



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

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

**Título del Proyecto de Investigación**

“Actividad antagonista de *Pseudomonass veronii* R4 y *Pseudomonass protegens* CHA-0 contra *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao (*Theobroma cacao*)”

**Autor**

Holger Estalin Zambrano Guerrero

**Director del Proyecto de Investigación**

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

Quevedo – Los Ríos – Ecuador  
2019

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

Yo, **HOLGER ESTALIN ZAMBRANO GUERRERO** 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.

---

**Holger Estalin Zambrano Guerrero**

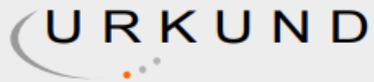
# **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el egresado Holger Estalin Zambrano Guerrero, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado “**Actividad antagonista de *Pseudomonass veronii* R4 y *Pseudomonass protegens* CHA-0 contra *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao (*Theobroma cacao*)””, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.**

---

**Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez**  
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

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



## Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** TESIS ZAMBRANO.docx (D49180116)  
**Submitted:** 3/15/2019 4:56:00 PM  
**Submitted By:** hcanchignia@uteq.edu.ec  
**Significance:** 4 %

### Sources included in the report:

TESIS LISTA PARA EL URKUND.docx (D14486568)  
Cedeño URKUND.docx (D41116245)  
urkund 07-03-2017.docx (D26238104)

### Instances where selected sources appear:

4

---

**Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez**  
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**



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

**TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

**“Actividad antagonista de *Pseudomonass veronii* R4 y *Pseudomonass protegens* CHA-0 contra *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao (*Theobroma cacao*)”.**

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

**Aprobado por:**

---

Dra. Marisol Rivero Herrada  
**PRESIDENTA DEL TRIBUNAL**

---

Dr. Pablo Ramos Corrales  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Dr. Víctor Guamán  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**Quevedo - Los Ríos - Ecuador**  
**2019**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento principalmente a Dios por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome salud, fortaleza y sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas.

A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa de vida.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Expreso mi agradecimiento al cuerpo de docentes de la Escuela de Agronomía de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial, al Dr. Fabricio Canchignia tutor de mi proyecto de investigación quien ha guiado con su paciencia, y su rectitud como docente.

Así también agradezco al Instituto de Fomento al Talento Humano por haberme apoyado económicamente con la Beca de Movilidad Territorial con la que pude terminar satisfactoriamente mi educación superior.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación lo dedico principalmente a Dios, por brindarme salud, fortaleza y capacidad para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados, a mis padres Jenny G y Gregorio Z., que me han permitido trazar mi camino y caminar con mis propios pies. Ellos son mis pilares de la vida, a mi familia entera; también hago extenso este reconocimiento a todos los maestros de mi educación superior, quienes me han dado las pautas para mi formación profesional; y por último a todos quienes me acompañaron en mi formación superior, compañeros y amigos.

## RESUMEN

El árbol de cacao, procedente de América, recibe el nombre científico de *Theobroma cacao* L. que significa "alimento de los dioses". Es un árbol cauliflor, es decir que florece y desarrolla las mazorcas en las partes viejas del tronco y de las ramas principales. En el país se cultivan dos tipos de cacao: el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional. La enfermedad causada por el patógeno *Phytophthora palmivora*, es el factor más limitante en el cultivo de cacao en el mundo, ataca raíces, hojas, tallos y ramas del cacao, desde etapas de vivero hasta plantas adultas. El uso de microorganismos como agentes antagonistas se muestran como alternativas para el control de enfermedades, y, además, existes investigaciones realizadas que señalan a especies de bacterias del género *Pseudomonass* como antagonistas contra *Phytophthora sp.*, entre los cuales se encuentran *P. veronii* y *P. protegens*. Por lo alegado se planteó el objetivo de evaluar la actividad antagonista de *P. veronii* R4 y *P. protegens* CHA-0 contra *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao (*Theobroma cacao*). El proyecto de investigación se realizó en el invernadero y los laboratorios de Biología Molecular y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. En el ensayo se procedió a recolectar muestras de frutos infectados con la mancha parda para posteriormente aislar al hongo *P. palmivora* y posteiormente se utilizaron semillas de cacao (CCN51) para la evaluación patológica en plántulas y la actividad antagonista de las rizobacterias a *P. palmivora*. Para las evaluaciones in-vivo se utilizaron las PGPRs. *P. veronii* R4 y *P. protegens* CHA-0. Los resultados obtenidos a partir de esta investigación fueron, como principal, una incidencia de la enfermedad del 6 % en el tratamiento de CCN51 + *P. palmivora* + *P. protegens* CHA-0, y del 11 % para el tratamiento de plántulas de CCN51 + *P. palmivora* + *P. veronii* R4, en contraste con la incidencia de la enfermedad registrada en el control (CCN51 + *P. palmivora*) la cual fue del 100 %. Las conclusiones a partir de los resultados obtenidos son: las rizobacterias ejercen un efecto benéfico hacia la planta, contribuyendo al desarrollo radicular por la producción de reguladores de crecimiento, *P. protegens* CHAO inoculadas en *T. cacao* CCN-51 mostraron efectos antagónicos contra *P. palmivora*, debido a que contribuyeron al aumento de las variables evaluadas y la inoculación de las bacterias *P. protegens* CHAO y *P. veronii* R-4 redujeron la infección de *P. palmivora*.

**Palabras claves:** Cacao, CCN51, *P. palmivora*, *P. protegens* CHAO, *P. veronii* R-4.

## SUMMARY

The cocoa tree, coming from America, receives the scientific name of *Theobroma cacao* L. which means "food of the gods". It is a cauliflower tree, that is to say it blooms and develops the ears in the old parts of the trunk and the main branches. In the country, two types of cocoa are grown: Cocoa CCN-51 and the so-called National Cocoa. The disease caused by the pathogen *Phytophthora palmivora*, is the most limiting factor in the cultivation of cocoa in the world, attacking roots, leaves, stems and branches of cocoa, from nursery stages to adult plants. The use of microorganisms as antagonistic agents are shown as alternatives for the control of diseases, and, in addition, there are investigations carried out that indicate species of bacteria of the genus *Pseudomonas* as antagonists against *Phytophthora* sp., among which are *P. veronii* and *P. protegens*. Therefore, the objective was to evaluate the antagonist activity of *P. veronii* R4 and *P. protegens* CHA-0 against *Phytophthora palmivora* in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). The research project was carried out in the greenhouse and the laboratories of Molecular Biology and Microbiology of the State Technical University of Quevedo. In the trial we proceeded to collect samples of fruits infected with the brown spot to later isolate the fungus *P. palmivora* and later cocoa seeds (CCN51) were used for the pathological evaluation in seedlings and the antagonistic activity of the rhizobacteria to *P. palmivora*. For the in-vivo evaluations, the PGPRs were used. *P. veronii* R4 and *P. protegens* CHA-0. The results obtained from this investigation were, as main, an incidence of the disease of 6% in the treatment of CCN51 + *P. palmivora* + *P. protegens* CHA-0, and 11% for the treatment of seedlings of CCN51 + *P. palmivora* + *P. veronii* R4, in contrast to the incidence of the disease recorded in the control (CCN51 + *P. palmivora*) which was 100%. The conclusions from the obtained results are: the rhizobacteria exert a beneficial effect towards the plant, contributing to the root development by the production of growth regulators, *P. protegens* CHAO inoculated in T. cocoa CCN-51 showed antagonistic effects against *P. palmivora*, because they contributed to the increase of the variables evaluated and the inoculation of the bacteria *P. protegens* CHAO and *P. veronii* R-4 reduced the infection of *P. palmivora*.

**Key words:** *Cocoa*, *CCN51*, *P. palmivora*, *P. protegens* CHAO, *P. veronii* R-4.

## TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN..	iii
REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO .....	iv
TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN .....	viii
SUMMARY .....	ix
TABLA DE CONTENIDO .....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xv
CÓDIGO DUBLÍN .....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	
1.1 Problematización .....	3
1.1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.1.2. Sistematización del problema.....	3
1.2. Objetivos.....	4
1.2.1. Objetivo general .....	4
1.2.2. Objetivos específicos .....	4
1.3. Justificación.....	5
CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	
2.1 Marco teórico .....	7
2.1.1. El Cacao en el Ecuador.....	7

2.1.2.	Cacao CCN-51 .....	7
2.1.2.1.	Principales características del cacao CCN-51 .....	8
2.1.3.	Principales enfermedades del cacao en etapa de vivero.....	8
2.1.4.	Tizón o Fitóftora ( <i>Phytophthora palmivora</i> ).....	10
2.1.4.1.	Taxonomía.....	10
2.1.4.2.	Ciclo de vida del patógeno.....	11
2.1.4.3.	Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad .....	12
2.1.4.4.	Sintomatología y signos .....	13
2.1.4.5.	Epidemiología.....	14
2.1.4.6.	Métodos de control.....	15
2.1.5.	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) .....	16
2.1.6.	Utilización de las PGPR en la agricultura.....	16
2.1.7.	<i>Pseudomonas veronii</i> R4.....	17
2.1.8.	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0.....	17

### CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.	Localización del experimento.....	20
3.2.	Método de Investigación .....	20
3.3.	Fuentes de recopilación de información.....	20
3.4.	Material Biológico.....	20
3.5.	Materiales y Equipos.....	21
3.5.1.	Material de laboratorio: .....	21
3.5.2.	Material de oficina: .....	21
3.5.3.	Material para los ensayos in-vivo: .....	21
3.5.4.	Equipos de Laboratorio: .....	21
3.5.5.	Reactivos: .....	22
3.6.	Diseño de la Investigación .....	22
3.7.	Manejo del Experimento .....	23

3.7.1.	Aislamiento de <i>P. palmivora</i> .....	23
3.7.2.	Extracción de ADN de <i>P. palmivora</i> .....	23
3.7.3.	Identificación molecular de <i>P. palmivora</i> .....	23
3.8.	Establecimiento de los experimentos .....	24
3.8.1.	Tratamientos .....	24
3.8.2.	Evaluación de semillas de cacao - inoculación de las plantas .....	25
3.9.	VARIABLES A EVALUAR .....	25
3.9.1.	Altura de planta .....	25
3.9.2.	Numero de hojas .....	25
3.9.3.	Peso de plantas, hojas y raíces (g) .....	26
3.9.4.	Longitud de raíz (cm) .....	26
3.9.5.	Evaluación de la incidencia de la enfermedad causada por <i>P. palmivora</i> en plántulas de cacao CCN 51 .....	26

#### CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Resultados .....	28
4.1.1.	Identificación Molecular de <i>Phytophthora palmivora</i> .....	28
4.1.2.	Altura de Planta .....	29
4.1.3.	Número de hojas por planta .....	30
4.1.4.	Peso de Planta .....	31
4.1.5.	Peso de Hojas .....	32
4.1.6.	Peso de Raíz .....	33
4.1.7.	Longitud de Raíz .....	34
4.1.8.	Incidencia de enfermedad .....	35

#### CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	Conclusiones .....	37
5.2.	Recomendaciones .....	38

#### CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

5.1. Bibliografía.....	40
------------------------	----

ANEXOS

7.1. Anexos.....	48
------------------	----

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza .....	22
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Identificación molecular Phytophthora palmivora mediante PCR. A, Lader 100pb. B, identificación de Phytophthora palmivora mediante PCR Carril M, marcadores de peso molecular; Ph1 Phytophthora palmivora (Buena Fe), Ph2 Phytophthora palmivora (Balao), M.r (Moniliophthora roreri), Ctrl control con agua.....	28
Figura 2. Altura de planta. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey)..	29
Figura 3. Número de hojas por planta. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey). .....	30
Figura 4. Peso de planta. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey)..	31
Figura 5. Peso de hojas. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey)..	32
Figura 6. Peso de raíz. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey)..	33
Figura 7. Longitud de raíz. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey)..	34
Figura 8. Incidencia de la enfermedad. Las barras de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey). .....	35

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Plántulas listas para la inoculación .....	48
Anexo 2. Tratamientos; plántula de CCN51 (sin aplicación), plántula de CCN51 + P. protegens CHAO y plántulas de CCN51 + P. palmívora.....	48
Anexo 3. Inicio de síntomas de plántula inoculada con P. palmívora.....	49
Anexo 4. Avance de Síntomas de plántula inoculada con P. palmívora .....	49
Anexo 5. Registro de variables; peso de planta, hojas y raíz. ....	50

## CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“Actividad antagonista de <i>Pseudomonass veronii</i> R4 y <i>Pseudomonass protegens</i> CHA-0 contra <i>Phytophthora palmivora</i> en plántulas de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> )”.
Autor:	Holger Estalin Zambrano Guerrero
Palabras clave:	<i>Cacao</i> , <i>CCN51</i> , <i>P. palmivora</i> , <i>P. protegens</i> CHAO, <i>P. veronii</i> R-4.
Fecha de publicación:	
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2018
Resumen:	<p>El árbol de cacao, procedente de América, recibe el nombre científico de <i>Theobroma cacao</i> L. que significa "alimento de los dioses". Es un árbol cauliflor, es decir que florece y desarrolla las mazorcas en las partes viejas del tronco y de las ramas principales. En el país se cultivan dos tipos de cacao: el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional. La enfermedad causada por el patógeno <i>Phytophthora palmivora</i>, es el factor más limitante en el cultivo de cacao en el mundo, ataca raíces, hojas, tallos y ramas del cacao, desde etapas de vivero hasta plantas adultas. El uso de microorganismos como agentes antagonistas se muestran como alternativas para el control de enfermedades, y, además, existes investigaciones realizadas que señalan a especies de bacterias del género <i>Pseudomonass</i> como antagonistas contra <i>Phytophthora sp.</i>, entre los cuales se encuentran <i>P. veronii</i> y <i>P. protegens</i>. Por lo alegado se planteó el objetivo de evaluar la actividad antagonista de <i>P. veronii</i> R4 y <i>P. protegens</i> CHA-0 contra <i>Phytophthora palmivora</i> en plántulas de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). El proyecto de investigación se realizó en el invernadero y los laboratorios de Biología Molecular y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. En el ensayo se procedió a recolectar muestras de frutos infectados con la mancha parda para posteriormente aislar al hongo <i>P. palmivora</i> y posteiormente se utilizaron semillas de cacao (CCN51) para la evaluación patológica en plántulas y la actividad antagonista de las rizobacterias a <i>P. palmivora</i>. Para las evaluaciones in-vivo se utilizaron las PGPRs. <i>P. veronii</i> R4 y <i>P. protegens</i> CHA-0. Los resultados obtenidos a partir de esta investigación fueron, como principal, una incidencia de la enfermedad del 6 % en el tratamiento de CCN51 + <i>P. palmivora</i> + <i>P. protegens</i> CHA-0, y del 11 % para el tratamiento de plántulas de CCN51 + <i>P. palmivora</i> + <i>P. veronii</i> R4, en contraste con la incidencia de la enfermedad registrada en el control (CCN51 + <i>P. palmivora</i>) la cual fue del 100 %. Las conclusiones a partir de los resultados obtenidos son: las rizobacterias ejercen un efecto benéfico hacia la planta, contribuyendo al desarrollo radicular por la producción de reguladores de crecimiento, <i>P. protegens</i> CHAO inoculadas en <i>T. cacao</i> CCN-51 mostraron efectos antagónicos contra <i>P. palmivora</i>, debido a que contribuyeron al aumento de las variables evaluadas y la inoculación de las bacterias <i>P. protegens</i> CHAO y <i>P. veronii</i> R-4 redujeron la infección de <i>P. palmivora</i>.</p>
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162
URI:	

# INTRODUCCIÓN

Conocido como el alimento de los dioses, el cacao de nombre científico *Theobroma cacao* L. procedente de América, es un árbol que florece y desarrolla sus mazorcas en las partes viejas del tronco y de las ramas principales (cauliflor), su fruto el cual es una baya tipo capsula contiene numerosas semillas con una pulpa rica en azúcar.

Actualmente, en el país se cultivan dos tipos de cacao: el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional que es un Cacao fino de aroma conocido como “Arriba”, desde la época colonial. Según estadísticas locales Ecuador es el país con la mayor participación en este segmento del mercado mundial.

Uno de los factores que más limitan la producción de cacao se debe a las enfermedades causadas por hongos y oomicetos, de este último grupo el patógeno *Phytophthora palmivora* es el factor más limitante en el cultivo de cacao en el mundo. Este microorganismo ataca raíces, hojas, tallos y ramas del cacao, desde etapas de vivero hasta plantas adultas, pero el daño más grave ocurre en las mazorcas, las que pueden ser atacadas en cualquier etapa del desarrollo produciendo una mancha café oscura de márgenes ligeramente irregulares lo cual disminuye drásticamente la producción.

Como métodos de control cultural se menciona la regulación de sombramiento mediante podas, control de malezas, técnicas de evacuación de excedentes de agua y la remoción semanal de frutos enfermos, con la finalidad de reducir las fuentes del inóculo de *Phytophthora sp.* Sin embargo, la realización de las prácticas representa un gran esfuerzo por parte del agricultor, por lo que la enfermedad perdura en las fincas, esto hace necesario la búsqueda de estrategias de control biológico con el uso de especies antagonicas aisladas en el hábitat donde se desarrolla esta enfermedad.

El uso de microorganismos como agentes antagonistas se muestran como alternativas para el control de enfermedades, y, además, existes investigaciones realizadas que señalan a especies de bacterias del género *Pseudomonass* como antagonistas contra *Phytophthora sp.*, entre los cuales se encuentran *Pseudomonass veronii* y *Pseudomonass protegens*.

**CAPÍTULO I**  
**CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1 Problematización**

### **1.1.1. Planteamiento del problema**

Entre las principales enfermedades presentes en el país, se destaca a la mancha parda producida por el hongo *Phytophthora palmivora*, patógeno habitante natural del suelo que afecta a la planta desde la etapa de vivero y complica el establecimiento de plantaciones por limitar la disponibilidad de planta sanas para su establecimiento en campo.

Los métodos empleados para el control de las plántulas de cacao en viveros se basan en controles químicos, que, a pesar de su efectividad en control, suponen un gasto adicional, crean resistencia y además no son ambientalmente aceptables.

### **1.1.2. Sistematización del problema**

¿Las cepas aisladas de mazorcas enfermas con presencia de síntomas de mancha parda corresponden a *Phytophthora palmivora*?

¿Cuál es el efecto fitopatológico de *Phytophthora palmivora* en el desarrollo de plántulas de cacao?

¿Las Rizobacterias *Pseudomonass veronii* R4 y *Pseudomonass protegens* CHA-0 ejercen una actividad antagónica hacia el hongo en plántulas de cacao?

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

Evaluar la actividad antagonista de *Pseudomonas veronii* R4 y *Pseudomonas protegens* CHA-0 contra *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao (*Theobroma cacao*).

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Identificar a nivel molecular *Phytophthora palmivora* con partidores específicos.
- Determinar el efecto fitopatológico de *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao.
- Evaluar la actividad antagonista de *Pseudomonas veronii* R4 y *Pseudomonas protegens* CHA-0 en el control de *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao.

### 1.3. Justificación

El Ecuador, conocido mundialmente por la producción y exportación de cacao fino de aroma, posee características edafoclimatológicas envidiables que hacen que este cultivo se adapte bien y produzca rendimientos aceptables, pero, así también, las condiciones climáticas juegan un papel importante en la producción de cacao, puesto que estas favorecen la presencia de enfermedades que afectan a todas las etapas del cultivo y en gran medida a los rendimientos obtenidos en cosechas.

La enfermedad causada por el hongo *P. palmivora* es una de las principales enfermedades en el desarrollo de las plántulas de cacao limitando el número de plantas aprovechables para su establecimiento en el cultivo.

El uso biocontroladores se presenta como una opción viable no solo en el control de *P. palmivora* si no como promotores del desarrollo de las plantas sin afectar el ecosistema siendo amigables para el medio ambiente.

Los resultados obtenidos serán de gran importancia para el agro y el área investigativa del sector cacaotero del país, los cuales se presentan como alternativas para el control eficaz de *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao

## **CAPÍTULO II**

# **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1 Marco teórico**

### **2.1.1. El Cacao en el Ecuador**

El cacao es una fruta tropical, sus cultivos se encuentran mayormente en el Litoral y en la Amazonía. Es un árbol con flores pequeñas que se observan en las ramas y producen una mazorca que contiene granos cubiertos de una pulpa rica en azúcar. La producción de cacao se concentra principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos (Guerrero, 2014).

Ecuador es el principal exportador de cacao de fino aroma, oscila un promedio de 60% a 70% de las exportaciones en el mundo. También conocido como “cacao arriba”, que se cultiva en zonas con altitud desde el nivel del mar hasta 1200 msnm. Se caracteriza por su aroma floral y frutal concentrado, ideal para chocolatería fina (Tapia, 2014). La producción total de cacao en nuestro país proviene de la Costa 81,51 %, el 10,94 % de la Sierra y el 4,55% del Oriente (Barcia, 2012).

La producción de cacao en el Ecuador ha constituido un importante renglón para la economía nacional, en especial por su significativa contribución a la generación de divisas por concepto de exportación, actividad que se inició en la época de la Colonia. En la actualidad ocupa el tercer lugar en el monto de exportaciones del sector agrícola, después del banano y de las flores (Roberto, 2010). Los cultivos de cacao se concentran un 80% en las provincias de Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas, El Oro y Santa Elena, mientras que el resto se distribuye en las provincias de Chimborazo, Bolívar, Cotopaxi, Pichincha, Azuay, Sucumbíos, Orellana, Napo y Zamora Chinchipe (Ministerio de Agricultura y Ganadería , 2017).

### **2.1.2. Cacao CCN-51**

En 1965 luego de varias investigaciones, el agrónomo ambateño Homero Castro Zurita, logró en 1965 el denominado cacao clonal CCN-51 que significa Colección Castro Naranjal (ANECACAO, 2015). Los diferentes clones CCN fueron obtenidos del híbrido entre los clones ICS-95 x IMC-67, habiendo procedido luego a realizar un segundo cruce

entre dicho híbrido con un cacao encontrado por él en el Oriente ecuatoriano y denominado “Canelos” (Fajardo, 2013).

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

### **2.1.2.1. Principales características del cacao CCN-51**

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

### **2.1.3. Principales enfermedades del cacao en etapa de vivero**

En el país no se conoce de ninguna enfermedad del cacao que pueda ser transmitida por semilla. Por lo tanto, semilla proveniente de mazorcas sanas, sembrada en el suelo suelto,

desinfectado y con buena dotación de nutrientes, debe dar por resultado una plántula vigorosa con buen potencial de desarrollo (Suarez, 1994).

Las prácticas inadecuadas en el manejo de viveros favorecen en gran medida las pérdidas de plantas por enfermedades. Entre estas prácticas predisponentes para el desarrollo de las enfermedades se pueden mencionar: i) mezclado de sustrato de siembra con suelos pesados o arcillosos, lo que provoca el drenaje deficiente del agua excedente; ii) no eliminación efectiva de las plantas enfermas en el vivero en las fases iniciales de los síntomas; iii) incorrecta colocación de la semilla en el sustrato para su germinación, lo que conlleva a torceduras en las radículas; iv) reutilización de los pilones o bolsas en donde las semillas no emergieron, o bien murieron debido a enfermedades; v) no desinfección de las herramientas de trabajo y del sustrato de siembra, y vi) conservación de plántulas viejas, de más de cuatro meses de edad, con tejidos lignificados, pues éstos atraen insectos plaga y vectores de hongos fitopatógenos. Estas dos últimas prácticas son las que mayormente son ignoradas por los viveristas (Perez *et al.*, 2017).

Estas enfermedades se pueden producir a causa de deficiencias nutricionales en el suelo y por toxicidad a consecuencia de una aplicación excesiva o inadecuada de químicos; pero, más frecuentemente ocurren por ataque de hongos. Los géneros *Phythium*, *Phytophthora*, *Rizoctonia* y *Fusarium* que son los más comunes en nuestro medio. Ocasionalmente se han aislado también especies de *Verticillium* y *Colletotrichum*. (Suarez, 1994).

Además, Perez *et al.* (2017), en el estudio de la descripción de plagas en viveros de cacao, manifiestan a las siguientes enfermedades como factores limitantes en la producción de plantas sanas: necrosis foliares; tizón (*Phytophthora palmivora*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), tizón de las hojas (*Corynespora cassiicola*) y muerte de yemas (*Lasiodiplodia theobromae*). Engrosamientos de las yemas; escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), agallas de cojín floral (*Fusarium decemcellulare*), mal de machete (*Ceratocystis cacaofunesta*). Necrosis de raíces; verticilosis (*Verticillium dahliae*), Chancros (*Fusarium solani*). En las enfermedades de necrosis de raíces, salvo de *Phytophthora palmivora*, del resto de los especímenes mencionados no se han encontrado reportes que confirmasen su carácter patógeno en viveros, y se mencionan sólo a efectos de registro de la información.

#### **2.1.4. Tizón o Fitóftora (*Phytophthora palmivora*)**

*Phytophthora palmivora* es el principal patógeno que se presenta actualmente en viveros de cacao (Parra & Camejo, 2015). Sin embargo, el tizón causado por este patógeno en chupones, plántulas y hojas es considerado por otros autores como de poca importancia en comparación con la pudrición parda del fruto (Surujdeo-Maharaj *et al.*, 2016). En plántulas de vivero es muy común la *Phytophthora palmivora*. Seca las hojas y el tallo, dando una apariencia inicial de quemazón. Se produce en ambientes húmedos cuando no hay suficiente aireación y cuando al momento del riego, se salpican partículas de suelo hacia el follaje (ICA, 2012).

A inicios de los años 60 no se conocían reportes de *Phytophthora spp.* en el cacao del Litoral de Ecuador (Hardy, 1961). El exceso de humedad en el sustrato se reconoce como una condición favorable para el desarrollo de la sintomatología de este patógeno (Carvajal *et al.*, 2008) y la presencia de una película de agua sobre las hojas incrementa su diseminación y es requerida para completar su ciclo (Surujdeo-Maharaj *et al.*, 2016). Cuando las condiciones ambientales son favorables a este cromista, causa tizones en las hojas de las plántulas de vivero (End *et al.*, 2014) y puede llegar a presentarse muerte regresiva (Surujdeo-Maharaj *et al.*, 2016).

El agente causal más cosmopolita de la mazorca parda en mazorcas y tizón o fitóftora en plántulas es *Phytophthora palmivora*, debido a su distribución mundial, aunque muchas son las especies del patógeno identificadas que causan la enfermedad en diferentes regiones productoras en el mundo (Rodríguez & Vera, 2015). *Phytophthora palmivora* es la especie más ampliamente distribuida del género que atacan al cacao, a nivel mundial y en las Américas, otras especies asociadas a cacao, pero en segundo orden de importancia por su distribución, serían *P. megakarya* (África occidental), *P. citrophthora* (Brasil) y *P. capsici*/*P. tropicalis* (Surujdeo-Maharaj *et al.*, 2016).

##### **2.1.4.1. Taxonomía**

La especie causantes de la mazorca parda, tizón o fitóftora en cacao se encuentran agrupadas así: reino: *Chromista* (Stramenopila); división: *Oomycota* (mohos acuáticos);

subdivisión: *Mastigomycotina*; clase: *Phycomycetes*; subclase: *Oomycetes*; orden: *Peronosporales*; familia: *Pythiaceae*; género: *Phytophthora* y especie *palmivora* (Rodríguez & Vera, 2015).

#### **2.1.4.2. Ciclo de vida del patógeno**

Es importante mencionar que todos los procesos de reproducción, ya sean sexuales o asexuales, juegan un papel fundamental en el ciclo de vida del hongo. Las poblaciones de hongos en el suelo se mantienen por infección repetida de las raíces fibrosas. En condiciones favorables de alto grado de humedad y temperatura, el hongo produce esporangios que liberan zoosporas móviles, que son atraídas a las zonas de alargamiento de nuevas raíces por nutrientes que son naturalmente exudados de esta zona radicular (Perez *et al.*, 2010).

En contacto con la raíz, las zoosporas se enquistan, germinan y después infectan el área de la zona de alargamiento. Una vez que el hongo ha penetrado en la punta de la raíz, la infección puede avanzar en el córtex, produciendo la podredumbre de toda la raíz. El ciclo se puede repetir mientras las condiciones sean favorables y se disponga de tejido susceptible (Perez *et al.*, 2010).

*Phytophthora palmivora* tiene dos tipos de reproducción asexual y sexual, que producen cuatro tipos de esporas diferentes que pueden causar infección directa o indirectamente: esporangios, zoosporas, clamidosporas (producidos durante la reproducción asexual) y oosporas (producidas durante la reproducción sexual). El tipo de reproducción asexual es predominante y se inicia con la producción de esporangios sobre el tejido infectado (frutas infectadas, hojas, tallos o raíces) (Rodríguez & Vera, 2015).

Los esporangios son capaces de germinar directamente sobre la superficie de la planta o en el suelo. Este tipo de germinación ocurre en presencia de temperaturas cercanas o superiores a los 25 °C. La baja temperatura (15 a 20 °C) favorece la ruptura del esporangio, liberación y germinación de las zoosporas, lo cual incrementa el nivel de inóculo, ya que cada esporangio tiene de 20 a 30 zoosporas que constituyen un mayor número de unidades infectivas o propágulos, mientras que la germinación directa del

esporangio constituye un solo propágulo del patógeno (Dennis & Konam, 1994; Erwin & Ribeiro, 1996).

Por tanto, las unidades infectivas más importantes para la diseminación de este chromista son las zoosporas. Estas tienen dos funciones dentro del ciclo de la enfermedad: diseminación del patógeno a nuevos hospederos y reconocimiento de señales en el sitio de infección (Walker & Van West, 2007); son atraídas por señales de la planta hacia los potenciales sitios de infección y, en un tiempo aproximado de 20 a 30 minutos, encuentran su hospedero y se enquistan. A pocos minutos de entrar en contacto con el huésped potencial, un material mucilaginoso que facilita la adhesión del quiste es secretado sobre su superficie e inmediatamente forma una pared celular. Se ha demostrado que la penetración de *P. palmivora* ocurre principalmente a través de los estomas (Iwaro *et al.*, 2005).

La germinación ocurre rápidamente después del enquistamiento y los tubos germinativos penetran la epidermis de los tejidos; esto ocurre en un periodo aproximado de 48 horas (Attard *et al.*, 2008). La colonización del tejido del hospedante progresa y, en tejidos susceptibles, la esporulación ocurre dentro de tres a cinco días en condiciones de ambiente favorable (Rodríguez & Vera, 2015).

Durante la reproducción sexual se forman las oosporas por acoplamiento de dos tipos de estructuras especializadas, llamadas anteridio (estructura reproductiva masculina) y oogonio (estructura reproductiva femenina), de compatibilidad complementaria (A1 y A2). Sin embargo, las oosporas son raramente observadas en la naturaleza, debido a que los dos tipos de apareamiento (A1 y A2) pocas veces se encuentran juntos (Guest, 2007). Las oosporas germinan desarrollando micelio o produciendo esporangios; su germinación está influenciada por la edad, nutrición, temperatura y luz. El *Phytophthora* es un parásito facultativo que parasita a otro organismo susceptible si se dan las condiciones favorables y requiere de estructuras de supervivencia como clamidosporas y oosporas que le permitan sobrevivir en ausencia de hospederos (Widmer, 2010).

#### **2.1.4.3. Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad**

La enfermedad se encuentra adaptada a las regiones húmedas y la intensidad del daño se

incrementa en la época de lluvias (Weststeijon, 1965). La precipitación es uno de los factores más importantes para la ocurrencia de una epidemia, iniciándose esta 4 a 5 días después de una fuerte lluvia (Galindo, 1986).

El principal agente de diseminación de las zoosporas es el salpique ocasionado por la lluvia y también por el agua que se escurre a lo largo de troncos y ramas, la incidencia y severidad de la enfermedad se incrementa cuando hay una alta humedad durante largos periodos de tiempo y las temperaturas son relativamente bajas, 18-20°C, condiciones que favorecen la reproducción del hongo, las principales fuentes de inóculo son los frutos enfermos, la corteza de mazorcas cosechadas enfermas, las mazorcas momificadas, el suelo infestado, los cojines florales, la corteza del tronco y los brotes de cacao infectado que crecen cerca del suelo (Galindo, 1986).

#### **2.1.4.4. Sintomatología y signos**

La infección por *Phytophthora palmivora* también aparece en otros órganos de la planta, como tallos, ramas y chupones, donde forma lesiones cancerosas, que se constituyen en fuente de inóculo (Gregory & Maddison, 1981; Guest *et al.*, 1994). *Phytophthora palmivora* ataca igualmente cojines florales y destruye completamente las flores (Rodríguez & Vera, 2015).

Produce la muerte de arriba hacia abajo de los brotes tiernos de las plantas adultas (chupones) y de las plántulas de vivero. Causa el cáncer del tronco que se caracteriza por la aparición de lesiones circulares que al remover la corteza tienen una coloración rojiza y pueden eventualmente producir la muerte del árbol. En la raíz, produce lesiones marrones y trastornos en la absorción del agua y de nutrientes, lo cual puede matar al árbol (Phillips-Mora & Cerda, 2009).

En condiciones favorables de humedad, el hongo también ataca plántulas y causa necrosis de la hoja (tizón), daño al sistema radical y al tallo principal; de esta manera, provoca la muerte de plántulas. La infección en hojas maduras se caracteriza por necrosis irregular del tejido foliar, pero no es considerada importante en la diseminación y supervivencia del patógeno (Rodríguez & Vera, 2015).

#### 2.1.4.5. Epidemiología

El inicio del proceso de infección depende de las condiciones ambientales, la humedad relativa alta y las bajas temperaturas. Las épocas de lluvias, por ejemplo, son favorables para la liberación de las esporas y su dispersión. Su propagación se facilita según el ICA, bajo ciertas condiciones (ICA, 2012).

- Cuando hay salpicadura de la lluvia, pues aprovecha el inóculo presente en el suelo para afectar a las mazorcas más cercanas al suelo.
- La escorrentía que transporta en la corriente del agua las esporas y permite la dispersión del patógeno.
- También el viento moviliza las esporas atrapadas en microgotas de agua. De esta manera las esporas transmiten la enfermedad
- El inicio de la enfermedad se da en condiciones óptimas de humedad (agua libre) y temperatura (15° – 38° C) libera las esporas que son estructuras móviles de vida corta.

Las especies del género *Phytophthora* presentan dos tipos de reproducción: asexual (con la formación de clamidosporas y esporangios, que contienen las zoosporas) y sexual (mediante la formación de oosporas) (Rodríguez & Vera, 2015).

Los esporangios, que son las estructuras reproductivas asexuales del hongo, requieren de agua para su germinación y pueden presentar dos modos de germinación dependientes de las condiciones de temperatura. La temperatura más elevada favorece la germinación directa del esporangio en la cual el tubo germinativo se origina, principalmente, a partir de la papila del esporangio; este, a su vez, puede dar lugar rápidamente al micelio o producir un nuevo esporangio. La baja temperatura favorece la ruptura del esporangio, liberación y germinación de los zoosporos, lo que incrementa el nivel de inóculo, ya que cada esporangio tiene de 20 a 30 zoosporas que constituyen un mayor número de unidades infectivas o propágulos, mientras que la germinación directa del esporangio constituye un solo propágulo del hongo (Dennis & Konam, 1994; Erwin & Ribeiro, 1996).

Los zoosporos son los propágulos infectivos más importantes para la diseminación del hongo, aunque no se descarta la posibilidad de propagación por medio de clamidosporas e hifas. Las zoosporas de *P. palmivora* y *P. megakarya* tienen la capacidad de sobrevivir en el suelo o en las raíces por un periodo de hasta cuatro meses, mientras que las clamidosporas sobreviven hasta por 6 años y las oosporas por 13 (Drenth & Guest, 2004).

#### **2.1.4.6. Métodos de control**

Existen cuatro métodos básicos para controlar el patógeno causante de la enfermedad: control cultural, químico y biológico y uso de materiales resistentes. Una estrategia de manejo integrado para el control de *Phytophthora* empleando estos cuatro métodos se debe enfocar en eliminar las fuentes de inóculo primario (Rodríguez & Vera, 2015).

Los fungicidas tales como metalaxil, fosfonato y el cobre pueden proporcionar un buen control de *P. palmivora* en el cacao (Guest *et al.*, 1994), sin embargo, los efectos de su empleo en la inducción de resistencia en el patógeno, la alta presión de la enfermedad durante la estación húmeda, los altos costos de producción y los elevados riesgos de contaminación ambiental le restan eficiencia y rentabilidad a su empleo; por tanto, resulta más efectivo su uso cuando se combina con prácticas culturales (Vos *et al.*, 2003).

Muchos experimentos sobre control biológico (CB) en *Phytophthora sp.* en cacao se han desarrollado en laboratorio, cultivo in vitro o mazorcas sanas, identificando microorganismos con potencialidad como controladores de *Phytophthora sp* (Rodríguez & Vera, 2015). El uso de bacterias antagonistas en el manejo de patógenos en cultivos anuales y perennes sobresale como una alternativa a los problemas ambientales causados por la agricultura intensiva tradicional (Singh *et al.*, 2011). Estas bacterias se pueden aislar de la rizosfera del cultivo o de la superficie de las hojas o frutos (Hernández *et al.*, 2006).

Algunas cepas de PGPB de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* se utilizaron como antagonistas de *Phytophthora spp.* (Hernández *et al.*, 2014), Koranteng & Awuah (2011) aislaron y caracterizaron ocho rizobacterias antagonistas de *P. palmivora* y demostraron que productos a base de las bacterias y sus caldos libres de células, podrían ser utilizados como biofungicidas para controlar la enfermedad.

### **2.1.5. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)**

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

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son un grupo de microorganismos que colonizan las raíces de las plantas y mejoran el crecimiento de las plantas directa o indirectamente. Estudios demuestran que la aplicación de PGPR genera un alivio del estrés abiótico en diferentes cultivos de planta. (Bharti *et al.*, 2016).

Estos microorganismos pueden encontrarse en asociaciones simbióticas o de vida libre. Estos últimos están asociados a las partículas del suelo generando interacciones con las raíces de las plantas, en la zona de la rizosfera (Pena & Reyes, 2007).

Las PGPR del género *Pseudomonas sp* son utilizadas como controladores biológicos de insectos - plagas, e influyen en el crecimiento y etapas del desarrollo de insectos. La aplicación de este tipo de rizobacterias en diversos cultivos ha dado como resultado la promoción del crecimiento de las plantas, observándose un incremento en el número de brotes, vigor, producción de biomasa y desarrollo del sistema radicular (Canchignia *et al.*, 2016).

### **2.1.6. Utilización de las PGPR en la agricultura**

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

grupos de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, como agentes de control biológico (Bach & Díaz, 2011).

#### **2.1.7. *Pseudomonas veronii* R4**

Las rizobacterias tienen actividad antagonista y son empleadas a problemas patológicos y promueven el desarrollo del tejido radicular. Los niveles de estímulo en rizobacterias se relaciona con la habilidad que tiene R4 en desarrollar el complejo de simbiosis inducido por la vía del etileno (ET), estimulan la expresión de crecimiento, desarrollo, masa foliar, formación de tejido radicular en hojas, etc. (Peñafiel *et al.*, 2016).

#### **2.1.8. *Pseudomonas protegens* CHA0**

*Pseudomonas protegens* es una eubacteria de vida libre aislada de las raíces del tabaco en Suiza. Produce metabolitos secundarios con actividad antibiótica de amplio espectro (cianuro de hidrógeno [HCN], pyoluteorin y pirrolnitrin) asociados con la inhibición de fitopatógenos, así como la fitotoxicidad. ( Jousset *et al.*, 2014).

Los compuestos antimicrobianos producidos por *Pseudomonas fluorescens* son armas eficaces contra una gran diversidad de organismos como hongos, oomicetos, nematodos y protozoos ( Flury *et al.*, 2017).

*Pseudomonas protegens* CHA0 se ha utilizado como cepas modelo en estudios sobre la biosíntesis de varias enzimas extracelulares, como AprA. proteasa y metabolitos secundarios tales como 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina (Prn), y pyoluteorin (Plt), con actividad antibiótica en la rizósfera. ( Takeuchi *et al.*, 2014).

## **CAPÍTULO III**

# **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **3.1. Localización del experimento**

El presente trabajo se realizó en el invernadero y los laboratorios de Biología Molecular y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez”, km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo. Sus coordenadas geográficas son 01° 00' 73.7" de latitud Sur y 79° 28' 16.2" de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 metros sobre el nivel el del mar.

### **3.2. Método de Investigación**

Se utilizó el método deductivo partiendo de información procedente de literatura y ensayos anteriores sobre caracterización de hongos y sobre agentes antagonistas, para su correcta identificación.

### **3.3. Fuentes de recopilación de información**

Las fuentes que se utilizaron para la obtención de información serán de: revistas investigativas, publicaciones científicas, libros e información de internet.

### **3.4. Material Biológico**

Se procedió a recolectar muestras de frutos infectados con la “mancha parda” (*Phytophthora palmivora*) en la hacienda Guantupí localizada en el cantón Buena Fé, sus coordenadas geográficas son 0°53'12.5"S y 79°28'00.1"W, a una altitud de 103 msnm, un clima lluvioso tropical de 27°C en promedio y con un tipo de suelo de origen volcánico franco limoso, para posteriormente aislar el hongo.

Se utilizaron semillas de cacao CCN51 (*Theobroma cacao*) para la evaluación patológica en plántulas y la actividad antagonista de las rizobacterias a *Phytophthora palmivora*.

Para las evaluaciones in-vivo se utilizaron PGPR del género *Pseudomonas*.

- *P. protegens* CHA0

- *P. veronii* R4

### **3.5. Materiales y Equipos**

#### **3.5.1. Material de laboratorio:**

- Puntas amarillas 5-200 ul.
- Microtubos 1.5 ml.
- Puntas azules 1000 ul.
- Tubo PCR individual 0.2 ml.
- Cajas monopetri
- Botella Para Esterilización De 500 ml.
- Guantes quirúrgicos talla M
- Vasos de precipitación
- Papel parafilm
- Papel aluminio
- Juego de micro-pipetas (5 unidades: 1000 uL, 200 uL, 20 uL, 5 uL, 2uL)
- Kit de extracción de ADN, PureLink® Genomic DNA.

#### **3.5.2. Material de oficina:**

- Cuaderno
- Computador
- Lapiceros
- USB pendrive

#### **3.5.3. Material para los ensayos in-vivo:**

- Fundas plásticas negras de 8x8cm
- Tierra de sembrado (Turba)
- Aspersores
- Mangueras

#### **3.5.4. Equipos de Laboratorio:**

- Nevera de -20
- Balanza analítica 0.001 g
- Termociclador
- Campana extractora de gases

- Cámara fotográfica
- UV transiluminador
- Baño María
- Centrífuga
- Vortex
- Agitador
- Caja electroforética
- Microondas
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave

### 3.5.5. Reactivos:

- PDA (Papa Dextrosa Agar)
- Jugo Natural V8
- Medio SABORAUD
- Extracto de levadura
- Buffer 5x
- Blue Juice
- QIAGEN-Start Protocol
- C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>
- Partidores (para palmivora)
- DNTPs
- Agua ultra pura
- Buffer PCR 10x

### 3.6. Diseño de la Investigación

**a) Diseño para la evaluación in-vivo de la determinación del efecto patológico y la actividad antagonista de las rizobacterias hacia el control de *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao (*Theobroma cacao*) variedad Nacional.**

Para las evaluaciones se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), estableciendo 6 tratamientos, con 6 repeticiones. Lo manifestado se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	30
Tratamientos	5
Total	35

Elaborado: Autor

## **3.7. Manejo del Experimento**

### **3.7.1. Aislamiento de *P. palmivora*.**

Se recolectaron muestras de mazorcas con síntomas presentes de la enfermedad (mancha parda – pudrición acuosa – olor fuerte a pescado) de Cacao CCN 51. Las muestras de mazorca fueron almacenadas en fundas plásticas y puestas en una hielera cooler para su transporte al laboratorio.

Para el aislamiento del hongo se les realizó un triple lavado con agua estéril y alcohol para su desinfección. Se procedió a hacer un corte transversal a la mazorca y se cortaron pequeños fragmentos del interior del fruto en el área en donde se encontraban los síntomas de *Phytophthora palmivora* en las mazorcas enfermas. Se sembraron en cajas monopetri 4 porciones de tejido en un medio PDA+V8 con antibióticos (estreptomina – cloranfenicol) para luego ser incubadas por 4 días a 28 °C para el desarrollo completo de la colonia.

### **3.7.2. Extracción de ADN de *P. palmivora***

Se sembró un disco del hongo puro de 4mm de radio en medio PDA+V8 para su crecimiento en placa monopetri por 4 días a 28 °C hasta obtener un considerable crecimiento micelial. Se recolectó con una punta de micro pipeta tejido micelial del hongo, y se pesó de 100 a 400 mg de muestra para proceder a la extracción del ADN genómico mediante el kit QIAGEN-Start Protocol. Las muestras obtenidas fueron almacenadas en congelador a -20 °C.

### **3.7.3. Identificación molecular de *P. palmivora***

Para la identificación del hongo se realizó una PCR previamente obtenido el ADN mediante el kit QIAGEN-Start Protocol empleando como cebadores PpalITS\_F (5´-AAAAGCGTGGCGTTGC-3´); PpalITS\_R (5´ AATCATACCACCACAGCTGAA -3´), los cuales se anclan en los ADNr 25 S y 18 S, respectivamente, por lo que incluyen también el 5.8 S (Contreras, 2015).

La PCR se la realizó en tubos de 1.5 ml con un volumen final del mix de 20 ul que contienen: Agua 10.7 ul Ultra pura, Partidores: PpalITS\_F (forward), PpalITS\_R (reverse), 5 ul Buffer 10x, 1 ul DNTPs, 0.3 ul de Taq Polimerasa y 2 ul de ADN.

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

Las muestras fueron observadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñidas con bromuro de etidio 2 ul donde se obtuvieron productos de amplificación de 600 a 750 pb.

### **3.8. Establecimiento de los experimentos**

Se realizó la recolección de 108 semillas de cacao CCN 51 de la finca "La María". A las semillas se les retiró el mucílago y fueron lavadas, para luego dejarlas en un sustrato (Turba + tierra de guabo en proporción 3/1) húmedo por 2 días hasta que germinen y posteriormente ser sembradas en fundas plásticas de 15 x 20 cm con sustrato previamente preparado. Después de 3 días se observó los primeros brotes de las semillas.

Las plantas fueron distribuidas en seis camas separadoras cada una con una dimensión de 1m de largo por 0.5m de ancho. La separación entre camas fue de 0.4 m, cada una constó de dos hileras separadas a 0.2m entre sí.

#### **3.8.1. Tratamientos**

Para la elaboración de los tratamientos se empleó un total de 108 plantas de cacao. Se realizó las evaluaciones para la determinación del efecto patológico y la actividad antagonista de las rizobacterias hacia el control de *Phytophthora palmivora* estableciendo los siguientes tratamientos:

- **T<sub>1</sub>**: Cacao (Sin aplicación)

- **T<sub>2</sub>**: Cacao + *P. palmivora*
- **T<sub>3</sub>**: Cacao + *P. protegens* CHAO
- **T<sub>4</sub>**: Cacao + *P. veronii* R4
- **T<sub>5</sub>**: Cacao + *P. protegens* CHAO + *P. palmivora*
- **T<sub>6</sub>**: Cacao + *P. veronii* R4 - *P. palmivora*

### **3.8.2. Evaluación de semillas de cacao - inoculación de las plantas**

Las semillas de cacao se desinfectaron con hipoclorito de sodio NaClO al 2%., se seleccionaron semillas pre germinadas las cuales fueron trasplantadas en unas fundas de sembrado con capacidad de 2 kilogramos.

Las rizobacterias *P. protegens* CHAO y *P. veronii* R4 que se utilizaron pertenecen al banco de Cepas de Rizobacterias del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad antes mencionada. Se realizaron dos tipos de inoculaciones, la primera por medio de la raíz con 10ml de la bacteria y la segunda por medio de aspersión con un atomizador, efectuando dos aplicaciones por cada planta de forma suprafoliar en los días 36 y 40 después del trasplante.

Se inocularon esporas del hongo *P. palmivora*, obtenidas del cantón Buena Fe. Las inoculaciones se las realizó a los 55 y 62 días después del trasplante, mediante la extracción de discos con colonias puras del hongo en un medio de cultivo PDA+V8, estos discos se los colocó en el ápice de las hojas de cada planta.

## **3.9. Variables a evaluar**

### **3.9.1. Altura de planta**

Los datos se tomaron de forma manual a los 14 y 28 días después de la inoculación usando una cintra métrica midiendo desde el cuello del tallo de las plantas hasta el ápice del brote más largo.

### **3.9.2. Numero de hojas**

El conteo de hojas se realizó en conjunto con la toma de datos de altura de plantas a los

14 y 28 días después de la inoculación.

### **3.9.3. Peso de plantas, hojas y raíces (g)**

Para el peso separado de planta, hojas y raíces se procedió a arrancar del sustrato las plantas a los 39 días después de la inoculación. Los datos de peso fueron registrados con el uso de una balanza expresada en gramos.

### **3.9.4. Longitud de raíz (cm)**

Se midió con cinta métrica tomando como punto referencial desde el hipocótilo hasta el ápice de la raíz principal.

### **3.9.5. Evaluación de la incidencia de la enfermedad causada por *P. palmivora* en plántulas de cacao CCN 51**

La incidencia de enfermedad causada *P. palmivora* se la midió en porcentajes evaluando el número plantas infectadas de cada tratamiento en contraste al control mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de plantas sin tratamiento} - \text{N}^\circ \text{ de plantas con tratamiento}}{\text{N}^\circ \text{ de plantas sin tratamiento}} \times 100$$

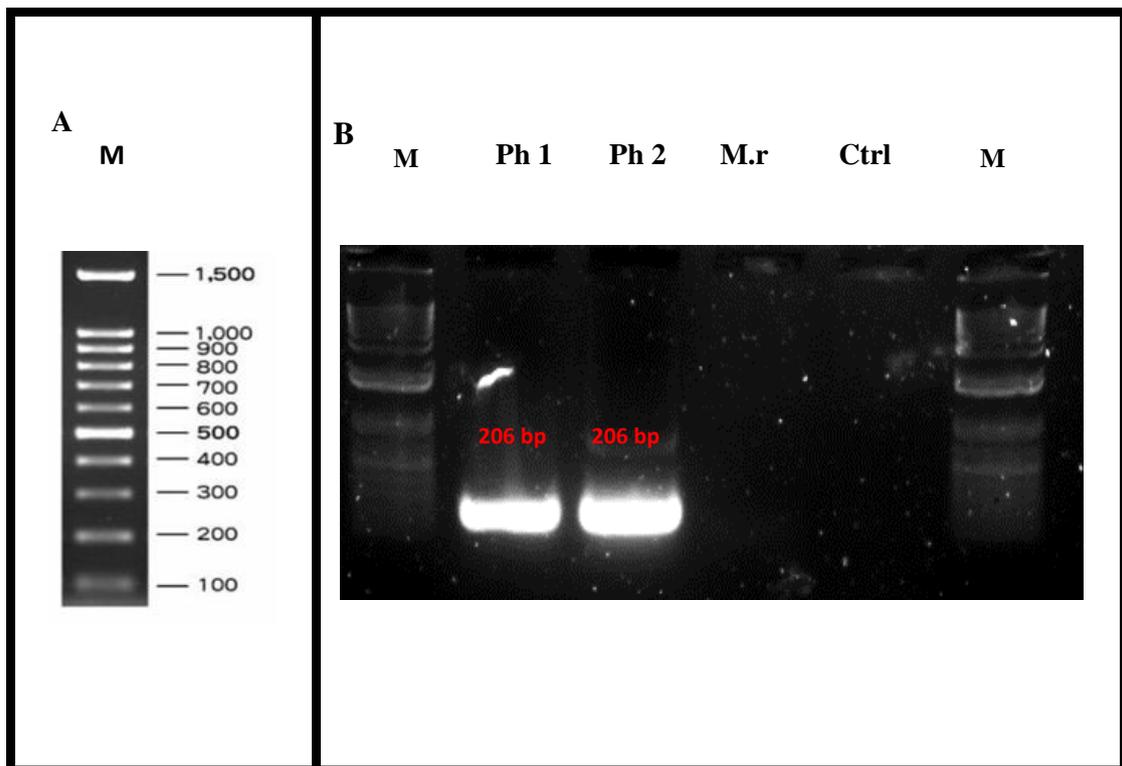
**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. Resultados

### 4.1.1. Identificación Molecular de *Phytophthora palmivora*

Se extrajo el ADN genómico del micelio del hongo el cual se dejó crecer previamente hasta cubrir la caja Petri por completo.

La identificación molecular de *Phytophthora palmivora*, se realizó mediante PCR utilizando los primarios específicos PpalITS\_F y PpalITS\_R, generando así un producto de amplificación de 206 bp (Figura 1). La veracidad de la amplificación fue determinada al contrastar la amplificación de *Moniliophthora roreri* y el control con agua.

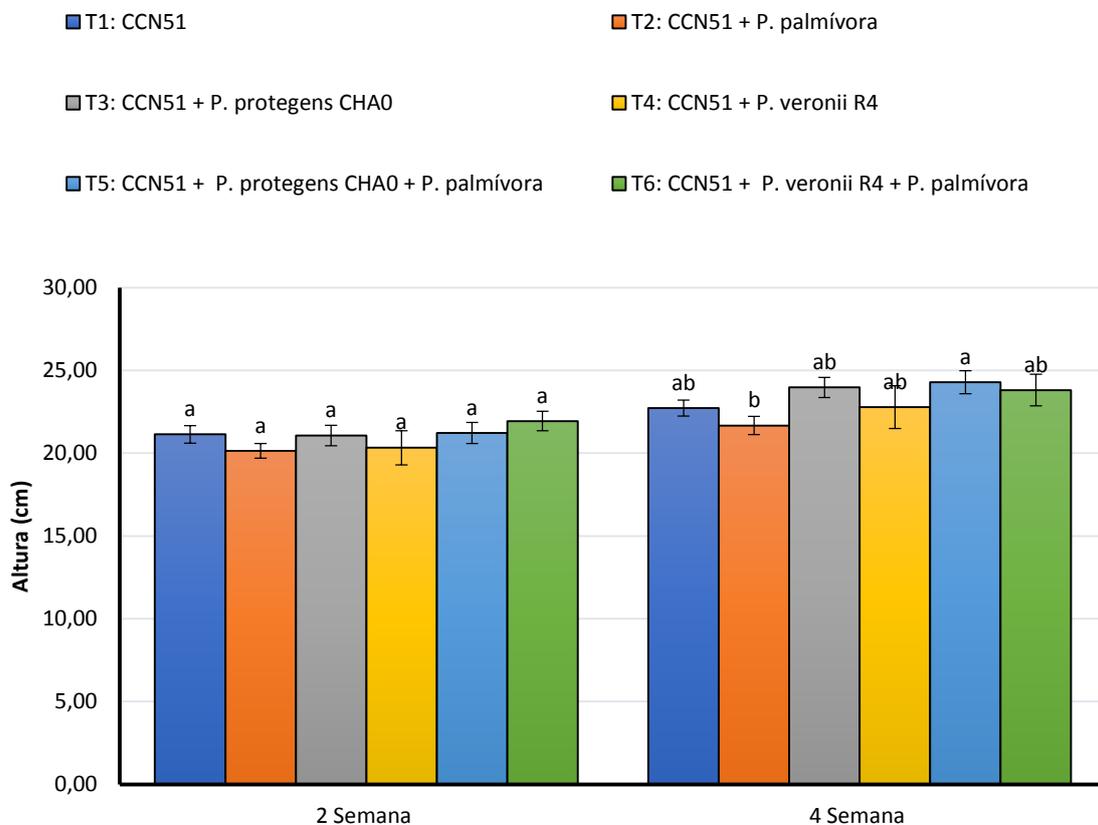


**Figura 1. Identificación molecular *Phytophthora palmivora* mediante PCR.** A, Lader 100pb. B, identificación de *Phytophthora palmivora* mediante PCR Carril M, marcadores de peso molecular; Ph1 *Phytophthora palmivora* (Buena Fe), Ph2 *Phytophthora palmivora* (Buena Fe), M.r (*Moniliophthora roreri*), Ctrl control con agua.

### 4.1.2. Altura de Planta

Las rizobacterias inoculadas en las plantas promueven el crecimiento, desarrollo de raíces, yemas axilares y tejidos foliares. La figura 2 muestra los resultados obtenidos en la variable altura de planta, donde se midió el crecimiento de las plantas a la 2da y 4ta semana después de inoculación (ddi) de *Phytophthora palmívora* y la inoculación con las rizobacterias.

El tratamiento A las 2 semanas de inoculación no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero a la cuarta semana de inoculación se evidenció un crecimiento de las plantas de T3 (*P. protegens* CHAO), T5 y T6 que contenían bacterias y patógeno, estos resultados coinciden por lo manifestado por Canchignia *et al.* (2015); Osorio *et al.* (2011) ; Quiroz & Amores (2002) que indican que las PGPR promueven el crecimiento de la planta, debido que tienen la disponibilidad de colonizarlas raíces y estimular el crecimiento de la planta mediante la generación de metabolitos secundarios.

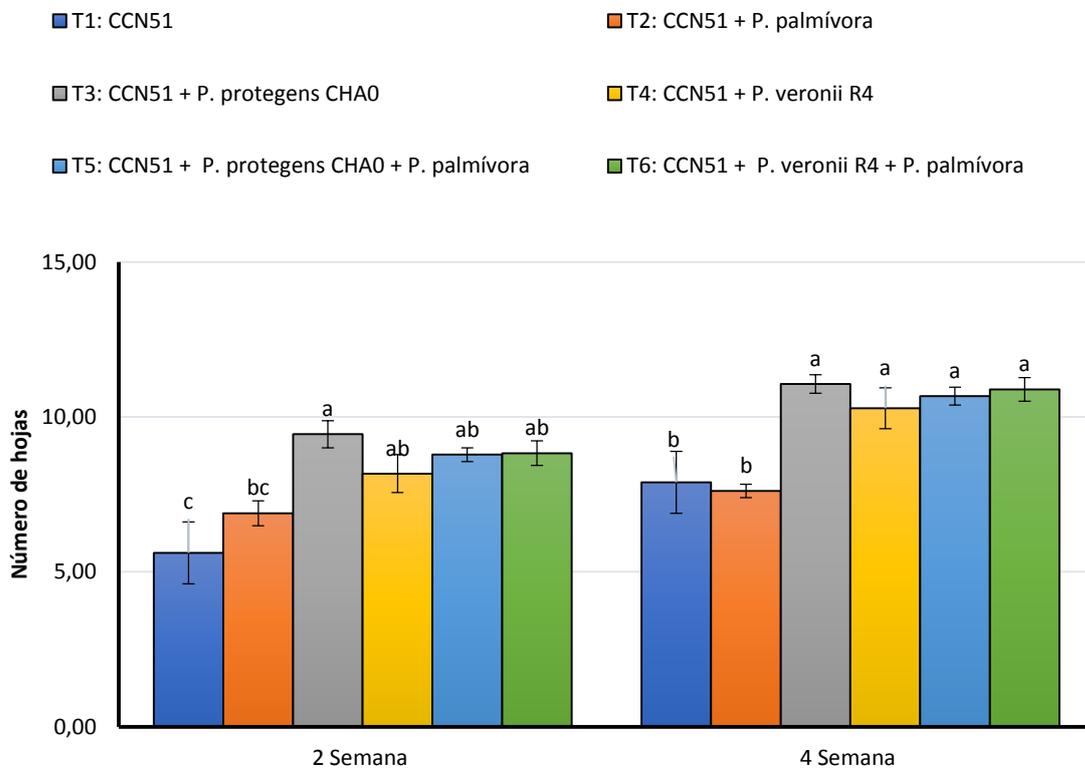


**Figura 2. Altura de planta.** Las barras de error indican  $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (prueba de Tukey).

### 4.1.3. Número de hojas por planta

Esta variable fue evaluada conjuntamente con la altura, se realizó el conteo de las hojas de las plantas para verificar qué tratamiento promueve la aparición de más hojas en las plantas evaluadas, en la figura 3 se muestran los resultados obtenidos.

Se determinó que en la segunda y cuarta semana el tratamiento T3 promovió la aparición de hojas en las plántulas de CCN51 con un valor promedio de 9.44 y 11.06 hojas por planta y, además se observó un incremento en número de hojas estimulado por los tratamientos T4, T5, y T6 a la segunda y cuarta semana de evaluación con valores que oscilan entre 8.17 a 8.83 y de 10.28 a 10.89 respectivamente en las plantas de CCN51. Los tratamientos con menor incremento fueron el control T1 y el T2 presentando valores de 5.61 y 6.89 para la segunda semana, 7.89 y 7.61 para la cuarta, este último debido a que la presencia de *Phytophthora palmivora* desencadena un desequilibrio hormonal en las plantas huésped (SENASICA, 2016).

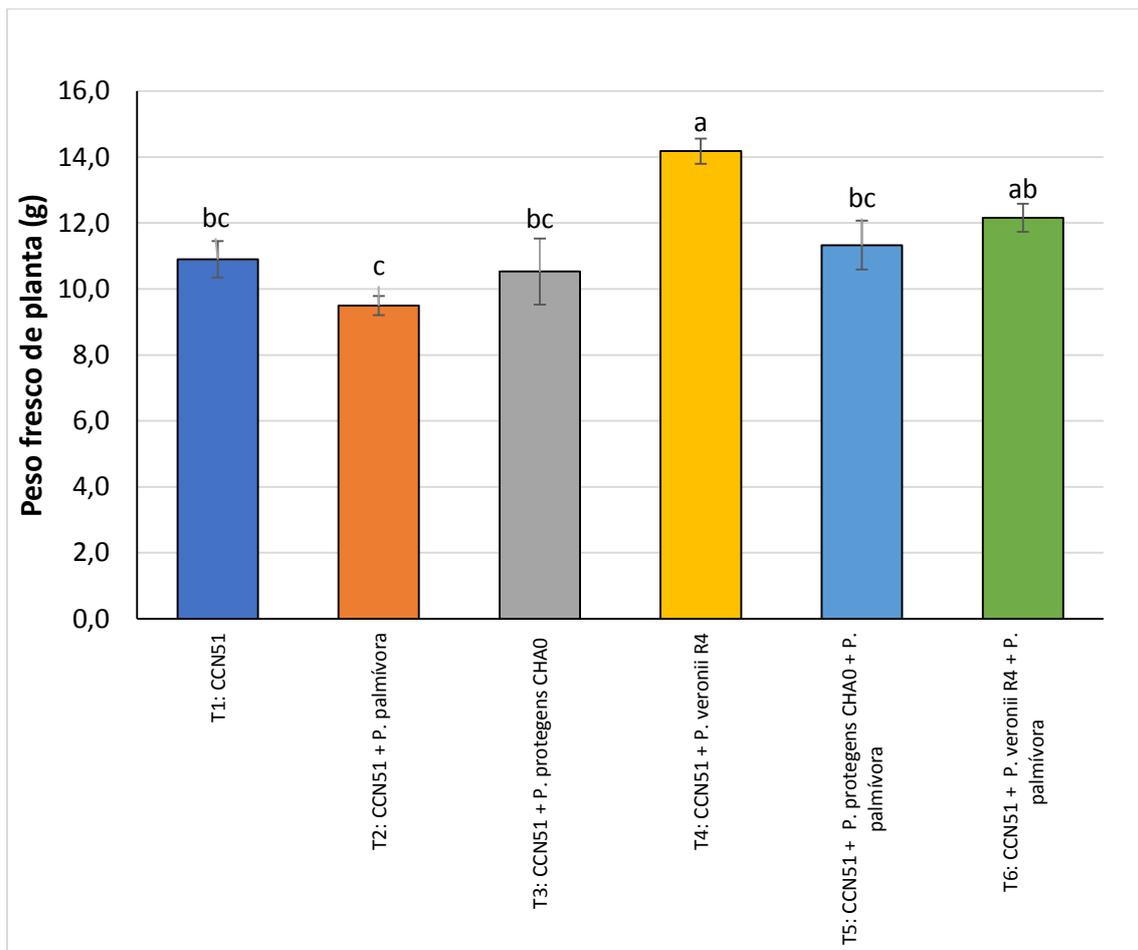


**Figura 3. Número de hojas por planta.** Las barras de error indican  $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (prueba de Tukey).

#### 4.1.4. Peso de Planta

Se realizó la evaluación del peso fresco total de las plantas al final del experimento, con lo cual se obtuvieron datos sobre la incidencia de las bacterias PGPR en el aumento de masa fresca de las plantas de *T. cacao* CCN51, tal como se observa en la figura 4.

Se evidenció el mayor aumento de masa en el tratamiento de la plántula de CCN-51 con *P. veronii* R4 con un valor promedio de 14.18 g coincidiendo con estudios de aplicación de PGPR en plantas, a las cuales se le atribuye el crecimiento de la planta por la producción de fitohormonas o metabolitos primarios tales como citoquininas que promueven y mantienen la división celular de las plantas y están involucradas en varios procesos de diferenciación incluyendo la formación de los brotes, estimulando desarrollo fenológico de las plantas por la facilidad de solubilización de macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento y aumento de masa (Benjumeda , 2017).

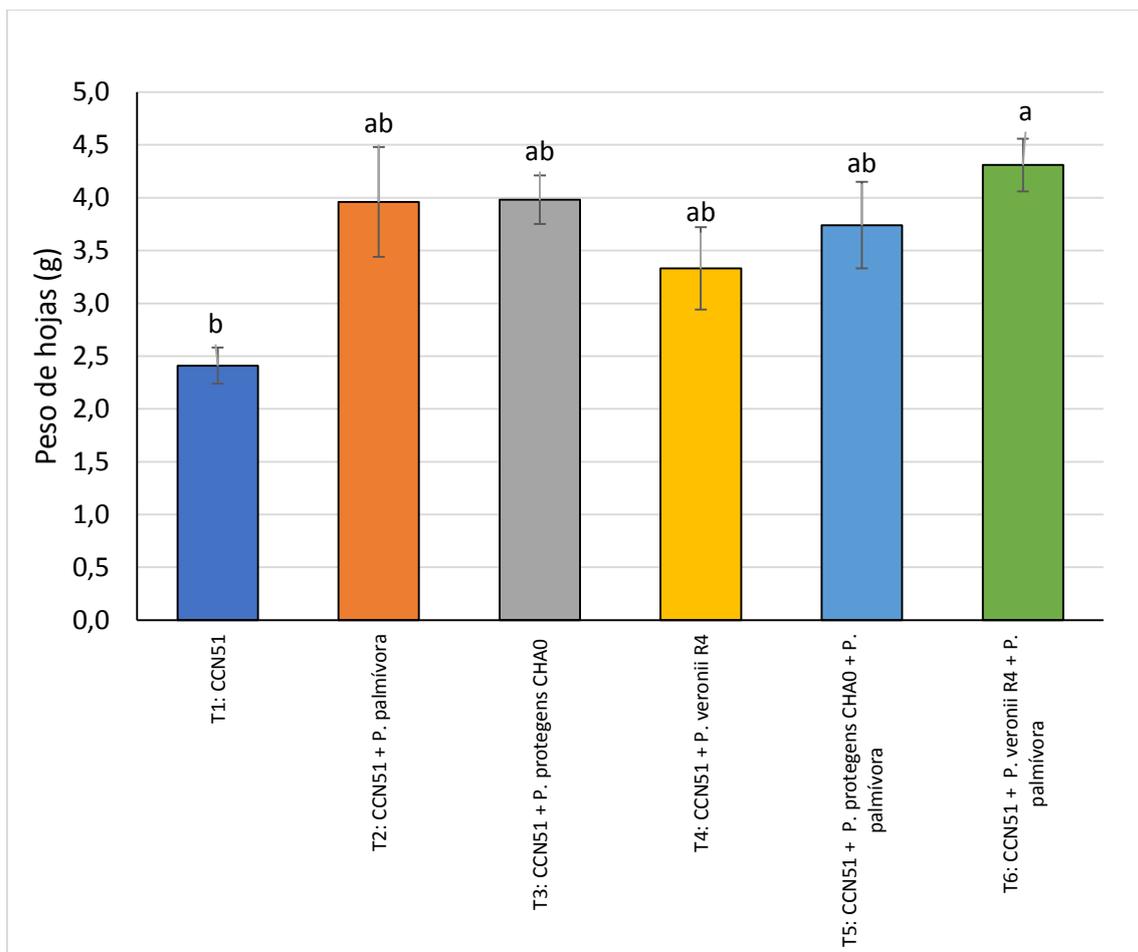


**Figura 4. Peso de planta.** Las barras de error indican  $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (prueba de Tukey).

#### 4.1.5. Peso de Hojas

En la figura 4 se muestran los resultados para la variable peso foliar en plántulas de *T. cacao* CCN-51 a los 39 ddi.

El tratamiento T1 control presentó el peso más bajo con 2.41 g en comparación a los demás tratamientos, mientras que el que mejor resultados demostró fue T6, compuesto por la inoculación de *P. veronii* R4 frente a *P. palmivora* con 4.31 g, lo cual indica un efecto inhibitor de la bacteria *P. veronii* R4 contra *P. palmivora*. La colonización efectiva por *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4, ejercen cambios morfológicos que corresponden al grado de adaptabilidad de la Rizobacterias con la variedad de cada especie (Jaimes & Aranzazu, 2010).

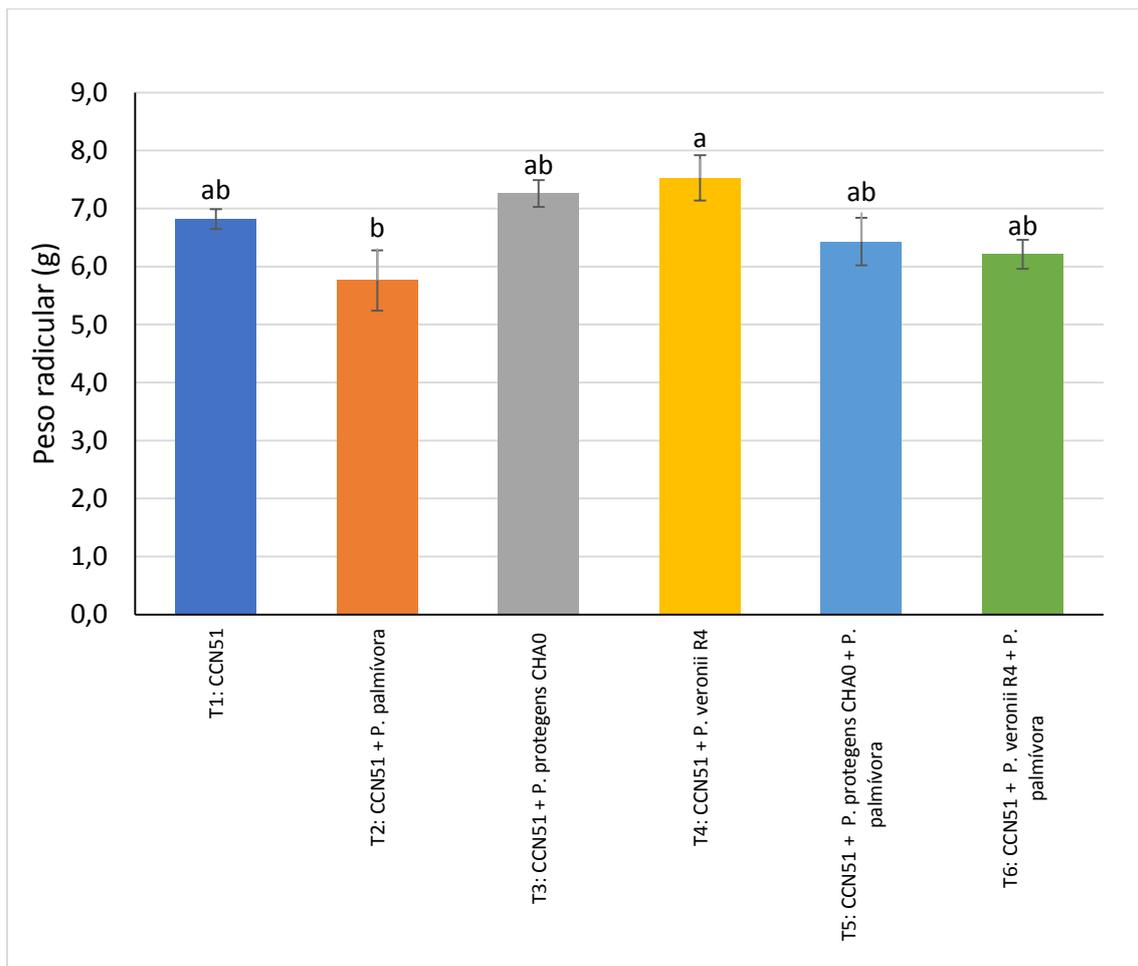


**Figura 5. Peso de hojas.** Las barras de error indican  $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (prueba de Tukey).

#### 4.1.6. Peso de Raíz

En la figura 6 se muestran los resultados para la variable peso fresco radicular, dicha variable fue obtenida después de sacrificar las plantas a los 39 ddi.

Se observa que los tratamientos con la inoculación de las bacterias PGPR tienen un mayor aumento en el peso radicular comparado con el control T1 sin aplicación y con el T2 inoculado con el patógeno, puesto que promueven el crecimiento de plantas y previenen el establecimiento de patógenos. Tal como lo indican Canchignia *et al.* (2015), que las rizobacterias lideran una serie de mecanismos en el sistema radicular en plantas que favorecen en aspectos fisiológicos como: desarrollo radicular por la producción de auxinas y promueven el mecanismo de defensa con la producción de metabolitos secundarios a nivel sistémico. Además, desencadenan una serie de reacciones de defensa en la planta hospedera.

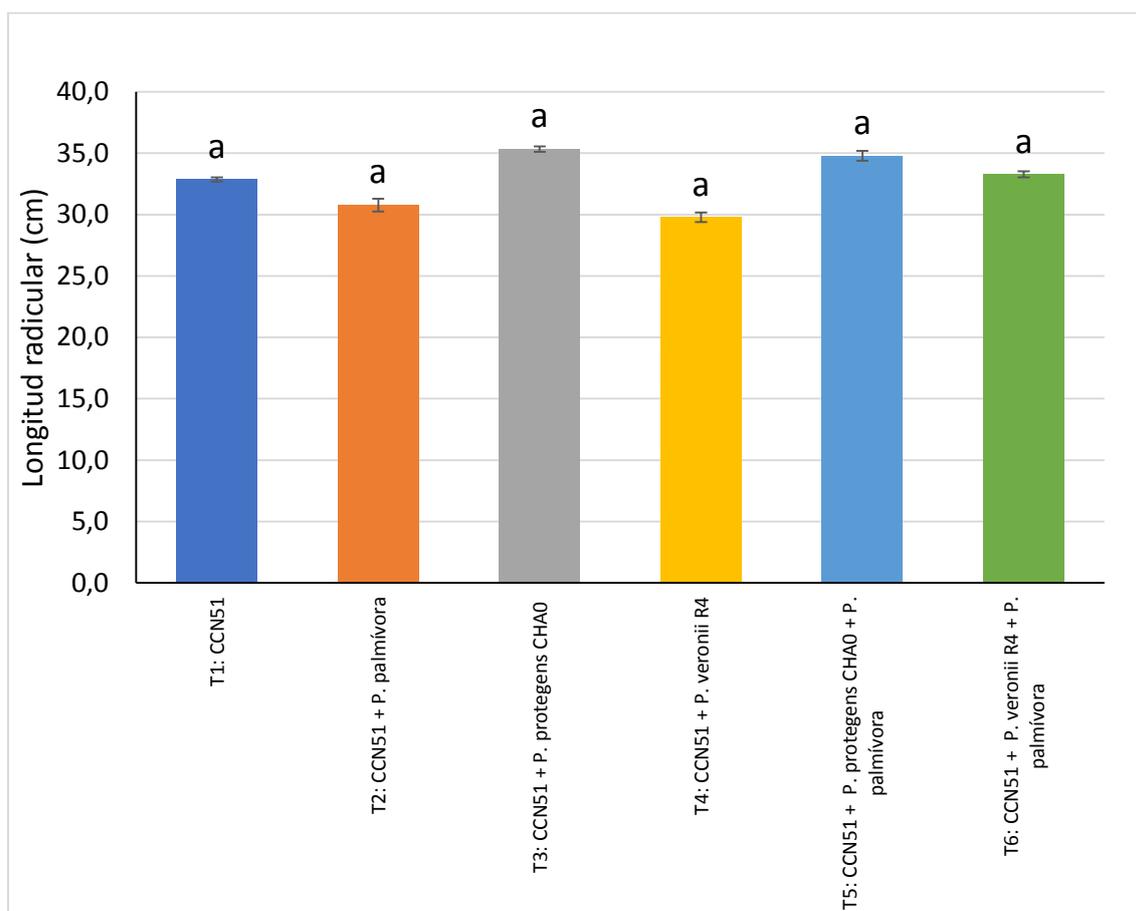


**Figura 6. Peso de raíz.** Las barras de error indican  $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (prueba de Tukey).

#### 4.1.7. Longitud de Raíz

Al evaluarse la variable longitud radicular se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 7, para medir esta variable se tomó en cuenta desde los cotiledones de las semillas hasta la punta de la raíz.

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, no así numéricamente en donde se puede afirmar que los tratamientos T3 con la inoculación de CHA0, y los tratamientos T5 y T6 inoculados con el patógeno *P.palmivora* mas CHA0 y R4 respectivamente obtuvieron los mejores promedios en longitud de la raíz, coincidiendo con los estudios realizados por Canchignia et al. (2015) en donde indican que las rizobacterias del suelo tienen la capacidad de colonizar raíces y estimular el crecimiento en plantas. Esta capacidad de promover el crecimiento ha sido relacionada con diferentes actividades fisiológicas.

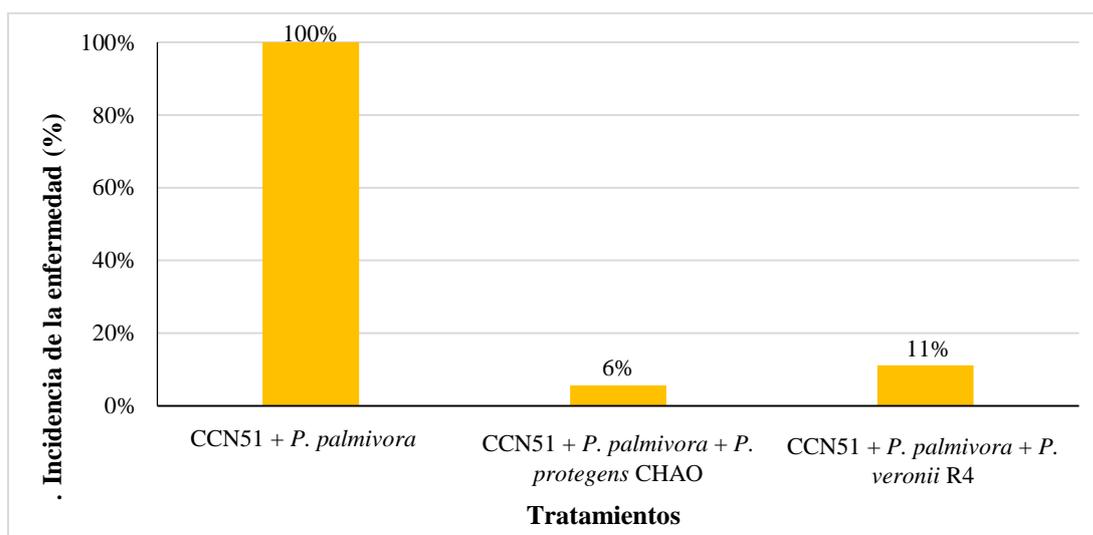


**Figura 7. Longitud de raíz.** Las barras de error indican  $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (prueba de Tukey).

#### 4.1.8. Incidencia de enfermedad

Se realizó la evaluación de la incidencia de la enfermedad por el patógeno *P. palmivora* en el tratamiento T2 con el patógeno *P. palmivora* y los tratamientos T5 y T6 con el patógeno más la inoculación de CHA0 y R4 de acuerdo al nivel de daño presentado en las unidades experimentales, se tomó en cuenta la aparición de los síntomas característicos de dicha enfermedad, en la figura 8 se reflejan los resultados obtenidos en porcentaje de infección.

El tratamiento con la inoculación del patógeno evidenció el porcentaje máximo de infección, esto debido a que el hongo es muy agresivo al momento de infección como lo describen Garcés (1946); Arriaga (2016); Jaimes & Aranzazu (2010), en los tratamiento que contenían rizobacterias se determinó que existió un bajo índice de infección, esto debido a que producen metabolitos secundarios que intervienen en las defensa de las plantas, esto coincide con lo descrito por Canchignia *et al.* (2015) que manifiestan que las PGPR ejercen un efecto sinérgico hacia la planta, ofreciendo una activación rápida y fuerte de las respuestas de defensas antes y después de ser expuestas a un patógeno. Dwivedi & Johri (2003) describe el rol de *P. protegens* CHAO como agente controlador de patógenos fúngicos, donde ellas están ejerciendo un control del patógeno por un efecto antagonista a través de la síntesis de compuestos con actividad anti fúngica.



**Figura 8. Incidencia de la enfermedad.** Las barras de error indican  $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (prueba de Tukey).

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones

- La identificación molecular de *Phytophthora palmivora*, generó un producto de amplificación de 206 bp confirmando su género y especie.
- *P. protegens* CHAO inoculadas en *T. cacao* CCN-51 mostraron efectos antagónicos contra *P. palmivora*, debido a que contribuyeron al incremento de altura y producción de hojas.
- La inoculación *P. veronii* R4 evidenció el mayor aumento de peso de planta en el tratamiento de las plántulas de CCN-51 con un valor promedio de 14.18 g.
- *P. veronii* R4 inoculadas en *T. cacao* CCN-51 no fueron eficientes en el aumento de masa foliar, pero mostró antagonismo en las demás variables evaluadas.
- La inoculación de las bacterias PGPR redujeron la infección de *P. palmivora*, reflejando que con la aplicación de *P. Protegens* CHA-0 y *P. Veronii* R4 se obtuvo una incidencia mínima de la enfermedad del 6 y 11 % respectivamente.

## 5.2. Recomendaciones

- Ampliar la caracterización molecular de *P. palmivora* mediante la técnica ERIC-PCR para ver la diferencia dentro de la misma especie en diferentes sitios de recolección.
- Probar las Rizobacterias seleccionadas en este estudio, frente a *P. palmivora* a nivel de campo, para establecer su actividad antagonista en el cultivo de cacao.
- Realizar ensayos de antagonismo hacia *P. palmivora* con la combinación de varias PGPR a nivel *in-vitro*.

**CAPÍTULO VI**  
**BIBLIOGRAFÍA**

## 5.1. Bibliografía

Flury, P., Vesga, P., Péchy-Tarr, M., Aellen, N., Dennert, F., Hofer, N., . . . Maurhofer, M. (2017). Antimicrobial and Insecticidal: Cyclic Lipopeptides and Hydrogen Cyanide Produced by Plant-Beneficial *Pseudomonas* Strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 Contribute to Insect Killing. *NCBI*.

Jousset, A., Schuldes, J., Keel, C., Maurhofer, M., Rolf, D., Scheu, S., & Thuermer, A. (2014). Full-Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas protegens* CHA0. *NCBI*. doi: 10.1128/genomeA.00322-14

Takeuchi, K., Noda, N., & Someya, N. (2014). Complete Genome Sequence of the Biocontrol Strain *Pseudomonas protegens* Cab57 Discovered in Japan Reveals Strain-Specific Diversity of This Species. *NCBI*.  
doi:10.1371/journal.pone.0093683

Anecacao. (2015). *Asociacion nacioanal de exportadores de cacao - Ecuador*. Recuperado el 11 de Agosto de 2018, de <http://www.anecacao.com>:  
<http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>

Arriaga, V. (2016). *Escoba de Bruja*. Obtenido de Cesaveson :  
<http://www.cesaveson.com/files/docs/campanas/vigilancia/fichas2016/ESCOBA.pdf>

Attard, A., Gourgues, M., Galiana, E., Panabières, V., Ponchet, M., & Keller, H. (2008). Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur r (syn. *P. nicotianae* Breda da Haan). *Journal of Plant Physiology*, 83-94 P.

Barcia, W. (9 de Abril de 2012). *PRODUCCIÓN DE CACAO Y TRIGO EN EL ECUADOR*. Obtenido de PRODUCCIÓN DE CACAO Y TRIGO EN EL ECUADOR: <http://ambitoeconomico.blogspot.com/2012/04/produccion-de-cacao-y-trigo-en-el.html>

- Benjumbeda , D. (Julio de 2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones*, 44 p. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.  
Obtenido de:  
<https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA%20MU%C3%91OZ%2C%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bharti, N., Shanker, S., Barnawal, D., Kumar, V., & Kalra, A. (6 de Octubre de 2016). *NCBI*. Obtenido de NCBI:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5052518/>
- Canchignia , H., Peñafiel, M., Belezaca, C., Carranza, M., Prieto, Ó., & Gaibor, R. (2015). Respuesta de poblaciones microbianas que lideran el crecimiento en raíces y resistencia sistémica inducida. *Ciencia y Tecnología*, 8(2), 1-11.
- Canchignia, H., Cruz, N., & Barrera, A. (2016). Aplicación de Rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas* spp como controladores biológicos de insectos y nemátodos-plagas. *ARTÍCULO DE REVISIÓN en Ciencia y Tecnología* , 25-35.
- Canchignia, H., Cruz, N., Barrera, A., Morante, J., Canchignia, G., & Peñafiel, M. (2015). Aplicación de Rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas* spp como controladores biológicos de insectos y nemátodos-plagas. *Ciencia y Tecnología*, 8(1), 25-35.
- Carvajal, T., Carrillo, R., Solorzano, G., Cobeña , G., Rivera, R., & Valdez, J. (2008). *Propagacion de plantulas de cacao en vivero*. Estacion Experimental Portoviejo, Nucleo de transferencia y comunicacion . Portoviejo, Ecuador: INIAP.
- Chaves, G., Ortíz, M., & Ortiz, L. (2017). Efecto de la aplicación de agroquímicos en un cultivo de arroz sobre los microorganismos del suelo. *revistas.unal.edu.co*.
- Contreras, L. Y. (27 de Enero de 2015). Identificación molecular de aislamientos de *Monilophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia.

- Crespo del Campo, E., & Crespo, F. (1997). Cultivo y beneficio del cultivo de cacao CCN51. *Primera*, 136 p. Quito, Ecuador: Editorial el Conejo. Recuperado el 4 de Febrero de 2018
- Dennis , J., & Konam , J. (1994). Phytophthora palmivora: Cultural control methods and their relationship to disease epidemiology on cocoa in PNG. *Proceedings of the 11th International Cocoa Research Conference*. Yamusukro, Costa de Marfil.
- Dimas, A., & Montero , L. (2009). Estudio preliminar sobre el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) en el municipio Tucupita del estado Delta Amacuro, Venezuela. *UDO Agrícola*, 268 - 272.
- Drenth , A., & Guest , D. (2004). Phytophthora in the tropics. *Diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia Canberra*, 30-41 p. Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Dwivedi, D., & Johri, B. (2003). Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science*, 85(12), 1693-1703.
- End, M., Daymond, A., & Hadley, P. (2014). *Bioversity International*. Recuperado el 12 de Agosto de 2018, de [www.bioversityinternational.org](http://www.bioversityinternational.org):  
<http://www.bioversityinternational.org/>
- Erwin , D., & Ribeiro , O. (1996). Phytophthora diseases worldwide. *The American Phytopathological Society*.
- Galindo, J. (1986). Efecto de poda sanitaria y practicas culturales sobre el combate de mazorca negra y moniliasis del cacao. *In seminario taller de fitopatología. Memorias del taller de fitopatología*, 58-66 p. Panama.
- Garcés, C. (1946). La escoba de bruja del cacao. *Revista Nacional de Agronomía*, 6(24), 1-41.

- Gregory , P., & Maddison, A. (1981). *Epidemiology of Phytophthora on Cocoa in Nigeria*. Londres: Commonwealth Mycological Institute.
- Guerrero, G. (2011). *Revista lideres*. Recuperado el 11 de Agosto de 2018, de [www.revistalideres.ec](https://www.revistalideres.ec): <https://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano-historia-empezo-siglo.html>
- Guerrero, G. (2014). *Revista lideres*. Recuperado el 11 de Agosto de 2018, de [www.revistalideres.ec](http://www.revistalideres.ec): <http://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano-historia-empezo-siglo.html>
- Guest , D. (2007). Black pod: diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology* , 1650-1653 p.
- Guest , D., Anderson , R., Foard , H., Phillips , D., Worboys , S., & Middleton , R. (1994). Long-term control of Phytophthora diseases of cocoa using trunk injected phosphonate. *Plant Patho*, 479-492 p.
- Hardy, F. (1961). *Manual de cacao*. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Hernández , A., Velásquez , M., & Hernández , A. (2006). Use of antagonistic microorganisms for the control of postharvest diseases in fruits. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 111-121 p.
- Hernández, A., Ruíz, Y., Acebo, Y., Miguélez, Y., & Heydrich, M. (2014). Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*.
- ICA. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo de cacao (*Theobroma caca* L.) medidas para la temporada invernal. 43 p. Bogota, Colombia: Instituto colombiano agropecuario ICA. Recuperado el 5 de Marzo de 2018

- INIAP. (1994). Manual del cultivo de cacao. 143 p. (C. Suarez, M. Moreira, & J. Vera, Edits.) Quevedo, Ecuador: INIAP. Recuperado el 29 de Enero de 2018
- Iwaro , A., Thévenin , J., Butler , D., & Eskes , A. (2005). Usefulness of the detached pod test for the assessment of cocoa pod resistance to Phytophthora pod rot. *European Journal of Plant Pathology*, 173-182 P.
- Jaimés, Y., & Aranzazu, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Colombia: Corpoica.
- Koranteng , S., & Awuah , R. (2011). Biological suppression of black pod lesion development on detached cocoa pods. *African Journal of Agricultural Research*, 67-72 p.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería . (2017). Producción de cacao apunta a romper récord este año. *Ministerio de Agronomía y Ganadería*.
- Osorio, C., Alberto, C., Botero, M., Rivera, F., & López, G. (2011). Evaluación microbiológica y molecular de Moniliophthota pernisirosa (Agaricales: Maras Miaceae. *Scielo Digital*.
- Parra, D., & Camejo, C. (2015). *Reconocimiento de enfermedades de cacao en vivero y su manejo*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Venezuela.
- Peñafiel, M. J., Sanchez, E. S., Cruz, N. R., Belezaca, C., Prieto , H. E., & Canchignia , H. M. (28 de 1 de 2016). *Revistas UTEQ*. Obtenido de revistas.uteq.edu.ec: [revistas.uteq.edu.ec/index.php/cyt/article/view/111](http://revistas.uteq.edu.ec/index.php/cyt/article/view/111)
- Perez, M., Peñaranda, L., & Herazo, M. (2010). *Impacto, manejo y control de enfermedades causadas por Phytophthora palmivora en diferentes cultivos*, 71 p. Pamplona, España: Universidad de Pamplona.

Perez, S., Noceda, C., Zambrano, O., Parra, D., Cordoba, L., & Sosa, D. (Septiembre de 2017). Descripción de plagas en viveros de cacao en el cantón Milagro a partir de diferentes fuentes de informacion. *Revista Ciencia UNEMI, Vol 10(N° 24)*, 19 - 38p.

Phillips-Mora, W., & Cerda, R. (2009). Fitóftora y cancer del tronco. *Catálogo: enfermedades del cacao en Centroamerica*. Costa Rica: CATIE.

Quiroz, J. (2009). *La produccion de cacao*. Estacion Experimental Central de la Amazonia . Quito, Ecuador: INIAP.

Quiroz, J., & Amores, F. (2002). Rehabilitación de plantaciones tradicionales de cacao en Ecuador. *Manejo Integrado de Plagas*(63), 73-80.

Quiroz, J., & Soria, J. (1994). *Caracterizacion fenotipica del cacao nacional de Ecuador*. Estacion Experimental Tropical Pichilingue. Quevedo, Ecuador: INIAP.

Roberto. (1 de Noviembre de 2010). *Agricultura tropical ecuador*. Obtenido de Agricultura tropical ecuador: <http://agricultura-tropical-ecuador.blogspot.com/2010/11/el-cacao-ecuadoriano.html>

Rodríguez , E., & Vera , A. (2015). *Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (Phytophthora sp.) en cacao.*, 60 p. Bogota, Colombia: Corpoica. Recuperado el 2 de Agosto de 2018, de [http://digitool.gsl.com.mx:1801/webclient/StreamGate?folder\\_id=0&dvs=1533234909345~863](http://digitool.gsl.com.mx:1801/webclient/StreamGate?folder_id=0&dvs=1533234909345~863)

Rodríguez , E., & Vera, A. (2015). *Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (Phytophthora sp.) en cacao*. Bogota, Colombia: CORPOICA.

SENASICA. (2016). Ficha técnica n° 4. *Escoba de bruja del cacao - Moniliophthora perniciosa (Stahel)* . México: SAGARPA.

- Singh , J., Pandey , V., & Singh , D. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 339-353 p.
- Suarez, C. (1994). *Manual del cultivo de cacao*. Estación Experimental Tropical Pichilingue. Quevedo, Ecuador: INIAP.
- Surujdeo-Maharaj, S., Sreenivasan, T., Motilal, L., & Umaharan, P. (2016). En *Black Pod and Other Phytophthora Induced Diseases of Cacao: History, Biology, and Control*. In *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters* (págs. 213 – 266 p).
- Tapia, E. (2014). El cacao ecuatoriano huele a USD 700 millones. *El comercio*.
- Tuttle, M. (2014). ¿Qué son los fungicidas? *APS*, 60-66.
- Vos , J., Ritchie , B., & Flood , J. (2003). Discovery learning about cocoa: an inspiration guide for training facilitators . *CABI Bioscience*.
- Walker , C., & Van West , P. (2007). Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biol Rev*, 10-18 P.
- Weststeijon , G. (1965). La susceptibilidad de Theobroma cacao L. a la pudrición de la mazorca por Phytophthora. *II Sesión del Grupo Técnico de Trabajo de la FAO sobre Producción y Protección del Cacao*. Roma, Italia: Instituto de investigaciones del cacao en Nigeria; FAO.
- Widmer , T. (2010). Phytophthora kernoviae oospore maturity, germination and infection. *Fungal Biology* , 661-668 p.

## **ANEXOS**

## 7.1. Anexos

**Anexo 1.** Plántulas listas para la inoculación



**Anexo 2.** Tratamientos; plántula de CCN51 (sin aplicación), plántula de CCN51 + *P. protegens* CHAO y plántulas de CCN51 + *P. palmívora*.



**Anexo 3.** Inicio de síntomas de plántula inoculada con *P. palmívora*.



**Anexo 4.** Avance de Síntomas de plántula inoculada con *P. palmívora*



**Anexo 5.** Registro de variables; peso de planta, hojas y raíz.

