



## Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51

### Characterization of *Phytophthora* spp. and application of rhizobacteria with biocontrol potential in black pod disease in *Theobroma cacao* variety CCN-51

Ángel Virgilio Cedeño Moreira<sup>1</sup> ; Ricardo Fernando Romero Meza<sup>1</sup> ; Javier Andrés Auhing Arcos<sup>1</sup> ; Antonio Francisco Mendoza León<sup>1</sup> ; Fernando Abasolo Pacheco<sup>1</sup> ; Hayron Fabricio Canchignia Martínez<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Microbiología Molecular-PGPR, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, EC. 120501, Los Ríos, Ecuador.

Received May 8, 2020. Accepted September 16, 2020.

#### Resumen

El objetivo del trabajo se enfocó en Caracterizar la biodiversidad de *Phytophthora* spp. y rizobacterias con potencial al biocontrol en la enfermedad de la mazorca negra en CCN-51. Nueve muestras vegetales con síntomas a la enfermedad se recolectaron de áreas productoras de cacao, evaluando sus características morfológicas e identificación por PCR. Se observan distintos morfotipos de colonias; algodonosos, borde regular y estrellado característico para *Phytophthora* spp. Los perfiles de electroforesis revelan un amplicón de 159 pb para *P. palmivora*, demostrando su distribución en las nueve zonas. Los ensayos en inhibición micelial *in vitro* a *P. palmivora*, determinaron niveles altos de antagonismo de 78 y 60% por enfrentamiento directo con las rizobacterias. Los resultados en bio-protección a CCN-51 por aplicaciones de *P. veronii*R4, *A. calcoaceticus* BMR2-12, *S. marcescens* PM3-8 y *P. protegens* CHA0 son efectivos al control de *P. palmivora* cepa (BL15), sin aplicación de bacterias se evidencia el avance de la enfermedad a nivel foliar a 15 y 19 dpi con (2,00E+05) zoosporas. La aplicación edáfica de las rizobacterias en CCN-51, se fusionó la capacidad promotora al crecimiento en plantas y supresión de la enfermedad por *P. palmivora*.

**Palabras clave:** *Phytophthora*; *Theobroma cacao*; rizobacteria; biocontrol; rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas; antagonista.

#### Abstract

The objective of the work focused on characterizing the biodiversity of *Phytophthora* spp. and rhizobacteria with potential for biocontrol in black pod disease in CCN-51. Nine plant samples with symptoms of the disease were collected from cocoa-producing areas, evaluating their morphological characteristics and identification by PCR. Different morphotypes of colonies are observed: cottony, regular and starry edge characteristic for *Phytophthora* spp. Electrophoresis profiles reveal an amplicon of 159 bp for *P. palmivora*, demonstrating its distribution in the nine zones. The tests on mycelial inhibition *in vitro* to *P. palmivora*, determined high levels of antagonism of 78 and 60% by direct confrontation with the rhizobacteria. These results in bio-protection to CCN-51 by applications of *P. veronii*R4, *A. calcoaceticus* BMR2-12, *S. marcescens* PM3-8 and *P. protegens* CHA0 are effective in the control of *P. palmivora* strain (BL15), without the application of bacteria the disease progress is evidenced at the level foliar at 15 and 19 dpi with (2.00E + 05) zoospores. The edaphic application of rhizobacteria in CCN-51, the promoter capacity to plant growth and suppression of *P. palmivora* disease.

**Keywords:** *Phytophthora*; *Theobroma cacao*; rhizobacteria; biocontrol; growth promoting rhizobacteria in plants; antagonist.

#### Cite this article:

Cedeño, A.V.; Romero, R.F.; Auhing, J.A.; Mendoza, A.F.; Abasolo, F.; Canchignia, H.F. 2020. Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51. Scientia Agropecuaria 11(4): 503-512.

\* Corresponding author  
E-mail: [hanchignia@uteq.edu.ec](mailto:hanchignia@uteq.edu.ec) (H.F. Canchignia).

## 1. Introducción

La presencia de *Phytophthora* en países tropicales corresponde en su mayoría a especies de: *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. megakarya*, *P. hevea*, y *P. palmivora* donde esta última es la más frecuente y agresiva (Bahia *et al.*, 2015). La similitud de las enfermedades, hace que su identificación a nivel patológico se ha poco confiable por las diversas especies, siendo importante la identificación correcta para el monitoreo y manejo del patógeno (dos Santos *et al.*, 2016). La técnica de PCR, ha permitido su identificación a nivel de especies por aplicación de cebadores específicos para definir (género y especie) por secuenciación al ADN/ARN (Ali *et al.*, 2016).

Al control de *Phytophthora* se emplean fungicidas a base de cobre (Liu *et al.*, 2020). Este fungicida aumenta el costo de producción a los ingresos por venta de cacao (Efombagn *et al.*, 2007). Aplicaciones continuas de fungicidas a base de sulfato de cobre contribuyen a la contaminación ambiental de (suelo y agua) (Cornu *et al.*, 2017). Además, incrementa el grado de tolerancia y su efectividad es variable durante la alta presión de la enfermedad en estación húmeda (Guest, 2006).

Alternativas naturales al control de *Phytophthora* se ha empleado extractos naturales de hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Lavandula* (lavanda), que reducen la germinación de las zoosporas de *P. palmivora* y *P. megakarya* (Widmer y Laurent, 2006). La aplicación de hongos endófitos de *Aspergillus flavipes* disminuye la incidencia de enfermedad por *Phytophthora* (El-Sayed y Ali, 2020). Ensayos *in vitro* con *Trichoderma* se ha verificado la presencia de compuestos orgánicos volátiles que inhiben el desarrollo micelial de *P. infestans* (Elsherbiny *et al.*, 2020). Estudios de aplicación en campo de *T. asperellum* PR11 determinaron las incidencias de *P. megakarya* del (47,1%), siendo necesario integrar otros métodos de control (Deberdt *et al.*, 2008).

Los suelos agrícolas disponen de alta diversidad microbiana y asociadas a su sistema radicular promueven un mecanismo en defensa a las plantas, destacándose la presencia de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (PGPR). Las rizobacterias secretan de compuestos volátiles como: cianuro de hidrogeno (HCN), proteasa (PR), antibióticos *pirrolnitrina* (Prn) y *ácido fenazina-1-carboxílico* (PCA), que protegen las especies vegetales de problemas fúngicos (Keswani *et al.*, 2020). El empleo de *Pseudomonas putida* R32 y *Pseudomonas chlororaphis* R47 productoras de HCN tienen actividad antagonica *in vitro* a *P.*

*infestans* (Anand *et al.*, 2020). Ensayos de aplicación de *Streptomyces cameroonensis* en cacao promueve el desarrollo de la planta y protegen a *P. megakarya* (Boudjeko *et al.*, 2017). Las PGPR en especies vegetales promueven la resistencia sistémica inducida (ISR) (Bukhat *et al.*, 2020). Se ha demostrado que ISR mediada por PGPR, suprime eficazmente varios patógenos fúngicos, por una activación rápida y coordinada de genes en defensa en plantas que normalmente expresan susceptibilidad al patógeno (Goswami *et al.*, 2016).

El trabajo se enmarca a la búsqueda de nuevas alternativas al control de problemas fitosanitarios del cacao bajo la aplicación de PGPR. Donde el inadecuado y excesivas aplicaciones de fungicidas al control de enfermedades en este cultivo, ha originado el incremento al desarrollo de tolerancia de los fitopatógenos y cambios de la biodiversidad de *Phytophthora* spp. de zonas productoras del Ecuador. El objetivo se basó en caracterizar la biodiversidad de *Phytophthora* spp. y rizobacterias con potencial al biocontrol en la enfermedad de la mazorca negra en CCN-51.

## 2. Materiales y métodos

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1,5 vía Quevedo – Santo Domingo. Sus coordenadas geográficas 01° 01’ de latitud Sur y 79° 47’ de longitud Occidental a 73 m.s.n.m.

### Muestreo y aislamiento de *Phytophthora* spp.

De plantaciones de cacao CNN51, se recolectaron mazorcas con síntomas a la enfermedad de *Phytophthora* spp., plantaciones de distintos pisos altitudinales. Se georreferenciado y codificaron de acuerdo con su procedencia (Tabla 1).

Al aislamiento de *Phytophthora* spp., se ajustó al protocolo descrito por Evans *et al.* (2013) con modificaciones. Las mazorcas con presencia de síntomas se sometieron a triples lavados con H<sub>2</sub>O estéril y alcohol 70%, recuperando de su epidermis segmentos de corcho de (0,2 cm<sup>2</sup>). Las muestras de tejido se inocularon en cajas Petri con agar V8, empleando la metodología establecida por Matos *et al.* (2011), e incubadas a 28 °C / 5 días, material biológico se codifico y adjuntó al Banco de Cepas del Laboratorio de Microbiología Molecular. El hongo se reactivó en medio agar V8 por un fotoperiodo de (12 h luz / 12 h oscuridad) / 5 días, para proceder a evaluar las variables: borde, forma,

elevación y presencia de disco concéntrico, de la colonia.

#### Determinación del tamaño de esporangios

El hongo se incubó en placas con agar V8 por un fotoperiodo de (12 h luz / 12 h oscuridad) / 3 días. Se extrajo 1 cm<sup>2</sup> del micelio y transferido a tubos (Eppendorf), para ser vortexeado con 1 mL H<sub>2</sub>O y 20 µL de azul de tripan. Recuperando 20 µL y ubicado en porta objeto para su visualización por el microscopio OLYMPUS (ocular 10X y objetivo 40X), registrando longitud del esporangio al punto de inserción del pedicelo hasta su papila en (µm) por el software IScapture.

#### Concentración de zoosporas

El hongo incubado en agar V8 se sometió al fotoperiodo antes mencionado, posteriormente se adicionó 10 mL de H<sub>2</sub>O a 4 °C / 10 min. Este material fue sometido a ondas de choque por ultrasonido (Diamond Back 3Q) / 10 min, para la liberación de zoosporas. Se extrajo 1 mL de la suspensión y ubicado en tubos (Eppendorf) con 20 µL de azul de tripan para su inmovilización. Obteniendo 10 µL de la solución para su visualización en cámara de Neubauer, para el conteo en cinco de los cuadrantes de 0,20 mm<sup>2</sup>, para determinar la concentración de zoosporas= (número de células x 10.000) / (número de cuadros).

#### Prueba de infectividad de *Phytophthora* spp.

De mazorcas sanas de CCN-51 con 18 semanas de edad, se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada y jabón. Siendo sumergidas en NaClO al 10% / 10 s. Este material se llevó a bolsas de polipropileno más papel absorbente con 10 mL de H<sub>2</sub>O para generar cámara húmeda. Se recuperó discos miceliales de (1cm Ø), con un promedio de (10.000 U) de esporangios. Los discos miceliales del hongo se ubicaron en los extremos de la mazorca y almacenadas

a temperatura ambiente por un fotoperiodo de (12 h luz / 12 h oscuridad) / 3 días, para registrar el avance de infección a 4, 5 y 6 días post-incubación (dpi), con un calibrador de Vernier y fotografía.

Los experimentos contenían cinco replicas y cada una con tres unidades experimentales. Los valores a cada condición están representados con la desviación estándar promedio individual (±), los tratamientos fueron sujetos al análisis de varianza por ANOVA, y separados por procedimiento de comparación múltiple de Tukey SD, al nivel de significancia de (p ≤ 0,05), empleando Statgraphics.

#### Caracterización molecular

Las cepas de *Phytophthora* spp. se cultivaron en medio V8 y se recuperó 1 g de tejido micelial para su pulverización con N<sub>2</sub> líquido, obteniendo entre 400 mg. Iniciando con la extracción de ADNg, siguiendo las intrusiones del fabricante por DNeasy Plant Mini Kit de (QIAGEN-Start EE.UU.), la muestra se diluyó en 50 µL del tampón TE (Ácido tris-etilendiaminotetraacético 10 mM y EDTA pH 8.2). El ADNg se visualizó en geles de agarosa al 0,9% teñidos en bromuro de etidio. La identificación por PCR para las especies de *Phytophthora*, se empleó los oligonucleótidos específicos reportados por Ali et al. (2016) (Tabla 2). Que amplifica la secuencia específica a la región ITS al gen del ARNr. La reacción de la PCR se realizó en 20 µL que contenía 4 µL Buffer (1X); 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (6 mM); 1 µL de DNTP's (0,2 mM); 1 µL / cada primer (0,2 mM); 0,2 µL de Taq pol (Promega®); 1 µL de ADN (60 ng/mL); 10,6 µL de H<sub>2</sub>O. Se empleó un termociclador (TECHME®) ajustando su perfil térmico a: 94 °C por 5 min; 35 ciclos a 94 °C por 1 min; 57 °C por 60 s; 72 °C por 1 min; extensión final de 72 °C por 10 min.

**Tabla 1**  
Distribución de recolección de muestras

Código	Piso altitudinal (m.s.n.m)	Coordenadas	Cantón	Temperatura °C		Humedad relativa %
				MAX	MIN	
BFS16	140	0°54'50.4"S 79°29'19.9"W	Buena fe	29,18	21,25	80,39
QFS12	74	1°00'01.8"S 79°29'34.0"W	Quevedo	29,46	21,33	77,53
ZFS11	32	1°26'13.4"S 79°28'12.1"W	Zapotal	27,33	20,10	80,48
VFS88	36	1°21'22.4"S 79°24'04.0"W	Ventanas	27,33	20,10	80,48
MFS45	74	1°05'04.5"S 79°29'54.5"W	Mocache	29,46	21,33	77,53
SFS65	299	0°24'18.0"S 79°18'10.0"W	Santo Domingo	28,17	21,33	85,22
BFS78	80	2°57'9"S 79°39'11"W	Balao	29,70	22,70	84,02
QNFS4	300	0°29'16.9"N 79°22'48.4"W	Quininde	28,6	21,3	93,98
LMFS12	220	0°58'29.5"S 79°12'04.8"W	La mana	26,6	18,9	93,99

**Tabla 2**Cebadores específicos para la identificación de *Phytophthora* spp.

Primer	Forward	Reverse	Tamaño del fragmento (bp)	Especie
PmegITS_F/R	TGCTCGAAAAGTAAAGCTTGC	AGGAAAAACGCCCAATAAGC	147	<i>P. megakarya</i>
PpalITS_F/R	AAAAGCGTGGCGTTGCT	AATCATACCACCACAGTGAA	159	<i>P. palmivora</i>
Pcap/citITS_F/R	TCGAAAAGCGTGGTGTTG	GCCACAGCAGGAAAAGCATA	157	<i>P. capsici</i> y <i>P. citrophthora</i>
PcitITS_F/R	GGGTGTTGCTTGGCATTTT	CACAAAAACGGCAAGACACTT	380	<i>P. citrophthora</i>

Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y teñidos en bromuro de etidio. Los fragmentos se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen®)

### Actividad antagónica del enfrentamiento bacteria-patógeno

Del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Microbiología de la UTEQ, se seleccionaron cuatro rizobacterias (Tabla 3). Las rizobacterias se incubaron a 120 r.p.m / 24 h a 27 °C en un agitador (Benchmark, Incu-Shaker), en 10 mL del medio líquido King B [(g/L): 20.0, peptona; 15 mL, glicerol; 1,5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O; 15, agar; agua destilada (pH 7.2)], suplementado con chloramphenicol (13 µg/mL), ampicilina (40 µg/mL) (King et al., 1954). Del cultivo bacteriano se recuperó 1 mL y ubicados en tubos (Eppendorf) para su centrifugación a 6000 r.p.m. / 5 min. Se descartó el sobrenadante para recuperar las bacterianas y re-suspenderlas en un mismo volumen de H<sub>2</sub>O. Al enfrentamiento antagónico se seleccionó la *Phytophthora* de mayor agresividad con discos miceliales de (1 cm Ø) y ubicados al centro de la placa Petri con PDA (papa dextrosa agar). Simultáneamente se inoculó 5 µL de la bacteria en los 4 extremos de la caja con el patógeno a 28 °C para su evaluación.

### Actividad antagónica del enfrentamiento extractos celulares-patógeno

Las rizobacterias incubadas King B líquido con 50 mL a 120 r.p.m / 48 h a 27 °C, se recuperó 15 mL del cultivo bacteriano y centrifugado a 6000 r.p.m / 5 min (Centrifuge 800-B), proceso se realizó en triplicado para recuperar el sobrenadante. Los extractos se filtraron en Nalgene Syringe de 0,2 µm, sometidos a 15 min / 90 °C en (Memmert WNB 22) y 15 min / - 40 °C en el congelador (Eppendorf-Innova U725), para ser almacenados a 4 °C. Para los ensayos antagónicos se añadieron 0,2 mL de los extractos en placas con PDA y posteriormente se ubicó un disco micelial de (1 cm Ø) al centro de la misma a 28 °C para su evaluación. Se evaluó el porcentaje de antagónico a inhibición micelial por bacterias y los extractos al séptimo dpi, desde el borde del disco

micelial hasta el crecimiento del hongo empleando la fórmula: % inhibición = (crecimiento del control – crecimiento del tratamiento / crecimiento del control) x 100. Se realizó seis replicas y cada una con cuatro unidades experimentales. Los valores a cada condición están representados con la desviación estándar promedio individual (±), los tratamientos fueron sujetos al análisis de varianza por ANOVA, y separados por procedimiento de comparación múltiple de Tukey SD, al nivel de significancia de (p ≤ 0,05), empleando Statgraphics.

### Inoculación y protección de PGPR a plántulas de cacao CCN-51 en presencia de *Phytophthora* spp.

Las semillas de cacao CCN-51 se desinfectaron con NaClO al 5% por 3 min y sumergidas en H<sub>2</sub>O estéril para su escarificación. Se ubicaron en contenedores plásticos con papel absorbente con 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril a 28 °C / 96 h para su germinación. Las bacterias se incubaron en 50 mL de King B líquido a 120 r.p.m a 27 °C / 24 h, hasta alcanzar la concentración de 1x10<sup>9</sup> (UFC x mL) y centrifugadas a 6.000 r.p.m / 5 min, para la recuperación de células y re-suspendidas en un mismo volumen de H<sub>2</sub>O. Con 10 µL de la suspensión celular se inoculó en la base del hipocótilo de cada semilla pre-germinada y ubicadas en contenedores plásticos con 140 g del sustrato con (50 / 50%) de suelo franco limoso y turba (Novarbo seedling, black C1B), esterilizado por autoclave a 121 °C / 20 min. Se realizaron aplicaciones de 1 mL de suspensión celular individual de (R4, PM3-8, BMR2-12 y CHA0) al suelo por (15, 30 y 45 días). Se mantuvieron en invernadero con humedad relativa al 75% a 28 ± 2 °C, por un fotoperiodo de (12 h luz / 12 h oscuridad) y plántulas control sin inoculante bacteriano. A los 46 dpi se añadió 20 µL de zoosporas a una concentración de (2,00E+05) al ápice de las plántulas de CCN-51, de la *Phytophthora* spp. de mayor agresividad. Las plántulas se trasladaron a cámara húmeda para asegurar la supervivencia de las zoosporas. A los 65 dpi se evaluó su patogenicidad, donde se determinó peso fresco de (hojas y raíz), peso del brote se realizó un corte por debajo de la inserción de los cotiledones a (10 cm) y retirando la masa foliar.

Tabla 3

Rizobacterias productoras de metabolitos secundarios

Organismo	Cepas	Metabolitos antagonicos				Sideróforos	Producción AIA
		PR	HCN	Prn	DAPG		
1 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	BMR2-12			+		+	
2 <i>Serratia marcescens</i>	PM3-8	+	+			+	
3 <i>Pseudomonas protegens</i>	CHA0	+	+	+	+	+	
4 <i>Pseudomonas veronii</i>	R4	+		+		+	

Productoras de metabolitos secundarios: PR-Proteasa, HCN-cianuro de hidrogeno, Prn-pirrolnitrina, 2,4-DAPG *diacetilfloroglucinol*, sideróforos, AIA-ácido indol-3-acético (Chávez et al., 2018).

El Ø del hipocótilo se evaluó por debajo de la inserción de los cotiledones y el número de hojas funcionales. Los tratamientos contenían cinco replicas y cada una con cuatro unidades experimentales. Los valores a cada condición están representados con la desviación estándar promedio individual ( $\pm$ ), los tratamientos fueron sujetos al análisis de varianza por ANOVA, y separados por procedimiento de comparación múltiple de Tukey SD, al nivel de significancia de ( $p \leq 0,05$ ), empleando Statgraphics.

### 3. Resultados y discusión

#### Caracterización morfológica de *Phytophthora* spp.

La caracterización morfológica reveló considerables variaciones en todos los parámetros analizados, al género *Phytophthora* spp. se pueden dilucidar distintos morfotipos de colonia del hongo cultivados en agar V8, que se clasifican en cuatro grupos morfológicos (1 y 3) (Figura 1a). Esto concuerda con Appiah et al. (2003), la presencia de patrones de colonias algodonosos, borde regular y estrellado característico para *Phytophthora* spp. Las variaciones morfológicas están influenciadas a su mecanismo de patogenicidad para sus pisos altitudinales, donde se cultiva el cacao en Ecuador. Esto coincide con Maora et al. (2016), que verifican variaciones morfológicas de *Phytophthora* spp. en una misma plantación de cacao. Estas diferencias en colonias de *Phytophthora* spp., están reguladas a las variantes del fenotipo del hongo por su capacidad de adaptación y co-evolución con el cultivo del cacao.

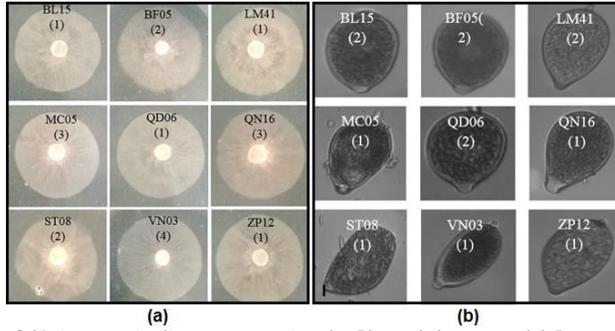
Al visualizar los esporangios de *Phytophthora* spp., no hay variaciones en las papilas y con ausencia de pedicelo. La forma de los esporangios reúne dos grandes características: grupo 1 elipsoide y grupo 2 ovoide (Figura 1b). En longitud de esporangios se evidencia variaciones entre los nueve ecotipos, con rangos de 27,54 y 52,74  $\mu\text{m}$  (Figura 2). Estas variaciones en dimensiones de los esporangios se ha reportado dentro de una misma localidad o región, sugiriendo una población continua que afecta el cultivo de cacao (Maora et al., 2016).

Las concentraciones de zoosporas varían entre las cepas de *Phytophthora* spp., observando el mayor contenido de 1918750 zoosporas/mL para la cepa BL15. Los altos contenidos de zoosporas demuestran su alto mecanismo de infección a tejidos vegetales y su desimanación en plantaciones de cacao (Figura 2). Estos ecotipos de *Phytophthora* spp., no guardan relación entre mayor longitud del esporangio el aumento de concentración de zoosporas cepa BF05 (esporangios de 52,74  $\mu\text{m}$  - 1337500 /mL zoosporas), con la cepa BL15 (esporangios de 47,67  $\mu\text{m}$  - 1918750 /mL zoosporas). Sus zoosporas se movilizan por el agua en busca de tejidos (semillas, raíces, tallos u hojas), donde se asientan y enquistan (Hon, 2018; West et al., 2003).

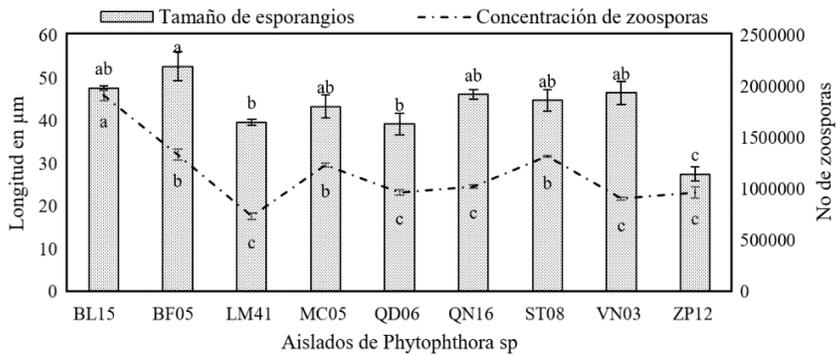
#### Progresión de virulencia por *Phytophthora* spp. en mazorcas de CCN-51

El grado de infección por *Phytophthora* spp. en mazorcas de CCN-51 mostraron ser virulentas con índices de necrosis entre 136 y 195 (mm) a 4 dpi. Los ecotipos recolectados son de alta virulencia con necrosis en mazorcas entre 406 y 497 (mm) a los 6 dpi (Figura 3a). Las condiciones de infección en mazorcas se ejecutaron en condiciones con alta humedad, esto facilitó el avance de la enfermedad para cubrir la totalidad de la mazorca en 10 días. Donde el borde de sus lesiones avanzó con un promedio 12 mm por cada 24 horas. Las especies de *Phytophthora* se consideran hemibiotrófico en su primera etapa de infección (Ali et al., 2017), siendo esto oportuno para este patógeno donde cambia a necrotrófico una vez establecida.

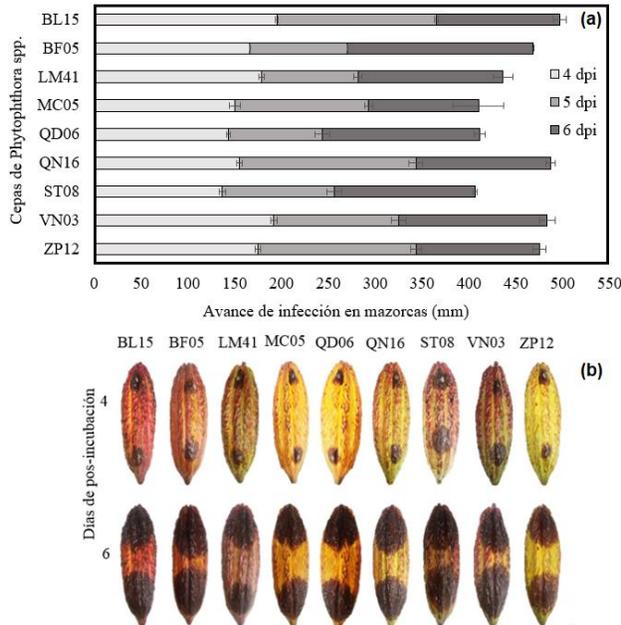
Las cepas de *Phytophthora* spp. poseen un alto índice en producción de zoosporas infectivas entre 1918750 y 737500, que favorecen al desarrollo de la necrosis (Figura 3b). La infección por *Phytophthora* spp., está regulado a la formación rápida del tubo germinal de las zoosporas, que penetra al huésped directamente a través de su apresorio causando la diseminación de la enfermedad (Ali et al., 2016). En estos ensayos de agresividad en mazorcas de cacao CCN-51 no se ejecutaron heridas para facilitar la infección por el patógeno, deduciendo que la formación del apresorio estableció una interacción exitosa con el huésped (Hardham, 2001).



**Figura 1.** Diferencias morfológicas a micelio y esporangios de *Phytophthora* spp. (a) Desarrollo micelial del hongo en agar V8 por cinco dpi, grupo 1 (forma estrellada, sin elevación, borde regular, algodonoso y disco concéntrico), grupo 2 (forma estrellada, sin elevación, borde irregular, algodonoso y sin disco concéntrico), grupo 3 (forma aracnoides, bordes regulares, algodonoso, sin elevación, no presentan disco concéntrico), grupo 4 (forma estrellada, borde regular, sin elevación y sin disco concéntrico). (b) Visualización morfológica de los esporangios cultivado en agar V8 por tres dpi.



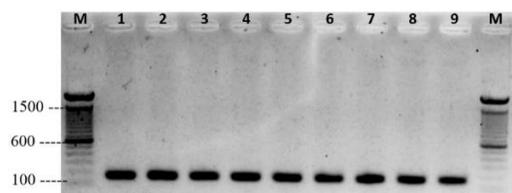
**Figura 2.** Diferencias en longitud de esporangios y concentración de zoosporas entre *Phytophthora* spp. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican la DE individual para tratamiento ( $\pm$ ).



**Figura 3.** Avance de infección de ecotipos de *Phytophthora* spp. en mazorcas de cacao CCN-51. (a) Respuesta diferencial de necrosis de las nueve cepas de *Phytophthora* spp. a 4, 5 y 6 dpi. Las barras indican el DE individual para tratamiento ( $\pm$ ). Con diferencias significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. (b) Avance de infección con la formación de necrosis a 4 y 6 dpi por inoculación de discos miceliales de *Phytophthora* spp., a los extremos de la mazorca.

### Identificación de especies de *Phytophthora* spp. específica por PCR

Los perfiles de electroforesis revelaron un amplicón único de 159 pb que concierne a *P. palmivora*, para las nueve cepas de los cultivos de cacao en Ecuador (Figura 4), pero con diferencias en sus comportamientos fisiológicos y morfológicos. Corroborando con Ali et al. (2016), donde el amplicón de 159 para *P. palmivora*. Además, se realizó la reacción de PCR, con los partidores (PmegITS\_F/R; Pcap/citITS\_F/R; PcitITS F/R), donde no generó los productos de amplificación para: *P. megakarya*, *P. capsici* y *P. citrophthora*. En este trabajo no se descarta la presencia de otras especies de *Phytophthora* spp., al poder parasitar distintas partes del tejido: foliar y radicular. De forma especial *P. palmivora* y *P. megakarya* son capaces de poder parasitar el mismo huésped en toda la planta, por su trayectoria evolutiva (Ali et al., 2017).



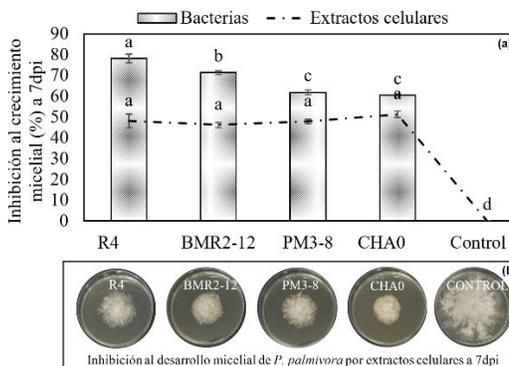
**Figura 4.** Perfil de electroforesis a la amplificación por PCR de *P. palmivora* por el primer (PpalITS\_F/R). Del carril 1 a 9 corresponde al ADNg de las nueve cepas de *Phytophthora*; M (Lader 100 pb Invitrogen).

### Las PGPR en inhibición al desarrollo micelial de *P. palmivora* in vitro

Los ensayos *in vitro* (bacteria-hongo) en inhibición al desarrollo micelial de *P. palmivora*, se verificó niveles de antagonismo entre (78 y 60%) por: R4, BMR2-12, PM3-8 y CHA0 (Figura 4a). La búsqueda de bacterias antagonistas inicia con pruebas *in vitro*, donde *Pseudomonas chlororaphis* CP07 capaz de sintetizar: (HCN, proteasa, fenazina), inhibe el desarrollo micelial *in vitro* del 50% a *P. palmivora* (Acebo et al., 2015). Donde el efecto inhibitorio *in vitro* por las PGPR a *P. palmivora* está conferido por la producción de metabolitos antagonistas antes descrito (Tabla 3). La producción de enzimas como: (proteasa y quitinasa) por rizobacterias no tiene efecto alguno sobre *P. palmivora*, donde la pared celular de los oomicetos está compuesto por celulosa ( $\beta$ -1,4-glucanos) y los ascomicetos contienen quitina (West et al., 2003).

Los ensayos *in vitro* del (sobrenadante-hongo) de R4, BMR2-12, PM3-8 y CHA0, inhibieron el desarrollo micelial entre (46 al 51%) a *P. palmivora* (Figura 4a). Resultados de sobrenadantes obtenidos de

*Pseudomonas chlororaphis* R4 detienen el desarrollo micelial de *P. infestans* y al ser transferidas a placas frescas no permite que el oomiceto reanude su crecimiento (Hunziker et al., 2015). *P. protegens* CHA0 se caracterizan por ser cianogénicas, donde la funcionalidad del HCN tiene una toxicidad de amplio espectro para hongos, causando la sensibilidad en las hemoproteínas en células eucariotas (Zdor, 2014). Curiosamente *P. veronii* R4 incapaz de producir HCN, sugiriendo la presencia de otros componentes bioactivos volátiles. Donde la biosíntesis del antibiótico Prn por las cepas BMR2-12, CHA0 y R4, se considera como otro factor de inhibición micelial. Este antibiótico Prn se dirige a las mitocondrias siendo el objetivo para este biopesticida (Anderson y Kim, 2018). Además, Prn participa en alterar la señalización al estrés osmótico en hongos (Okada et al., 2005).



**Figura 5.** Ensayos antagonistas de PGPR a *P. palmivora*. (a) Inhibición al desarrollo micelial del hongo por bacteria y extractos celulares a 7 dpi. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el DE individual para tratamiento ( $\pm$ ). (b) Inhibición antagonista por los extractos celulares en reducción del crecimiento micelial de la colonia.

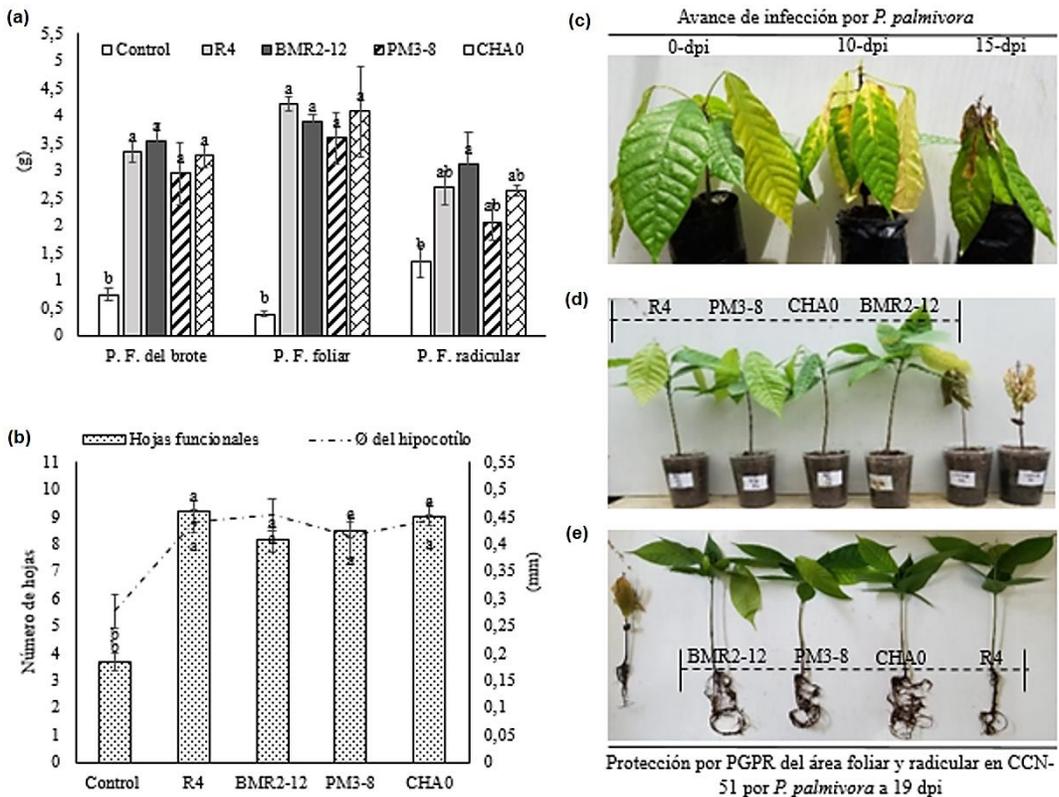
El extracto celular de *P. protegens* CHA0 desplegó el 51% de inhibición a *P. palmivora* por la producción del 2,4-DAPG (Figura 4a). Este antibiótico desorganiza las hifas de *Pythium ultimum*, alterando la membrana plasmática y desintegración del contenido celular (Souza et al., 2003). El HCN y 2,4-DAPG contribuyen a un mayor efecto antagonístico por CHA0, esto se corrobora por Paulin et al. (2019), donde estos dos metabolitos presentes en *P. brassicacearum* LBUM300 reduce significativamente a *Clavibacter michiganensis*. Sugieren que los extractos celulares de R4, BMR2-12, PM3-8 y CHA0 contienen una diversidad de metabolitos antagonísticos que reducen el desarrollo micelial de *P. palmivora* *in vitro*.

**Las PGPR promueven el desarrollo y protección a plántulas de CCN-51 en presencia de *P. palmivora*.**

Las aplicaciones individuales de: (R4, BMR2-12, PM3-8 Y CHA0) contribuyeron al incremento en peso fresco del brote, foliar y radicular. A diferencia de las plantas no tratadas se verifica la disminución del peso fresco de los tejidos evaluados en CCN-51 a 19 dpi en presencia de *P. palmivora* cepa (BL15) (Figura 6a). La protección e incremento del tejido vegetal en CCN-51 por aplicación de las PGPR, se relacionó a su capacidad simbiótica bacteria-planta. Las bacterias colonizan el tejido radicular captando las pequeñas cantidades de Trp presente en las raicillas y aumentando la biosíntesis de AIA (Kravchenko et al., 2004). Donde aplicaciones *in vitro* de *Burkholderia phytofirmans* PsJN en *Vitis vinifera* L.cv. *Chardonnay*, incrementaron el tejido radicular por su colonización endofítica (Barka et al., 2006).

Las rizobacterias en CCN51 promovieron el

desarrollo de (8 a 9 hojas) funcionales, con incremento al Ø del hipocótilo entre (0,41 a 0,44 mm), inhibiendo la marchitez por *P. palmivora* a 19 dpi (Figura 6b). Las plantas no tratadas con PGPR se evidencian el grado de infección en el tejido foliar a 10 y 15 dpi por *P. palmivora* cepa (BL15) (Figura 6c). Las PGPR ejercen un incremento de la masa radicular y foliar por aplicaciones edáficas de *P. brassicacearum* LBUM en tomate, y reduciendo la marchitez por *Clavibacter michiganensis* (Paulin et al., 2019). Sugiriendo que las rizobacterias en CCN-51, se fusionó la capacidad promotora en plantas y la supresión de *P. palmivora* (Figura 6d y e). En aplicaciones foliares de *P. protegenes* 44R-P8 en papa hacen posible reducir la incidencia de *P. infestans* por biosíntesis del 2,4-DAPG (Caulier et al., 2018). Las bacterias ejercieron cambios positivos morfológicos y fisiológicos en CCN-51, estas habilidades de las PGPR están regulados por la producción de: ácido indol-acético, citoquininas y activación de mecanismo en defensa (Singh et al., 2017).



**Figura 6.** Influencia del tratamiento edáfico en CCN-51 con PGPR al biocontrol de *P. palmivora*. a) Incremento en peso fresco de la planta. b) Número de hojas funcionales y Ø del hipocótilo. c) Avance de la enfermedad en plantas sin inoculo bacteriano a los 15 dpi., con *P. palmivora*. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ( $\pm$ ). d y e) Protección del tejido foliar y radicular al hongo por aplicación de PGPR e inducción al desarrollo en plantas 19 dpi.

En este trabajo, no se estableció un contacto directo bacteria-patógeno, por lo tanto, el efecto protector a CCN-51 está mediado por la capacidad endofítica de las PGPR y activación de genes de resistencia por ISR, impidiendo el avance de la enfermedad. Esto se corrobora con Miguelez *et al.* (2019), por aplicaciones edáficas de *P. chlororaphis* cepa CP07 en cacao reduce la incidencia de *P. palmivora*. Esto guarda relación con aplicaciones edáficas en *T. cacao* con *Pseudomonas chlororaphis* CP24 productora de Prn, reduce la incidencia de *P. palmivora* (Acebo *et al.*, 2015).

Las PGPR en este trabajo tienen la capacidad de producir sideróforos, estos están asociados en activar el mecanismo en defensa para ISR y promover el desarrollo en plantas (Verbon *et al.*, 2017). Los sideróforos de *P. putida* WCS358 activan ISR en tomate a la infección por *Botrytis cinerea* (Meziane *et al.*, 2005). Los metabolitos bacterianos se consideran inductores de ISR en plantas y pueden conferir un efecto protector contra un amplio espectro de enfermedades (Meena, 2014). Las bacterias activarían el mecanismo en defensa por ISR en CCN-51 al colonizar el sistema radicular. Esto sensibilizan a nivel sistémico las partes distales de la planta, a través de un mecanismo de defensa dependiente al ácido jasónico (JA) y etileno (ET) (Ton *et al.*, 2002). Esto proporciona una capacidad rápida y eficiente a una infección, que solo se activaría en presencia del patógeno (Verhagen *et al.*, 2004).

Las bacterias *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12 y *Serratia marcescens* PM 3-8 provenientes de la rizósfera de cultivos endémicos de Musáceas del Ecuador y *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 impidieron el avance de la enfermedad por infección de *P. palmivora* en cacao CCN-51, clon de origen ecuatoriano que se destaca por ser un cultivar precoz y alta productividad. Donde la capacidad endofítica de las rizobacterias hace posible mejorar la potencialidad del CCN-51, favoreciendo la arquitectura morfológica y activación al mecanismo en defensa a *P. palmivora*. La adaptabilidad de las bacterias lo faculta para su potencial empleo como agente bio-controlador a la podredumbre de la mazorca negra al sector cacaotero y mejorando la sostenibilidad en la producción del cacao.

#### 4. Conclusiones

*P. palmivora* está presente en plantaciones de CCN-51 con una gran diversidad dependiendo a sus pisos altitudinales donde se viene cultivando en Ecuador, observando

cambios en el patógeno en su morfología y patogenicidad que han permitido desarrollarse de las nueve zonas evaluadas. El proceso de inhibición antagonista *in vitro* por *A. calcoaceticus* BMR2-12, *S. marcescens* PM 3-8, *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 alcanzaron promedios superiores al 70% destacándose su actividad anti-fúngica. El proceso de interacción bacteria-planta-patógeno hace posible la inhibición de la enfermedad por la capacidad endofítica de las rizobacterias mejorando la potencialidad del CCN-51, estas rizobacterias se proyectan a su aplicación individual o en consorcios para determinar su actividad bio-controladora en campo.

#### Agradecimientos

La ejecución del proyecto se realizó por financiamiento a convocatorias FOCICYT-2019 (Seguimiento a caracterización de población de *Phytophthora* spp. y *Lasiodiplodia theobromae* asociada a cacao en el Litoral y la aplicación de rizobacterias biocontroladoras), otorgado por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

#### ORCID

Á.V. Cedeño  <http://orcid.org/0000-0002-6564-5569>  
 R.F. Romero  <http://orcid.org/0000-0002-3915-3309>  
 J.A. Auhing  <https://orcid.org/0000-0003-4537-7234>  
 A.F. Mendoza  <http://orcid.org/0000-0001-5103-0152>  
 F. Abasolo  <http://orcid.org/0000-0003-2268-7432>  
 H.F. Canchignia  <http://orcid.org/0000-0003-1195-5446>

#### Referencias bibliográficas

- Acebo, Y.; Hernández, A.; Vandeputte, O.; *et al.* 2015. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* from *Theobroma cacao* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora* (Butler). *Journal of Applied Microbiology* 119: 1112–1126.
- Ali, S.; Amoako, I.; Bailey, R.; *et al.* 2016. PCR-based identification of cacao black pod causal agents and identification of biological factors possibly contributing to *Phytophthora megakarya*'s field dominance in West Africa. *Plant Pathology* 65: 1095–1108.
- Ali, S.; Shao, J.; Lary, D.; *et al.* 2017. *Phytophthora megakarya* and *Phytophthora palmivora*, closely related causal agents of cacao black pod rot, underwent increases in genome sizes and gene numbers by different mechanisms. *Genome Biology and Evolution* 2: 1–22.
- Anand, A.; Chinchilla, D.; Tan, C.; *et al.* 2020. Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of *Pseudomonas* strains against *Phytophthora infestans*. *Microorganisms* 8: 1–10.
- Anderson, A.; Kim, Y. 2018. Biopesticides produced by plant-probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. *Crop Protection* 105: 62–69.
- Appiah, A.; Flood, J.; Bridge, P.; *et al.* 2003. Inter and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Pathology* 52: 168–180.
- Bahia, R.; Aguilar, C.; Luz, E.; *et al.* 2015. Resistance to black pod disease in a segregating cacao tree population. *Tropical Plant Pathology* 40: 13–18.
- Barka, E.; Nowak, J.; Clément. 2006. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7246–7252.

- Boudjeko, T.; Mouafo, R.; Zitouni, M.; *et al.* 2017. *Streptomyces cameroonensis* sp. nov., a geldanamycin producer that promotes *Theobroma cacao* growth. *Microbes and Environments* 32.: 24–31.
- Bukhat, S.; Imran, A.; Javaid, S.; *et al.* 2020. Communication of plants with microbial world: Exploring the regulatory networks for PGPR mediated defense signaling. *Microbiological Research* 238: 1-50.
- Caulier, S.; Gillis, A.; Colau, G.; *et al.* 2018. Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens. *Frontiers Microbiology* 9: 1–15.
- Chávez, K.; Guato, J.; Peñafiel, M.; *et al.* 2018. Bacterias fluorescentes productoras de metabolitos antagónicos de cultivares nativos de Musa sp. y su diversidad filogenética al gen ARNr 16S. *Agricultural Sciences* 11: 17–29.
- Cornu, J.; Huguenot, D.; Jézéquel, K.; *et al.* 2017. Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 1-12.
- Deberdt, P.; Mfegue, C.; Tondje, P.; *et al.* 2008. Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. *Biological Control* 44: 149–159.
- dos Santos, F.; Tata, A.; Belaz, K.; *et al.* 2016. Major phytopathogens and strains from cocoa (*Theobroma cacao* L.) are differentiated by MALDI-MS lipid and/or peptide protein profiles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409: 1765–1777.
- Efombagn, M.; Nyassé, S.; Sounigo, O.; *et al.* 2007. Participatory cocoa (*Theobroma cacao*) selection in Cameroon: *Phytophthora* pod rot resistant accessions identified in farmers fields. *Crop Protection* 26: 1467–1473.
- El-Sayed, A.; Ali, G. 2020. *Aspergillus flavipes* is a novel efficient biocontrol agent of *Phytophthora parasitica*. *Biological Control* 140: 1–11.
- Elsherbiny, E.; Amin, B.; Aleem, B.; *et al.* 2020. *Trichoderma* volatile organic compounds as a biofumigation tool against late blight pathogen *Phytophthora infestans* in postharvest *Potato* tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68: 8163–8171.
- Evans, H.; Bezerra, J.; Barreto, R. 2013. Of mushrooms and chocolate trees: aetiology and phylogeny of witches broom and frosty pod diseases of cocoa. *Plant Pathology* 7: 728–740.
- Goswami, D.; Dhandhukia, P.; Thakker, J. 2016. Expanding the Horizons for the use of *Paenibacillus* species as PGPR for sustainable agriculture. In *Bacilli and Agrobiotechnology* 4: 281–307.
- Guest, D. 2006. Black Pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *The American Phytopathological Society* 2: 1650–1653.
- Hardham, A. 2001. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. *Australasian Plant Pathology* 30: 91–98.
- Hon, H. 2018. The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. *Journal of Bacteriology & Mycology* 6: 1–7.
- Hunziker, L.; Bönisch, D.; Groenhagen, U.; *et al.* 2015. *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 821–830.
- Keswani, C.; Singh, H.; Garcia, C.; *et al.* 2020. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104: 1013–1034.
- King, E.; Ward, M.; Raney, D. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301–307.
- Kravchenko, L.; Azarova, T.; Makarova, N.; *et al.* 2004. The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phyto-stimulating activity of rhizobacteria. *Microbiology* 73: 156–158.
- Liu, H.; Xue, X.; Yu, Y.; *et al.* 2020. Copper ions suppress abscisic acid biosynthesis to enhance defence against *Phytophthora infestans* in potato. *Molecular Plant Pathology* 21: 636–651.
- Maora, J., Liew, E., Guest, D. 2016. Limited morphological, physiological and genetic diversity of *Phytophthora palmivora* from cocoa in Papua New Guinea. *Plant Pathology* 3: 1–7.
- Matos, Y.; Peteira, B.; Matos, G.; *et al.* 2011. Prueba de apareamiento en 90 aislamientos de *Phytophthora*, provenientes de frutos enfermos de cacao (*Theobroma cacao* Lin.) en el municipio de Baracoa. *Revista de Protección Vegetal* 26: 198–199.
- Meena, B. 2014. Biological control of pest and diseases using fluorescent *Pseudomonads*. K. Sahayaraj (Ed.). *Basic and applied aspects of biopesticides*. 7: 187–322.
- Meziane, H.; Van der Sluis, I.; Van Loon, L.; *et al.* 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing. *Molecular Plant Pathology* 6: 177–185.
- Migueluez, Y.; Acebo, Y.; Jaziri, M.; *et al.* 2019. *Pseudomonas chlororaphis* CP07 strain reduces disease severity caused by *Phytophthora palmivora* in genotypes of *Theobroma cacao*. *European Journal of Plant Pathology* 3: 1–11.
- Okada, A.; Banno, S.; Ichiishi, A.; *et al.* 2005. Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. *Pesticide Science Society of Japan* 30: 378–383.
- Paulin, M.; Novinsack, A.; Lanteigne, C.; *et al.* 2019. Interaction between DAPG and HCN producing *Pseudomonas brassicacearum* LBUM300 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the rhizosphere of tomato. *American Society for Microbiology* 28: 1–27.
- Singh, H.; Jaiswal, V.; Singh, S.; *et al.* 2017. Antagonistic compounds producing plant growth promoting rhizobacteria: A tool for management of plant disease. *Journal of Advances in Microbiology* 3: 1–12.
- Souza, J.; Arnould, C.; Deulvot, C.; *et al.* 2003. Effect of 2,4-Diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *The American Phytopathological Society* 93: 966–975.
- Ton, J.; Pelt, J.; Loon, L.; *et al.* 2002. Differential effectiveness of salicylate dependent and Jasmonate/Ethylene dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *The American Phytopathological Society* 15: 27–34.
- Verbon, E.; Trapet, P.; Stringlis, I.; *et al.* 2017. Iron and Immunity. *Annual Review of Phytopathology* 1: 1–21.
- Verhagen, B.; Glazebrook, J.; Zhu, T.; *et al.* 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The American Phytopathological Society* 17: 895–908.
- West, P.; Appiah, A.; Gow, N. 2003. Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 99–113.
- Widmer, T.; Laurent, N. 2006. Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*. *European Journal of Plant Pathology* 115: 377–388.
- Zdor, R. 2014. Bacterial cyanogenesis: impact on biotic interactions. *Journal of Applied Microbiology* 5: 267–274.