

Caracterización Bioquímica de Rizobacterias Endófitas con Actividad Biocontroladora Contra *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae* Biochemical Characterization of Endophytic Rhizobacteria with Biocontrol Activity Against *Phytophthora palmivora* and *Lasiodiplodia theobromae*

Hayron Fabricio Canchignia-Martínez¹ , Luis Fernando Vera-Benites¹ ,
Dayanara Nicolle Tapia-Quintana¹ , Ángel Virgilio Cedeño-Moreira² ,
Erick García-Intriago³ y Cristhian John Macías-Holguín^{3*}

¹ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Carrera de Agronomía. Avenida Quito, km 1.5 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. 120501 Quevedo, Los Ríos, Ecuador; (H.F.C.M.), (L.F.V.B.), (D.N.T.Q.).

² Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Laboratorio de Biología y Microbiología, Campus Experimental La María, Vicerrectorado Administrativo, ³ Laboratorio de Química y Bioquímica. Vía Quevedo-El Empalme km 7. 120501 Quevedo, Los Ríos, Ecuador; (E.G.I.), (C.J.M.H.), (A.V.C.M.).

* Autor para correspondencia: cristhian.macias2016@uteq.edu.ec

RESUMEN

El empleo de rizobacterias tiene la capacidad de colonizar el sistema radicular, promover el crecimiento en plantas y la capacidad biocontroladora o suprimir hongos fitopatógenos. El objetivo de esta investigación fue seleccionar y analizar las rizobacterias fluorescentes solubilizadoras de nitrógeno, fósforo y potasio, productoras de enzimas líticas de actividad antagonistas hacia *P. palmivora* y *L. theobromae*. Las bacterias se aislaron del tejido radicular y foliar de cultivares endémicos de cacao CCN-51 de las provincias de Los Ríos, Santa Elena y Esmeralda. La caracterización de la actividad antagonista se apoyó en la selección de actividad proteolítica, producción de sideróforos y pigmentación fluorescente bajo luz ultra violeta. Además, se realizó la actividad antagonista mediante los extractos celulares. Se seleccionaron nueve cepas bacterianas (BF 567, FZ 9-7, LH 5-10, MH 4-20, MN 5-20, MN 5-19, AC3, PV-25) con producción de proteasa, sideróforos y emisión de fluorescencia. Se analizó la capacidad de las bacterias para solubilizar minerales complejos (nitrógeno, fósforo y potasio) su eficiencia de solubilización vario, oscilando entre 50 y 100%. El factor antagonístico de los sobrenadantes celulares de FZ 9-7, BF 567 y PV-25 inhiben el crecimiento del micelio hacia *P. palmivora* y *L. theobromae* en un 40, 60 y 85%, respectivamente. La utilización de las rizobacterias podría usarse como biofertilizante alternativo a los fertilizantes químicos y control biológico de hongos fitopatógenos del suelo a través de sus emisiones volátiles.

Palabras clave: actividad proteolítica, antagonismo, enzimas líticas, extractos celulares, sideróforos.

SUMMARY

The use of rhizobacteria has the ability to colonize the root system, promote plant growth and biocontrol or suppress phytopathogenic fungi. The objective of this research was to select and analyze fluorescent rhizobacteria solubilizing nitrogen, phosphorus and potassium, producing lytic enzymes with antagonistic activity towards *P. palmivora* and *L. theobromae*. The bacteria were isolated from root and leaf tissue of endemic CCN-51 cacao cultivars from the provinces of Los Ríos, Santa Elena and Esmeralda. Characterization of antagonistic activity was based on the selection of proteolytic activity, siderophore production and fluorescent pigmentation under ultra violet light. In addition, antagonistic activity was performed using cell extracts. Nine bacterial strains (BF 567, FZ 9-7, LH 5-10, MH 4-20, MN 5-20, MN 5-19, AC3, PV-25) with protease production, siderophore production and fluorescence emission



Cita recomendada:

Canchignia-Martínez, H. F., Vera-Benites, L. F., Tapia-Quintana, D. N., Cedeño-Moreira, A. V., García-Intriago, E., & Macías-Holguín, C. J. (2024). Caracterización Bioquímica de Rizobacterias Endófitas con Actividad Biocontroladora Contra *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*. *Terra Latinoamericana*, 42, 1-10. e1807. <https://doi.org/10.28940/terra.v42i0.1807>

Recibido: 24 de agosto de 2023.
Aceptado: 19 de enero de 2024.
Artículo. Volumen 42.
Marzo de 2024.

Editor de Sección:
Dr. Tomás Rivas García



Copyright: © 2024 by the authors.
Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC ND) License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

were selected. The ability of the bacteria to solubilize complex minerals (nitrogen, phosphorus and potassium) was analyzed and their solubilization efficiency varied, ranging from 50 to 100 %. The antagonistic factor of cell supernatants from FZ 9-7, BF 567 and PV-25 inhibited mycelial growth toward *P. palmivora* and *L. theobromae* by 40, 60 and 85%, respectively. The use of rhizobacteria could be used as an alternative biofertilizer to chemical fertilizers and biological control of phytopathogenic soil fungi through their volatile emissions.

Index words: proteolytic activity, antagonism, lytic enzymes, cell extracts, siderophores.

INTRODUCCIÓN

Ecuador ocupa el cuarto lugar en exportación de cacao (*Theobroma cacao* L.) con 293 487 toneladas al año, producidas en 559 617 hectáreas (Anzules-Toala *et al.*, 2022). Sin embargo, existen grandes pérdidas de casi el total de su producción por hectárea por la presencia de patógenos que afectan la mazorca en épocas de mayor humedad y altas temperaturas (El Salous, Marcillo, Vargas y Alcivar, 2020).

La enfermedad de la mazorca negra afecta a las plantaciones de cacao, causada por diferentes especies de oomiceto hemibiotrófico superior al género *Phytophthora* spp. como *P. megakarya*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, y *P. palmivora*, donde esta última es la más virulenta y dañina (Perrine-Walker, 2020). Por el tamaño de sus esporangios, germina en el agua con facilidad para formar zoosporas móviles o produciendo un tubo germinal en la periferia de la pared de los esporangios (Kuswinanti, Patandjengi y Hardina, 2023). El micelio tiene la capacidad de propagarse por todas las partes del árbol de cacao en cada fase de su desarrollo, llegando a incidir en el proceso de maduración de la mazorca (Decloquement *et al.*, 2021).

La muerte regresiva ocasionada por el género *Lasiodiplodia* spp., como *L. theobromae* endofíticos cosmopolitas (Vanam, Ather, Madhura y Rudramurthy, 2019; Uranga *et al.*, 2016), se presenta en las mazorcas de cacao con la presencia de manchas negras de apariencia a polvillo negro que se asimila al carbón (He, Matsuura y Yoshihara, 2004; Alvindia y Gallema, 2017). También expresa la muerte regresiva en el área foliar como clorosis y necrosis (Mbenoun, Momo, Samuels, Nsouga y Nyasse, 2008). Estas enfermedades provocan pérdidas de rendimiento significativas de mazorcas de un 30 hasta un 10% de los árboles anualmente una vez que ha infectado el cacao (Acebo-Guerrero, Hernández, Heydrich, El Jaziri y Hernández, 2012; Bahia *et al.*, 2015). En la búsqueda de estrategias de biocontrol, las investigaciones se han orientado hacia el empleo de bacterias con propiedades beneficiosas para las plantas. Entre estas, se destacan *Pantoea agglomerans* sp., *Flavobacterium* sp. (Gunasinghe y Karunaratne, 2009), *Streptomyces* sp. (Sajitha y Florence, 2013), *Bacillus subtilis* (Sultana y Ghaffar, 2010), *Pseudomonas fluorescens* sp. (Muthukumar, Raj, Udhayakumar y Naveenkumar, 2019), *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp. (Sangeetha, Thangavelu, Usha-Rani, Muthukumar y Udayakumar, 2010), consideradas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

Las rizobacterias usan su propio metabolismo para solubilizar fosfatos por la producción de ácidos orgánicos donde las enzimas fosfatasa juegan un papel importante en la mineralización del fósforo insoluble a soluble asimilable a la planta (Behera, Singdevsachan, Mishra, Dutta y Thatoi, 2014), secretan fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA) que controla diversos procesos fisiológicos como la elongación y división celular (Vega-Celedón, Canchignia, González y Seeger, 2016). Fijan nitrógeno atmosférico, aumentan la absorción de agua y nutrientes por parte de las plantas, mejorando el desarrollo de las raíces y la actividad enzimática de las plantas en combinación con fungicidas (Ganeshan y Manoj, 2005). Los compuestos antifúngicos producidos por la rizobacterias actúan sobre la germinación de las esporas que pueden ser termoestables y los que actúan sobre los micelios pueden incluir también compuestos termolábiles (Backer *et al.*, 2018).

Grandes poblaciones de rizobacterias endofitas del género *Pseudomonas fluorescens* viven en la rizosfera del suelo y se transportan a través de los conductos de xilema y floema en la superficie de la hoja (Oliveira-Santana *et al.*, 2018; Bhetwal *et al.*, 2021). Estas bacterias no solo fomentan el crecimiento de las plantas, sino que también ejercen un control supresor sobre fitopatógenos mediante diversos mecanismos. Entre ellos, se destaca la producción de antibióticos volátiles, sideróforos, cianuro de hidrógeno (HCN) (Rijavec y Lapanje, 2016), así como la enzima quitinasa (Sajitha y Florence, 2013) y otros metabolitos auxiliares. Estas rizobacterias, simultáneamente, compiten con los fitopatógenos por nutrientes y desencadenan la Inducción de Resistencia Sistémica (ISR) en las plantas para fortalecer su capacidad defensiva contra enfermedades (Pieterse *et al.*, 2014).

La aplicación excesiva de productos químicos sintéticos para controlar hongos fitopatógenos afecta negativamente las funciones microbianas del suelo provocando una alteración en la diversidad y composición de la comunidad bacteriana (Onwona-Kwakye *et al.*, 2020). El trabajo de investigación se enfocó en seleccionar rizobacterias con potencial solubilización de nitrógeno, fósforo y potasio productoras de enzimas líticas de biocontrol hacia *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en la finca experimental "La María" ubicado en el km 7.5 de la Vía Quevedo - El Empalme, cantón Mocache, con sus coordenadas geográficas 1° 20' 30" de latitud Sur y 79° 28' 30" O, ubicada a 75 m de altitud.

Aislamiento de Bacterias Endófitas de Cultivares Nativos

Se recolectaron cinco muestras del tejido radicular y foliar de cultivares endémicos CCN-51 de las provincias, Los Ríos, Guayas, Bolívar, Esmeralda, Manabí, Santa Elena. Esto generó un total de 30 muestras, donde se almacenaron en bolsas de plástico ziploc® y trasladadas al laboratorio de biotecnología molecular para su procesamiento. El tejido radicular fue sumergido en agua destilada estéril separando las partículas del suelo y segmentadas en 5 cm para su maceramiento en agua destilada estéril y procesadas en diluciones en serie. El tejido foliar fue lavado con abundante agua estéril-alcohol al 70% secadas con papel absorbente para ser cortadas en fragmentos de 2 cm². Las muestras de tejidos de cada procedencia se ubicó cajas Petri con King B Agar [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 mL; K₂HPO₄, 1.5 g; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5 g; agar, 15 g] e incubadas a 28 °C por 24 h. Se observó la presencia de pigmento fluorescente bajo la luz ultravioleta a 365 nm (Nathan, Rathinam, Kasi, Rahman y Subramaniam, 2011). Se tomó una colonia bacteriana fluorescente e inoculada en 50 mL de King B líquido a 28 °C por 48 h/150 rpm y almacenada en glicerol al 20% a -40 °C para su conservación.

Caracterización Bioquímica de los Aislados

Se rescató 10 µL del inóculo bacteriano 5×10⁴ colonias mL⁻¹ desarrollados en 50 mL de King B líquido e inoculadas en medio Gelatin [(g L⁻¹): peptona, 4 g; extracto de levadura, 1 g; gelatina, 12 g; agar, 15 g] (Smith y Goodner, 1958) evaluando la actividad proteolítica. Los halos de degradación alrededor de la colonia se observaron a las 24 horas, la producción de sideróforos se recogieron 5 mL de bacteriana sometidas en tubos falcón de 15 mL adicionándole 5 mL de FeCl₃ al 2% en relación 1:1 la formación del cambio de color marrón a anaranjado indica la presencia de sideróforo (Sujatha y Ammani, 2013).

Evaluación de la Actividad Solubilizadora de N-P-K

Se seleccionaron nueve rizobacterias de plantaciones de cacao CCN-51, extraídas del sistema radicular y foliar de Los Ríos: BF 567, FZ 9-7, LH 5-10, MH-18, MH 4-20, MN 5-20 y MN 5-19. Santa Elena: AC3. Esmeralda: PV-25 que presentaron características consideradas como PGPR por su actividad antagonistas, Estas bacterias se incubaron en 75 mL de King B líquido a 28 °C por 24 h a 180 rpm en un agitador, Rescatando 5 µL de cada suspensión celular e inoculadas en cajas Petri con el medio de cultivo Cristensen's Urea Agar [(g L⁻¹): peptona 1g, dextrosa 1g, NaCl 5g, K₂HPO₄ 2g, urea 20g, rojo fenol 0.012g, agar 15 g] (Brink, 2010), Pikovskaya modificado [(g L⁻¹): glucosa 10 g, KNO₃ 5 g, KCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, púrpura de bromocresol 0.125 g, agar 15 g] y NBRIP [(g L⁻¹): glucosa 10 g, Ca₃PO₄ 5 g, MgCl₂ x 6H₂O 5 g, KCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, agar 20 g] (Nautiyal, 1999) e incubadas a 28 °C por tres días. El proceso se realizó por triplicado. Se evaluó a las 24, 48 y 72 h después de la inoculación para determinar el porcentaje de solubilidad de N-P-K. Se observó cada colonia con una zona de halo claro y se midió el diámetro del halo (HD) y el diámetro de la colonia (CD). Empleando la siguiente fórmula planteada por Joshi, Jaggi, Tiwari, Sah y Sahgal (2019) (ecuación 1).

$$\% \text{ solubilidad} = \frac{DH - DC}{DC} \times 100 \quad (1)$$

Obtención de los Sobrenadantes Celulares Antagonistas

Las rizobacterias se incubaron en 75 mL de king líquido a 180 rpm a 28 °C por 48 h en agitación constante. Se vertieron 15 mL del cultivo bacteriano y centrifugado a $6000 \times g$ 5 min^{-1} . Los sobrenadantes fueron filtrados empleando Nalgene Syringe de $0.2 \mu\text{m}$ para descartar la presencia de células bacterianas, sometidas a choque térmico de 15 min a 90 °C a baño María y 15 min a -40 °C por triplicado y almacenados a 4 °C (Chávez-Arteaga *et al.*, 2020).

Ensayos de Sobrenadantes Antifúngico al Crecimiento Micelial de *P. palmivora* y *L. theobromae*

Se utilizaron cepas de *P. palmivora* y *L. theobromae* donadas por Carmen Suarez (INIAP) con un crecimiento micelial de siete días. Se colocaron 0.1 mL de sobrenadantes celulares previamente homogenizado en 10 mL de medio de cultivo PDA y distribuidas en cajas Petri. Se incorporó un disco fúngico (\varnothing 7 mm) micelial de *P. palmivora* y *L. theobromae* por separado. Se evaluó el porcentaje de inhibición desde el extremo del tarugo hasta el crecimiento fúngico a las 24, 48 y 72 h, utilizando la fórmula propuesta por Qingwei *et al.*, (2023) (ecuación 2).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Crecimiento del control} - \text{crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del control}} \times 100 \quad (2)$$

Donde el porcentaje de inhibición es el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno. Crecimiento del control es el radio micelial del fitopatógeno. Crecimiento del tratamiento es el radio micelial del fitopatógeno que crece frente al sobrenadante bacteriano.

Cada experimento contempla 3 réplicas con 2 unidades experimentales cada una para la solubilización de N P K y antagonismos a *P. palmivora* y *L. theobromae*. 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 el programa estadístico Statgraphics Centurion™ V.18 (Statgraphics Technologies, 2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de Rizobacterias Endófitas

Se logró la recuperación de 155 aislados bacterianos fluorescentes por el método de dilución en serie para el tejido radicular y tejido foliar por proceso de lavado y secado impregnados en placas en king B Agar (Figura 1). La caracterización bioquímica de rizobacterias con actividad proteolítica, pigmentación fluorescente y producción de sideróforos. Determinante para el escrutinio de rizobacterias (PGPR) por su actividad inhibitoria contra hongos fitopatógenos, se presenta en el Cuadro 1. La proteasa alcalina al gen AprA producida por la cepa *P. protegens* CHA0 combinada con otras enzimas líticas actúa de forma, directa o indirectamente a los polímeros de la pared celular de la eclosión de los huevos y la mortalidad de los juveniles de *M. incognita* (Siddiqui *et al.*, 2005; Herkersdorf *et al.*, 2021). Las enzimas líticas degradan la pared celular fúngica, compuesta de quitinasa, β -1,3-glucanasa y proteasas por *Pseudomonas fluorescens*, MT9, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces exfoliatus*. *P. fluorescens* presenta un antagonismo de amplio espectro hacia varios fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* fsp, *P. meadii*, *C. vanillae* (Rathore, Vakharia y Rathore, 2020), *P. palmivora* (Cedeño-Moreira *et al.*, 2020), *M. pernicioso* (Auhing-Arcos *et al.*, 2021). Además, tiene la capacidad de producir un líquido soluble de color verde amarillento característico por la producción de sideróforo de tipo pioverdina, un quelante de hierro (Vindeirinho, Soares y Soares, 2021). El cual participa en el transporte de hierro de alta afinidad en presencia de otros metales hacia la célula bacteriana (Mandal y Kotasthane, 2014). Biodisponible reducido a Fe^{+2} que mejora el crecimiento de las plantas por los procesos metabólicos como la síntesis de ADN, la respiración celular, formación de la clorofila y la fotosíntesis al aumentar la disponibilidad de Fe cerca de la raíz (Gull y Hafeez, 2012; Rout y Sahoo, 2015) e inhiben la colonización de las raíces por patógenos de plantas u otras bacterias dañinas (Alexander y Zuberer, 1991).

Solubilización de N-P-K

Se evaluó el potencial de solubilización de diferentes minerales insolubles de las cepas bacterianas aisladas, como la solubilización de N-P-K. La cepa BF 567 mostro el diámetro máximo de la zona del halo de solubilización de N-P-K a las 24, 48 y 72 h observando diferencia significativa de 92, 90 y 100% (Figura 2 A, B y C). Las cepas MN 5-20 mostraron una solubilización lenta a las 72 h en todos los minerales.

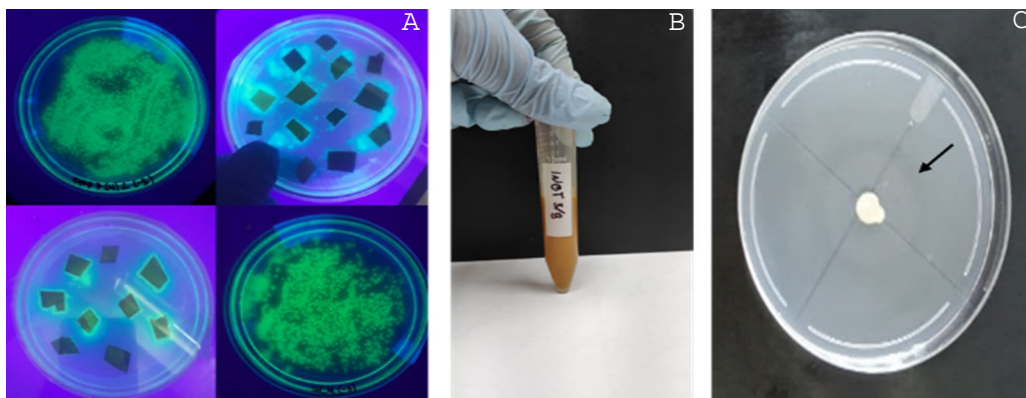
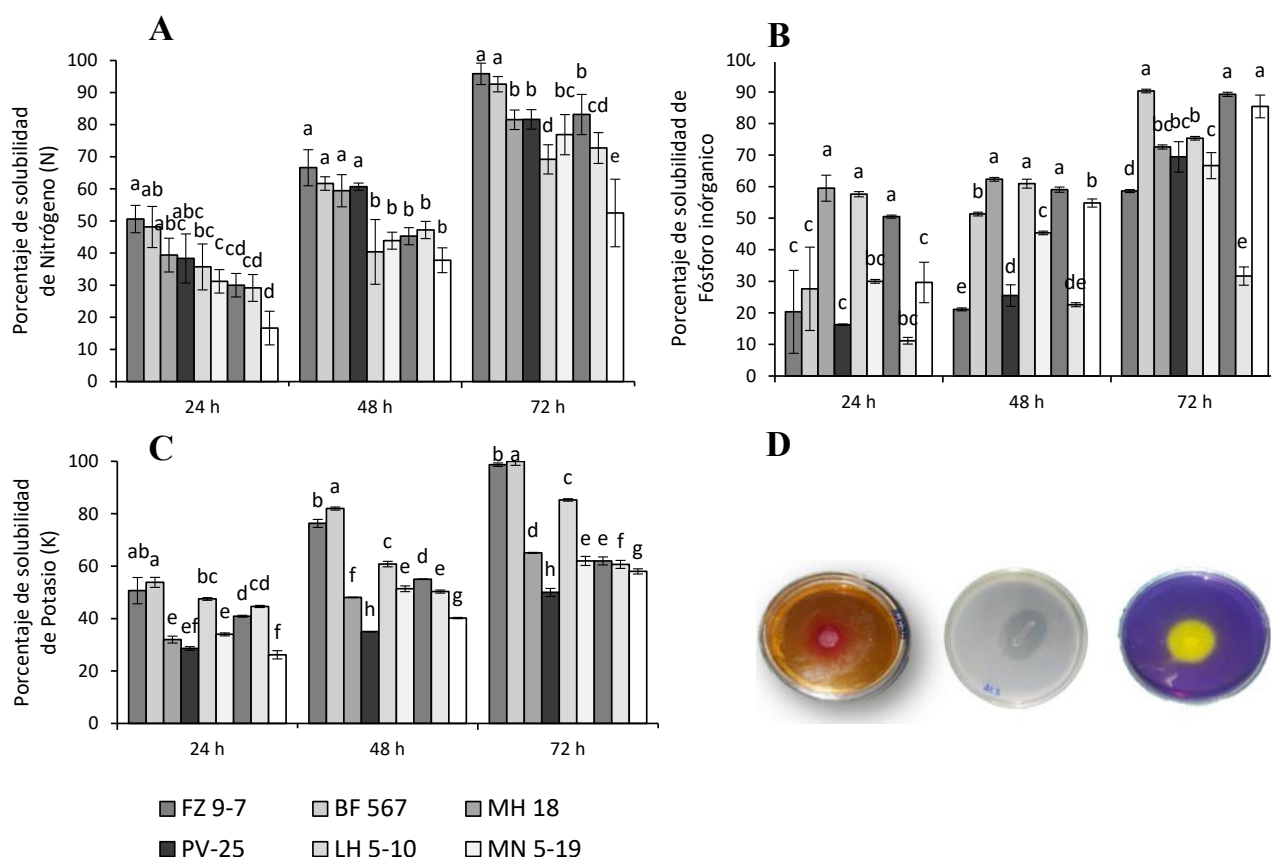


Figura 1. Selección de bacterias fluorescentes de cultivares endémicos CCN-51 y caracterización bioquímica. A. Colonias extraídas del sistema radicular y foliar. B. Producción de sideróforos. C. Actividad Proteolítica. La flecha marca el halo de degradación alrededor de la colonia en el medio de cultivo Gelatin Agar.
Figure 1. Selection of fluorescent bacteria from endemic CCN-51 cultivars and biochemical characterization. A. Colonies extracted from root and leaf systems. B. Siderophore production. C. Proteolytic activity. The arrow marks the degradation halo around the colony in Gelatin Agar culture medium.



Cuadro 1. Zona de recolección de tejido radicular y foliar en plantaciones de cacao CCN-51.**Table 1. Root and leaf tissue collection zone in cocoa plantations CCN-51.**

Provincia	Cantón	Cepa	Tejido Vegetal	Mecanismo de acción					
				Solubilización			Antagonismo		
				N	P	K	PR	FLT	SFR
Los Ríos	Buena-Fe	BF 567	R	++	+++	++	+++	++	+
Los Ríos	Valencia	FZ 9-7	R	++	++	++	+++	+++	+
Los Ríos	Valencia	LH 5-10	R	+	+	++	++	+++	+
Los Ríos	Mocache	MH 18	F	+	+	+	++	+	+
Los Ríos	Milagro	MH 4-20	F	+	+	+	+	+	+
Los Ríos	Las Naves	MN 5-20	F	+	+	++	+++	++	+
Los Ríos	Las Naves	MN 5-19	F	+	+	+	++	+	+
Santa Elena	Santa Elena	AC3	F	+	+	++	++	+	+
Esmeralda	Quinindé	PV-25	F	+	+	+	+	+	+

Tejido = radicular (R) y foliar (F), mecanismo de acción; Solubilización = nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K); Antagonismos = actividad proteolítica (PR), fluorescencia (FLT), producción de sideróforo (SFR).

Tissue = radicular (R) and foliar (F), mechanism of action; Solubilization = nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K); Antagonisms = proteolytic activity (PR), fluorescence (FLT), siderophore product (SFR).

A partir de las 24 h después de la inoculación mostraron halos de avances degradatorios con actividad solubilizadoras de N P K (Figura 2 D). Reportes obtenidos por Verma, Patidar y Vaishampayan (2016) muestran el efecto de solubilización de diferentes formas de potasio en medios suplementados con KCl y K_2SO_4 cumpliendo un rol en las funciones fisiológicas vitales en las plantas y su disponibilidad al fruto (Ashley, Grant y Grabov, 2006; Weinert *et al.*, 2021). Los géneros bacterianos con mayores potencialidades de uso son *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp., donde sus principales mecanismos de acción incluyen la producción de ácidos orgánicos, la quelación acidólisis, polisacáridos, complexólisis y reacciones de intercambio (Etesami, Emami y Alikhani, 2017), siendo estos elementos responsables de asimilación directa de minerales insolubles presentes en el suelo (Restrepo *et al.*, 2015). La solubilización de elementos minerales en el suelo, está relacionado al fósforo (P) y potasio (K) disponible para la nutrición de las plantas (Paredes y Espinosa, 2010).

Inhibición en el Crecimiento Micelial de *P. palmivora* y *L. theobromae* por Sobrenadantes Bacterianos

Los sobrenadantes bacterianos producidos por la cepa FZ 9-7, BF 567, PV-25 presentaron mayor presencia inhibitoria a *P. palmivora* y *L. theobromae* entre el 40, 60 y 85% evaluadas a las 24, 48 y 72 horas observando diferencia significativa entre los tratamientos. El efecto de los sobrenadantes demuestra una actividad antagonista baja por la cepa BF 567 y PV-25 con 48 y 53% a *L. theobromae* a las 72 horas (Figura 3A y B).

El rendimiento de actividad antifúngica producidas por los extractos celulares bacterianos producidos por la cepa FZ 9-7, BF 567, PV-25 impiden el desarrollo del crecimiento micelial (Figura 3C y D). Esto coinciden con Alsultan *et al.*, (2019), donde los extractos de *P. aeruginosa* inhiben el crecimiento micelial de *P. palmivora*, tienen la capacidad de producir enzimas líticas como son la producción de pioverdina, cianuro de hidrógeno, biosurfactantes, proteasa y lipasa (Acebo-Guerrero *et al.*, 2015), provocando anomalía morfológica producto de la degradación de la pared celular al entrar en contacto los extractos celulares con las hifas del hongo (Masanto, Wibowo, Joko, Subandiyah y Kageyama, 2020). Los metabolitos bioactivos volátiles, como la 6-pentil- α -pirona, exhiben múltiples acciones, como inhibir el crecimiento del micelio fúngico, la germinación de esporas y la pigmentación de hongos (Intana, Kheawleng y Sunpapao, 2021).

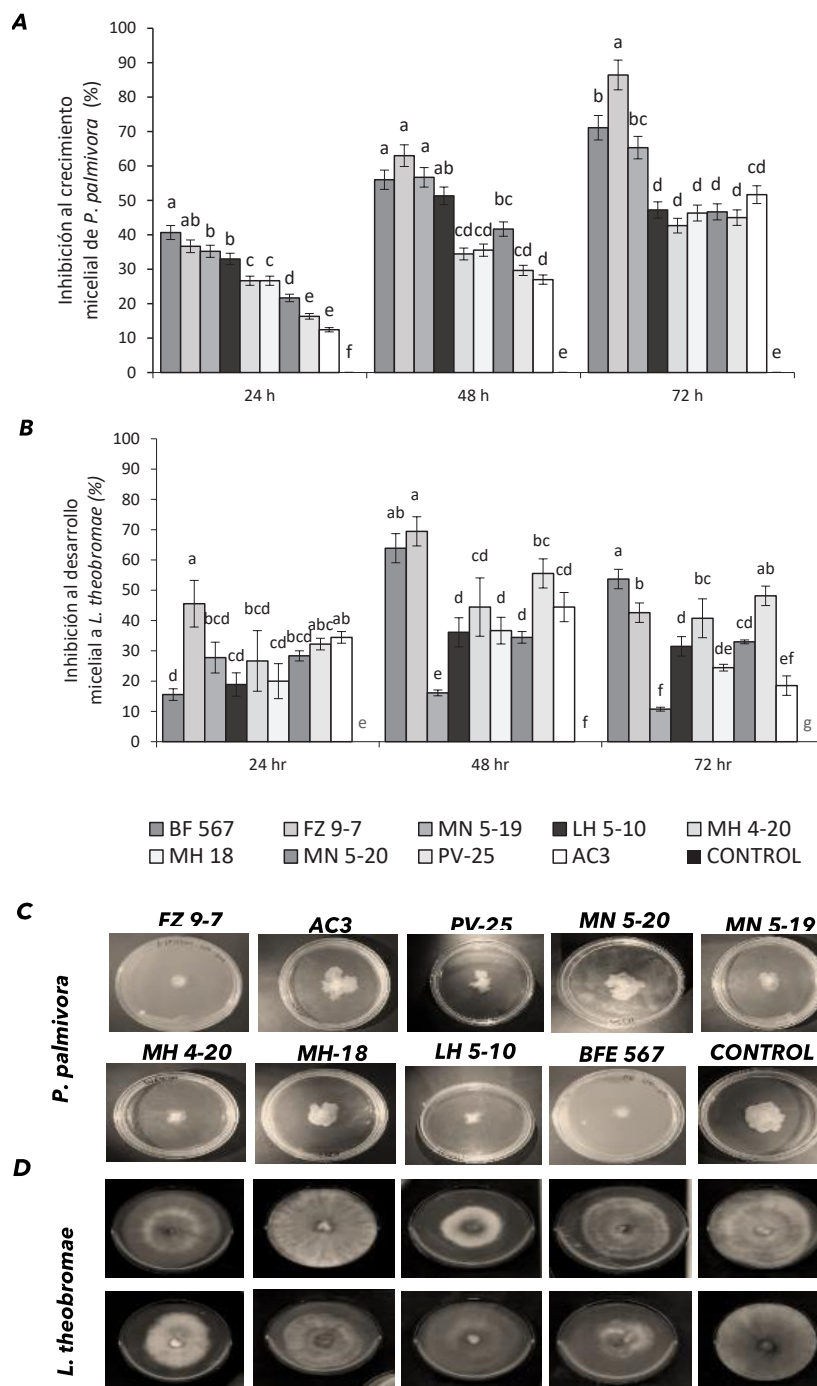


Figura 3. Efecto de los sobrenadantes bacterianos en inhibición del desarrollo micelial. A y B El Porcentaje de Inhibición al desarrollo micelial de los hongos a 24, 48 y 72 h después de la inoculación. C y D). Visualización de los sobrenadantes en la inhibición de desarrollo micelial a *P. palmivora* y *L. theobromae*. Las barras indican el DE individual para tratamiento (\pm). Medias con letras iguales en la columna no difieren significativamente según Tukey ($P \leq 0.05$).

Figure 3. Effect of bacterial supernatants on inhibition of mycelial growth. A and B The percentage inhibition of mycelial development of fungi at 24, 48 and 72 h after inoculation. C and D). Visualization of the supernatants in the inhibition of mycelial development to *P. palmivora* and *L. theobromae*. Bars indicate individual SD for treatment (\pm). Means with equal letters in the column do not differ significantly according to Tukey ($P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

Las rizobacterias aisladas del sistema radicular del cultivo de cacao CCN-51, producen enzima proteolítica, pigmentación fluorescente y producción de sideróforos por BF 567 mantiene una alta capacidad de solubilizar N-P-K de 95, 60 y 80%. En inhibición al crecimiento micelial FZ 9-7 presenta mayor biocontrol con 69 y 80%. Los extractos celulares producido por las rizobacterias endófitas degradan la pared celular de *P. palmivora* y *L. theobromae* en fase infección causando la muerte celular.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

No aplicable

CONFLICTO DE INTERESES

No aplicable

FINANCIACIÓN

No aplicable.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Investigación, conceptualización, validación, administración del proyecto, adquisición de fondo: H.F.C.M. Escritura, revisión y edición: C.J.M.H. Investigación, metodología: E.G.I. Escritura: preparación del borrador original, escritura: revisión y edición: L.F.V.B. Curación de datos, análisis de datos: D.N.T.Q. Escritura, revisión, análisis formal: Á.V.C.M.

AGRADECIMIENTOS

La ejecución del proyecto se realizó por financiamiento a convocatorias FOCICYT-2021 (Empleo potencial de biocontroladores antagónicos de origen bacteriano a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Mal de Panamá) Raza 1 y su identificación morfológica-molecular), otorgado por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

LITERATURA CITADA

- Acebo-Guerrero, Y., Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., El Jaziri, M., & Hernández-Lauzardo, A. (2012). Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. *Fruits*, 67(1), 41-48. <https://doi.org/10.1051/fruits/2011065>
- Acebo-Guerrero, Y., Hernández-Rodríguez, A., Vandeputte, O., Miguélez-Sierra, Y., Heydrich-Pérez, M., Ye, L., ... & El Jaziri, M. (2015). Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* from *Theobroma cacao* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora* (Butler). *Journal of Applied Microbiology*, 119, 1112-1126. <https://doi.org/10.1111/jam.12910>
- Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12, 39-45. <https://doi.org/10.1007/BF00369386>
- Alsultan, W., Vadamalai, G., Khairulmazmi, A., Saud, H. M., Al-Sadi, A. M., Rashed, O., ... & Nasehi, A. (2019). Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria antagonistic to *Phytophthora palmivora* causing black pod of cocoa in Malaysia. *European Journal of Plant Pathology*, 155(4), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01834-8>
- Alvinda, D. G., & Gallema, F. L. M. (2017). *Lasiodiplodia theobromae* causes vascular streak dieback (VSD)-like symptoms of cacao in Davao Region, Philippines. *Australasian Plant Disease Notes*, 12, 10-13. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0279-9>
- Alvares-Toala, V., Pazmiño-Bonilla, E., Alvarado-Huamán, L., Borjas-Ventura, R., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2022). Control of cacao (*Theobroma cacao*) diseases in Santo Domingo de los Tsachilas, Ecuador. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1), 1-13. <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.45939>

- Ashley, M. K., Grant, M., & Grabov, A. (2006). Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *Journal of Experimental Botany*, 57(2), 425-36. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj034>
- Auhing-Arcos, J., Cedeño-Moreira, A., Saucedo-Aguilar, A., Vera-Benites, L., Macías-Holguín, C., & Canchignia-Martínez, H. (2021). Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de *Moniliophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L. nacional del Litoral Ecuatoriano. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 599-609. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.064>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9(1473), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bahia, R. D. C., Aguilar-Vildoso, C. I., Luz, E. D. M. N., Lopes, U. V., Machado, R. C. R., & Corrêa, R. X. (2015). Resistance to Black Pod Disease in a Segregating Cacao Tree Population. *Tropical Plant Pathology*, 40, 13-18. <https://doi.org/10.1007/s40858-014-0003-7>
- Behera, B., Singdevsachan, S., Mishra, R., Dutta, S., & Thatoi, H. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilizing microorganism in mangrove-A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 97-110. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>
- Bhetwal, S., Rijal, R., Das, S., Sharma, A., Pooja, A., & Malannavar, A. (2021). *Pseudomonas fluorescens*: Biological Control Aid for Managing Various Plant Diseases: A Review. *Biological Forum-An International Journal*, 13(1), 484-494.
- Brink, B. (2010). *Urease Test Protocol*. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology.
- Cedeño-Moreira, Á. V., Romero-Meza, R. F., Auhing-Arcos, J. A., Mendoza-León, A. F., Abasolo-Pacheco, F., & Canchignia-Martínez, 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. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.05>
- Chávez-Arteaga, K. T., Guato-Molina, J. J., Rodríguez-Acosta, J. L., Cedeño-Moreira, Á. V., Romero-Meza, R. F., & Canchignia-Martínez, H. F. (2020). Rizobacterias con potencial antagonista in vitro a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Ciencia y Tecnología*, 13(2), 1390-4051. <https://doi.org/10.18779/cyt.v13i2.387>
- Decloquement, J., Ramos-Sobrinho, R., Elias, S. G., Britto, D. S., Puig, A. S., Reis, A., ... & Marelli, J. P. (2021). *Phytophthora theobromicola* sp. nov.: a new species causing black pod disease on cacao in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 12, 537399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399>
- El Salous, A., Marcillo, J., Vargas, J. A. G., & Alcivar, F. R. M. (2020). Mejoramiento de la calidad del cultivo de cacao en Ecuador. *Revista Venezolana de Gerencia*, 25(3), 368-380. <https://doi.org/10.37960/rvg.v25i3.33375>
- Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017). Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4), 897-911. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>
- Ganeshan, G., & Manoj, A. (2005). *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *Journal of Plant Interactions*, 1(3), 123-134. <https://doi.org/10.1080/17429140600907043>
- Gull, M., & Hafeez, F. (2012). Characterization of siderophore producing bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* Mst 8.2 as plant growth promoting and biocontrol agent in wheat. *African Journal of Microbiology Research*, 6(33), 6308-6318. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1285>
- Gunasinghe, W., & Karunaratne, A. (2009). Interactions of *Colletotrichum musae* and *Lasiodiplodia theobromae* and their biocontrol by *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp. in expression of crown rot of "Embul" banana. *BioControl*, 54(4), 587-596. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9210-4>
- He, G., Matsuura, H., & Yoshihara, T. (2004). Isolation of an α -methylene- γ -butyrolactone derivative, a toxin from the plant pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry*, 65(20), 2803-2807. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.011>
- Herkersdorf, S., Krüger, T., Wein, P., Löffler, S., Fontaine, T., Gressler, M., ... & Hoffmeister, D. (2021) Bacterial cell wall-degrading enzymes induce basidiomycete natural product biosynthesis. *Environmental Microbiology*, 23(8), 4360-4371. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15621>
- Intana, W., Kheawleng, S., & Sunpapao, A. (2021). *Trichoderma asperellum* T76-14 Released Volatile Organic Compounds against Postharvest Fruit Rot in Muskmelons (*Cucumis melo*) Caused by *Fusarium incarnatum*. *Journal of Fungi*, 7(46), 1-13. <https://doi.org/10.3390/jof7010046>
- Joshi, S., Jaggi, V., Tiwari, S., Sah, V. K., & Sahgal, M. (2019). Multitrate phosphate solubilizing bacteria from *Dalbergia sissoo* Roxb. Rhizosphere in natural forests of Indian Central Himalayas. *Environment and Ecology*, 3, 894-908.
- Kuswinanti, T., Patandjengi, B., & Hardina, N. (2023). Morphological and Molecular Characterization of *Phytophthora palmivora* Isolates and Their Virulence Test on Cocoa Clone Sulawesi 2. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 19(4), 145-155.
- Mandal, L., & Kotasthane, A. (2014). Isolation and Assessment of Plant Growth Promoting Activity of Siderophore Producing *Pseudomonas fluorescens* in Crops. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology*, 6(1), 103-105. <https://doi.org/10.5958/j.2230-732X.7.1.009>
- Masanto, W., Wibowo, A., Joko, T., Subandiyah, S., & Kageyama, K. (2020). Antagonistic Potential of Endophytic Bacteria Against *Phytophthora palmivora* Causing Black Pod Rot Disease on Cacao (*Theobroma cacao* L.) In Indonesia. *Plant Pathology Journal*, 19(1), 22-41. <https://doi.org/10.3923/ppj.2020.22.41>
- Mbenoun, M., Momo-Zeutsa, E. H., Samuels, G., Nsougua-Amougou, F., & Nyasse, S. (2008). Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. *Plant Pathology*, 57(2), 381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01755.x>
- Muthukumar, A., Raj, T. S., Udhayakumar, R., & Naveenkumar, R. (2019). Evaluation of antagonistic microbes against peduncle blight caused by *lasiodiplodia theobromae* (Pat.) griffon & maubl in tuberose. *Journal of Biopesticides*, 12(1), 83-94.
- Nathan, P., Rathinam, X., Kasi, M., Rahman, Z. A., & Subramaniam, S. (2011). A pilot study on the isolation and biochemical characterization of *Pseudomonas* from chemical intensive rice ecosystem. *African Journal of Biotechnology*, 10(59), 12653-12656.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Oliveira-Santana, J. O., Gramacho, K. P., de Souza Eduvirgens-Ferreira, K. T., Rezende, R. P., Mangabeira, P. A. O., Dias, R. P. M., ... & Pirovani, C. P. (2018). Witches' broom resistant genotype CCN51 shows greater diversity of symbiont bacteria in its phylloplane than susceptible genotype catongo. *BMC Microbiology*, 18(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1339-9>
- Onwona-Kwakye, M., Plants-Paris, K., Keita, K., Lee, J., Brink, P. J. V. D., Hogarh, J. N., & Darkoh, C. (2020). Pesticides decrease bacterial diversity and abundance of irrigated rice fields. *Microorganisms*, 8(3), 1-13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030318>
- Paredes-Mendoza, M., & Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61-70.
- Perrine-Walker, F. (2020). *Phytophthora palmivora*-Cocoa Interaction. *Journal of Fungi*, 6(3), 1-20. <https://doi.org/10.3390/jof6030167>

- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Qingwei, Z., Lushi, T., Yu, Z., Yu, S., Wanting, W., Jiangchuan, W., ... & Bilal, M. (2023). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from rhizosphere of poplar on road verge and their antagonistic potential against various phytopathogens. *BMC Microbiology*, 23(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02953-3>
- Rathore, R., Vakharia, D. N., & Rathore, D. S. (2020). In vitro screening of different *Pseudomonas fluorescens* isolates to study lytic enzyme production and growth inhibition during antagonism of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, wilt-causing pathogen of cumin. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(57), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00259-4>
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 63-76.
- Rijavec, T., & Lapanje, A. (2016). Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01785>
- Rout, G. R., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 1-24. <https://doi.org/10.7831/ras.3.1>
- Sajitha, K., & Florence, E. (2013). Effects of *streptomyces* sp. on growth of rubberwood sapstain fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of Tropical Forest Science*, 25(3), 393-399.
- Sangeetha, G., Thangavelu, R., Usha-Rani, S., Muthukumar, A., & Udayakumar, R. (2010). Induction of systemic resistance by mixtures of antagonist bacteria for the management of crown rot complex on banana. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(6), 1177-1187. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0513-y>
- Siddiqui, I., Haas, D., & Heeb, S. (2005). Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a Biocontrol Factor with Activity against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5646-5649. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5646-5649.2005>
- Smith, H., & Goodner, K. (1958). Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *Journal of Bacteriology*, 76(6), 662-665. <https://doi.org/10.1128/jb.76.6.662-665.1958>
- Statgraphics Technologies (2019). *Statgraphics Centurion Version 18 User's Manual*. The Plains, VA, USA: Statgraphics Inc.
- Sujatha, N., & Ammani, K. (2013). Siderophore production by the isolates of *Fluorescent pseudomonads*. *International Journal of Current Research and Review*, 5(20), 1-7.
- Sultana, N., & Ghaffar, A. (2010). Effect of fungicides and microbial antagonists in the control of *Lasiodiplodia theobromae*, the cause of seed rot, seedling and root infection of bottle gourd. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 23(1-2), 46-52.
- Uranga, C. C., Beld, J., Mrse, A., Córdova-Guerrero, I., Burkart, M. D., & Hernández-Martínez, R. (2016). Fatty acid esters produced by *Lasiodiplodia theobromae* function as growth regulators in tobacco seedlings. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 472, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.104>
- Vanam, H. P., Ather, M., Madhura, K. S., & Rudramurthy, S. M. (2019). First report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* keratitis susceptible to voriconazole in an Indian mango grower. *Access Microbiology*, 1(6), <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000055>
- Vega-Celedón, P., Canchignia-Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.
- Verma, A., Patidar, Y., & Vaishampayan, A. (2016). Isolation and purification of potassium solubilizing bacteria from different regions of India and its effect on crop's yield. *Indian Journal of Microbiology Research*, 3(4), 483-488.
- Vindeirinho, J., Soares, H., & Soares, E. (2021). Modulation of siderophore production by *pseudomonas fluorescens* through the manipulation of the culture medium composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193, 607-618. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03349-z>
- Weinert, C., Sonntag, F., Egert, B., Pawelzik, E., Kulling, S., & Smit, I. (2021). The effect of potassium fertilization on the metabolite profile of tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 159, 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.12.010>