



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

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

Título del Proyecto de Investigación:

Evaluación de bacterias solubilizadoras de minerales en el desarrollo
morfológico de cacao CCN-51 y su capacidad protectora contra *Phytophthora*
palmivora

AUTOR:

Macías Holguín Cristhian John

DIRECTOR PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Hayron Fabricio Canchignia Martínez Ph.D

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2021

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **CRISTHIAN JOHN MACÍAS HOLGUÍN** 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.

CRISTHIAN JOHN MACÍAS HOLGUÍN

C.I: 120614022-8

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Egresado Macías Holguín Cristhian John, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado **“Evaluación de bacterias solubilizadoras de minerales en el desarrollo morfológico de cacao CCN-51 y su capacidad protectora contra *Phytophthora palmivora*”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

Hayron Canchignia Martínez Ph.D

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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



Document Information

Analyzed document	PROYECTO DE TESIS MACIA'	: 27-7-2021 URKUND.docx (D110848889)
Submitted	7/29/2021 4:06:00 PM	
Submitted by		
Submitter email	hcanchignia@uteq.edu.ec	
Similarity	6%	
Analysis address	hcanchignia.uteq@analysis.orkund.com	

Sources included in the report

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO / TESIS FINAL C1.docx

Document TESIS FINAL C1.docx (D77189648)

SA

 12

Hayron Fabricio Canchignia Martínez Ph.D
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



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

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO:

Evaluación de bacterias solubilizadoras de minerales en el desarrollo morfológico de cacao CCN-51 y su capacidad protectora contra *Phytophthora palmivora*

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

INGENIERO AGRÓNOMO

Aprobado por:

Dra. Silvia Saucedo Aguiar

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dra. Marisol Rivero Herrada

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Fernando Abasolo Pacheco

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Quevedo - Los Ríos - Ecuador

2021

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 forjo mis conocimientos en la preparación de ingeniero Agrónomo.

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

Al Msc Antonio Mendoza, Msc Joselyn Vilela, Msc Erick García, Msc Ángel Cedeño, Ing. Luis Vera, Víctor Tubay, Víctor García, Vanessa Arellano y Dayanara Tapia por brindarme su amistad y confianza en el tiempo que estuve en el laboratorio.

También a mis amigos Luis Beltrán y Ivonne Varas que han formado parte de mi vida profesional a las que les encantaría agradecerles su amistad, apoyo ánimo y compañía en los buenos y malos momentos

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón mi proyecto de investigación a mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

RESUMEN

La pudrición de la mazorca negra es el factor más importante que limita la producción de cacao (*Theobroma cacao*) con pérdidas anuales superiores al 30%, la utilización de agentes de control biológico mediante microorganismos se considera una de las estrategias más seguras y asequibles. El objetivo de este estudio fue evaluar bacterias solubilizadoras de minerales en el desarrollo morfológico de cacao CCN-51 y su capacidad protectora contra *Phytophthora palmivora*. En el presente trabajo se aislaron 238 cepas de distintas partes de la planta con potencial para solubilizar nutrientes, bioestimulantes y capacidad bioprotectora contra *P. palmivora*. Se seleccionaron 9 aislados obtenidos de un screening bioquímico con producción de catalasa, proteasa, producción de sideróforos, tinción de gram y caracteres morfológicos. Las 9 cepas fueron sometidas a ensayos de solubilización de N-P-K recalca que la cepa BF-567 alcanzó el mayor porcentaje de solubilización con promedios superiores del 81%, 90% y 100% destacando del resto de tratamientos en estudio. Además, se observó el efecto bioestimulante del sedimento bacteriano de la cepa FZ 9-7 lavadas con el Buffer PBS (Phosphate Buffered Saline), presentando mayores resultados en la tasa de germinación del 100%, longitud 5.67 cm, peso 3.57 g y volumen radicular 92.43 cm³. Así también, estos aislados fueron analizados para determinar la actividad antagonista mediante enfrentamientos bacterias-patógeno y sobrenadante-patógeno, en ensayos de cultivo dual y barrido de los sobrenadantes directos. Las cepas FZ 9-7 y BF-567 fueron capaces de inhibir el avance del crecimiento micelial *in vitro* en un rango del 86% y 85% a través de la producción de compuestos antifúngicos. Estos resultados confirman la importancia de las rizobacterias y sugieren que estas bacterias podrían usarse para el control biológico de oomicetos del suelo a través de sus emisiones volátiles.

Palabras claves: solubilización de NPK, *Phytophthora palmivora*, bioestimulante, proteasa, sobrenadantes, Buffer PBS.

ABSTRACT

Black pod rot is the most important factor limiting cocoa (*Theobroma cacao*) production, with annual losses exceeding 30%. The use of biological control agents using microorganisms is considered one of the safest and most affordable strategies. The objective of this study was to evaluate mineral solubilizing bacteria in the morphological development of cocoa CCN-51 and its protective capacity against *Phytophthora palmivora*. In the present work, 238 strains were isolated from different parts of the plant with potential to solubilize nutrients, biostimulants and bioprotective capacity against *P. palmivora*. Nine isolates obtained from a biochemical screening with catalase production, protease, siderophore production, gram staining and morphological characters were selected. The 9 strains were subjected to N-P-K solubilization assays, emphasizing that strain BF-567 reached the highest solubilization percentage with superior averages of 81%, 90% and 100%, standing out from the rest of the treatments under study. In addition, the biostimulant effect of the bacterial sediment of strain FZ 9-7 washed with PBS (Phosphate Buffered Saline) was observed, presenting higher results in germination rate of 100%, length 5.67 cm, weight 3.57 g and root volume 92.43 cm³. Also, these isolates were analyzed to determine the antagonistic activity by bacteria-pathogen and supernatant-pathogen confrontations, in dual culture and direct supernatant sweep assays. Strains FZ 9-7 and BF-567 were able to inhibit mycelial growth progress in vitro in the range of 86% and 85% through the production of antifungal compounds. These results confirm the importance of rhizobacteria and suggest that these bacteria could be used for biological control of soil oomycetes through their volatile emissions.

Key words: NPK solubilization, *Phytophthora palmivora*, biostimulant, protease, supernatants, PBS buffer.

TABLA DE CONTENIDO

Portada	i
Declaración de autoría y sesión de derechos	ii
Certificación de culminación del proyecto de investigación	iii
Certificado del reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico	iv
Certificado de aprobación por tribunal de sustentación	v
Agradecimiento	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen	viii
Abstract.....	ix
Tabla de contenido.....	x
Código dublín	xvi
Introducción.....	1

CAPÍTULO I. CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.	Problema de Investigación.....	4
1.1.1.	Diagnóstico del problema	4
1.1.2.	Planteamiento del problema.....	4
1.1.3.	Sistematización del Problema	4
1.2.	Justificación	5
1.3.	Objetivos	6
1.3.1.	Objetivo General.....	6
1.3.2.	Objetivos Específicos.....	6

CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.	Género.....	8
------	-------------	---

2.2.	Clasificación.....	8
2.3.	Características	8
2.4.	Cacao CCN-51	9
2.5.	Cultivo.....	9
2.6.	Problemas en la producción de cacao	9
2.7.1.	Agente causal	10
2.7.2.	Ciclo de vida	11
2.8.	Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR).....	11
2.8.1.	Mecanismo de acción.....	12
2.8.1.1.	Fijación biológica de nitrógeno	12
2.8.1.2.	Ureasa	12
2.8.1.3.	Ácido indol-acético.....	13
2.8.1.4.	Solubilización de fosfato	13
2.8.1.5.	Solubilización de potasio.....	13
2.8.1.6.	Producción de sideróforos	14
2.8.1.7.	Producción de ACC desaminasa y regulación del nivel de etileno	14

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.	Localización del Experimento	16
3.2.	Tipo de investigación.....	16
3.3.	Método de investigación.....	16
3.4.	Fuentes de recopilación de información	16
3.5.	Diseño de la investigación.....	17
3.5.1.	Tratamientos	17
3.6.1.	Manejo del Experimento	18
3.6.1.1	Aislamiento e identificación de bacterias en los cultivos nativos de cacao CCN-51	18
3.6.1.2.	Solubilización de nitrógeno, fósforo y potasio.....	19

3.6.1.3.	Aplicación de bacterias seleccionadas en semillas de cacao CCN-51	19
3.6.1.4	Respuesta de las bacterias seleccionadas contra <i>P. palmivora</i>	20
a.	Bacteria-Patógeno	20
b.	Sobrenadante-Patógeno	20
3.6.2	Variables a evaluar	20
3.6.2.1.	Días de germinación (%)	21
3.6.2.2.	Longitud radicular (cm).....	21
3.6.2.3.	Peso radicular (gr)	21
3.6.2.4.	Volumen radicular (cm ³)	21
3.6.2.5.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.....	21
3.6.3.	Tratamientos de los datos	22
3.7.	Materiales	22
3.7.1.	Materiales de laboratorio y reactivos.....	22
3.7.2.	Equipos de laboratorio.....	23
3.7.3.	Materiales de oficina	23
3.7.4.	Material vegetal	24

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Aislamiento de bacterias solubilizadoras de minerales	26
4.2.	Identificación de bacterias solubilizadoras de minerales seleccionadas por caracteres morfológicos y bioquímicos.....	28
4.3.	Evaluación de la solubilización de minerales con bacterias seleccionadas	30
4.3.1.	Bacterias solubilizadoras de nitrógeno	30
4.3.2.	Bacterias solubilizadoras de fósforo	31
4.3.3.	Bacterias solubilizadoras de potasio	32
4.4.	Aplicación de bacterias seleccionadas en semillas de cacao CCN-51	32
4.4.1.	Días de germinación.....	32
4.4.2.	Longitud radicular.....	34

4.4.3.	Peso radicular	34
4.4.4.	Volumen radicular.....	36
4.5.	Respuesta protectora de las bacterias seleccionadas contra <i>P. palmivora</i>	37
4.5.1.	Actividad antagonista bacteria patógeno	37
4.5.2.	Actividad antagonista con sobrenadantes	38
4.6.	Discusión	39
4.6.1.	Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de minerales.....	39
4.6.2.	Aplicación de bacterias seleccionadas en semillas de cacao CCN-51.....	40
4.6.3.	Respuesta protectora de las bacterias seleccionadas contra <i>P. palmivora</i>	41

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	Conclusiones.....	44
5.2.	Recomendaciones	45

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

6.1.	Bibliografía.....	47
------	-------------------	----

CAPÍTULO VII. ANEXOS

7.1.	Anexos	55
------	--------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de Análisis de Varianza	17
Tabla 2. Tratamientos utilizados en los ensayos in vitro.....	17
Tabla 3. Datos geográficos y características agroclimáticas del sitio de recolección de muestras	24
Tabla 4. Cepas bacterianas obtenidas a partir de diferentes partes morfológicas de plantas de cacao	27
Tabla 5. Identificación bioquímica y morfológica de bacterias solubilizadoras de minerales	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Solubilización de nitrógeno con bacterias seleccionadas.....	30
Figura 2. Solubilización de fósforo inorgánico con bacterias seleccionadas.	31
Figura 3. Evaluación del halo de solubilización de potasio con bacterias seleccionadas. ..	32
Figura 4. Efectos de las bacterias en el porcentaje de germinación.	33
Figura 5 Germinación de semillas de cacao CCN-51, inoculadas con bacterias seleccionadas.....	33
Figura 6. Longitud radicular de cacao CCN-51 inoculadas con bacterias seleccionadas ...	34
Figura 7. Peso radicular de cacao CCN-51 inoculadas con bacterias seleccionadas	35
Figura 8. Efecto de las bacterias solubilizadoras de minerales en la longitud y peso radicular en plántulas de cacao CCN-51.....	35
Figura 9. Volumen radicular de cacao CCN-51 inoculadas con bacterias seleccionadas. .	36
Figura 10. Efecto de la inoculación bacteriana sobre el crecimiento micelial de <i>P. palmivora</i>	37

Figura 11. Efectos de los sobrenadantes bacterianos sobre la inhibición del crecimiento micelial de <i>P. palmivora</i>	38
---	----

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento bacteriano a partir de distintos tejidos vegetales de cacao CCN-51	55
Anexo 2. Bacterias biodegradadoras de nitrógeno.	55
Anexo 3. Bacterias biodegradadoras de fósforo.	55
Anexo 4. Bacterias biodegradadoras de potasio.	56
Anexo 5. Resultados antagónicos de las bacterias al crecimiento micelial de <i>P. palmivora</i>	56
Anexo 6. Disminución del crecimiento micelial de <i>P. palmivora</i> con los sobrenadantes bacterianos	56
Anexo 7. Extracción de los sobrenadantes bacterianos seleccionados.....	57

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“Evaluación de bacterias solubilizadoras de minerales en el desarrollo morfológico de cacao CCN-51 y su capacidad protectora contra <i>Phytophthora palmivora</i> ”.
Autor:	Macías Holguín Cristhian John
Palabras clave:	Solubilización de NPK, <i>Phytophthora palmivora</i> , bioestimulante, proteasa, sobrenadantes, Buffer PBS.
Fecha de publicación:	
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2021
Resumen: (hasta 300 palabras)	Resumen. - La pudrición de la mazorca negra es el factor más importante que limita la producción de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) con pérdidas anuales superiores al 30%, la utilización de agentes de control biológico mediante microorganismos se considera una de las estrategias más seguras y asequibles. El objetivo de este estudio fue evaluar bacterias solubilizadoras de minerales en el desarrollo morfológico de cacao CCN-51 y su capacidad protectora contra <i>Phytophthora. Palmivora</i>. En el presente trabajo se aislaron 238 cepas de distintas partes de la planta con potencial para solubilizar nutrientes, bioestimulantes y capacidad bioprotectora contra <i>P. palmivora</i>. Se seleccionaron 9 aislados obtenidos de un screening bioquímico con producción de catalasa, proteasa, producción de sideróforos, tinción de gram y caracteres morfológicos. Las 9 cepas fueron sometidas a ensayos de solubilización de N-P-K recalca que la cepa BF-567 alcanzó el mayor porcentaje de solubilización con promedios superiores del 81%, 90% y 100% destacando del resto de tratamientos en estudio. Además, se observó el efecto bioestimulante del sedimento bacteriano de la cepa FZ 9-7 lavadas con el Buffer PBS (Phosphate Buffered Saline), presentando mayores resultados en la tasa de germinación del 100%, longitud 5.67 cm, peso 3.57 g y volumen radicular 92.43 cm³. Así también, estos aislados fueron analizados para determinar la actividad antagonista mediante enfrentamientos bacterias-patógeno y sobrenadante-patógeno, en ensayos de cultivo dual y barrido de los sobrenadantes directos. Las cepas FZ 9-7 y BF-567 fueron capaces de inhibir el avance del crecimiento micelial <i>in vitro</i> en un rango del 86% y 85% a través de la producción de compuestos antifúngicos. Estos resultados confirman la importancia de las rizobacterias y sugieren que estas bacterias podrían usarse para el control biológico de oomicetos del suelo a través de sus emisiones volátiles.
Descripción:	Hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162
URI:	

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao*) es un cultivo tropical que crece bajo condiciones húmedas en Centroamérica y Sudamérica (Efraim *et al.*, 2010). La actividad cacaotera tiene impactos importantes en los principales países productores ya que representa el modo de vida de más de 150 000 agricultores y genera alrededor de 1 500 000 empleos directos en las etapas de producción, procesamiento y comercialización. La producción de cacao en el Ecuador está localizada en 23 de sus 24 provincias y se produce como “cultivo solo” o cultivo asociado con otras especies, sin embargo, su superficie sembrada de CCN-51 es de 319.244 y Nacional 241.043 hectáreas (Batista, 2019). Según Romero *et al.*, (2016) menciona que la mayor concentración del cultivo del cacao se encuentra en las provincias del litoral (Los Ríos, Guayas, Manabí, Esmeraldas y El Oro), en las estribaciones de la Cordillera Occidental de los Andes y en las provincias del nororiente del Ecuador (Sucumbíos, Orellana y Napo).

Se estima que 90% de la producción de cacao fino Nacional se realiza en sistemas tradicionales y semitecnificados, mientras que la mayoría de la variedad CCN-51 se efectúa en sistemas tecnificados (Plaza, 2016). Existen diferencias importantes entre los dos tipos de cacao producidos en el país, especialmente que la variedad CCN-51 registra una mayor productividad, así como un inicio más temprano de producción y mayor resistencia a ciertas enfermedades. No obstante, la variedad Nacional cuenta con una calidad superior ampliamente aceptada.

El exceso del uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura no es sólo un problema que afecta a la economía desde el punto de vista de adquisición de los mismos, sino también un problema que puede traer asociado desequilibrios en el suelo que perjudiquen su fertilidad además de provocar contaminación en el medio ambiente, donde las aguas utilizadas para el consumo humano, animal y vegetal pueden estar afectadas (Vargas *et al.*, 2021), el principal responsable del contenido de nitratos en las aguas superficiales y subterráneas, el cual puede llegar a ser tóxico a determinados niveles (Domínguez *et al.*, 2016). Además, Hutch (2015) afirma que el extenso e inapropiado uso de pesticidas para aumentar el rendimiento de los cultivos debido a su formulación local y su fácil disponibilidad puede ser una fuente importante de contaminación de las aguas superficiales, subterráneas, del aire y del suelo.

Los microorganismos juegan un papel importante en la descomposición de los pesticidas en el suelo. Muchos microbios son capaces de utilizar pesticidas como fuentes de carbono (Ampofo *et al.*, 2009). En respuesta a la necesidad de generar cultivos limpios, con trazas mínimas o nulas de agroquímicos que afectan a 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, 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 (Peña y Reyes, 2007), también Derkowaska *et al.*, (2015) pueden producir compuestos biológicamente activos (vitaminas, reguladores del crecimiento, antibióticos, sideróforos y nutrientes para las plantas), mejorando la calidad de los suelos cultivados y el crecimiento y rendimiento de las plantas de cultivo.

La búsqueda de seleccionar bacterias solubilizadoras de minerales como urea, potasio y fósforo, es el inicio para comprobar su aporte al crecimiento vegetal de la semilla de cacao variedad CCN-51 y su efecto de protección, la selección de estas bacterias contribuye al desarrollo de nuevos temas de investigación basados al control biológico como la fabricación de biofertilizantes, con el fin de reemplazar la matriz productiva al reducir la dependencia de agroquímicos, pesticidas y exceso de fertilizantes, optando por una agricultura sostenible-ecológica.

CAPÍTULO I

CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1. CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de Investigación

1.1.1. Diagnóstico del problema

El desconocimiento de bacterias solubilizadoras de nutrientes que benefician la rápida germinación y desarrollo vegetativo para su producción masiva es un factor limitante, los principales problemas nutricionales son asociados a los desgastes producidos en el suelo y agua siendo capaces de alterar el normal funcionamiento de la germinación de las semillas provocando un mal desarrollo vegetativo que a su vez dan paso al ingreso de patógenos. Además, los diferentes sistemas de producción que emplean los agricultores los lleva a hacer uso de diferentes productos químicos que conducen al desgaste, contaminación de los suelos, bajos rendimientos, lo que repercute tanto en la capacidad productiva de los mismos como en la calidad del producto generado.

1.1.2. Planteamiento del problema

Los fertilizantes, agroquímicos y pesticidas se han incrementado en los últimos años y los agricultores dependen de cantidades mayores para satisfacer la producción del cultivo, estos productos afectan a largo plazo la disponibilidad de nutrientes proporcionando la disminución de la biodiversidad de microorganismos que habitan en el suelo y a su vez genera resistencia hacia cierto patógenos perjudiciales que bajan la productividad del cultivo. Los suelos que están destinados a la agricultura, se encuentran constituidos por una gran variedad de bacterias desconocidas que favorecen al desarrollo y obtención de nutrientes de las plantas por la producción de metabolitos secundarios.

1.1.3. Sistematización del Problema

¿Cuál de las bacterias puede tener un efecto antagónico?

¿Cómo las bacterias interfieren en el desarrollo morfológico de las semillas de cacao?

1.2. JUSTIFICACIÓN

A medida que la producción agrícola se fortaleció en las últimas décadas, los agricultores se volvieron cada vez más dependientes en aplicaciones extensivas de agroquímicos, incluidos pesticidas y fertilizantes inorgánicos para aumentar la producción de sus cultivos como un método relativamente confiable de protección de cultivos que ayuda con la estabilidad económica de su maniobra, sin embargo el uso de estos productos acarrea acidez y pérdida de la materia orgánica con la disminución de la carga microbiana, generando gran impacto en la actividad y la población de las comunidades bacterianas beneficiosas reduciendo la calidad nutricional de los suelos que por otra parte podrían ser una fuente de estrés para la germinación de semillas de cacao.

El uso de biofertilizantes en sistemas de producción agrícola es un componente clave de los ecosistemas agrícolas que no solo juega un papel importante en los procesos básicos del suelo, sino que también participa activamente en la mejora de la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos, ofrece el potencial de incrementar la eficiencia productiva de las unidades a través de la utilización acelerada de nutrientes, sustancias estimulantes y antagonistas de fitopatógenos presentes y subproductos de las unidades dado el caso se busca una amplia variedad de microorganismos de importancia agrícola para mejorar la salud del suelo por tanto, el uso de bioproductos se ha aceptado como bioindicadores de la salud y la actividad del suelo, que generan gran impacto al medio ambiente, asegurando la biodiversidad y salud humana, y que además facilitan su control, manejo y bajos costos de producción del cultivo. Esta investigación servirá como guía al sector cacaotero para potenciar el conocimiento de los microorganismos benéficos que habitan en el suelo ya que los datos son relevantes para nuevas investigaciones.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

Evaluar bacterias solubilizadoras de minerales en el desarrollo morfológico de cacao CCN-51 y su capacidad protectora contra *Phytophthora palmivora*.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Aislar e identificar bacterias solubilizadoras de minerales.
- Evaluar el desarrollo morfológico de la semilla de cacao CCN-51 inoculadas con bacterias solubilizadoras de minerales seleccionados.
- Determinar la respuesta antagónica de las bacterias solubilizadoras de minerales seleccionadas contra *Phytophthora palmivora*.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2. ESQUEMA REFERENCIAL DEL MARCO TEÓRICO

2.1. Género

El cultivo de *T. cacao*, comprende unas 20 especies, es una de las especies más conocidas por su importancia económica y social. Por mucho tiempo ha existido confusión en la ubicación taxonómica del cacao comercial, debido a su variabilidad genética en cuanto a caracteres de color, forma y dimensiones de las distintas partes de la flor, fruto y semilla. Pero se considera que, en el caso comercial, pertenece a una sola especie *T. cacao*, que comprende tres complejos genéticos: los criollos, forasteros amazónicos y trinitarios (Barón, 2016).

2.2. Clasificación.

- **Reino:** Plantae
- **Subreino:** Tracheobionta
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Subclase:** Dilleniidae
- **Orden:** Malvales
- **Familia:** Malvaceae
- **Subfamilia:** Byttnerioideae
- **Tribu:** Theobromeae
- **Género:** Theobroma
- **Especie:** cacao
- **Nombre binomial:** *Theobroma cacao* L.

2.3. Características

Es un árbol pequeño de 4 a 8 m de altura que puede alcanzar 10 metros de alto, si crece con buena sombra; sus frutos (ovoideos) son bayas oblongas amarillo-rojizas, alargadas con surcos, de hasta 20 cm de largo que contienen de 30 a 40 semillas de color marrón-rojizo al exterior, cubiertas de una pulpa blanca dulce y comestible. El embrión está formado por dos grandes cotiledones, cuyas sustancias formadoras constituyen el producto con valor comercial, además de que en esos tejidos (parenquimatosos) se encuentran sus principios

estimulantes, los que son los alcaloides teobromina y cafeína en porcentajes del 0.5 al 5%, respectivamente. Con las semillas se elabora el chocolate (Waizel, 2012).

2.4. Cacao CCN-51

El CCN-51 es un cacao clonado de origen ecuatoriano conocido también como Colección Castro Naranjal que el pasado 22 de junio fue declarado, mediante acuerdo ministerial, un bien de alta productividad cuyo color característico es el rojo. Además, es reconocido por sus características de alto rendimiento para la extracción de semielaborados, ingredientes esenciales para la producción a escala de chocolates y otros (Jumbo, 2017).

Según Fuentes *et al.*, (2011) manifiesta que el comportamiento del rendimiento a nivel nacional la variedad CCN-51 es de 0.33 a 0.65 Tm/ha, las principales características productivas son la densidad de 1,054 plantas por hectárea, siete mazorcas en promedio por árbol, un índice de mazorca de 17 y la mayor superficie corresponde a plantas entre 11 y 30 años. El productor cacaotero cuenta con una edad promedio de 54 años, 9 años de educación y el cacao es su principal fuente de ingresos.

2.5. Cultivo

El cacao es una planta que requiere de sombra. Es ideal establecerlo en sistema agroforestales o sea asociado con árboles forestales y otras especies de cultivos que dan cosecha rápida como: plátanos, frijol gandúl. Se tienen alimentos en poco tiempo e ingresos a la familia en espera de la producción de cacao. Es indispensable al preparar el terreno, establecer el sistema aparato A de conservación de suelos. Si es en pendientes trazarlas curvas a nivel, acequias y barreras vivas para disminuir la velocidad de las corrientes de agua que afectan sobre todo el cacao en desarrollo. En terrenos planos que tienen dificultades de drenaje de las aguas, hay que construir canales de drenaje para eliminar los excesos de agua (Arvelo *et al.*, 2017).

2.6. Problemas en la producción de cacao

Muchos factores contribuyen a la disminución de la producción de cacao en grano en todo el mundo, las enfermedades, representan pérdidas de más del 30% de la cosecha

potencial. Estas pérdidas han provocado una disminución constante de la producción y una reducción de la calidad del grano en casi todas las zonas productoras de cacao del mundo, Las enfermedades más significativas son la escoba de bruja, causada por *Moniliophthora perniciosa*, que se presenta principalmente en América del Sur; la pudrición helada de la vaina, causada por *M. roreri*, que se presenta principalmente en Centro y norte de América del Sur; y enfermedad de la mazorca negra, causada por varias especies de *Phytophthora*, que se distribuyen por los trópicos (Hebbbar, 2007).

Por lo tanto, la sostenibilidad de la economía del cacao está amenazada, ya que enfermedades de diversos estados constituyen ahora la limitación más grave para la producción. La más importante de ellas es la enfermedad de la mazorca negra causada por el género *Phytophthora* con pérdidas anuales del 30-90% de la cosecha (Adeniyi, 2019).

Este patógeno de importancia económica es de naturaleza muy diversa y variado en los países en crecimiento, incluidas especies como *palmivora*, *megakarya*, *capsici* y *citrophthora* se distinguen según el número de cromosomas, las características esporádicas y la longitud del pedicelo. Las pérdidas mundiales del 20 al 25% en la producción de cacao se deben a la enfermedad de la mazorca negra, una estimación de 700.000 toneladas métricas a escala mundial que reduce la producción mundial de cacao (Adeniyi, 2019).

2.7. Mazorca negra (*P. palmivora*)

Es un oomiceto hemibiotrófico capaz de infectar más de 200 especies de plantas, incluido uno de los cultivos más importantes económicamente, *Theobroma cacao* comúnmente conocido como cacao. Infecta muchas partes de la planta del cacao, incluidas las mazorcas, causando la enfermedad de la pudrición de la mazorca negra (Perrine, 2020).

2.7.1. Agente causal

En el cacao, causa la muerte de las plántulas, pudrición de la raíz, aftas del tallo, marchitamiento del chupón, tizón de la hoja, marchitamiento podredumbre de la vaina negra. Tanto el inóculo como el tejido huésped susceptible están continuamente disponibles y el potencial de enfermedad siempre está presente, cabe destacar que necesitan alta humedad para la esporulación y la germinación de esporangiosporas y zoosporas móviles que son

atraídas por la quimiotaxis y la electrotaxis a las raíces de sus plantas hospederas (Drenth y Guest, 2004).

2.7.2. Ciclo de vida

Estos eucariotas parecidos a hongos, que se clasifican taxonómicamente como oomicetos, generan esporas asexuales y sexuales con características que contribuyen en gran medida a su éxito patógeno. Las esporas incluyen estructuras de supervivencia y dispersión y potentes propágulos infecciosos capaces de localizar activamente a los huéspedes. La infección de plantas involucra principalmente su etapa de vida asexual, incluidos los esporangios papilados y las zoosporas biflageladas, que son los principales agentes de dispersión e infección de este patógeno (Judelson y Blanco, 2005; Hwu *et al*, 2017).

2.8. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR)

Las plantas son colonizadas externa e internamente por una multitud de microorganismos que afectan su desarrollo, en asociación con sus colonizadores epítitos y endofíticos, los microorganismos endofíticos se definen como especies microbianas que invaden los tejidos internos de la planta sin causar enfermedad, varias especies bacterianas residen de hojas, tallos y raíces, así como en frutas y semillas. Las bacterias invaden las semillas por su capacidad de transmitirse a la próxima generación (Mouatafo *et al.*, 2016).

Este grupo tiene la capacidad de aumentar la disponibilidad de nutrientes, transformarlos a formas asimilables por la planta, producir sustancias promotoras del crecimiento fitohormonas o servir como control biológico de fitopatógenos (Hernández *et al.*, 2015) y la reducción de la cantidad de etileno sintetizado en la planta (Mouatafo *et al.*, 2016).

Las PGPR como biofertilizantes, más comúnmente conocidos como inoculantes microbianos, son cultivos multiplicados artificialmente de ciertos organismos del suelo que pueden mejorar la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos, el mecanismo bien conocido para la promoción del crecimiento es a través de varias hormonas de crecimiento vegetal que incluyen Giberelinas y ácido Indole-3-acético (AIA) ha atraído la atención de los agricultores como inóculos de suelo para mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Katiyar *et al.*, 2016).

2.8.1. Mecanismo de acción

De acuerdo con el modo de acción, los PGPR se han dividido en dos grupos: los PGPR de biocontrol que indirectamente benefician el crecimiento de las plantas y los PGPR que afectan directamente el crecimiento de las plantas, la emergencia de semillas o mejoran los rendimientos de los cultivos. Aumenta a la nutrición de las plantas por PGPR se da fundamentalmente al incremento de la absorción de fósforo orgánico por la solubilización de fosfatos inorgánicos y la absorción de hierro por la producción de sideróforos quelantes de hierro y beneficia indirectamente el crecimiento de la planta o patógenos nocivos de la raíz a través de antibióticos, parasitismo y la competencia por los nutrientes y el espacio en las proximidades de la raíces de la planta con la activación de las respuestas de defensa del huésped (Podile y Krishna, 2006).

2.8.1.1. Fijación biológica de nitrógeno

Los microorganismos fijadores de N_2 denominados colectivamente "diazótrofos" son capaces de fijar biológicamente N_2 en asociación con las raíces de las plantas. Específicamente, las rizobacterias simbióticas inducen modificaciones estructurales y fisiológicas de las células bacterianas y las raíces de las plantas en estructuras especializadas llamadas nódulos (Molina *et al.*, 2015).

La FBN se define como la conversión de nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4) ion en el citoplasma de las bacterias y se excreta como compuesto químico del nitrógeno al citoplasma de la planta fácilmente absorbible por las raíces a través del proceso descendente, que puede ser utilizado dando a cambio la fuente de carbono requerida por las bacterias, la transformación de N_2 a nitrógeno biodisponible se consigue mediante la enzima denominada nitrogenasa, la mayor parte del N_2 fijado en la rizosfera se utiliza después de la mineralización del cadáver bacteriano (Molina *et al.*, 2015).

2.8.1.2. Ureasa

La ureasa convierte la urea en amoníaco y ácido carbámico, que luego reacciona espontáneamente con agua para formar ácido carbónico (y produce otro amoníaco). La conversión del ácido carbónico en bicarbonato produce una solución tampón: el amoníaco y el bicarbonato pueden unirse y disociarse de los iones de hidrógeno libres lo suficiente como

para mantener el pH del área circundante relativamente neutral (Gould, 2014). Este proceso implica genes que codifican polipéptidos enzimáticos estructurales, así como genes que codifican proteínas accesorias (Konieczna *et al.*, 2012).

2.8.1.3. Ácido indol-acético

La síntesis microbiana de la fitohormona auxina (ácido indol-3-acético/ ácido indol-acético, IAA) se conoce desde hace mucho tiempo. El 80% de los microorganismos aislados de la rizosfera de varios cultivos poseen la capacidad de sintetizar y liberar auxinas como metabolitos secundarios.

Evidentemente, AIA también actúa como una molécula de señalización recíproca que afecta la expresión génica de varios microorganismos. En consecuencia, IAA juega un papel muy importante en las interacciones entre rizobacterias y plantas. Además, la baja regulación de IAA como señalización se asocia con los mecanismos de defensa de la planta contra una serie de bacterias fitopatógenas como se evidencia en una mayor susceptibilidad de las plantas al patógeno bacteriano mediante la aplicación exógena de IAA o IAA producida por el patógeno (Ahemad y Kibret, 2013).

2.8.1.4. Solubilización de fosfato

El fósforo (P), es el segundo nutriente importante que limita el crecimiento de las plantas después del nitrógeno, está abundantemente disponible en suelos tanto en forma orgánica como inorgánica. La baja disponibilidad de plantas de fósforo se debe a que la mayoría del suelo P se encuentra en formas insolubles presente como un mineral inorgánico y apatita, mientras que las plantas lo absorben solo en dos formas solubles, los iones monobásicos (H_2PO_4) y los diatóxicos (HPO_4^{2-}) (Ahemad y Kibret, 2013).

2.8.1.5. Solubilización de potasio

El potasio (K) es el tercer macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas. Las concentraciones de potasio soluble en el suelo son generalmente muy bajas y más del 90% del potasio en el suelo existe en forma de rocas insolubles y minerales de silicato. Las bacterias pueden solubilizar las rocas de potasio a través de la producción y secreción de ácidos orgánicos (Gupta *et al.*, 2015), puede acelerar las reacciones de meteorización de los

minerales K; especialmente cuando están en contacto directo con superficies minerales por diferentes mecanismos de acción. Se han hecho intentos de utilizar bacterias movilizadoras de K para solubilizar K de diferentes minerales que contienen K (Etesami *et al.*, 2017).

2.8.1.6. Producción de sideróforos

El hierro es un nutriente vital para prácticamente todos los seres vivos en los que es necesario para importantes funciones celulares como síntesis de ADN, respiración y destoxificación de radicales libres. En la naturaleza se encuentra fundamentalmente en la forma Fe^{3+} formando parte de sales e hidróxidos de muy baja solubilidad, formas químicas que imposibilitan su uso por algunos seres vivos. La disponibilidad de este elemento es fundamental en el éxito o fracaso de microorganismos patógenos o simbióticos para invadir un organismo o para colonizar un ambiente determinado (Ahemad y Kibret, 2013).

Todos los microorganismos conocidos hasta ahora, con la excepción de ciertos lactobacilos, requieren esencialmente hierro. Las bacterias adquieren hierro mediante la secreción de quelantes de hierro de baja masa molecular denominados sideróforos que tienen constantes de alta asociación para el complejo hierro. La mayoría de los sideróforos son solubles en agua y se pueden dividir en sideróforos extracelulares y sideróforos intracelulares (Ahemad y Kibret, 2013).

2.8.1.7. Producción de ACC desaminasa y regulación del nivel de etileno

En condiciones de estrés como las generadas por salinidad, sequía, anegamiento, metales pesados y patogenicidad, la producción endógena de etileno se acelera sustancialmente lo que afecta adversamente el crecimiento radicular y consecuentemente el crecimiento de la planta en su conjunto que pueden conducir a un rendimiento reducido del cultivo (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Ciertas rizobacterias (PGPR) contienen una enzima vital, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, que regula la producción de etileno al metabolizar ACC (un precursor inmediato de la biosíntesis de etileno en plantas superiores) en alfa-cetobutirato y amoníaco. La inoculación con PGPR que contiene actividad de desaminasa ACC podría ser útil para mantener el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones de estrés al reducir la producción de etileno inducida por estrés (Bhattacharyya y Jha, 2012).

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3. MÉTODO

3.1. Localización del Experimento

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología ubicados en la Finca Experimental “La María”, perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo localizada en el Km 7 1 /2 de la Vía Quevedo – El Empalme, cantón Mocache, provincia de Los Ríos, con coordenadas geográficas 01° 06’ de latitud Sur y 79° 29’ de latitud Oeste. A una altitud de 75 msnm.

3.2. Tipo de investigación

Se utilizó el método experimental comparando información existente en la literatura y estudios anteriores sobre bacterias solubilizadores de minerales, se procedió a las aplicaciones de inoculaciones en semillas de cacao variedad CCN-51, mientras que también se determinó su efecto de protección hacia *P. palmivora*.

3.3. Método de investigación

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

- **Método deductivo:** Será utilizado durante el proceso de evaluación, identificación y caracterización de las bacterias en estudio.

- **Método analítico:** Consiste en descomponer un objeto de estudio separando cada una de las partes del todo para estudiarlas en forma individual.

- **Método de observación:** Consiste en saber seleccionar aquello que queremos analizar.

3.4. Fuentes de recopilación de información

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

3.5. Diseño de la investigación

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el desarrollo morfológico en semillas de cacao CCN-51, generando 10 tratamientos de tres repeticiones cada uno. Todas las variables se sometieron a la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. Se evaluó por medio de un análisis de varianza utilizando el programa estadístico InfoStat.

Tabla 1. Esquema de Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad
Total	29
Tratamientos	9
Error	20

3.5.1. Tratamientos

Se realizó los tratamientos donde las cepas seleccionadas se inocularon en semillas de cacao CCN-51, se evaluaron cada 3 días y se realizó una comparación con un control sin inoculación.

Tabla 2. Tratamientos utilizados en los ensayos *in vitro*.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
T1	Bacteria 1
T2	Bacteria 2
T3	Bacteria 3
T4	Bacteria 4
T5	Bacteria 5
T6	Bacteria 6
T7	Bacteria 7
T8	Bacteria 8
T9	Bacteria 9
T10	TESTIGO (sin Bacteria)

3.6. Instrumentos de Investigación

3.6.1. Manejo del Experimento

3.6.1.1 Aislamiento e identificación de bacterias en los cultivos nativos de cacao CCN-

51

Se recolectaron muestras de distintas partes de la planta (raíces, tallo, hojas y mazorcas enfermas). Las muestras permanecieron almacenadas en fundas ziploc y puestas en una hielera para su transporte al laboratorio para su debido aislamiento.

Para los aislamientos de las bacterias se cogieron muestras de hojas cortadas cuidadosamente en tramos de 2 cm² por separado para ser lavadas con agua potable, después con agua destilada estéril y secadas con papel absorbente (Grellet *et al.*, 2017). Para las muestras de raíces, tallos y frutos enfermos se realizaron cortes de 5 cm para ser macerados en agua destilada estéril y posteriormente realizar las diluciones seriadas Villamil *et al.*, (2015). Los aislados seleccionados fueron identificados bioquímicamente, en un medio de cultivo selectivo King B Agar mencionado por King *et al.* (1954), [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 mL; K₂HPO₄, 1.5 g; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5 g; agar, 15 g)] para su crecimiento las bacterias fueron incubadas a 24 horas a 27°C una vez obtenido su desarrollo, se caracterizaron de acuerdo morfología colonial, tinción de gram y catalasa (Gupta *et al.*, 2012).

La presencia de pigmento fluorescente por parte de las bacterias recolectadas se dio por aparición brillante de color verde-amarillo puestas bajo la luz ultra violeta a 365 nanómetros descrito por (Nathan *et al.*, 2011).

Para determinar la actividad proteolítica se evaluó el avance del halo claro de degradación con relación a la colonia indicando un signo + equivalente a producción normal, ++ producción moderada, +++ producción alta, para este procedimiento se utilizó el medio de cultivo Agar Gelatin (4g peptona, 1g extracto de levadura, 12 g de gelatina, 15 g agar por litro) propuesto por Mediana y Baresi (2007), se inoculó e incubó 10 µl de bacterias en el medio sólido crecidas en el medio de cultivo líquido king B a 27 °C en agitación constante a 200 rpm por 24 horas.

3.6.1.2. Solubilización de nitrógeno, fósforo y potasio

Para esto, se inoculó por separado las bacterias seleccionadas para su crecimiento en medio de cultivo selectivo King B y se mantuvieron en condiciones de temperatura a 28 °C en agitación constante a 180 rpm por 24 h (Liu *et al.*, 2015), se recuperó 5 µL de cada cultivo bacteriano inoculadas en las cajas petri con medio de cultivo Cristensen's Urea Agar [(g/L): peptona 1g, dextrosa 1g, cloruro de sodio 5g, fosfato de potasio 2g, urea 20g, rojo fenol 0.012g, agar 15 g)] (Brink, 2010) para la solubilización de nitrógeno, Pikovskaya modificado [(g/L): glucosa 10g, nitrato de potasio 5g, cloruro de potasio 0.2g, sulfato de amonio 0.5g, sulfato de magnesio 0.1g, púrpura de bromocresol 0.125g, agar 15g)] (Guevara, 2010) para la solubilización de potasio y NBRIP [(g/L): glucosa 10 g, Ca₃PO₄ 5 g, MgCl₂·6H₂O 5 g, KCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, agar 20 g)] (Nautiyal, 1999) para la solubilización de fósforo.

El porcentaje de solubilización de cada nutriente se determinó a las 24, 48 y 72 horas midiendo el avance de la zona de aclaramiento y el diámetro de la colonia para obtener el diámetro total de las solubilizaciones aplicando la siguiente fórmula utilizada por (Nguyen *et al.*, 1992).

$$\text{Solubilización (\%)} = \frac{\text{diámetro del halo} - \text{diámetro de la colonia}}{\text{diámetro de la colonia}} \times 100\%$$

En donde:

% de solubilización= porcentaje de la tasa de solubilización de las bacterias.

Diámetro de la colonia= diámetro de crecimiento de la colonia.

Diámetro del halo= diámetro del halo claro alrededor de la colonia.

3.6.1.3. Aplicación de bacterias seleccionadas en semillas de cacao CCN-51

Los inóculos bacterianos seleccionados se mantuvieron en un caldo nutritivo para su crecimiento incubadas a 28 °C en agitación constante a 180 rpm por 24 horas (Naeem *et al.*, 2018). Para el procedimiento de inoculación en semillas, se separaron las células bacterianas de los metabolitos secundarios en su fase exponencial bajo centrifugación a 3000 rpm por 5 min y lavadas 2 veces en una solución buffer Phosphate Buffered Saline (pH 6.5), para

obtener como producto final únicamente las células bacterianas puras. Para estos ensayos se empleó las inoculaciones de las células puras cada 3 días respectivamente colocándolas en cajas Petri humedecida con algodón a temperatura ambiente (Esmeralda, 2019).

3.6.1.4 Respuesta de las bacterias seleccionadas contra *P. palmivora*

a. Bacteria-Patógeno

Se obtuvo la cepa de *P. palmivora* para los ensayos antagonistas a partir del banco cepas del laboratorio de microbiología, para determinar cuantitativamente el porcentaje de inhibición del oomicetos, se partió con el desarrollo del crecimiento micelial incubadas en PDA por siete días a 28 °C. Las bacterias seleccionadas se sembraron en caldo de cultivo a 28 °C en agitación constante a 180 rpm por 48 horas, se depositó gotas de 5 µL de bacteria en placas de PDA en cuatro extremos equidistantes por triplicado. Se colocó un tarugo (Ø 7 mm) del cultivo de los oomicetos en el centro de la placa. Se incubó durante siete días a 28 °C. La inhibición del crecimiento se evaluará midiendo el diámetro del crecimiento fúngico (cm) y calculando el porcentaje de inhibición mediante la comparación con una placa control) (Acebo *et al.*, 2015), siendo evaluadas a las 24, 48 y 72 horas.

b. Sobrenadante-Patógeno

Para la obtención de sobrenadantes libres de células bacterianas, los aislados seleccionados se cultivaron en 50 ml de caldo nutritivo King B en agitación constante a 180 rpm por 48 horas, las células bacterianas se separaron por centrifugación en tubos falcón de 15 ml a 4000x g por 5 min, el sobrenadante fue trasladado en tubos eppendorf de 1,5 ml por triplicado para otro proceso de centrifugación (Kong y Hong, 2016). Las muestras se filtraron empleando Nalgene Syringe de 0.2 µm y se mantuvieron a choque térmico de 15 min 90 °C y 15 min a -40 °C (El-Sayed *et al.*, 2018), los sobrenadantes obtenidos se sometieron a enfrentamientos para evaluar el porcentaje de inhibición micelial a las 24, 48 y 72 horas, vertiendo 100 µl del sobrenadante usando un asa de DIGRALSKY estéril en el medio de cultivo PDA y por último se colocó un tarugo (Ø 7 mm) del cultivo de los oomicetos en el centro de la placa.

3.6.2 Variables a evaluar

Las variables a evaluar en esta investigación son:

3.6.2.1. Días de germinación (%)

El número de semillas germinadas se evaluó mediante la observación de la emergencia de la radícula y finalmente el porcentaje de germinación se determinó a los 3 días. La tasa de germinación fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ germinación} = \frac{\text{número de semillas germinadas con el inoculo bacteriano}}{\text{número de semillas germinadas con agua (testigo)}} \times 100$$

3.6.2.2. Longitud radicular (cm)

Se midió la longitud radicular en un periodo de 10 días desde la punta inserción de la radícula y el cotiledón, tomando como referencia el avance del desarrollo de cada uno de las semillas evaluadas.

3.6.2.3. Peso radicular (gr)

Se pesó en forma individual el crecimiento radicular de la semilla en un periodo de 10 días con la ayuda de una balanza de precisión para determinar cuál de los tratamientos promueve el desarrollo y elongación de raíces.

3.6.2.4. Volumen radicular (cm³)

Se sumergieron las raíces en el agua en un periodo establecido de 10 días, sin tocar las paredes del vaso, mediante el volumen de agua desplazado por raíz y corona en una probeta de 100 ml. determinó el volumen de la masa radicular en el desarrollo de las semillas.

3.6.2.5. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

El porcentaje de inhibición se evaluó midiendo el crecimiento micelial del hongo a las 24, 48 y 72 horas y calculando la inhibición con un control descrito por Acebo (2015).

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

En donde:

% inhibición= Porcentaje de inhibición del crecimiento de colonias patógenas.

Crecimiento del testigo = Radio de la colonia del patógeno.

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

3.6.3. Tratamientos de los datos

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de las variables de estudio, se realizó mediante un análisis de varianza (ADEVA) y para determinar diferencia significativa, se aplicó la prueba de significación Tukey ($p < 0.05$), este análisis se realizó en el programa estadístico InfoStat versión 2018.

3.7. Materiales

3.7.1. Materiales de laboratorio y reactivos

- ✓ Puntas blancas de micro-pipeta (0.2-10µl)
- ✓ Puntas amarillas de micro-pipeta (2-20µl y 20-200 µl)
- ✓ Puntas azules de micro-pipeta (100-1000µl)
- ✓ Papel Toalla
- ✓ Botellas esterilizables de 500 ml
- ✓ Juego de Micro-pipetas (0.2-10µl, 2-20µl, 20-200µl y 100-1000µl)
- ✓ Frascos de vidrio (500 ml)
- ✓ Tubos de Eppendorf (0.6 ml y 1.5 ml)
- ✓ Papel Parafilm
- ✓ Cajas Petri
- ✓ Guantes Quirúrgicos
- ✓ Tijeras Quirúrgicas

- ✓ King B
- ✓ Sulfato de magnesio hepta-hidratado
- ✓ Bacto™ Peptona
- ✓ Fosfato de potasio dibásico
- ✓ Glicerol
- ✓ Cloruro de potasio
- ✓ Fosfato tricálcico
- ✓ PDA

3.7.2. Equipos de laboratorio

- ✓ Balanza de 0,001 gr
- ✓ Cámara de flujo Laminar
- ✓ Microondas
- ✓ Nevera
- ✓ Vortex
- ✓ Autoclave
- ✓ Estufa
- ✓ Centrífuga
- ✓ Incubadora

3.7.3. Materiales de oficina

- ✓ Cuaderno
- ✓ Computador
- ✓ Lapicero
- ✓ Lápiz
- ✓ USB
- ✓ Pendrive
- ✓ Escritorio
- ✓ Silla

3.7.4. Material vegetal

Tabla 3. Datos geográficos y características agroclimáticas del sitio de recolección de muestras.

Zona de recolección de las muestras		Coordenadas Geográficas	Precipitación (mm)	Temperatura (°C anual)	Humedad relativa %	Heliofanía (anual)	Altitud (msnm)	Superficie km2
Provincia	Cantón							
LOS RÍOS	BABAHOYO	1°49'00" S 79°31'00" O	1909	25.2	85	509.9	1.076	174.6
	BUENA-FE	0°53'35" S 79°29'27" O	1250	23	84	--	103	119
	QUINSALOM A	1°12'22" S 79°08'52" O	1398	27	94	869.4	27	512.5
	MOCACHE	1°11'02" S 79°30'20" O	1626	16	82	899	30	572.3
	QUEVEDO	1°02'00" S 79°27'00" O	2061	25.2	87	626	74	303
	VALENCIA	0°57'09" S 79°21'11" O	1948	24	86	890	60	987
	VENTANAS	1°26'29.7" S 79°27.566" O	2136	25.1	87	800	24	533
GUAYAS	MILAGRO	2°07'37" S 79°35'57" O	4283	25	80	1036.5	11	405.64
	EMPALME	1°02'46" S 79°38'01" O	1530	24	75	---	71	711
BOLÍVAR	NAVES	1°17'00" S 79°18'00" O	2500	26	72	626	676	148.82
ESMERALDA	QUININDÉ	0°20'00 N 79°29'00 O	2300	26	89	1078	190	3855
MANABÍ	OLMEDO	1°23'46" S 80°12'22" O	1550	25.2	78	1415	334	253
SANTA ELENA	SANTA ELENA	2°13'34.39" S 80°51'31.43" O	1626	23.4	89	1005	313	12289.5

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de minerales

De los aislados bacterianos procedentes de las huertas cacao de la variedad CCN-51 se rescataron 238 cepas de las distintas partes morfológicas de la planta como el tejido del sistema radicular, tejido foliar, tallos y mazorcas enfermas (Tabla 4). En la provincia de Los Ríos se recolectaron 15 cepas bacterianas procedentes del cantón Babahoyo 10 bacterias son de tejido del sistema radicular, 3 bacterias son del órgano vegetativo foliar y 2 bacterias son del tallo, 6 cepas bacterianas del cantón Buena Fe son del tejido de sistema radicular, 21 cepas bacterianas del cantón Quinsaloma 17 bacterias recolectadas son del tejido radicular, 3 bacterias son del órgano vegetativo foliar y 1 bacteria son del tallo.

Se rescató 19 cepas bacterianas del cantón Mocache 8 bacterias son de tejido del sistema radicular, 4 bacterias son del órgano vegetativo foliar y 7 bacterias son de mazorcas infectadas, 24 cepas bacterianas del cantón Quevedo 3 bacterias son de tejido del sistema radicular, 6 bacterias son del tallo y 15 bacterias son de mazorcas infectadas, 15 cepas bacterianas del cantón Valencia 4 bacterias son de tejido del sistema radicular, 4 bacterias son del tallo y 7 bacterias de mazorcas infectadas, 24 cepas bacterianas del cantón Ventanas, 19 bacterias son del tejido radicular y 5 bacterias son del órgano vegetativo foliar, 22 cepas bacterianas del cantón Milagro 12 bacterias son de tejido del sistema radicular y 10 bacterias son del órgano vegetativo foliar.

Se recuperaron 20 cepas bacterianas del cantón Empalme 17 bacterias son de tejido del sistema radicular y 3 bacterias son del tallo, 28 cepas bacterianas del cantón las Naves 4 bacterias son de tejido del sistema radicular, 9 bacterias son del órgano vegetativo foliar, 5 bacterias son del tallo y 10 bacterias son de mazorcas infectadas. Se recolectaron 11 cepas bacterianas del cantón Quinindé 6 bacterias son de tejido del sistema radicular y 5 bacterias son del órgano vegetativo foliar, 24 cepas bacterianas del cantón Olmedo 4 bacterias son de tejido del sistema radicular 3 bacterias son del tallo y 17 bacterias son de mazorcas infectadas, 9 cepas bacterianas del cantón Santa Elena 6 bacterias son de tejido del sistema radicular y 3 bacterias son de mazorcas infectadas (ver anexo 1).

Tabla 4. Cepas bacterianas obtenidas a partir de diferentes partes morfológicas de plantas de cacao.

PROVINCIA	CANTÓN	CANTIDAD DE BACTERIAS	TOMA DE MUESTRA				CEPAS
			Raíz	Hoja	Tallo	Mazorcas Enfermas	
LOS RÍOS	BABAHOYO	15	10	3	2		ESP 1; ESP 2; ESP 3; ESP 4; ESP 5; ESP 6; ESO 7; ESO 8; ESO 9; ESO 10; ESO 12; ESO 11; ESO 20; ESO 30
	BUENA FE	6	6				BF 10-20; BF 1-13; BF 4-20; BF 567; BF 8-16; BF 3-4;
	QUINSALOMA	21	17	3	1		RED 1-2; RED 3-20; RED 5-30; RED 5-16; RZ 21; RZ 20; RZ 14; RZ 19; RZ 24; RZ 29; RZ 30; RZ 41; RZ 39; RZ 54; RZ 31; RZ 49; RZ 90; RZ 87; RZ 32; RZ98; RZ 44
	MOCACHE	19	8	4		7	MH1-2; MH 18; MC 2-15; MC 3-20; MC 8-10; MC5-20; MM4-10; MM6-8; HH2-4; HH 7-50; PM 38; PM 29; PM 47; OM 21; PM 39; PM 32; PM 18; PM 56; PM 65
	QUEVEDO	24	3		6	15	PM 2-3; TN 9-20; TN 5-8; TN 3-9; TN 6-24; TN 3-21; TN 4-3; PR 3-4; RI 90-2; MZ 34; MZ 21; MZ 65; MZ 98; MZ 50; MZ 30; MZ 38; MZ 19; MZ 32; MZ 89; MZ 50; MZ 09; MZ 75; MZ 98; MZ 70
	VALENCIA	15	4		4	7	G 2-14; FZ 9-7; LH 5-10; LH 25-13; WW 20; WW 30; WW 21; WW 89; WW 45; WW 65; WW76; WW89; WW 15; WW 32; WW 85
	VENTANAS	24	19	5			V 9-25; V 31-50; V 45-6; V 8-30; V 62-32; V5-40; V3-50; V20-40; V18-45; V 23-42; VN 89; VN6; VN 4; VN 62; VN 1; VN 12; VN 9; VN 2; VN 8; VN 19; VN 54; VN 20; VN 30; VN 54
GUAYAS	MILAGRO	22	12	10			MH 6-10; MH 4-20; MH 18-32; MH 42-10; MH 32-20; MH 2-7; RR 001; RR 002; RR 003; RR004; ML 12; ML 32; ML 2; ML 19; ML 20; ML 32; ML 1; ML 42; ML 9; ML 54; ML 13; ML 98
	EMPALME	20	17		3		EMP 42-60; EMP 12-50; ME 1; ME 23; ME 54; ME 12; ME 56; ME 87; ME 12; ME 43; ME 65; ME 87; ME 6; ME 8; DC 8-30; DC 5-30; DC 13-5; DC 40-10; DC 29-8; DC 4-8
BOLIVAR	NAVES	28	4	9	5	10	MN 6-1; MN 6-12; MN7-3; MN 7_8 MN 7-10; MN 7-1; MN 7-2; MN7-4; MN 7-5; MN 7-6; MN 7-20; MN 7-14; MN 8-4; MN 6-3; MN 8-5; MN 43-5; MN 3-2; MN 5-19; MN 5-20; MN 6-21; MN 6-25; MN 52-50; MN 12-59; MN 61-9; ZT 5-12; ZT 64-5; ZT 5-34; ZT 9-32
ESMERALDA	QUININDÉ	11	6	5			HJ 2-5; HJ 5-12; HJ 3-5; HJ 24-2; HJ 54-20; HJ 51-90; HJ 42-40; HJ 59-70; PV-25; HJ 3-40; HJ 5-60
MANABÍ	OLMEDO	24	4		3	17	CT-12; CT 43; CT 50; TC 21; TC 40; TC 46; TC 68; TC 42; TC 5; TC 6; TC 1; TC 8; TC 54; TC 90; TC 86; TC 65; TC 10; TC 20; TC 43; TC 60; TC 70; TC 34; RS 21-30; RS45-10; RS 56-80
SANTA ELENA	SANTA ELENA	9	6			3	LT 4-23; LT 4-29; CH 3-21; CH 41-5; CH 32-4; CH-12; AC1; AC2; AC3

4.2. Identificación de bacterias solubilizadoras de minerales seleccionadas por caracteres morfológicos y bioquímicos.

En las bacterias recolectadas de diferentes tejidos vegetales del sistema radicular, foliar, tallo y mazorcas enfermas de la planta de cacao en la provincia de los Ríos, Guayas, Bolívar, Esmeralda, Manabí y Santa Elena se evaluó la presencia de la actividad proteolítica (proteasa) que mostraron un halo de degradación alrededor de la colonia a las 24 horas después de inoculación, catalasa indico la formación rápida de burbujas de gas significa resultados positivos y la presencia de pigmentación fluorescente que exhibieron tonalidad verde fluorescente bajo luz ultravioleta a 365nm, de esta manera se permitió la selección de 9 cepas (BF-567; MH-18; FZ 9-7; MN 5-20; AC3; LH 5-10; MH 4-20; MN 5-19; PV-25), que presentaron todas las características que las considerada como PGPR que son mecanismos eficiente que contribuyen de manera directa o indirecta empleando una actividad antagonista para minimizar o prevenir la proliferación de hongos fitopatógeno, esta identificación es de alta relevancia mientras que las 229 cepas restantes no presentaron características acordes a su selección o consideradas como bacterias potenciadores de especies vegetales.

La evaluación de los caracteres morfológicos de las bacterias seleccionadas se destacó por la formación de colonias: 4 de ellas son circular, 4 cepas son puntiforme, 1 cepa es granular. Por su elevación: 3 bacterias son convexa, 2 bacterias son elevadas, 4 bacterias son planas. Para la forma del borde se observaron 6 bacterias de borde entero, 2 bacterias de borde ondulado y una bacteria de borde dentada, la morfología de las colonias es fundamental en la identificación de preseleccionamiento y para la diferenciación de los microorganismos. El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie.

Por último, la identificación de tinción de gram mostró que todas las bacterias presentaron tinción de coloración rosada característico de las bacterias gramnegativa presentando dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano (Tabla 5), mientras que las bacterias grampositivas retienen el colorante de cristal violeta durante el proceso de coloración porque presentan una capa muy delgada de peptidoglucano en su pared celular y su capa más externa está cubierta por una membrana de lipoproteínas, por tanto, estas mismas cepas que presentaron rasgos relevantes se seleccionaron para inspeccionar la potencialidad de solubilizar nitrógeno, fosforo y potasio.

Tabla 5. Identificación bioquímica y morfológica de bacterias solubilizadoras de minerales

BACT	TEJIDO VEGETAL	MECANISMO DE ACCIÓN																	
		FORMA			ELEVACIÓN			FORMA DE BORDE			TINCIÓN GRAM	CATALASA	SOLUBILIZACIÓN			INDIRECTO			
													SOLUBILIZACIÓN			INDIRECTO			
		CR	PT	GN	CV	EV	PN	ET	OD	DD	NIT	FOS	POT	PR	FLUOREST				
BF 567	R	+					+		+			-		+	++	+++	++	+++	++
MH 18	R	+					+		+			-		+	+	+	++		+
FZ 9-7	R	+					+		+			-		+	++	++	++	+++	+++
MN 5-20	MI		+					+	+			-		+	+	+	++	+++	++
AC3	MI		+					+	+			-		+	+	+	++	++	+
LH 5-10	R	+						+	+			-		+	+	+	++	++	+++
MH 4-20	H		+			+				+		-		+	+	+	+	+	+
MN 5-19	MI		+			+				+		-		+	+	+	+	++	+
PV-25	H			+		+					+	-		+	+	+	+	+	+

Bact: bacteria, R: raíz, H: hoja, MI: mazorca infectada, CR: circular, PT: puntiforme, GN: granular, CV: convexa, EV: elevada, PN: plana, ET: entera, OD: ondulada, DD: dentada, NIT: nitrógeno, FOS: fosforo, POT: potasio, PR: proteasa, FLUOREST: fluorescente.

+: producción normal, ++: producción moderada, +++: producción alto

4.3. Evaluación de la solubilización de minerales con bacterias seleccionadas

4.3.1. Bacterias solubilizadoras de nitrógeno

La velocidad del halo de solubilizar el nitrógeno se verificó a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación con las bacterias seleccionadas en un medio de cultivo Cristensen's Urea Agar, donde se verificó que las cepas FZ 9-7 y BF-567 recolectadas a partir de tejido radicular y obtenidas en el cantón Valencia y Buena-Fe son estadísticamente iguales con promedios correspondientes al 95% y 92% (Figura 1), destacándose de las cepas MH 18 recolectadas del tejido radicular procedente del cantón Mocache, PV-25 y MH 4-20 ambas recolectadas del órgano vegetativo foliar obtenidas en los cantones Quinindé y Milagro que presentaron promedios ente 83% y 81% (ver anexo 2).

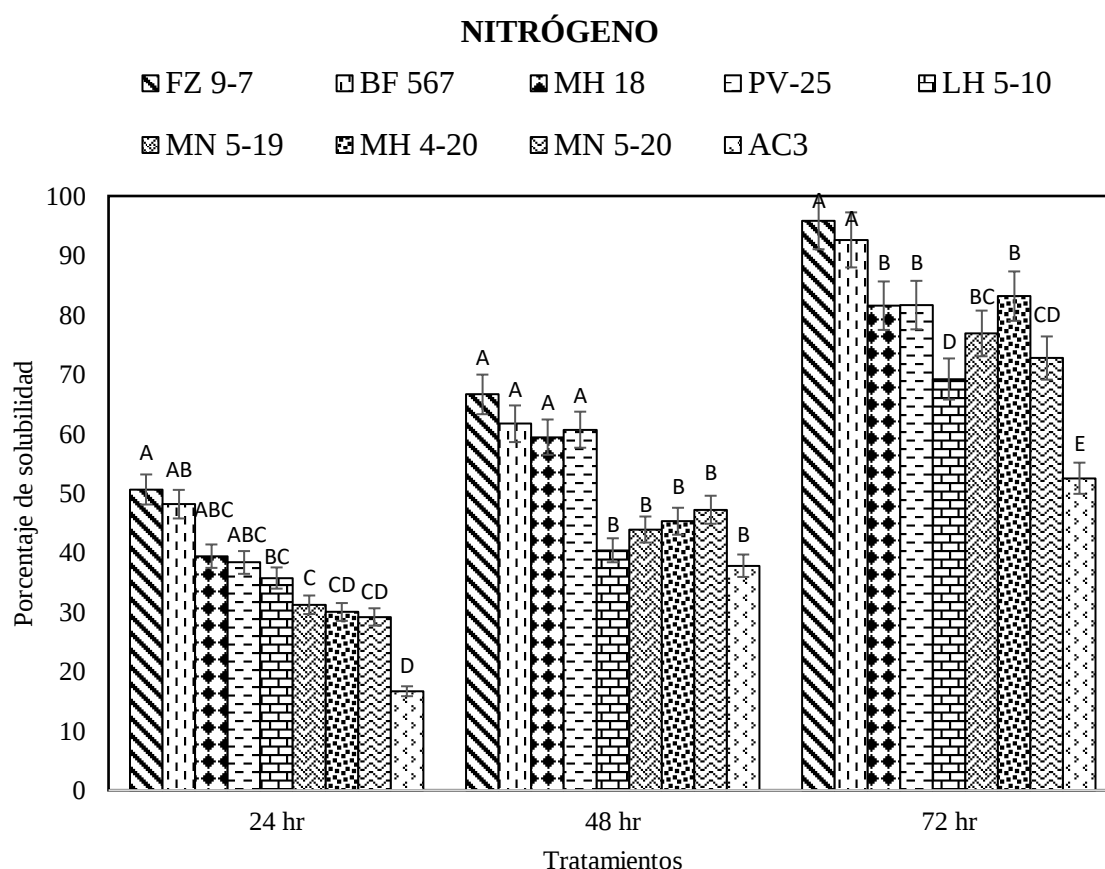


Figura 1. Solubilización de nitrógeno con bacterias seleccionadas.

Las barras de error indican $\pm$ Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.3.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo

La velocidad del crecimiento del halo en relación a la colonia bacteriana con capacidad de solubilizar fósforo fue prevista a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación de las bacterias seleccionadas en el medio de cultivo NBRIP, donde se observó que las cepas BF-567 procedentes del sistema radicular obtenida en el cantón Buena-Fe (Figura 2), MH 4-20 aislada del órgano vegetativo foliar y obtenida en el cantón Milagro y la AC3 de muestras de mazorcas infectadas obtenida en el cantón Santa Elena son estadísticamente iguales con promedios pertenecientes del 90, 89 y 85% respectivamente, a continuación la cepa LH 5-10 aisladas de tejido radicular u obtenidas en el cantón Valencia proporcionó un efecto de solubilidad del 75.33%, mientras que las cepas MN 5-19, MN 5-20 aisladas de mazorcas infectadas y obtenidas en el cantón Las Naves y la FZ 9-7 aisladas del tejido radicular y obtenidas en el cantón Valencia presentaron un crecimiento de degradación bajo a las 72 horas después de la incubación (ver anexo 3).

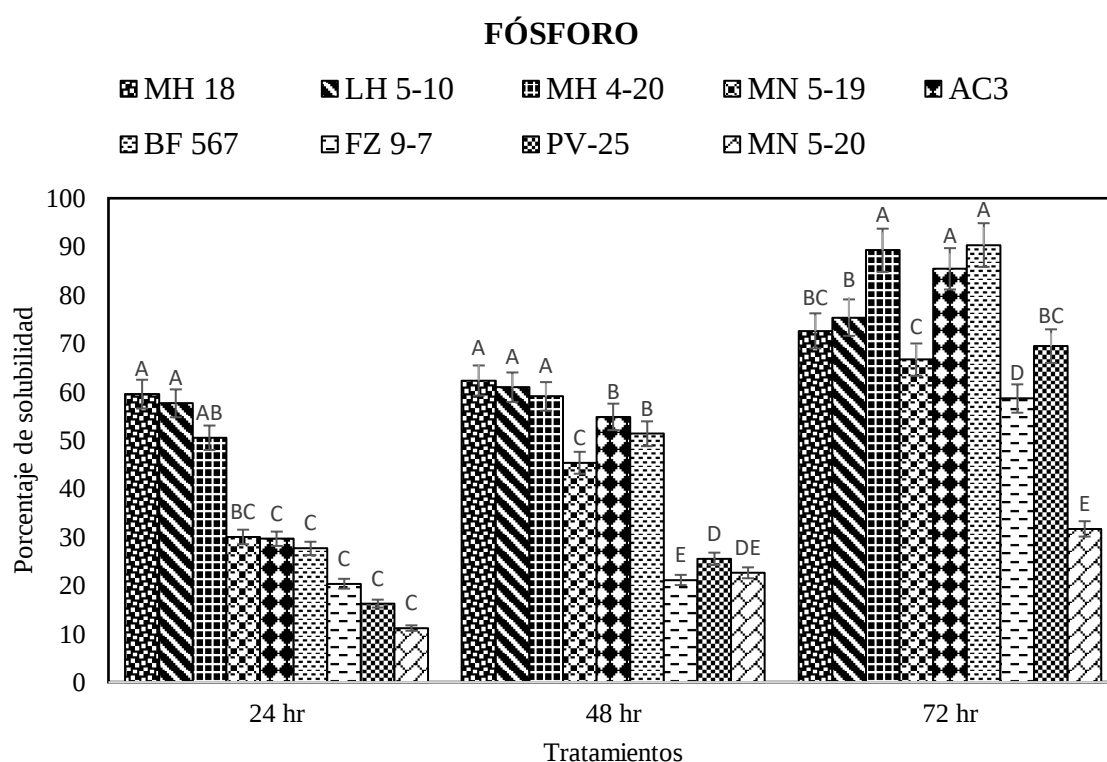


Figura 2. Solubilización de fósforo inorgánico con bacterias seleccionadas.

Las barras de error indican $\pm$ Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.3.3. Bacterias solubilizadoras de potasio

La velocidad del crecimiento del halo en relación a la colonia bacteriana con capacidad de solubilizar potasio fue verificada a las 24, 48 y 72 horas después de la incubación de las bacterias seleccionadas en medio de cultivo Pikovskaya modificado, observando significancia estadística (Figura 3) en la cepa BF-567 recolectadas de tejido radicular obtenida en el cantón Buena-Fe presentaron valores de 53%, 82% y 100% sin diferir de los demás tratamientos (ver anexo 4).

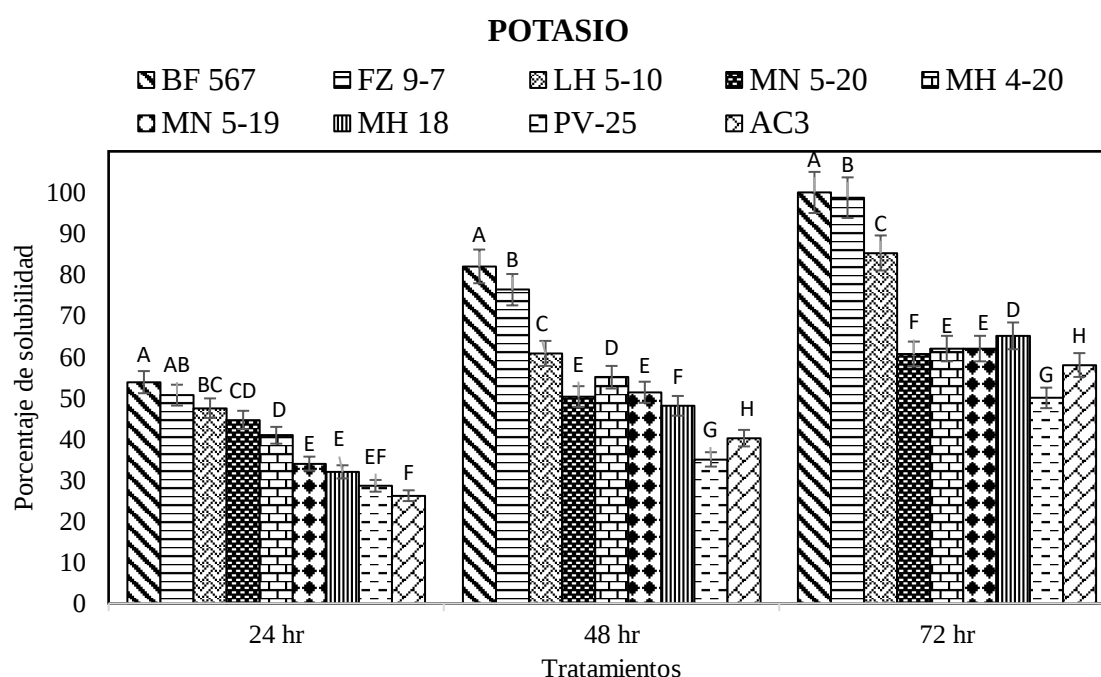


Figura 3. Evaluación del halo de solubilización de potasio con bacterias seleccionadas.

Las barras de error indican $\pm$ Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.4. Aplicación de bacterias seleccionadas en semillas de cacao CCN-51

4.4.1. Días de germinación

Se confirmó la emisión radicular en el proceso germinativo a los 3 días después de la inoculación con las bacterias solubilizadoras de minerales donde las cepas MN 5-19 y AC3 son procedentes de mazorcas infectadas obtenidas en los cantones Las Naves y Santa Elena, PV-25 obtenida a partir del tejido foliar en el cantón Quinindé, FZ 9-7 y BF-567 obtenidas

de la radícula en el cantón Valencia y Buena-Fe son estadísticamente iguales con 100% de germinación superando a los demás tratamientos evaluados (Figura 4 y 5).

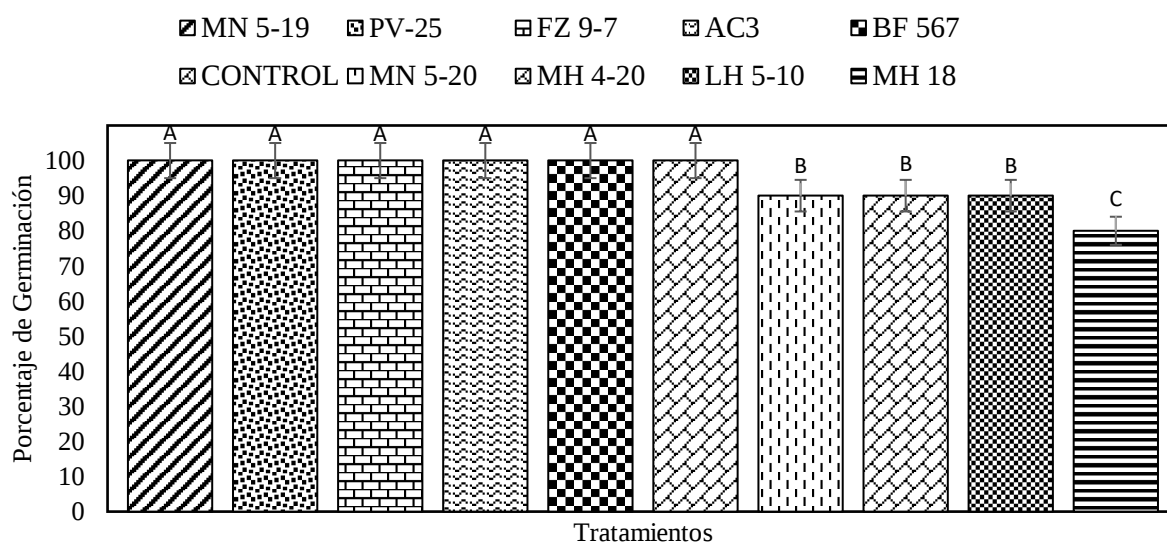


Figura 4. Efectos de las bacterias en el porcentaje de germinación.

Las barras de error indican $\pm$ Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).



Figura 5. Germinación de semillas de cacao CCN-51, inoculadas con bacterias seleccionadas.

A. MN 5-19, B. PV-25, C. FZ 9-7, D. AC3, E. BF-567, F. CONTROL, H. MN 5-20, I. MH 4-20, J. LH 5-10, K. MH-18.

4.4.2. Longitud radicular

La aplicación de las bacterias seleccionadas logró efectos bioestimulante en la estructura del sistema radicular, a los 10 días después de la inoculación se encontró diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados, observando la mayor longitud radicular con 5.67 cm con la aplicación de la cepa FZ 9-7 aislada del tejido radicular y obtenida en el cantón Valencia, también se observó incremento en la longitud radicular con 4.83 cm en la inoculación con la cepa MN 5-20 recolectada de mazorcas infectadas obtenida en el cantón Las Naves, además en las cepas BF-567 y LH 5-10 aisladas del tejido radicular obtenidas en los cantones Buena-Fe y Valencia, la cepa MN 5-19 aislada de frutos enfermos obtenida en el cantón Las Naves y MH 4-20 aislada del tejido foliar obtenida en el cantón Milagro presentaron emisiones radiculares que varían 3.87 a 3.53 cm. Al mismo tiempo, se observó un efecto negativo por parte de las demás cepas al sistema radicular donde se observa un proceso lento igual al control (Figura 6).

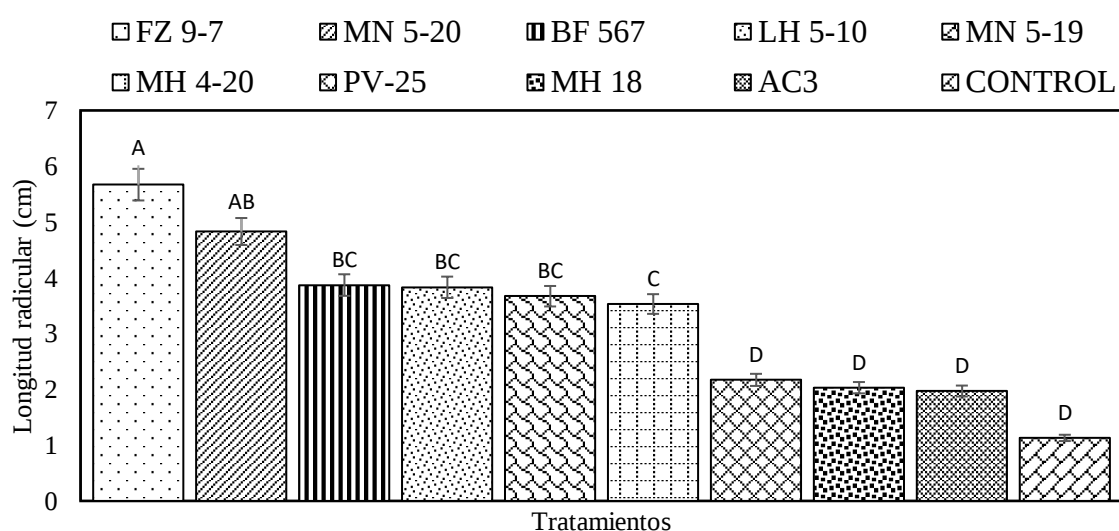


Figura 6. Longitud radicular de cacao CCN-51 inoculadas con bacterias seleccionadas.

Las barras de error indican $\pm$ Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.4.3. Peso radicular

La inoculación con la cepa FZ 9-7 recolectada del sistema radicular y obtenida en el cantón Valencia presentó mayor peso radicular de 3.57 gr esto se observó a los 10 días después de

la inoculación presentando diferencias estadísticas con las cepas MH 4-20, PV-25 aisladas del tejido foliar y procedentes de los cantones Milagro y Quinindé, MN 5-19 y MN 5-20 aisladas de fruto enfermos procedente del cantón Las Naves, LH 5-10, BF 567 y MH 18 aisladas del tejido radicular y obtenida en los cantones Valencia, Buena-Fe y Mocache presentaron promedios que oscilan entre 2.78 a 2.3 gr mientras que la cepa AC3 recolectadas de mazorcas infectadas u obtenida en el cantón Santa Elena obtuvo un promedio de 1.66 gr (Figuras 7 y 8).

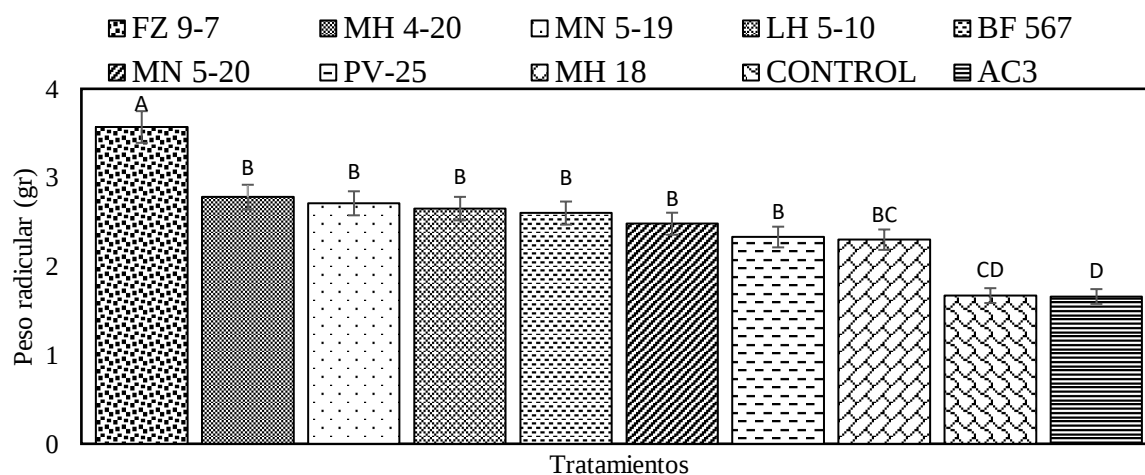


Figura 7. Peso radicular de cacao CCN-51 inoculadas con bacterias seleccionadas.

Las barras de error indican $\pm$ Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

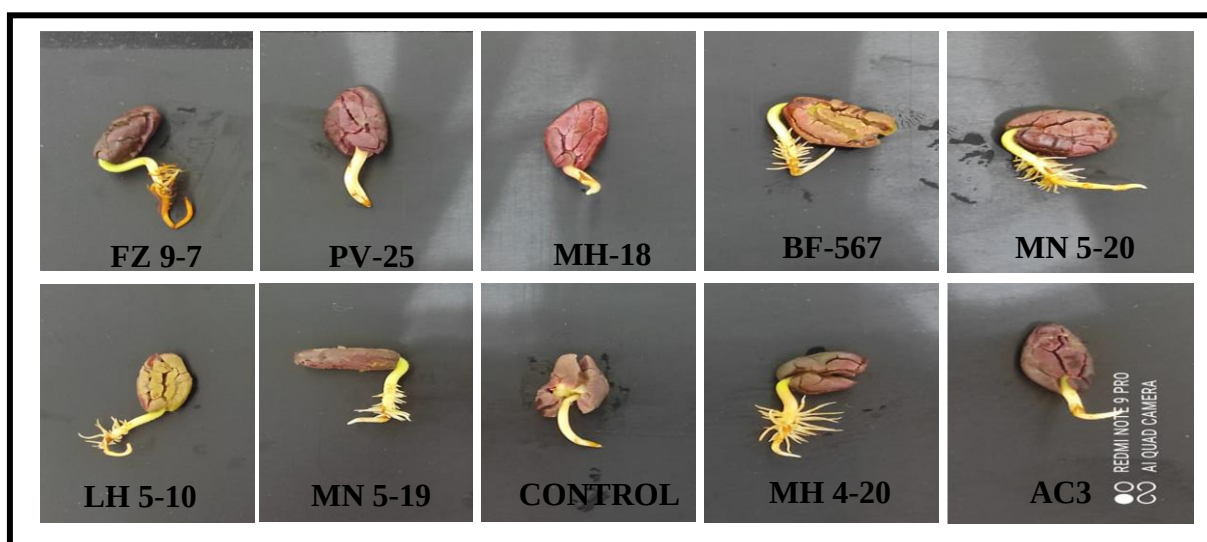


Figura 8. Efecto de las bacterias solubilizadoras de minerales en la longitud y peso radicular en plántulas de cacao CCN-51.

4.4.4. Volumen radicular

Se evaluó el volumen radicular a los 10 días después de la inoculación, donde se observó que la cepa FZ 9-7 procedente del cantón Valencia aisladas del tejido radicular proporciono mayor masa radicular efectuando mayor absorción de agua, con un promedio de 92.43 centímetros cúbicos respectivamente, sin diferir estadísticamente de los tratamientos MN 5-19, MN 5-20 y AC3 aisladas de frutos enfermos obtenidas en los cantones Las Naves y Santa Elena, MH 4-20 obtenidas de tejido foliar procedente del cantón Milagro, LH 5-10 aislada del sistema radicular obtenida en el cantón Valencia, proporcionó masa radicular con valores que oscilan 91.83 a 90.55 cm³, a excepción que las cepas BF 567 y MH-18 aisladas del tejido radicular obtenidas en los cantones Buena-Fe y Mocache, PV-25 aislada del tejido foliar y obtenida en el cantón Quinindé y el control presentaron valores de 90.27 a 90.04 milímetros, respectivamente (Figura 9).

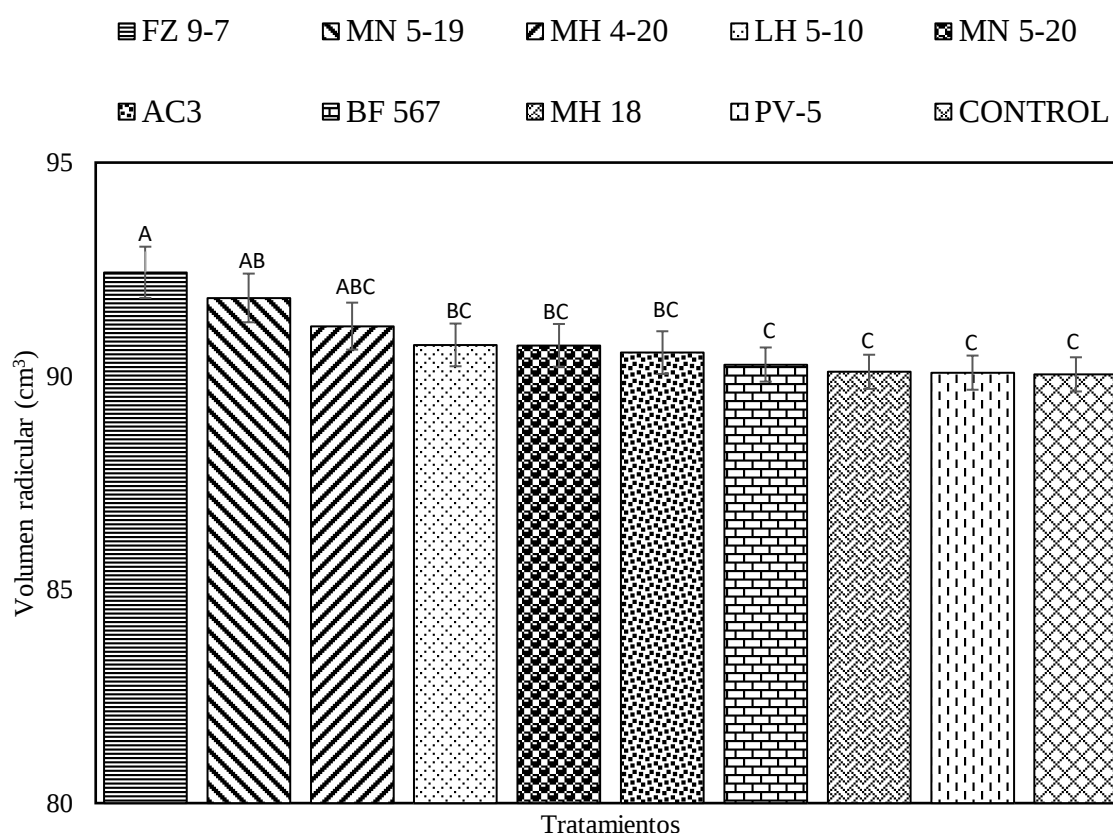


Figura 9. Volumen radicular de cacao CCN-51 inoculadas con bacterias seleccionadas.

Las barras de error indican $\pm$ Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.5. Respuesta protectora de las bacterias seleccionadas contra *P. palmivora*

4.5.1. Actividad antagonista bacteria patógeno

La cepa FZ 9-7 aislada de muestras obtenida en el cantón Valencia a partir de la radícula y evaluadas a las 24, 48 y 72 horas después de la aplicación presentó el mayor porcentaje de inhibición con promedio superior al 85.67 % (Figura 10), seguida de la muestra BF-567 aislada de muestras de raíces obtenida en el cantón Buena-Fe presentó un promedio de inhibición del 76.67%, superando a los demás tratamientos seleccionados como el MH 4-20 aisladas del tejido foliar obtenido en el cantón Milagro que obtuvo un 66.33%, seguido de la LH 5-10, MH 18 aislados del sistema radicular y obtenidos en los cantones Valencia y Mocache con valores del 63% y 57%, respectivamente. Por último, la MN 5-20 y la AC3 aisladas de mazorcas enfermas obtenidas en el cantón Las Naves y Santa Elena demostraron tener rangos entre el 60.33% y 57.33%, respectivamente (ver anexo 5).

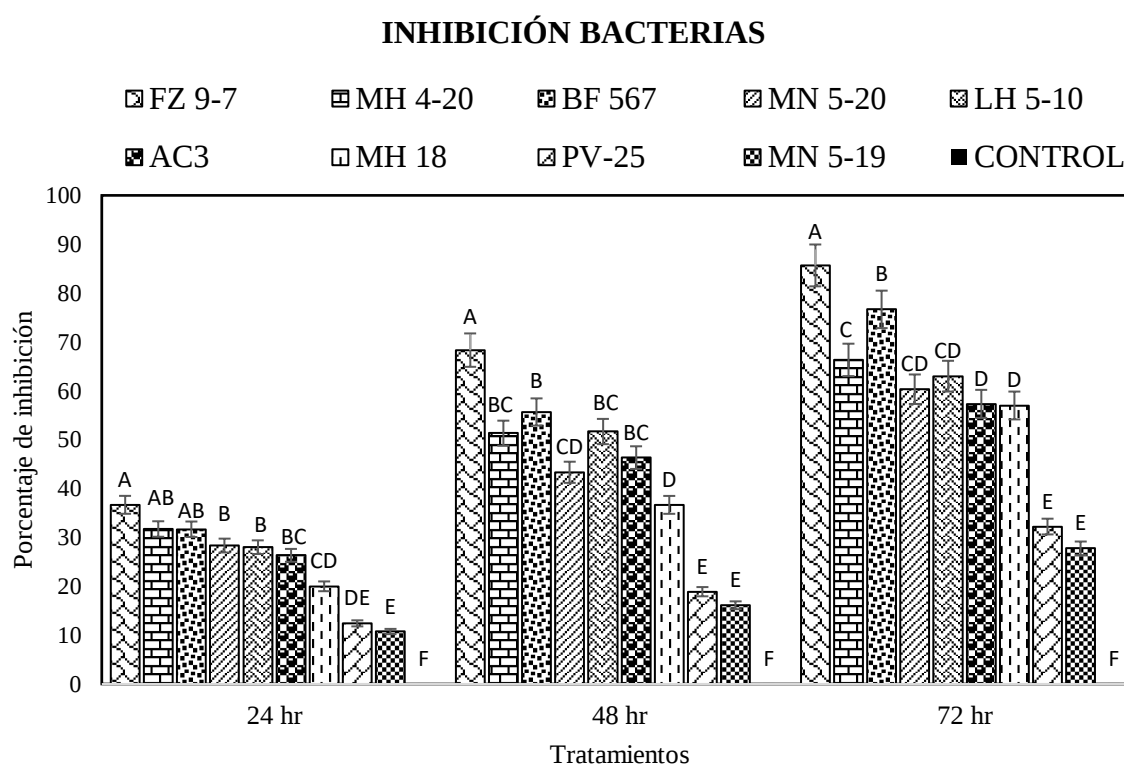


Figura 10. Efecto de la inoculación bacteriana sobre el crecimiento micelial de *P. palmivora*.

Las barras de error indican $\pm$ Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.5.2. Actividad antagonista con sobrenadantes

Se confirmó la disminución del crecimiento micelial de *P. palmivora* con la aplicación de los sobrenadantes bacterianos evaluados a las 24, 48 y 72 horas después de la aplicación, destacándose la cepa FZ 9-7 procedente del cantón Valencia recuperada del sistema radicular proporcionó una actividad antagonista superior con el 86.44% (Figura 11), mientras que en la cepa BF 567 de la zona de Buena-Fe obtenidas de raíces se observó un porcentaje del 71.11%, seguida de las cepas MN 5-19 obtenidas de frutos infectados procedente del cantón Las Naves y AC3 aislada de raíces procedente del cantón Santa Elena mostraron reducción del 65.33% y 51.67% superando al control que no presentó disminución alguna en su crecimiento micelial (ver anexo 6).

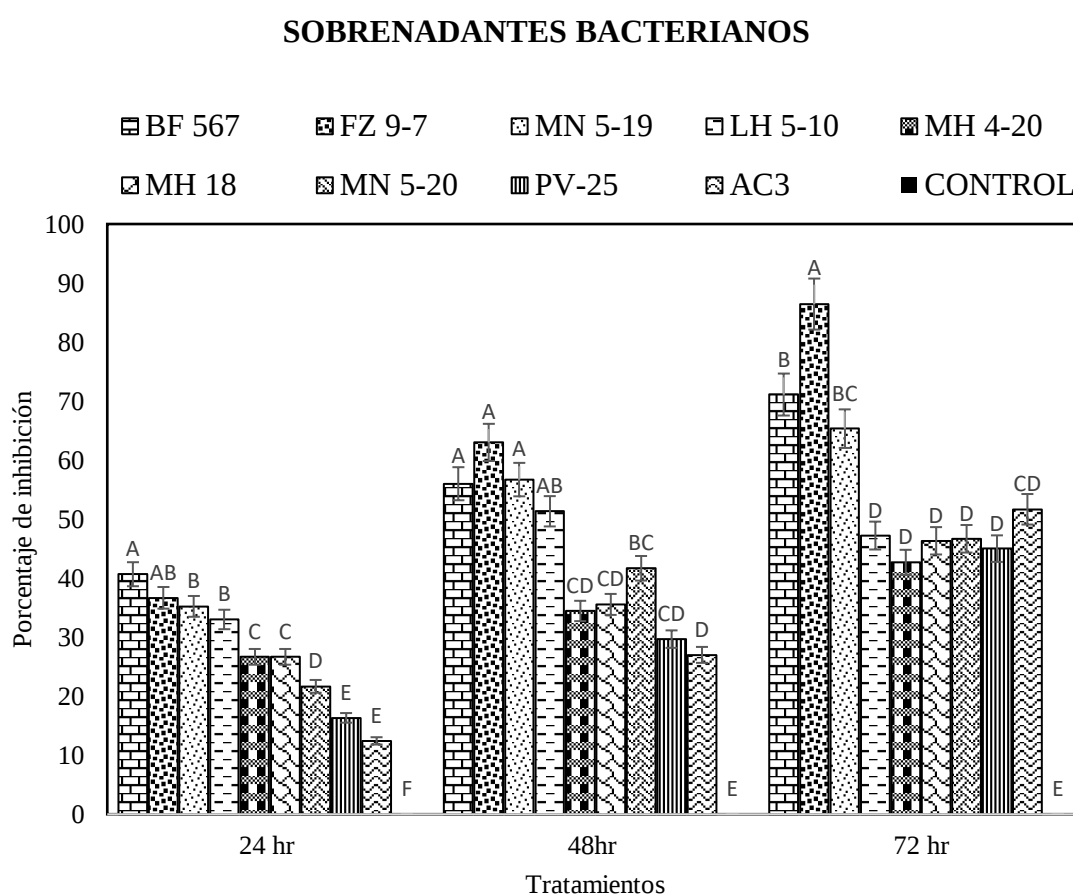


Figura 11. Efectos de los sobrenadantes bacterianos sobre la inhibición del crecimiento micelial de *P. palmivora*.

Las barras de error indican $\pm$ Error estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.6. Discusión

4.6.1. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de minerales

Se estableció un banco de germoplasma de bacterias recolectadas de un total de 238 cepas de distintas partes de la planta obteniendo como producto final una diversidad genética de bacterias endófitas que presentan pigmentos fluorescentes con características al género de *Pseudomonas* spp. Ortiz-Galeana *et al.*, (2018) detalla haber realizado 92 aislados bacterianos de diferentes tejidos raíces, hojas y tallo de plantas de arándano de 12 meses de edad a campo cerrado, en cambio Villamil *et al.*, (2015) recolectó un total de 53 cepas microbianas endófitas a partir de suelo rizosférico y frutos infectados con *M. royeri* en árboles de más de 40 años de edad. Según afirma Yan *et al.*, (2018) que las rizobacterias endófitas juegan un rol fundamental en las interacciones simbiótica planta-microbiana y en la regulación del crecimiento de las plantas en condiciones normales y desafiantes, pero no les causan enfermedades, mejora la absorción de nutrientes de las plantas. Algunas bacterias endofíticas pueden tener una amplia gama de huéspedes y pueden usarse como bioinoculantes en el desarrollo de un sistema agrícola seguro y sostenible Afzal *et al.*, (2019).

La identificación de los rasgos bioquímicos y morfológicos de todos los aislados bacterianos crecidos en medio de cultivos selectivo King B se caracterizaron por tener caracteres pertenecientes a este género *Pseudomonas* spp por ser bacterias gram negativas por el método de identificación bioquímico de tinción de gram y morfología colonial y por su capacidad de producir enzimas y metabolitos secundarios que presentan actividad antagonista contra hongos fitopatógenos tales como la producción de proteasas, catalasas, fluorescencia. Coincidiendo con Tariq *et al.*, (2019) en el cultivo de arroz y verificados por Nepali *et al.*, (2018), se seleccionaron estas características como indicativo para su preselección reduciendo de manera simultánea el banco total de cepas bacterianas aisladas a nueve cepas que contienen todos los parámetros bioquímicos de identificación, que concuerda con El-Sayed *et al.*, (2014) quienes recolectaron 531 aislados microbianos de muestras de suelo de varias especies de plantas silvestres y nativas recolectadas de las cuales solo reaccionaron 66 cepas que mostraron rasgos de ser rizobacterias fijadoras de nitrógeno

atmosférico, fosfato mineral, solubilizadoras de zinc, producción de AIA y con efecto biocontrolador contra *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Las rizobacterias endófitas han sido utilizadas como recurso para la absorción de macronutrientes, para mejorar el estado de crecimiento de la planta. En este ensayo se pusieron a prueba las nueve cepas bacterianas seleccionadas para ver su efecto de solubilizar N, P y K *in vitro*. Entre las nueve cepas seleccionadas, recalca las cepas FZ 9-7, BF-567 recuperadas de muestras radiculares procedente del cantón Valencia y Buena-Fe, MH 4-20 nativa de la filosfera de la zona de Milagro y AC-3 originaria de mazorcas infectadas de Santa Elena las mismas que obtuvieron mayor porcentaje de solubilización de los macronutrientes efectuado a través de procesos bioquímicos como la acción de ácidos orgánicos producto del metabolismo de los microorganismos, la quelación de elementos que impiden la solubilización de los minerales presentes en el suelo y la asimilación directa de nutrientes insolubles por microorganismos que lo acumulan para posteriormente liberarlo, el pH, la salinidad y la temperatura.. Acorde con los datos de Koua *et al.*, (2020) y Bechtaoui *et al.*, (2019) en cultivo de haba, trigo y cacao destacándose que, en las pruebas de avance de halo de degradación de minerales, encontró que las cepas con mayores porcentajes de solubilización fueron *B. subtilis*, *E. aerogenes* y *P. fluorescens* con 97.33%, 90% y 85% en todos los principales macronutrientes. Gran cantidad de rizobacterias son capaces de solubilizar minerales insolubles mejorando el crecimiento y rendimiento de una gama de varios cultivos perennes y ciclo corto mejorando de manera sofisticada la fertilidad del suelo presentando la biodiversidad genética y reemplazando los fertilizantes químicos convencionales en la agricultura comercial Alori *et al.*, (2017).

4.6.2. Aplicación de bacterias seleccionadas en semillas de cacao CCN-51

En el experimento de evaluación de desarrollo morfológico de la semilla fueron inoculadas con las bacterias seleccionadas BF-567, MH-18, FZ 9-7, MN 5-20, AC-3, LH 5-10, MH 4-20, MN 5-19 y PV-25 aisladas del tejido radicular, foliar y del vástago las mismas que destacaron obtener un efecto estimulante en el porcentaje de tasa germinativa, longitud, peso y volumen radicular. Considerando que la aplicación solo del sedimento bacteriano de la cepa FZ 9-7 rescatada del sistema radicular ejerce un cambio sustancial en la arquitectura del sistema radicular, a las interacciones simbióticas en los estadios tempranos del proceso germinativo de las semillas. Esto concuerda con lo planteado por Qessaoui *et al.*, (2019)

donde al evaluar el sistema radicular del cultivo de tomate se observó los efectos de la aplicación de rizobacterias que expresaron una mayor longitud y peso radicular de 8.75 cm y 6 gr respectivamente al ser inoculadas con *P. fluorescens*, mientras que Ben *et al.*, (2016) establece obtener una tasa de germinación del 100% en el mismo cultivo. Las cepas prospera al estar interactuando en las raíces con el hospedero proporcionándole el aminoácido triptófano a la población bacteriana el cual produce la liberación de la hormona auxínica ácido indol acético capaz de mejorar la rizogénesis Silini *et al.*, (2016).

4.6.3. Respuesta protectora de las bacterias seleccionadas contra *P. palmivora*

4.6.3.1. Bacteria-patógeno

En este ensayo se detectaron efectos de reducción de crecimiento micelial de *P. palmivora* destacándose la cepa FZ 9-7 originaria de la zona de Valencia y aislada de raíces demostró obtener el mayor porcentaje inhibitorio de crecimiento micelial lo que se atribuye a la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos y antifúngicos, los cuales, al entrar en contacto con el hongo, impiden su desarrollo radial normal. Del mismo modo Wibowo *et al.*, (2020) observo que solo 72 bacterias aisladas de suelo rizosféricas tienen un efecto biocontrolador contra *P. palmivora* en cultivos de cacao con porcentajes del 97% y 55% con un diámetro de crecimiento micelial visualizados con rangos que van entre 38 mm y 2.5 mm, resultados similares se encontraron en los ensayos duales de enfrentamientos bacterianos contra *P. megakarya* por Sani *et al.*, (2019) la cepa 111B (*Pantoea* sp) mostro el mayor porcentaje de inhibición del 90 %, seguido de la cepa 130B (*Microbacterium* sp) y 140B (*Bacillus* sp) que obtuvieron rangos de 98.15% y 87.53%.

4.6.3.2. Sobrenadante-patógeno

El presente ensayo de evaluación de sobrenadantes bacterianos con actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial del hongo, la cepa FZ 9-7 demostró obtener una mayor tasa de inhibición de avance micelial. Concordando con Alsultan *et al.*, (2019) quienes, al realizar las pruebas de inhibición de barrido de los extractos celulares, encontró que la cepa con mayor porcentaje de disminución fue *P. aeuroginosa* con el 100% de inhibición. Existe una amplia gama de rizobacterias capaces de producir compuestos anti-fúngicos como:

fenazinas, 2,4- Diacetylphloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina (Prn), pioluterina (Plt), cianuro de hidrogeno (HCN) y enzimas líticas que degradan la pared celular del hongo como proteasa, quitinasas, pectinasas enfocado a reducir el crecimiento de los hongos fitopatógenos (Sharma, Kaur, y Prashad, 2014).

La anomalía morfológica, así como la disminución del micelio indicó un daño en las hifas de *P. palmivora* al enfrentarse con aislamientos bacterianos antagonistas por presentar rasgos de producción proteasa, cianuro de hidrógeno (HCN), quitinasa y producción de sideroforos. Resultados similares son encontrados por Wibowo *et al.*, (2020) con ensayos duales de rizobacterias biocontroladoras que fueron extremadamente más severa causando lisis de la membrana celular. Las hifas se encontraron intactas y de crecimiento normal en *P. palmivora* sin ningún tratamiento con antagonistas. Así mismo Al-Ghafri *et al.*, (2020) en ensayos de sobrenadantes libres de células demostró que la cepa *P. aeruginosa* ISO1 and ISO2 en las observaciones de microscopía electrónica de barrido afecta la estructura de las hifas de *F. solani* y *P. aphanidermatum* mostrando cambios morfológicos en la zona de inhibición, incluida la contracción del micelio, deformación y pérdida de turgencia en comparación con el control. Además, se observó colapso de hifas y enrollamiento en la zona de inhibición.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se aislaron 238 cepas bacterianas de seis provincias a partir de diferentes partes morfológicas de plantas de cacao, de las cuales se seleccionaron nueve cepas que presentaron rasgos de importancia en la identificación de producción de catalasa, actividad proteolítica, fluorescencia e identificación de bacterias gram negativas por la técnica de tinción de gram.
- Las nueve cepas bacterianas seleccionadas presentan en la mayoría de colonias circulantes y puntiforme, por su elevación plana y por su borde entera.
- las cepas FZ 9-7 y BF-567 solubilizan el nitrógeno con porcentaje correspondientes de 95% y 92%, mientras que, en los elementos del fósforo inorgánico y potasio la cepa BF-567 alcanzó un mayor alcance de degradación del 90% y 100%.
- Las inoculaciones con la bacteria seleccionadas ejercieron un efecto estimulante, en las variables del porcentaje de germinación del 100%, longitud radicular con 5.67 cm, peso radicular de 3.57 gr y volumen radicular de 92.43 cm³ en relación al control en las variables de longitud, peso y volumen radicular.
- La cepa FZ 9-7 inhibió el desarrollo micelial del hongo *Phytophthora palmivora* con promedios superiores del 85% y 86%.

5.2. Recomendaciones

- Identificar a nivel molecular por ARN ribosomal 16S a qué especie pertenecen estas bacterias que presentaron rasgos bioquímico relevante.
- Identificar con partidores específicos que compuesto antifúngico y antibacterianos producen cada bacteria seleccionada.
- Probar estas bacterias seleccionadas que solubilizan estos 3 minerales NPK en otros minerales insolubles.
- Determinar si existe presencia de la auxina ácido indol acético y cuantificar su producción por espectrofotómetro.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acebo, Y., Hernandez, A., Bertin, P., y El Jaziri, M. (2015). Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* from *Theobroma cacao* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora*. *Journal of Applied Microbiology*, 119: 1112-1126.
- Adeniyi, D. (2019). *Theobroma Cacao* - Deploying Science for Sustainability of Global Cocoa Economy. En *Diversity of Cacao Pathogens and Impact on Yield and Global Production* (págs. 1-14).
- Afzal, I., Shinwari, Z., Sikandar, S., y Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221: 36-49.
- Ahemad, M., y Kibret, M. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26:1-20.
- Al-Ghafri, H., Velazhahan, R., Shahid, M., y Al-Sadi, A. (2020). Antagonistic activity of *Pseudomonas aeruginosa* from compost against *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium solani*. *Biocontrol Science and Technology*. 10: 1-17.
- Alori, E., Glick, B., y Babalola, O. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8(971): 1-8.
- Alsultan, W., Vadmalai, G., Khairulmazmi, A., y Nasehi, A. (2019). Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria antagonistic to *Phytophthora palmivora* causing black pod of cocoa in Malaysia. *Eur J Plant Pathol*. 155: 1077-1091.
- Ampofo, J. A., Tetteh, W., y Bello, M. (2009). Impact of commonly used agrochemicals on bacterial diversity in cultivated soils. *Indian Journal Microbiol*, 49:223-229.
- Arvelo, M. A., González, D., Maroto, S., Delgado, T., y Montoya, P. (2017). Manual técnico del cultivo de cacao Buenas prácticas para América Latina. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)*.

- Barón, J. D. (2016). El Cultivo Del Cacao; Un Negocio Rentable, Competitivo Y Ambientalmente Sostenible En Colombia. *Fedacacao*.
- Batista, L. (2019). Guía Técnica El Cultivo de Cacao. In *Santo Domingo, Republica Dominicana. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal CEDAF* (Vol. 2, Issue 1).
- Bechtaoui, N., Raklami, A., Benidire, L., y Oufdou, K. (2019). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their benefits on growth and phosphate nutrition of faba bean and wheat. *Biology Open*, 8(7): 1-8.
- Ben, N., Vallance, J., Gerbore, J., Rey, P., y Remadil, D. (2016). Bio-suppression of Sclerotinia Stem Rot of Tomato and Biostimulation of Plant Growth Using Tomato-associated Rhizobacteria. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 7(2): 1-11.
- Bhattacharyya, P. N., y Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*, 28:1327-1350.
- Brink, B. (2010). Urease Test Protocol. *American Society for Microbiology*, 1-7.
- Derkowaska, E., Paszt, L., Harbuzov, A., y Sumorok, B. (2015). Root Growth, Mycorrhizal Frequency and Soil Microorganisms in Strawberry as Affected by Biopreparations. *Microbiology*, 5:65-73.
- Domínguez, B., Lawniczak, A., Zbierska, J., & Nowak, B. (2016). (1994). Impact of agriculture and land use on nitrate contamination in groundwater and running waters in central-west Poland. *Environmental Monitoring and Assessment*, 172: 1-17.
- Drenth, A., y Guest, D. (2004). Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. Melbourne-Australia: ACIAR Monograph 114.
- Efraim, P., Pezoa H., Jardim, C., Nishikawa, A., Haddad, R., y Eberlin, M. (2010). Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30:142-150.
- El-Sayed, A., Akbar, A., Iqar, I., y Brennan, M. (2018). A glucanolytic *Pseudomonas* sp. associated with *Smilax bona-nox* L. displays strong activity against *Phytophthora parasitica*. *Microbiological Research*, 207: 140-152.

- El-Sayed, W., Akhkha, A., El-Naggar, M., y Elbadry, M. (2014). *In vitro* antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. *Frontiers in Microbiology*, 5(651): 1-12.
- Esmeralda, G. (2019). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. "Actividad antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) a *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja) en Cacao (*Theobroma cacao* L.)"
- Etesami, H., Emami, S., y Ali, H. (2017). Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17: 897-911.
- Fuentes, Q., Fernando, L., & Salomón, G. C. (2011). Perfil del Sabor del Clon CCN51 del Cacao (*Theobroma cacao* L .) Producido en Tres Fincas del Municipio de San Vicente de Chucurí. *Revista Especializada En Ingeniería de Procesos En Alimentos y Biomateriales Introducción*, 5, 45–58.
- Gould, S. E. (2014). *blogs.scientificamerican*. Recuperado de <https://blogs.scientificamerican.com/lab-rat/urease-an-anti-microbial-target-in-bacteria-and-fungi/>
- Grellet, N., Vera, L., Fernanda , L., Fernández, P., y Tortora, M. (2017). Evaluación de la cepa *Azospirillum brasilense* Az39 como biofertilizante para el cultivo de sorgo azucarado. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 94: 31-39.
- Guevara, M. (2010). Escuela Politécnica del Ejército. "Aislamiento e identificación de microorganismos solubilizadores de potasio a partir de muestras de suelo y raíces de cultivo de alcachofa de la localidad de la remonta, Cantón Cayambe"
- Gupta, G., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., y Singh, V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial & Biochemical Technology*, 7: 96-102.
- Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., y Tewari, R. (2012). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological Research*, 167: 358-363.

- Hebbar, P. (2007). Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. *Phytopathology*, 97: 1658-1663.
- Hernández, I., Nápoles García, M. C., y Morales Mena, B. (2015). Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultivos Tropicales*, 36:65-72.
- Hutch, M., Choudhury, A., y Kennedy, I. (2005). Nitrogen Fertilizer Losses from Rice Soils and Control of Environmental Pollution Problems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36: 1-12.
- Hwu, F., Lai, M., y Liou, R. (2017). PpMID1 Plays a Role in the Asexual Development and Virulence of *Phytophthora parasitica*. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1-14.
- Judelson, H., y Blanco, F. (2005). The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 47-58.
- Jumbo Merino, A. (2017). Universidad Nacional de Loja. Caracterización morfológica del cacao (*Theobroma cacao* L.) en la cuenca del río Nangaritza provincia de Zamora Chinchipe.
- King, E., Ward, M., y Raney, D. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301-307.
- Kong, P., y Hong, C. (2016). Soil bacteria as sources of virulence signal providers promoting plant infection by *Phytophthora* pathogens. *Scientific Reports*, 6: 1-13.
- Konieczna, I., Żarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesińska, B., Frączyk, J., Kamiński, Z., y Kaca, W. (2012). Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Current Protein and Peptide Science*, 13:789-806.
- Koua, S., N'golo, D., Alloue-Boraud, W., Konan, F., y Dje, K. (2020). *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Cocoa Trees (*Theobroma cacao* L.) Rhizosphere for their use as Potential Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Côte d'Ivoire. *Current Microbiology*, 77(9): 2258-2264.

- Liu , Z., Li, Y., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel , J., y Zhang, M. (2015). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, 96: 217-224.
- Medina, P., y Baresi, L. (2007). Rapid identification of gelatin and casein hydrolysis using TCA. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 391-393.
- Molina, D., Bustillos, M., Santiago, Y., y Muñoz, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Ciencias Biológicas Agropecuarias*, 17:24-34.
- Mouatafo, R. A., Boudjeko, T., y Beaulieu, C. (2016). Morphological, Physiological, and Taxonomic Characterization of Actinobacterial Isolates Living as Endophytes of Cacao Pods and Cacao Seeds. *Microbes Environ*, 31:56-62.
- Naeem, M., Aslam, Z., Khaliq, A., Nazir, J., Nawaz, A., y Hussain, M. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria reduce aphid population and enhance the productivity of bread wheat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49: 9-14.
- Nathan, P., Rathinam, X., Kasi, M., Abdul, Z., y Subramaniam, S. (2011). A pilot study on the isolation and biochemical characterization of *Pseudomonas* from chemical intensive rice ecosystem. *African Journal of Biotechnology*, 10: 12653-12656.
- Nautiyal, S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265-270.
- Nepali, B., Bhattarai, S., y Shrestha, J. (2018). Identification of *Pseudomonas fluorescens* using different biochemical tests. *International Journal of Applied Biology*, 2(2): 27-32.
- Nguyen, C., Yan, W., Le Tacon, F., y Lapeyrie, F. (1992). Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant and Soil*, 143: 193-199.
- Ortiz-Galeana, M., Hernández-Salmerón, J., Valenzuela-Aragón, B., y Santoyo, G. (2018). Diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi con actividades promotoras del crecimiento vegetal. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 34(2): 140-151.

- Peña, H. B., y 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*, 32:560-565.
- Perrine, F. (2020). *Phytophthora palmivora*–Cocoa Interaction. *Journal of Fungi*, 6: 1-20.
- Plaza, M. (2016). Escuela Politécnica del Litoral. Estudios industriales y orientación estratégica para la toma de decisiones para la Industria de cacao.
- Podile, A. R., y Krishna, G. (2006). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Plant-Associated Bacteria*, 195-230.
- Qessaoui, R., Bouharroud, R., Amarraque, A., y Chebli, B. (2019). Applications of New Rhizobacteria *Pseudomonas* Isolates in Agroecology via Fundamental Processes Complementing Plant Growth. *Scientific Reports*, 9(1): 1-10.
- Romero, E., Fernandez, M., Macias, J., y Zuñiga, K. (2016). Producción y comercialización del cacao y su incidencia en el desarrollo socioeconómico del cantón Milagro. *Ciencia Unemi*, 9(17): 56-64.
- Sani, M., Souleymanou, A., Henri, F., y Dieudonné, N. (2019). Phosphates solubilizing bacteria like promoter's agent of cocoa-tree growth and biocontrol of *Phytophthora megakarya* Brasier and M.J. Griffin, agent of black pod disease. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 11(2): 8-21.
- Sharma, S., Kaur, M., y Prashad, D. (2014). Isolation of *fluorescent pseudomonas* strain from temperate zone of himachal pradesh and their evaluation as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *The Bioscan*, 9(1): 323-328.
- Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Ouzari, I., y Boudabous, A. (2016). Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of Microbiol.* 66: 1087-1097.
- Tariq, J., Ahmed, B., y Abro, M. (2019). Characterization and Bio-Antagonistic Activity of Rhizobacteria against *Fusarium Oxysporum* F. S p. Cepae. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 32(2): 353-358.
- Vargas, T., Martínez, J., Berbel, J., y Ordóñez, R. (2021). Nitrogen Fertilization. A Review of the Risks Associated with the Inefficiency of Its Use and Policy Responses. *Sustainability*, 13:1-15.

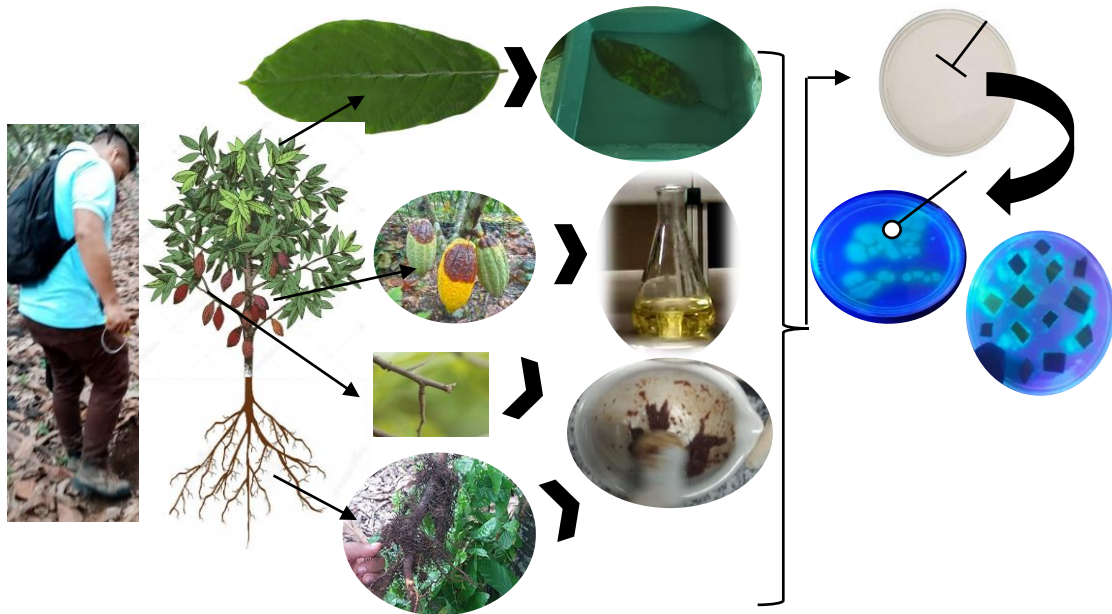
- Villamil, J. E., Blanco, J. O., y Viteri, S. E. (2015). Evaluación *in vitro* de Microorganismos Nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 65: 6305-6315.
- Waizel-Haiat, S. (2012). Cacao y chocolate: seducción y terapéutica. *Anales Médicos*, 57:236-245.
- Wibowo, A., Joko, T., Subandiyah, S., y Kageyama, K. (2020). Antagonistic Potential of Endophytic Bacteria Against *Phytophthora palmivora* Causing Black Pod Rot Disease on Cacao (*Theobroma cacao* L.) In Indonesia. *Plant Pathology Journal*, 19(1): 22-41.
- Yan, X., Wang, Z., Xu, Q., y Wei, C. (2018). Isolation, Diversity, and Growth-Promoting Activities of Endophytic Bacteria From Tea Cultivars of Zijuan and Yunkang-10. *Frontiers in Microbiology*, 9(1848): 1-11.

CAPÍTULO VII

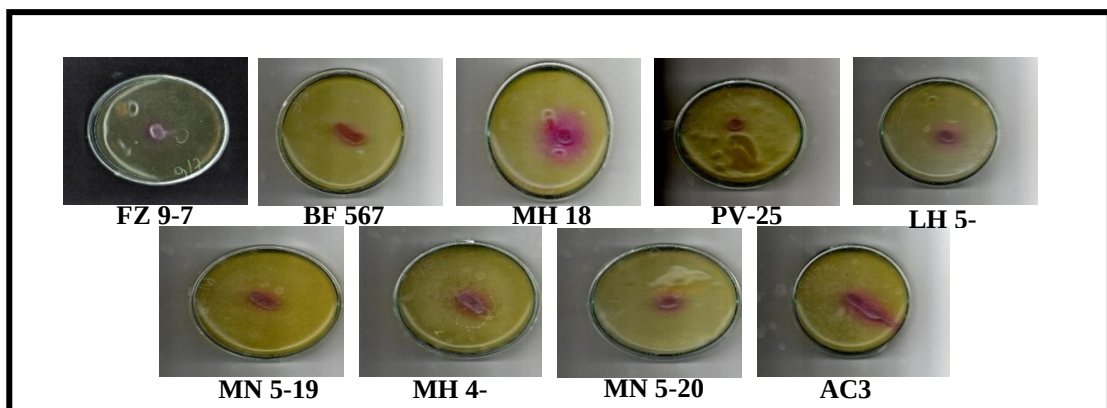
ANEXOS

7.1. ANEXOS

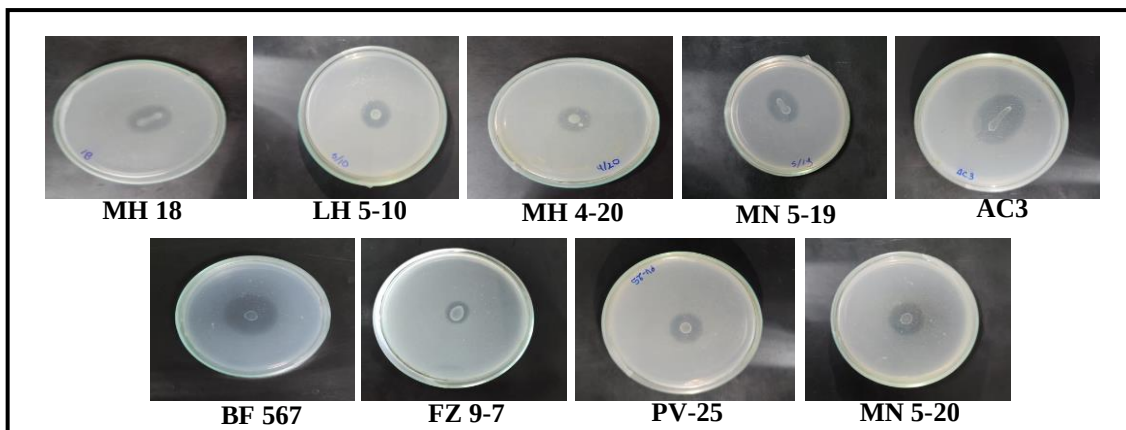
Anexo 1. Aislamiento bacteriano a partir de distintos tejidos vegetales de cacao CCN-51



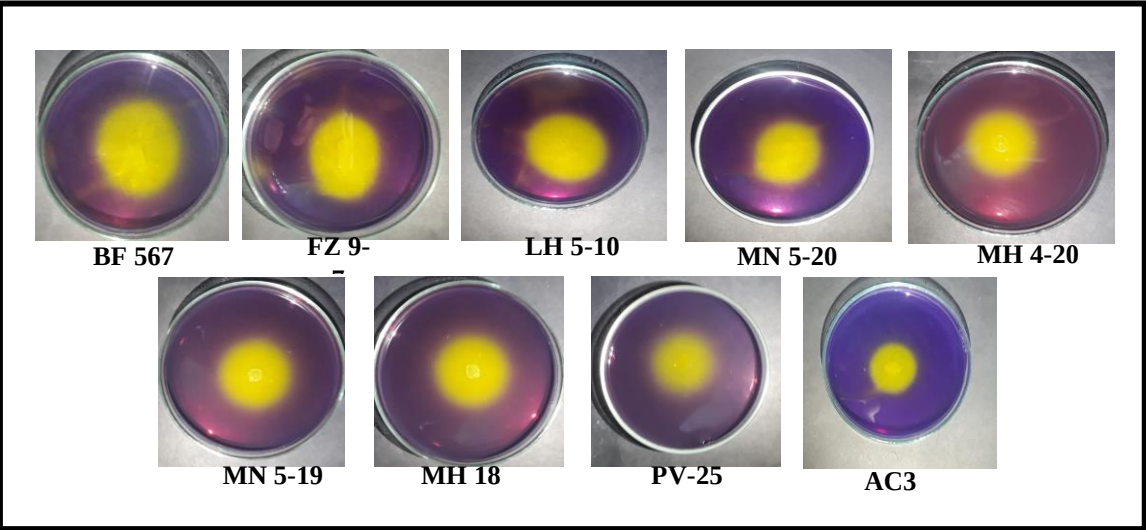
Anexo 2. Bacterias biodegradadoras de nitrógeno.



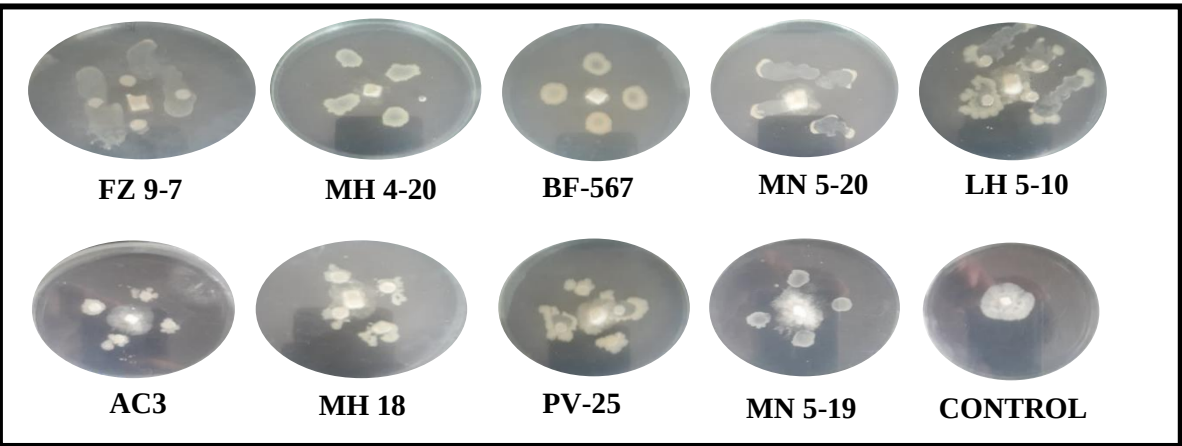
Anexo 3. Bacterias biodegradadoras de fósforo.



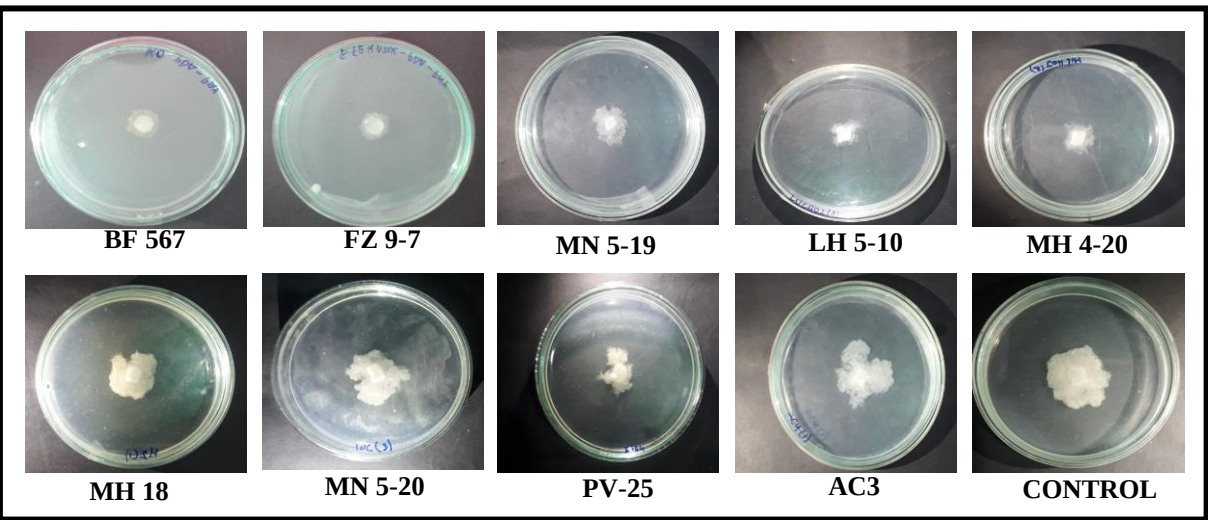
Anexo 4. Bacterias biodegradadoras de potasio.



Anexo 5. Resultados antagónicos de las bacterias al crecimiento micelial de *P. palmivora*.



Anexo 6. Disminución del crecimiento micelial de *P. palmivora* con los sobrenadantes bacterianos.



Anexo 7. Extracción de los sobrenadantes bacterianos seleccionados.

