

**UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA.**



**DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA TIERRA**

**ESCUELA DE INGENIERIA AGROPECUARIA**

**PREVIA A LA OBTENCION DEL TÍTULO DE:**

**INGENIERA AGROPECUARIA.**

**TEMA:**

**Microorganismos del suelo y enfermedades asociadas a genotipos de cacao en la provincia de Napo en la región Amazonía Ecuatoriana.**

**AUTORA:**

**DENICE JUDITH SHIGUANGO YUMBO.**

**DIRECTOR DEL PROYECTO:**

**Ing. M Sc. JORGE ANTONIO FREILE ALMEIDA.**

**PUYO-PASTAZA-ECUADOR**

**2016**

## **Declaración de auditoria y cesión de derechos.**

El proyecto de investigación de grado denominado “MICROORGANISMOS DEL SUELO Y ENFERMEDADES ASOCIADAS A GENOTIPOS DE CACAO EN LA PROVINCIA DE NAPO EN LA REGIÓN AMAZONÍA ECUATORIANA” fue desarrollado por Denice Judith Shiguango Yumbo egresada de la carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad Estatal Amazónica, bajo mi supervisión .

**Denice Shiguango**

**150096047-9**

## **Certificado de aprobación por tribunal de sustentación.**

---

Ing. Sandra Soria Re. M.Sc

---

Dr. C Javier Domínguez Brito

---

Dr. Joel Rodríguez Guerra

## **AGRADECIMIENTO**

---

EN PRIMER LUGAR A DIOS POR HABERME GUIADO E ILUMINADO POR EL BUEN CAMINO EN LA CARRERA UNIVERSITARIA.

A LA UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA POR ABRIR LAS PUERTAS Y PERMITIR FORMARME COMO PROFESIONAL.

A MI FAMILIA A MI PADRE ANDILE SHIGUANGO, MI MADRE INÉS YUMBO, A MIS HERMANOS; POR SIEMPRE HABERME DADO SU FUERZA Y APOYO INCONDICIONAL QUE ME HAN AYUDADO Y LLEVADO HASTA DONDE ESTOY AHORA.

A MI ESPOSO JAVIER GREFA E HIJA IVIS ANAHÍ POR FORMAR PARTE DE MI VIDA BRINDARME SU APOYO INCONDICIONAL, CONFIANZA, CARÍÑO.

A MI DIRECTOR DE TESIS, ING. MSC. JORGE FREILE ALMEIDA POR SU INCONDICIONAL APOYO EN LA ORIENTACIÓN, PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.

**Denice Shiguango**

## **DEDICATORIA.**

---

A DIOS POR SER MI GUÍA DURANTE MI VIDA UNIVERSITARIA.

LO DEDICO CON MUCHO CARIÑO A MI PADRE ANDILE SHIGUANGO Y A MI MADRE INÉS YUMBO A QUIENES A LA VEZ ADMIRO RESPETO POR SER EXCELENTES PADRES, POR SUS CONSEJOS, VALORES QUE ME HAN INCULCADO A LO LARGO DE MI VIDA Y ENSEÑARME QUE A PESAR DE LAS CIRCUNSTANCIA QUE ACONTECEN DÍA A DÍA Y HAY QUE SALIR ADELANTE MOTIVARME A ALCANZAR UNA META.

A MIS HERMANAS/OS, QUIENES ME HAN MOTIVADO EN TODO MOMENTO YA SEA EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS.

A MI ESPOSO JAVIER GREFA POR APOYAR Y CONFIAR EN MÍ PARA PODER SEGUIR ADELANTE.

A MI HIJA IVIS AHANI QUE ME DIO FUERZAS PARA PODER SALIR ADELANTE Y ES EL MOTOR DE MI VIDA.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS QUE ME HAN ALEGRADO LA VIDA Y ME APOYAN INCONDICIONALMENTE, LOS QUIERO MUCHO.

**Denice Shiguango**

## RESUMEN

---

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación, Posgrado y Conservación Amazónica (CIPCA), situado en la Región Amazónica Ecuatoriana con el objetivo de analizar la relación de los microorganismos del suelo y de las principales enfermedades con clones promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.). Se evaluaron los clones EET-95, EET-96, EET-103 y el CCN-51 utilizado como control, para ello se determinó la cantidad de bacterias, hongos y actinomicetos totales, expresados en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo, presentes en la rizosfera de los tres clones, así como la aparición de las principales enfermedades que atacan al cultivo. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de un factor y prueba HSD de Tukey. Las bacterias fueron los microorganismos de mayor asociación a los clones en estudio, le siguieron actinomicetos y hongos, el clon CCN-51 con la mayor presencia de bacterias, los clones EET-96 y EET-103 tuvieron mayor presencia de actinomicetos y el EET-103 la mayor presencia de hongos. La enfermedad escoba de bruja (*Cripinellis perniciosa* Sthael Singer) afectó en menor medida a los clones EET-103 y CCN-51, mientras que la moniliasis [*Moniliophthora roreri* (Cif and Par) Evans et al.] mostró al clon EET-103 con la mayor incidencia de esta enfermedad y al clon CCN-51 con la menor.

Palabras claves: Cacao, clones, genotipos, microorganismos, enfermedades.

## **ABSTRACT AND KEY WORDS**

This work was performed at the Center for Research and Graduate Amazon Conservation (CIPCA), located in the Ecuadorian Amazon Region with the aim of analyze the relationship of soil microorganisms and major disease in promising clones of cocoa (*Theobroma cacao* L.). EET-95, EET-96, EET-103 clones were evaluated and CCN-51 clone was used as a control, for that the total amount of bacteria, fungi and actinomycetes, expressed in colony forming units (CFU) per gram present in the rhizosphere soil of the three clones, and the emergence of major diseases that attack the crop was determined . Data were analyzed statistically by one-way ANOVA and Tukey HSD test. Bacteria were the largest association microorganisms clones under study, followed actinomycetes and fungi, the CCN-51 clone showed major presence of bacteria, EET-96 and EET-103 clones had higher presence of actinomycetes and EET- 103 the major presence of fungi. Witches' broom disease (*Cripinellis perniciososa* Sthael Singer) affected to a lesser extent the EET-103 and CCN-51 clones, while moniliasis [*Moniliophthora roreri* (Cif and Par) Evans et al.] showed in EET-103 clone the highest incidence of this disease and the CCN-51 clone with the least.

Key words: Cocoa, clones, diseases, microorganisms.

# ÍNDICE

## CAPÍTULO I

Introducción.....	10
1.1 Problema de investigación.....	13
1.2 Hipótesis.....	13
1.3 Objetivos.....	13
1.3.1 Objetivo general. ....	13
1.3.2 Objetivo específico.....	13

## CAPITULO II

Fundamentación teórica.....	14
2. Revisión bibliográfica.....	14
2.1. Generalidades del cultivo de cacao.....	14
2.1.1. Origen y taxonomía.....	14
2.1.2. Importancia económica.....	15
2.1.3. Importancia alimenticia y medicinal.....	16
2.1.4. Características botánicas.....	16
2.1.5 Clasificación taxonómica.....	17
2.1.6 Características de clones en estudio.....	17
2.1.7 Características fisiológicas y condiciones del cultivo.....	18
2.1.8 Requisitos ecológicos.....	19
2.1.9 Principales enfermedades.....	19
2.1.10 Fenología.....	23
2.2 Genética.....	23
2.2.1 Mejora genética.....	24
2.2.2 Hibridación.....	25

## CAPITULO III

3. Metodología de la investigación.....	26
3.1 Localización.....	26
3.2 Tipo de investigación.....	27



3.3 Métodos de investigación.....	27
3.4 Diseño de investigación.....	29
3.5 Tratamiento de los datos.....	30
3.6 Recursos humanos y materiales.....	31
<b>CAPITULO IV</b>	
4 Resultados y discusiones.....	38
5. Conclusiones.....	38
6. Recomendación.....	38
<b>CAPÍTULO VI</b>	
7. Bibliografía.....	39

### **ÍNDICE DE TABLA**

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cacao.....	17
Tabla 2. Características físicas y químicas del suelo antes del montaje de la investigación.....	26
Tabla 3. Variables meteorológicas registradas durante la etapa de la investigación.....	26
Tabla 4. Diseño de campo para la evaluación de la adaptabilidad de los clones EET-95, EET-96, EET-103 y CCN-51.....	29
Tabla 5. Métodos seguidos en el análisis de suelo.....	30

### **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

Figura 1. Microorganismos asociados a los clones en estudio.....	33
Figura 2. Incidencia de escoba de bruja de acuerdo a los clones en estudio.....	35
Figura 3. Incidencia de monilia de acuerdo a los clones en estudio.....	36

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

El cacao ecuatoriano es altamente apreciado en el mercado internacional por su calidad y aroma. Se cultiva en la Región Amazónica y Costa del país, la producción nacional 212.249 t. alcanza anuales, en 491.221 hectáreas cultivadas (MAGAP, III SNA SIGAGRO; INEC; ESPAC 2011).

En las plantaciones de cacao es posible la implementación de una agricultura sostenible, en donde parte de la clave para la productividad, está en el mantenimiento de los niveles de materia orgánica del suelo y el reciclaje de nutrientes. El aporte periódico de materiales orgánicos constituido principalmente por la hojarasca, común en los cacaotales, facilita la adopción de prácticas sostenibles en este sistema productivo. Según Blair *et al.*, (1995), el contenido de materia orgánica del suelo es un equilibrio entre la adición y la tasa de descomposición y como tal, modificaciones en las prácticas agrícolas pueden dar lugar a incremento del carbono, de los nutrientes y por tanto mejoras de la calidad del suelo agrícola.

La materia orgánica del suelo favorece el desarrollo de la agregación y su estructura, influye en la dinámica hídrica y en las transformaciones de sus componentes que representan modificaciones del medio edáfico y benefician a las plantas. Es importante considerar que la materia orgánica es el principal factor que incide en las características del sistema raíz-suelo y representa una de las diferencias sobresalientes entre el suelo rizosférico y no rizosférico (Pozuelo, 1991).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol originario de las selvas neotropicales, principalmente de la cuenca del Amazonas y la meseta Guyanesa (Lachenaud *et al.*, 2007), que en el país ha tomado importancia debido a la gran demanda que existe en el mundo de su producto principal, el chocolate y de sus derivados. Los suelos cacaoteros presentan una vasta reserva de poblaciones microbianas endofíticas (Arnold y Herre, 2003), que favorecen los procesos de asimilación de nutrientes.

A nivel mundial el cacao no solo se usa como golosina o bebida, se usa parte de la producción para la industria cosmética y en la medicina, lo que lo convierte en un cultivo de gran potencial económico. Otra de las ventajas que nos ofrece es que por ser un árbol originario

de los bosques húmedos, nos permite cultivarlo sin tener problemas con exceso de lluvia o inundaciones, lo que lo convierte en una alternativa ante la influencia del cambio climático (CATIE, 2011).

El 75% de la producción del Ecuador, es considerada como “cacao fino de aroma”, con denominación “sabor Arriba”, por cultivarse en la parte de arriba de la cuenca del río Guayas. Este cacao proviene de la variedad conocida como Nacional que es autóctona y se cultiva desde principios del siglo XVIII. Posiblemente tuvo su origen en algunas pocas mazorcas llevadas, hace mucho tiempo, desde la vertiente oriental de la cordillera de los Andes. Es homogénea en comparación con la variedad de cacao Trinitario, y su almendra, por su excelente calidad, obtiene precios altos con relación a otros cacaos comerciales (Revista Líderes, 2013).

La producción cacaotera del Ecuador está estrechamente relacionada a las condiciones del ecosistema, lo que determina un rendimiento diferente al de otros países productores. En general se consideran factores importantes que influyen en el rendimiento: la imperfecta distribución de las lluvias, escasez de horas luz, la presencia de enfermedades como la monilia y escoba de bruja, edad avanzada de los árboles, pérdida de fertilidad del suelo, falta de zonificación del cultivo, problemas de comercialización interna y la escasa respuesta técnica a estos problemas suscitados (Rosero, 2002).

La multifuncionalidad de los microorganismos en los sistemas agrícolas, se expresa de acuerdo a una serie de factores bióticos, como la competencia con otros microorganismos, la composición biológica del suelo, el reconocimiento planta microorganismo y viceversa. Igualmente, factores abióticos, como la climatología, las características físicas y químicas del suelo, que influyen directamente en el tipo de interacción de estos organismos y la expresión de los efectos benéficos o detrimentales, determinantes en el desarrollo de las especies vegetales (Marschner & Timonen, 2005; Harman, 2006; Hoitink *et al.*, 2006; Siddiqui & Akhtar, 2008; Radjacommaré *et al.*, 2010).

Por otra parte Argüello y Moreno (2014) señalaron que la adaptabilidad del cacao a condiciones adversas está relacionada con los microorganismos asociados a la rizosfera, y que esto determina en las capacidades de nutrición y desarrollo de las plantas, de esta manera

relacionan de alguna forma las características genéticas con la presencia de microorganismos propios de la rizosfera de un genotipo en particular.

Es difícil predecir el resultado de las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos del suelo y, más aún, entre las especies de microorganismos; no obstante, las comunidades microbianas asociadas con el sistema de raíces, se considera que desempeñan un papel clave en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. La respuesta de las plantas a la inoculación depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción, entre los componentes microbianos; así arroja diferentes respuestas, dependiendo de la combinación de los microorganismos (Vázquez *et al.*, 2000)

Los microorganismos que colonizan la rizosfera pueden afectar el crecimiento de la planta positiva o negativamente. Las rizobacterias pueden estimular el crecimiento de las plantas, impactar la biología de la raíz, la nutrición y ayudar a la sostenibilidad a largo plazo. La promoción del crecimiento de las plantas puede ser a través de al menos uno de los siguientes mecanismo: suprimir enfermedades (bioprotectores), mejorar la toma de nutrientes (biofertilizantes) o influir en la producción de fitohormonas (bioestimulantes) (Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Saharan y Nehra, 2011).

Uno de los mayores beneficios de los microorganismos, es su capacidad para facilitar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo mediante la fijación biológica (Baca *et al.*, 2000), además, se les atribuyen otras cualidades entre las que se destacan la solubilización de nutrientes que los hace disponibles para las plantas (Yazdani *et al.*, 2009).

## **1.1 PROBLEMA**

Las condiciones edafoclimáticas influyen de manera decisiva en la presencia de enfermedades y la obtención de bajos rendimientos del cultivo de cacao en la región Amazónica. Sin embargo, pocos estudios se han desarrollado para determinar las poblaciones totales de microorganismos en este agroecosistema y su relación con la aparición de enfermedades en el cultivo de cacao.

## **1.2 HIPÓTESIS**

Las poblaciones de microorganismos totales del suelo estarían en correspondencia con la aparición de enfermedades en plantas y frutos de cacao del sector en estudio.

### **1.2.1 OBJETIVOS**

#### **1.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar los grupos de microorganismos totales del suelo y de las principales enfermedades en clones promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.) nacional, mediante técnicas de cultivo *invitro* para contribuir a un control fitosanitario eficiente en cantón Arosemena Tola de la provincia de Napo.

#### **1.2.3 OBJETIVO ESPECIFICO**

- Determinar los grupos de microorganismo existente en la rizosfera de los clones EET-95, EET-96 Y EET-103, comparados con el clon CCN-51.
- Evaluar la manifestación de síntomas de enfermedades en los clones de cacao en estudio.

## **CAPITULO II**

## FUNDAMENTACION TEORICA DE LA INVESTIGACION

### 2. Revisión Bibliográfica

#### 2.1 Generalidades del cultivo de cacao

##### 2.1.1 Origen y taxonomía

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta ancestral que ha llegado a tener gran importancia cultural, ecológica y económica. En la época precolombina la semilla se utilizaba para obtener una bebida, la cual fue considerada como alimento de los dioses y de ahí su nombre científico theo = dios y broma = alimento; y fue usado por los Mayas, Aztecas y otros grupos como moneda. Su centro de origen fue la cuenca del río Amazonas, dispersándose hasta el sur de México donde en la actualidad se encuentra uno de las mayores reservas de germoplasma y del legendario cacao criollo (CATIE, 2011).

A nivel mundial, se cultiva principalmente en 13 países de los cuales Costa de Marfil, Camerún, Ghana, Malasia, Indonesia y Brasil, de los cuales se obtiene el 80% de la producción mundial. Se estima que más de 20 millones de personas dependen directamente de este cultivo para subsistir y que el 90% de la producción es cosechada de minifundios (menor de 5 ha). México hace un aporte del 0,6% a la producción mundial de cacao, procedente de 61.344,25 ha, de plantaciones ubicadas en los estados Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Guerrero (FAOSTAT, 2015).

El cacao es una planta originaria de las regiones tropicales de centro y sur américa, donde crece espontáneamente desde hace unos 6000 años. Pertenece al orden de las Malvales, dentro del género *Theobroma*. Los orígenes históricos del cacao para las civilizaciones precolombinas cuentan que Quetzalcoatl, dios sagrado de los toltecas, regaló a su pueblo el preciado árbol, conocido por los indígenas como Cacahuaquahitl. Una valiente princesa azteca, prefirió morir antes que revelar el lugar donde su marido, ausente en la guerra, guardaba los tesoros de su pueblo. El cacao nació por expreso deseo del dios Quetzalcoatl en el lugar donde fue asesinada la valiente princesa. Por ello, según los aztecas, el cacao es amargo como el sufrimiento de la fiel esposa, fuerte como su amor y determinación, y rojo como la sangre que derramó para no traicionar a su marido. Toda una leyenda (Confitería Márquez, 2016).

El cacao se dispersó ya sea de manera natural o por su transporte por parte del hombre, hacia el norte de América del sur y a Centroamérica, que eventualmente se dividió en dos

subespecies: cacao criollo en Centroamérica y cacao forastero en América del Sur (Confitería Márquez, 2016).

### **2.1.2 Importancia económica**

Su importancia en la economía radica en que el cacao, en el 2010, fue el quinto producto más exportado por el Ecuador según datos obtenidos de la página web del Banco Central de Ecuador, dentro de las exportaciones no petroleras, después del banano, pescados y crustáceos, preparaciones de carne, pescado o de crustáceos o moluscos acuáticos (conservas de pescado) y flores” (ANECACAO, 2015).

Para las familias productoras es un buen negocio producir y vender cacao debido a que es un cultivo que siempre tiene demanda, su precio en el mercado es estable a diferencia de otros cultivos como el café (*Coffea*) o el frijol (*Phaseolus vulgaris*) que además de tener precios variables enfrentan mayores riesgos de pérdida de la producción especialmente en el trópico húmedo (CATIE, 2011).

Según el boletín anuario del Banco Central del Ecuador del 2012 citado por ANECACAO, 2015, durante el período 2002-2011, el banano es el primer producto de origen agrícola exportable con US 14.200 millones, el segundo lugar lo ocupa el camarón con US 5.900 millones; y, en el tercer puesto aparecen las flores con ventas de \$ 4.600 millones. El cacao aparece como cuarto en importancia con unos \$ 2.700 millones, de los cuales, el 79% corresponde a grano seco y fermentado; y el 21% restante, forma parte de los semielaborados (licor, manteca, polvo, chocolate, etc.)

Durante los últimos años se ha querido aumentar la productividad de los cultivos y para ello se ha hecho uso del mejoramiento genético, de fertilizantes y principalmente de fungicidas e insecticidas, ya que se calcula que alrededor del 30% de la producción mundial se pierde a causa de plagas y enfermedades. Desafortunadamente el cultivo del cacao en América Latina atraviesa por un grave problema causado por la diseminación de enfermedades tales como escoba de bruja (*Moniliophthora pernisiosa*) y la Moniliasis roreri, esta última de ingreso reciente en México ha producido efectos devastadores llegando a generar pérdidas que superan el 90% de la producción (Barrera, 2011).

### **2.1.3 Importancia alimenticia y medicinal.**

Es primero, una flor, luego, es un producto de la mazorca, lo que se consigue por el largo periodo de formación con los millares de cambios celulares que se realizan hasta su maduración, biofermentación y secado, este largo proceso natural le permite obtener sus especiales y únicas características medicinales, este es un eficaz alimento con alto poder nutritivo, curativo saludable, este especial efecto, es causado, por sus miles de cambios biocelulares a los que está sometido, para la floración formación / maduración, (6/8 meses), pertenecen al género *Theobroma* (Monografías alimentos y medicinales, 2012).

Contiene teobromina eficaz medicina, con la presencia de varios y completos ácidos grasos y mantecas esenciales; como son el ácido fólico, esteárico, cítrico, palmítico, y las 3 bromelinas, es muy rico en grasas liposolubles, contiene los omegas 3, 4, 6, 7, este fruto contiene carbohidratos y fibra de beta glucanos solubles y muy digeribles, debe consumirse natural, sin mezcla con azúcar blanca usado para el proceso de refinación industrial para producir los chocolates y confites comerciales (Monografías alimentos y medicinales, 2012).

### **2.1.4 Características Botánicas**

El cacao es un árbol que puede alcanzar una altura de 6 a 8 m, posee un sistema radicular principalmente pivotante el cual busca las capas inferiores del suelo hacia los mantos freáticos, posee a la vez raíces primarias y secundarias que crecen horizontalmente.

De acuerdo a Rondón y Cumana, (2005) la clasificación sistemática del cacao (*Theobroma cacao L*), es de la siguiente manera:



### 2.1.5 Clasificación taxonómica del cacao

La tabla 1, reporta la clasificación taxonómica de cacao según de acuerdo a Rondón y Cumana, (2005).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cacao

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>Sub-reino</b>	Embriophyta
<b>Tipo</b>	Espermatofitas
<b>Subtipo</b>	Angiospermas
<b>Clase</b>	Dicotiledónea
<b>Sub-clase</b>	Dialipétalas
<b>Orden</b>	Malvales
<b>Familia</b>	Malvaceae
<b>Genero</b>	<i>Teobroma</i>
<b>Especie</b>	<i>Cacao</i>
<b>Nombre Científico</b>	<i>Teobroma cacao</i>

### 2.1.6. Características de clones en estudio

**EET-95:** Los árboles tienen floración intensa en los meses de agosto, octubre, diciembre y enero. El color inmaduro del fruto es verde y en madurez es amarillo. Tiene índice de semilla de 1,3 g y un índice de mazorca de 20, el rendimiento en kg/ha/año ha sido de 1368, se ha manifestado tolerante a las enfermedades, posee excelente sabor arriba y excelente aroma (Vasco, 2008).

**EET-96:** Se obtuvo del cruce de Nacional x Venezolano Amarillo. Posee floración intensa en los meses de enero y marzo. El fruto inmaduro presenta el lomo verde rojizo y en madurez es de color amarillo. Su índice de semilla es de 1,3 g, índice de mazorca de 20, el rendimiento obtenido es de 1140 kg/ha/año. Se ha comportado tolerante a las enfermedades, buen sabor y aceptable aroma. Posee alto porcentaje de mazorcas sanas y bajos niveles de escoba de bruja (Vasco, 2008).

**EET-103:** Se obtuvo del cruce de Nacional x Venezolano Amarillo. Posee floración intensa en los meses de enero y marzo, el color inmaduro es verde y en madurez es amarillo, índice de semilla de 1,5 g, índice de mazorca de 20, rendimiento de 1330 kg/ha/año, tolerante a

enfermedades, con buen sabor y aroma (Vasco, 2008). Es un clon precoz, que muestra sus primeras mazorcas a los 12 meses de establecidos en el campo, con alto porcentaje de mazorcas sanas. Nivel intermedio de escobas de bruja (Escobar, 2008).

**CCN-51:** El clon surgió de la hibridación (ICS-95 x IMC-67) x Canelo, el ICS = Imperial College Selection e IMC = Iquitos Mixes Calabacillo desarrollado, en 1965 luego de varias investigaciones, el agrónomo ambateño Homero Castro Zurita, logró este clon, que significa Colección Castro Naranjal. 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 (Guamán, 2007 y ANECACAO, 2015).

### **2.1.7 Características fisiológicas y condiciones del cultivo**

Según Info Agro (2010) el cacao no soporta temperaturas bajas, siendo su límite medio anual de temperatura los 21 °C ya que es difícil cultivar cacao satisfactoriamente con una temperatura más baja. Las temperaturas extremas muy altas pueden provocar alteraciones fisiológicas en el árbol por lo que es un cultivo que debe estar bajo sombra para que los rayos solares no incidan directamente y se incremente la temperatura. La temperatura determina la formación de flores. Cuando ésta es menor de 21 °C la floración es menor que a 25 °C, donde la floración es normal y abundante. Esto provoca que en determinadas zonas la producción de mazorcas sea estacional y durante algunas semanas no haya cosecha, cuando las temperaturas sean inferiores a 22 °C.

La práctica del cultivo bajo sombra incluye significativamente en el microclima de la plantación, principalmente en la radiación solar, viento y la humedad relativa, sin dejar de lado los factores del suelo, como la nutrición mineral, incidencia de plagas y enfermedades que incluyen en el crecimiento y desarrollo que se debe considerar en forma integral (Enríquez, 2010).

Son muchos los factores que delimitan las cosechas de cacao; en su hábitat natural, el cacao prefiere crecer cerca de plátanos y de cauchos, y en esas condiciones su producción es baja, pues comparte los nutrientes del suelo. En las plantaciones, son hileras de cacaoteros y solamente de cacaoteros, lo que en teoría debe aumentar la producción, pero en la práctica agota los suelos rápidamente y aleja un tanto a los árboles de cacao de sus polinizadores naturales. El suelo selvático es más rico en nutrientes que el suelo de las plantaciones. De todos modos el problema fundamental de las plantaciones siempre han sido las plagas, que no atacan la semilla (por su toxicidad) pero si pueden atacar los frutos jóvenes y los brotes. Se sabe que cuando los cacaoteros permanecen en lugares selváticos, rodeados de otros árboles, son mucho menos susceptibles a las plagas porque éstas son menos probables. La explicación es que los depredadores de los insectos y microorganismos están más presentes en la selva que en las plantaciones (Enríquez, 2010).

### **2.1.8 Requisitos ecológicos del cacao**

Desde el punto de vista del cultivo del cacao, la temperatura y la lluvia son los aspectos ambientales que pueden limitar las zonas aptas para el desarrollo del cultivo, ya que estos son considerados los factores climáticos críticos para su desarrollo. Aunque en algunas zonas geográficas, el viento puede ser el factor limitante de más importancia sin considerar ninguno de los otros. También la radiación solar es considerada un factor importante, aunque esta planta usualmente tiene mejor desarrollo bajo sombra, se ha encontrado en condiciones especiales de luminosidad y bajo sistemas de provisión de agua (riego) que esta puede ser cultivada a plena exposición solar, no obstante los requerimientos de otros factores no deben de ser olvidados (Vasco, 2008).

Especie primaria, umbrófila. No es un árbol de espacios abiertos. Evolucionaron bajo circunstancias de dosel cerrado. Este árbol es cultivado bajo la sombra de árboles más grandes pues requiere protección para su desarrollo normal y producción (CONABIO, 2008).

### **2.1.9. Principales enfermedades del cacao**

**Moniliasis:** Causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, se caracteriza por dañar frutos en cualquier estado de desarrollo, siendo el de mayor susceptibilidad los menores de tres meses de formación. La evidencia indica que la infección de monilla ocurre principalmente en las

primeras etapas del crecimiento de las mazorcas y que éstas se vuelven progresivamente más resistentes a medida que avanza su desarrollo. Cuando logra entrar en las etapas iniciales del crecimiento, el hongo parece capaz de invadir el interior de la mazorca mientras ésta continúa su crecimiento, sin que en su exterior aparezca ningún síntoma de la enfermedad (Evans *et al.*, 1998).

Para el combate de la enfermedad se recomienda: a) Regulación de la sombra definitiva del cacaotal, para que permita mayor paso de luz y aire (30-40%). b) Podar el cacao moderadamente cuantas veces sea necesario, para mantener el árbol aireado y con poca humedad ambiental. c) Cosechar las mazorcas maduras cada dos semanas para no tener infecciones en las etapas finales de la maduración, y recoger los frutos infectados alejándolos de la plantación; y d) Como medida adicional se pueden hacer aspersiones con productos químicos, para proteger las mazorquitas durante meses de mayor producción. Se puede usar un producto a base de cobre o clorotalonil, haciendo aspersiones de acuerdo con las recomendaciones de las casas comerciales (Info Agro, 2010).

**Escoba de bruja:** Afecta cojinetes florales, brotes, hojas y frutos. Antes de definirse la moniliasis del cacao esta enfermedad era considerada la más destructiva en el Ecuador. Es causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa*.

El síntoma característico es la proliferación de yemas axilares en ramas principales y secundarias, las cuales producen brotes vegetativos atrofiados en forma de abanico a lo que se denomina “escoba”, ésta se seca y después de tres meses, cuando las condiciones son favorables se estimula la fructificación del hongo y aparecen los basidio carpos. (Fundación Maquita Cusunchic, 2003).

Para su control es importante aprovechar las podas de mantenimiento, para eliminar escobas antes que fructifiquen, reduciendo de esta manera la fuente de inóculo, tomándose mayor atención en el momento de mayor fructificación a fin de proteger los frutos y asegurar una buena cosecha (Info Agro, 2010).

**Mazorca negra:** Esta es la enfermedad más importante del cacao en todas las áreas cacaoteras del mundo; causada por hongos del complejo *Phytophthora palmivora*, es responsable de más pérdidas en las cosechas que cualquier otra enfermedad existente en la región. Aunque el hongo puede atacar plántulas y diferentes partes del árbol de cacao, como cojines florales, chupones, brotes, hojas, ramas, tronco y raíces, el principal daño lo sufren

las mazorcas. Para su control se deben recoger los frutos infectados por el hongo y aplicar productos a base de cobre (ENGORMIX, 2004).

Los microorganismos del suelo desempeñan un rol vital en diferentes procesos del suelo. Así por ejemplo, en la mineralización (ej. bacterias), inmovilización (ej. hongos micorrizas), eficiencia del ciclo de nutrientes, descomposición (y síntesis) de materia orgánica (MO), en la capacidad de intercambio catiónico, en las reservas de nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P), en la acidez, en la toxicidad, en la capacidad de retención de humedad, en la agregación (estructura) a través de los exudados microbianos, en el régimen de agua, etc. (Gómez, 2007).

Los suelos cacaoteros presentan una vasta reserva de poblaciones microbianas endofíticas, que favorecen los procesos de asimilación de nutrientes (Arnold y Herre, 2003).

Según Cano,(2011) existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por múltiples y complejos factores bióticos y abióticos. En la rizosfera, uno de los principales sitios donde se presentan microorganismos, específicamente funcionales, como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patogénicas, normalmente, compiten por espacio y por nutrientes. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales. Microorganismos rizosféricos, como los hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF), hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas*, usualmente, catalogados como agentes de control biológico (BCA) y microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM), dependen de los factores mencionados para expresar sus potenciales efectos benéficos; sin embargo, en la interacción de estos tres tipos de microorganismos, se pueden presentar efectos sinérgicos, que potencialicen los beneficios o, por el contrario, efectos antagónicos o simplemente que no ocurra ningún efecto en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas.

Es difícil predecir el resultado de las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos del suelo y, más aún, entre las especies de microorganismos; no obstante, las

comunidades microbianas asociadas con el sistema de raíces, se considera que desempeñan un papel clave en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. La respuesta de las plantas a la inoculación depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción, entre los componentes microbianos; así arroja diferentes respuestas, dependiendo de la combinación de los microorganismos (Vázquez *et al.*, 2000).

### ***Pseudomonas spp.***

Estas bacterias pueden ejercer un efecto benéfico directo, a través de la síntesis de fitohormonas y de vitaminas, estimulación de la germinación de semillas y emergencia de plántulas, inhibición de la síntesis de etileno, solubilizarían de fósforo (P) inorgánico. De manera indirecta, por medio de síntesis de antibióticos y fungicidas, competencia por nutrientes, producción de sideróforos o por la inducción de la resistencia sistémica a patógenos. Pueden también actuar como BCA, capaces de proteger a las plantas de la infección, causadas por agentes fitopatógenos (Rosas *et al.*, 2009).

En virtud de su capacidad de adaptación fisiológica y versatilidad metabólica, las bacterias en las zonas de raíces de las plantas son un agente clave del cambio del suelo en los agroecosistemas, con efectos positivos, en cuanto a tolerancia de altos contenidos de sales, aumento en los rendimientos de los cultivos y mejoras en la calidad del suelo, respecto a la disponibilidad de nutrientes; sin embargo, esta regulación está mediada por el “*quorum sensing*” de las bacterias, las cuales, se deben adaptar para alcanzar una alta proliferación y, de esta manera, se estimulan, se activan y se mantienen en la zona radicular, por medio de la liberación selectiva de los exudados y lixiviados, por parte de las plantas y otros microorganismos (Brown, 2010).

Las plantas pueden ser inducidas a desarrollar una mayor resistencia a los patógenos, mediante el tratamiento, con una variedad de inductores bióticos y abióticos. La resistencia inducida es de amplio espectro y puede ser de larga duración, pero rara vez proporciona un control completo de la enfermedad. Una posible razón para esto es que las plantas en el campo ya están inducidas, a través de sus continuas interacciones con el entorno biótico y abiótico (Walters, 2009)

### 2.1.10. Fenología

**Follaje:** Perennifolio.

**Floración:** Florece durante casi todo el año (principalmente verano y otoño).

**Fructificación:** Los frutos maduran mayormente en la primavera y el verano.

**Polinización:** Polinización natural: entomófila. El principal agente polinizador es una activa y pequeña “mosquita” (*Forcipomya spp.*, *Ceratopogonidae*), que se ha encontrado en todas las áreas donde se cultiva el cacao. Las mosquitas pueden volar de un árbol a otro hasta una distancia de 60 m y tienen actividad durante el día después de las 8:00 am. Se ha informado que los áfidos y varias especies de hormigas (*Crematogaster sp.* y *Ectatomma tuberculatum*) también efectúan la polinización. El polen puede mantenerse viable por tres días. Las flores están receptivas desde las primeras horas de la mañana. La flor del cacao comienza a abrirse gradualmente por la tarde, y continúa por la noche hasta que está completamente abierta justo antes del amanecer. Una porción muy grande de flores no son polinizadas y caen al cabo de 48 horas. Se ha desarrollado la protoginia para prevenir la autopolinización. Las flores funcionalmente son hembras primero y después machos. Existe cuando menos un sistema de incompatibilidad que opera y que favorece la fecundación cruzada (manteniendo la heterozigocidad) pero que no excluye por completo la autofecundación. Las poblaciones de cacao silvestre en el corazón de su distribución natural en las colinas de los Andes en Ecuador, Perú y Colombia son auto-incompatibles. En contraste, poblaciones cercanas a la periferia son auto-compatibles. El cacao es una planta altamente alógama, pues se estima que la polinización cruzada es aproximadamente del 95 %. En cultivo se practica la polinización artificial (manual): con unas pinzas se toma un estambre con las anteras abiertas de una flor del progenitor masculino. Las anteras se frotan sobre toda la longitud del pistilo (CONABIO, 2008)

### 2.2. Genética del cultivo

Tres principales grupos genéticos de cacao han sido descritos y cultivados tradicionalmente alrededor del mundo: Criollo, Forastero y Trinitario. El grupo de los Criollos fue originalmente cultivado por los mayas en América Central y representa el primer grupo de cacao domesticado del mundo. El grupo de los Forasteros incluye distintas poblaciones localizadas a lo largo de la Región Amazónica desde Colombia hasta las Guyanas. Las almendras de cacao de calidad, provienen del grupo Criollo que, a diferencia del cultivar Forastero y del Trinitario (obtenido por la recombinación de los dos primeros), fue

domesticado y empleado como materia prima en la alimentación de los pueblos precolombinos de Centroamérica hace unos 3.800 años (Powis *et al.*, 2011).

El grupo genético Criollo, clasificado como subespecie cacao, y del cual se obtiene el cacao “fino” contribuye a la producción mundial con el 5% (Afoakwa *et al.*, 2008); aunque su consumo aún está revalorándose, se encuentra en expansión y es mucho más exigente respecto a la calidad de la materia prima y de los productos derivados de ésta. Este mercado gourmet paga sobreprecios por almendras obtenidas del genotipo Criollo y destina el grano a la elaboración de chocolates “finos” altamente cotizados en Estados Unidos y Europa. Esta situación, sumada a otras características de mercadeo, que premia los productos con denominación de origen y simplifica los requerimientos de comercio, estimula la conservación, cultivo y comercialización de razas o genotipos de calidad “superior” (Vázquez *et al.*, 2012).

Los individuos que descienden de estos sistemas de entrecruzamiento, son un importante reservorio de genes que potencialmente pueden exhibir las características de sus parentales, siendo la calidad sensorial una de las más importantes (aroma, sabor y textura principalmente), además, hay mejora de las características agronómicas de rendimiento y tolerancia a enfermedades, tal como ocurre en las variedades Trinitario (Johnson *et al.*, 2009).

### **2.2.1. Mejora genética por medio biotecnológicos**

En el caso del Ecuador, el material genético natural lo constituyó el cacao llamado Nacional, que desafortunadamente va desapareciendo para dar paso a otros genotipos o variedades con alta productividad y resistentes a enfermedades, pero de un sabor diferente y sin aroma, que es lo que ha caracterizado al cacao Nacional a través de los años y lo que le ha dado la fama entre todos los manufactureros de chocolate especial, finos con aroma (Quiroz, 2004)

Según Arévalo, (2012) el mejoramiento genético del cacao en el Perú implica: incremento de la productividad y resistencia a plagas y enfermedades – mejoramiento de la calidad en sabor y aroma.



A la vez que satisfagan normas sociales, éticas, ecológicas, de seguridad. Etapas del mejoramiento genético del cacao: a) Identificación de genotipos promisorios en productividad, calidad, resistencia a enfermedades y factores adversos del clima. b) Establecimiento de ensayos de campo para la selección de los genotipos superiores. c) Desarrollo de una nueva generación de ensayos de campo basado en los resultados anteriores (Arévalo, 2012).

### **2.2.2. Hibridación**

Es posible tanto entre diferentes formas dentro de la especie como también entre especies diferentes del género *Theobroma*. Hibridación interespecífica e injertos son considerados como estrategias potenciales para el desarrollo de nuevas cultivos (resistentes) de cacao. Una hibridación es posible entre especies estrechamente relacionadas, como también entre especies de diferentes secciones del género *Theobroma*. Hibridación intraespecífica, especialmente sobre la base de clasificaciones moleculares de la diversidad del cacao, se ha utilizado para el desarrollo de nuevas variedades (Motamayor *et al.*, 2003). Híbridos naturales son extremadamente escasos, lo que probablemente se debe a un eficiente sistema de aislamiento reproductivo y a una reducida distribución de las especies (De la Cruz *et al.*, 1995).

## CAPITULO III

### 3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

#### 3.1. Localización

La presente investigación se realiza en el Centro de Investigación, Posgrado y Conservación de la Biodiversidad Amazónica – CIPCA, está ubicada en la provincia de Napo, Cantón Arosemena Tola región amazónica, junto a la desembocadura de los ríos Piatúa y Anzú, a 527 msnm, en un suelo del orden Inceptisoles (Soil Survey Staff, 2003), con las características físico-químicas que se muestran en la tabla 2. Las variables meteorológicas registradas durante la etapa de la investigación se muestran en la tabla 3.

Tabla 2. Características físicas y químicas del suelo antes del montaje de la investigación

Característica	Unidad de medida	Profundidad 0-20 cm	Profundidad 20-40 cm
pH	-	4,8	5,1
MO	%	4,2	2,1
CE	dS m <sup>-1</sup>	0,004	0,005
N	mg.kg <sup>-1</sup>	0,02	0,01
P	mg.kg <sup>-1</sup>	7,5	4,1
K	meq/100g	0,51	0,32
S	mg.kg <sup>-1</sup>	9,2	4,6
Ca	meq/100g	7,1	5,2
Mg	meq/100g	1,2	0,8
Zn	mg.kg <sup>-1</sup>	5,2	6,1
Cu	mg.kg <sup>-1</sup>	6,3	5,3
Fe	mg.kg <sup>-1</sup>	203	223
Mn	mg.kg <sup>-1</sup>	16,1	18,2
Al			
Clase textural		Franco-Arcilloso	

Tabla 3. Variables meteorológicas registradas durante la etapa de la investigación

Año	Temperatura Media (°C)	Humedad relativa (%)	Pluviometría (mm)
2012	24,30	79,70	4200
2013	24,21	79,75	4000
2014	24,15	79,79	3800

### **3.2. Tipo de investigación**

El tipo de investigación que se realizó es de carácter experimental, se realizaron evaluaciones bajo la supervisión del tutor entre marzo y septiembre del 2015 como parte de investigación cacao 2015.

### **3.3. Métodos de investigación**

Para el análisis microbiológico del suelo se tomaron muestras aleatorias en la rizosfera de las plantas, a 40 cm del tronco y a una profundidad de 0-20 cm. Las muestras se conformaron a partir de cinco sub-muestras de 200 g, tomadas en cada tratamiento (clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103 y CCN-51) y a réplicas. Estas se homogenizaron y se pesó un gramo/muestra.

Se prepararon diluciones seriadas a partir de la dilución de un gramo de suelo en 9 ml de agua destilada estéril. Se agitaron de forma vigorosa durante 5 minutos en agitador Vórtex. Este procedimiento se siguió hasta la obtención de la dilución  $10^{-7}$ .

#### **Siembra de microorganismos.**

Bacterias totales: La alícuota de 0,1 ml de la dilución  $10^{-6}$  se colocó en el centro de la superficie del medio de cultivo en cajas Petri con 20 ml de agar nutritivo cultivadas en triplicado. Se ubicaron a temperatura de 30 a 37°C durante 24 horas.

Hongos totales: La alícuota de 0,1 ml de la dilución  $10^{-2}$  se colocó en cajas Petri con 20 ml de agar Papa Dextrosa (PDA) y con rosa de bengala y estreptomycin a una dosis de para no permitir el crecimiento de bacterias triplicado. Se ubicaron a temperatura de 28 a 30°C durante 7 días.

Actinomicetos totales: La alícuota de 0,1 ml de la dilución  $10^{-4}$  se colocó en las cajas Petri con 20 ml de Czapek por triplicado. Se ubicaron a temperatura de 28 a 30°C durante 10 días.

En todos los casos la dilución se colocó en el centro de la superficie del medio de cultivo especificado, se extendió y distribuyó de forma homogénea por toda la superficie de la placa con una varilla de vidrio previamente esterilizada (inmersa en alcohol al 70%), se pasó por la llama del mechero y se deja enfriar. Las cajas Petri se colocaron de forma invertida.

Transcurrido el tiempo a la temperatura definida se realizó el conteo de colonias, que se cuantificó como unidades formadoras de colonias (UFC)/g suelo y se realizó una caracterización física, química y biológica del suelo, esto se lo realizó en el laboratorio de suelos de la UEA.

### **Incidencia de las principales enfermedades presentes en los clones en estudiados**

Porcentaje de incidencia de enfermedades: Se tomaron datos para la utilización del criterio de Sánchez et al. (2003). Las evaluaciones se realizaron en 30 plantas por tratamiento.

% Incidencia =  $\frac{\text{Número de plantas u órganos afectados}}{\text{Número total de plantas u órganos analizados}} \times 100$ .

- Número de plantas con inicio de mal de machete. *Ceratocystis fimbriata*, Ellis & Halsted ó *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht y Harrington.
- Número de plantas con escoba de bruja. *Moniliophthora perniciosa* Sthael. Singuer.
- Número de frutos dañados por moniliasis/ plantas totales. *Moniliophthora roreri* (Cif and Par) Evans *et al.* (Evans *et al.*, 1998).
- Número de frutos dañados por mazorca negra/plantas totales. *Phytophthora palmivora*

### **3.4. Diseño de investigación**

Se trasplantaron posturas de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los clones EET-95, EET-96, EET-103 y CCN-51, de cinco meses de edad, a una distancia de 3,5 x 3,5 m. Las plantas para el trasplante se obtuvieron de un vivero certificado, con 12 hojas, tallo de 15 mm de diámetro y altura de 40 cm, sin síntomas de plagas, vigorosas y homogéneas.

El diseño experimental fue de bloques al azar con cinco réplicas, los tratamientos consistieron en los clones EET-95, EET-96, EET-103 y CCN-51. El diseño de campo se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Diseño de campo para la evaluación de la adaptabilidad de los clones EET-95, EET-96, EET-103 y CCN-51.

Réplicas	Tratamientos (Clones)			
I	EET-95	EET-96	EET-103	CCN-51
II	EET-103	EET-95	CCN-51	EET-96
III	EET-96	CCN-51	EET-95	EET-103
IV	CCN-51	EET-96	EET-103	EET-95
V	EET-103	EET-95	CCN-51	EET-96

Se estableció la investigación con el criterio de un sistema integrado cacao-plátano-guaba, estas últimas especies como sombra transitoria, en el sistema se integraron forestales como sombra permanente.

Se establecieron 20 plantas por tratamiento en parcelas de 147 m<sup>2</sup>, se evaluaron seis plantas en el centro de la parcela. Las aplicaciones de nutrientes fueron mediante material orgánico a base de compost, (N; 2,1 %, P; 1,73 % y K; 2,51 %) con dosis de un kilogramo por planta, en 3 aplicaciones anuales. Se efectuaron cuatro podas a las plantas, las mismas que fueron de formación y saneamiento.

**Análisis de Suelo:** El análisis de suelo se realizó según los métodos que se señalan en la tabla 5.

Tabla 5. Métodos seguidos en el análisis de suelo.

Determinación	Método
Distribución del tamaño de partículas	Dispersante Hexametáfosfato de sodio + Carbonato de Sodio.
K, Ca, Mg (meq/100ml)	Olsen, extraído con solución de Bicarbonato de Sodio 0,5 M a pH= 8,5. Relación suelo-solución 1:20.
Zn, Cu, Fe, Mn(mg.kg <sup>-1</sup> )	
N, P, B (mg.kg <sup>-1</sup> )	Colorimetría
S (mg.kg <sup>-1</sup> )	Turbidimetría
Al (meq/100ml)	Titulación con NaOH
Ph	Potenciometría digital. Relación suelo-agua 1:2,5.
Materia Orgánica (%)	Combustión húmeda. Welkley-Black
Conductividad eléctrica (CE) dS.m <sup>-1</sup>	Conductimetría. Relación suelo-agua, 1:2,5.

### 3.5. Tratamiento de los datos

#### Análisis estadísticos

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el paquete utilitario Statgraphics Plus versión 5.0. Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). Se desarrolló ANOVA de un factor y prueba de Tukey. La probabilidad máxima de cometer error de tipo I fue 0,05.

### 3.6 RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES.

#### Equipos:

Los equipos utilizados fueron: Cámara fotográfica, Computadora, Impresora HP color, Escritorio, Acceso al Laboratorio de Biología/Microbiología de la UEA y Balanza.

#### Materiales:

Los principales materiales empleados en esta investigación fueron: Machete, Machetín, Agitador Vórtex, Palas, Cintas métricas, Baldes, Fundas de polietileno, Agua destilada

estéril, cajas Petri, Agar nutritivo, Agar papa dextrosa (PDA), rosa de bengala, Estreptomicina, Varilla de vidrio, Mechero, cuerda, Rollos de cinta para control de edad (10 colores), Lápices, esferos y cuadernos

## CAPITULO IV

### 4. Resultados y Discusión

#### Caracterización de los principales grupos de microorganismos relacionados con los clones en estudio

El análisis microbiológico permitió comprobar que el nivel poblacional más alto de los microorganismos fue de bacterias, pues se presentaron los más altos valores en los clones en estudio y en particular en el clon CCN-51 que mostró el mayor grado de presencia de bacterias asociadas a su rizosfera como se observa en la figura 1. Entre los clones promisorios se encontraron diferencias, ya que el EET-95 presentó valores superiores a los otros dos clones promisorios, todos estos expresaron valores más bajos que el clon CCN-51.

El hecho de que se haya asociado una mayor cantidad de bacterias a este clon, evidenció la especificidad de algunos grupos de bacterias que se asociaron a este genotipo, en tal sentido hay estudios que comprobaron la especificidad que algunos tipos de bacterias muestran al asociarse, por ejemplo con las raíces de poaceas tropicales, en particular los géneros *Paspalum* y *Digitaria*, donde se fijan grandes cantidades de N<sub>2</sub>. Estas bacterias pertenecían al género *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* y se hallaron, tanto en la rizosfera como en los espacios intercelulares de la corteza de la raíz (Mano, 2008).

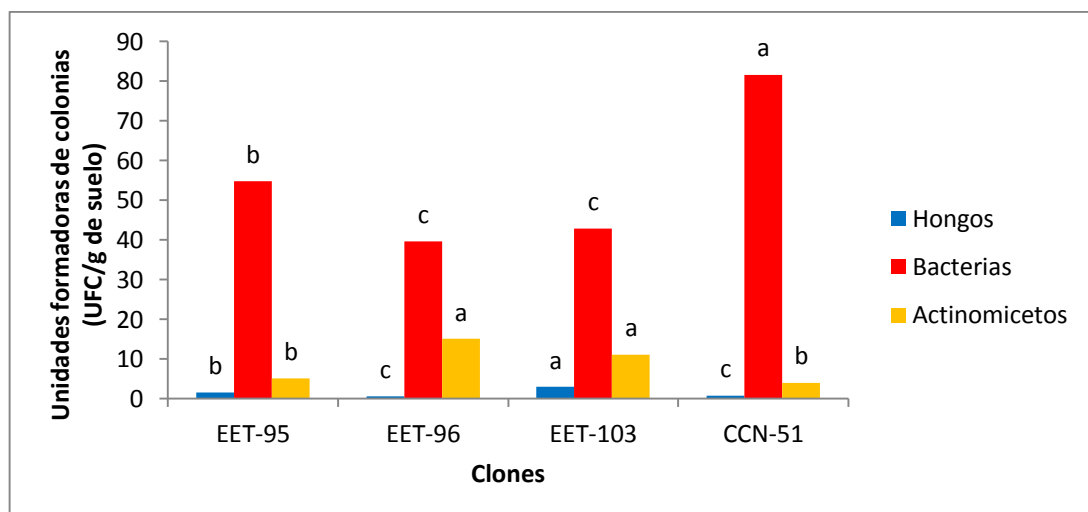




Figura 1. Microorganismos asociados a los clones en estudio. Valores expresados con exponente  $10^4$ . ANOVA SIMPLE. Prueba de Tukey  $p \leq 0,05$ .  $n=3$ . Error típico (ET) Bacterias= 1,86, ET Hongos=2,00, ET Actinomicetos= 0,04. Medias con letras desiguales muestran diferencias estadísticas.

Las raíces producen secreciones y otros compuestos rizosféricos que son fuentes importantes de C y que entran al suelo desde la planta, pero este fenómeno no se expresa por igual en todos los genotipos. Las bacterias diazotróficas utilizan estos recursos al asociarse con las raíces de las plantas (Van Loon y Bakker, 2006). En investigación realizada por Soto *et al.*, (2012) determinaron que las poblaciones microbianas fueron afectadas por el tipo de especie vegetal, cuando determinaron las poblaciones totales de microorganismos en dos especies; *Viguiera dentata* (Cav.) Spreng y *Ferocaptus latispinus* (Haw) Britton & Rose, donde se expresó mayor población de bacterias y menos hongos en la primera y a la inversa en la segunda.

Por esta razón es de esperar una respuesta eficiente, tanto por los clones promisorios, los que mostraron niveles altos de asociación de bacterias totales, como por el clon CCN-51, que representa para el Ecuador un alto porcentaje de su producción y exportación.

Otro ejemplo de asociación de bacterias a una especie concreta es la soya, donde las bacterias del género *Bradyrhizobium* son los simbioses principales de la especie. Estas bacterias, en particular distintas cepas de especies como *B. japonicum* y *B. elkanii* son utilizadas como inoculantes y en esos casos pueden aportar entre el 60 % y 90 % del N total utilizado por la planta (Werner y Newton, 2005).

Los actinomicetos o actinobacterias fueron el segundo grupo de microorganismos presentes y asociados en los clones, mostraron resultados en los que los clones EET-96 y EET-103 alcanzaron los mayores valores. De los actinomicetos se ha señalado que son rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, gran positivas de vida terrestre y con la capacidad de descomponer la materia orgánica actuando sobre la celulosa por la quitina (Franco, 2009), y esta es una de las causas de que los clones promisorios mostraran mayor crecimiento.

Los resultados respecto a los hongos, tercer grupo en abundancia en la rizosfera de los clones en estudio, demostró que las mayores poblaciones se encontraron en el clon EET-103. Estos microorganismos mantienen unidas las partículas del suelo, aumentan la estabilidad estructural y proveen alimento a la fauna, lo cual evidentemente favorece a este clon. Algunos hongos, como las micorrizas, forman mutualismos con las raíces de las plantas y

proveen nutrientes limitantes a las plantas como el P y reciben a cambio compuestos de C y un espacio libre de competidores (Simard y Durall, 2004).

La diversidad microbiana de los suelos agrícolas es fundamental para el mantenimiento de la formación del suelo, la eliminación de toxinas y el ciclo de elementos, las medidas de diversidad son cada vez más importantes en la evaluación de la calidad del suelo. Ejemplos de los rápidos cambios en la estructura de la comunidad podrían servir como indicadores tempranos de cambios en la calidad del suelo (Gómez, 2012; Schimann *et al.* 2012).

Contrariamente a los resultados obtenidos en la presente investigación, en una plantación de cacao de Colombia (Villamil *et al.* 2012) al evaluar microorganismos nativos encontraron casi el doble de la presencia de hongos, que de bacterias. Estos mismos autores determinaron que hay microorganismos antagonistas que limitan el desarrollo de la monilia, tanto bacterias como hongos. De cualquier manera los niveles de hongos presentes y asociados al clon promisorio EET-103, muchos de ellos nativos, aunque en este trabajo solamente se determinaron los totales, pueden incidir en la presencia de esta enfermedad.

Se comprobó que la microbiota asociada a la rizosfera del cacao, tiene especificidad, acorde a las características genéticas de las plantas. Según consideraciones de Argüello *et al.*, (2014) la microbiota asociada con la rizosfera desempeña una función importante para la nutrición y desarrollo de las mismas, lo cual quedó demostrado en los resultados sobre las caracterizaciones morfo-agronómicas realizadas en el primer acápite de este trabajo.

### **Incidencia de las principales enfermedades presentes de acuerdo con los clones en estudio**

Los resultados de las evaluaciones de las principales enfermedades que atacan al cacao se presentan seguidamente. Aunque fueron evaluadas cuatro enfermedades, desde el punto de vista de su incidencia tal como señala Sánchez *et al.*, (2003), no se presentó incidencia de *Ceratocystis frimbriata* Ellis & Halsted, ni de *Phytophthora palmivora*, no se presentaron plantas con inicio de mal de machete, tampoco presencia de mazorca negra.

En la figura 2 se expresan los resultados de la incidencia de escoba de bruja (*Cripinellis pernicioso* Sthael Singer), donde los clones EET-95 y EET-96 mostraron la mayor incidencia de la enfermedad, sin diferir entre ellos, pero si variaron estadísticamente con respecto a los clones EET-103 y CCN-51. Estos últimos clones no presentaron diferencias estadísticas

entre sí, con los valores más bajos, incluso el clon CCN-51 no tuvo incidencia de la enfermedad.

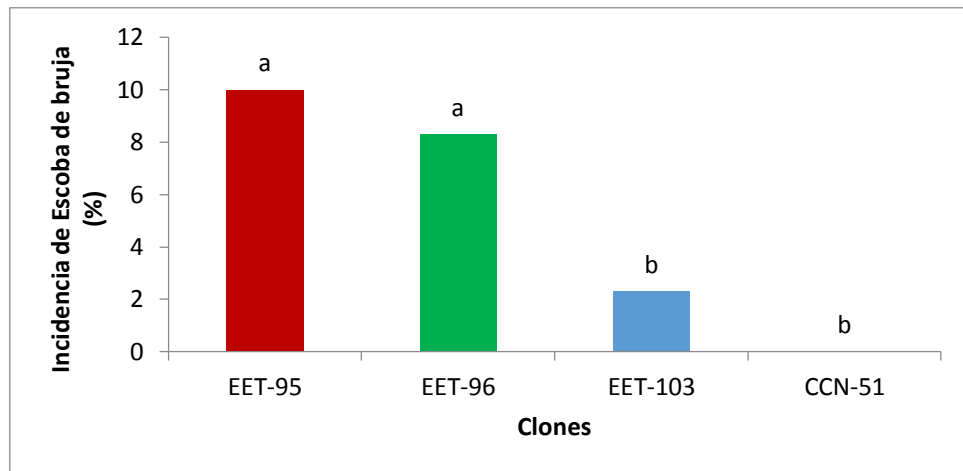


Figura 2. Incidencia de escoba de bruja de acuerdo a los clones en estudio. ANOVA SIMPLE. Prueba de Tukey  $p \leq 0,05$ .  $n=30$ . Error Típico= 2,00 .Letras desiguales muestran diferencias estadísticas.

Los resultados obtenidos en relación con la incidencia de *Moniliophthora roreri* (Cif and Par) Evans *et al.* (Figura 3), mostraron una tendencia diferente, ya que el clon EET-103 fue el que alcanzó mayor valor, diferenciándose de los demás clones en estudio, entre los clones EET-95 y EET-96 no se encontraron diferencias, estos a su vez tuvieron diferencias con respecto al CCN-51, que mostró el menor valor.

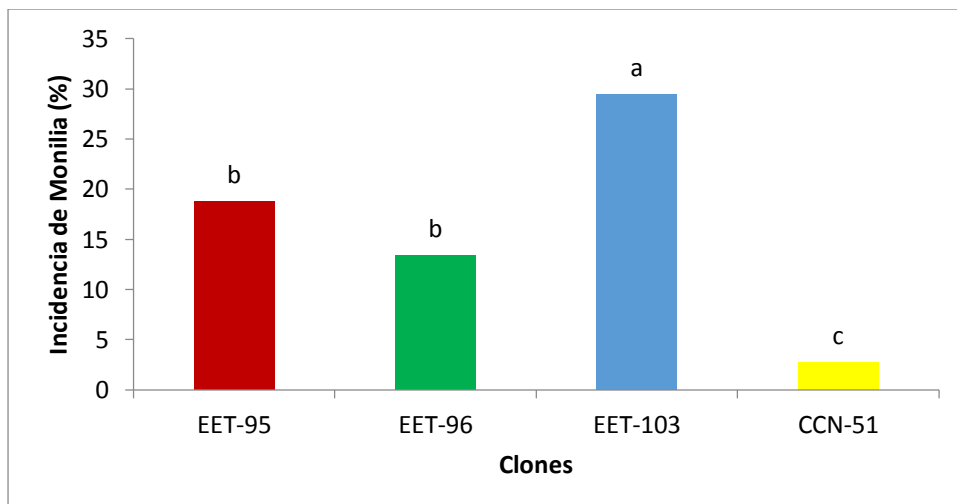


Figura 3. Incidencia de monilia de acuerdo a los clones en estudio. ANOVA SIMPLE. Prueba de Tukey  $p \leq 0,05$ .  $n=30$ . Error Típico= 2,75. Medias con letras desiguales muestran diferencias estadísticas.

Los resultados referidos a las dos enfermedades que incidieron en los clones en estudio, demostraron que el clon CCN-51 es más resistente al ataque, respecto a los clones promisorios. Por su parte el clon EET-103 que fue menos afectado por escoba de bruja, resultó ser el más atacado por la moniliasis, mientras que los clones EET-95 y EET-96 mostraron valores altos de incidencia de escoba de bruja e intermedios de moniliasis.

Según Sánchez *et al.*, (2012) entre las enfermedades más importantes del cacao se encuentran la moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*), escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa* Aime y Phillips-Mora), *Phytophthora palmivora* y en menor porcentaje el mal de machete (*Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht y Harrington), los resultados obtenidos en la presente investigación están en correspondencia con esta aseveración, pues la mayor incidencia fue de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, y *Moniliophthora perniciosa* Aime y Phillips-Mora, sin presentarse *Phytophthora* spp., ni *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht y Harrington.

Es necesario destacar que los clones se manifestaron de forma diferente respecto a la incidencia de las enfermedades, acorde al genotipo en estudio. Los resultados obtenidos coinciden con los criterios de Vasco (2008), el que refiere la tolerancia del clon CCN-51 a las enfermedades y a los menores niveles de escoba de bruja y moniliasis en el mismo.

Al comparar estos resultados con los de Vasco, (2008), en relación con el clon EET-103, quien señaló que este clon presenta incidencia intermedia de escoba de bruja, existe coincidencia; sin embargo, no sucede así con el clon EET-96 al cual se le detectaron bajos niveles de incidencia de esta enfermedad, pues la actual investigación para las condiciones del cantón Arosemena Tola demostró que tanto el EET-95 como el EET-96 presentaron las mayores afectaciones.

## CAPITULO V

### 5. CONCLUSIONES

- Como aspectos concluyentes se obtuvo que las bacterias fueron los microorganismos de mayor asociación a los clones en estudio, le siguieron actinomicetos y hongos, el clon CCN-51 con la mayor presencia de bacterias, los clones EET-96 y EET-103 tuvieron mayor presencia de actinomicetos y el EET-103 la mayor presencia de hongos
- La enfermedad escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa* Sthael Singer) afectó en menor medida a los clones EET-103 y CCN-51, mientras que la moniliasis [*Moniliophthora roreri* (Cif and Par) Evans *et al.*] mostró al clon EET-103 con la mayor incidencia de esta enfermedad y al clon CCN-51 con la menor.

### 6. RECOMENDACIONES

- Continuar la evaluación de los microorganismos de los clones promisorios, para obtener resultados finales en cuanto a rendimiento, incidencia de enfermedades.

## CAPITULO VI.

### 7. BIBLIOGRAFIA

1. ANECACAO. Asociación Nacional de Exportadores de Cacao, Ecuador. 2015. Cacao CCN-51. <http://www.anecacao.com/es/cacao-ccn-51>. Consultado 12/04/2016
2. Arévalo Gardini, E. 2012. Mejoramiento genético del cacao en el Perú <http://documents.mx/education/mejoramiento-genetico-del-cacao-en-el-peru.html>
3. Argüello, N. A., Moreno, R. L. 2014. Evaluación del potencial biofertilizantes de bacterias diazótrofes aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Acta Agronómica 63(3):238-245.
4. Arnold, A., Herre, E. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malváceas). Mycologia 95:388–398.
5. Baca, B., Soto, L., Pardo, M. (2000). Fijación Biológica del Nitrógeno. Elementos: Ciencia y cultura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla 7 (038): 43-49.
6. Blair, G. J., Lefroy, R. D. B. y Lisle, L. 1995. Soil carbon fractions based on their degree of oxidation, and the development of a carbon management index for agricultural systems. Australian Journal of Agricultural Research 46:1459-1466.
7. Brown, D. 2010. A mathematical model of the Gac/ Rsm quorum sensing network in *Pseudomonas fluorescens*. Biosystems. 101:200-212.
8. CATIE. 2011. Guía técnica de cacao. [Biblioteca.catie.ac.cr/descargas/Estrada\\_et\\_al\\_Guia\\_Tecnica\\_Cacao.pdf](http://Biblioteca.catie.ac.cr/descargas/Estrada_et_al_Guia_Tecnica_Cacao.pdf). Consultado 11/04/2016
9. CONABIO.2008. biodiversidad del cacao mejicano. [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf). Consultado 05/03/2016
10. Confitería Márquez. 2016 taxonomía e historia del cacao <http://www.Confiteriamarques.com/index.php/m,37/taxonomia-e-historia-del-cacao>. Consultado 12/04/2016
11. Cano. M. A. 2011. Interaccion de microorganismo beneficos en plantas: *Micorriza*, *Trichoderma* spp. *Pseudomonas* spp. Una Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 14(2):

- 15 – 31. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03.pdf>. Consultado 04/04/2016
12. Enríquez, G. 2010. Cacao orgánico: Guía para productores ecuatorianos. 2 ed. Quito. EC. 407 p.
13. ENGORMIX. 2004. Enfermedades del cacao. [www.engormix.com/cacao\\_enfermedades\\_\\_s\\_articulos\\_762\\_AGR](http://www.engormix.com/cacao_enfermedades__s_articulos_762_AGR)
14. Evans H. C. Colmes, K. A. Phillips and Willkinson, 1998. Pod rot of cacao caused by *Monillioptera roreri* and *Crinipellis perniosa* the final resting place for the rostrum pod rot.
15. De la Cruz M, Whitkus R, Gómez-Pompa A, Mota-Bravo L. 1995. Origins of cacao cultivation. *Nature* 375:542 –543. [http://www.botconsult.com/downloads/Hoja\\_Botanica\\_Cacao\\_2012.pdf](http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf) Consultado 26/03/2016
16. FAOSTAT.2015.<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. Consultado 7/05/2015.
17. Franco, C. M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Rev. Peruana Biología* 16(2):239-242.
18. Fundación Maquita Cusunchic, (M.C.C.H). 2003. Cultivo del Cacao.pp. 19-26
19. FUNDESYRAM, 2012 <http://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=3449> consultado (12/04/2016)
20. Gómez, M. T., Alkorta, I., Becerril, J. M., Epelde, L., Anza, M., Garbisu, C. 2012. Microbial Monitoring of the Recovery of Soil Quality During Heavy Metal Phytoremediation. *Water, Air & Soil Pollution* 223:3249-3262.
21. Gómez, 2007 *Microbiología de suelos en el Ecuador: situación actual de la investigación*.
22. Guamán, PC. 2007. Estudio de la factibilidad para el cultivo del cacao CCN-51 en la Parroquia Cristóbal Colón y su comercialización. ESPOL. Facultad de Ciencias Administrativas. 205 pp.
23. Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopath.* 96:190-194.
24. Hoitink, H. A. J., Madden, L. V., Dorrance, A. E. 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopath.* 96:186-189.
25. Info Agro. 2010. Manual de manejo y producción del cacaotero. <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENF01J71.pdf>. Consultado 03/04/2016

26. Johnson, E.; Bekele, F.; Brown, S.; Song, Q.; Zhang, D.; Meinhardt, L. y Schnell, R. 2009. Population structure and genetic diversity of the Trinitario cacao *Theobroma cacao* L. from Trinidad and Tobago. In: *Crop Sci.* 49: 564-572.
27. Lachenaud, P., Paulin, D., Ducamp, M., Thevenin, J. 2007. Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. *Scientia Horticulturae.* 113(4): 313-321.
28. MAGAP, III SNA SIGAGRO; INEC; ESPAC 2011, análisis sectorial del cacao. Disponible en <http://www.ecuaquimica.com.ec/cacao.pdf>.
29. MAG. 2006. Ecuador reconocido mundialmente por cacao fino de aroma. EC. [http://www.mag.gov.ec/docs/boletines/boletin\\_43\\_2005.pdf](http://www.mag.gov.ec/docs/boletines/boletin_43_2005.pdf). consultado 06/03/2016.
30. Mano, H., Morisaki, H. 2008. Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes and Environments JSME* 23:109-17.
31. Marschner, P., Timonen, S. 2005. Interactions between plant species and *mycorrhizal* colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology.* 28:23-36.
32. Martínez-Viveros, O., Jorquera M. A., Crowley D. E., Gajardo G., Mora M. L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by *Rhizobacteria*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10(3): 293-319.
33. Mejoramiento genético del cacao, 2012  
<http://es.slideshare.net/ucsur1/mejoramiento-gentico-del-cacao>
34. Barrera, L. 2011. Enfermedades del cacao  
<http://www.Monografias.com/trabajos88/enfermedades-del-cultivo-cacao/enfermedades-del-cultivo-cacao.shtml#enfermedaa#ixzz45eCCe3Hk>  
consultado 12/04/2016
35. Monografías. Alimentos medicinales, 2012.  
<http://www.Monografias.com/trabajos94/alimentosmedicinales/alimentosmedicinal-es2.shtml>. Consultado 20/04/2016.



36. Motamayor, J. C.; Risterucci, A. M.; Heath, M.; Lanaud, C. 2003. Cacao domestication II: Progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity* (2003), 91(3), 322-330. [http://www.botconsult.com/downloads/Hoja\\_Botanica\\_Cacao\\_2012.pdf](http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf) Consultado 26/03/2016
37. Osorio, 2013. microorganismos Asociados A La Rizosfera Del Cacao Theobroma cacao L en Condiciones De Bosque Humedo Premontano Bh-PM consultado 19/04/2016
38. Porras V.H. & Sánchez J. A, 1999. Enfermedades del cacao. FHIA / IICA. Honduras 32 p.
39. Powis, T., Cyphers, A., Gaikwad, N., Grivetti, I., Cheong, K. 2011. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 108(21): 8595-8600.
40. Pozuelo, J. 1991. Estudio de grupos funcionales de microorganismos edáficos en la rizosfera de *Alnus glutinosa* (L.) GAERTN. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense Madrid. Memoria para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.
41. Radjacommare, R.; Venkatesan, S.; Samiyappan, R. 2010. Biological control of phytopathogenic fungí of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology and Plant Protection*. 43(1):1-17.
42. Ramos, VE., Zúñiga, DD. 2008. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada* 7:2-8.
43. Rondón, JB., Cumana, LJ. 2005. Revisión Taxonómica del género *Theobroma* (*Sterculiaceae*) en Venezuela. *Acta Bot. Venez.* 28 (1): 113-134.
44. Rosero, J .2002. La Ventaja comparativa del cacao ecuatoriano.:<http://www.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Apuntes/ae20.pdf> .Consultado 18dic.2009.
45. Revista el Agro, 2013 <http://www.revistaelagro.com/2013/03/20/el-cacao-en-la-economia-del-ecuador/> consultado 11/04/2016
46. Revista Líderes .2013 .<http://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano-historia-empezo-siglo.html> Consultado 30/03/2016
47. Rosas, S.B.; Vanzini, G.; Carlier, E.; Pasluosta, C.; Pastor, N.; Rovera, M. 2009. Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biology & Biochemistry*. 41:1802-1806. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03.pdf>. Consultado 04/04/2016

48. Rusconi M, Conti A. 2010. *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research* 61(1):5-13. [http://www.botconsult.com/downloads/Hoja\\_Botanica\\_Cacao\\_2012.pdf](http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf)  
Consultado 26/03/2016
49. Saharan, B., Nehra, V. 2011. Plant growth promoting *Rhizobacteria*: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 2011: LSMR-21:1-30.
50. Sánchez, F. M., Garcés, F. F. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria* 3: 249 – 258.
51. Sánchez, F. L., Gamboa, E., Rincón, E. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. *Rev. Fac. Agron.* 20(2):188-194.
52. Schimann, H., Petit-Jean, C., Guitet, S., Reis, T., Domenach, A. M., Roggy, J. C. 2012. Microbial bioindicators of soil functioning after disturbance: The case of gold mining in tropical rainforests of French Guiana. *Ecological Indicators* 20:34-
53. Siddiqui, I. A.; Shaukat, S. S. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology & Biochemistry.* 35:1615-1623. <http://www.bdigital.unal.edu.co/39793/1/7211504.2014.pdf>.
54. Simard, S. W., Durall, D. M. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* 82:26.
55. Soto, A. H., Zavala, H. J., Pérez, M. J., Cargo, R. S. 2012. Estacionalidad de bacterias y hongos en la rizósfera de dos especies de plantas en el valle semiárido de Zapotitlán, Puebla. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* 3(6): 1231- 1245.
56. Van Loon, L. C, Bakker, P. A. 2006. Root-associated bacteria inducing systemic resistance. In: Gnanamanickam SS (ed.) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht, pp 269-316.
57. Vasco, M. A. 2008. Avances en el desarrollo de nuevas variedades de cacao en el Ecuador. Situación actual y perspectivas. INIAP. Santiago de Méndez. Ecuador. Pp. 60.
58. Vázquez, M. M.; Cesar, S.; Azcón, R.; Barea, J.M. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology.* 15:261-272. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03.pdf>. Consultado 04/04/2016

59. Villamil, C. J., Blanco, V. J., Viteri, R. 2012. Evaluación in vitro de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). Rev. Fac. Mal. Agr. Medellín 65(1):6305-6315.
60. Walters, D. R. 2009. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control.
61. Werner, D., Newton, W. E. 2005. Nitrogen fixation in agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. Springer-Verlag: Berlin.
62. Yazdani, M., Bahmanyar, M., Pirdashti, H., Esmaili, M. 2009. Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and Plant growth promoting *Rhizobacteria* (PGPR) on yield and yield components of corn (*Zea mays* L.), International Journal of Biological and Life Sciences 5(2): 80- 8



