



**Selección e identificación de microorganismos nativos del suelo de cacao
(*Theobroma cacao* L.) con potencial antagónico contra *Phytophthora* sp. a nivel *in vitro*
de la hacienda “La Dolorosa”, provincia de Esmeraldas.**

Vélez Cárdenas, Michelle Salomé

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

20 de agosto del 2021



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**Selección e identificación de microorganismos nativos del suelo de cacao (*Theobroma cacao* L.) con potencial antagonico contra *Phytophthora* sp. a nivel *in vitro* de la hacienda "La Dolorosa", provincia de Esmeraldas**" fue realizado por la señorita **Vélez Cárdenas, Michelle Salomé** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 20 de agosto del 2021.

Firma:

ALMA ROSEL KOCH KAISER ALMA ROSAL KOCH KAISER CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE SANGOLQUI, CANTON SANGOLQUI, PROVINCIA DE ESMERALDAS TEL: 06 2 23 23 23 23 FAX: 06 2 23 23 23 23
---------------------------------	---

.....
Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

C. C.: 170888079-2



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, Vélez Cárdenas, Michelle Salomé, con cédula de ciudadanía n° 172430918-0, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Selección e identificación de microorganismos nativos del suelo de cacao (*Theobroma cacao* L.) con potencial antagónico contra *Phytophthora* sp. a nivel *in vitro* de la hacienda "La Dolorosa", provincia de Esmeraldas** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 20 de agosto de 2021

Firma

.....
Vélez Cárdenas Michelle Salomé

C.C.: 172430918-0



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo Vélez Cárdenas, Michelle Salomé, con cédula n° 172430918-0, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: *Selección e identificación de microorganismos nativos del suelo de cacao (Theobroma cacao L.) con potencial antagónico contra Phytophthora sp. a nivel in vitro de la hacienda "La Dolorosa", provincia de Esmeraldas* en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 20 de agosto del 2021

Firma

Vélez Cárdenas Michelle Salomé

C.C.: 172430918-0

Dedicatoria

A mis padres, Haydeé y José

A mis hermanos Ricardo y Gabriel

A mis tíos Nathalia, Gabriela y Fabián

A mis primos Diego, Saul, Israel y Amaya

A Indy y toda su familia

Por haber permanecido a mi lado durante todo este largo camino
y haber sido mi soporte incondicional

Agradecimiento

A mi madre Haydeé, por ser mi ejemplo a seguir y mi motivación constante para ser un ser humano de excelencia.

A mi padre José, por ser mi apoyo incondicional, mi compañero de viajes y mi cajita de historias interesantes.

A mis hermanos Ricky y Gabo, por ser mi apoyo moral en tiempos universitarios.

A mis tíos y primos, por haber permanecido junto a nosotros desde siempre y por haber sabido estar en las buenas, en las malas y en las peores.

A Indy, por haber recorrido este camino junto a mí a pesar de las altas y bajas.

Al equipo de Yura Biosearch, Cris, Majo, Arti y Pame, por darme la oportunidad de formar parte de su maravilloso proyecto que me ha permitido crecer profesional y personalmente.

A Alma por ser una docente maravillosa, gracias por sus enseñanzas, su guía y sus ánimos para continuar con la investigación.

A mis amigos, César, Emi, Pris, Carlitos, Gabo y Sole que aún en la distancia de los últimos tiempos, han estado apoyándome. Gracias por haber compartido conmigo esta experiencia llamada ESPE.

Michelle Salomé Vélez Cárdenas.

Índice de contenidos

Hoja de resultados de la herramienta Urkund.....	2
Certificación	¡Error! Marcador no definido.
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento	7
Índice de contenidos.....	8
Listado de tablas.....	10
Listado de figuras	11
Listado de abreviaturas.....	13
Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Formulación del problema.....	16
Justificación del problema	17
Objetivos de la investigación.....	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
Capítulo II: Marco teórico.....	19
Cultivo de cacao.....	19
Enfermedades del cacao.....	22
Mazorca negra.....	22
Control de la mazorca negra.....	26
<i>Hipótesis</i>	28
Capítulo III: Materiales y métodos	29
Participantes del Proyecto	29
Fase de campo.....	29
<i>Zona de estudio.....</i>	29
<i>Muestras de suelo.....</i>	29
<i>Muestras de material vegetal</i>	30
Fase de laboratorio.....	30
<i>Aislamiento e identificación de <i>Phytophthora</i> sp.....</i>	30
<i>Medición pH del suelo</i>	31

<i>Procesamiento de muestras de suelo</i>	31
<i>Aislamiento, selección e identificación de bacterias de interés</i>	31
<i>Aislamiento, selección e identificación de hongos de interés</i>	31
<i>Pruebas de antagonismo contra Phytophthora sp. en plato dual</i>	32
Análisis estadístico	33
Capítulo IV: Resultados	34
<i>Aislamiento de Phytophthora sp</i>	34
<i>pH de suelo</i>	35
<i>Aislamiento de microorganismos nativos de suelo</i>	35
<i>Identificación de microorganismos nativos</i>	36
<i>Pruebas de antagonismo in vitro contra Phytophthora sp</i>	40
Capítulo V: Discusión	46
Capítulo VI: Conclusiones	51
Capítulo VII: Recomendaciones	52
Bibliografía	53
Anexos	61

Listado de tablas

Tabla 1 Descripción taxonómica del cacao.....	19
Tabla 2 Estratificación de los lotes de la hacienda “La Dolorosa” para el muestreo de suelo y material vegetal.....	30
Tabla 3 Escala de clases de Baker y Cook.....	33
Tabla 4 pH promedio de las muestras de suelo de la Hacienda “La Dolorosa”	35
Tabla 5 Características morfológicas coloniales de las bacterias aisladas de los suelos de la Hacienda “La Dolorosa”	36
Tabla 6 Características morfológicas coloniales de los hongos aislados de los suelos de la Hacienda “La Dolorosa”	36
Tabla 7 Pruebas bioquímicas, morfología microscópica e identificación final de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras de suelo.....	37

Listado de figuras

Figura 1 Morfología del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	21
Figura 2 Diversas formas de esporangios producidos por diferentes especies de <i>Phytophthora</i>	24
Figura 3 Formas de papilas en los esporangios de <i>Phytophthora</i> sp.....	24
Figura 4 Morfología de Clamidospora de <i>Phytophthora</i> sp. y formas de germinación	25
Figura 5 Características macroscópicas de <i>Phytophthora</i> sp. en PDA.....	34
Figura 6 Morfología microscópica de <i>Phytophthora</i> sp. vista en 100x	34
Figura 7 Géneros de hongos aislados de mazorcas de cacao	35
Figura 8 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa C1, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	37
Figura 9 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa C6, <i>B. subtilis</i>	37
Figura 10 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa C7, <i>Bacillus</i> sp.....	38
Figura 11 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa C8, <i>B. thuringiensis</i>	38
Figura 12 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa C9, <i>B. licheniformis</i>	38
Figura 13 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa C10, <i>Bacillus</i> sp.....	39
Figura 14 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa H5, <i>Trichoderma</i> sp. 5	39
Figura 15 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa H8, <i>Trichoderma</i> sp. 8	39
Figura 16 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa H11, <i>Trichoderma</i> sp. 11.....	40
Figura 17 Morfología microscópica (100x) y macroscópica de la cepa H12, <i>Trichoderma</i> sp. 12.....	40
Figura 18 Crecimiento en cultivos duales entre el antagonista <i>Bacillus</i> sp. y el patógeno <i>Phytophthora</i> sp.....	41

Figura 19 Zonas de inhibición producidas por de cepas de <i>Bacillus</i> sp. en cultivo dual contra <i>Phytophthora</i> sp.....	42
Figura 20 Crecimiento en cultivos duales entre el antagonista <i>Trichoderma</i> sp. y el patógeno <i>Phytophthora</i> sp.....	43
Figura 21 Crecimiento radial de <i>Phytophthora</i> sp. frente a <i>Trichoderma</i> sp	44
Figura 22 Porcentajes de inhibición de crecimiento radial de <i>Phytophthora</i> sp. en cultivos duales con los antagonistas <i>Bacillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.....	45

Listado de abreviaturas

TM	Tonelada de mercancía
ha	Hectárea
mL	Mililitros
g	Gramos
µL	Microlitros
h	Horas
°C	Grados centígrados
rpm	Revoluciones por minuto
AN	Agar nutriente
PDA	Agar papa dextrosa
TME	Medio selectivo E de Trichoderma
SNA	Agar Spezieller Nährstoffarmer

Resumen

Entre las enfermedades más importantes que afectan al cultivo de cacao está la mazorca negra o pudrición parda, ocasionada por microorganismos del complejo *Phytophthora*. Aunque el manejo de esta enfermedad involucra diferentes enfoques, es necesario avanzar en la búsqueda de alternativas que permitan mitigar la plaga. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de microorganismos nativos de la rizósfera de cacao sobre *Phytophthora palmivora* aislada e identificada mediante morfología macro y microscópica a partir de mazorcas enfermas procedentes de la hacienda “La Dolorosa” ubicada en la provincia de Esmeraldas. Se obtuvieron además diez microorganismos con potencial biocontrolador a partir de muestras de suelo identificadas como pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Trichoderma*. Al realizar pruebas de cultivo dual, el mejor porcentaje de inhibición de crecimiento (PIRC) lo ejercieron los aislados descritos como *T. harzianum*, *B. subtilis* y *T. asperellum*, estimándose que los mecanismos de acción involucrados en este efecto antagonista son la antibiosis y la competencia por espacio y nutrientes.

Palabras clave:

- **CACAO**
- **MAZORCA NEGRA**
- **ANTAGONISMO**
- **BACILLUS**
- **TRICHODERMA**

Abstract

Among the most important diseases that affect cocoa crops is the black pod or brown rot, caused by microorganisms of the *Phytophthora* complex. Although the management of this disease involves different approaches, it is necessary to advance in the research for alternatives that allow mitigating this trouble. The objective of this investigation was to evaluate the *in vitro* antagonistic capacity of native microorganisms of the cocoa rhizosphere on *Phytophthora palmivora* isolated and identified by macro and microscopic morphology from diseased fruits from the “La Dolorosa” farm located in the province of Esmeraldas. Ten microorganisms with biocontroller potential were also obtained from soil samples identified as belonging to the *Bacillus* and *Trichoderma* genus. Dual culture tests shows the best growth inhibition percentage (PIRC) with the isolates described as *T. harzianum*, *B. subtilis* and *T. asperellum*, estimating that the mechanisms of action involved in this antagonistic effect are antibiosis and competition for space and nutrients.

Keywords:

- **COCOA**
- **BLACK POD DISEASE**
- **ANTAGONISM**
- **BACILLUS**
- **TRICHODERMA**

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

El cacao (*Theobroma cacao* L.) perteneciente a la familia Malvaceae, es un cultivo originario y tradicional de América. En el Ecuador, su importancia es sumamente relevante, pues es uno de los productos principales de exportación. Según el INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos), el sector cacaotero contribuye con el 5% de la población económicamente activa nacional (PEA) y el 15% de la PEA rural, constituyéndose como una base fundamental de la economía de alrededor de 100.000 familias de pequeños y medianos productores de la Costa y Amazonía de país (F. Sánchez et al., 2011).

Fulton (1989) asegura que la planta de cacao se desarrolla en ambientes húmedos y sombreados, condiciones que resultan favorables para que las enfermedades emerjan; convirtiéndose en un factor limitante para su producción y rendimiento. Entre las enfermedades más importantes y frecuentes que afectan al cacao se destacan la escoba de bruja (causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa* Stahel.); la moniliasis (causada por el hongo *Moniliophthora roreri* Cif & Par), las bubas (causadas por *Fusarium decemcellulare*) y la pudrición negra del fruto producida por *Phytophthora* sp. (Ploetz, 2007).

También conocida como mazorca negra o pudrición parda, esta enfermedad ocasiona pérdidas estimadas de 450,000 TM de cacao a nivel mundial y se caracteriza porque su agente causal puede atacar todos los tejidos de la planta. Produce manchas de color café tabaco en hojas nuevas; cáncer o chancro en tronco y raíces, el ennegrecimiento y momificación de los frutos en conjunto con la decoloración y pudrición de las almendras, que resulta ser la principal afección al cultivo (M. Sánchez et al., 2015).

España (2019) menciona que el suelo y los restos de cosecha son un inóculo primario, pues gracias a las condiciones de humedad, *Phytophthora* puede formar clamidosporas que le permiten establecer la infección. Además, con estas estructuras reproductivas puede permanecer latente por mucho tiempo en el suelo desde meses hasta varios años.

Justificación del problema

El manejo de la mazorca negra puede ser abordado desde varios enfoques, como el uso de productos químicos, labores culturales y control biológico. La solución más utilizada para el control de esta enfermedad ha sido la aplicación de métodos de control químico a base de cobre, que, si bien cumplen su objetivo, presentan varios aspectos negativos como la afectación a la salud del agricultor y el daño al medio ambiente por la contaminación del suelo y del agua. Además, para los pequeños agricultores, los agroquímicos pueden llegar a ser inaccesibles porque implican una gran inversión económica y su eficacia puede ser poco satisfactoria pues depende en gran medida de su correcto uso (M. Sánchez et al., 2015).

El uso de microorganismos antagonistas se considera como una estrategia segura y económicamente viable. Según Ibarra y colaboradores (2006), la aplicación de antagonistas microbianos está clasificada como un elemento importante en el manejo integrado de plagas (MIP) y enfermedades de plantas, siendo una alternativa al uso de pesticidas químicos. Varias investigaciones han demostrado que el uso del hongo *Trichoderma* inhibe el crecimiento de *Phytophthora* tanto *in vitro* como *in vivo*, así también existen otros microorganismos benéficos como actinomicetes, *Pseudomonas* sp. y *Bacillus subtilis* que han mostrado efecto antagónico contra el agente causal de la pudrición parda (M. Sánchez et al., 2015). Los suelos agrícolas disponen de una gran diversidad microbiana y en la rizósfera se pueden encontrar bacterias y hongos que promueven mecanismos de defensa a las plantas y suprimen varios patógenos fúngicos (Cedeño Moreira et al., 2020).

Por lo tanto, este proyecto busca aislar e identificar microorganismos nativos de suelo del cultivo de cacao con potencial antagónico a nivel *in vitro* contra *Phytophthora* sp. cuya finalidad es el futuro desarrollo de productos biológicos que permitan contrarrestar el crecimiento y establecimiento del fitopatógeno. Así, se podrá mejorar la producción agrícola sin causar graves impactos a los agroecosistemas.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Seleccionar e identificar de microorganismos nativos del suelo de cacao (*Theobroma cacao* L.) con potencial antagónico contra *Phytophthora* sp. a nivel *in vitro* de la hacienda “La Dolorosa”, provincia de Esmeraldas

Objetivos específicos

- Realizar el muestreo de suelo y fruto del cultivo de cacao en la hacienda “La Dolorosa”.
- Aislar el hongo patógeno *Phytophthora* sp. a partir de mazorcas de cacao enfermas de la hacienda “La Dolorosa”.
- Aislar y seleccionar cepas de microorganismos nativos de interés a partir de muestras de suelo del cultivo de cacao.
- Identificar los aislados seleccionados mediante claves y pruebas dependientes de cultivo.
- Realizar pruebas de antagonismo de los aislados obtenidos contra *Phytophthora* sp. obtenidas de la mazorca de cacao.

Capítulo II: Marco teórico

Cultivo de cacao

Historia y producción

El origen del cacao ha sido estimado en los bosques húmedos tropicales de América del Sur. Su cultivo y manejo fue extendido desde allí, a otras regiones del continente como centro y Norte América; y con la llegada de los europeos, logró ser expandido y establecido en Asia y África (Mendoza, 2013).

Actualmente los países líderes mundiales en su producción son Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún, con una producción cercana al 60%. Este alto rendimiento del continente africano se debe a la ausencia de enfermedades severas que se encuentran en la tierra de origen del cultivo. Así, el continente americano únicamente aporta con el 18% de la producción mundial desde Brasil; seguido de Ecuador con el 6% (Ramírez-González, 2013).

En nuestro país, el cacao se constituye como una especie primordial de los sistemas productivos campesinos de muchas zonas. Varias provincias de la Costa y de la Amazonía y algunas estribaciones la Cordillera de los Andes tienen plantaciones de cacao, llegando a sumar un total de 500.000 hectáreas cultivadas, de las cuales se benefician alrededor de 100.000 familias de pequeños y medianos productores (Torres, 2012) (Carranza, 2015).

Taxonomía y morfología

Tabla 1

Descripción taxonómica del cacao (Arvelo et al., 2017)

Nombre Científico:	<i>Theobroma cacao</i>
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malvales
Familia:	Malvaceae
Género:	<i>Theobroma</i>
Especie:	<i>Theobroma cacao</i> L.

Enríquez (2010) asegura que el cacao es un árbol que puede crecer hasta 5 u 8 m de altura, sin embargo, bajo mucha sombra y sin podas, puede alcanzar los 20 m. Su copa de 7 a 9 m diámetro es densa (figura 1a). Posee una raíz principal pivotante que penetra hasta 2 m y muchas raíces secundarias laterales ubicadas a 30 cm por debajo del suelo.

Las hojas son perennes, simples, y enteras; tienen un tamaño medio, pecíolo largo y son de color verde (Enríquez, 2010) (Sánchez M et al., 2015).

Las flores son pequeñas con un cáliz rosado de segmentos largos y puntiagudos; la corola puede tener diversos tonos desde blanquecina, amarilla hasta rosada. Nacen en pequeños racimos llamados cojines, en el tronco y ramas maduras característica que se denomina caulifloria (figura 1b y 1c) (Hardy, 1961) (Sánchez M et al., 2015).

El fruto puede variar en tamaño, color y forma, pero generalmente es una baya. Cuando es joven se lo llama chirel y cuando está más desarrollado y maduro se le denomina mazorca y alcanza unos 30 cm de largo y 10 cm de diámetro (figura 1d). La superficie puede ser lisa o con surcos, de consistencia coriácea y de color variable, dependiendo de la variedad. El interior se divide en cinco celdas donde una pulpa blanca, rosada o café, de sabor agridulce, rodea a las semillas. Estas semillas también llamadas almendras, son planas o redondas, de color blanco, marrón o morado y pueden haber de 20 a 40 en cada baya (M. Sánchez et al., 2015).

El árbol de cacao comienza a producir fruto a los tres o cuatro años de haberse plantado, y tiene una vida productiva de entre 25 y 30 años (España, 2019)

Exigencias edafoclimáticas y de suelo

El cacao crece en las zonas bajas tropicales, a temperaturas promedio de 30 a 32°C máximo y 21°C mínimo. La humedad también es importante, esta debe ser 100% durante el día y bajar hasta 70-80% en la noche. Se produce en suelos diversos, con un pH entre 4 a 7; deben ser profundos para permitir el desarrollo del sistema radicular y deben ser ricos en materia orgánica (M. Sánchez et al., 2015)(Arauz, 2015).

Figura 1

Morfología del cacao (Theobroma cacao L.)



Nota: a. Árbol de cacao, b. Flor de cacao, c. Cojines florales en el tallo, d. Frutos de cacao en estado de mazorca (Fotos tomadas por la autora).

Variedades

El cacao, a nivel mundial, estaba dividido en tres tipos: criollo, forastero y su mezcla que dio origen al conocido como trinitario. Sin embargo, en 2008 estudios científicos identificaron 10 tipos genéticos de cacao, dejando de lado la primera división (Corporación Fortaleza del Valle, 2014).

En el Ecuador se cultivan dos tipos de cacao, el nacional que se consideraba dentro de los forasteros amazónicos y, con la nueva división, formó parte de los 10 tipos identificados. Es reconocido mundialmente por su aroma floral y por su uso en la producción exclusiva de chocolate suave. A pesar de sus favorables características se reconoce que no existen grandes extensiones sembradas de esta variedad (Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones, 2017).

Por otro lado, el cultivar CCN-51 es el cacao clonal más productivo del mundo. Es de rápida comercialización y muy demandado por empresas procesadoras y exportadoras de cacao para la extracción de semielaborados, importantes para la producción a gran escala de chocolate. Es una variedad resistente a plagas y enfermedades y su ciclo de cosecha es cuatro veces más comparado con otras variedades de cacao (Lema, 2015) (Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones, 2017).

Enfermedades del cacao

Las enfermedades son uno de los factores más limitantes y de mayor impacto negativo en la producción de cacao. Pueden llegar a causar pérdidas considerables del 30% o más del potencial productivo mundial (M. Sánchez et al., 2015).

En el Ecuador, pueden ocasionar hasta 80% de pérdidas en la producción de una parcela, independientemente de la variedad de cacao sembrada según el III Censo Nacional Agropecuario. Estas pérdidas se deben principalmente a la escoba de bruja y la moniliasis causadas por el complejo de las *Moniliophthoras* (*M. Perniciosa* y *M. Roreri* respetivamente), el Mal de Machete (*Ceratocystis fimbriata*) y la Mazorca negra (*Phytophthora* sp.) (Morán, 2008).

Mazorca negra

Según Carranza (2015) la mazorca negra es causada por microorganismos del complejo *Phytophthora* y es considerada la más importante en un 80% de los países productores de cacao, debido a que el fitopatógeno puede atacar todos los tejidos de la planta de cacao y producir pérdidas a nivel mundial estimadas en 450,000 TM.

Descripción del agente causal

De acuerdo con algunas investigaciones, se han reportado al menos siete especies de *Phytophthora* como agentes causales de la enfermedad de acuerdo con la zona geográfica. Se describen a *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* var., *P. parasitica*, *P. megasperma* y *P. arecae*, siendo las dos primeras las especies más importantes en el mundo. Por su gran incidencia y su alta distribución a nivel mundial, *P. palmivora* es responsable de 20% a 30% de pérdidas anuales de la producción

mundial de grano y aproximadamente 10% de muerte de árboles (Instituto Colombiano Agropecuario, 2012)

Características morfológicas

Morfología de las Colonias In Vitro

Para la identificación taxonómica de oomycetes patógenos generalmente se utilizan los caracteres morfológicos como la forma de la colonia, que depende de la extensión de las ramificaciones de las hifas y de la frecuencia de sus ángulos. En el caso de *Phytophthora* se destacan ciertos tipos culturales típicos como el crecimiento en forma de crisantemo, en forma estrellada o en forma petaloide (Machado et al., 2008)

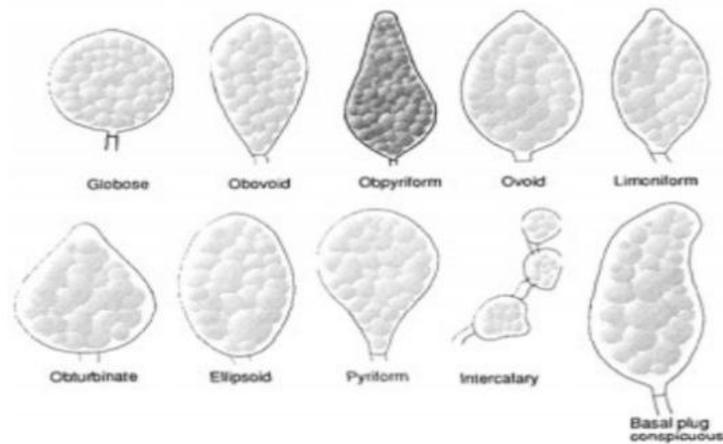
Morfología de estructuras microscópicas

Las especies de *Phytophthora* son clásicamente identificadas por sus características morfológicas microscópicas como: morfología del esporangio (forma, tamaño), papilación del esporangio y presencia o ausencia de Clamidosporas, entre otras (Erwin & Ribeiro, 1996).

Esporangios: los esporangios son los organismos de reproducción rápida. Tienen forma de saco y en su interior, el plasma se convierte en esporas asexuales endógenas denominadas zoosporas. En su mayoría son estructuras terminales, aunque a veces se presentan interinas o de lado. En cuanto a su aspecto, los esporangios puede ser elipsoides, ovoide, obpiriforme, ovoides-obpiriforme, limoniforme casi esféricos y esféricos de vez en cuando (figura 2); la forma y dimensiones de los esporangios son características importantes para la clasificación morfológica de las especies del género *Phytophthora* (Luz, 2008).

Figura 2

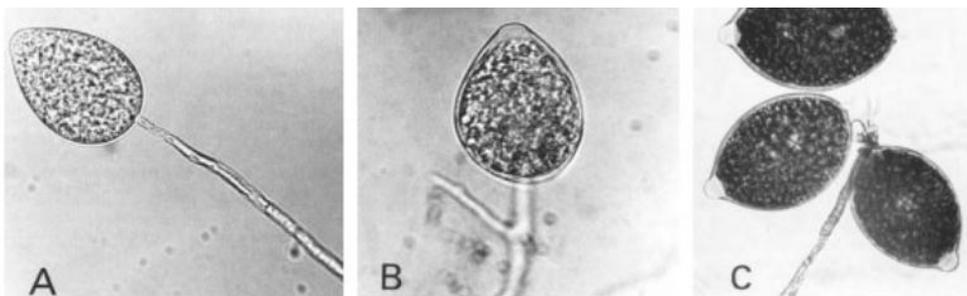
Diversas formas de esporangios producidos por diferentes especies de Phytophthora (Erwin & Ribeiro, 1996)



El engrosamiento apical en el esporangio se llama papila, que termina en un poro y permite la salida de zoosporas. Los esporangios pueden ser clasificados en base a esta estructura como papilados (engrosamiento visible), semipapilados o no papilados (engrosamiento discreto) (figura 3) (Erwin & Ribeiro, 1996) (Gregory, 1974)

Figura 3

Formas de papilas en los esporangios de Phytophthora sp.

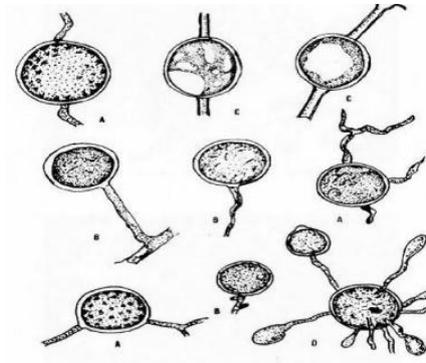


Nota: (A) No papilado, (B) Semipapilado, (C) Papilado (Erwin & Ribeiro, 1996)

Clamidospora: las clamidosporas son estructuras de resistencia de paredes gruesas. Pueden ser intercaladas (formadas entre hifas) o terminales (formadas en los extremos de hifas). Su morfología no difiere en gran medida entre las especies; sin embargo, la presencia o ausencia de estas puede ayudar a la identificación (Rivero, 2009).

Figura 4

Morfología de Clamidospora de Phytophthora sp. y formas de germinación (Echemendia, 2010)



Sintomatología

El daño más importante de la enfermedad ocurre cuando el fruto es atacado. Se evidencian lesiones de color marrón chocolate que van creciendo y cubren por completo las mazorcas o chireles y en el campo se visualiza la aparición de frutos negros. En plántulas de vivero, la infección de las hojas jóvenes se muestra como con una mancha color café tabaco y en el tallo ocasiona quemazón. En plantas más grandes, *P. palmivora* y *P. megakarya* pueden infectar el tallo, los cojines florales y los chupones o brotes tiernos, produciendo la formación de chancros o cáncer, que suelen quedar escondidos por la corteza. También afectan el tronco y el cuello de las plantas. El daño ocasionado por los chancros en los tallos y raíces, además de reducir el vigor de los árboles, produce la muerte del 10% de las plantas anualmente (M. Sánchez et al., 2015).

Ciclo de la enfermedad

España (2009) menciona que la aparición de la pudrición parda en campo está influenciada por las condiciones ambientales, como son las precipitaciones, la alta humedad relativa y las temperaturas frescas, que en conjunto crean un ambiente favorable para su el desarrollo.

Phytophthora sp. se caracteriza por tener dos tipos de reproducción: asexual y sexual, que se presentan en función del ambiente. En la pudrición parda, este patógeno atraviesa por diferentes fases: formación de micelio, esporangios, zoosporas y

clamidosporas. El inóculo primario, está en el suelo y también en los tejidos y estructuras infectadas de la planta. En ellos se forman esporangios que germinan bajo condiciones húmedas para establecer la infección (M. Sánchez et al., 2015).

El suelo es una fuente de esporas que infecta mayoritariamente a los frutos de la parte baja de los árboles. Una sola mazorca afectada puede producir cuatro millones de esporangios y pueden ser diseminados por la lluvia, el traslado de material de siembra, insectos, roedores y herramientas de poda y cosecha. Con las estructuras de resistencia llamadas clamidosporas, *Phytophthora* puede permanecer en el suelo y en restos de cosecha por mucho tiempo: desde meses hasta varios años (M. Sánchez et al., 2015).

Control de la mazorca negra

El manejo de la pudrición parda del cacao debe enfocarse desde varios ángulos: control biológico, métodos fitosanitarios y el uso de productos químicos (Hernández-Rodríguez et al., 2014).

Los métodos culturales tienen como objetivo la manipulación del ambiente, haciéndolo poco favorable para el establecimiento del patógeno (Adejumo, 2005). Sin embargo, muchas veces resulta ser una tarea difícil y que involucra un arduo trabajo para los agricultores (Koranteng & Awuah, 2011).

Actualmente, la aplicación de fungicidas sintéticos es el método de control más empleado contra *Phytophthora*. Se utilizan compuestos de cobre, metalaxil y fosfonatos (Ndoumbe-Nkeng et al., 2004) para reducir la incidencia de esta enfermedad.

El control biológico, por su parte, involucra el uso de microorganismos y sus subproductos para contrarrestar el crecimiento y establecimiento de fitopatógenos. Se ha demostrado que los hongos antagonistas del género *Trichoderma* pueden actuar frente a una amplia variedad de fitopatógenos, empleando diferentes mecanismos; algunas especies de *Trichoderma* inhiben el crecimiento de *Phytophthora* sp., tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Hanada et al., 2009; Mpika et al., 2009; Tchameni et al., 2011). El uso de bacterias antagonistas en el manejo de patógenos de diversos cultivos también está catalogado dentro del control biológico. Algunas cepas de los géneros *Bacillus* (R. Melnick

et al., 2008; R. L. Melnick et al., 2011) y *Pseudomonas* (Haas & Défago, 2005) evidenciaron ser antagonistas de *Phytophthora* sp.

Tanto hongos como bacterias benéficas con propiedades antagonistas pueden ser aislados de la rizósfera del cultivo o de la superficie de las hojas o frutos (Hernández-Rodríguez et al., 2014).

Mecanismos de acción del control biológico

Algunos de los mecanismos detrás del antagonismo son: antibiosis, competencia por espacio y nutrientes (Rubio & Ferreres, 2005).

Antibiosis

La antibiosis se define como la inhibición del metabolismo o el crecimiento de un organismo por la acción de una sustancia a bajas concentraciones, producida por otro organismo (Jacas et al., 2005).

Algunas especies del género *Bacillus* tienen la capacidad de producir péptidos, lipopéptidos y fosfolípidos que se utilizan como agentes antibióticos contra bacterias y hongos patógenas (Layton et al., 2011).

Competencia

La competencia sucede cuando al menos dos microorganismos necesitan el mismo requerimiento de nutrientes o espacio y el uso que uno de ellos ejerce de cualquiera de estos dos, reduce la cantidad disponible para el otro (Rubio & Ferreres, 2005).

Los hongos tienen una fase saprofítica que les permite competir con otros microorganismos por nutrientes o espacio cuando sus requerimientos se ven limitados. También tienen la capacidad de parasitar y producir antibióticos para acceder a nutrientes y de esta manera retrasar el desarrollo de los patógenos, con lo que, se puede reducir la cantidad de inóculo y evitar que la plaga alcance niveles poblacionales sustanciales para establecer una infección, convirtiéndolos en candidatos como agentes de biocontrol (Bélanger & Avis, 2002).

Hongos del género *Trichoderma* se presentan como biocontroladores de diversos fitopatógenos gracias a su crecimiento natural en diversos suelos y su excelente capacidad de competir por espacio y nutrientes (Infante et al., 2009).

Hipótesis

En el suelo del cultivo de cacao existen microorganismos nativos con potencial antagónico contra el hongo fitopatógeno *Phytophthora* sp.

Capítulo III: Materiales y métodos

Participantes del Proyecto

El proyecto de tesis fue desarrollado por Michelle Salomé Vélez Cárdenas, con la colaboración de Alma Koch Kaiser, Mgs., directora del Proyecto; y se contó con la participación del laboratorio YURA BioSearch y la hacienda “La Dolorosa”.

Fase de campo

Zona de estudio

El muestreo de suelo y material vegetal se realizó en la hacienda “La Dolorosa” ubicada en la provincia de Esmeraldas, Cantón Quinindé, parroquia Malimpia, Recinto 10 de Agosto.

Coordenadas:

N: Rumbo S: 87° - 00 ° E

S: Rumbo S: 88° - 00 ° W “Cuello”

E: Rumbo S: 84° - 30 ° W; Rumbo S: 2° - 30 ° W “Granda”

O: Rumbo N: 2° - 00 ° E; Rumbo N: 12° - 00 ° E; Rumbo N: 1° - 00 ° E “Epacem”; Rumbo S: 82° - 30 ° E “Felipe Moran”.

Posee una extensión aproximada de 69,84 hectáreas, de las cuales 7,59 ha están ocupadas por el cultivo de cacao.

Muestras de suelo

Se realizó un muestreo al azar estratificado de acuerdo a una división por lotes como se detalla en la tabla 2.

De cada lote, se obtuvo una muestra compuesta de suelo rizosférico, tomado a 40 cm del tallo de la planta y a una profundidad 20 cm, siguiendo un patrón de camino en zigzag (Schweiser, 2011) (Freile-Almeida et al., 2018) Las sub-muestras que conformaron la muestra compuesta se homogenizaron en un balde plástico y se empacaron alrededor de 200 g de muestra representativa en fundas plásticas estériles. Se almacenaron a una temperatura de 4°C para su traslado al laboratorio.

Tabla 2

Estratificación de los lotes de la hacienda “La Dolorosa” para el muestreo de suelo y material vegetal

Nombre de Lote	Código	Fecha de plantación	Edad	ha	Coordenadas	
					X_este	Y_norte
Guayaba	2102A	2015 Julio	5 años	0,33	709874	39492
Potreros 1	2102B	2015 Mayo	5 años	0,56	709535	38617
Establos	2102C	2013 Enero	7 años	1,46	709487	38478
Potreros 2	2102D	2016 Julio	4 años	1,32	709561	38722
Limón	2102E	2016 Enero	4 años	2,59	709763	39573
Guanábana	2102F	2015 Julio	5 años	0,22	709838	39372

Muestras de material vegetal

Se realizó un recorrido en cada lote para coleccionar muestras del fitopatógeno de plantas infectadas. Se recolectaron dos mazorcas enfermas por sección, con un mínimo del 10% de daño visual, que se guardaron en fundas de papel periódico estériles.

Fase de laboratorio

El procesamiento de las muestras de suelo y del material vegetal se realizó en el laboratorio YURA BioSearch ubicado en Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Charles Darwin y Quintillano Sánchez, con coordenadas Latitud: 0°16'58.7"S; Longitud: 78°27'56.6"W

*Aislamiento e identificación de *Phytophthora* sp.*

Con una aguja previamente esterilizada, se tomó micelio del hongo de las mazorcas enfermas muestreadas y se realizó una siembra directa en cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA) con 0,5 g/L de amoxicilina para prevenir el crecimiento bacteriano. Las cajas se incubaron a 25 °C durante siete días. Luego, del borde del crecimiento de la colonia se realizaron repiques en PDA hasta lograr una colonia pura (Villamil et al., 2010).

Para la identificación del aislamiento, se observó la morfología colonial del aislado en medio PDA, además de realizar siembras en medio agar- jugo V8 modificado para la observación de esporangios y clamidosporas. Al cabo de 10 días de incubación en medio V8, se tomó con cinta adhesiva una muestra del oomycete, se colocó en un portaobjetos

que contenía una gota de azul de lactofenol y se observó en un microscopio de campo claro (Carrera, 2016).

El aislamiento puro se conservó en refrigeración para las pruebas de antagonismo con los microorganismos aislados de suelo.

Medición pH del suelo

Las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente durante 24 h. Fueron colocadas sobre papel periódico estéril en una habitación libre de contaminantes y luego fueron tamizadas en mallas para obtener partículas más finas.

Se realizó una dilución (1:2) de suelo y agua siguiendo el protocolo de Solena, 2019 (confidencial). Se midieron los valores con un pH-metro hasta obtener un número constante. Se realizaron tres repeticiones.

Procesamiento de muestras de suelo

Se pesó una cantidad de suelo y se realizó una dilución (1:10) con una solución salina estéril, posteriormente se realizaron diluciones seriadas de acuerdo al protocolo de Solena, 2019 (confidencial).

Aislamiento, selección e identificación de bacterias de interés

Dos diluciones se inocularon en cajas Petri con agar nutritivo (AN). Se sembró por extensión y se incubaron por 48 h a una temperatura de 33 °C. Luego se seleccionaron colonias diferentes de acuerdo a características morfológicas de interés tomando en cuenta: borde, forma, elevación, superficie y color; estos parámetros se evaluaron a simple vista. Las colonias de bacterias seleccionadas se resembraron por estrías cruzadas en cajas Petri con medio AN de acuerdo al protocolo de Solena, 2019 (confidencial).

Para la identificación se realizó una descripción microscópica con tinción de Gram, además se utilizaron las pruebas bioquímicas de: Catalasa, KOH y Oxidasa (Solena, 2019).

Aislamiento, selección e identificación de hongos de interés

Se realizó por dos métodos de acuerdo al protocolo de Solena (2019):

1. Dos diluciones se inocularon en cajas Petri con agar - jugo V8. Se sembró por extensión y se incubaron durante cinco días a una temperatura de 29°C.

2. Se tomaron partículas de las muestras de suelo y se sembraron directamente sobre agar Medio selectivo E de Trichoderma (TME). Se incubaron durante cinco días a una temperatura de 29°C.

Se seleccionaron colonias diferentes de acuerdo a características morfológicas de interés como: color anverso, color reverso, aspecto, crecimiento y presencia de exudación.

Las colonias seleccionadas se repicaron en medio PDA y luego en medio de cultivo Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA). Se incubaron por 72 h a 29°C. Se realizó una visualización microscópica de las colonias en medio SNA con azul de lactofenol, y se los clasificó según la morfología microscópica de la hifas, las esporas y otras estructuras bajo las descripciones de Barnett & Hunter (1998).

Pruebas de antagonismo contra Phytophthora sp. en plato dual

Se sembraron discos 5 mm de *Phytophthora* sp. de siete días de edad, a una distancia de 2 cm del extremo de la caja de Petri con medio de cultivo PDA.

Para la evaluación de los aislados fúngicos, se colocó a 2 cm del extremo opuesto de la caja Petri un disco de 5 mm de diámetro con micelio del antagonista de siete días de edad. Para la evaluación de los aislados bacterianos, se extendió un asa llena de cultivo del microorganismo de dos días de edad a 2 cm del lado opuesto de la caja Petri. Las cajas se sellaron y se incubaron a $25\pm 2^\circ\text{C}$ durante siete días. Una placa de Petri que contenía solo el patógeno sirvió como control y se realizaron cinco repeticiones por tratamiento (Anjum et al., 2019)

Las variables de respuesta medidas con un calibrador fueron:

- Tratamientos bacterianos: zona de inhibición (ZI) y crecimiento radial del patógeno (RCP)
- Tratamientos fúngicos: crecimiento radial del patógeno (RCP) y crecimiento radial del antagonista (RCA).

Además, los hongos antagonistas se categorizaron de acuerdo a la escala de medición de Baker y Cook (citada por Cholango, 2009) (Tabla 3), con el fin de evaluar la competencia por sustrato.

Tabla 3*Escala de clases de Baker y Cook*

Clase 1	El antagonista crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
Clase 2	El antagonista crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
Clase 3	El antagonista y el patógeno cubren aproximadamente la mitad la superficie del medio de cultivo.
Clase 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento del antagonista.
Clase 5	El patógeno crece sobre la colonia del antagonista ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Para todos los tratamientos se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), mediante la fórmula propuesta por Vincent (1947):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde C = crecimiento radial del patógeno en la placa control y T = crecimiento radial del patógeno en placa de prueba.

Análisis estadístico

Se aplicará un diseño experimental completamente al azar (DCA), con cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue una caja Petri con *Phytophthora* sp en presencia o ausencia de un microorganismo antagonista. Las variables de respuesta obtenidas se analizaron utilizando el paquete estadístico Infostat v2017.1.2, donde se verificaron los supuestos para realizar el análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias se consideraron significativas con $p < 0.05$. Posteriormente se realizó la prueba de comparación múltiple de Duncan.

Capítulo IV: Resultados

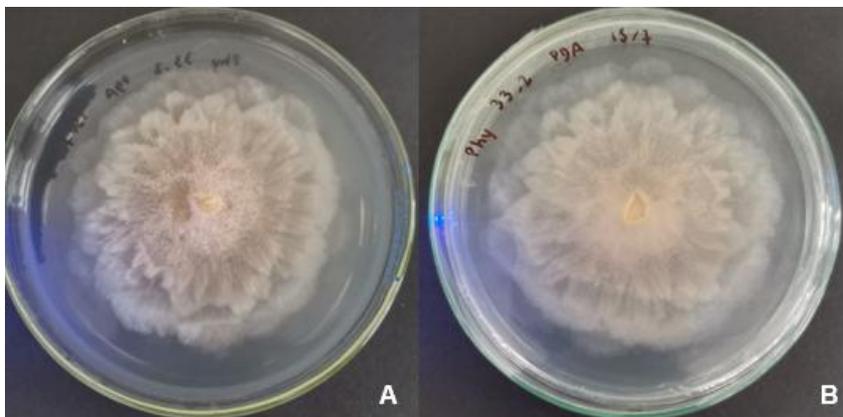
Aislamiento de Phythophtora sp.

Se obtuvo un aislado correspondiente *Phythophtora* sp procedente de mazorcas de cacao de la variedad CCN51 que presentaban síntomas de mazorca negra.

Macroscópicamente en medio PDA, el aislado se caracterizó por su crecimiento en forma estrellada, con escaso micelio a excepción del centro, de color blanco con ligeros matices amarillos (figura 5).

Figura 5

Características macroscópicas de Phythophtora sp. en PDA

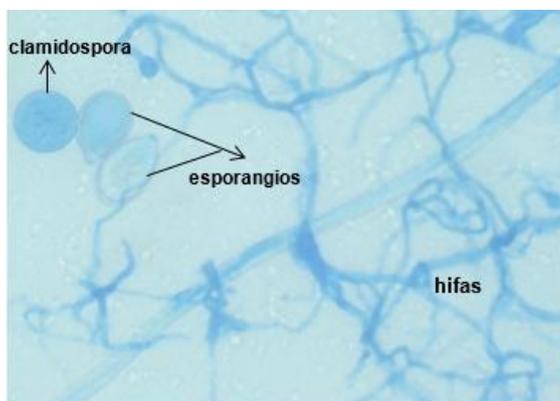


Nota: A) vista del anverso, B) vista del reverso (Fotos tomadas por la autora).

En la visualización microscópica se observaron hifas hialinas, esporangios ovoides y clamidosporas redondeadas (figura 6).

Figura 6

Morfología microscópica de Phythophtora sp.

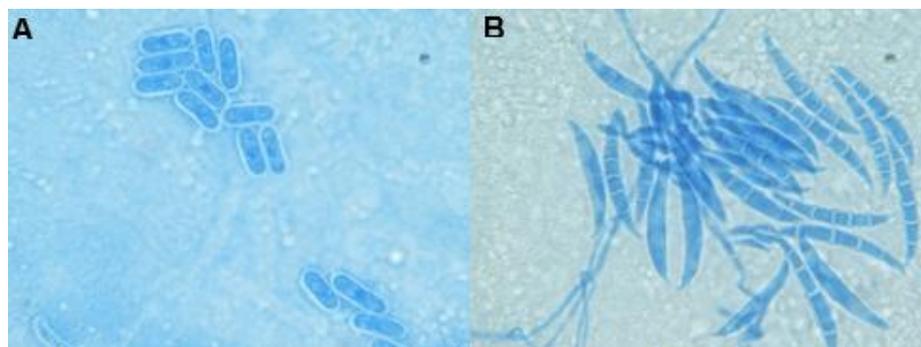


Nota: Visualización en 100X (foto tomada por la autora)

Se evidencio además la presencia de los géneros de hongos *Colletotrichum* sp. y *Fusarium* sp.

Figura 7

Géneros de hongos aislados de mazorcas de cacao



Nota: Visualización en 100X. a) *Colletotrichum* sp., b) *Fusarium* sp. (fotos tomada por la autora)

pH de suelo

Se obtuvieron valores promedio de pH entre 4.5 y 5.6 para los diferentes lotes de acuerdo a la tabla 4:

Tabla 4

pH promedio de las muestras de suelo de la Hacienda “La Dolorosa”

Lote	Código	pH
Guayaba	2102A	5,15
Potreros 1	2102B	5,09
Establos	2102C	5,22
Potreros 2	2102D	4,90
Limón	2102E	5,56
Guanábana	2102F	5,09

Aislamiento de microorganismos nativos de suelo

De las seis muestras compuestas de suelo recolectadas en la Hacienda “La Dolorosa”, se lograron aislar diez cepas bacterianas en agar nutriente y doce cepas fúngicas de las cuales: siete se obtuvieron en agar – jugo V8 y cinco en agar TME. De estas únicamente se seleccionaron aquellas con características de interés. Se describe la

morfología colonial de las cepas elegidas en la tabla 5 y 6 para bacterias y hongos respectivamente.

Tabla 5

Características morfológicas coloniales de las bacterias aisladas de los suelos de la Hacienda “La Dolorosa”

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Color
C1	Circular	Ondulado	Plana	Húmeda	Blanco opaco
C6	Irregular	Ondulado	Plana	Seca	Beige opaco
C7	Irregular	Lobulado	Plana	Lisa	Blanco
C8	Circular	Ondulado	Plana	Lisa	Beige opaco
C9	Irregular	Lobulado	Plana	Lisa	Blanco opaco
C10	Circular	Ondulado	Plana	Seca	Blanco opaco

Tabla 6

Características morfológicas coloniales de los hongos aislados de los suelos de la Hacienda “La Dolorosa”

Cepa	Color anverso	Color reverso	Aspecto	Crecimiento	Exudación
H5	Verde	Verde	Pulverulento	Irregular	No
H8	Verde	Verde	Velloso	Irregular	No
H11	Blanco	Blanco	Algodonoso	Irregular	No
H12	Verde	Blanco	Algodonoso	Irregular	No

Identificación de microorganismos nativos

La identificación bacteriana utilizando tres pruebas bioquímicas, además de la visualización microscópica por tinción Gram y comparación con la morfología colonial de los aislados puros, permitió determinar la presencia de cepas pertenecientes al género *Bacillus* sp., tal como se describen en la tabla 7 y las figuras 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

La identificación de hongos se hizo mediante visualización macroscópica y microscópica, reconociéndose cuatro aislados del género *Trichoderma* sp. como se observan en las figuras 14, 15, 16 y 17.

Tabla 7

Pruebas bioquímicas, morfología microscópica e identificación final de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras de suelo

Cepa	Pruebas Bioquímicas			Morfología microscópica	Identificación
	K	C	O		
C1	-	+	+	Estreptobacilo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
C6	-	+	+	Bacilo	<i>B. subtilis</i>
C7	-	+	+	Bacilo	<i>Bacillus</i> sp.
C8	-	+	+	Estreptobacilo	<i>B. thuringiensis</i>
C9	-	+	+	Bacilo	<i>B. licheniformis</i>
C10	-	+	+	Bacilo	<i>Bacillus</i> sp.

Figura 8

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa C1, *Bacillus amyloliquefaciens* (fotos tomadas por la autora)

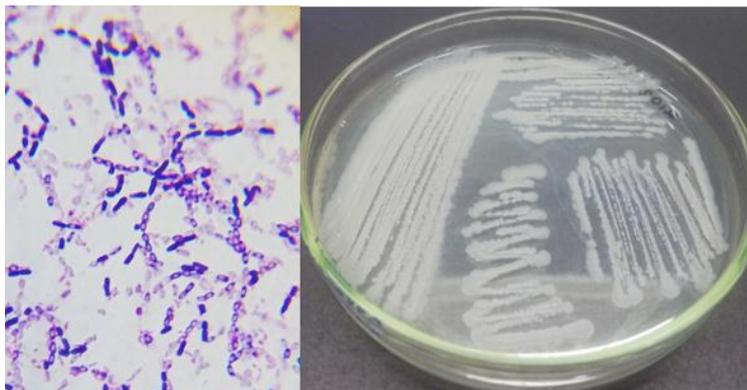


Figura 9

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa C6, *B. subtilis* (fotos tomadas por la autora)

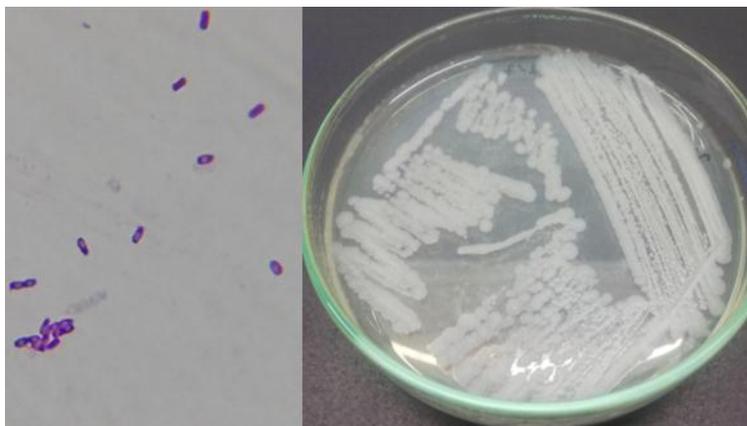


Figura 10

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa C7, *Bacillus* sp. (fotos tomadas por la autora)

**Figura 11**

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa C8, *B. thuringiensis* (fotos tomadas por la autora)

**Figura 12**

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa C1, *B. licheniformis* (fotos tomadas por la autora)

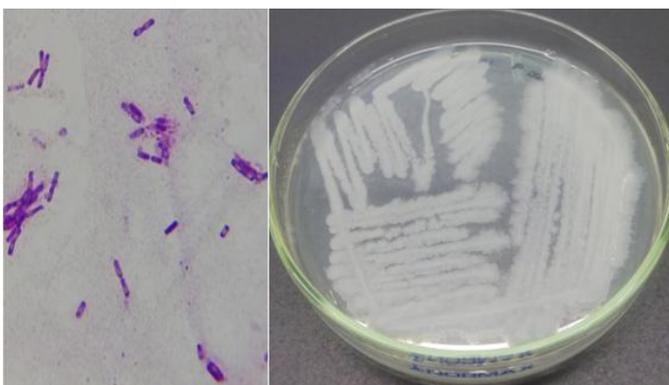
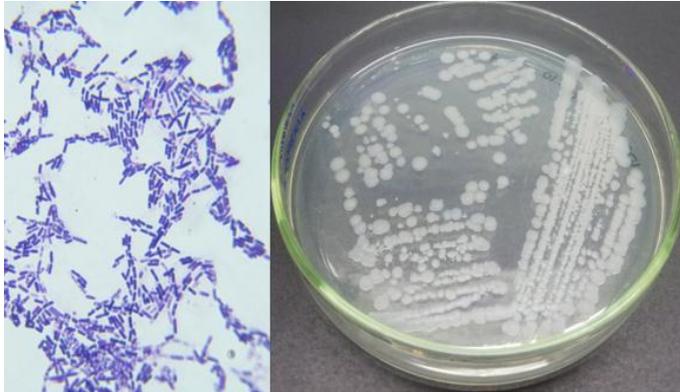
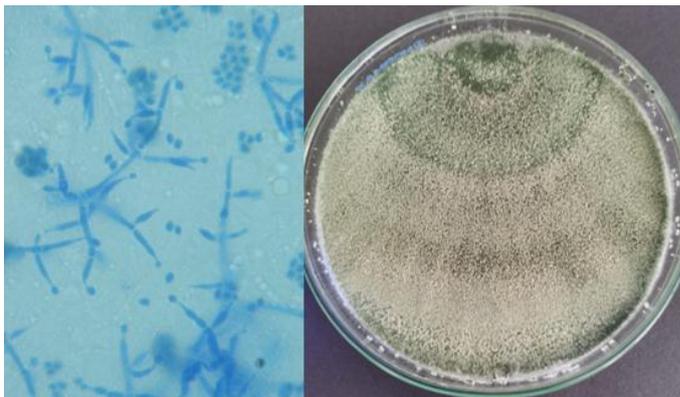


Figura 13

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa C10, Bacillus sp. (fotos tomadas por la autora)

**Figura 14**

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa H5, Trichoderma sp. 5 (fotos tomadas por la autora)

**Figura 15**

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa H8, Trichoderma sp. 8 (fotos tomadas por la autora)

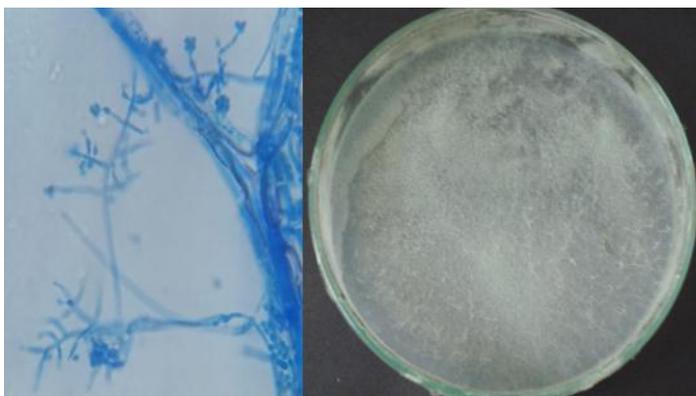
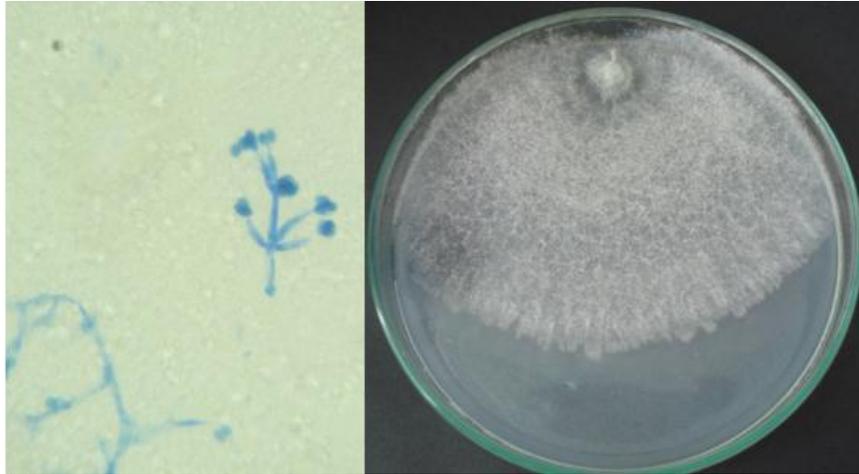
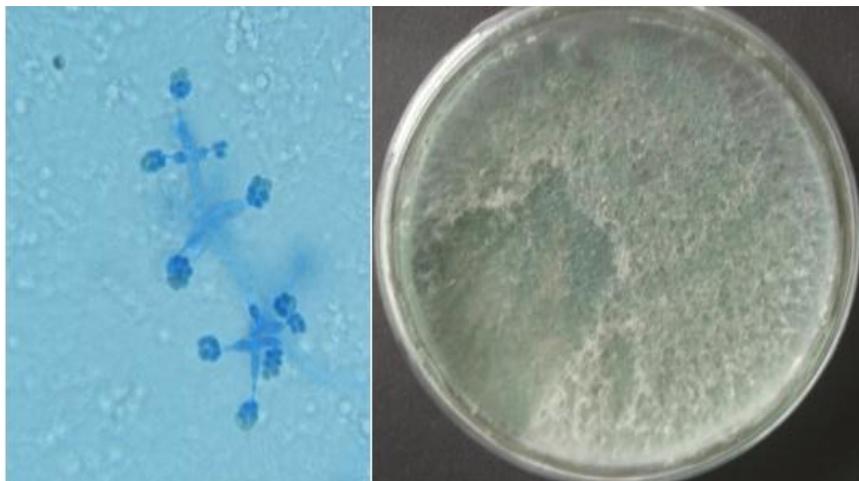


Figura 16

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa H11, *Trichoderma* sp. 11 (fotos tomadas por la autora)

**Figura 17**

Morfología microscópica (100X) y macroscópica de la cepa H12, *Trichoderma* sp. 12 (fotos tomadas por la autora)

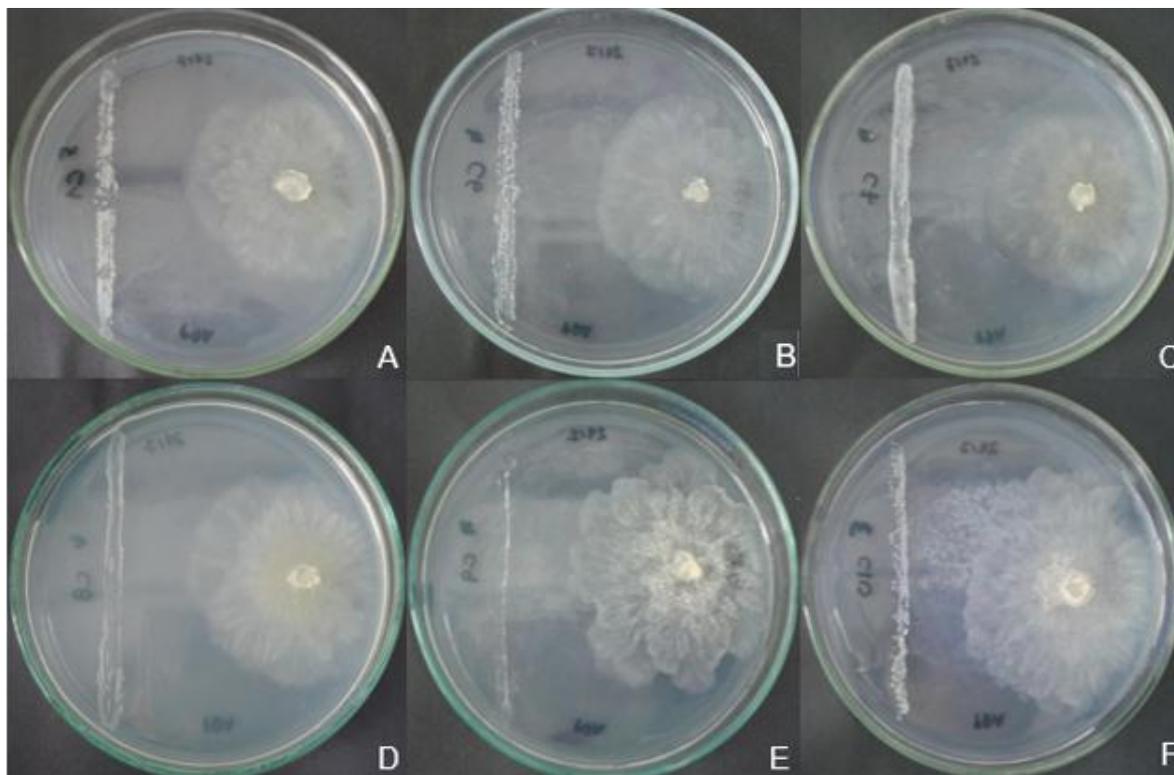


Pruebas de antagonismo in vitro contra Phytophthora sp.

Los ensayos de antagonismo se realizaron mediante la técnica de cultivo dual enfrentando tanto a los aislados bacterianos como a los hongos obtenidos del suelo contra *Phytophthora* sp. La figura 18 muestra la interacción entre las diferentes cepas de *Bacillus* sp. y el patógeno observándose una zona de inhibición.

Figura 18

Crecimiento en cultivo duales entre el antagonista *Bacillus* sp. y el patógeno *Phytophthora* sp.

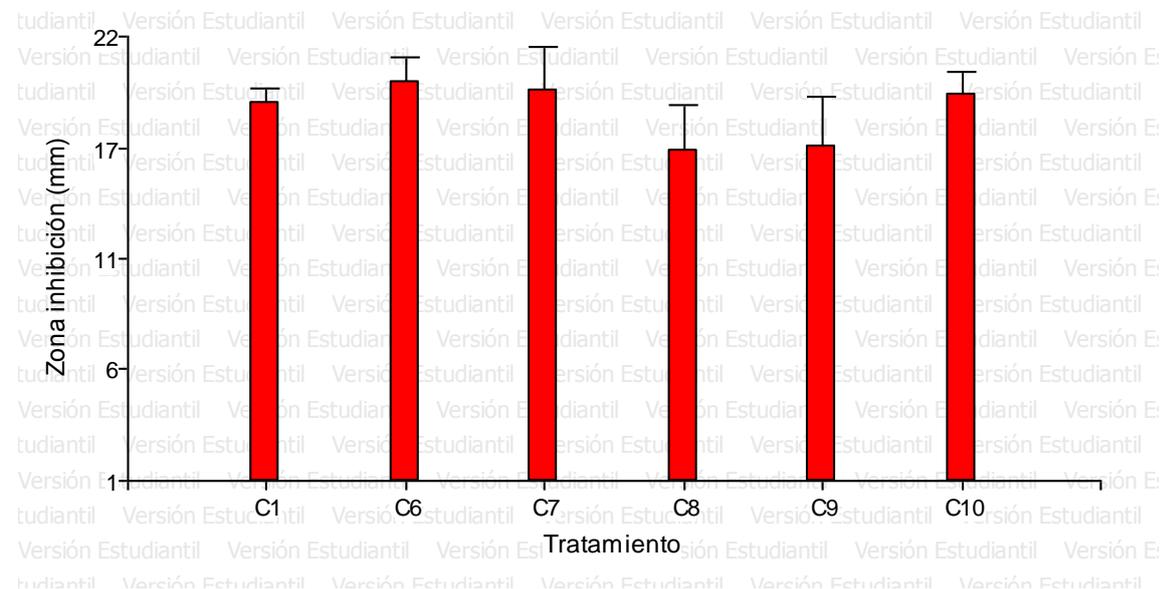


Nota: a. *B. amyloliquefaciens* - *Phytophthora* sp., b. *B. subtilis* - *Phytophthora* sp., c. *Bacillus* sp. (C7) - *Phytophthora* sp., d. *B. thuringiensis* - *Phytophthora* sp., e. *B. licheniformis* - *Phytophthora* sp., f. *Bacillus* sp. (C10) - *Phytophthora* sp.

Los datos de la zona de inhibición en los tratamientos bacterianos fueron sometidos a una prueba de Normalidad (Shapiro – Wilks) y Homocedasticidad (Anexo 2 y 3), demostrando una distribución normal. Al realizar la prueba de análisis de varianza (ANOVA) se comprobó la inexistencia de diferencias significativas entre tratamientos (anexo 4). Sin embargo, se observó que la mayor zona de inhibición fue producida por la Cepa 6 correspondiente a *Bacillus subtilis* (19.8mm), seguida de las cepas 7 y 10 con una zona de 19.4 mm y 19.2 mm respectivamente. La menor zona de inhibición fue producida por la cepa 8 de *Bacillus thuringiensis* (16.6 mm) (figura 19).

Figura 19

Zonas de inhibición producidas por de cepas de Bacillus sp. en cultivo dual contra Phythophtora sp.

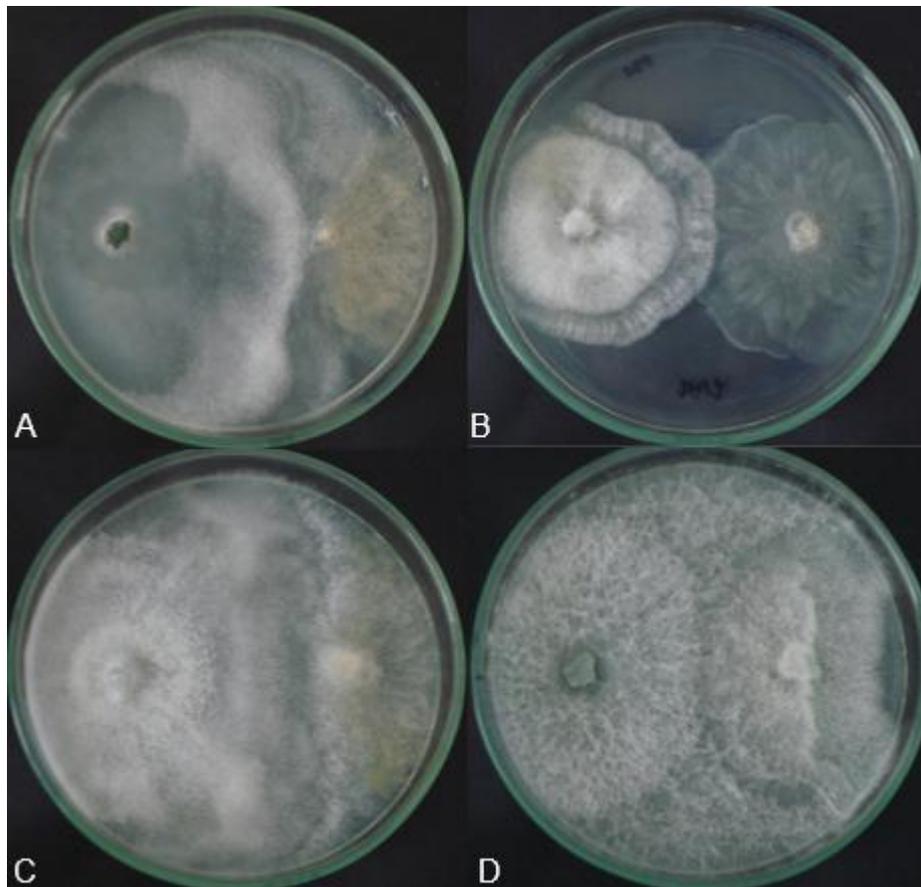


Al séptimo día se evidenció la capacidad antagonica de los aislados de *Trichoderma* sp., frente a *Phytophthora* sp. de acuerdo a las clases de antagonismo descritas en la escala de Baker y Cook (citada por Cholango, 2009). La figura 20 muestra la interacción entre los diferentes aislados de *Trichoderma* sp. y el patógeno, obteniéndose que *Trichoderma* sp. 12 se colocó en la clase 1, *Trichoderma* sp. 5 y *Trichoderma* sp. 11 se ubicaron en la clase 2 y finalmente *Trichoderma* sp. 8 se ubicó en la clase 3.

En los tratamientos H5, H11 y H12 todos los antagonistas tuvieron un crecimiento radial mayor a *Phytophthora* sp. y únicamente el tratamiento H8 presentó un crecimiento similar. De estos, *Trichoderma* sp. 12 (H12) mostró el mayor crecimiento, con un radio promedio de 49 mm, seguido de *Trichoderma* sp. 5 (H5) con 42.8 mm y *Trichoderma* sp. 11 con 35.2 mm. El crecimiento radial de *Phytophthora* sp. en confrontación con los antagonistas fue menor al de su control en todos los casos (figura 21).

Figura 20

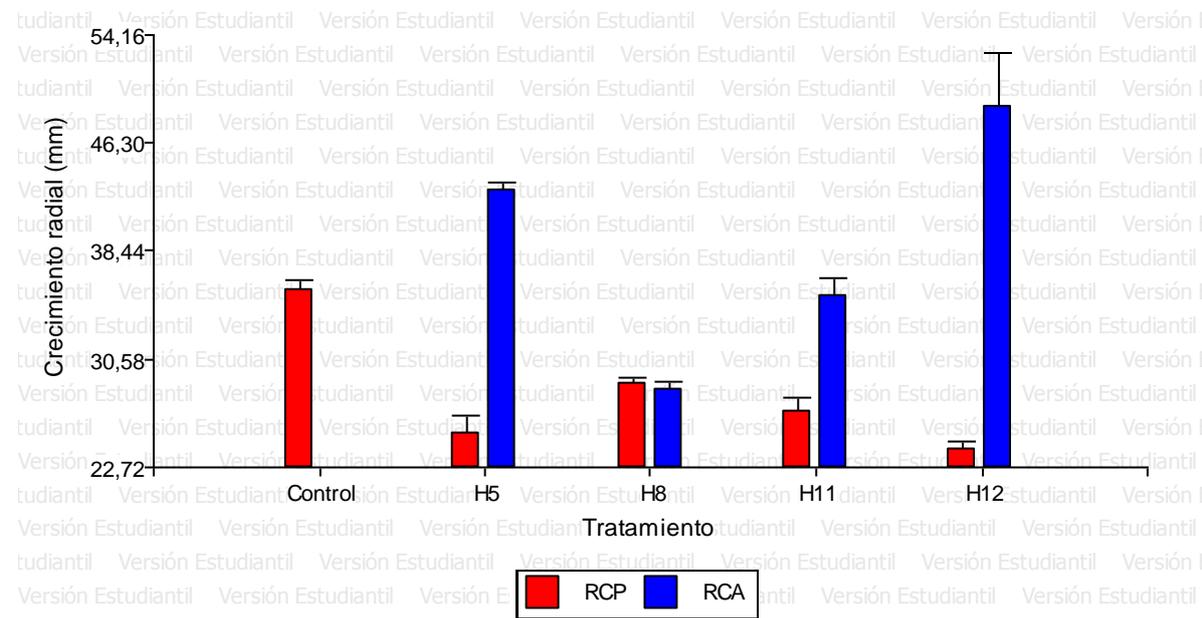
Crecimiento en cultivo duales entre el antagonista *Trichoderma* sp. y el patógeno *Phytophthora* sp.



Nota: a. *Trichoderma* sp. 5 - *Phytophthora* sp., b. *Trichoderma* sp. 8 - *Phytophthora* sp., c. *Trichoderma* sp. 11 - *Phytophthora* sp., d. *Trichoderma* sp. 12 - *Phytophthora* sp.

Figura 21

Crecimiento radial de Phytophthora sp. frente a Trichoderma sp.



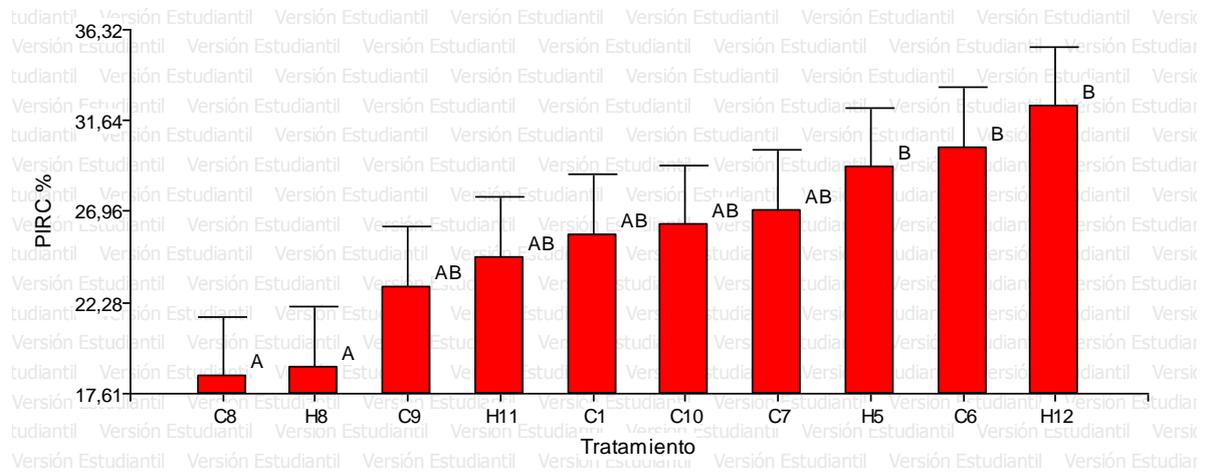
Nota: Rojo: crecimiento radial del patógeno (RCP), Azul: crecimiento radial del antagonista (RCA)

Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PIRC)

Los datos del porcentaje de inhibición en todos los tratamientos fueron sometidos a una prueba de Normalidad (Shapiro – Wilks) y Homocedasticidad (Anexo 7 y 8), evidenciándose una distribución normal. El análisis de varianzas demostró que si existían diferencias significativas (Anexo 9) y la comparación múltiple de Duncan mostró a los tratamientos con los mayores porcentajes de inhibición siendo *Trichoderma sp. 12* (H12), *Bacillus subtilis* (C6) y *Trichoderma sp. 5* (H5), con porcentajes de 32.36%, 30.23% y 29.20% respectivamente. Los que obtuvieron el menor PIRC fueron la cepa 8 correspondiente a *Bacillus thuringensis* (18.46%) y *Trichoderma sp. 8* (18.94%).

Figura 22

Porcentajes de inhibición de crecimiento radial de Phytophthora sp. en cultivos duales con los antagonistas Bacillus sp. y Trichoderma sp.



Nota: Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas para Duncan ($P > 0,05$).

Capítulo V: Discusión

El crecimiento del oomycete *Phytophthora* sp. en medio PDA mostró diversos aspectos de la colonia: crecimiento del micelio aéreo abundante y únicamente en el centro, borde regular y patrón de crecimiento estrellado (figura 5), según Brasier & Griffin (1979), estas características se aproximan a las encontradas en *Phytophthora palmivora*.

Los esporangios de *P. palmivora* presentan diferentes formas predominando las ovoides, además son papilados. Se encuentra también la presencia de clamidosporas redondeadas con una pared definida, inicialmente hialinas, pero luego se tornan a un color amarillo (Carranza, 2015 citando a Stamps 1985). Todas estas características pueden ser evidenciadas en la figura 6 donde se observan dos esporangios ovoides papilados y una clamidospora redondeada bien definida.

Durante el aislamiento de *P. palmivora*, adicionalmente se evidenció la presencia de otros géneros de hongos anamorfos: *Colletotrichum* sp. y *Fusarium* sp. correspondientes a la microflora de las mazorcas de cacao como lo han reportado Suárez & Cabrales (2008) Villamil et al., (2010) Mosquera (2014) y Campos (2018)

Según M. Sánchez et al. (2015) y Aráuz (2015), el adecuado rango de pH para el desarrollo del cultivo de cacao oscila entre 4 a 7. Los valores promedios obtenidos en los seis lotes de la hacienda “La Dolorosa” se encuentran dentro de este intervalo evidenciándose el menor pH en el lote Potreros 2 con un valor de 4.9 y el mayor pH en lote Limón con un valor de 5.56.

El suelo es un entorno complejo, lleno de microorganismos y caracterizado por una vasta diversidad de comunidades microbianas entre las que se encuentran diferentes especies de bacterias y hongos (Daniel, 2005). Debido a que la rizósfera es la sección del suelo más rica en microorganismos por la relación mutua positiva que existe con las plantas (Esikova et al., 2021), el muestreo realizado en todos los lotes de la hacienda “La Dolorosa” recopiló precisamente muestras de esta zona en el cultivo de cacao.

El género *Bacillus* es uno de los principales entre las rizobacterias (Slepecky & Hemphill, 2006) y en el presente estudio el criterio de selección bacteriana fue la morfología

colonial que caracteriza a los microorganismos dentro del grupo. *Bacillus* se presenta como colonias grandes o muy grandes, de color blanco, blanco grisáceo, beige o crema, apariencia seca o húmeda con elevación generalmente plana y bordes ondulados, filamentosos hasta rizados (University of California, 2018). Se seleccionaron seis cepas bacterianas que cumplieran con las características del género *Bacillus*.

En la identificación mediante pruebas bioquímicas, todas las cepas obtenidas resultaron ser catalasa y oxidasa positivas; Standards Unit (2018) menciona que la mayoría de las especies dentro del género *Bacillus* tienen mismos resultados. Por otro lado, la prueba de hidróxido de potasio (KOH) fue negativa para todos los aislados; al no formarse una consistencia viscosa cuando el reactivo y una porción de la colonia se mezclaron, se evidenció que los microorganismos son Gram positivos (Swedish University of Agricultural Sciences, 2017)

Este resultado se complementó con la tinción de Gram donde se observó que todas las cepas aisladas eran bacterias Gram positivas, con morfología tipo bacilo y formadoras de endosporas, características acordes al género *Bacillus* (Chalivendra & Ham, 2019). Según Slepecky & Hemphill (2006), las caracterizaciones fenotípicas clásicas basadas principalmente tanto en la morfología como en el tamaño y la posición de la endospora dentro de la célula vegetativa, pueden ayudar a la identificación de especies de *Bacillus*. En el caso de las cepas 7 y 10, únicamente se llegó hasta el género debido a la diversidad de los dos parámetros, como se observa en las figuras 10 y 13.

Se evidenció que las cepas 1, 6 y 9 morfológicamente son bacilos Gram positivos pequeños que presentan endosporas en el centro de las células; sin embargo, la disposición de la cepa 1 en cadenas cortas permitió identificarla como *Bacillus amyloliquefaciens*, a diferencia de las cepas 6 y 9 que se forman como células individuales o en grupos pequeños (Afrin & Bhuiyan, 2019). Esta es una característica de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* y su diferenciación se realizó gracias a la forma de la espora. En el primer caso se observó una endospora ligeramente esférica y en el segundo caso una endospora elipsoidal larga (Standards Unit, 2018; Whitman, 2010), además la morfométrica de la cepa

9 así como su forma irregular y su margen rizado o filamentoso, permitió catalogarla como *Bacillus licheniformis* (J. Sánchez & Henry, 2012). Slepecky & Hemphill (2006) señalan que estas tres especies se encuentran comúnmente en el suelo y están estrechamente relacionadas por encontrarse dentro del mismo grupo en el que tradicionalmente el género *Bacillus* ha sido dividido.

Por otro lado, se determinó que la cepa 8 podría ser *Bacillus thuringiensis* debido a su morfología distintiva de bacilos Gram positivos grandes y robustos, rectos y con extremos redondeados que se presentan en cadenas largas (Ibrahim et al., 2010).

En el caso de los hongos, el género *Trichoderma* está constituido por microorganismos saprofitos que se encuentran en la madera muerta, la corteza, el suelo y la rizosfera. En sus inicios, las colonias muestran un color blanco y de aspecto algodonoso, luego se tornan de color verde o amarillo por la densa esporulación y su aspecto se vuelve compacto (Infante et al., 2009; M. Sánchez, 2009). Estas características permitieron la selección de cuatro hongos de acuerdo a las observaciones que se describen en la tabla 6.

La morfología microscópica de los cuatro aislados permitió confirmar que se trataban de hongos pertenecientes al género *Trichoderma* ya que se pueden observar conidióforos con diversas ramificaciones perpendiculares de apariencia piramidal. Las fiálides se ven largas, delgadas y asimétricas con verticilos terminales de hasta cuatro conidios subglobosos (Arenas et al., 2009).

El aislado H5 pudo ser reconocido como *Trichoderma asperellum* gracias a su aspecto macroscópico de presentar de anillos concéntricos bien definidos, blancos y verdes (H. García et al., 2017). Además, al comparar las observaciones microscópicas obtenidas por Samuels et al. (2010) se puede evidenciar que esta especie muestra conidias ligeramente ovoides, dispuestas en roseta en grupos de cuatro a seis, clamidosporas abundantes y globosas, fiálides apicales arregladas en verticilos cruzados, ornamentación finamente espinosa y conidióforos ramificados.

En el caso del aislado H12, se pudo determinar la especie correspondiente a *Trichoderma harzianum* gracias a la descripción de Olivera & Rodríguez (2017) quienes

describen un micelio septado e hialino, del cual se originan los conidióforos de color verde para esta especie. Las ramas principales del conidióforo producen ramas laterales que se levantan aproximadamente sobre 90° con respecto al eje principal y pueden presentarse en forma verticilada o no. Las fiálides tienen formas cilíndricas o casi subglobosas, dándole un aspecto de una botella (Donati, 2017)

El control biológico microbiano ha ido desarrollándose los últimos años, y gracias a diversas investigaciones hoy en día se tiene conocimiento de más de 1.500 especies de microorganismos que incluyen hongos y bacterias y virus. Entre los géneros de mayor interés por su amplio uso en la agricultura actual sobresalen *Bacillus* y *Trichoderma* (Claro, 2006).

El presente estudio evaluó la capacidad antifúngica de diferentes agentes de biocontrol mediante cultivo dual; *T. harzianum* (H12), *B. subtilis* (C6) y *T. asperellum* (H5) mostraron tener el porcentaje de inhibición más alta entre todos los demás antagonistas probados.

Anjum y colaboradores (2019) evaluaron dos aislados obtenidos de suelo de *Bacillus subtilis* contra *Phytophthora capsici* obteniendo porcentajes de inhibición en cultivo dual entre 55-40%. Según Layton y otros (2011), la acción biocontroladora de *Bacillus subtilis* está basada en la antibiosis al producir metabolitos antibióticos capaces de actuar y suprimir el crecimiento de diversos microorganismos. Esta bacteria Gram positiva ha demostrado su eficiencia *in vitro* en el control de más de 23 tipos de patógenos de plantas entre ellas, varias especies de *Phytophthora*. Por otro lado, el bajo desempeño de *Bacillus thuringensis* se debe a que, si bien es un agente de control biológico, su alta especificidad y eficacia está enfocada a insectos plaga o vectores que son importantes para la agricultura (Ibrahim et al., 2010).

García (2017) reportó valores de porcentaje de inhibición entre 18% a 25% de aislados nativos de *Trichoderma* sp frente a *P. palmivora* y Carrera (2016) obtuvo resultados de 23-37% frente a *Phytophthora cinamoni*. Los considerables resultados obtenidos en el porcentaje de inhibición por los hongos *T. asperellum* (H5) y *T. harzianum* (H12) se deben a

que una de las formas de antagonismo que presenta el género *Trichoderma* es la competencia por nutrientes y espacio, gracias a su rápido crecimiento (Fernández & Suárez, 2009). Esta característica se comprueba en el estudio al comparar el crecimiento radial de estos antagonistas y el patógeno, evidenciándose que *T. harzianum* tuvo el mayor crecimiento radial, seguido de *T. asperellum*. Ambos microorganismos fueron más grandes que *P. palmivora* en el cultivo dual a los siete días de la incubación.

Además, se evidencia la capacidad antagónica según la escala de Baker y Cook (citada por Cholango, 2009), en la que el aislado H12 se ubicó en la clase 1 gracias a que logró colonizar por completo la colonia del patógeno y el aislado H5 se ubicó en la clase 2 al lograr crecer en al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.

El manejo de fitopatógenos a través de agentes de control biológico es un enfoque eficiente, duradero y no químico que puede ser adoptado ampliamente en el Ecuador. El estudio de los microorganismos de la rizosfera y el aislamiento de nuevas cepas con potencial antagonista y que también puedan estimular el crecimiento de las plantas son necesarios (Johns, 2017). La presente investigación ha logrado obtener dos hongos pertenecientes al género *Trichoderma* y una bacteria del género *Bacillus* con potencial antagonista frente al omicete *P. palmivora*, agente causal de la enfermedad pudrición parda del cultivo de cacao.

Capítulo VI: Conclusiones

Gracias a la aplicación de técnicas microbiológicas y visualización macro y microscópica, se logró aislar e identificar a la especie *Phytophthora palmivora* a partir de mazorcas enfermas de la hacienda “La Dolorosa”, Esmeraldas.

Se aislaron diez microorganismos con potencial biocontrolador a partir de muestras de suelo del cultivo de cacao, identificándose seis cepas de *Bacillus* y cuatro cepas de *Trichoderma*.

Se evidenció que *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma asperellum* mostraron los valores más altos del porcentaje de inhibición (PIRC) en comparación con los otros microorganismos, siendo estos 32.36%, 30.23% y 29.20% respectivamente.

Se comprobó la hipótesis de que en el suelo del cultivo de cacao existen microorganismos nativos con potencial antagónico contra el hongo fitopatógeno *Phytophthora* sp.

Capítulo VII: Recomendaciones

Identificar molecularmente al aislado fitopatógeno *Phytophthora palmivora* y los microorganismos aislados de la rizósfera de cacao obtenidos en este estudio.

Evaluar la patogenicidad del aislado de *Phytophthora palmivora* en la planta de cacao.

Desarrollar formulaciones de biopreparados en base de los diez aislados de suelo de cacao y evaluar su capacidad antagónica.

Bibliografía

- Adejumo, T. (2005). Crop protection strategies for major diseases of cocoa, coffee and cashew in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 4, 143–150.
- Afrin, S., & Bhuiyan, M. N. I. (2019). Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* against multidrug resistant *Serratia rubidaea*. *BioRxiv*, 818054. <https://doi.org/10.1101/818054>
- Anjum, M. Z., Adnan, M., Ali, S. M., Bilal, H. M., & Javaid, H. (2019). Antifungal Potential of Biocontrol Agents Against *Phytophthora Capsici* Causing Chili Fruit Rot. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 22(4), 156–159. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2019.22.556209>
- Aráuz, L. (2015). *Certificaciones de comercio justo: la facilidad de su alcance por pequeños productores de cacao fino de aroma del cantón Quevedo de la provincia de Los Ríos y beneficios en su productividad.*
- Arenas, O. R., Lara, M. H., Huato, M. A. D., Hernández, F. D., & Victoria, D. A. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143–151. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11759>
- Arvelo, M., González, D., Maroto, S., Delgado, T., & Montoya, P. (2017). *Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas.* Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
- Barnett, H. L. (Horace L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi.* 218.
- Bélanger, R., & Avis, T. (2002). Ecological processes and interactions occurring in leaf surface fungi. In *Phyllosphere microbiology* (pp. 193–207).
- Brasier, C. M., & Griffin, M. J. (1979). Taxonomy of '*Phytophthora palmivora*' on cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, 72(1), 111–143. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(79\)80015-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(79)80015-7)

- Campos, V. (2018). *Efecto de diferentes coadyuvantes en el establecimiento y supervivencia de Trichoderma (Trichodesma sp.) sobre mazorcas de cacao, para el control biológico de la moniliasis (Moniliophthora roreri)*.
- Carranza, G. (2015). *Identificación específica del agente causal de la mazorca negra (Phytophthora spp.) en cacao en la zona central del litoral*.
- Carrera Mena, N. G. (2016). *Aislamiento e identificación del Oomycete Phytophthora cinnamomi causante de la pudrición de la raíz de aguacate y evaluación de actividad antagónica in vitro por medio de Trichoderma spp* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería en Biotecnología.].
<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/11849>
- Chalivendra, S., & Ham, J. (2019). *Bacilli in the Biocontrol of Mycotoxins* (pp. 49–62).
https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_3
- Cholango, L. (2009). *Selección de cepas de Trichoderma sp in vitro para el control de problemas radiculares en flores de verano Checa - Ecuador*.
- Claro, O. (2006). *Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas*.
- Corporación Fortaleza del Valle. (2014). *Ecuador tiene dos tipos de cacao*.
<https://fortalezadelvalle.org/ecuador-tiene-dos-tipos-de-cacao/>
- Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 3, Issue 6, pp. 470–478). Nat Rev Microbiol. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1160>
- Donati, S. (2017). *Efecto de Trichoderma harzianum cepa L1 sobre la calidad de plantines en Pinus taeda* [UR. FA].
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/9715>
- Echemendia, M. (2010). *Phytophthora: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control*. .
<http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf>
- Enríquez, G. (2010). *Cacao orgánico: Guía para productores ecuatorianos*. (2a ed). INIAP.

- Erwin, D., & Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19971001256>
- Esikova, T. Z., Anokhina, T. O., Abashina, T. N., Suzina, N. E., & Solyanikova, I. P. (2021).
Characterization of Soil Bacteria with Potential to Degrade Benzoate and Antagonistic to Fungal and Bacterial Phytopathogens.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040755>
- España, M. (2019). *Manejo de Phytophthora palmivora L., en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.), en la hacienda San José, cantón Babahoyo*.
- Fernández, R., & Suárez, C. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *passiflorae* en Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio Zona Bananera Colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, 62(1), 4743--4748.
- Freile-Almeida, J. A., Morgado-Martínez, M., Pérez-García, G. A., Alemán-Pérez, R. D., & Domínguez-Brito, J. (2018). Soil microorganisms and plant diseases associated to cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes in the Ecuadorian Amazon. *Acta Agronomica*, 67(1). <https://doi.org/10.15446/ACAG.V67N1.60828>
- Fulton, R. H. (1989). The Cacao Disease Trilogy: Black Pod, Monilia Pod Rot, and Witches~Broom. *Plant Disease*, 73(7), 601. <https://doi.org/10.1094/PD-73-0601>
- García, A. (2017). *García, A. (2017). Evaluación de aislamientos de Trichoderma spp. para el control de Phytophthora Palmivora agente causante de la pudrición del cogollo de la palma de aceite*.
- García, H., Martínez, Á., Hermosa, M., Monte, E., Aguilar, C., & González, C. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(1), 58–79. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-4>
- Gregory, P. H. (1974). *Phytophthora disease of cocoa*. Longman.

- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(4), 307–319.
<https://doi.org/10.1038/NRMICRO1129>
- Hanada, R. E., Pomella, A. W. V., Soberanis, W., Loguercio, L. L., & Pereira, J. O. (2009). Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control*, 50(2), 143–149.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2009.04.005>
- Hernández-Rodríguez, A. I., Ruíz-Beltrán, Y. I., Acebo-Guerrero, Y. I., Miguélez-Sierra, Y. I., & Heydrich-Pérez, M. I. (2014). Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Rev. Protección Veg*, 29(1), 11–19.
- Ibarra, J. E., Castro, M. C. D. R., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J. A., Alférez, B. P., Pizaña, A. A., Olvera, H. L., Wong, L. G., Pardo, L., Garay, C. M., Gómez, I., Soberón, M., & Bravo, A. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 113–120.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31.
<https://doi.org/10.4161/BBUG.1.1.10519>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de Acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 14–21.
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del cacao (Theobroma cacao L.). Medidas para la temporada invernal*. Produmedios.
- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. (2017). *Perfil Sectorial del Cacao y Elaborados*. <https://www.proecuador.gob.ec/cacao-y-elaborados/>
- Jacas, J., Caballero, P., & Avila, J. (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades*. Publicaciones de la Universitat Jaume.

- Johns, C. (2017). *Living Soils: The Role of Microorganisms in Soil Health*.
- Koranteng, S. L., & Awuah, R. T. (2011). Biological suppression of black pod lesion development on detached cocoa pods. *African Journal of Agricultural Research*, 6(1), 67–72. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.368>
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L., & Sánchez, L. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA*, 9(16), 177–187. <https://doi.org/10.22490/24629448.501>
- Lema, J. (2015). “Zazagan”; Centro de Acopio de Cacao CCN-51 en Carrizal Ciudad de Milagro. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/30508>
- Luz, E. (2008). *Glossário ilustrado de Phytophthora: Técnicas especiais para o estudo de oomicetos* / *Illustrated glossary of Phytophthora*. Itabuna.
- Machado, M., Peña, M., Coto, O., López, M., Zamora, V., Cabrera, R., & Aranguren, M. (2008). Caracterización morfológica y fisiológica de *Phytophthora* spp. aisladas de plantas de aguacatero con síntomas de marchitez. *Revista CitriFrut*, 25(2), 49–56.
- Melnick, R. L., Suárez, C., Bailey, B. A., & Backman, P. A. (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57(3), 236–245. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2011.03.005>
- Melnick, R., Zidack, N., Bailey, B., Maximova, S., Guiltinan, M., & Backman, P. (2008). Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*, 46, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.022>
- Mendoza, C. (2013). *El cultivo de cacao Opción rentable para la selva* (L. Torres, W. Bravo, F. Quispe, K. Roque, D. Ventura, C. Jiménez, C. Cerājuo, E. Quispe, C. Herrera, & L. Yancen, Eds.; 1era ed). desco. www.desco.org.pe
- Morán, I. (2008). *Factibilidad de la producción y comercialización de cacao*. <http://repositorio.iaen.edu.ec/handle/24000/410>

- Mosquera, L. (2014). *Caracterización cultural, morfológica y fisiológica in vitro de Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al., agente causante de la Moniliasis del cacao (Theobroma cacao L), en comunidades kichwas amazónicas de la provincia de Napo-Ecuador.*
- Ndoumbe-Nkeng, M., Cilas, C., Nyemb, E., Nyasse, S., Bieysse, D., Flori, A., & Sache, I. (2004). Impact of removing diseased pods on cocoa black pod caused by *Phytophthora megakarya* and on cocoa production in Cameroon. *Crop Protection*, 23, 415–424.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.09.010>
- Olivera, V., & Rodríguez, D. (2017). *Evaluación de crecimiento, sanidad y resistencia a heladas de tres híbridos de Eucalyptus grandis con aplicación de bioestimulantes, Trichoderma harzianum (Trichosoil) y Quitosano (Biorend), en plantación [Udelar. Facultad de Agronomía].*
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/8764>
- Ploetz, R. C. (2007). Cacao Diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide. *The American Phytopathological Society*, 97(12), 1634–1639.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1634>
- Ramírez-González, S. I. (2013). La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. *Revista Tecnología En Marcha*, 21(1), pág. 97–110.
https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1343
- Rivero, V. I. (2009). *Phytophthora cactorum: Caracterización, epidemiología e incidencia en la productividad y en la calidad de frutos de peral cv. Williams.*
<http://rdi.uncoma.edu.ar/handle/123456789/15376>
- Rubio, V., & Fereres, A. (2005). Control Biológico de Plagas y enfermedades de los cultivos. In *Biotecnología y medio ambiente* (pp. 215–229).
- Samuels, G., Ismaiel, A., Bon, M., de Respini, S., & Petrini, O. (2010). *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102(4), 944–966.
<https://doi.org/10.3852/09-243>

- Sánchez, F., Garcés, F. R., Vera, J., Remache, R., Troya, F., & Coronel, T. (2011, July). *Cuantificación de enfermedades en mazorcas de cacao (Theobroma cacao L.) en la zona central del litoral ecuatoriano.*
- Sánchez, J., & Henry, C. (2012). Degradation of Aldrin by *Bacillus licheniformis*, Isolated from Water and Sediment from the Ciénaga Grande, Santa Marta, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 17(1), 67–76.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-548X2012000100005
- Sánchez, M. (2009). *Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de Trichoderma spp. nativos del norte de Tamaulipas.*
- Sánchez, M., Jaramillo, E., & Ramírez, I. (2015). *Enfermedades del cacao.*
- Schweiser, S. (2011). *Muestreo y análisis de suelo para diagnóstico de fertilidad.* INTA.
- Slepecky, R., & Hemphill, E. (2006). The Genus *Bacillus* — Nonmedical. *The Prokaryotes*, 530–562. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_16
- Standards Unit. (2018). *UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of Bacillus species.*
- Suárez, L., & Cabrales, C. (2008). Identificación de las especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *M. roleri* en el departamento de Norte de Santander. *Revista Universidad Francisco de Paula Santander*, 13(1), 45–56.
- Swedish University of Agricultural Sciences. (2017, December 20). *Potassium hydroxide test.* VetBact. <https://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=117>
- Torres, L. (2012). *Manual de producción de cacao fino de aroma a través de manejo ecológico.*
- University of California. (2018). *Bacillus* sp. Viticulture and Enology. <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/bacteria/bacillus-sp>

Villamil, J., Blanco, J., & Rosero, S. (2010). Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 65(1), 6305–6315.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179924340002>

Vincent, J. M. (1947). Distortion of Fungal Hyphæ in the Presence of Certain Inhibitors.

Nature, 159(4051), 850–850. <https://doi.org/10.1038/159850b0>

Whitman, W. (2010). Berge's Manual of Determinative Bacteriology: The Firmicutes. In P.

Vos, G. Garrity, D. Jones, N. Krieg, W. Ludwig, F. Rainey, K. Schleifer, & W. Whitman (Eds.), *Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag.

Anexos