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Al **Director**, por la dirección en mi Proyecto de Investigación.

Mi eterno agradecimiento a todas las personas que día a día aportaron un granito de arena y que de una u otra manera a lo largo de mi vida, contribuyeron para que mis sueños se hagan realidad.

## DEDICATORIA

Dedico este Proyecto a mi Dios que permitió que culmine mi carrera, y basado en su palabra Salmo 23, Jehová es mi pastor nada me faltara, con amor, humildad dedico este trabajo de investigación al dador de sabiduría Jesús mi salvador por ser mi principal guía y sustento.

Al igual un enorme y afectuoso agradecimiento al **Director** que guío con sus conocimientos la presente tesis, a las personas que con sus palabras de aliento estuvieron presentes.

## RESUMEN

La *Mazorca negra* y *Phytophthora spp* de *Theobroma cacao L*, son causadas por los diferentes hongos como; *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora spp*, estos son uno de los principales problemas fitosanitarios en las áreas donde este rubro se cultiva.

Con el fin de identificar la flora fúngica a través de la morfología de hongos patogénicos en el cacao fueron recolectadas muestras en dos fincas cacaoteras con más de 40 años de producción, ubicadas en los Sectores; Quevedo y Buena Fe perteneciente a la Provincia de Los Ríos, se realizaron aislamientos bacterianos provenientes de raíces de cacao en donde se evaluaron e identificaron las bacterias que contenían fluorescencia característica de las bacterias *Pseudomonas spp* en el cual fueron medidas mediante criterios tales como; (diámetro, borde, entre otros), fisiológicos (se determinó a mediada temperatura).

Las bacterias fueron cultivadas en medios de cultivo King b en estado líquido durante un periodo de 72 horas, para luego ser inoculadas en cajas que contenían medios de cultivos PDA en estado sólido en las cuales se encontraban sembrados los hongos *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora spp*,

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de biotecnología de la Universidad técnica estatal de Quevedo. Se utilizó medios de cultivos King b y PDA (Papa destroza agar) en estado líquido y sólido para evaluar el crecimiento y confrontaciones de bacteria y hongos.

Algunos de los aislamientos evaluados presentaron capacidad antagonista características de las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, coincidieron con las bacterias que obtuvieron el mayor potencial antagónico hacia el hongo.

## ABSTRACT

*Phytophthora* spp and black pod of *Theobroma cacao L* are caused by different fungi like; *Moniliophthora roreri* and *Phytophthora* spp, these are one of the major phytosanitary problems in areas where this area is cultivated.

Considering the samples they were collected from two farms cocoa production more than 40 years of production, located in the Sectors; Quevedo and Buena Fe belonging to the province of Los Rios, bacterial isolates from cacao estate where bacteria containing characteristic fluorescence of the bacteria *Pseudomonas* spp in which were measured by criteria such as assessed and identified were performed; (Diameter, edge, etc.), physiological (is determined mediated temperature) in order to start the characterization of populations of the fungus in the country and have a bank of isolates for further research at different levels.

Experiments were performed in the laboratory of biotechnology State Technical University of Quevedo. King B culture media and PDA was used (Papa takes agar) in liquid and solid state to assess growth and confrontations of bacteria and fungi.

Bacteria were grown in culture media King b in liquid state for a period of 72 hours, and then be inoculated into boxes containing culture media PDA solid state in which fungi *Moniliasis roreri* and *Phytophthora* spp were sown,

Some of the isolates tested showed antagonistic capacity characteristics of the bacteria *Pseudomonas fluorescens*, coincided with the bacteria that showed the greatest potential antagonistic to the fungus.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
Portada.....	i
Declaración de Autoría y Cesión de Derechos.....	ii
Certificación de Culminación del Proyecto de Investigación .....	iii
Certificado del Reporte de la Herramienta de Prevención de Coincidencia .....	iv
Certificación de Miembros de Tribunal .....	v
Agradecimiento .....	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen .....	viii
Abstract.....	ix
Tabla de Contenido.....	x
Índice de Tablas.....	xii
Índice de Figuras .....	xiv
Índice de Anexos .....	xiv
Introducción.....	1
<b>CAPÍTULO I CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.1 Problematización .....	3
1.1.1 Planteamiento del problema .....	3
1.1.2 Formulación del problema.....	3
1.1.3 Sistematización del problema .....	3
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 General.....	4
1.2.2 Específicos.....	4
1.3 Justificación .....	5
<b>CAPÍTULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>6</b>
2.1. Marco conceptual.....	7
2.1.1 Clasificación taxonómica de t. Cacao.....	7
2.1.2 Caracteres botánicos. ....	8
2.1.3 Condiciones edafoclimáticas del cultivo de cacao .....	11

2.2.	Enfermedades de la mazorca de cacao .....	13
2.2.1	Principales zonas productoras de cacao.....	16
2.2.2	Organismo antagónico a las enfermedades del cacao.....	17
2.3	Rizobacterias con actividad antagonista a fito patógenos. ....	18
<b>CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>		<b>21</b>
3.1	Localización .....	22
3.1.1	Aislamiento de microorganismos patogénicos de mazorcas de cacao .....	22
3.1.2	Procesamiento de muestras mazorcas enfermas .....	22
3.1.3	Identificación de microorganismos.....	23
3.2	Aislamiento de <i>pseudomonas spp</i> desde muestras de suelos de plantaciones de cacao. ....	23
3.2.1	Selección de colonias fluorescentes.....	24
3.2.2	Evaluación del potencial antagónico de las cepas <i>p. Fluorescens</i> .....	24
3.2.3	Actividad antagonista <i>in vitro</i> de metabolitos extracelulares de <i>p. Fluorescens</i> , hacia los hongos patogénicos .....	25
<b>CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>26</b>
4.1.1	Microorganismos patogénicos de mazorca de cacao.....	27
4.1.2	Bacterias de <i>pseudomonas</i> de raíces de un cultivo de <i>t. Cacao</i> .....	27
4.1.3	Evaluación de la confrontación de <i>pseudomonas spp</i> con el hongo <i>moniliasis roreri</i> y <i>phytophthora spp.</i> ....	29
4.1.4	Evaluación del antagonismo de la <i>pseudomonas spp</i> contra el hongo <i>monilia roreri</i> y <i>phytophthora spp.</i> ....	35
4.2	Discusión .....	41
<b>CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>		<b>42</b>
5.1	Conclusiones.....	43
5.2	Recomendaciones .....	44
<b>CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>45</b>
	Bibliografía.....	46
<b>CAPÍTULO VII ANEXOS .....</b>		<b>49</b>

## ÍNDICE DE TABLA

	Pág.
Tabla 1 Aislados bacterianos fluorescens spp de los sectores de la Lola, Buena fe.....	28
Tabla 2 Resultados de Confrontaciones de las bacterias Pseudomonas spp vs el hongo de la Moniliophthora al 3er día del plaqueado. ....	29
Tabla 3 Resultados de Confrontaciones de las bacterias Pseudomonas spp vs el hongo de la Moniliophthora roreri al 4to día del plaqueado.....	30
Tabla 4 Resultados de Confrontaciones de las bacterias Pseudomonas spp vs el hongo de la Moniliasis perteneciente al 5to día del plaqueado. ....	31
Tabla 5 Resultados de los análisis estadísticos de las bacterias Pseudomonas spp vs el hongo de la Phytophthora. Perteneciente al 3er día del plaqueado.....	32
Tabla 6 Resultados de los análisis estadísticos de las bacterias Pseudomonas spp vs el hongo de la Phytophthora. Perteneciente al 4to día de plaqueado.....	33
Tabla 7 Resultados de los análisis estadísticos de las bacterias Pseudomonas spp vs el hongo de la Phytophthora. Perteneciente al 5to día de plaqueado.....	34
Tabla 8 Resultados obtenidos de las bacterias que tuvieron una actividad antagonista hacia el hongo de la Monilia perteneciente al 3er día del plaqueado.....	35

Tabla 9	Resultados obtenidos por la actividad antagonista de las bacterias <i>Pseudomonas</i> spp sobre el hongo de la <i>Monilia</i> perteneciente al 4to día del plaqueado. ....	36
Tabla 10	Resultados obtenidos por la actividad antagonista de las bacterias <i>Pseudomonas</i> spp sobre el hongo de la <i>Monilia</i> perteneciente al 5to día del plaqueado. ....	37
Tabla 11	Resultados obtenidos por la actividad antagonista de las bacterias <i>Pseudomonas</i> sobre el hongo de la <i>Phytophthora</i> perteneciente al 3er día del plaqueado. ....	38
Tabla 12	Este cuadro se logra ver los resultados obtenidos por la actividad antagonista de las bacterias <i>Pseudomonas</i> sobre el hongo de la <i>Phytophthora</i> perteneciente al 4to día de plaqueado. ....	39
Tabla 13	Resultados de actividad antagónica de las bacterias <i>Pseudomonas</i> spp sobre <i>Phytophthora</i> perteneciente al 5to día del plaqueado.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Raíz del cacao .....	8
Figura 2 Hoja del cacao .....	10
Figura 3 Fruto de cacao .....	11
Figura 4 Escoba de bruja .....	13
Figura 5 Enfermedades de la moniliasis.....	14

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1 Obtención de raíces de cacao.....	50
Anexo 2 Crecimiento de las bacterias .....	50
Anexo 3 Bacterias plaqueadas.....	51
Anexo 4 Hongos sembrados en tubos de ensayos .....	52
Anexo 5 Conservación de organismos en placas o platos Petri .....	52
Anexo 6 Confrontación de hongos vs bacterias .....	53

## CÓDIGO DUBLÍN

Título:	Potencial Antagonista de Rizobacterias <i>Pseudomonas Spp</i> Nativas, Frente a Hongos Patogénicos del Cultivo de Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.)		
Autor:	Edwin Oswaldo Alarcón Montecé		
Palabras clave:	Antagonista	Patogénicos	Cacao
Fecha de publicación:			
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2016.		
Resumen: (hasta 266 palabras)	<p>La Investigación se planteó en base a los principales problemas ocasionados por los hongos patogénicos en el cultivo de cacao, ccon el fin de identificar la fluora fúngica a través de la morfología de hongos patogénicos en el cacao fueron recolectadas muestras en dos fincas cacaoteras con más de 40 años de producción, ubicadas en los Sectores; Quevedo y Buena Fe perteneciente a la Provincia de Los Ríos, se realizaron aislamientos bacterianos provenientes de raíces de cacao en donde se evaluaron e identificaron las bacterias que contenían fluorescencia característica de las bacterias <i>Pseudomonas spp</i> en el cual fueron medidas mediante criterios tales como; (diámetro, borde, entre otros), fisiológicos (se determinó a mediada temperatura).</p> <p>The research was based on the main problems posed by pathogenic fungi in cocoa cultivation, in order to identify the fungal fluora through the morphology of pathogenic fungi in cocoa samples were collected on two farms with more than 40 years of production, located in the Sectors; Quevedo and Buena Fe, belonging to the Province of Los Ríos, bacterial isolates were made from cocoa roots, where the bacteria containing fluorescence characteristic of the bacteria <i>Pseudomonas spp</i> were evaluated and identified in which they were measured by criteria such as; (Diameter, border, among others), physiological (was measured at medium temperature).</p>		
Descripción	hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
URI:			

## INTRODUCCIÓN

El presente trabajo es el resultado de una investigación sobre el "Potencial antagonista de rizobacterias *Pseudomonas* spp nativas, frente a hongos patogénicos del cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.)"; que se realizó para investigar y tratar de resolver el grave problema que enfrentan los agricultores cacaoteros de la zona central del litoral ecuatoriano.

Para alcanzar cada uno de estos objetivos se establecieron variables de estudio que nos permitió generar información que se expone en el documento.

Luego de delimitar el problema y plantear el objetivo se formuló la hipótesis de la investigación de la siguiente manera: Existen aislamientos locales de *Pseudomonas fluorescens* que disminuyen el poder patogénico de los hongos, *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* Spp., que atacan al cacao, mediante un mecanismo antagonista. La misma que fue ratificada parcialmente con los resultados de la investigación.

Los tratamientos que se investigaron fueron para: Evaluar el potencial antagonistas de las cepas *P. fluorescens* y la actividad antagonista *in vitro* de metabolitos extra celulares de *P. fluorescens* hacia los hongos patogénicos.

La investigación fue una experiencia muy enriquecedora por cuanto se cumplieron las expectativas de estudiar bacterias de diversas zonas, recolectadas y manejadas en condiciones de laboratorio. Estos ecosistemas fueron todos de la provincia de Los Ríos ubicados en las jurisdicciones de: San Carlos y Buena Fe. Los resultados fueron evidentes puesto que las cepas si presentaron antagonismo contra los hongos del cacao.

**CAPÍTULO I**  
**MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.2 Problematización**

### **1.2.1 Planteamiento del problema**

El empleo de productos agro-químicos para el control de hongos en el cultivo de cacao ha originado un creciente deterioro del ecosistema, teniendo como consecuencia que los frutos producidos bajo estas condiciones estén expuestos a contaminantes y disminuya la rentabilidad, ocasionando pérdidas en la producción.

Frente a este problema, existe la necesidad de buscar nuevos métodos de manejo fitosanitario, que permitan utilizar productos a base de microorganismos patogénicos para el control de enfermedades fungosas y de esta manera disminuir la utilización de productos químicos en el control de Fito patógenos en el cultivo de cacao.

### **1.2.2 Formulación del Problema**

El problema se lo define como el empleo de productos agro-químicos para el control de hongos en la agricultura ha originado un creciente deterioro del ecosistema, teniendo como consecuencia que los productos obtenidos bajo este procedimiento son contaminados, disminuyen la rentabilidad y ocasiona cuantiosas pérdidas en la producción de cacao.

### **1.2.3 Sistematización del problema**

1. Aislar e Identificar la microflora fúngica a través de la morfología de hongos patogénicos de *T. cacao*.
2. Estudiar e identificar rizobacterias de raíces de plantaciones comerciales de *T. cacao*.
3. Determinar la actividad anti-fúngica producida por el sobre-nadante del cultivo celular de rizobacterias nativas, sobre los hongos patogénicos *in vitro*.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 General**

Evaluar la capacidad antagonista de rizobacterias *Pseudomonas* spp. Nativas a los hongos patogénicos del cultivo de *Theobroma cacao* L.

### **1.2.2 Específicos**

- Aislar e Identificar la flora fúngica a través de la morfología de hongos patogénicos de *T. cacao*.
- Estudiar e identificar rizo bacterias de raíces de plantaciones comerciales de *T. cacao*.
- Determinar la actividad anti-fúngica producido por el sobre-nadante del cultivo celular de rizo bacterias nativas, sobre los hongos patogénicos *in vitro*.

### **1.3 Justificación**

El control biológico es una forma muy atractiva de reducir la utilización de productos químicos para el control de patógenos. Existen suelos agrícolas con una amplia gama de bacterias benéficas que mejoran el rendimiento de los cultivos.

Dentro de este grupo se destacan rizo bacterias no patogénicas del género *Pseudomonas*. Se ha descrito el rol de *Pseudomonas fluorescens* como agente controlador de hongos, insectos y nematodos, donde ellas están ejerciendo el control por un efecto antagonista a través de la síntesis de compuestos con actividad anti fúngica (Canchignia, 2014)

**CAPÍTULO II**  
**FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## 2.1 Marco Conceptual

### 2.1.1 Clasificación Taxonómica de *T. cacao*

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Tracheobionta

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Malvales

**Familia:** Esterculáceas (Malvaceae)

**Género:** *Theobroma*

**Especie:** *T. cacao*

La palabra *Theobroma* deriva del griego (Theo = Dios y bromo = alimento) que Significa alimento de los dioses. Cuando llegaron los primeros colonizadores a América, el cacao era cultivado por los indígenas, inicialmente por los aztecas y mayas en Centroamérica. Según los historiadores, este árbol, denominado por los indígenas `cacahualt`, se consideraba sagrado. En México, los aztecas creían que el cacao era de origen divino, donde el profeta Quatzalcault fue quien enseñó a la gente a cultivarlo tanto como alimento como para embellecer los jardines de la ciudad de Talzitapec (Erazo, 2014).

El área de distribución natural se extiende desde la cuenca del Amazonas por el sur hasta la región meridional de México (18°N a 15°S) (46). Su centro de diversidad se encuentra en la región amazónica en lo que hoy es Brasil, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia (27<sup>0</sup>, 59, 60). Las especies del género *Theobroma* son árboles ramificados con hojas simples y con un fruto indehisciente carnosos (mazorca). El cacao ardilla (*Herrania purpurea*) forma pequeños árboles no ramificados con hojas palmaticompuestas, frutos idénticos al de *Theobroma cacao* pero en miniatura de apenas 10 ó 15 centímetros de largo, los cuales también nacen en los troncos y ramas, con muchas semillas cubiertas de un arilo o pulpa blanca, esponjosa y de un exquisito sabor dulce-acídulo que se puede comer así al natural. Todo el cacao que se cultiva para el mercado mundial se obtiene de la especie *Theobroma cacao* L. Las otras especies del género *Theobroma* son cultivadas y utilizadas sólo localmente (Nicolas Dostert, 2012).

### 2.1.2 Caracteres Botánicos

**La Raíz.-** donde inicia el crecimiento del tronco y se forma o desarrolla el sistema radicular, existe una zona de transición bien definida conocida como cuello de la raíz. En plantas reproducidas por semillas, el sistema radicular está compuesto por una raíz principal denominada raíz pivotante o raíz primaria, la cual crece hacia abajo de forma recta (Batista, 2009).



**Figura 1.** Raíz del cacao

**Fuente:** (Batista, 2009).

A partir de la raíz pivotante, inmediatamente debajo del cuello, se desarrollan la mayoría de las raíces secundarias a unos 15 a 20 cm de profundidad en la porción superior de la capa de humus. Éstas se extienden en forma horizontal a 5 y 6 metros del tronco del árbol, con raíces laterales que se dividen repetidamente. Las raíces secundarias que se encuentran en la parte inferior de la raíz pivotante, tienen un crecimiento hacia abajo en dirección a la roca madre o hacia la capa freática.

Las plantas que son reproducidas por medios vegetativos o sexuales no desarrollan raíz pivotante, pero sí raíces primarias y secundarias, de crecimiento horizontal, según se describe en el párrafo anterior.

La forma y desarrollo de las raíces del cacao dependen principalmente de la textura, estructura y consistencia del suelo así como del modo de reproducción. En suelos profundos bien aireados su crecimiento puede alcanzar hasta 2 metros de profundidad; en

suelos pedregosos su crecimiento es tortuoso. Cuando el suelo es de una estructura granular uniforme y de textura arcillosa, la raíz crece erecta o derecha (Batista, 2009).

**Tallo y ramas.** Las ramas del árbol de cacao, al igual que las de otras especies del género *Theobroma*, son di mórficas:

- Unas son de crecimiento vertical hacia arriba, denominadas ramas de crecimiento ortotrópico, y constituyen el tallo y/o los chupones.
- Otras son de crecimiento oblícuo hacia fuera, denominadas ramas de crecimiento plagiotrópico.

Las plantas de cacao, reproducidas por semillas, desarrollan un tallo principal de crecimiento vertical que puede alcanzar 1 a 2 metros de altura a la edad de 12 a 18 meses. A partir de ese momento la yema apical detiene su crecimiento y del mismo nivel emergen de 3 a 5 ramas laterales. A este conjunto de ramas se le llama comúnmente verticilo u horqueta.

**La hoja.** Durante su formación, crecimiento y estado adulto, las hojas exhiben pigmentaciones diferentes, cuya coloración varía desde muy pigmentadas hasta poca pigmentación. Generalmente, los tipos de cacao Criollo y Trinitario tienen pigmentación más coloreadas que los del tipo Forastero, los que son de muy poca pigmentación.

En todos casos las hojas adultas son completamente verdes, de lámina simple, entera, de forma que va desde lanceolada a casi ovalada, margen entero, nervadura pinada, y ambas superficies glabras. El nervio central es prominente y el ápice de la hoja es agudo. Las hojas están unidas al tronco o a las ramas por medio a los pecíolos, siendo los del tronco más largos que los de las ramas.

Las hojas tienen, tanto en la base como en la parte superior, una estructura abultada constituida por un tejido parenquimatoso, cargado de gránulos de almidón, denominada pulvino que, a consecuencia de estímulos de los rayos de luz solar, orientan las hojas mediante movimientos de rotación, buscando posición en relación con sus necesidades de luz.



**Figura 2:** hoja del cacao

**Fuente:** (FUNDESYRAM, 2008).

**La flor.** Es hermafrodita de ovario súpero, cuya fórmula floral es:  $S_5, P_5, E_{5+5}, + G (5)$ . Esto indica que la flor del cacao está constituida en su estructura floral por 5 sépalos, 5 pétalos; el androceo conformado por 10 filamentos de los cuales 5 son fértiles (estambres) y otros 5 son infértiles (estaminodios); el gineceo (pistilo) está formado por un ovario súpero con 5 lóculos fusionado desde la base donde cada uno puede contener de 5 a 15 óvulos, dependiendo del genotipo.

La polinización del cacao es estrictamente entomófila, para lo cual la flor inicia su proceso de apertura con el agrietamiento del botón floral en horas de la tarde. El día siguiente, en horas de la mañana, la flor está completamente abierta. Las anteras cargadas de polen abren y están viables (disponibles; funcionales) casi inmediatamente por un período aproximado de 48 horas. Esta es la única etapa disponible para la polinización.

**El fruto del cacao.** Es como en otras especies el resultado de la maduración del ovario una vez fecundado, este fruto está sostenido por un pedúnculo leñoso que es el resultado de la maduración de los pedicelos de la flor. Cada fruto puede tener un número muy variable de semillas pues esto está en dependencia de la fecundación de cada ovario, aunque cada árbol sólo puede tener un máximo debido al número de óvulos que es constante en cada uno. El mínimo de semillas puede ser de una, pero en general se estima que una mazorca normal crece cuando se han fecundado por lo menos el 25% de los óvulos. La cáscara del fruto del cacao está formada por tres partes: el exocarpio o la sección exterior, la capa de

en medio o mesocarpio y la capa interior o endocarpio. El mesocarpio es una capa de células semi-leñosas bastante duras esto es variable y en dependencia del genotipo, usualmente los tipos criollos son muy suaves y los forasteros son muy duros, existiendo muy poca variabilidad entre las mazorcas de un mismo árbol (FUNDESYRAM, 2008).



**Figura 3.** Fruto de cacao  
**Fuente:** (Gutiérrez., 2012).

### **2.1.3 Condiciones Edafoclimáticas del cultivo de cacao**

El desarrollo de la planta de cacao y su rendimiento está íntimamente relacionado con las condiciones medio ambientales del lugar donde se va a cultivar. Debido a eso, los factores climáticos influyen en la producción de la plantación, por tal motivo las condiciones térmicas, de humedad y luminosidad deben ser las óptimas para el cultivo. La época de floración, brotación y cosecha están regulados por el clima. Debido a estos factores es importante Implementar calendarios agroclimáticos para un óptimo desarrollo del cultivo.

**Precipitación.** La planta de cacao es muy sensible a la escasez de agua así como al encharcamiento, un adecuado suministro y manejo del agua es esencial para que la planta efectuara sus procesos metabólicos. En general la lluvia es el factor climático más variable durante el año y es diferente de una región a otra siendo este un factor que determina diferencias en el manejo del cultivo.

La precipitación óptima para el cultivo del cacao es de 1600 a 2500 mm de lluvia en las zonas más cálidas y 1200 a 1500 mm de lluvia en las zonas más frescas y valles altos. En

lugares donde los períodos de sequía son extensos se recomienda realizar riego para así mantener la producción.

**Temperatura.** El cacao no soporta temperaturas bajas, siendo su límite medio anual de temperatura los 21 °C ya que es difícil cultivar cacao satisfactoriamente con una temperatura más baja. Las temperaturas extremas muy altas pueden provocar alteraciones fisiológicas en el árbol por lo que es un cultivo que debe estar bajo sombra para que los rayos solares no incidan directamente y se incremente la temperatura.

La temperatura determina la formación de flores. Cuando ésta es menor de 21 °C la floración es menor que a 25 °C, donde la floración es normal y abundante. Esto provoca que en determinadas zonas la producción de mazorcas sea estacional y durante algunas semanas no haya cosecha, cuando las temperaturas sean inferiores a 22 °C (PRODUCTOS AGRI-NOVA Science, 2011)

**Viento.** Vientos continuos pueden provocar un desecamiento, muerte y caída de las hojas. Por ello en las zonas costeras es preciso el empleo de cortavientos para que el cacao no sufra daños. Los cortavientos suelen estar formados por distintas especies arbóreas (frutales o madereras) que se disponen alrededor de los árboles de cacao (PRODUCTOS AGRI-NOVA Science, 2011).

**Altitud.** El cacao se cultiva desde el nivel del mar hasta los 800 msnm, sin embargo, plantaciones cerca de la línea del ecuador se desarrolla de manera normal en altitudes mayores a los 1000 msnm hasta los 1400 msnm; siendo por estas razones la altitud un factor no determinante para un desarrollo Óptimo del cultivo (Gutiérrez., 2012).

**Luminosidad.** La intensidad de la luz es otro factor determinante en el cultivo del cacao, especialmente porque influye en la fotosíntesis. En etapas de establecimiento del cultivo se recomienda la siembra de otras plantas para proporcionar sombra ya que las plantas de cacao en estas etapas son muy susceptibles a la acción directa de los rayos solares (Gutiérrez., 2012).

## 2.2 Enfermedades de la mazorca de cacao

Las enfermedades más importantes que afectan al cultivo de cacao son: la *Moniliasis* cuyo agente patógeno es la (*moniliophthora roreri*), *mazorca negra* cuyo agente patógena es (*Phytophthora spp*), y la *Escoba bruja* cuyo agente causante es *Moniliophthora perniciosa*, cuyos efectos causan pérdidas de la producción superiores al 60% (Pico, 2012).

**Escoba De Bruja.** Enfermedad que ataca el cultivo de cacao. Es causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa* ataca a diferentes partes del árbol como: brotes jóvenes, cojinetes florales, mazorcas y granos. Los síntomas más característicos aparecen en los brotes tiernos presentando crecimiento anormal y agrandamiento en el tejido que inicialmente es de color verde y a medida que avanza la enfermedad se seca. Dando la apariencia de una escoba (Pico, 2012).

Cuando los cojines florales son atacados por esta enfermedad, no nacen mazorcas sino brotes vegetativos a manera de ramas, con apariencia de escoba. Los frutos afectados por la enfermedad presentan diferentes síntomas; esto depende del estado de desarrollo cuando son atacados, pueden tomar forma de chirimoyas, fresas o zanahorias.

Las escobas producen estructuras reproductivas, con forma de pequeños paraguas, que producen millones de esporas. Estas son dispersadas por el viento y la lluvia. En la época seca el patógeno sobrevive en las escobas y frutos momificados que permanecen adheridos al árbol y se reactiva cuando llegan las lluvias, emitiendo los paraguas denominados basidocarpos (ICA, 2012).



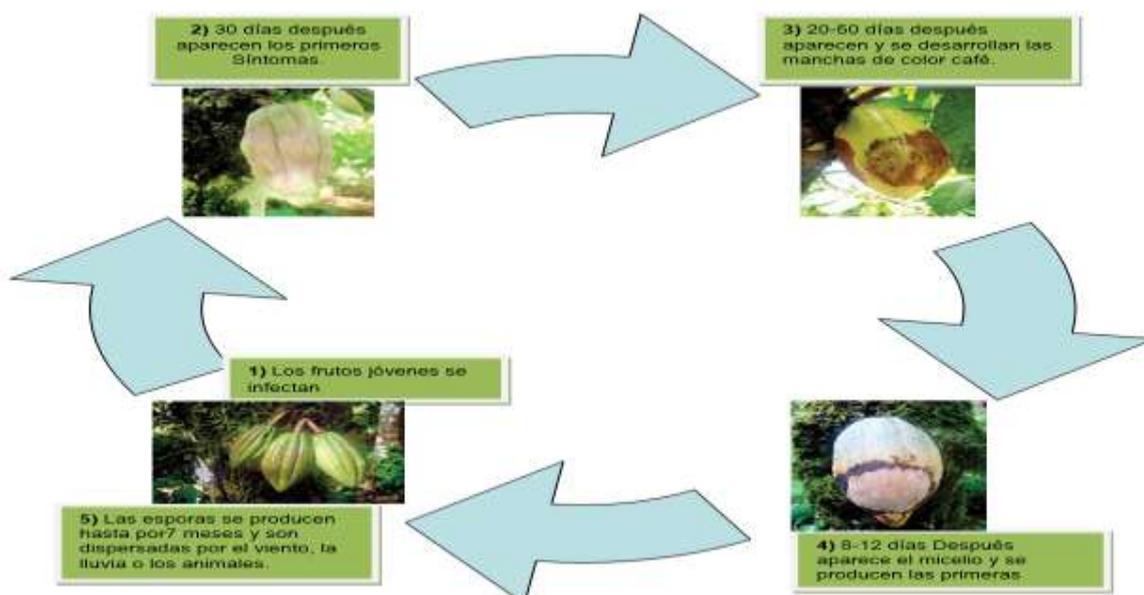
**Figura4. Escoba de bruja**

**Fuente:** (ICA, 2012)

**La moniliasis del cacao.** Es una enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri* es considerada la principal enfermedad del cultivo en el Ecuador por las pérdidas que ocasiona. Su ataque es con frecuencia tan severo que constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción del cacao, en lugares donde se lo siembra, especialmente en el litoral ecuatoriano (AYALA, 2014).

Este hongo produce millones de esporas o semillas, que se multiplican rápidamente cuando el cacao está mal manejado. Los daños ocasionados por la moniliasis varían con el manejo del cultivo, las condiciones ambientales y la semilla de cacao utilizada. Por esto; es importante tener en cuenta que su impacto es muy variable dentro de los mismos clones o híbridos. En plantaciones ubicadas en zonas húmedas y sin un manejo adecuado del cultivo, es frecuente observar pérdidas superiores al 80%. Sin embargo, bajo condiciones de manejo óptimas, los daños se disminuyen considerablemente a niveles inferiores al 8% (ICA, 2012).

Conociendo el ciclo de vida de los organismos que causan estas enfermedades comprenderemos mejor cuándo y cómo controlarlas. La duración del ciclo de vida depende de la variedad del cacao y de las condiciones ambientales. El ciclo es más corto en climas calientes y húmedos que en climas frescos (Wilberth Phillips-Mora, 2014).



**Figura 5.** Ciclo biológico de la moniliasis  
**Fuente:** (Wilberth Phillips-Mora, 2014).

**Phytophthora.**- Esta enfermedad ataca varias partes de la planta, pero los daños más importantes se dan en los frutos, particularmente en los cercanos a la madurez. Produce una mancha café de borde regular y de crecimiento rápido que llega a cubrir al fruto en pocos días. Internamente, causa una pudrición café.

La vía de infección del hongo es por medio de esporas que tienen la capacidad de nadar, las cuales se activan cuando hay mucha humedad y se da un periodo de baja temperatura seguido por otro caliente. Las esporas son transportadas por el salpique de lluvia, las corrientes de agua, el viento, las hormigas, etc. El contacto directo entre los frutos sanos y enfermos también es una fuente importante de contagio (Phillips-Mora, 2009).



**Figura 6. Ciclo de vida de la Phytophthora**

Fuente: (Hernandez, 2011).

**Las bubas.** Se caracterizan por un abultamiento y crecimiento anormal de los cojines florales. Aunque se han identificado cinco tipos diferentes de bubas, solamente dos son importantes: la buba de puntos verdes, causada por el hongo *Calonectria (Fusarium) rigidiuscula*, y la buba floral, cuyo agente causal se desconoce (Hernandez, 2011).

### **2.2.1 Principales zonas productoras de cacao**

En tiempos de la independencia del Ecuador, ya existían familias adineradas dedicadas a la producción de cacao, denominadas “Grandes Cacaos” haciendas ubicadas en Vences y otros cantones de Los Ríos. Durante la década de 1890, Ecuador se convierte en el número uno en exportar cacao en el mundo, dinamizando la economía del país y gracias a ello se crearon los primeros bancos del país. Sin embargo, la década de 1920 fue negativa para este sector, aparecieron plagas como la Monilla y Escoba de la Bruja que causaron la reducción de la producción al 30%, agravando la crisis también ocasionada por la falta de medios de transporte y mercados internacionales como consecuencias de la Primera Guerra Mundial.

Hoy en día la mayor parte del cacao ecuatoriano es una mezcla del cacao Nacional, Trinitario y Forastero. La cantidad de cacao tipo Nacional puro es cada día menor y puede desaparecer poco a poco debido a que las plantaciones existentes son muy viejas y poco productivas. (Yerovi, 2013).

Los resultados se reflejan en la obtención de rendimientos mayores. En consecuencia, “el volumen de producción registró un crecimiento de 11%, cuatro puntos porcentuales por arriba de lo que creció el año anterior (7%)”. La encuesta se la realizó en las provincias de: Manabí, Guayas, Los Ríos, Esmeraldas, Santo Domingo de Los Tsáchilas, Azuay, El Oro y Cañar. Al efectuar el análisis desagregado por zonas productivas, por ejemplo, en el cantón Quinindé en Esmeraldas, los entrevistados señalaron que el cultivo de cacao presenta niveles favorables, debido a que las plantaciones mantienen buenas condiciones vegetativas.

Estos crecimientos se fundamentan básicamente en que se está sembrando más cacao en reemplazo de la palma y, porque se ha recuperado la fertilidad de los terrenos con la asistencia del Magap, efectuando nuevas podas. Por tal razón, el volumen de producción alcanzado en el 2014 fue mayor, en el 25%. En la provincia de Manabí, las condiciones de las plantaciones fueron diferentes según el cantón investigado. En El Carmen, por ejemplo, los entrevistados indicaron que las condiciones vegetativas de las plantaciones son buenas por el mantenimiento que le proporcionan los productores mediante la realización de

podas, en consecuencia, los rendimientos fueron mayores y el volumen de producción habría crecido un promedio de 28%.

Las previsiones para el 2015, son halagadoras en la mayoría de cantones de la provincia de Los Ríos; a excepción de los cantones (Urdaneta, Pueblo Viejo y Quinsaloma), pues los entrevistados consideran que el volumen de producción podría crecer entre el 5% y 25%. Por el contrario, en la provincia de Santo Domingo de Los Tsáchilas la producción de cacao no ha experimentado cambios significativos durante el semestre en estudio del 2013 (Yerovi,2013).

En lo que se refiere a la situación económica de los productores de cacao, el 63% de los consultados consideró que su economía fue normal y el restante 37% indicó que son buenas. De acuerdo a las expectativas, los agricultores aspiran que la producción de cacao mantenga sus niveles de crecimiento. Es así que prevén para el año 2015 un aumento de 16% en el volumen de producción

### **2.2.2 Organismo antagónico a las enfermedades del cacao**

Las bacterias endofíticas forman parte de la gran cantidad de bacterias benéficas presentes en la rizosfera, que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas y las protegen contra otros organismos que causan enfermedades (Hallmann *et al.*, 1997).

La aplicación de este tipo de rizo bacterias en diversos cultivos, ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento de las plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, producción de biomasa y desarrollo del sistema radical (kloepper. 1999).

Estas rizo bacterias, pertenecientes principalmente al grupo de *Pseudomonas* y *Bacillus*, son antagonistas de importantes patógenos de la raíz en muchos cultivos de importancia económica (Hallmann y Berg 2006).

Bajo condiciones de invernadero, su aplicación ha generado prometedores resultados en vegetales, frutas y plantas ornamentales. Por otra parte, poblaciones endofíticas, tanto de *Pseudomonas* como *Bacillus*, aisladas de tejidos internos de banano, han evidenciado un

gran potencial como agentes biológicos de control de *Radopholus similis* en condiciones de invernadero (Núñez. 2006).

### **2.3 Rizobacterias con actividad antagonista a Fito patógenos.**

#### **a) Rizobacterias**

Las PGPR (Plantas que promueven el crecimiento de Rizobacterias) son rizobacterias que pueden promover el crecimiento en base a tres características: 1) capacidad para colonizar la raíz, 2) sobrevivir y multiplicarse en micro hábitos asociados a la superficie radical en competencia con la microbiota, al menos con tiempo para expresar su actividad promotora del crecimiento, 3) poseer capacidad para promover dicho desarrollo (Jaizme . et al 2008).

Estos microorganismos del suelo son capaces de producir efectos benéficos en estadios tempranos de las especies vegetales, mejorando el desarrollo de la biomasa de las raíces y brotes de las plantas. Entre los géneros bacterianos que han sido descrito como PGPR se encuentra Pseudomonas tales como: Klebsiella, Enterobacter y Arthrobacter (Saharan. et al., 2011).

#### **b) Bacterias antagonistas hacia los hongos**

Dada la diversidad genética en el género Bacillus, tanto en el suelo como en la rizosfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces. Las potencialidades del género Bacillus sobre *P. fluorescens* han sido señaladas por Kin et al. (1997), quienes encontraron mayor emergencia y control de patógenos del trigo cuando utilizaron este género.

Estas bacterias se han evaluado para el control de enfermedades fungosas, determinándose que las aplicaciones de Bacillus subtilis pre y pos cosecha en aguacate tienen un efecto similar al de los fungicidas comerciales (Korsten et al. 1997).

### c) *Pseudomonas fluorescens*

Estas bacterias pertenecen al filo: Proteobacteria, clase: Gammaproteobacteria, Orden Pseudomonadales, Familia: Pseudomonadaceae y Genero: *Pseudomonas* (Palleroni. 2005). Sus especies pueden derivarse en dos grandes grupo como: las fluorescens y las no *fluorescens*, dentro de la primera clasificación se puede encontrar; *P. fluorescens*, *P. flavescens*, y *P. auroginosa* (Goldman. et al, 2008).

Las bacterias *Pseudomonas fluorescens spp* son aerobias y tienen forma de bastón y son flageladas. Los flagelos permiten el movimiento de las bacterias con facilidad en el suelo. Además son conocidas por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas.

El modo más conocido en que ayudan a estimular el crecimiento de la planta es produciendo antibióticos. Estos evitan que la planta se enferme por la presencia de otras bacterias u hongos patógenos. Cuando están presentes, las bacterias *Pseudomonas fluorescens* compiten con estos patógenos e impiden su crecimiento. También tienen la capacidad de acelerar la germinación y el crecimiento de las plantas a través de hormonas. Algunas de estas bacterias pueden eliminar sustancias contaminantes para el suelo y el agua. Cuando en el suelo hay poco hierro, liberan un compuesto amarillo fluorescente para capturarlo.

Gustavo Santoyo (2010), reporta que `la cepa de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 logró restringir el crecimiento de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Phytophthora cinnamomi*, en un 76, 72 y 70%, respectivamente. Los altos grados de inhibición fueron posibles cuando la cepa bacteriana se inoculó con 24 horas de anterioridad a los Fito patógenos.

Bedoya et al (2013), Reporto que el aislamiento de un conjunto de bacterias nativas de cultivos de aguacate de cuyas cepas mostraron actividad antagónica *in vitro* frente a *Phytophthora cinnamomi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, De los 205 aislamientos bacterianos obtenidos a partir de huertos del oriente del departamento de Antioquia, el 84% mostraron halos de inhibición al ser enfrentados con los patógenos en cultivos duales. Se observaron porcentajes de inhibición superiores al 95% al tratar a los diferentes patógenos con soluciones al 1% de los extractos

crudos obtenidos de sobrenadantes, producto de la fermentación de las bacterias más promisorias.

Knudson (1992) citado por Jiménez (2007) reporta que existen asociaciones establecidas de orquídeas con bacterias, estas se han encontrado dentro del sustrato donde se desarrollan y en las raíces de orquídeas tanto epífitas como terrestres. De los géneros bacterianos aislados de estas orquídeas, se ha demostrado que *Azotobacter* y la bacteria *Bacillus radicola* promueven la germinación de semillas de orquídeas por la producción de la fitohormona auxina (IAA). Y bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, y *Xanthomonas*) y *Sphingomonas* sp, *Microbacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Rhodococcus* sp., *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas* de producir esta hormona.

**CAPÍTULO III**  
**METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### 3.1 Localización

La obtención de las muestras para el aislamiento de los hongos causantes de las enfermedades de cacao y de las bacterias fluorescentes nativas se obtuvieron de las siguientes localidades

Cantón	Coordenadas	Sector	Zona climática
Quevedo	17 <sup>0</sup> 20` 13`` S	Sector la Lola	Zona tropical
Buena Fe	10 <sup>0</sup> 53` 35`` O	Parroquia Patricia Pilar	Zona tropical húmeda

#### 3.1.1 Aislamiento de microorganismos patogénicos de mazorcas de cacao

Las muestras se obtuvieron de huertas de cacao nacional con una edad máxima de producción de 40 años. El material enfermo se recolectó de acuerdo a los síntomas y signos característicos de las enfermedades de *Moniliasis* y *Phytophthora*. El material identificado según sus signos y síntomas fueron colocados en fundas ziplock de plástico para ser trasladadas al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

#### 3.1.2 Procesamiento de muestras mazorcas enfermas

Las mazorcas se lavaron con abundante agua para eliminar cualquier residuo externo, luego desinfectada con hipoclorito de sodio al 5% durante tres minutos, lavadas tres veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso del desinfectante y luego secadas con papel toalla estéril.

Las muestras se procesaron individualmente de acuerdo a los síntomas de la *Moniliasis* y *Phytophthora*. Una vez limpio el material se procedió a quitar la capa superficial de la mazorca de cacao con la ayuda de un bisturí; de la parte interna de las muestras se realizaron varios cortes que se colocaron en placas Petri con PDA (papa dextrosa agar), en

condiciones de incubación en la estufa a una temperatura ambiente 24°C para promover su desarrollo.

### **3.1.3 Identificación de microorganismos**

Los microorganismos fúngicos se identificaron con la ayuda de claves micológicas de Barnett y Hunter (1998) entre otros. El hongo de la *Phytophthora* se identificó mediante un microscopio en el cual se observó los micelios y los sacos de esporas en cuyo interior se observaron las esporas características de la *Phytophthora*, para el caso del hongo *Monilia royeri* la identificación se realizó a través de la coloración café claro que tomo el medio de cultivo al contorno del bio-material que poseía el patógeno.

### **3.2 Aislamiento de *Pseudomonas spp* desde muestras de suelos de Plantaciones de cacao.**

Se recolectaron diez muestras de suelos con raíces de la siguiente manera: las muestras de suelos con raíces fueron obtenidas de árboles de huertas de cacao de 40 a 50 años de producción, 5 árboles al azar en cada una de ellas se realizaron un pequeño hoyo de 3x2 m, se retiraron las raíces secundarias y se procedió al retiro del exceso de tierra adherida. Las muestras de suelo con raíces obtenidas se colocaron en bolsas plásticas con su respectiva identificación.

En el laboratorio se procedió a retirar la tierra adherida a la raíz y se lavó dos veces con agua destilada estéril (200 ml). Las raíces fueron colocadas en un matraz Erlenmeyer de 200 mL conteniendo 50 mL de agua destilada, 0,01 % de Tween 40 y agitado a 200 rpm por 10 min, en tres veces. Las raíces fueron colocadas en una solución estéril amortiguadora de fosfato y sal (PBS)  $K_2PO_4$ - $KH_2PO_4$  10mM, NaCl 0,14 M, pH 7,2 durante 10 min. Al final se cortaron las raíces en segmentos de 2 cm y se inocularon en el medio King B.

La composición del medio King B es la siguiente (KMB) (g/L): peptona no. 3 (Difco), 20,0; glicerol, 15 ml;  $K_2HPO_4$ , 1,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 1,5; agar 15; agua destilada (pH 7,2) y se incubaron a 28 °C, con una agitación de 150 rpm por 24 horas (h) (King *et al.*, 1954). Para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas spp*, fueron suplementados con: Benomil,

1g/L (Benlate, 50 %, Dupon, USA) para inhibir el crecimiento de hongos; carbonicilina (40 µg/mL); cloranfenicol (13 µg/mL) (Raaijmakers *et al.*, 1997; McSpadden *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2003).

Una muestra de 100 µL de este cultivo, fue plaqueado en agar medio King B y luego llevadas a la incubadora a una temperatura de 30<sup>0</sup>C por 48 horas.

### **3.2.1 Selección de colonias fluorescentes**

Después de las 48 horas de crecimiento las bacterias fueron llevadas en tubos Erlenmeyer al espectrofotómetro para observar su fluorescencia. Posteriormente las bacterias que mostraban fluorescencia fueron plaqueadas en medio de cultivo King b en estado sólido. Luego de 72 horas de sembradas las bacterias, fueron seleccionadas por su pigmentación fluorescente, bajo una lámpara de luz ultravioleta. Las colonias positivas con mayor fluorescencia fueron seleccionados y plaqueadas de forma individual para su almacenamiento a una temperatura de 24<sup>0</sup> C.

### **3.2.2 Evaluación del potencial antagónico de las cepas *P. fluorescens***

El potencial antagónico se determinó siguiendo la metodología propuesta por Poritsanos *et al.*, (2006). Ensayos de difusión radial fueron realizados para evaluar la inhibición *in vitro* de los hongos *Phytophthora* y *Moniliophthora*. Alícuotas de (5 µL) de cultivo bacteriano crecido por 12 horas en King B, fueron ubicados en placas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), 0,5 cm alejado del borde de la placa. Las bacterias previamente crecidas por 16 horas a 28<sup>0</sup>, luego fueron obtenidos pequeños discos de PDA a una caja Petri con un diámetro de 0.6 cm para ser plaqueado en el centro del medio del cultivo en la caja Petri.

Las placas se incubaron a temperatura ambiente y la actividad anti-fúngica fue evaluada después de 3 y 4 días, para medir la distancia entre el borde de la colonia y el micelio del hongo.

El sistema de evaluación se realizó con lo propuesto por Mc Spadden y Weller, (2002). Dos mediciones realizadas: la distancia desde el borde del disco de PDA al borde del crecimiento del hongo (x) y la distancia desde el borde del crecimiento bacteriano al borde

del crecimiento del hongo (y). Para cada réplica, un índice de inhibición (i) será calculado:  $i = y / (x+y)$ . Los datos fueron sujetos a análisis de varianza en bloques completamente al azar con arreglo factorial.

**(i): índice de inhibición**

**(x): crecimiento del hongo**

**(y): borde del crecimiento del hongo**

### **3.2.3 Actividad antagonista *in vitro* de metabolitos extracelulares de *P. fluorescens*, hacia los hongos patogénicos**

Para la obtención de los cultivos filtrados libres de células, las bacterias se incubaron en el medio de cultivo King B en estado líquido, con agitación de (150 rpm) a 28<sup>0</sup>C. Los cultivos fueron recolectados durante la fase exponencial tardía. Las células fueron removidas por centrifugación a 8000 rpm por 20 min a 4<sup>0</sup>C. El sobrenadante libre de células fue filtrado asépticamente al pasar por la membrana estéril con un tamaño de poro de 0,45 µm y guardado a 4<sup>0</sup>C.

Para la determinación del crecimiento de las bacterias, las soluciones del sobrenadante del cultivo celular bacteriano, fueron colocadas en concentraciones que varían del 10%, 5% y 1%, las bacterias en estado de suspensión en agua, fueron inoculadas a través de una pipeta regulada para concentraciones que varían de 0 a 100% en cajas Petri que contenían medios de cultivos PDA (Papa Dextrosa Agar) en estado sólido en donde se encontraban colocados los hongos *Moniliasis roreri* y *Phytophthora spp.*

El crecimiento del hongo en el medio de cultivo PDA fue medido a partir del tercer día de inoculado la bacteria en estado líquido en el medio de cultivo del hongo, por un periodo de 7 días. Para observar la inhibición del crecimiento radial del hongo que será expresado en centímetros para determinar la actividad antagonista de la bacterias sobre el hongo. Los datos serán sujetos a análisis de varianza diseño completamente al azar con arreglo factorial.

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **4.1 Resultados de la investigación**

### **4.1.1 Microorganismos patogénicos de mazorca de cacao**

Siguiendo la metodología descrita, se consiguió aislar colonias de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* spp que se codificaron y colocaron en medios de cultivo PDA

Se aisló el hongo, *Moniliophthora roreri* de las mazorcas de cacao, donde se podía observar los síntomas de la enfermedad, las mazorcas eran color café con un recubrimiento blanquecino característico de la Monilia. Además se aisló el Oomycete *Phytophthora* spp. Por medio de pequeños tarugos obtenidos de las mazorcas los cuales fueron transportados al medio de cultivo PDA.

### **4.1.2 Bacterias de *Pseudomonas* de raíces de un cultivo de *T. cacao***

Las cepas correspondieron a 7 aislados bacterianos de muestras de raíces de plantas de cacao las cuales fueron obtenidas através de un proceso de selección de colonias *fluorescentes* característica de las bacterias *Pseudomonas* spp.

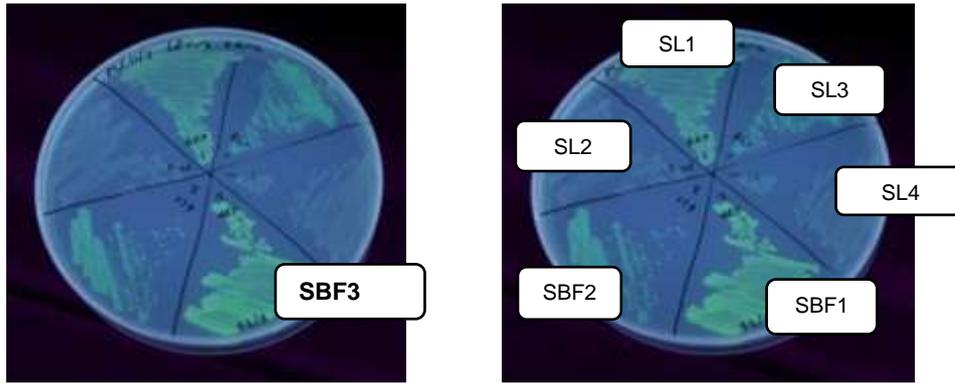
Las bacterias fueron conservadas en cajas Petri en estado sólido en medios de cultivo King b a temperatura ambiente, además fueron codificadas de acuerdo al sector de recolección de las muestras (SL1, SL2, SL3, SL4, SBF1, SBF2, SBF3). Cuyas siglas se identifican así:

S= Sector

L= Lola

B= Buena Fe

Numero= corresponde al dígito de la muestra



**Imagen 1.** Aislados bacterianos cultivados en medio agar King B. (fuente original).

El análisis del cultivo nos permitió definir dos grandes grupos bacterianos cuyo material fue obtenido de diferentes sectores: **A).** Sector la Lola de Quevedo y **B).** Sector Buena Fe. El **Grupo A** esta formado de 4 cepas características de las bacterias *P. fluorescens* obtenidas del sector la Lola (S.L1, S.L 2, S.L 3 Y S.L 4) y el **Grupo B** que comprende las cepas nativas de *P. fluorescens del* Sector Buena Fe (S.B.F 5, S.B.F 6 Y S.B 7). Ambos grupos fueron aislados desde raíces de *Theobroma cacao*.

**Tabla 1** Aislados bacterianos *fluorescens spp* de los sectores de la Lola, Buena fe.

Localidad	Bacterias <i>fluorescentes</i>	Código Cepas
Sector La Lola	4	S.L. 1
		S. L .2
		S. L .3
		S. L .4
Sector Buena Fe	3	S.B.F. 5
		S.B.F. 6
		S.B.F. 7

FUENTE: INVESTIGACIÓN PROPIA  
ELABORADO POR: POR AUTOR

#### 4.1.3 Evaluación de la confrontación de *Pseudomonas spp* con el hongo *Moniliasis roreri* y *Phytophthora spp*.

**Tabla 2** Promedios de las confrontaciones de las bacterias *Pseudomonas spp* vs el hongo de la *Moniliophthora roreri* al 3<sup>er</sup> día del plaqueado.

BACTERIAS (Cepas)	MEDIAS (cm)
S.L.1	2.35 a
S.L.2	2.12 a
S.L.3	2.35 a
S.L.4	2.33 a
S.B.F.1	2.30 a
S.B.F.2	2.40 a
S.B.F.3	2.38 a
TESTIGO	2.42 a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

De acuerdo al análisis de varianza los tratamientos no presentaron significancia estadística siendo el coeficiente de variación de 22.05%.

Según la prueba de Duncan el tratamiento T8 (testigo) y T6 (S.B.F2) presentaron el mayor promedio con 3.3cm cada uno, estadísticamente igual a los demás tratamientos que presentaron promedios entre 2.53 y 3.2cm; siendo el tratamiento de mayor eficacia el T2 (SL2) el cual alcanzó el mayor crecimiento del hongo.

**Tabla 3** Promedios de las Confrontaciones de las bacterias *Pseudomonas* spp vs el hongo de la *Moniliophthora roreri* al 4<sup>to</sup> día del plaqueado.

<b>BACTERIAS</b> <b>(Cepas)</b>	<b>MEDIAS</b> <b>(cm)</b>	
S.L.1	3.10	b
S.L.2	3.80	a b
S.L.3	4.00	a b
S.L.4	3.83	a b
S.B.F1	4.47	a
S.B.F2	4.23	a
S.B.F.3	3.83	a
TESTIGO	4.53	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

Elaborado el análisis de varianza los tratamientos mostraron significancia estadística, con un coeficiente de variación de 11.37%

El análisis estadístico demostró que el testigo (T8) presentó el mayor crecimiento del hongo con 4.53cm estadísticamente igual a los demás tratamientos que presentaron promedios entre 3.8 y 4.47cm, excepto el SL1 (T1) que mostró el menor valor con 3.10cm.

**Tabla 4** Promedios de los Confrontaciones de las bacterias *Pseudomonas* spp vs el hongo de la *Moniliophthora roreri* perteneciente al 5<sup>to</sup> día del plaqueado.

<b>BACTERIAS</b>	<b>MEDIAS</b>	
<b>(Cepas)</b>	<b>(cm)</b>	
S.L.1	3.93	b
S.L.2	4.60	a b
S.L.3	4.90	a
S.L.4	5.03	a
S.B.F1	4.77	a
S.B.F2	5.00	a
S.B.F3	4.67	a
TESTIGO	5.33	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

Según el análisis de varianza los tratamientos alcanzaron significancia estadística; siendo el coeficiente de variación de 5.19%

El testigo (T8) mostró el mayor crecimiento del hongo con 5.33cm estadísticamente igual a los demás tratamientos que presentaron promedios entre 4.60 y 5.03cm, excepto el SL1 (T1) que presento el menor valor con 3.93cm.; siendo esta la bacteria que inhibió en el crecimiento del hongo.

**Análisis de varianza de la bacteria *Pseudomonas* spp vs el pseudo hongo *Phytophthora*.**

**Tabla 5** Promedios de los análisis estadísticos de las bacterias *Pseudomonas* spp vs el hongo de la *Phytophthora*. Perteneciente al 3<sup>er</sup> día del plaqueado.

<b>BACTERIAS (Cepas)</b>	<b>MEDIAS (cm)</b>	
S.L.1	1.90	b
S.L2	2.30	a b
S.L3	2.33	a b
S.L4	2.67	a b
S.B.F1	2.17	a b
S.B.F2	2.53	a b
S.B.F3	2.23	a b
TESTIGO	3.37	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

Practicado el análisis de varianza los tratamientos no demostraron significancia estadística; de acuerdo a los resultados el coeficiente de variación es de 27.03%

El testigo (T8) según los resultados alcanzó el mayor crecimiento del hongo con 3.37cm estadísticamente igual a los demás tratamientos que presentaron promedios entre 2.17 y 2.67cm, excepto el SL1 (T1) que presentó el menor valor con 1.90cm., bacteria que más mostró el menor crecimiento del hongo.

**Tabla 6** Promedios de los análisis estadísticos de las bacterias *Pseudomonas spp* vs el hongo de la *Phytophthora*. Perteneciente al 4<sup>to</sup> día de plaqueado.

<b>BACTERIAS</b>	<b>MEDIAS</b>	
<b>(Cepas)</b>	<b>(cm)</b>	
S.L1	3.03	b c
S.L2	2.77	c
S.L3	3.30	a b c
S.L4	3.40	a b
S.B.F1	3.33	a b
S.B.F2	3.40	a b c
S.B.F3	3.40	a b c
TESTIGO	3.83	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

Según el análisis de varianza los tratamientos no presentaron significancia estadística, con un coeficiente de variación de 9.76%

Con el tratamiento testigo (T8) se obtuvo el mayor crecimiento del hongo con 3.83cm sin diferir estadísticamente a los demás tratamientos que alcanzaron promedios entre 3.03 y 3.40cm; siendo la bacteria con la mayor capacidad antagonista la LS2 (T2) con un promedio de 2.77cm.

**Tabla 7.** Promedios de los análisis estadísticos de las bacterias *Pseudomonas spp* vs el hongo de la *Phytophthora*. Perteneciente al 5<sup>to</sup> día de plaqueado.

<b>BACTERIAS</b> <b>(Cepas)</b>	<b>MEDIAS</b> <b>(cm)</b>	
S.L1	4.10	a b
S.L2	3.93	b
S.L3	4.40	a b
S.L4	4.70	a b
S.B.F1	4.43	a b
S.B.F2	4.47	a b
S.B.F3	4.50	a b
TESTIGO	4.93	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

Concluido el análisis de varianza los tratamientos no mostraron significancia estadística; ya que su coeficiente de variación de 11.00%

De acuerdo a los resultados del testigo (T8) mostró el mayor crecimiento del hongo con 4.93cm estadísticamente similar a los demás tratamientos que obtuvieron promedios entre 4.10 y 4.70cm, se evidenció que la bacteria con el mayor promedio antagónico fue la SL2 (T2) con un 3.93cm.

**4.1.4. Evaluación del antagonismo de la *Pseudomonas spp* contra el hongo *Monilia roreri* y *Phytophthora*.**

**Tabla 8** Promedios obtenidos de las bacterias que tuvieron una actividad antagonista hacia el hongo de la *moniliophthora* perteneciente al 3<sup>er</sup> día del plaqueado.

<b>BACTERIAS</b>	<b>MEDIAS</b>	
<b>(Cepas)</b>	<b>(cm)</b>	
S.L1	1.23	d
S.L2	1.73	c d
S.L3	2.33	b c
S.L4	2.37	b c
S.B.F1	2.43	b
S.B.F2	2.63	a b
S.B.F3	2.40	b
TESTIGO	3.13	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

Obtenido los resultados del análisis de varianza los tratamientos alcanzaron significancia estadística con un coeficiente de variación de 15.51%

El tratamiento testigo (T8) registró el mayor crecimiento del hongo con 3.13cm estadísticamente igual a los demás tratamientos que presentaron promedios entre 2.33 y 2.63cm, excepto el SL1 (T1) y SL2 que evidencio los menores valores con 1.23 y 1.73cm.

**Tabla 9** Promedios obtenidos por la actividad antagonista de las bacterias *Pseudomonas spp* sobre el hongo de la *Moniliophthora* perteneciente al 4<sup>to</sup> día del plaqueado.

<b>BACTERIAS</b> <b>(Cepas)</b>	<b>MEDIAS</b> <b>(cm)</b>	
S.L1	2.50	b
S.L2	2.50	b
S.L3	3.50	a
S.L4	3.57	a
S.B.F1	3.67	a
S.B.F2	3.53	a
S.B.F3	3.63	a
TESTIGO	4.20	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

Practicado el análisis de varianza los tratamientos presentaron significancia estadística; de acuerdo al coeficiente de variación de 12.10%

El testigo (T8) sin aplicación alcanzó el mayor crecimiento del hongo con 4.20cm estadísticamente igual a los demás tratamientos que obtuvieron promedios entre 3.50 y 3.67cm; superior a las bacteria SL1 y SL2 que mostraron la mayor retención del crecimiento del hongo, con 2.50cm.

**Tabla 10** Resultados obtenidos por la actividad antagonista de las bacterias *Pseudomonas* spp sobre el hongo de la *Moniliophthora* perteneciente al 5<sup>to</sup> día del plaqueado.

<b>BACTERIAS</b>	<b>MEDIAS</b>	
<b>(Cepas)</b>	<b>(cm)</b>	
S.L1	3.73	b
S.L2	3.67	b
S.L3	4.40	a b
S.L4	4.63	a
S.B.F1	4.57	a
S.B.F2	4.77	a
S.B.F3	4.93	a
TESTIGO	5.10	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

Realizado el análisis de varianza se pudo observar que los tratamientos presentaron significancia estadística; según su coeficiente de variación que es de 9.68%

El testigo (T8) evidencio el mayor crecimiento del hongo con 5.10cm estadísticamente igual a los demás tratamientos que presentaron promedios entre 4.40 y 4.93cm, excepto los tratamientos SL2 (T2) y SL1 que presentaron los valores 3.67 y 3.73cm.

**Tabla 11** Promedios obtenidos por la actividad antagonista de las bacterias *Pseudomonas* sobre el hongo de la *Phytophthora* perteneciente al 3<sup>er</sup> día del plaqueado.

<b>BACTERIAS</b>	<b>MEDIAS</b>	
<b>(Cepas)</b>	<b>(cm)</b>	
S.L1	1.93	a
S.L2	2.27	a
S.L3	2.30	a
S.L4	2.22	a
S.B.F1	2.33	a
S.B.F2	2.30	a
S.B.F3	2.33	a
TESTIGO	2.47	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

De acuerdo el estudio de varianza los tratamientos no presentaron significancia estadística con un coeficiente de variación de 17.83%

Todos los tratamientos incluidos el testigo mostraron igualdad estadística en la capacidad antagonica de las bacterias *Pseudomonas* sobre el hongo de la *Phytophthora* con promedios entre 1.93 para la cepa SL1 (TI) y 2.47 para el testigo sin aplicación de la bacteria.

**Tabla 12** Este cuadro se logra ver los resultados obtenidos por la actividad antagonista de las bacterias *Pseudomonas* sobre el hongo de la *Phytophthora* perteneciente al 4<sup>to</sup> día de plaqueado.

<b>BACTERIAS (Cepas)</b>	<b>MEDIAS (cm)</b>	
S.L1	2.60	b
S.L2	2.53	b
S.L3	3.27	a b
S.L4	3.23	a b
S.B.F1	3.30	a b
S.B.F2	3.47	a b
S.B.F3	3.13	a
<b>TESTIGO</b>	3.73	a

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

Según el análisis de varianza los tratamientos presentaron significancia estadística siendo el coeficiente de variación de 12.81%

El mayor crecimiento del hongo con 3.73cm se registró en el testigo siendo estadísticamente igual a los demás tratamientos que presentaron promedios entre 3.13 y 3.47cm, excepto el SL1 (T1) que presentó 2.60cm, con la mayor capacidad de actividad antagónica.

**Tabla 13** Resultados de actividad antagonica de las bacterias *Pseudomonas spp* sobre *Phytophthora* perteneciente al 5<sup>to</sup> día del plaqueado.

<b>BACTERIAS</b> <b>(Cepas)</b>	<b>MEDIAS</b> <b>(cm)</b>		
S.L1	3.80		c
S.L2	3.93		b c
S.L3	4.47	a	b
S.L4	4.50	a	b
S.B.F1	4.27	a	b c
S.B.F2	4.13	a	b c
S.B.F3	4.33	a	b c
TESTIGO	4.83	a	

\* Promedios con la misma letra no diferentes estadísticamente al 95% según la prueba de Duncan

El análisis de varianza de los tratamientos presentaron significancia estadística; ya que su coeficiente de variación es de 7.65 %

El tratamiento con el mayor crecimiento del hongo fue el testigo (T8), con 4.83cm. Sin diferir estadísticamente del tratamiento que obtuvieron promedios que varían de 4.50cm excepto SLA1 y SL2 que mostraron 3.80 y 3.93cm de antagonismo.

## 4.2 Discusión

Evaluación antagonista de *Pseudomonas spp* hacia *Moniliasis* y *Phytophthora*, el análisis comparativo de la confrontación de las bacterias *Pseudomonas spp* con el hongo de la *moniliasis* del cacao, mostró que al tercero, cuarto y quinto día del plaqueado las bacterias pese a que no hubo diferencia estadística su capacidad antagonica al hongo fue a los tres días de 0.30cm. mientras que al cuarto y quinto día su capacidad alcanzó de 1.4cm., lo que indica que las bacterias *pseudomonas spp*, si presentan una capacidad antagónica al hongo de la *moniliasis*.

En el análisis de la acción antagonista de las bacterias respecto a la *Phytophthora* estas, mostraron un potencial antagonico desde el tercer día al quinto día de plaqueado con diferencias respecto del testigo de 1.5, 1.1 y 1.0cm. especialmente las bacterias SL1 y SL2, lo que indica que las bacterias provenientes de este sector pueden servir para contrarrestar el hongo de la *Phytophthora*, lo que concuerda con Bedoya 2013, quien manifiesta que las bacterias *Pseudomonas* confrontadas con los hongos de la *Phytophthora cinnamomi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, presentaron alto porcentaje de antagonismo.

En el análisis de la acción antagonista de las bacterias respecto a la *Moniliasis* estas, mostraron un potencial antagonico desde el tercer día al quinto día de plaqueado con diferencias respecto del testigo de 0.54, 1.13 y 1.03cm. especialmente las bacterias SL1, indica que la bacteria proveniente de este sector pueden servir para contrarrestar el hongo *moniliasis*, lo que concuerda con Sandoya 2010, quien manifiesta que las bacterias *Pseudomonas* confrontadas con los hongos tiene capacidad antagonica.

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1 Conclusiones

En base a los análisis de los resultados de las investigaciones realizadas sobre la confrontación y la actividad antagonista de las bacterias *Pseudomonas* spp contra los hongos *Monilia roreri* y *Phytophthora* spp se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- En las bacterias se pudo observar que ejercen un poder antagonico en los hongos de la moniliasis y la *Phytophthora*
- La obtención de rizobacterias es posible a través de la recolección de muestras de raíces de plantaciones de cacao, de las cuales se aislaron siete cepas que presentaban pigmentación fluorescente característica de *Pseudomonas fluorescens*.
- Se pudo multiplicar los hongos de *Moniliasis* y *Phytophthora* en condiciones de laboratorio en medio de cultivos PDA por un periodo de cuatro días para su posterior utilización.
- En la evaluación del antagonismo de las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, a través de la confrontación versus los hongos *Monilia roreri* y *Phytophthora* spp fue evidente que la cepa S.B.F.3 bloqueo el crecimiento de los hongos y disminuyo la infección.
- Los resultados del estudio de la actividad antagonista de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* versus los hongos *Monilia roreri* y *Phytophthora* spp muestran la efectividad de la actividad antagonista puesto que una vez inoculado las cepas S.L.2 y SL3 de *Pseudomonas* bloqueo el crecimiento de los hongos.

## 5.2 Recomendaciones

- Para el manejo fitosanitario de la Monilia y la Phytophthora del cacao se pueden aislar cepas nativas de *P. fluorescens* de las raíces de cacaotales.
- Para el control biológico de la moniliasis y la Phytophthora del cacao se sugiere utilizar cepas nativas aisladas de *Pseudomonas fluorescens* de los mismos ecosistemas cacaoteros de la zona.
- Se sugiere que se desarrollen nuevas investigaciones sobre la utilización de bacterias antagonistas contra hongos fitopatógenos en agro ecosistemas de la zona.

**CAPÍTULO VI**  
**BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografía

- PRODUCTOS AGRI-NOVA Science. (2011). *infroagro*.
- Rizobacterias asociadas a cultivos de cacao como fuente de metabolitos antimicrobianos para el control de enfermedades. (2013). *La fitopatología en la seguridad alimentaria y el Medio ambiente*.
- AYALA. (2014). *Manejo Integrado de Moniliasis*. Guayaquil.
- Ayala, M. (s.f.). *Manejo Integrado de Moniliasis*.
- Batista, L. (2009). *Guía Técnica, El Cultivo de Cacao*, 64-65-66-67.
- Batista, L. (2009). *Guía Técnica, El Cultivo de Cacao. Morfología de la planta de cacao*.
- Bedoya. (2013). Rizobacterias asociadas a cultivos de aguacate como fuente de metabolitos antimicrobianos para el control de enfermedades. *la fitopatología en la seguridad alimentaria y el medio ambiente*.
- Canchignia, F. (2014). *Aislamiento y caracterización de cepas Pseudomonas fluorescens y estudio de sus efectos antagonistas hacia el nematodo Xiphinema index y promotor del desarrollo de vid 'Thompson Seedless'*. CHILE.
- Doster, N. (2011). *Theobroma cacao L. Hoja botánica: Cacao*.
- Erazo, X. A. (2014). *DIVERSIDAD GENÉTICA DE CACAO Theobroma cacao L., CON. palmira - colombia*.
- FUNDESYRAM, B. V. (2008). *Botánica, Ecología, Suelos. MANUAL DE MANEJO Y PRODUCCIÓN DEL CACAOTERO*.
- Gutiérrez., L. A. (2012). *Manual de producción de cacao fino de aroma a través de manejo*.
- Hernandez, J. L. (2011). *Enfermedades del cultivo de cacao*.
- ICA. (2012). *Medidas para la temporada invernal. Manejo fitosanitario del cultivo de cacao*.
- ICA, I. c. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de cacao. Medidas para la temporada invernal*.
- Jimenez, T. (2007). *ESTUDIO DE BACTERIAS ASOCIADAS A ORQUIDEAS (ORCHIDACEAE). PORTAL DE REVISTAS ACADEMICAS*.
- Nicolas Dostert, J. R. (2012). *Hoja botánica: Cacao*.
- Nicolas, D. (2012). *Hoja botánica: Cacao. Theobroma cacao L.*

- Phillips-Mora, W. (2009). Enfermedades del cacao. *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, catie*.
- Pico, J. (2012). ESTACION EXPERIMENTAL CENTRAL DE LA AMAZONIA CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DE CAPACITACION. *GUIA DEL MANEJO INTEGRADO DE ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE CACAO (Theobroma cacao L.) EN LA AMAZONIA*.
- Ramírez, E. I. (2013). PROPUESTA PARA EL MANEJO DE CACAO ORGÁNICO. *al del Machete (Ceratocystis fimbriata), en cacao y su control*.
- Sandoyo, G. (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de Pseudomonas fluorescens ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoam vol.28*.
- Wil. (2013). CONTROL FITOSANITARIO DEL CACAO. *ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE CACAO*.
- Wilberth Phillips-Mora, R. C. (2014). Catálogo enfermedades del cacao en Centroamérica. *Biblioteca Virtual - FUNDESYRAM*.
- Yerovi, A. V. (2013). PLAN DE FACTIBILIDAD PARA LA CREACIÓN .

**CAPÍTULO VII**  
**ANEXOS**

## Anexo 1



**OBTENCIÓN DE RAÍCES DE CACAO**

## Anexo 2



**CRECIMIENTO DE LA BACTERIAS**

**Anexo 3**



**BACTERIAS PLAQUEADAS**

**Anexo 4**



**HONGOS SEMBRADOS EN TUBOS DE ENSAYOS**

**CONSERVACION DE ORGANISMOS EN PLACAS O PLATOS PETRI**

**Anexo 5**



**PHYTOPHTORA SP**



**MONILIOHT RORERI**

**Anexo 6**



**CONFRONTACION DE HONGOS VS BACTERIAS**