



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:

“Biodiversidad de ecotipos de *Moniliophthora roreri* en cacao (*Theobroma cacao*) clon
ccn-51 y la actividad antagonista de PGPR”

Autor:

Romero Meza Ricardo Fernando

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2018

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **ROMERO MEZA RICARDO FERNANDO** 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.

Romero Meza Ricardo Fernando

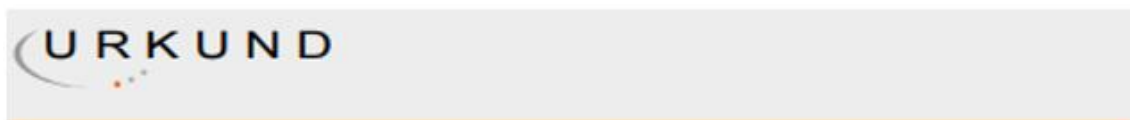
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el egresado Ricardo Fernando Romero Meza, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado **“Biodiversidad de ecotipos de *Moniliophthora roreri* en cacao (*Theobroma cacao*) clon CCN-51 y la actividad antagonista de PGPR”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

	
Dokument	Tesis de Grado Ricardo Romero.docx (D36763339)
Inskickat	2018-03-20 15:45 (-05:00)
Inskickad av	hcanchignia@uteq.edu.ec
Mottagare	hcanchignia.uteq@analysis.orkund.com
Meddelande	Visa hela meddelandet
	6% av det här c:a 14 sidor stora dokumentet består av text som också förekommer i 16 st källor.



Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis de Grado Ricardo Romero.docx (D36763339)
Submitted: 3/20/2018 9:45:00 PM
Submitted By: hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance: 6 %

Sources included in the report:

Caso Valenzuela VALIDO (2.docx (D25376113)
shiguango-microorganismo cacao-Freile.docx (D19556850)
<http://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/2557/1/ESTUDIO%20DE%20LA%20COMERCIALIZACI%C3%93N%20DE%20CACAO%20Y%20SU%20INFLUENCIA%20EN%20EL.pdf>
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/9106/1/TTUACE-2016-CI-DE00035.pdf>
<https://doi.org/10.1007/BF00335919>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16349167>

Instances where selected sources appear:

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



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

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Biodiversidad de ecotipos de *Moniliophthora roreri* en cacao (*Theobroma cacao*) clon CCN-51 y la actividad antagonista de PGPR”.

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

Aprobado por:

Dr. Fernando Abasolo Pacheco
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Silvia Saucedo M.Sc
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Marisol Rivero
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Quevedo - Los Ríos - Ecuador
2018

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 Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjó mis conocimientos.

Le agradezco a mi Director de tesis, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez, por su amistad, enseñanza, apoyo y estimulación para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

A los docentes Ing. Ignacio Sotomayor, Dr. Fernando Abasolo, Ec. Flavio Ramos, Ing. Pedro Rosero y a la Dra. Carmen Suarez por sus grandes enseñanzas en el trayecto de toda mi preparación académica.

Al Ing. Antonio Mendoza por brindarme su amistad y confianza en el tiempo que estuve en el laboratorio.

Al Ing. Jefferson Guato por ser mi mentor y amigo para la realización de mi proyecto de investigación.

A mi mejor amigo Ángel Verdesoto por su amistad, confianza y apoyo durante el proyecto de investigación.

También a mis amigos Harón Engracia, Jorge Rodríguez, Joselyn Vélez, Ivo Sabando, Amy Murillo, Antonio Solórzano, Jaime Briones, Javier Auhing y Ángel Cedeño que han formado parte de mi vida profesional a los que me encantaría agradecerles su amistad, apoyo ánimo y compañía en los buenos y malos momentos.

A mis compañeros de investigación Helen Olvera y Paulina Cruz por esa amistad y confianza brindada en muy corto tiempo.

Dedicatoria

Agradezco a Dios por permitirme lograr esta meta en mi vida, también por darme unos padres maravillosos, ya que, con sus esfuerzos, confianza, amor y apoyo incondicional, permitieron culminar mis estudios y poder ser un profesional. Este logro se los dedico a Francisco Romero y Mirian Meza.

A mis hermanos Ana María Romero y Luis Ponce y a mi sobrino Matías que siempre me apoyaron y estuvieron pendientes de mí sacándome una sonrisa en todo momento.

A Margarita Macías por ser la persona más especial en mi vida que en todo momento ha estado brindándome su apoyo.

RESUMEN

La Moniliasis o mal de Quevedo, causada por el hongo *Moniliophthora roreri* es la principal enfermedad que ataca a los frutos del cacao en el Ecuador, su ataque es severo que constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de cacao, en base a ello fue apremiante estudiar la utilización de “Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal” (PGPR) como una alternativa viable y amigable con el medio ambiente hacia el control de moniliasis en cacao, planteando la presente investigación “Biodiversidad de ecotipos de *M. roreri* en cacao (*Theobroma cacao*) clon CCN-51 y la actividad antagonista de PGPR”. La presente investigación fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, enfocado a los objetivos de obtener un banco de germoplasma de cepas de *M. roreri*, caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. roreri* y evaluar la actividad antagonista de las PGPR hacia la proliferación del hongo a nivel *in-vitro*. Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para la caracterización morfológica del hongo *M. roreri* generando 12 zonas a evaluar. Se realizó una caracterización molecular mediante ERIC-PCR e ITS generando un árbol filogenético de los diferentes aislados realizando ensayos antagonistas con células bacterianas y sobrenadantes. Luego de la interpretación y análisis de los resultados se obtuvieron las siguientes conclusiones: La variabilidad de ecotipos del hongo *M. roreri* en el Ecuador está estrechamente relacionada con su ubicación en el piso altitudinal y las condiciones climáticas en las que se encuentre el cultivo huésped. Las condiciones favorables para un mayor grado de agresividad del hongo *M. roreri* son una temperatura promedio de 32 °C y una humedad relativa del 56% y piso altitudinal de 138 msnm. Los sobrenadantes de los aislados bacterianos de *S. marcescens* y *P. protegens CHA0* ejercieron la mayor actividad antagónica en inhibición de producción de esporas de *M. roreri* pese a su crecimiento micelial normal.

Palabras claves: PGPR, actividad antagonista, pisos altitudinales.

ABSTRAC

The Moniliasis or mal de Quevedo, caused by the fungus *M. roreri* is the main disease that attacks the fruits of cocoa in Ecuador, its attack is severe which constitutes one of the most important limiting factors in the production of cocoa, in Based on this, it was urgent to study the use of "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (PGPR) as biocontrollers as a viable option in monilla control, if not as promoters in the development of plants without affecting the ecosystem, being friendly to the environment , proposing the present investigation "Biodiversity of ecotypes of *Moniliophthora roreri* in cocoa (*Theobroma cacao*) clone CCN-51 and the antagonist activity of PGPR". It was carried out in the Molecular Biology and Microbiology laboratory of the State Technical University of Quevedo, focused on the objectives of obtaining a germplasm bank of *M. roreri* strains, to characterize the morphological and molecular diversity of the different ecotypes of *M. roreri* and evaluate the antagonistic activity of PGPR towards the proliferation of the fungus at the in-vitro level. A completely randomized DCA design was applied for the morphological characterization of *M. roreri* fungus, generating 12 zones to be evaluated. A molecular characterization was carried out by means of ERIC-PCR and ITS generating a phylogenetic tree of the different isolates performing antagonistic tests with bacterial cells and supernatants. After the interpretation and analysis of the results, the following conclusions were obtained: The variability of ecotypes of the fungus *M. roreri* in Ecuador is closely related to its location in the altitudinal floor and the climatic conditions in which the host crop is found. The favorable conditions for a greater degree of aggressiveness of the fungus *M. roreri* are an average temperature of 32 °C and a relative humidity of 56% and altitudinal floor of 138 meters above sea level. The supernatants of the bacterial isolates of *S. marcescens* and *P. protegens* CHA0 exerted the greatest antagonistic activity in inhibiting the production of *M. roreri* spores despite their normal mycelial growth.

Keywords: PGPR, antagonistic activity, altitudinal floors.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN..	iii
REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRAC.....	ix
TABLA DE CONTENIDO	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
Código dublín	xvi
Introducción.....	1
 CAPÍTULO I CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.1. Problematización.....	3
1.1.1. Diagnóstico del problema	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
1.3. Justificación	5
 CAPÍTULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	6
2.1. Marco teórico	7
2.1.1. El cacao	7
2.1.1.2. Cacao en el Ecuador.....	7
2.1.1.3. Cacao CCN-51	8
2.1.1.4. Principales características del cacao CCN-51.....	9
	x

2.1.2.	Principales enfermedades en el cacao	9
2.1.3.	Moniliasis.....	9
2.1.3.1.	Origen de la enfermedad	10
2.1.4.	<i>Moniliophthora roreri</i>	10
2.1.4.1.	Morfología	10
2.1.4.2.	Taxonomía	11
2.1.4.3.	Ciclo de vida del patógeno.....	11
2.1.4.4.	Sintomatología	12
2.1.4.5.	Epidemiología	12
2.1.5.	Métodos de control	13
2.1.6.	Variabilidad genética	13
2.1.7.	Ecotipos.....	14
2.1.8.	Regiones ITS (espacios de transcripta interna).....	15
2.1.9.	ERIC-PCR (secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas)	15
2.1.10.	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).....	16
2.1.11.	Utilización de las PGPR en la agricultura.....	19
2.1.12.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	19
2.1.13.	<i>Bacillus sp</i>	20
2.1.14.	<i>Acinetobacter sp</i>	20
2.1.15.	<i>Enterobacter sp</i>	20
2.1.16.	<i>Serratia marcescens</i>	21
2.1.17.	Metabolitos secundarios.....	21
CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		23
3.1.	Localización de la investigación	24
3.2.	Tipo de investigación	24
3.3.	Método de investigación	24
3.4.	Fuentes de recopilación de información	24
3.5.	Material genético.....	24
3.6.1.	Material de laboratorio.....	26
3.6.2.	Material de oficina	26
3.6.3.	Equipos de laboratorio	26
3.6.4.	Reactivos.....	27

3.7.	Diseño de la investigación	27
3.8.	Manejo del experimento	29
3.8.1.	Creación del banco de germoplasma	29
3.1.1.1.	Aislamiento de <i>M. roreri</i> de cultivos nativos de cacao CCN-51.....	29
3.9.2.	Caracterización morfológica de <i>M. roreri</i>	30
3.9.3.	Caracterización molecular de <i>M. roreri</i>	31
3.9.3.1.	Extracción de adn de <i>M. roreri</i>	31
3.9.3.2.	Caracterización e identificación molecular de <i>M. roreri</i> mediante ITS.....	31
3.9.3.3.	Caracterización molecular mediante ERIC-PCR.....	32
3.9.3.4.	Agrupamiento filogenético.	33
3.9.4.	Ensayos antagonistas	33
3.9.4.1.	Obtención de las pgpr con actividad antagonista.....	33
3.9.4.2.	Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y producción de esporas del hongo <i>M. roreri</i>	34
3.9.4.3.	Obtención de sobrenadantes de pgpr con actividad antagonista.....	34
3.9.4.4.	Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y producción de esporas del hongo <i>M. roreri</i>	35
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN		36
4.1.	Obtener un banco de germoplasma de cepas de <i>M. roreri</i>	37
4.1.1.	Banco de germoplasma	37
4.2.	Caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de <i>M. roreri</i>	38
4.2.1.	Crecimiento micelial	38
4.2.2.	Número de esporas.....	39
4.2.3.	Tamaño de esporas.....	39
4.2.4.	Actividad metabólica	40
4.2.5.	Borde, textura y color.	41
4.2.6.	Análisis de componentes principales.	41
4.2.7.	Triángulo de la enfermedad del aislado con características más agresivas. ..	42
4.2.7.	Identificación molecular del hongo <i>M. roreri</i> mediante ITS (espacios de transcripta interna).....	43
4.2.8.	Caracterización molecular mediante marcadores ERIC – REP PCR	44

4.2.9.	Agrupamiento filogenético de <i>M. roreri</i> para la determinación de la biodiversidad de ecotipos mediante ERIC-PCR.....	45
4.2.10.	Agrupamiento de <i>M. roreri</i> para la determinación de diversidad de ecotipos (secuenciación ITS).	46
4.3.	Evaluar la actividad antagonista de las PGPR hacia la proliferación del hongo a nivel in-vitro.	47
4.3.1.	Efecto antagónico de las rizobacterias al crecimiento del micelio <i>M. roreri</i> . ..	47
4.3.2.	Efecto antagónico de las rizobacterias a la producción de esporas de <i>M. roreri</i>	49
4.3.1.	Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias al crecimiento micelial de <i>M. roreri</i>	50
4.3.2.	Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias a la producción de esporas de <i>M. roreri</i>	51
4.4.	Discusión.....	53
4.4.1.	Banco de germoplasma	53
4.4.2.	Caracterizar la diversidad de ecotipos a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de <i>M. roreri</i>	53
4.4.3.	Triángulo de la enfermedad del aislado con características más agresivas. ..	54
4.4.4.	Identificación molecular del hongo <i>M. roreri</i> mediante ITS (espacios de transcripta interna).....	54
4.4.5.	Caracterización molecular mediante marcadores ERIC – REP PCR	55
4.4.7.	Efecto antagónico de las rizobacterias a la producción de esporas de <i>M. roreri</i>	56
4.4.8.	Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias al crecimiento en diámetro del micelio <i>M. roreri</i>	56
4.4.9.	Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias a la producción de esporas de <i>M. roreri</i>	57
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		58
5.1.	Conclusiones	59
5.2.	Recomendaciones	60
CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA		61
ANEXOS.....		73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Zonas de recolección de muestras del hongo <i>M. roreri</i>	25
Tabla 2. Banco de cepas bacterianas UTEQ.....	25
Tabla 3. Esquema del ADEVA para la caracterización morfológica	28
Tabla 4. Esquema del ADEVA para los ensayos antagonistas de crecimiento micelial	28
Tabla 5. Esquema del ADEVA para los ensayos antagonistas a la producción de esporas.....	28
Tabla 6. Rango de colores para evaluar a los aislamientos morfológicamente con respecto al color de las colonias.	30
Tabla 7. Banco de germoplasma de los aislados del hongo <i>M. roreri</i>	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento radial de los aislados de <i>Moniliophthora roreri</i>	38
Figura 2. Número de esporas de los aislados de <i>M. roreri</i>	39
Figura 3. Tamaño de esporas de los aislados de <i>M. roreri</i>	40
Figura 4. Actividad metabólica de los aislados de <i>Moniliophthora roreri</i> ..	40
Figura 5. Colonia pura del Hongo <i>M. roreri</i>	41
Figura 6. Análisis de componentes principales.	42
Figura 7. Triángulo de la enfermedad del hongo <i>M. roreri</i> de “La Catorce”.....	42
Figura 8. Mapa geográfico de los sitios de recolección de <i>M. roreri</i> en el Ecuador.....	43
Figura 9. Identificación de molecular de <i>Moniliophthora roreri</i> mediante PCR.....	44
Figura 10. Caracterización molecular de <i>M. roreri</i> mediante ERIC-PCR.	45
Figura 11. Árbol filogenético generado de los 12 aislados de <i>Moniliophthora roreri</i> ..	46
Figura 12. Árbol filogenético generado de los 12 aislados de <i>M. roreri</i>	47
Figura 13. Efecto antagónico de rizobacterias al crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> ..	48
Figura 14. Inhibición del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i>	48
Figura 15. Efecto antagónico de rizobacterias al crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> ..	49
Figura 16. Efecto antagónico del sobrenadante a la producción de esporas de <i>M. roreri</i>	49

Figura 17. Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias al crecimiento micelial de <i>M. roreri</i>	50
Figura 18. Inhibición del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> en placas monopetri a los 18 días de inoculación con los sobrenadantes bacterianos.	51
Figura 19. Efecto antagónico del sobrenadante a la producción de esporas de <i>M. roreri</i>	52
Figura 20. Efecto Antagónico del sobrenadante a la producción de esporas de <i>M. roreri</i>	52

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	61
Anexo 2. Protocolo modificado para la extracción de AND de Hongos DNeasy® Plant Mini Kit.....	72
Anexo 3. Protocolo del conteo de esporas.....	73
Anexo 4. Protocolo de obtención de sobrenadantes.....	75
Anexo 5. Conservación de las cepas de <i>M. roreri</i>	75

Código Dublín

Título:	“Biodiversidad de ecotipos de <i>Moniliophthora roreri</i> en cacao (<i>Theobroma cacao</i>) clon CCN-51 y la actividad antagonista de PGPR”		
Autor:	Romero Meza Ricardo Fernando		
Palabras clave:	PGPR	Pisos altitudinales	Actividad antagonista
Fecha de publicación:			
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2018		
Resumen:	La Moniliasis o mal de Quevedo, causada por el hongo <i>M. roreri</i> es la principal enfermedad que ataca a los frutos del cacao en el Ecuador, su ataque es severo que constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de cacao, en base a ello fue apremiante estudiar la utilización de “Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal” (PGPR) como biocontroladores como una opción viable en el control de monilla si no como promotores en el desarrollo de las plantas sin afectar el ecosistema siendo amigables con el medio ambiente, planteando la presente investigación “Biodiversidad de ecotipos de <i>Moniliophthora roreri</i> en cacao (<i>Theobroma cacao</i>) clon CCN-51 y la actividad antagonista de PGPR”. Se realizó en el laboratorio de Biología Molecular y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, enfocado a los objetivos de obtener un banco de germoplasma de cepas de <i>M. roreri</i>, caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de <i>M. roreri</i> y evaluar la actividad antagonista de las PGPR hacia la proliferación del hongo a nivel <i>in-vitro</i>. Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para la caracterización morfológica del hongo <i>M. roreri</i> generando 12 zonas a evaluar. Se realizó una caracterización molecular mediante ERIC-PCR e ITS generando un árbol filogenético de los diferentes aislados realizando ensayos antagonistas con células bacterianas y sobrenadantes. Luego de la interpretación y análisis de los resultados se obtuvieron las siguientes conclusiones: La variabilidad de ecotipos del hongo <i>M. roreri</i> en el Ecuador está estrechamente relacionada con su ubicación en el piso altitudinal y las condiciones climáticas en las que se encuentre el cultivo huésped. Las condiciones favorables para un mayor grado de agresividad del hongo <i>M. roreri</i> son una temperatura promedio de 32 °C y una humedad relativa del 56% y piso altitudinal de 138 msnm. Los sobrenadantes de los aislados bacterianos de <i>S. marcescens</i> y <i>P. protegens CHA0</i> ejercieron la mayor actividad antagónica en inhibición de producción de esporas de <i>M. roreri</i> pese a su crecimiento micelial normal.		
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
URI:			

Introducción

El cacao es una fruta tropical, sus cultivos se encuentran mayoritariamente en el Litoral y en la Amazonía. Es un árbol con flores pequeñas que se observan en las ramas y producen una mazorca que contiene granos cubiertos de una pulpa rica en azúcar. La producción de cacao se concentra principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos (Abel, 2016).

En el país se cultivan dos tipos de cacao: el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional que es un Cacao fino de aroma conocido como “Arriba”, desde la época colonial. Ecuador es el país con la mayor participación en este segmento del mercado mundial (un 63% de acuerdo con las estadísticas de ProEcuador) (Guerrero, 2014).

El cultivo del cacao, (*Theobroma cacao*), tiene gran importancia dentro de la economía del Ecuador, por tratarse de un producto de exportación y materia prima para industrias locales de fabricación de chocolate y sus derivados. Esto se traduce, además, en fuentes de trabajo para un alto porcentaje de personas del campo y la ciudad (INIAP, 1998).

La Moniliasis o mal de Quevedo, causada por el hongo *M. roreri* es la principal enfermedad que ataca a los frutos del cacao en el Ecuador, su ataque es tan severo que constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de cacao, en lugares donde se lo siembra, especialmente en el litoral ecuatoriano.

Las labores culturales, especialmente la remoción semanal de frutos enfermos, ejercen su efecto acumulativo para la reducción de fuentes de inóculo de Monilla; sin embargo, la práctica exige un gran esfuerzo por parte del productor, por lo que la enfermedad persiste en las huertas, lo que lleva a la búsqueda de nuevas alternativas, integrando al manejo de enfermedades la estrategia del control biológico con el uso de especies antagónicas aisladas en el hábitat donde se desarrollan las enfermedades del cacao (Peñaherrera, 2013).

CAPÍTULO I

CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.Problematización

1.1.1. Diagnóstico del problema

El hongo *M. roreri* ataca únicamente a los frutos del cacao (*T. cacao*) en cualquier edad, causando pudrición de los granos, aunque los frutos aparenten estar sanos, el grado de incidencia del ataque de la monilla varía según la zona y época del año, de acuerdo con las condiciones del clima. Para lo cual se realizó una caracterización morfológica y molecular en diferentes zonas geográficas y se las enfrentó con microorganismos antagonicos evaluando su grado de severidad.

1.1.2. Planteamiento del problema

El establecimiento de cultivos de Cacao CCN-51 en zonas con ambientes favorables para la propagación del patógeno causa grandes pérdidas en su producción fomentando a la utilización de agroquímicos que influyen a la pérdida de biodiversidad de microorganismos existentes en el suelo que favorecen al desarrollo de las plantas.

1.1.3. Sistematización del problema

¿El grado de incidencia de la Moniliasis causada por el hongo *M. roreri* depende de la ubicación geográfica donde se encuentre establecido el cultivo?

¿Los cultivos establecidos en zonas geográficas elevadas son más propensos al ataque severo de la Monilla?

¿Los sobrenadantes obtenidos de las PGPR ejercen actividad antagónica hacia el hongo?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Establecer la biodiversidad de ecotipos de *Moniliophthora roreri* en cacao (*Theobroma cacao*) clon CCN-51 y la actividad antagonista de PGPR.

1.2.2. Objetivos específicos

- Generar un banco de germoplasma de cepas de *M. roreri*.
- Caracterizar la biodiversidad de ecotipos a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. roreri*.
- Evaluar la actividad antagonista de las PGPR hacia la proliferación del hongo a nivel in-vitro.

1.3. Justificación

Considerando que el cacao CCN-51 es uno de los cultivos con mayor rentabilidad en el Ecuador es necesario presentar nuevas alternativas sostenibles y sustentables en el manejo integrado de enfermedades es por esto que se planteó estudiar la biodiversidad del hongo patogénico *M. roreri* y su incidencia en la producción de las principales zonas cacaoteras del país. Este trabajo de investigación se enfoca en la evaluación de la diversidad de ecotipos de este patógeno antes mencionado y su distribución geográfica del *T. cacao*, correlacionado con la incidencia al grado de patogenicidad.

La enfermedad de la monilla o mal de Quevedo causada por el hongo *M. roreri* es la principal enfermedad que ataca a este cultivo en especial a este clon, siendo su mayor incidencia de afectación a las mazorcas que son el producto comercial.

La utilización de PGPR como biocontroladores se presenta como una opción viable no solo en el control de la monilla si no como promotores del desarrollo de las plantas sin afectar el ecosistema siendo amigables con el medio ambiente.

Los resultados obtenidos serán de gran importancia para el agro y el área investigativa del sector cacaotero del país, los cuales se presentan como alternativas comprobadas para el control eficaz de moniliasis.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Teórico

2.1.1. El cacao

El cultivo de cacao es un típico cultivo perenne y pertenece a la familia *Esterculiaceae* cuya principal característica es que sus miembros producen flores y frutas en el tallo y ramas. Es además, un cultivo que crece y produce en forma adecuada cuando está protegido por la sombra de árboles de otras especies (Ministerio de Agricultura y Ganadería., 1991).

2.1.1.1. El cacao en el mundo

El mercado de cacao en el mundo ha tenido una evolución diferencial durante los últimos cien años aproximadamente. Debido a la presencia de enfermedades e insectos plagas o a algún otro factor como el político, la producción del cacao se ha ido trasladando a otros lugares (Enríquez, 2010).

Después de que el cacao fue aceptado por los europeos como alimento necesario, comenzaron a llevar semillas de su área natural hacia otros países. En la actualidad, el cacao se cultiva en todos los países que disponen de tierras tropicales húmedas y se ha convertido en un cultivo verdaderamente popular (Enríquez, 1985).

Los españoles y los portugueses se pueden considerar como los principales promotores de la expansión del cacao que, habiendo salido de América, hoy se encuentra en África, Asia y Oceanía (Enríquez, 1985).

2.1.1.2. Cacao en el Ecuador

El cacao es una fruta tropical, sus cultivos se encuentran mayormente en el Litoral y en la Amazonía. Es un árbol con flores pequeñas que se observan en las ramas y producen una mazorca que contiene granos cubiertos de una pulpa rica en azúcar. La producción de cacao se concentra principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos (Guerrero, 2011) .

En el país se cultivan dos tipos de cacao: el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional que es un Cacao Fino de Aroma conocido como 'Arriba', desde la época colonial. Ecuador es el país con la mayor participación en este segmento del mercado mundial (un 63% de acuerdo con las estadísticas de ProEcuador) (Guerrero, 2011). Según fuentes históricas, desde principios de 1600 ya había pequeñas plantaciones de cacao a orillas del río Guayas y se expandieron a orillas de sus afluentes el Daule y el Babahoyo, ríos arriba, lo cual originó el nombre de cacao “arriba” en el mercado nacional e internacional (Flores, 2007).

El auge cacaotero permitió la inserción del Ecuador en la economía mundial, pero como proveedor de materia prima, a la vez que estimuló el desarrollo de otras actividades que se daban en su entorno (Flores, 2007).

En 2015, Ecuador cultivó 264 mil toneladas métricas de cacao (El Telégrafo, 2016). Para 2020, el sector cacaotero del país tiene proyectado aumentar de 200 mil toneladas de producción, a 400 mil. Al año las ventas de cacao al exterior generan ganancias sobre los 500 millones de dólares (La Hora, 2015).

2.1.1.3. Cacao CCN-51

En 1965 luego de varias investigaciones, el agrónomo ambateño Homero Castro Zurita, logró en 1965 el denominado cacao clonal CCN-51 que significa Colección Castro Naranjal (ANECACAO, 2015).

Los diferentes clones CCN fueron obtenidos del híbrido entre los clones ICS-95 x IMC-67, habiendo procedido luego a realizar un segundo cruce entre dicho híbrido con un cacao encontrado por él en el Oriente ecuatoriano y denominado “Canelos” (Fajardo, 2013).

El CCN-51 es un cacao clonado de origen ecuatoriano que el 22 de junio del 2005 fue declarado, mediante acuerdo ministerial, un bien de alta productividad. Con esta declaratoria, el Ministerio de Agricultura brindar apoyo para fomentar la producción de este cacao, así como su comercialización y exportación. El clon CCN-51 cultivado en el Ecuador, es considerado cacao ordinario, corriente o común (ANECACAO, 2015).

2.1.1.4. Principales características del cacao CCN-51

- En primer lugar, se destaca su alta productividad que llega en haciendas altamente tecnificadas a superar los 50 quintales por hectárea.
- Es un clon autocompatible, es decir no necesita de polinización cruzada para su adecuado fructificación tal como la mayoría de los clones.
- El CCN-51 se caracteriza por ser un cultivar precoz pues inicia su producción a los 24 meses de edad.
- Es tolerante a la “Escoba de Bruja” enfermedad que ataca a la mayoría de variedades de cacao destruyendo gran parte de su producción.
- Es sensible a Monilla.
- Es una planta de crecimiento erecto, pero de baja altura lo que facilita y abarata las labores agronómicas tales como poda y cosecha entre otras.
- Índice de Mazorca (IM) 8 mazorcas/libra de cacao seco, en comparación con el índice promedio de 12 mazorcas/libra.
- Índice de Semilla: 1.45 grs./semilla seca y fermentada comparado con el índice promedio de 1.2 grs./semilla seca.
- Índice de Semillas por mazorca: que es de 45, mucho más alto que el promedio normal de 36 semillas por mazorca (Fajardo, 2013)

2.1.2. Principales enfermedades en el cacao

Las enfermedades más importantes del cacao en la Amazonia son: Moniliasis (*Moniliophthora roreri*), mazorca negra (*Phytophthora sp*) y escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), cuyos efectos causan pérdidas a la producción superiores al 60% (Pico et al., 2012).

2.1.3. Moniliasis

Enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, conocida como: monilla, pudrición acuosa y helada; ataca a frutos en cualquier estado de desarrollo siendo más susceptibles cuando menor es su estado de crecimiento. Los síntomas empiezan con pequeñas manchas de color amarillo en mazorcas verdes; también se observan abultamientos y presencia de manchas pardas; en condiciones favorables crece el micelio

del hongo formando una felpa blanca, produciendo una gran cantidad de esporas (cuerpos infectivos), que se caracterizan por el color blanco crema (Pico et al., 2012).

Según (Phillips-Mora, 2006) la *M. roreri* está presente en 11 países. Es uno de los principales factores limitantes causando pérdidas mayores al 30%, pero en muchas localidades alcanzan el 100%. Sus efectos devastadores han causado el abandono de miles de hectáreas durante un periodo de casi 200 años. La reciente aparición y agresividad mostrada por el hongo en los dos extremos longitudinales de distribución (México y Perú) indica que está en una intensa fase invasiva.

2.1.3.1. Origen de la enfermedad

Durante años, Ecuador fue considerado como el centro de origen de la enfermedad, debido a que en 1917 se realizó el primer reporte oficial del patógeno, cuando el fitopatólogo J. B. Rorer llegó de Trinidad a Ecuador para identificar el agente causal de la reducción de la producción de cacao. Las muestras recolectadas por Rorer fueron enviadas a R. E. Smith en la Universidad de California, allí se identificó el hongo como *Monilia sp* (Suárez & Hernández, 2010).

2.1.4. *Moniliophthora roreri*

M. roreri solo ataca especies pertenecientes a los géneros estrechamente relacionados *Theobroma* y *Herrania* (Whitlock & Baum, 1999), es de fácil dispersión, se distribuye principalmente con la acción del aire, lluvias, animales y las personas. Los frutos pueden infectarse en cualquier etapa del desarrollo. La penetración del hongo ocurre directamente a través de la epidermis del fruto. El hongo invade el tejido interno, intracelularmente, tarda entre 20 a 60 días para manifestarse externamente y presentan los síntomas de la enfermedad en forma de necrosamiento, deformación de la mazorca, hidrosis, madurez irregular y prematura (Peñaherrera, 2013).

2.1.4.1. Morfología

Las esporas provienen de un basidio modificado, con un pseudoestroma denso y carnoso sobre el cual el hongo produce los vestigios del píleo. Las esporas son multifuncionales,

sirven no sólo para el intercambio genético, sino también para la dispersión, la infección y la supervivencia (Evans, 2007). Éstas pueden ser esféricas u ovaladas y tienen dos formas de germinación a través del poro germinativo o directamente a través de su pared (Uquillas, 2004). Las esporas viejas desarrollan paredes gruesas y se tornan oscuras, las cuales pueden marcar el inicio de la fase de dormancia (Evans, 2007). El tubo germinativo presenta en el extremo distal una estructura similar a un apresorio y la hifa infectiva. Éste es único y en raras ocasiones doble (Uquillas, 2004).

2.1.4.2. Taxonomía

Moniliophthora roreri es un organismo del dominio *Eukaryota*, reino *Fungi*, filum *Basidiomycota*, clase *Basidiomycetes*, subclase *Agaricomycetidae*, orden *Agaricales*, familia *Tricholomataceae*, género *Moniliophthora* y especie *roreri* (Suárez & Hernández, 2010).

2.1.4.3. Ciclo de vida del patógeno

Las condiciones climáticas y la cantidad de esporas libres son factores determinantes en el ciclo de vida de *M. roreri*. El ciclo comienza con la estación seca, época en la que se encuentran la mayor cantidad de esporas disponibles en el ambiente. Sin embargo, para que inicie la infección es necesario que existan condiciones de humedad (Suárez & Hernández, 2010).

En Ecuador, el factor crítico en el ciclo de la enfermedad es la marcada estación seca y su importancia para determinar cómo *M. roreri* sobrevive entre cosechas y la disponibilidad de fuentes de inóculo al inicio de la estación húmeda (Evans, 1981).

En investigaciones adelantadas por el ICA entre 1960 y 1980 sobre etiología, epidemiología y control de la moniliasis, se resalta que los conidios sólo germinan en presencia de una película de agua, con mayor germinación cerca de los 24° C. En condiciones de laboratorio, las esporas que provienen de micelio esporulante, conservan la viabilidad y poder infectivo hasta 22 meses después de iniciar la esporulación (Suárez & Hernández, 2010).

La hifa infectiva del hongo penetra la epidermis del fruto, desde la cual se propaga inter e intracelularmente a los tejidos subepidermales y el exocarpo. La infección continúa a los tejidos centrales, incluyendo las semillas, e inicia el desarrollo de la necrosis desde la parte interna hacia la epidermis. Externamente, la infección aparece como puntos aceitosos muy pequeños y circulares, los cuales se convierten en lesiones (manchas) de color amarillo y marrón. El proceso desde la infección a la aparición de mancha tiene una duración aproximada de 60 ± 10 días, dependiendo de la susceptibilidad del clon de cacao. Entre 3 y 4 días, se desarrolla el micelio blanco sobre las lesiones y luego aparecen las esporas, las cuales confieren un color crema a marrón (Suárez & Hernández, 2010).

2.1.4.4. Sintomatología

En condiciones de campo, la enfermedad se ha encontrado sólo sobre frutos. Artificialmente se han logrado infecciones sobre plántulas y primeros estadios foliares (Evans, 2007). La penetración e infección puede ocurrir en cualquier fase de desarrollo del fruto, pero son más susceptibles durante los primeros estados. La susceptibilidad de los frutos es inversamente proporcional a su edad, es decir que a mayor edad menor susceptibilidad (Suárez & Hernández, 2010).

2.1.4.5. Epidemiología

La esporulación del hongo sobre la superficie del fruto es tan intensa que las nubes de esporas son liberadas y transportadas por el viento, la lluvia y en menor proporción por insectos (Evans, 1981).

Una mazorca esporulada ubicada a una altura aproximada de dos metros tiene un gradiente de dispersión, con capacidad de infección de 40%, de hasta una distancia de 20m (Merchán, 1981). Las condiciones óptimas para la maduración y penetración del hongo están alrededor de 25 °C y 85 % de humedad relativa. En tanto que tal nivel de esporulación sólo se observa durante pocas semanas después de su inicio, reduciéndose la cantidad de esporas producidas hasta aproximadamente diez semanas, cuando se torna casi insignificante. Las esporas pueden ser aisladas de los mismos frutos momificados, incluso después de un año de la infección, lo que es garantía de la oferta de inóculo durante ese tiempo (Evans, 1981).

2.1.5. Métodos de control

El control es una medida empleada para reducir, eliminar o llevar a niveles aceptables diferentes tipos de organismos vivos que pueden causar enfermedades en cultivos, por lo tanto, una estrategia de control es una combinación de varias medidas de intervención, en la cual se desarrollan diferentes técnicas metodológicas con el fin de mantener la sanidad vegetal del cultivo y, de esta manera, evitar que se propague una enfermedad (Tirado et al., 2016).

Los productos a base de oxiclورو de cobre (OC) han mostrado la mayor efectividad en el control de la enfermedad, pero los resultados, en la mayoría de los casos, son variables y antieconómicos comparados con el control cultural; sin embargo, en ensayos recientes se encontró similitud al comparar ambas prácticas. Otro hecho que limita el uso de los fungicidas es la baja rentabilidad del cultivo debido al bajo precio que alcanza el producto en el mercado, lo cual dificulta realizar un programa de aspersiones programadas de agroquímicos. Otra alternativa para el control de la enfermedad es la combinación de la poda de plantas a una altura de 4 metros y tumbar periódicamente las mazorcas aun cuando presenten estadíos incipientes de la enfermedad, la cual parece tener mayor probabilidad de adopción (Sánchez et al., 2003).

El control biológico ha despertado gran interés en detener los patógenos de plantas y es una respuesta al creciente uso de pesticidas químicos. Existe un grupo importante de hongos, bacterias, levaduras y actinomicetos que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos, acción que puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales (Suárez & Cabrales, 2008).

2.1.6. Variabilidad genética

Los hongos se caracterizan por poseer una mayor complejidad y diversidad que otros grupos de patógenos microscópicos. Por otra parte, la diversidad genética de los hongos permite identificar nuevos tipos de patógenos rápidamente en respuesta a una mayor resistencia en los cultivos. Se deduce que para una mejor comprensión de los mecanismos de patogenicidad y las fuentes de variación genética en patógenos de plantas la

comprensión de la variabilidad genética sea un factor crítico para el control futuro de enfermedades fúngicas (Talbout, 1998).

Los hongos poseen una variedad de mecanismos para introducir la variación genética en su ciclo de vida, ya sea durante la reproducción sexual o independientemente de ella (Wang & Szmidt, 2000). La variabilidad resultante es significativa por una serie de razones. Puede afectar el patógeno la relación con su huésped en muchos niveles, y la flexibilidad genética permite a los hongos adaptarse fácilmente a las condiciones ambientales cambiantes, incluida la introducción de nuevos huéspedes genotípicos.

La recombinación sexual es una de las fuentes más importantes de variabilidad, pero no es universal entre los hongos. Hasta un tercio de todos los hongos pueden tener las dos etapas la asexual (anamorfo) y la sexual (teleomorfo) (Culbertson & Ainsworth, 1972).

Muchos hongos fitopatógenos no tienen etapa sexual o etapa sexual que aún no se encuentran en la naturaleza (Brygoo et al., 1998). En un extremo del espectro están los hongos que están completamente asexual (por ejemplo, deuteromicetos) pero que sin embargo generan modificación de variación expresión genética o la adaptación de procesos mitóticos para producir recombinantes o segregantes como propágulos asexuales. En el otro extremo están las diversas formas de sexualidad, que van desde sistemas de incompatibilidad bipolar (unifactorial) a sistemas de incompatibilidad (bifactoriales), con tipos de apareamiento posiblemente en algunos organismos (Chiu & Moore, 1994).

2.1.7. Ecotipos

La especiación es el surgimiento de una nueva especie a partir de una población ancestral, que ocurre cuando una población se separa geográficamente del resto de la especie y evoluciona; entre otros factores que producen especiación están el tamaño de la población y su variabilidad genética (Monroy et al., 2014).

Se conoce como ecotipo a una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, a un ambiente particular o a un ecosistema definido, con límites de tolerancia particulares, a los factores ambientales locales. La adaptación a

un ecosistema o a un hábitat particular implica cambios genéticos que se establecen de acuerdo con los límites de tolerancia de las especies (Monroy et al., 2014).

2.1.8. Regiones ITS (Espacios de Transcripta Interna)

La región ITS consiste en las variables no codificadas que están localizadas entre las repeticiones ADN_r entre la altamente conservada pequeña subunidad, 5.8S, y los genes de la gran subunidad ARN_r, ITS1 e ITS2 que tienen un papel funcional, el cual explica el alto nivel de variación de secuencia entre ellos. ITS son ahora la región más secuenciable del genoma en hongos y ha sido explotado para explicar o inferir en afinidades filogenéticas de grupos relacionados (Lee & Taylor, 1992).

Según (Bridge & Arora, 1998) la región ITS es utilizada para estudios de caracterización molecular en hongos debido a que es una región relativamente corta (500 – 800 pb) y puede ser fácilmente amplificada por PCR utilizando solo pares de cebadores universales, que son complementarios para regiones conservadas entre los genes de la subunidad ARN_r. La naturaleza multicopia del ADN_r repetitivo hace que la región ITS sea fácil de amplificar, como se comprueba al secuenciar algunas cepas de *M. roreri*, donde los rangos van de 762–787–827 pb.

2.1.9. ERIC-PCR (Secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas)

Las secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC) son palíndromos imperfectos de 127 pb que se producen en copias múltiples en los genomas de bacterias entéricas y vibriones (Wilson & Sharp, 2006).

Las secuencias ERIC están sorprendentemente conservadas, lo que implica que han adquirido alguna función, tal vez relacionada con la estabilidad del ARNm. Las relaciones entre las copias dentro de *E. coli* son consistentes con un modo de generación de copia maestra. La inserción de nuevas copias parece ocurrir en la duplicación del dinucleótido timina y adenina (TA). Dos clases de insertos de aproximadamente 70 pb cada uno ocurren en diferentes sitios específicos dentro de las secuencias de ERIC; estos insertos evolucionan independientemente de las secuencias ERIC (Wilson & Sharp, 2006).

2.1.10. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

En respuesta a la necesidad de generar cultivos limpios, con tasas mínimas o nulas de agroquímicos que afecten la salud humana a largo plazo, se ha venido implementado el uso de los microorganismos benéficos del suelo, que pueden promover el crecimiento de las plantas y también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos (Pena & Reyes, 2007).

Estos son denominados PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal). Estos microorganismos pueden encontrarse en asociaciones simbióticas o de vida libre. Estos últimos están asociados a las partículas del suelo generando interacciones con las raíces de las plantas, en la zona de la rizosfera (Pena & Reyes, 2007).

Muchas de éstas han sido propagadas y usadas como inoculantes bacterianos, principalmente para mejorar la producción y el rendimiento de cultivos agrícolas. Las PGPR promueven el crecimiento vegetal mediante dos tipos de mecanismos: indirectos y directos, o una combinación de ambos (Shah, 2009).

Los mecanismos indirectos se caracterizan porque las PGPR ocasionan la disminución o eliminación de microorganismos fitopatógenos (hongos, bacterias y nematodos), a través de la producción de sustancias antimicrobianas, de sideróforos, de enzimas líticas, o una combinación de éstas; por competencia de nutrientes o de espacio en el nicho ecológico, así como por estimulación de las defensas naturales de la planta mediante mecanismos conocidos como Resistencia Sistémica Inducida (RSI) (Shah, 2009).

Esta última induce la resistencia de tejidos sistémicos al ataque por fitopatógenos mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles tales como ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno que son los que participan en la protección de las plantas a diferentes enfermedades (Shah, 2009).

Los mecanismos directos incrementan la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera al influir en el metabolismo de las plantas y mejorar su nutrición. Estos mecanismos son: fijación de nitrógeno; síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas),

vitaminas y enzimas; solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fosfato orgánico; oxidación de sulfuros; incremento en la permeabilidad de la raíz; producción de nitritos; acumulación de nitratos; y reducción de la toxicidad por metales pesados y de la actividad de la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Dobbelaere, Vanderleyden, & Okon, 2003). A este respecto, se ha propuesto que en el efecto que *Azospirillum* ejerce sobre la planta intervienen múltiples mecanismos que actúan simultánea y sucesivamente para promover el crecimiento vegetal (Bashan & Dubrovsky, 1996).

Estimulación directa: El metabolito producido por la bacteria es capaz de estimular el crecimiento del vegetal. A través de este mecanismo se desarrollan procesos tales como:

- **Fijación de nitrógeno.** Las leguminosas tienen la capacidad de establecer una asociación simbiótica con las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* comúnmente conocidas como *Rhizobius*. Estas bacterias inducen en la planta la formación de estructuras especializadas, denominadas nódulos, en donde se alojan como simbioses intracelulares y fijan nitrógeno atmosférico que es utilizado por la planta (Bach & Díaz, 2011). Por medio del manejo de los sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno (*Rhizobium-leguminosa*, *Frankiacasuarina*, *Anabaena-Azolla*) es posible contribuir al enriquecimiento de la fertilidad del suelo. Existen otras PGPR de vida libre capaces de reducir el nitrógeno atmosférico. Tal es el caso de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Beijerinckia*, entre otras. Todas ellas, además, poseen otros mecanismos tan o más importantes con los cuales aumentan la productividad de los cultivos (Bach & Díaz, 2011).

- **Producción de sustancias reguladoras del crecimiento.** El desarrollo vegetal se encuentra regulado por la acción de sustancias químicas que activan o inhiben determinados procesos fisiológicos. Estas sustancias se denominan fitohormonas, que se definen como reguladores producidos por las plantas y que a bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de éstas. Dentro de las fitohormonas que estimulan el crecimiento de las plantas se destacan las auxinas, las gibelinas y las citoquininas (Bach & Díaz, 2007). La respuesta a cada una de ellas está condicionada por factores externos e internos como la edad de la planta, el estadio fisiológico y las condiciones ambientales,

entre otras. Los mecanismos aún no están muy definidos ya que no hay un modo único de acción para cada sustancia (Bach & Díaz, 2011).

Estimulación indirecta: La estimulación es indirecta cuando la bacteria es capaz de liberar una o varias sustancias o metabolitos que intervienen en procesos que mejoran el crecimiento vegetal (Bashan & Holguin, 1998). Los mecanismos fundamentales de estimulación indirecta se pueden resumir en los siguientes:

- **Producción de sustancias que movilizan nutrientes (ácidos orgánicos, enzimas, aminoácidos, entre otras).** Estas sustancias son liberadas al medio y son capaces de movilizar elementos nutricionales como el hierro, el fósforo y el aluminio. Ejemplo de ello, lo constituyen las bacterias solubilizadoras de fósforo, las cuales a través de la secreción de ácidos orgánicos, solubilizan el fósforo mineral y mediante la acción hidrolítica de las enzimas fosfatasas, mineralizan el fósforo orgánico (Bashan & Holguin, 1998).
- **Producción de antibióticos.** La capacidad de las PGPR de generar sustancias antibióticas pueden producir dos efectos antagónicos entre sí: Los procesos inhibitorios que retardan el desarrollo y elongación de las raíces y los que aumentan el crecimiento por inhibición de patógenos (Bashan & Holguin, 1998).
- **Producción de Sideróforos.** Los sideróforos son sustancias de bajo peso molecular que tienen alta afinidad por el hierro. En condiciones de escasez de hierro, las bacterias productoras de estas sustancias, secuestran al elemento, convirtiéndolo en factor limitante para grupos de microorganismos patógenos hierro-dependiente (Bashan & Holguin, 1998).
- **Producción de sustancias que inducen la resistencia sistémica en algunas plantas.** Las bacterias PGPR amplifican el mecanismo de la planta para la defensa frente a diferentes enfermedades, fundamentalmente en aquellas que la tienen latente o de expresión lenta (Bashan & Holguin, 1998).

- **Síntesis de sustancias con actividad para el control de patógenos.** Síntesis de enzimas que hidrolizan la pared de algunos hongos que son patógenos y otras sustancias que controlan el desarrollo de plagas (Bashan & Holguin, 1998).

2.1.11. Utilización de las PGPR en la agricultura

La inoculación con bacterias beneficiosas proviene de finales del siglo XIX, donde la práctica de mezclar suelo inoculado de forma natural con semillas, se convirtió en un método recomendado para la inoculación de leguminosas en los Estados Unidos. Más tarde, se registró la primera patente (NITRAGIN) para inoculación de leguminosas con *Rhizobium sp.* y se desarrollaron productos con cepas de *Bacillus megaterium* y *Azotobacter sp.* En los años 70 ocurren los dos mayores descubrimientos relacionados con la tecnología de inoculación: Redescubrimiento del *Azospirillum* y la acción de los grupos de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, como agentes de control biológico (Bach & Díaz, 2011).

2.1.12. *Pseudomonas fluorescens*

Esta bacteria Gram negativo, se encuentra como saprófito en el suelo y es ampliamente conocido por ser una PGPR. Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no establecen una relación simbiótica con la planta.

Diversos son los compuestos producidos por las cepas de *P. fluorescens*. Dentro de los más estudiados se encuentran las fenazinas, el ácido cianhídrico involucrado en la supresión de la pudrición negra de la raíz del tabaco, pirrolnitrinas cuya actividad ha sido reportada sobre *Rhizoctonia solanii*, agente causal del volcamiento de plantas; pioluteorinas, que actúa contra *Phytium ultimum* y el 2,4- DAPG, un compuesto de tipo poliquétido cuya actividad controladora ha sido evidenciada sobre *Gaeumannomyces graminis*, responsable de enfermedades del trigo; *Fusarium oxysporum*, agente causal del marchitamiento del tomate y otros organismos como bacterias causales de la pudrición blanda de la papa e incluso nematodos que también afectan este cultivo (Schnider et al., 2000).

Otros compuestos del tipo de lipopéptidos cíclicos, producidos por esta especie, han sido descritos por su actividad antimicrobiana como la viscosinamida, las tensinas y la orfamida A, sin embargo poco se ha estudiado acerca de éstos (Picard & Bosco, 2007).

La utilización de *Pseudomonas fluorescens* ha permitido controlar varios géneros de hongos fitopatógenos tales como *Pythium* (Anjaiah et al., 1998), *Rhizoctonia* (Hill et al., 1994). Estos trabajos se han realizado en cultivos vegetales muy diversos tales como trigo, pepino, algodón, tomate, garbanzo, poroto, lechuga, girasol y remolacha azucarera.

2.1.13. *Bacillus sp*

Estos microorganismos se caracterizan por ser bacterias Gram positivas con forma bacilar, aerobias estrictos o anaerobias facultativas que en condiciones estresantes forman una endoespora central, que deforma la estructura de la célula. Esta forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas (Kokalis-Burelle et al., 2006).

2.1.14. *Acinetobacter sp.*

Acinetobacter 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 (Gerischer, 2008).

Acinetobacter es un microbio del suelo; sin embargo, estudios detallados sobre su papel en la promoción del crecimiento de las plantas no han sido reportados (Peix et al., 2009).

2.1.15. *Enterobacter sp*

Varias especies del género *Enterobacter* se sabe que interactúan y ejercen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas. El fomento del crecimiento de las plantas producido por el efecto 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 (Glick et al., 1999).

2.1.16. *Serratia marcescens*

S. marcescens, inhibe eficazmente el crecimiento de varios hongos fitopatógenos y suprime algunas enfermedades de los cultivos (Someya et al., 2004). *S. marcescens* produce antimicótico factores que incluyen enzimas líticas, como las quitinasas, y el prodigiosin del pigmento antibiótico (Okamoto et al., 1998). Prodigiosin es un antibiótico tripirrol (Bennett & Bentley, 2000) y se ha demostrado que inhibe de manera efectiva el crecimiento de fitopatógenos hongos (Okamoto et al., 1998). Este pigmento es por lo tanto uno de los más importantes factores antifúngicos producidos por *S. marcescens*.

2.1.17. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son productos de desecho de las bacterias que tienden a ser biosintetizados en la fase estacionaria de su cinética de crecimiento. Aunque se desconoce en la mayoría de los casos, la función del metabolito secundario, la bioactividad de estos compuestos ha sido explotada como medicamentos, veneno, agentes saborizantes en alimentos, fitohormonas y otros de aplicación industrial (Chaparro, 2010).

Numerosas bacterias producen antibióticos para asegurar su propia supervivencia. Algunos de estos antibióticos son inhibidores efectivos de fitopatógenos y desempeñan un papel importante en la biología y control de enfermedades de plantas (Someya et al., 2004).

Los metabolitos secundarios poseen las siguientes características:

- Son productos naturales elaborados por grupos microbianos pertenecientes a ciertas especies.
- Generalmente sintetizados como compuestos químicos con diversidad estructural, por ejemplo: Alcaloides, flavonoides, Benzoquinonas, glucósidos, tetraciclas, aminoazúcares, etc.

- Parece que no se encuentran relacionados con los procesos de las vías biosintéticas de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polímeros.
- En su mayoría son excretados al exterior, lo que puede estar relacionado con la eliminación de material toxico.
- Producción de compuestos estructurales de cubiertas fúngicas.
- Captación de minerales indispensables para otros microorganismos.
- La formación de señales de diferenciación (esporulación y acumulación de productos de reserva).
- La producción de elementos que contribuya a la colonización de espacio y nutrientes (antibióticos y toxinas) (Chaparro, 2010).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización de la investigación

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y 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

El proyecto de investigación fue de tipo experimental. Se realizó una caracterización a nivel morfológico y molecular de varios ecotipos del hongo *M. roreri* aislado de diferentes localidades del Ecuador considerando las condiciones climáticas y altura sobre el nivel del mar. Se procedió a realizar ensayos antagonistas a nivel *in vitro* hacia el control del hongo patogénico utilizando como biocontroladores Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (PGPR).

3.3. Método de investigación

Se empleó el método deductivo partiendo de información procedente de literatura y ensayos anteriores sobre caracterización de hongos y agentes antagonistas, para la identificación concreta de la más eficaz.

3.4. Fuentes de recopilación de información

Las fuentes empleadas para la obtención de información fueron de: revistas, publicaciones, libros e internet.

3.5. Material Genético

Se recolectaron mazorcas enfermas de cacao CCN-51 con síntomas externos de moniliasis (mancha parda y polvo blanco) para su posterior aislamiento en el laboratorio,

se obtuvieron 12 aislados de distintas ubicaciones de la costa y sierra ecuatoriana detalladas en la Tabla 1

Tabla 1. Zonas de recolección de muestras del hongo *M. roreri*

Zonas de Recolección de Muestras con sus alturas				Ubicación Geográfica	
Provincia	Cantón	Rango de alturas	Altura (m)	Coordenada	Código
Los Ríos	Zapotal		19	1°21'30.5"S 79°23'44.4"W	RZ-a
Los Ríos	Las Culebras	0-100	63	1°05'18.4"S 79°33'12.7"W	RCU-b
Los Ríos	La Cadena		84	0°56'20.7"S 79°25'00.4"W	RLC-c
Los Ríos	Buena Fe		98	0°52'03.6"S 79°29'18.6"W	RB-a
Manabí	La Catorce	100 - 250	138	0°35'25.0"S 79°31'11.7"W	MLC-b
Bolívar	Las Mercedes		210	1°16'10.0"S 79°19'19.3"W	BLM-c
Cotopaxi	Pujilí - La Maná		265	0°56'13.1"S 79°10'58.2"W	CPM-a
Sto. Domingo	Luz de América	250 - 350	304	0°24'18.0"S 79°18'10.0"W	SLA-b
Sto. Domingo	Km 23		326	0°23'56.8"S 79°17'36.2"W	Sk23-c
Sto. Domingo	Km 30		376	0°21'56.8"S 79°15'46.2"W	Sk30-a
Sto. Domingo	La Susanita	350 - 600	403	0°24'05.7"S 79°17'46.5"W	SLS-b
Sto. Domingo	Sto. Domingo		518	0°18'46.1"S 79°13'43.5"W	SD-c

Para los estudios *in-vitro* se utilizaron PGPR de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Bacillus* obtenidos del banco de cepas de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (Chávez, 2016).

Tabla 2 Banco de cepas bacterianas UTEQ (Caracterización morfológica)

Cepas	Fluorescente	Proteasa	HCN	Pirrolnitrina	Catalasa
<i>A. viviani</i> BMR 2-12	+			+	+
<i>S. marcescens</i> PM 3-8	++	+	+		+
<i>E. asburiae</i> PM 3-14	++	+	+	+	+
<i>P. protegens</i> , cepa CHA0	++		++		+
<i>P. veronii</i> R4	++		+	+	+
<i>B. subtilis</i> ATCC 55405					+

3.6. Materiales y equipos

3.6.1. Material de laboratorio

- Puntas amarillas 5-200 uL. Pk/1000
- Papel toalla
- Microtubos 1.5 mL. Pk/1000
- Puntas azules 1000 uL. Pk/1000
- Tubo PCR individual 0.2 mL. Cs/1000.
- Cajas monopenetri
- Botella Para Esterilización De 500 ML
- Guantes quirúrgicos talla M
- Vasos de precipitación
- Papel Parafilm
- Papel aluminio
- Juego de micro-pipetas (5 unidades: 1000 uL, 200 uL, 20 uL, 5 uL, 2uL)
- Kit de extracción de ADN, PureLink® Genomic DNA.
- Kit de purificación de PCR Invitrogen.

3.6.2. Material de oficina

- Cuaderno
- Computador
- Lapiceros
- Cinta masquin
- Resma de Hojas A4
- Cartuchos de impresora
- USB pendrive
- Regla de 30cm
- Marcador
- Impresora
- Calibrador vernier

3.6.3. Equipos de Laboratorio

- Nevera de -20
- Balanza 0.001 g
- Termociclador
- Espectrofotómetro
- Campana extractora de gases
- Cámara fotográfica
- UV transiluminador
- Baño María
- Centrífuga
- Congelador
- Vortex
- Caja electroforética

- Microondas
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Agitador
- Estufa
- Destilador de agua

3.6.4. Reactivos

- PDA (Papa Dextrosa Agar)
- Extracto de levadura
- Extracto de malta
- Agar
- Buffer 1x
- Blue Juice
- Bromuro de Etidio
- Partidores (ITS4; ITS5)
- DNTPs
- Agua Ultra pura
- Cl Mg₂
- Buffer PCR 10

3.7. Diseño de la investigación

En esta investigación se aplicó un diseño completamente al azar DCA. Todas las variables estudiadas fueron sometidas al análisis de varianza (ADEVA). Se estableció las diferencias estadísticas entre las medias para la caracterización morfológica mediante la prueba de Tukey y para los ensayos antagonistas Duncan al 95% de probabilidad. El procesamiento de datos fue llevado al programa estadístico Infostat.

a) Diseño para la caracterización morfológica del hongo *Moniliophthora roreri*.

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para la caracterización morfológica del hongo *M. roreri* generando 12 zonas a evaluar cada una con 3 unidades experimentales realizando 4 repeticiones.

Tabla 3 Esquema del ADEVA para la caracterización morfológica

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	36
Tratamientos	11
Total	47

b) Diseño para la evaluación *in-vitro* de ensayos antagonistas (sobrenadantes – bacterias) del crecimiento micelial del hongo *Moniliophthora roreri*.

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de las PGPR al desarrollo micelial del hongo *M. roreri* generando 7 tratamientos de 4 repeticiones cada uno con dos unidades experimentales.

Tabla 4 Esquema del ADEVA para los ensayos antagonistas de crecimiento micelial

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	21
Tratamientos	6
Total	27

c) Diseño para la evaluación *in-vitro* de ensayos antagonistas (sobrenadantes – bacterias) de producción de esporas del hongo *Moniliophthora roreri*.

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de las PGPR al porcentaje de inhibición de producción de esporas en el hongo *M. roreri* generando 7 tratamientos de 4 repeticiones cada uno con dos unidades experimentales.

Tabla 5 Esquema del ADEVA para los ensayos antagonistas a la producción de esporas

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	21
Tratamientos	6
Total	27

3.8. Manejo del experimento

3.8.1. Creación del banco de germoplasma

3.8.1.1. Aislamiento de *M. roreri* de cultivos nativos de cacao CCN-51.

Se recolectaron muestras de mazorcas enfermas de Cacao CCN-51 de 4 pisos altitudinales (3 sitios por cada piso) pertenecientes a las provincias de: Cotopaxi, Los Ríos, Bolívar, Santo Domingo de los Tsáchilas, y Manabí. Las muestras de mazorca fueron almacenadas en fundas plásticas y puestas en una hielera cooler para su transporte al laboratorio.

Para la recuperación del patógeno se procedió a realizar por el protocolo descrito por Evans (1981) con modificaciones, las muestras recolectadas se les realizó un triple lavado con agua estéril y alcohol para su desinfección, se procedió a hacer un corte en la epidermis y del interior del fruto extrajeron segmentos de 0.2 *0.2cm en el área de corcho en las mazorcas enfermas.

Las muestras de tejido se inocularon en cajas monopetri de cuatro porciones de tejido infectado en medio PDA con antibióticos (estreptomicina – cloranfenicol) para luego ser incubadas por 15 días a 28 °C para el desarrollo completo de la colonia.

a) Conservación de los aislados de *Moniliophthora roreri*

Se realizaron dos tipos de almacenamiento para la conservación de los aislados de *M. roreri*.

- Conservación en criotubos

Se ubicaron discos de 3mm del hongo en criotubos contenidos de medio de cultivo sólido PDA (Papa Dextrosa Agar), dejándolo crecer durante 5 días a una temperatura de 18 °C en incubadora, y se procedió a agregarle 400 uL de Glicerol a cada tubo para después ponerlos a -40 °C.

- Conservación en tubos de ensayo

Se ubicó un disco del hongo en tubos de ensayo de 10mL contenidos de medio de cultivo sólido PDA (Papa Dextrosa Agar), dejándolos crecer por 10 días a una temperatura de 18 °C en incubadora, colocándolos en una refrigeradora a -4 °C para su conservación.

3.8.2. Caracterización morfológica de *Moniliophthora roreri*

Para la caracterización morfológica se analizaron diferentes variables de las colonias del hongo.

- Crecimiento radial

Para medir el crecimiento radial del hongo se sembraron muestras en cajas mono-petri en un medio PDA encubados a 28 °C, se realizarán tres evaluaciones a los 5, 10 y 15 días para cada colonia aislada (3 por cada piso altitudinal).

- Análisis de color, borde y textura

Las 12 colonias del hongo fueron evaluadas periódicamente en base a características morfológicas como color y borde de las colonias, tipo de micelio (textura) y su crecimiento, realizando 4 repeticiones por cada aislamiento. El parámetro de color fue calificado siguiendo lo especificado en trabajos realizados por Phillips-Mora (2006), en el que describe los colores de las colonias de *M. roreri*.

Tabla 6 Rango de colores para evaluar la morfología colonial de los hongos.

Número	Color
1	café claro
2	café claro – blanco
3	café oscuro - café claro – blanco
4	crema- café oscuro - café claro – blanco
5	café oscuro – blanco

6	café oscuro - crema – blanco
7	crema- café claro- blanco

- Tamaño y número de esporas

Para el tamaño y número de esporas, se realizó un raspado de la muestra y se colocó 10 mL de agua destilada estéril en la caja petri, se vertió una gota de TWEEN 20 y con un asa drigalski se procedió extraer el micelio. Se recolectó 1mL de la solución y se filtró las esporas por una gaza estéril para la separación del micelio. Se colocó 20 uL de lo filtrado en la cámara NEUBAUER y se lo observó por medio del microscopio OLYMPUS 40x.

- Actividad metabólica

Para la actividad metabólica del hongo se sembraron pequeños discos de agar con micelio del hongo en tubos de ensayos con medio de cultivo PDA, se tomaron datos del peso inicial de cada tratamiento y después de 15 días se tomó el peso final mediante una balanza analítica.

3.8.3. Caracterización molecular de *Moniliophthora roreri*

3.8.3.1. Extracción de ADN de *Moniliophthora roreri*

Muestras del hongo de 4mm de radio se inocularon en medio líquido Caldo de Papa Dextrosa y se lo dejó a 165 rpm por 10 días hasta obtener un considerable crecimiento micelial, se recuperó la parte sólida y se lo pasó a un tubo de 1.5mL, se pesó 400 mg de la muestra para proceder a la extracción del ADN mediante el kit QIAGEN-Start Protocol, las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

3.8.3.2. Caracterización e identificación molecular de *Moniliophthora roreri* mediante ITS

Para la identificación del hongo se realizó una PCR previamente obtenido el ADN mediante el kit QIAGEN-Start Protocol empleando como cebadores ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White, Bruns, & y Taylor, 1990), que se anclan en los ADNr 25 S y 18 S, respectivamente, por lo que incluyen también el 5.8 S (Contreras, 2015).

La PCR se la realizó en tubos de 1.5 mL con un volumen final del mix de 20 uL que contienen: Agua 9.7 uL Ultra pura, Partidores: 1 uL ITS4 (forward), 1 uL ITS5 (reverse), 5 uL Buffer 10x, 1 uL DNTPs, 0.3 uL de Taq Polimerasa y 2 uL de ADN.

Las muestras fueron puestas en un termociclador con las condiciones siguientes: un ciclo inicial a 95 °C por 5 minutos (desnaturalización); 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto (segunda desnaturalización), para el alineamiento del primer 60 °C por 1 minuto, hibridación del ADN 72 °C por 1 minutos.

Se observaron las muestras en un gel de agarosa al 1.5% mediante electroforesis por 30min teñidas con bromuro de etidio 2 uL donde se obtuvieron productos de amplificación de 600 a 750pb.

3.8.3.3. Caracterización molecular mediante ERIC-PCR

Para la caracterización de los diferentes aislados se realizó una PCR previamente obtenido el ADN mediante el kit QIAGEN-Start Protocol empleando como cebadores ERIC1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'); ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Louws et al. 1994).

La PCR se la realizó en tubos de 1.5 mL con un volumen final del mix de 20 uL que contienen: Agua 9.7 uL Ultra pura, Partidores: 1 uL ERIC1R (forward), 1 uL ERIC2 (reverse), 5 uL Buffer 10x, 1 uL DNTPs, 0.3 uL de Taq Polimerasa y 2 uL de ADN.

Las muestras fueron puestas en un termociclador con las condiciones siguientes: un ciclo inicial a 94 °C por 3 minutos (desnaturalización); 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto (segunda desnaturalización), para el alineamiento del primer 37 °C por 2minuto, hibridación del ADN 72 °C por 2 minutos.

Se observaron las muestras en un gel de agarosa al 2.5% mediante electroforesis por 3 horas teñidas con bromuro de Etidio 2uL donde se obtuvieron varios productos de amplificación que varían en peso desde 100 a 1500 bp.

3.8.3.4. Agrupamiento filogenético.

Para el agrupamiento genético mediante ERIC PCR se realizó un análisis de los perfiles de información binaria de (1 y 0) generados por los productos de amplificación.

De la recuperación de bandas de los ITS se mandó a secuenciar a MACROGEN Corea. Las secuencias de los ITS se compararon con la base de datos de GenBank de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), empleando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método UPGMA. El árbol filogenético se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Kimura 2-parámetro y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 6.0.

3.8.4. Ensayos antagonistas

3.8.4.1. Obtención de las PGPR con actividad antagonista.

Se recuperó 5 µl de los aislados bacterianos y se los incubó en medio King-B líquido por 24 h a 28 °C en agitación de 150 rpm. Se recuperó 0,6 mL del crecimiento bacteriano y se ubicó en un medio de PDA con 14,4 mL a una concentración del 4 % se las incubó por 18h a 28 °C, para la distribución homogénea en el medio de cultivo.

3.8.4.2. Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y producción de esporas del hongo *Moniliophthora roreri*

Se ubicó 1 disco de agar de 6 mm de diámetro con micelio del hongo *M. roreri* en cajas monopetri con 50% de PDA y 50% de King-B y a su lado se colocó un disco de agar con la bacteria. Se realizó un tratamiento testigo solo sembrando el hongo.

La evaluación se la realizó a los 5, 10 y 15 días, midiendo el porcentaje de inhibición desde el borde del tarugo hasta el crecimiento del hongo mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{crecimiento del testigo} - \text{crecimiento del tratamiento}}{\text{crecimiento del testigo}}$$

Para el conteo de esporas se colocó 10 mL de agua destilada estéril en la caja petri donde se desarrolló el hongo, se vertió una gota de TWEEN 20 y con un rastrillo y se raspará el micelio contenido en la caja petri. Se recolectó 1mL de la solución y se filtraran las esporas por una gaza estéril para la separación del micelio. Se colocará 20 uL de lo filtrado en la cámara NEUBAUER y se lo observó en el microscopio OLYMPUS para su conteo. Se determinó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\# \text{ de esporas del testigo} - \text{número de esporas del tratamiento}}{\# \text{ de esporas del testigo}}$$

3.8.4.3. Obtención de sobrenadantes de PGPR con actividad antagonista.

Las bacterias crecieron en 50 mL de medio de cultivo líquido King B y a 150 rpm por 48 h, se centrifugó en tubos falcon de 15mL a 300 x g por 3 min. Se descartó el pellet y solo se recuperó el sobrenadante, por triplicado.

El sobrenadante obtenido en tubos eppendorf de 1.5mL y se lo centrifugó a 10 x g por 3 min. Se filtró la muestra empleando Nalgane Syringe de 0.2 um y fueron sometidos a un choque termino de 15 min a 90 °C y 15 min a -40 °C.

3.8.4.4. Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y producción de esporas del hongo *M. roreri*

Para la evaluación del crecimiento micelial se colocó 9.8 mL de medio sólido PDA en cajas monopetri se lo dejó solidificar y se agregó 0.2 mL del sobrenadante de PGPR, se colocó un tarugo del hongo de *M. roreri* incubado a 28°C de 1cm de diámetro sobre el medio dejando como testigo a un tratamiento sin el sobrenadante.

La evaluación se la realizó a los 5, 10 y 15 días, midiendo el porcentaje de inhibición desde el borde del tarugo hasta el crecimiento del hongo mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{crecimiento del testigo} - \text{crecimiento del tratamiento}}{\text{crecimiento del testigo}}$$

Para el conteo de esporas se colocó 10 mL de agua destilada estéril en la caja petri donde se desarrolló el hongo, se vertió una gota de TWEEN 20 y con un rastrillo se extrajo el micelio contenido en la caja petri. Se recolectó 1mL de la solución y se filtraron las esporas por una gaza estéril para la separación del micelio. Se colocó 20 uL de lo filtrado en la cámara NEUBAUER y se observó en el microscopio OLYMPUS para su conteo. Se determinó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\# \text{ de esporas del testigo} - \text{número de esporas del tratamiento}}{\# \text{ de esporas del testigo}}$$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtener un banco de germoplasma de cepas de *Moniliophthora roreri*.

4.1.1. Banco de germoplasma

Se generó un banco de germoplasma obtenido de diferentes ubicaciones geográficas, teniendo como punto de clasificación los pisos altitudinales, obteniendo 3 cepas por cada ecotipo con su debida codificación.

Zonas de Recolección de Muestras con sus alturas				Ubicación Geográfica		Características agroclimáticas		Identidad a la Base de datos de NCBI en GenBank			
Provincia	Cantón	Rango de alturas	Altura (m)	Coordenada	Código	Temperatura Promedio °C	Humedad relativa %	Organismo	Cepa	Identidad	Número de Acceso
Los Ríos	Zapotál		19	1°21'30.5"S 79°23'44.4"W	RZ	27	61	<i>Moniliophthora roreri</i>	57_1N24	83%	KY859404.1
Los Ríos	Las Culebras	0-100	63	1°05'18.4"S 79°33'12.7"W	RCU	29	61	<i>Moniliophthora roreri</i>	Mg_florum	99%	EU047937.1
Los Ríos	La Cadena		84	0°56'20.7"S 79°25'00.4"W	RLC	29	82	<i>Moniliophthora roreri</i>	Mg_florum	99%	EU047937.2
Los Ríos	Buena Fe		98	0°52'03.6"S 79°29'18.6"W	RB	30	60	<i>Moniliophthora roreri</i>	HT-ITV20	96%	JN241966.1
Manabí	La Catorce	100 - 250	138	0°35'25.0"S 79°31'11.7"W	MLC	30	56	<i>Moniliophthora roreri</i>	magdiel	99%	GU108605.1
Bolívar	Las Mercedes		210	1°16'10.0"S 79°19'19.3"W	BLM	24	78	<i>Moniliophthora roreri</i>	E18	100%	JX315286.1
Cotopaxi	Pujilí - La Maná		265	0°56'13.1"S 79°10'58.2"W	CPM	22	62	<i>Moniliophthora roreri</i>	HT-ITV20	93%	JN241966.1
Sto. Domingo	Luz de América	250 - 350	304	0°24'18.0"S 79°18'10.0"W	SLA	27	64	<i>Moniliophthora roreri</i>	MRO1	92%	JF769489.1
Sto. Domingo	Km 23		326	0°23'56.8"S 79°17'36.2"W	Sk23	27	64	<i>Moniliophthora roreri</i>	C5	100%	JX315274.1
Sto. Domingo	Km 30		376	0°21'56.8"S 79°15'46.2"W	Sk30	27	64	<i>Moniliophthora roreri</i>	E18	100%	JX315286.1
Sto. Domingo	La Susanita	350 - 600	403	0°24'05.7"S 79°17'46.5"W	SLS	27	64	<i>Moniliophthora roreri</i>	HT-ITV20	100%	JN241966.1
Sto. Domingo	Sto. Domingo		518	0°18'46.1"S 79°13'43.5"W	SD	27	64	<i>Moniliophthora roreri</i>	GU4	100%	GU457437.1

Tabla 7 Banco de germoplasma de los aislados del hongo *Moniliophthora roreri*.

4.2. Caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. roreri*.

4.2.1. Crecimiento micelial

El desarrollo micelial del hongo se verificó en los 5, 10, y 15 días para las cepas provenientes de los pisos altitudinales, observando diferencias en su cinética de crecimiento. El crecimiento radial de las cepas de *M. roreri* proveniente de la región MLC presentó el mayor crecimiento micelial con 7, 21, 35 mm a los 5, 10 y 15 días. En contraste las cepas (RZ; RCU; RLC; BLM; CPM; SLA; SK23; SK30; SLS; SD) sus valores oscilan entre 8 a 5mm; 20 a 14mm; 32 a 25 mm a los 5, 10 y 15 días respectivamente. En la cepa RB se observó menor crecimiento micelial a 15 días con un promedio de 23mm.

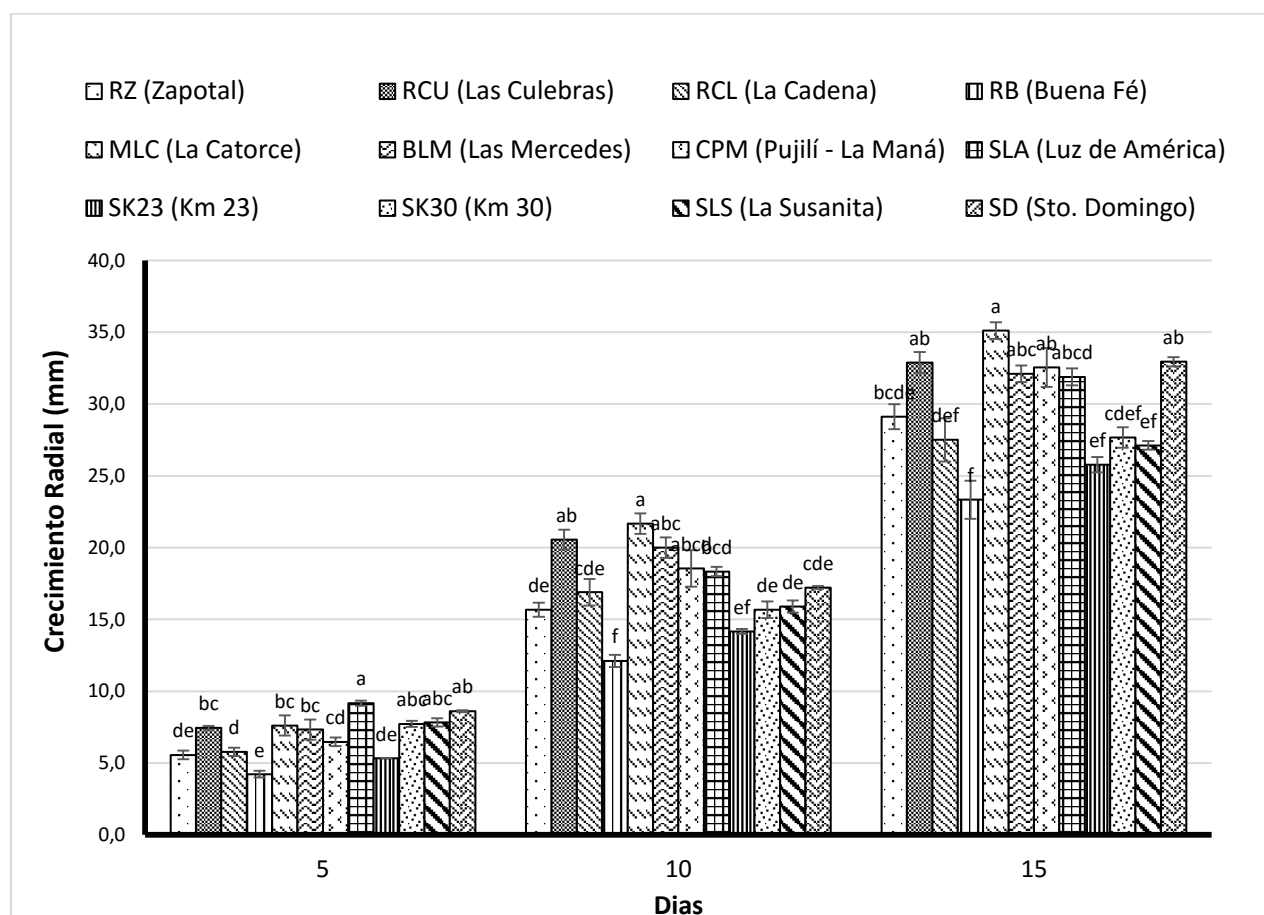


Figura 1. Crecimiento radial de los aislados de *Moniliophthora roreri*. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.2.2. Número de esporas

De las cepas empleadas en la evaluación del crecimiento micelial se realizó el conteo de esporas dando como resultado diferencias significativas entre ellas. La cepa proveniente a MLC se observó el mayor promedio en producción de esporas de 8.1×10^7 a los 15 días de evaluación. En contraste con las cepas (RZ; RCU; RLC; BLM; CPM; SLA; SK23; SK30; SLS; SD) la producción de esporas oscila entre 5.5×10^7 a 2.7×10^7 , donde la cepa RB de menor promedio en producción de esporas 5.5×10^6 a los 15 días.

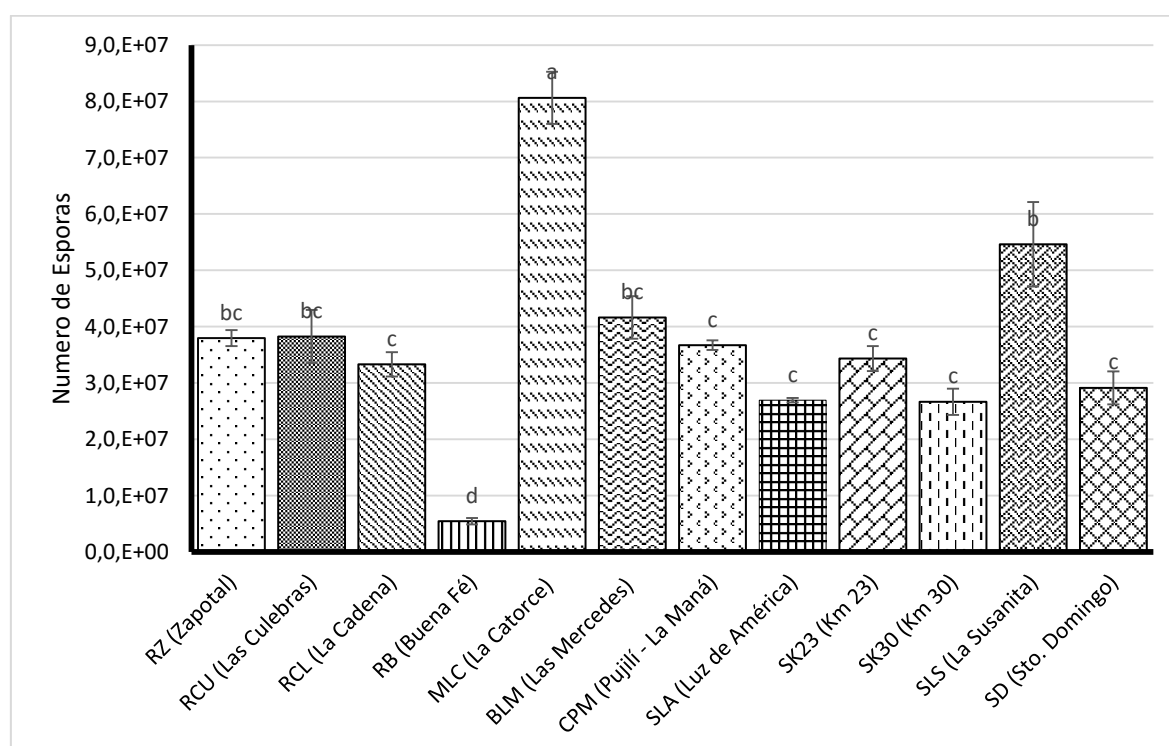


Figura 2. Número de esporas de los aislados de *M. roreri*. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.2.3. Tamaño de esporas

El tamaño de spora es una de las variables a considerar dentro de las características morfológicas de las cepas de *M. roreri* verificando el área de las esporas de los 12 aislados encontrando que no hay diferencias significativas para las cepas evaluadas. Lo que hace referencia que el tamaño de esporas no proporciona información idónea para una diferenciación entre cepas.

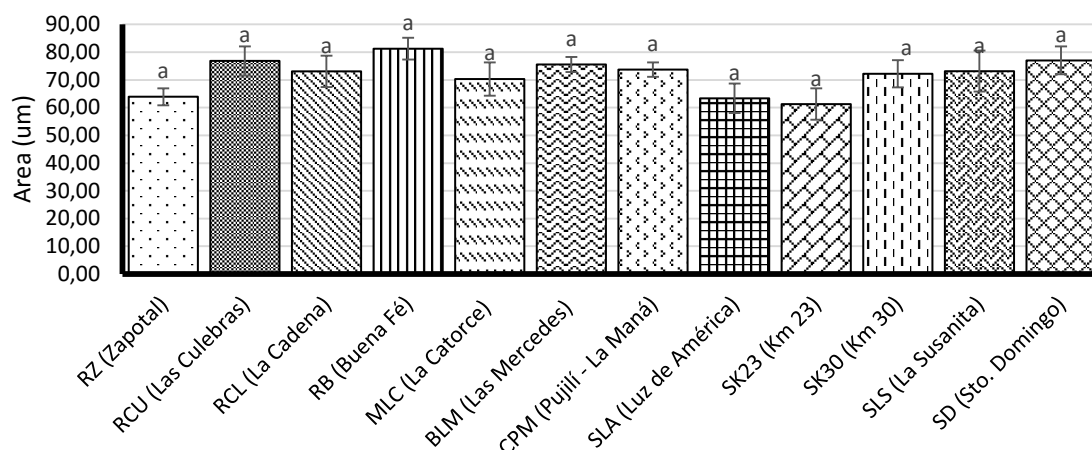


Figura 3. Tamaño de esporas de los aislados de *M. roreri*. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.2.4. Actividad metabólica

La actividad metabólica al consumo del medio de cultivo por las cepas de *M. roreri*. La cepa proveniente de MLC se observó el mayor consumo del medio de cultivo 3.15 gr a 15 días. En contraste con las cepas provenientes de los aislados (RZ; RCU; RLC; BLM; CPM; SLA; SK23; SK30; SLS; SD) con el consumo del medio de cultivo de 2,8 a 2,4gr observando el menor consumo de 2.3 gr por la cepa RB.

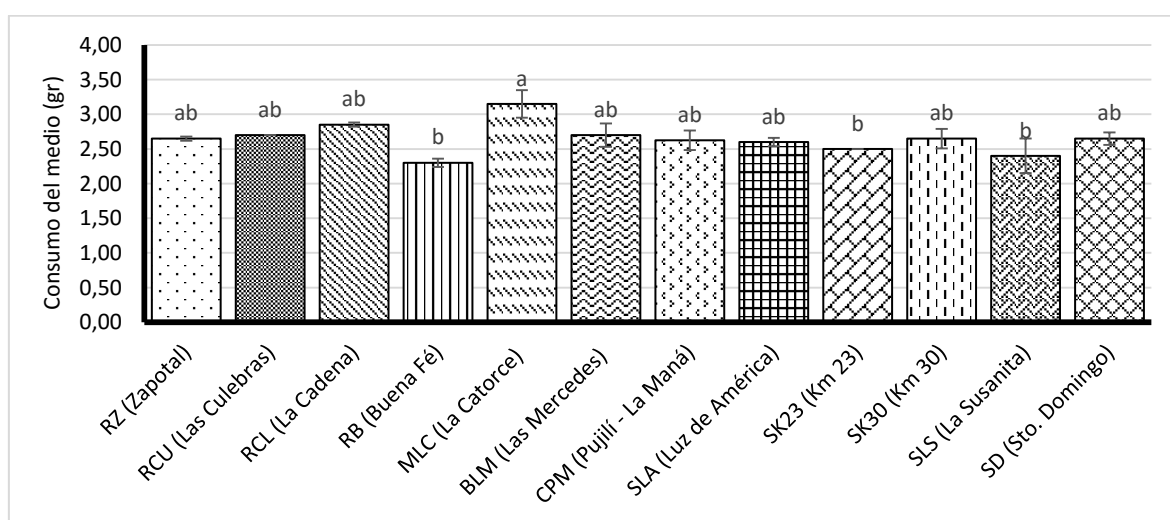


Figura 4. Actividad metabólica de los aislados de *Moniliophthora roreri*. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.2.5. Borde, textura y color.

Las características a morfología de la colonia de los 12 aislados de *M. roreri* presentaron borde regular y una textura polvorienta. El análisis realizado para el color de la colonia las cepas (RZ; RCU; MLC; RLC; BLM; CPM; SLA; SK23; SK30; SLS; SD) se clasificaron dentro del rango de colores 6 (café oscuro – crema – blanco) descrito por (Phillips-Mora, 2006) a diferencia del aislado RB que presentó tonalidades (café claro – blanco) (Figura 5)

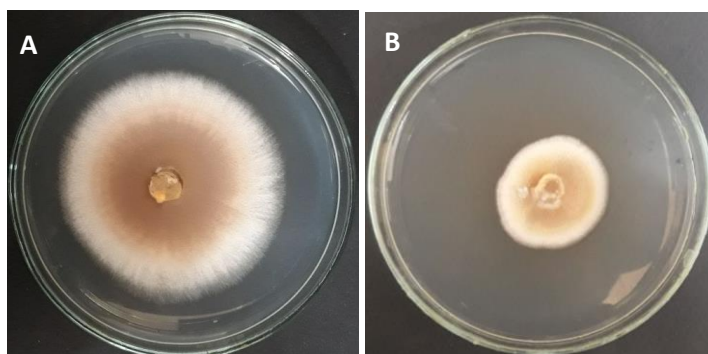


Figura 5. Colonia pura del Hongo *M. roreri*. A, café oscuro – crema – blanco; B, café claro – blanco.

4.2.6. Análisis de componentes principales.

El análisis de componentes principales se obtuvo como resultado cinco componentes, donde dos de ellos explican el mayor porcentaje de las variables evaluadas. En el componente 1 las variables con mayor porcentaje de contribución fueron: altura 23%, actividad metabólica 18%, temperatura 22% y humedad relativa 19%. Para el componente 2 las variables con mayor contribución fueron; número de esporas 12%, crecimiento 35%, actividad metabólica 15%, temperatura 14% y humedad 12%. En ambos componentes la variable que presento menor porcentaje fue tamaño de esporas. Mediante el análisis de componentes principales se observa que la cepa MLC muestra características de mayor porcentaje en crecimiento micelial, actividad metabólica y número de esporas, a lo que se le puede atribuir su agresividad (Figura 6).

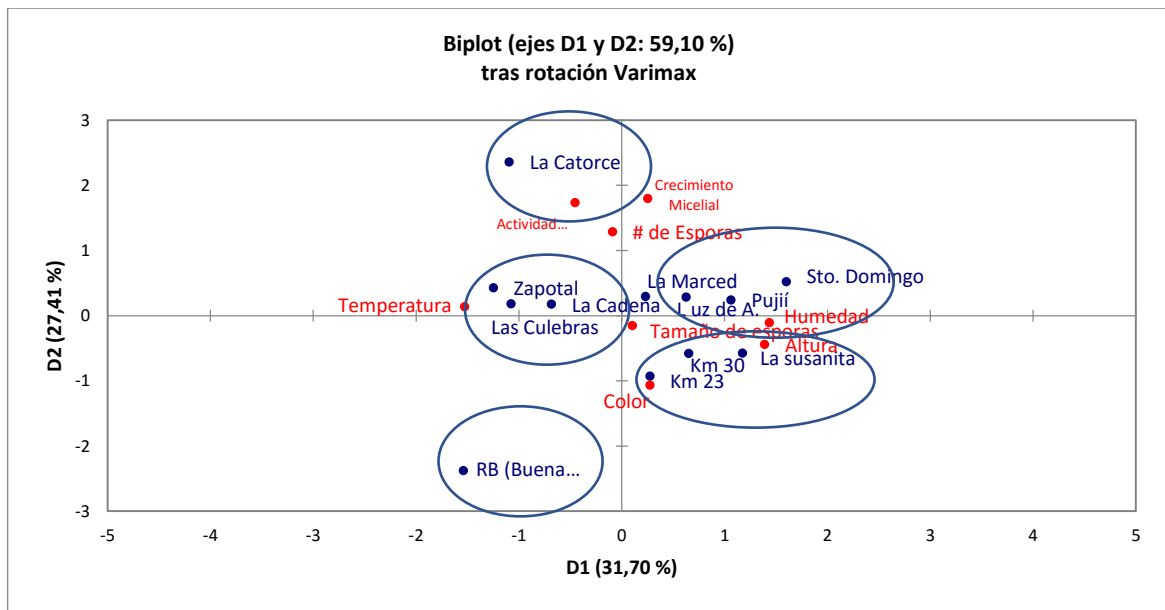


Figura 6. Análisis de componentes principales. Biplot obtenido del análisis de componentes principales para la caracterización morfológica y características agroclimáticas.

4.2.7. Triángulo de la enfermedad del aislado con características más agresivas.

De las 12 cepas *M. roreri* se determinó el índice de agresividad, considerando características el mayor crecimiento radial en días, numero de esporas, tamaño de esporas y actividad metabólica. Al cumplir con estas características se concluye que la cepa MLC se considera la cepa más agresiva. En el gráfico se muestran las condiciones favorables para el desarrollo del aislado proveniente de “La Catorce” (Figura 7)

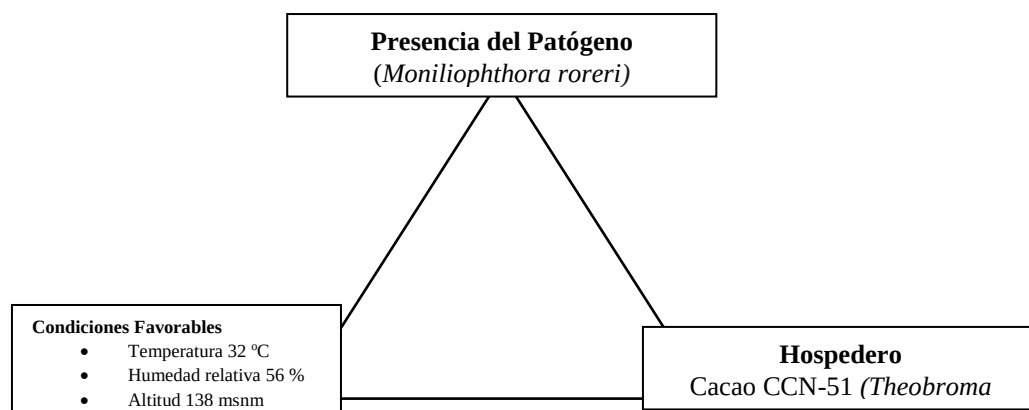


Figura 7. Triángulo de la enfermedad del hongo *M. roreri* proveniente de “La Catorce”

4.2.7. Distribución geográfica de los 12 ecotipos de *M. roreri*.

El mapa muestra la ubicación geográfica de los 12 aislados de *M. roreri*. La cepa “La Catorce” presentó los mayores promedios para crecimiento radial, actividad metabólica, número de esporas y tamaño de esporas, por lo que fue considerada como la más agresiva (Figura 8).

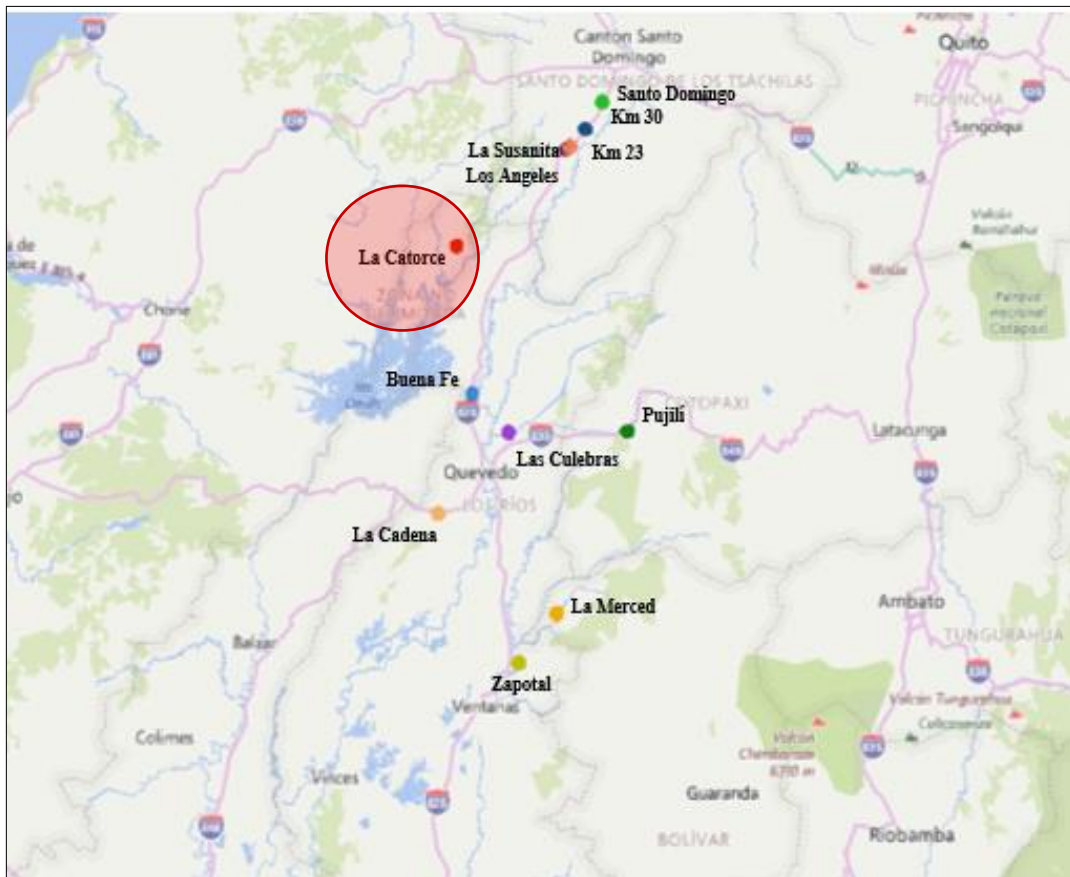


Figura 8. Mapa geográfico de los sitios de recolección de *M. roreri* en el Ecuador

4.2.8. Identificación molecular del hongo *Moniliophthora roreri* mediante ITS (Espacios de transcripto interno).

El ADN genómico de los 12 aislados dieron positivo para *M. roreri* con un producto de amplificación de 700bp, que corresponde al segmento ITS4 e ITS5 (Figura 9). La cepa RZ muestra una diferenciación en el número de pares de bases de 740 bp a diferencia de los

demás aislados (RCU, RLC, RB, MLC, BLM, CPM, SLA, SK23, SK30, SLS, SD) que mostraron un producto de amplificación de 700 bp.

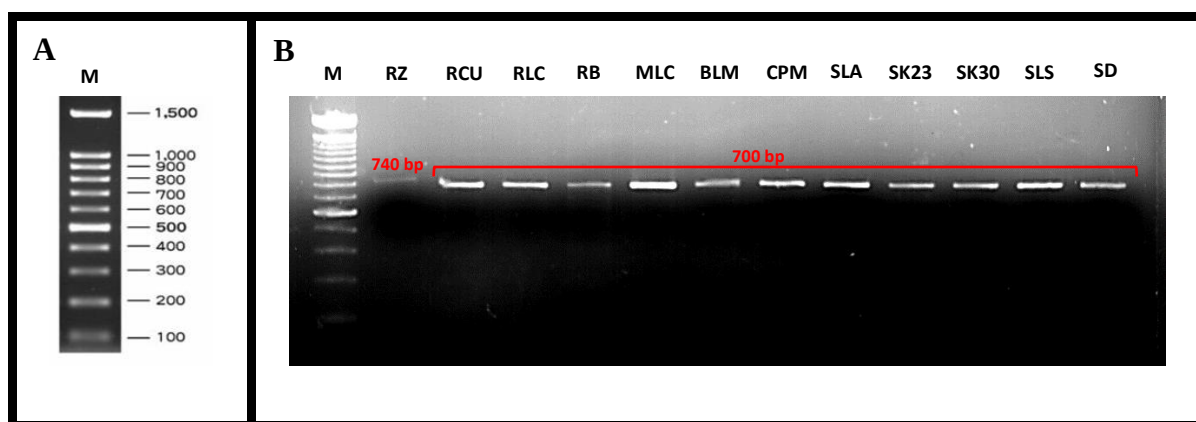


Figura 9. Identificación de Molecular de *Moniliophthora roreri* mediante PCR. A, Ladder 100pb. B, Identificación de Molecular de *Moniliophthora roreri*; Carril M, Marcador de peso molecular; **RZ** (Zapotol); **RCU** (Las Culebras); **RLC** (La Cadena); **RB** (Buena Fe); **MLC** (La Catorce); **BLM** (La Merced); **CPM** (Pujilí); **SLA** (Luz de América); **SK23** (Kilómetro 23); **K30** (Kilómetro 30); **SLS** (La Susanita); **SD** (Sto. Domingo).

4.2.9. Caracterización molecular mediante marcadores ERIC – REP PCR

La caracterización molecular por ERIC-PCR al ADN genómico de los 12 aislados de *M. roreri* generó un total de 11 bandas que varían en tamaño desde 100 a 1500 pb (Figura 10), mediante la comparación visual de bandas patrones revelaron 6 perfiles distintos entre los 12 aislados evaluados.

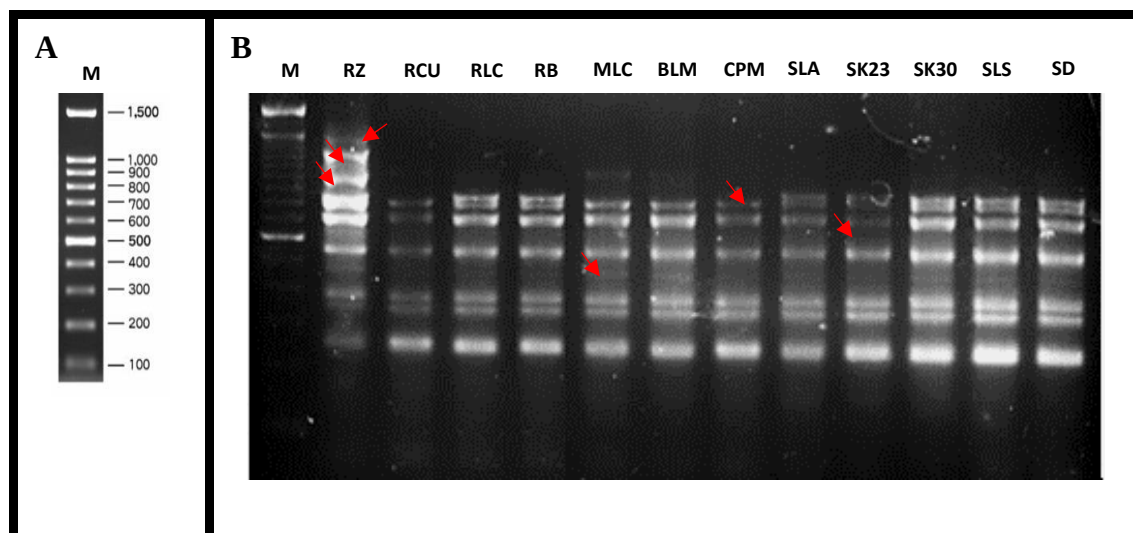


Figura 10. Caracterización molecular de *M. roreri* mediante ERIC-PCR. A, Ladder 100pb. B, Identificación de molecular de *M. roreri*; Carril M, Marcador de peso molecular; **RZ** (Zapotal); **RCU** (Las Culebras); **RLC** (La Cadena); **RB** (Buena Fe); **MLC** (La Catorce); **BLM** (La Merced); **CPM** (Pujilí); **SLA** (Luz de América); **SK23** (Kilometro 23); **K30** (Kilometro 30); **SLS** (La Susanita); **SD** (Sto. Domingo).

4.2.10. Agrupamiento filogenético de *Moniliophthora roreri* para la determinación de la biodiversidad de ecotipos mediante ERIC-PCR.

El análisis de agrupamiento produjo un dendrograma con tres grupos de los 12 aislados de *M. roreri* (Grupo I, II y III) (Figura 11).

El grupo I reúne dos subgrupos el A que agrupó las muestras pertenecientes a las regiones (RB; SLS; SD; SK23; SLA) y B (RLC; SK30; MLC; BLM) con 48 y 32% de similitud genética respectivamente. El grupo II muestra un subgrupo C con las cepas (RCU y CPM) con 78% de similitud genética. En el grupo III solo se muestra la cepa RZ que se encuentra en el menor rango altitudinal.

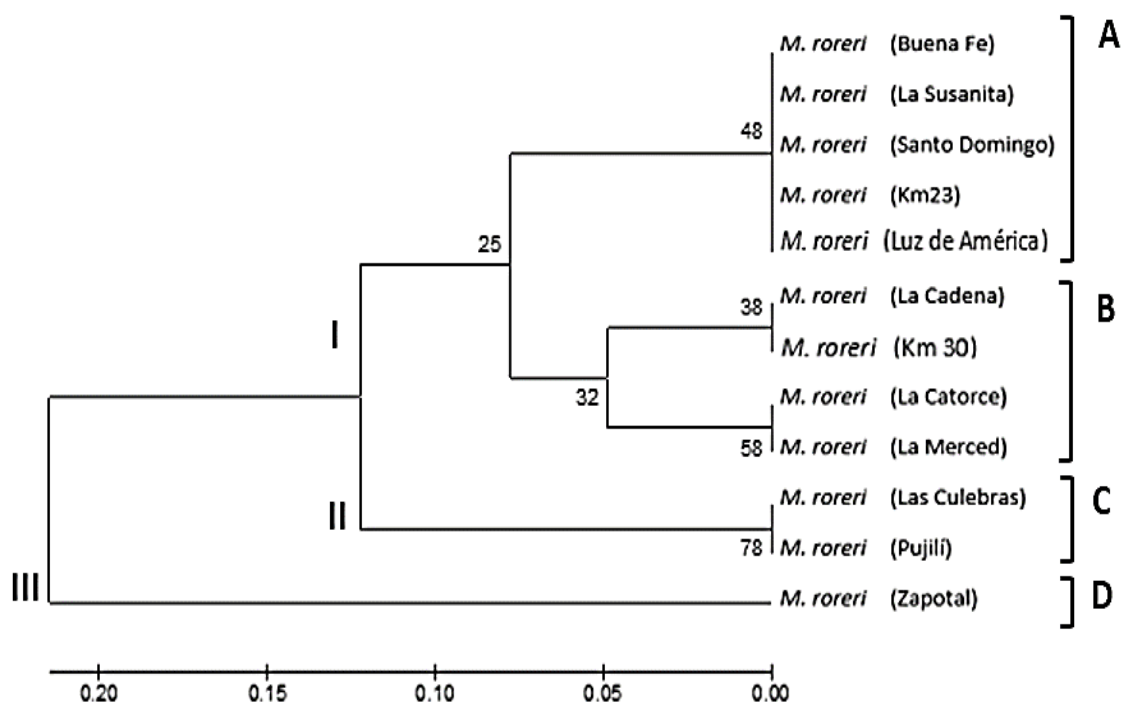


Figura 11. Árbol filogenético generado de los 12 aislados de *Moniliophthora roreri*. Dendrograma basado en el análisis ERIC-PCR. Las distancias evolutivas se dedujeron empleando el método Kimura 2-parámetro.

4.2.11. Agrupamiento de *M. roreri* para la determinación de diversidad de ecotipos (Secuenciación ITS).

El análisis de agrupamiento por el método de relaciones evolutivas de taxones produjo un dendrograma con dos grupos de los 12 aislados de *M. roreri* (grupo I y II) (Figura 12).

El grupo I reúne dos subgrupos el A que agrupó las muestras pertenecientes a las regiones (RB; SLS; SD; SK23; SLA; RLC; SK30; MLC; BLM; RLC; RCU) con 100% de similitud genética y B (CPM). El grupo II muestra solo se muestra la cepa RZ que se encuentra en el menor rango altitudinal.

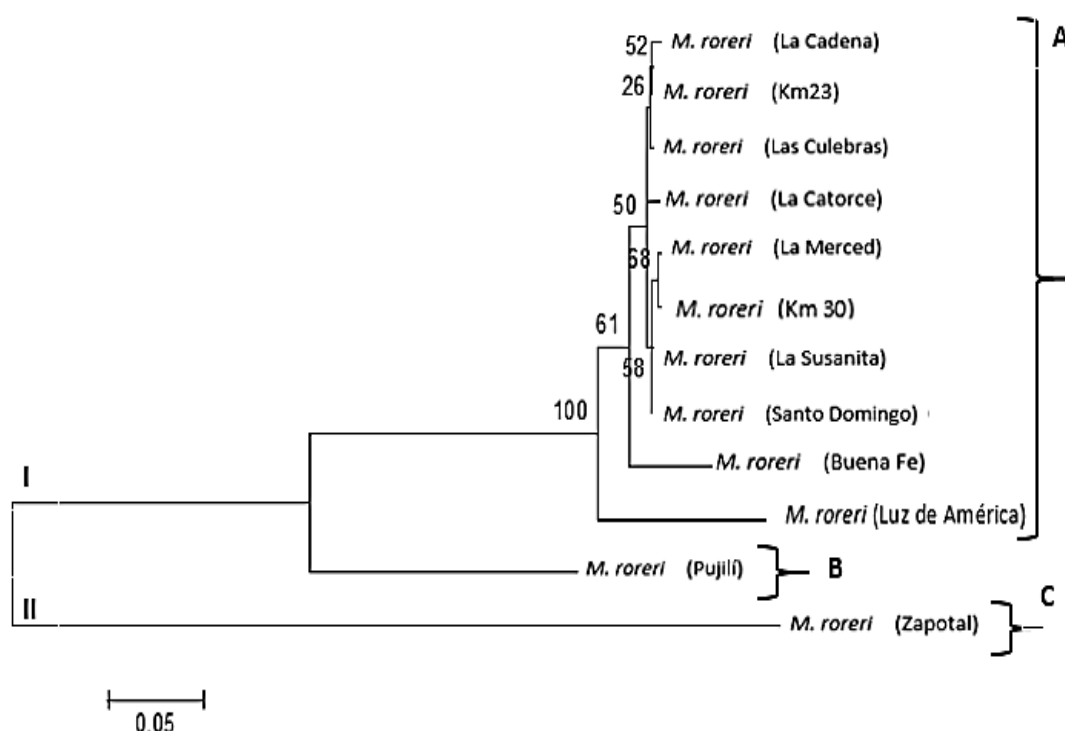


Figura 12. Árbol filogenético generado de los 12 aislados de *M. roleri*. Dendrograma basado en el análisis de la secuenciación de los ITS. Las distancias evolutivas se dedujeron empleando el método Kimura 2-parámetro.

4.3. Evaluar la actividad antagonista de las PGPR hacia la proliferación del hongo a nivel in-vitro.

4.3.1. Efecto antagónico de las rizobacterias al crecimiento micelial de *M. roleri*.

Los ensayos efectuados con las rizobacterias muestran un gran porcentaje de inhibición hacia el crecimiento micelial del hongo *M. roleri*. Los tratamientos con las rizobacterias presentaron efectos inhibitorios al desarrollo micelial del hongo con el 98% de inhibición a 6, 12 y 18 días, observando el comportamiento agresivo de la bacteria colonizando la mayor parte de la placa impidiendo que el hongo se desarrolle.

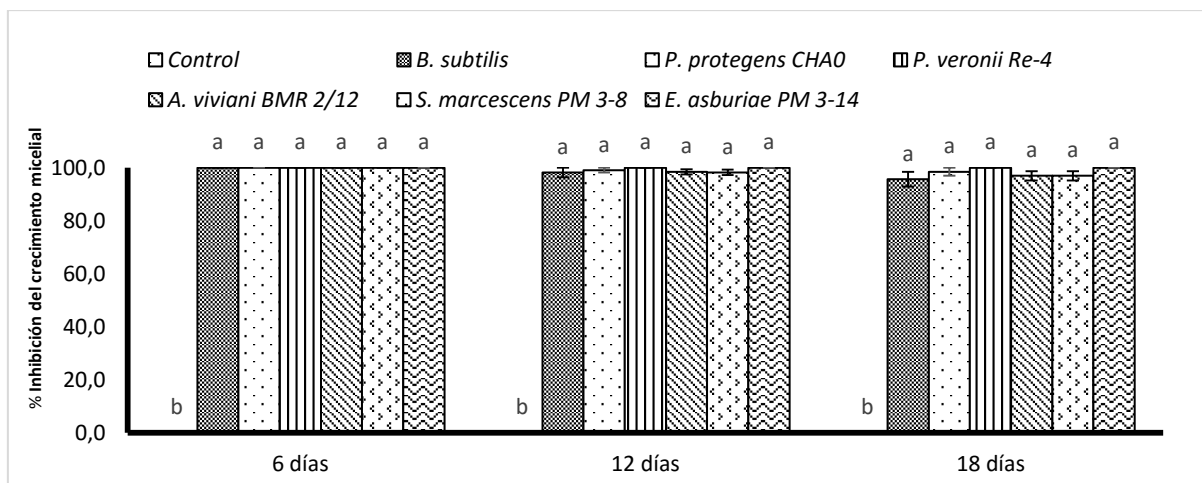


Figura 13. Efecto antagónico de rizobacterias al crecimiento micelial de *M. royeri*. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

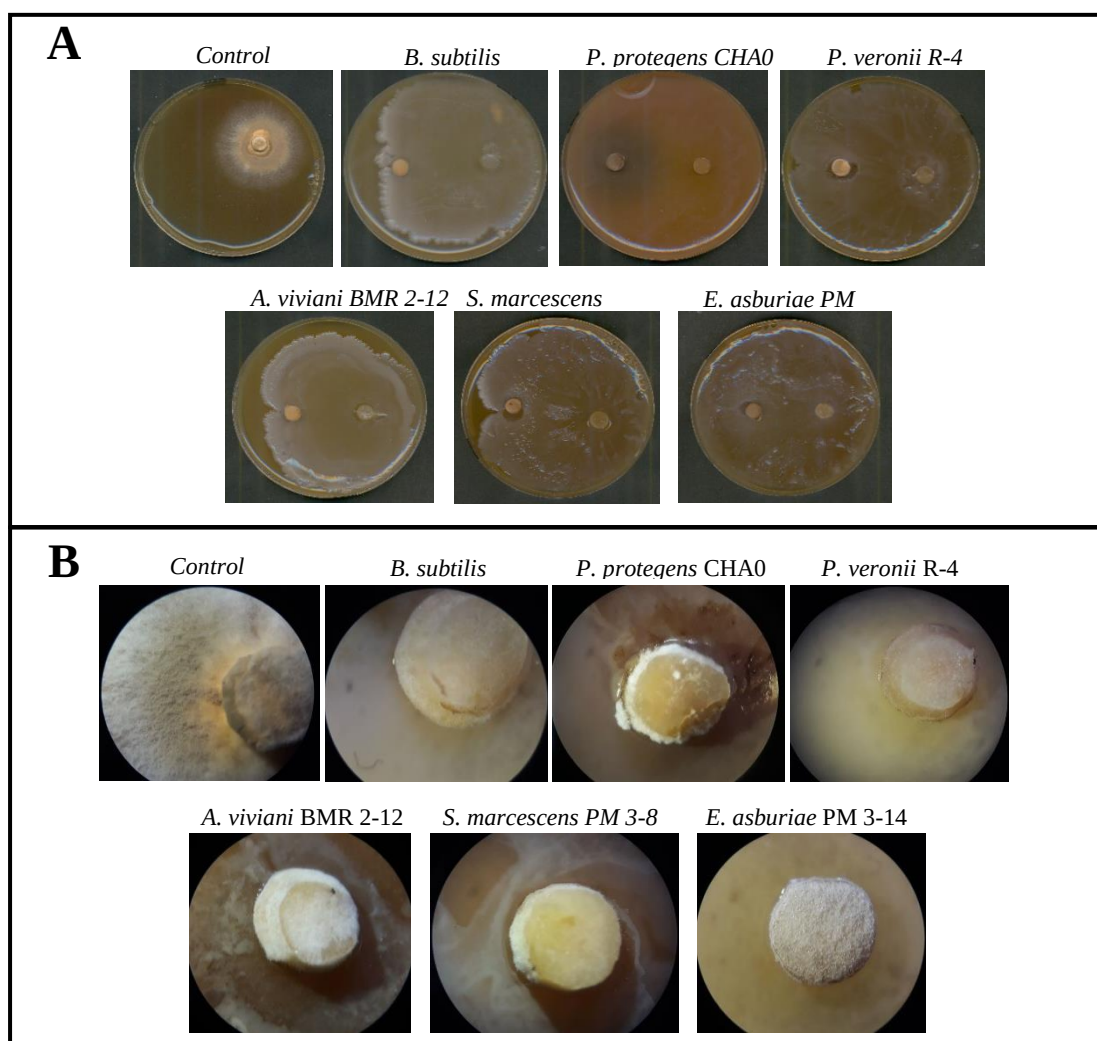


Figura 14. Inhibición del crecimiento micelial de *M. royeri*. A. Placas Monopetri; B. Estereomicroscopio 2X.

4.3.2. Efecto antagónico de las rizobacterias en producción de esporas de *M. roreri*.

Todos los ensayos realizados ejercieron un efecto antagonista hacia la producción de esporas del hongo *M. roreri*. Las evaluaciones realizadas en todas las cepas presentaron porcentajes superiores al 98% de inhibición de la producción de esporas a los 18 días de evaluación.

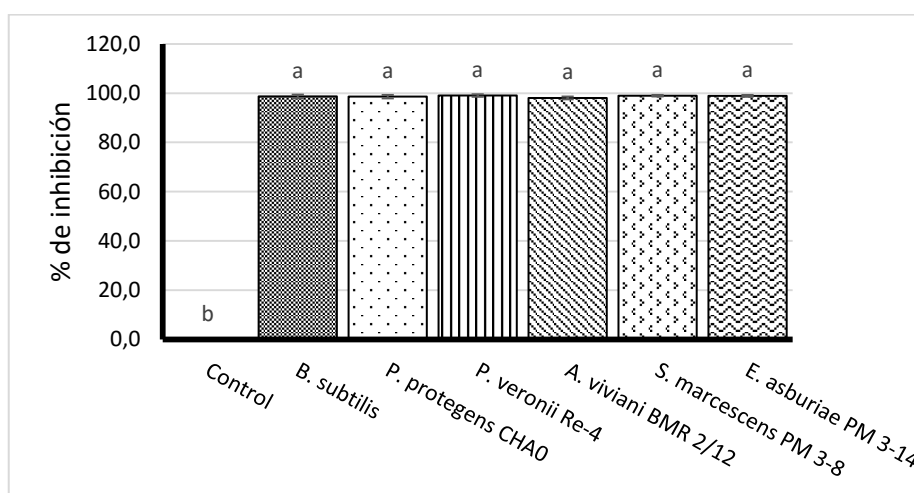


Figura 15. Efecto antagónico de rizobacterias al crecimiento micelial de *M. roreri*. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

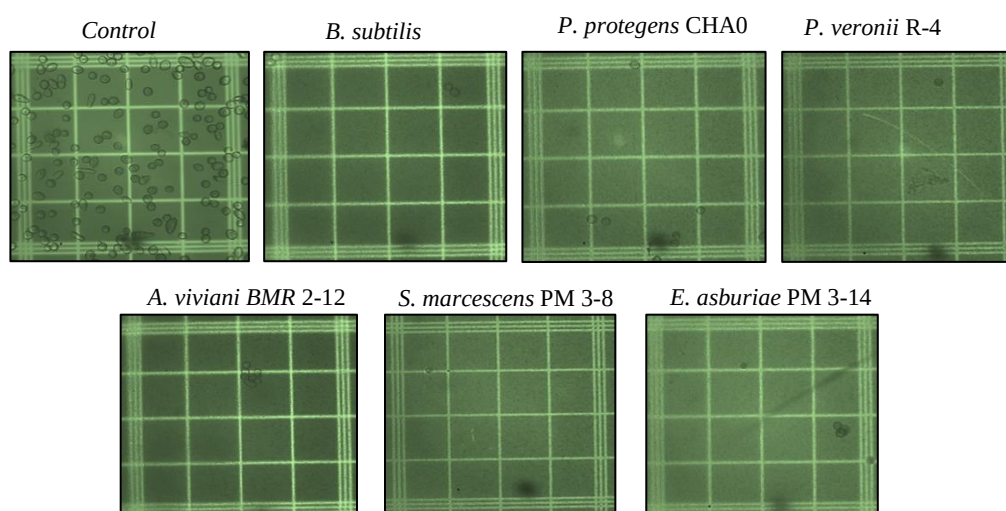


Figura 16. Efecto antagónico del sobrenadante a la producción de esporas de *M. roreri*. Conteo de esporas en cámara de NEUBAUER.

4.3.1. Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias en crecimiento micelial de *M. roreri*

Las pruebas realizadas de inhibición al incremento de crecimiento micelial muestran que algunos sobrenadantes tienen actividad antifúngica hacia *M. roreri*. El extracto de *B. subtilis* ejerce mayor actividad antagonista, inhibiendo el crecimiento micelial del hongo con (36, 48 y 52 %), para los días 6,12 y 18 de evaluación.

Los extractos obtenidos de la cepa *P. protegens* CHA0 muestran un alto grado de inhibición en los primeros días de evaluación con 57 %, mostrando una disminución en su efecto antagónico en los 12 días con el efecto inhibitorio de (45 y 29 %).

Los extractos de las rizobacterias (BMR2-12, PM3-8 y PM3-14) causan inhibiciones al desarrollo micelial del (35, 35 y 32 %) respectivamente, al sexto día de evaluación. En los siguientes días de evaluación las cepas (BMR2-12, PM3-8 y PM3-14) muestran una disminución del efecto antagónico en inhibición al desarrollo micelial de (7, 28, 18 %) a los 18 días de evaluación. Al control sin aplicación se observa un normal desarrollo al micelio para los 18 días de incubación.

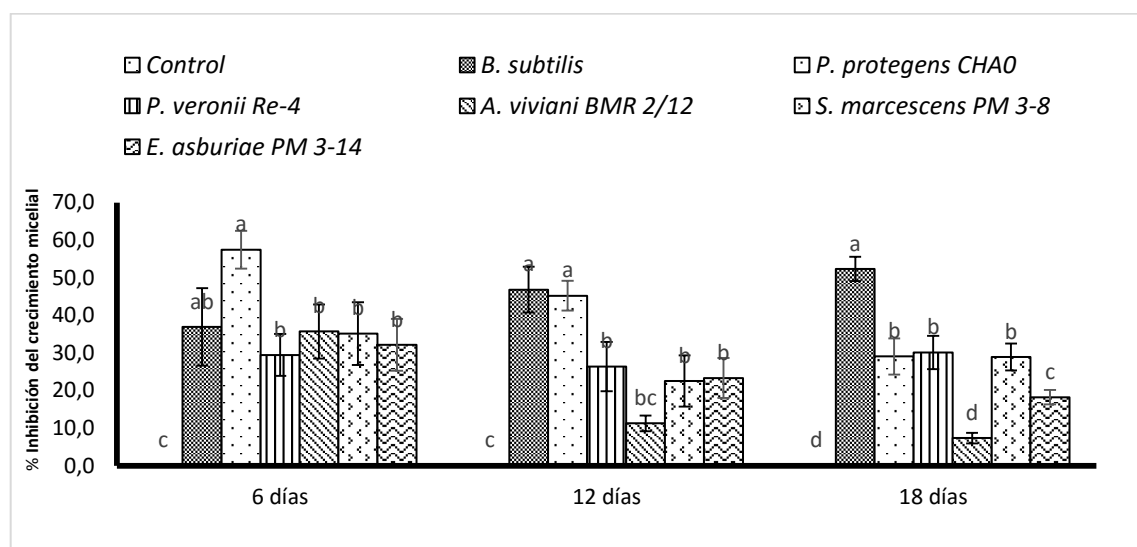


Figura 17. Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias al crecimiento micelial de *M. roreri* Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

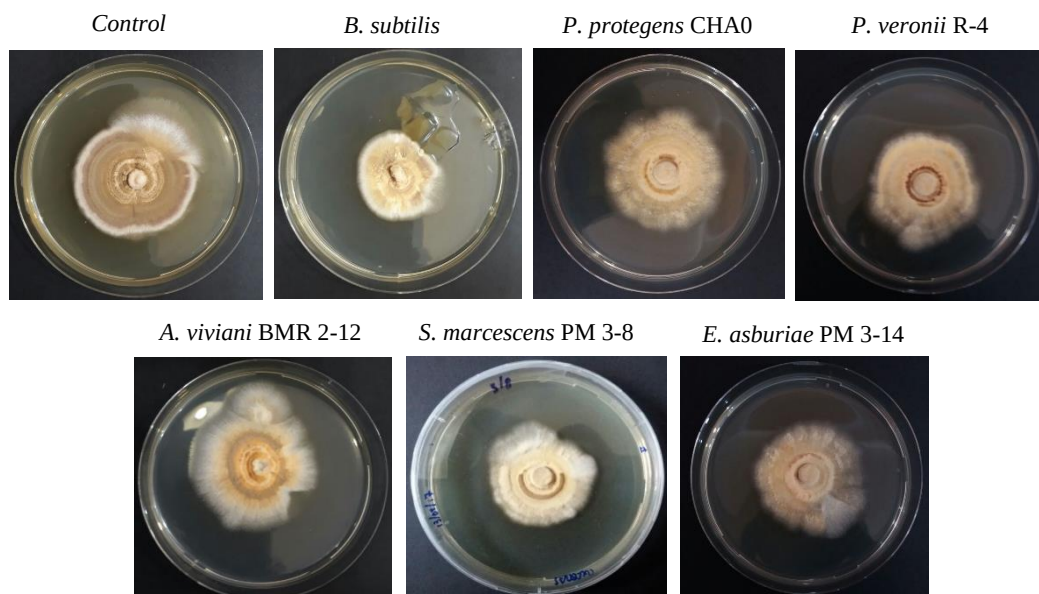


Figura 18. Inhibición del crecimiento micelial de *M. roreri* en placas monopetri a los 18 días de inoculación con los sobrenadantes bacterianos.

4.3.2. Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias a la producción de esporas de *M. roreri*

Los ensayos mostraron que los extractos de las rizobacterias generan un efecto inhibitorio en producción de esporas teniendo un crecimiento micelial abundante en el hongo *M. roreri*.

La cepa (PM 3-18 y CHA0) pese a su crecimiento micelial normal, se observó un efecto inhibitorio superior al 85% a producción de esporas a los 18 días.

Las rizobacterias con incidencia en la producción de esporas en la forma de reproducción sexual del hongo con efecto inhibitorio superiores al 70% se observa con las cepas bacterianas *B. subtilis*, BMR 2-12, el menor efecto inhibitorio con el 60% se observó con los extractos de R4. Al control sin aplicación se observa una normal producción de esporas para los 18 días de incubación.

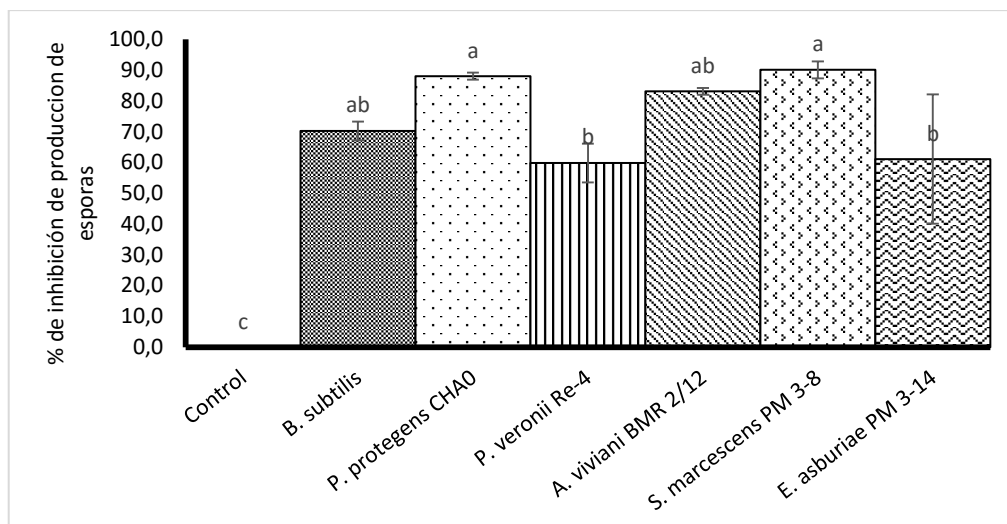


Figura 19. Efecto antagónico del sobrenadante a la producción de esporas de *M. royeri*.

Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

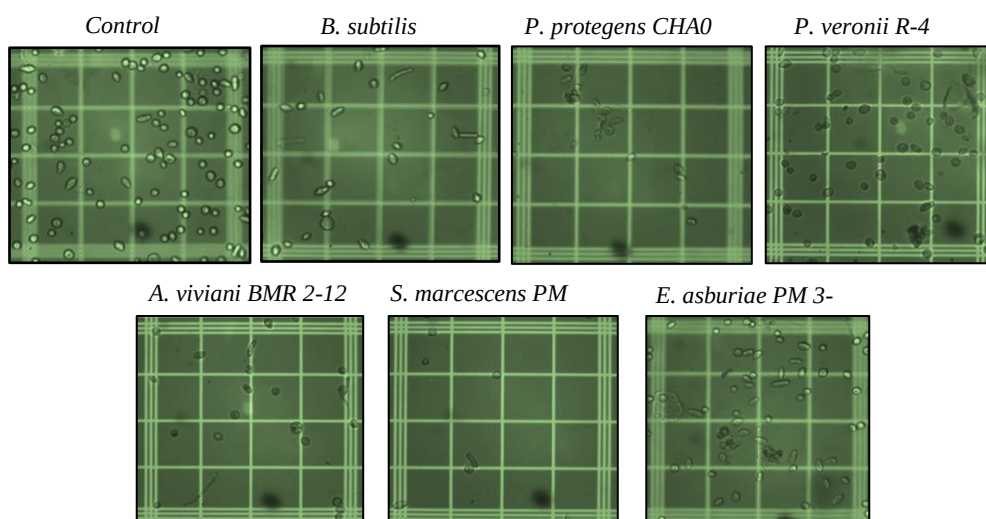


Figura 20. Efecto Antagónico del Sobrenadante a la Producción de Esporas de *M. royeri*. Conteo de esporas en cámara de NEUBAUER

4.4. Discusión

4.4.1. Banco de germoplasma

El proyecto de investigación de muestreo de cepas patogénicas de *M. royeri* generó un banco de germoplasma codificado para los pisos altitudinales donde se cultiva el cacao, las características climáticas del lugar de recolección debidamente georreferenciadas para su uso posterior en próximas investigaciones, se caracterizó en base a la secuenciación de la región ITS comparados con la base de datos de GenBank de NCBI coincidiendo con estudios realizados en donde la información acerca de las accesiones es esencial para la gestión y el mantenimiento de las colecciones en el banco de germoplasma (FAO, 2014).

El Ecuador con el pasar de los años ha ampliado las zonas productoras de cacao encontrado plantaciones comerciales desde los 19 a 519 m.s.n.m con afectaciones considerables de moniliasis abarcando gran parte de la costa, parte de la sierra y oriente corroborando lo descrito por (Phillips-Mora, 2006) donde menciona que *M. royeri* muestra una clara dispersión por la cordillera de los Andes con mayor agresividad en zonas con alta producción de cacao y es agravado por una alta variabilidad genética dentro del país. Esta situación conlleva que los clones de cacao con grado de resistencia, pierdan su potencial genético, ocasionando la aparición de nuevas variantes del hongo y favorecido por prácticas de manejo no adecuadas (Correa et al., 2014).

4.4.2. Caracterizar la diversidad de ecotipos a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. royeri*.

La cepa aislada del sector “La Catorce” de la provincia de Manabí presentó características de crecimiento radial, número de esporas y actividad metabólica mayor a los demás aislados lo cual demuestra una variación a nivel morfológico dependiendo el lugar de recolección. Trabajos realizados coinciden que existe una gran variación de caracteres morfológicos dependiendo de las condiciones agroclimáticas del lugar de recolección (Villavivencio & Jiménez, 2010).

Las 12 cepas del hongo *M. roreri* provenientes de diferentes ubicaciones geográficas mostraron una diferenciación considerable para la característica de tonalidad de color de colonias coincidiendo con las investigaciones de (Phillips-Mora, 2006). Las colonias de *M. roreri* tienen una considerable variabilidad morfológica en cuanto a tonos de coloración del micelio que varían del blanco, crema, hasta el pardo.

4.4.3. Triángulo de la enfermedad del aislado con características más agresivas.

La cepa “La Catorce” mostró un mayor porcentaje de características morfológicas que contribuyen a definir que la cepa corresponde a ser agresiva estando estrechamente relacionadas a condiciones favorables de huésped *T. cacao* , a una temperatura 32 °C y 56% de humedad relativa coincidiendo con los estudios realizados por (Phillips-Mora, 2006) mencionando que las condiciones secas, humedad relativa baja y temperatura mayor a 26 °C favorecen la liberación y dispersión de las conidias, y las lluvias intensas y frecuentes favorecen la presencia de agua libre sobre los frutos, facilitando la germinación y penetración de las conidias.

4.4.4. Identificación molecular del hongo *Moniliophthora roreri* mediante ITS (Espacios de transcripta interna)

Del análisis molecular mediante partidores universales ITS 4 y ITS 5 se obtuvieron bandas amplificadas de 700 a 740 pb coincidiendo con los estudios realizados de (Suárez Contreras, 2015) donde se verifica amplicones de 740 a 750 pb para cepas de *M. roreri* mostrando variabilidad genética en los 12 aislados. El tamaño de los amplicones observados por ITS no coincidió con todos los fenotipos de los aislamientos, corroborando así una diferencia a nivel molecular, no apreciado para el fenotipo de cada cepa de *M. roreri* esto se debe al efecto de mutaciones producidas por delección e inserción de bases como las reportadas por (Phillips, 2003).

4.4.5. Caracterización molecular mediante marcadores ERIC – REP PCR

La caracterización molecular de *M. roreri* de los 12 aislados por ERIC-PCR se verificó patrones de bandas que revelaron seis perfiles distintos entre las cepas, mostrando variabilidad genética y evolutiva. Esto coincide con (De Arruda et al., 2003), al empleo de ERIC-PCR definen como técnica rápida para la caracterización de hongos patógenos, aplicable en estudios sobre el impacto de los genotipos del huésped y evolución del patógeno.

4.4.6. Agrupamiento de *Moniliophthora roreri* para la determinación de diversidad de ecotipos (Secuenciación ITS).

El agrupamiento filogenético mediante el análisis de secuencias de transcripto interno (ITS) mostraron que las variabilidades genéticas de los aislados están relacionadas a las condiciones agroclimáticas del lugar de recolección coincidiendo con estudios realizados de diversidad genética *M. roreri* donde argumentan que la moniliasis se dispersó, donde por adaptación a nuevas condiciones ambientales adquirió características moleculares particulares que finalmente originaron grupos genéticos diferentes, aumentando la posibilidad genética de supervivencia frente a cambios ambientales (Suárez Contreras, 2015).

4.4.7. Efecto antagónico de las rizobacterias al crecimiento en diámetro del micelio *M. roreri*.

Los ensayos antagónicos a *M. roreri*, las cepas de mayor porcentaje de inhibición al desarrollo micelial se observó para la cepa *S. marcescens* PM 3-8 y *P. protegens* CHA0 coincidiendo con los estudios realizados por (Someya et al., 2000) el efecto inhibitorio *in vitro* por *S. marcescens* B2 alcanza un 70 % a *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* y en su totalidad *R solani* . Bacterias provenientes de la rizosfera del género *Pseudomonas*, presentan actividad antagónica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* , gracias a la producción de metabolitos difusibles, que alteran el crecimiento normal del micelio (Urrea, 2010).

4.4.8. Efecto antagónico de las rizobacterias a la producción de esporas de *M. roreri*.

El efecto inhibitorio en la reproducción sexual de hongo, los efectos inhibitorios a la producción de esporas de *M. roreri* se observó que la cepa *S. marcescens* PM 3-8 y *P. protegens* CHA0 produjeron una inhibición a presencia de micro conidios sin germinación y con ausencia de esporas. La cepa *B. subtilis* ATCC 55405, *A. viviani*, *E. asburiae* y *P. veronii* R4 también presentaron grandes porcentajes de inhibición. Los antibióticos producidos por algunas *P. fluorescens* son de gran importancia, destacándolos en la supresión de enfermedades en las plantas (Mukerji, 2004)

4.4.9. Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias al crecimiento en diámetro del micelio *M. roreri*

Los sobrenadantes de la cepa *B. subtilis* y *P. protegens* CHA0 presentaron un mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial coincidiendo con el estudio realizado de Chávez, 2016, Los géneros *Pseudomonas* sp., y *B. subtilis* ATCC 55405., han sido ampliamente reportados debido a su capacidad de inhibición del desarrollo de diversos fitopatógenos, por la producción de metabolitos como: fenazinas, 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina (Prn), pioluterina (Plt) para *Pseudomonas* sp. (Baehler et al., 2005) y la producción de Iturina A y surfactina zwittermicina y kanosamina para el género *Bacillus* sp (Kinsella et al.,2009).

El efecto inhibitorio que presentaron las cepas evaluadas sobre el crecimiento del hongo, se atribuye a la producción de metabolitos difusibles por las bacterias, los cuales, al entrar en contacto con el hongo, impiden su desarrollo radial normal (Fernando et al., 2011). Los sobrenadantes de la cepa *B. subtilis* y *P. protegens* CHA0 presentaron un mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial coincidiendo con el estudio realizado de Chávez, 2016, Los géneros *Pseudomonas* sp., y *B. subtilis* ATCC 55405., han sido ampliamente reportados debido a su capacidad de inhibición del desarrollo de diversos fitopatógenos, por la producción de metabolitos como fenazinas, 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina (Prn), pioluterina (Plt) para *Pseudomonas* sp. (Baehler et al., 2005) y la

producción de Iturina A y surfactina zwittermicina y kanosamina para el género *Bacillus* sp (Kinsella et al., 2009).

4.4.10. Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias a la producción de esporas de *M. roreri*.

Las cepas *S. marcescens* PM 3-8 y *P. protegens* CHA0 presentaron los mayores porcentajes de inhibición a la producción de esporas produciendo estrangulamientos de micelio y malformaciones a la estructura de las esporas coincidiendo con los estudios en los cuales detectaron altas actividades antifúngicas de *S. marcescens* B2 hacia *P. capsici* (Okamoto et al., 1998) al igual *P. protegens* con alta actividad antifúngica protege las frutas de manzana contra *Botrytis Cinerea* (Abdelwahab et al., 2016).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se generó un banco de germoplasma de 12 ecotipos de *M. roreri* codificado para los pisos altitudinales donde se cultiva el cacao.
- La variabilidad de ecotipos del hongo *M. roreri* en el Ecuador está estrechamente relacionada con su ubicación en el piso altitudinal y las condiciones climáticas en las que se encuentre el cultivo huésped.
- Las condiciones favorables para un mayor grado de agresividad del hongo *M. roreri* son una temperatura promedio de 32 °C y una humedad relativa del 56% y piso altitudinal de 138 msnm.
- La identificación mediante ITS muestra diferenciaciones en el número de pares de bases 700pb para las cepas (RCU, RLC, RB, MLC, BLM, CPM, SLA, SK23, SK30, SLS, SD) y 740 para la cepa RZ.
- Los aislados bacterianos de *S. marcescens* PM 3-8 y *P. protegens* CHA0 ejercen un porcentaje de inhibición del 98% hacia el crecimiento radial del hongo *M. roreri*
- Los sobrenadantes de los aislados bacterianos de *S. marcescens* PM 3-8 y *P. protegens* CHA0 ejercieron una actividad antagónica del 85% hacia la producción de esporas de *M. roreri* pese a su crecimiento micelial normal.

5.2.Recomendaciones

- Ampliar la caracterización molecular de *M. roreri* mediante la técnica ERIC-PCR con más sitios de recolección.
- Generar un banco de germoplasma con aislamientos de *M. roreri* provenientes de distintos tipos de hospederos.
- Probar las Rizobacterias seleccionadas en este estudio, frente a *M. roreri* a nivel de campo, para establecer su actividad antagonista en el cultivo de cacao.
- Realizar ensayos de antagonismo hacia *M. roreri* con combinación de PGPRs a nivel *in-vitro*.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, A. C. (2016). EL Cacao fino de aroma de la provincia de Napo cantón Tena y si aplicación en la gastronomía amazónica. Ambato, Ecuador.
- Abdelwahab, R., Bensidhoum, L., Nacera, T., Yousra, B., Fatma, N., Nabti, ... Elhafid. (2016). A *Pseudomonas* Protegens with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits Against *Botrytis Cinerea* Gray Mold, (November).
- ANECACAO. (2015). CacaoCCN51 | Anecacao Ecuador. Retrieved March 18, 2018, from <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacaoccn51.html>
- Anjaiah, V., Koedam, N., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., Höfte, M., Tambong, J. T., & Cornelis, P. (1998). Involvement of Phenazines and Anthranilate in the Antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 Derivatives Toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(9), 847–854. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.9.847>
- Bach, T., & Díaz, M. (2011). Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura - Engormix. Retrieved from <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/las-rizobacterias-promotoras-crecimiento-t40593.htm>
- Bach, T., & Díaz, Ma. (2007). Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura. Retrieved from http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:VX2sA7d49OUJ:www.actaf.co.cu/revistas/revista_ao_95-2010/Rev%25202008-3/21-Rizobacterias.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec
- Baehler, E., Bottiglieri, M., Péchy-Tarr, M., Maurhofer, M., & Keel, C. (2005). Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 24–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02597.x>

- Bashan, Y., & Dubrovsky, J. G. (1996). Azospirillum spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. *Biology and Fertility of Soils*, 23(4), 435–440. <https://doi.org/10.1007/BF00335919>
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8–9), 1225–1228. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00187-9)
- Bennett, J. W., & Bentley, R. (2000). Seeing red: the story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*, 47, 1–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12876793>
- Bridge, & Arora. (1998). *Interpretation of PCR Methods for Species Definition*. UK. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=iJL0AZvHwzcC&oi=fnd&pg=PA63&dq=Interpretation+of+PCR+methods+for+species+definition&ots=SBaWgiLMYb&sig=v2G1mh0AXbJTTT1gFzaWK9oZvZU#v=onepage&q&f=false>
- Brygoo, Y., Caffier, V., Carlier, J., Fabre, J.-V., Fernandez, D., Giraud, T., ... Lebrun, M. C. (1998). Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. Retrieved from <http://agritrop.cirad.fr/401123/>
- Chaparro, A. (2010). Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana, 116. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis389.pdf>
- Chávez, K. T. (2016). “Identificación y selección de rizobacterias del género *Pseudomonas* spp de cultivares endémicos de *Musa* spp con actividad antagonista al hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Chiu, S., & Moore, D. (1994). Sexual development of higher fungi.

- Contreras, L. Y. (27 de Enero de 2015). Identificación molecular de aislamientos de *Monilophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia.
- Correa, Castro, & Coy. (2014). Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388–399. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
- Culberson, W. L., & Ainsworth, G. C. (1972). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. *The Bryologist*, 75(1), 117. <https://doi.org/10.2307/3241540>
- De Arruda, M. C. C., Miller, R. N. G., Ferreira, M. A. S. V., & Felipe, M. S. S. (2003). Comparison of *Crinipellis perniciosa* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. *Plant Pathology*, 52(2), 236–244. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00819.x>
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2), 107–149. <https://doi.org/10.1080/713610853>
- El Telégrafo. (2016). Ecuador lidera la producción de cacao fino de aroma.
- Enríquez, G. (2010). *Cacao Orgánico: Guía para productores ecuatorianos (2a ed) (Segunda)*. Quito. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=FZozAQAAMAAJ&pg=PA44&lpg=PA44&dq=El+mercado+de+cacao+en+el+mundo+ha+tenido+una+evolución+diferencial+durante+los+últimos+cien+años+aproximadamente.+Debido+a+la+presencia+de+enfermedades+e+insectos+plagas>
- Enríquez, G. A. (1985). *Curso sobre el cultivo del cacao*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=eZgOAQAIAAJ&pg=PA8&dq=Después+de+que+el+cacao+fue+aceptado+por+los+europeos+como+alimento+necesario,+comenzaron+a+llevar+semillas+de+su+área+natural+hacia+otros+países.+En+la+actualidad,+el+cacao+se+cul>

- Evans, H. C. (1981). *Pod rot of cacao caused by Moniliophthora (Monilia) roreri*. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19811373782>
- Evans, H. C. (2007). Cacao Diseases—The Trilogy Revisited. Retrieved from http://www.worldcocoaoundation.org/wp-content/uploads/files_mf/evans2007.pdf
- Fajardo, F. (2013). ¿Quién fue el creador del cacao ccn-51? Homero Castro Zurita, conózcalo. Retrieved March 18, 2018, from http://www.elcacaotero.com.ec/cacao_ccn51.html
- FAO. (2014). Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i3704s.pdf>
- Fernando, Dilantha, & Nakkeeran. (2011). Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of Plant Diseases. In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (pp. 67–109). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_3
- Flores, M. (2007). *La proteccion juridica para el cacao fino y de aroma del Ecuador. Serie Magister* (Vol. 76). Retrieved from [http://repositorionew.uasb.edu.ec/bitstream/10644/220/1/SM76-Flores-La protección jurídica para el cacao fino y de aroma en el Ecuador.pdf](http://repositorionew.uasb.edu.ec/bitstream/10644/220/1/SM76-Flores-La%20protecci%C3%B3n%20jur%C3%ADdica%20para%20el%20cacao%20fino%20y%20de%20aroma%20en%20el%20Ecuador.pdf)
- Gerischer, U. (2008). *Acinetobacter molecular microbiology*. Caister Academic Press. Retrieved from <https://www.caister.com/acineto>
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., & Penrose, D. M. (1999). *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. Published by imperial college press and distributed by world scientific publishing co. <https://doi.org/10.1142/p130>
- Guerrero, G. (2011). El Cacao ecuatoriano. Su historia empezó antes del siglo XV. Retrieved March 5, 2018, from <http://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano-historia-empezo-siglo.html>

- Hill, D. S., Stein, J. I., Torkewitz, N. R., Morse, A. M., Howell, C. R., Pachlatko, J. P., ... Ligon, J. M. (1994). Cloning of Genes Involved in the Synthesis of Pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and Role of Pyrrolnitrin Synthesis in Biological Control of Plant Disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 78–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16349167>
- Idris, H., Labuschagne, N., & Korsten, L. (2007). Screening rizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological control*, 40(1), 97-106.
- INIAP. (1998). *Manual del cultivo de cacao* (2da edición ed.). Quevedo, Ecuador. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=UoYzAQAAMAAJ&pg=PR12&lpg=PR12&dq=El+cultivo+del+cacao,+Theobroma+cacao,+tiene+gran+importancia+dentro+de+la+econom%C3%ADa+del+Ecuador,+por+tratarse+de+un+producto+de+exportaci%C3%B3n+y+materia+prima+para+industrias+l>
- Kinsella, K., Schulthess, C. P., Morris, T. F., & Stuart, J. D. (2009). Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(2), 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.11.019>
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J. W., & Reddy, M. S. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 31(1–2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2005.03.007>
- La Hora. (2015). Cacao: al vaivén del mercado : País : La Hora Noticias de Ecuador, sus provincias y el mundo. Retrieved March 18, 2018, from <https://lahora.com.ec/noticia/1101865314/cacao-al-vaivc3a9n-del-mercado>
- Lee, & Taylor. (1992). Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040750>

Merchán. (1981). *Avances en la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia*. Colombia.

Ministerio de Agricultura y Ganadería. (1991). Cacao. *Dirección General de Investigación Y Extensión Agrícola*, 1–11. Retrieved from http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec-cacao.pdf

Monroy, G., Martínez, R., María, R., & Rojas Martínez, A. E. (2014). La relevancia evolutiva de los ecotipos. Retrieved from <http://www.elementos.buap.mx/num95/pdf/49.pdf>

Mukerji, K. G. (2004). *Fruit and vegetable diseases*. Kluwer Academic.

Okamoto, H., Sato, M., Sato, Z., & Isaka, M. (1998). Biocontrol of *Phytophthora capsici* by *Serratia marcescens* F-1-1 and Analysis of Biocontrol Mechanisms Using Transposon-insertion Mutants. *Japanese Journal of Phytopathology*, 64(4), 287–293. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.64.287>

Okamoto, H., Sato, Z., Sato, M., Koiso, Y., Iwasaki, S., & ISaka, M. (1998). Identification of Antibiotic Red Pigments of *Serratia marcescens* F-1-1, a Biocontrol Agent of Damping-off of Cucumber, and Antimicrobial Activity against Other Plant Pathogens. *Japanese Journal of Phytopathology*, 64(4), 294–298. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.64.294>

Orietta, F., & Larrea, V. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. En *Manejo Integrado de Plagas* (Vol. 62, págs. 96 -100). Costa Rica.

Peix, A., Lang, E., Verbarq, S., Spr, C., Santa-regina, I., Mateos, P. F., ... Rodr, C. (2009). *Acinetobacter* strains IH9 and OCI1 , two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth , constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*, 32, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.03.004>

PENA, H. B., & REYES, I. (2007). *Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de*

nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia* (Vol. 32). Asociación Interciencia. Retrieved from https://sci-hub.tw/http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442007000800013&script=sci_abstract

Peñaherrera, S. (2013). *Combinacion de agentes biologicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (Theobroma cacao L.)*. universidad técnica estatal de quevedo. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Sofia_Penaherrera/publication/237073775_Combinacion_de_agentes_biologicos_para_el_control_de_enfermedades_del_fruto_de_cacao_Theobroma_cacao_L/links/5761600f08ae2b8d20ed5713/Combinacion-de-agentes-biologicos-para-el-co

Phillips-Mora, W. (2006). *Taller Regional Andino de Aplicación Tecnológica en el cultivo de cacao. Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo, Ecuador* (AGRIS). Retrieved from <http://repiica.iica.int/docs/B0255e/B0255e.pdf>

Picard, C., & Bosco, M. (2007). Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften*, 95(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0286-3>

Pico, J., Calderón, D., Fernández, F., & Díaz, A. (2012). Guía del manejo integrado de enfermedades del cultivo de cacao (*theobroma cacao* L.) en la Amazonia. Retrieved from <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/guia-del-manejo-integrado-de-enfermedades-del-cultivo-de-cacao-theobroma-cacao-l-en-la-amazonia.pdf>

Sánchez, Gamboa, & Rincón. (2003). *Control químico y cultural de la moniliasis (Moniliophthora roreri Cif & Par) del cacao (Theobroma cacao L) en el estado Barinas. Revista de la Facultad de Agronomía* (Vol. 20). 2000. Universidad del Zulia. Retrieved from http://sci-hub.tw/http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182003000200007

- Schnider, U., Seematter, A., Maurhofer, M., Blumer, C., Duffy, B., Gigot-Bonnefoy, C., ... Keel, C. (2000). Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1215–1225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10671440>
- Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.011>
- Someya, N., Nakajima, M., Hamamoto, H., Yamaguchi, I., & Akutsu, K. (2004). Effects of light conditions on prodigiosin stability in the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2. *Journal of General Plant Pathology*, 70(6), 367–370. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0134-7>
- Someya, Kataoka, N., Komagata, T., Hirayae, K., Hibi, T., & Akutsu, K. (2000). Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Disease*, 84(3), 334–340. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.334>
- Suárez, L., & Cabrales, C. (2008). Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Respuestas*, 13(1), 45–56. <https://doi.org/10.22463/R.V13I1.553>
- Suárez Contreras, L. Y. (2015). Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(1), 51–57. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n1.47994>
- Suárez, & Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)* (Luz María). Retrieved from http://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_04A.pdf
- Talbout, N. (1998). *Molecular Variability of Fungal Pathogens: using the roce blast fungus as a case study*. UK. Retrieved from

<https://www.cabi.org/bookshop/book/9780851992662>

- Tirado, P., Lopera, A., & Ríos, L. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Revista Corpoica - Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 417–430. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:517
- Uknes, S., Winter, A., Delaney, T., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., . . . Ryals, J. (1993). Biological induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interactions.*, 6, 692-698.
- Uquillas, L. (2004). Inducción de la germinación para mejorar la eficacia de dos agentes antagónicos para el control de la monilia (*Crinipellis roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). Centro agronomico tropical de investigación y enseñanza (CATIE). Retrieved from <http://www.sidalc.net/repdoc/A0294e/A0294e.pdf>
- Urrea, R. (2010). *Evaluación in vivo e in vitro de bacterias aisladas de la rizósfera de uchuva (Physalis peruviana) como biocontroladoras de Fusarium oxysporum*. Universidad Militar Nueva Granada.
- Villavivencio, M., & Jiménez, M. (2010). Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana”. *CICYT*. Retrieved from <http://repiica.iica.int/docs/B0255e/B0255e.pdf>
- Wang, X.-R., & Szmidt, A. E. (2000). Population Genetic Analysis of Pathogenic Forest Fungi (pp. 491–520). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2311-4_21
- White, T. J., Bruns, T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA. *Academic Press*, 315 - 322.
- Whitlock, B. A., & Baum, D. A. (1999). Phylogenetic Relationships of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae) Based on Sequences of the Nuclear Gene Vicilin. *Systematic*

Botany, 24(2), 128. <https://doi.org/10.2307/2419544>

Wilbert Phillips, P. D. (2006). La Moniliasis del cacao, Un enemigo que podemos vencer - Wil. Retrieved March 18, 2018, from <https://es.scribd.com/document/373426610/La-Moniliasis-Del-Cacao-Un-Enemigo-Que-Podemos-Vencer-Wil>

Wilson, L. A., & Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution*, 23(6), 1156–1168. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj125>

Financiamiento

El financiamiento para el desarrollo del proyecto de investigación “Biodiversidad de ecotipos de *Moniliophthora roreri* en cacao (*Theobroma cacao*) clon CCN-51 y la actividad antagonista de PGPR” 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.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de aislamiento de *Moniliophthora roreri*



Anexo 2. Protocolo modificado para la extracción de AND de Hongos DNeasy® Plant Mini Kit

Obtener 100 mg de muestra (Hongo, Planta).

1. Macerar la muestra en un mortero de porcelana (previamente puesto en el Congelador de -40 °C), con nitrógeno líquido, se aconseja obtener más de 20 mg del tejido liofilizado.
2. Añadir a la muestra 400 uL del Buffer AP1 y 4 uL de RNasa. Vortex la muestra e incubar a Baño María durante 10 min (Invertir el tubo de 2 a 3 veces durante la incubación).

Nota: No mezclar el Buffer AP1 y el RNasa antes de utilizarlos.

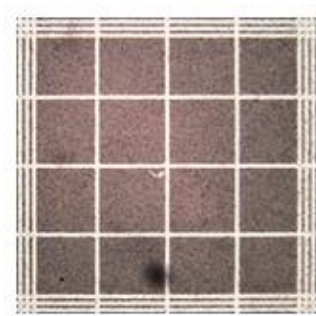
3. Añadir 130 uL del Buffer P3. Mezclar e incubar por 5 minutos en hielo.
4. **Recomendación:** Centrifugar la lisis por 5 minutos a 14000 rpm.
5. Pipetear la lisis (solo la parte líquida – procurar no tomar tejido pegado a la pared del tubo) e introducirla al QIAshredder spin column (colocado el tubo de 2mL para la colección). Centrifugar por 2min a 14000 rpm.

6. Transferir el flujo a un nuevo tubo si alterar el pellet presente. Añadir 1.5 volúmenes del Buffer AW1, mezclar con la pipeta.
7. Transferir 650 uL de la mezcla e introducirla a un tubo DNeasy Mini spin column (colocado el tubo de 2 mL para la colección). Centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm.
8. Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 mL para la colección. Añadir 500 µl Buffer AW2, y centrifugar durante 1 min a 8000 rpm. Deseche el flujo.
9. Añadir de nuevo 500 uL del Buffer AW2. Centrifugar durante 2 min a 14000 rpm.
Nota: Retire cuidadosamente la columna del tubo de colección. Procurar que la columna no entre en contacto con el flujo.
10. Transferir la columna de centrifugación a un tubo Eppendorf de 1,5 mL (recortar la tapa de la columna y utilizar la del Eppendorf).
11. Añadir 30 uL del Buffer AE para la elución. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente (15-25 °C). Centrifugar durante 1 min a 8000 rpm.
12. Repetir el paso con 20 uL del Buffer AE.

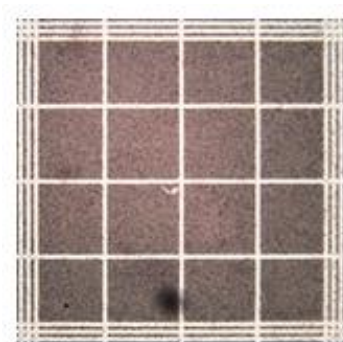
Se obtendrá alrededor de 50 uL de ADN, para su comprobación en electroforesis.

Anexo 3. Protocolo del conteo de esporas

1. Preparar una suspensión de conidias en agua destilada con Tween 80 al 0.1%.
2. Con una pipeta Pasteur llenar la cámara con la suspensión de conidias y cubrirla con el cubreobjetos.
3. Observar al microscopio utilizando el aumento conveniente de acuerdo al tamaño de la estructura (40x es un aumento adecuado)

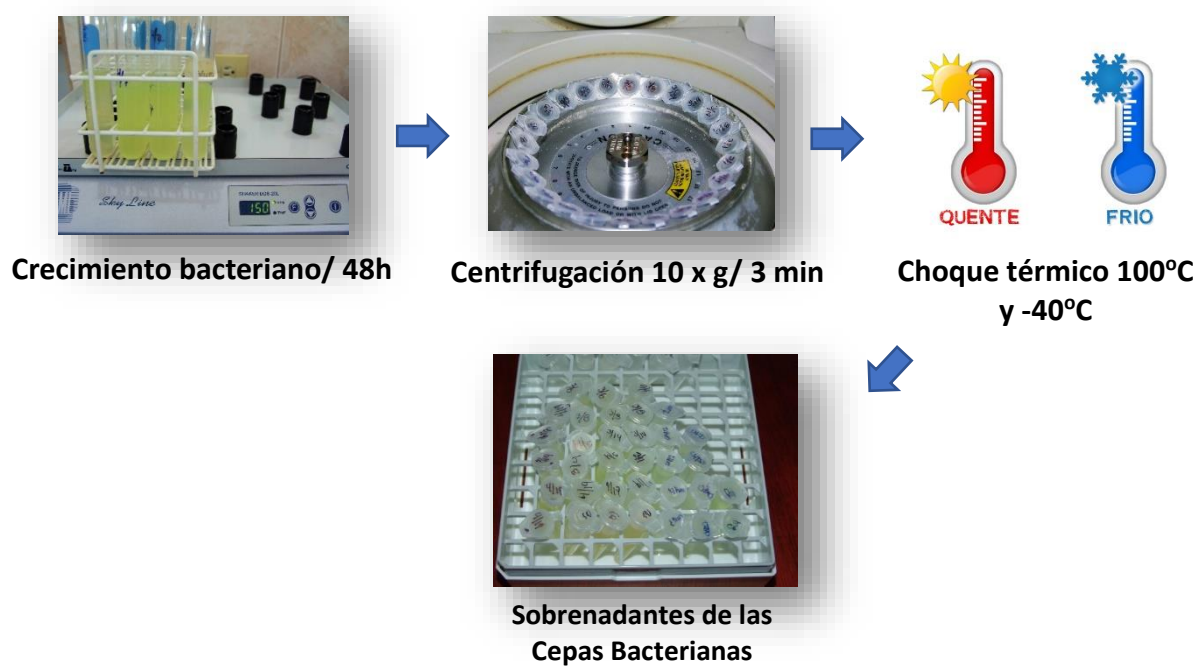


4. Contar las conidias presentes en los cuadrados elegidos (generalmente se cuentan en los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro, o en forma diagonal empezando por el primero de la parte superior izquierda. También se deben contar las conidias que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadrado, las que se encuentran en la Figura 18: Cámara de NEUBAUER vista al microscopio (40X). 42 parte superior y la derecha del cuadrado. Se cuentan en total 10 cuadrados, cinco en cada cámara (cinco arriba y cinco abajo)



5. Determinar el número de conidias por mL y el número total de conidias utilizando la siguiente fórmula: $\text{Conidias / mL} = \# \text{ de conidias contadas} \times 25,000 \times \text{factor de dilución}$
 $\text{Conidias total} = \text{conidias / mL} \times \text{Vol. de la suspensión original de conidias}$. Figura 19: Sector de la cámara de NEUBAUER que se debe contar.

Anexo 4. Protocolo de Obtención de Sobrenadantes



Anexo 5. Conservación de las cepas de *Moniliophthora roreri*

