



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora
roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA AGRÍCOLA Y BIOLÓGICA

Presentada por:

Mirian Elizabeth Villavicencio Vásquez

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2010

AGRADECIMIENTO

A Dios y a todas las personas que de uno u otro modo hicieron posible la realización de este trabajo pero muy en especial a las Dras. Ma. Isabel Jiménez, Esther Peralta y a la Ing. Gabriela Maridueña por su invaluable ayuda.

DEDICATORIA

A DIOS

A MIS PADRES

A MI HERMANA

A MI NOVIO

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ing. Francisco Andrade S.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Dra. María Isabel Jiménez F.
DIRECTORA DE TESIS



Ing. Gabriela Maridueña Z.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



Mirian Villavicencio Vásquez

RESUMEN

La Moniliasis del cacao (*Theobroma cacao L.*), causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans *et al.*, (Clase Basidiomycetes, Orden Trycholomataceae), es el principal problema fitosanitario en las áreas donde este rubro es cultivado. La enfermedad ataca solamente los frutos en cualquier etapa de su desarrollo. Dada su importancia, es necesario profundizar en el conocimiento del agente causal y las diferencias existentes entre poblaciones del hongo de diversa procedencia.

A partir de muestras recolectadas en diez fincas de producción de cacao Nacional ubicadas en cinco provincias de la Costa, se realizaron aislamientos que fueron evaluados e identificados mediante criterios morfológicos (diámetro, borde, coloración y textura de las colonias; tipo y tamaño de conidias, entre otros); fisiológicos (desarrollo a determinada temperatura, peso de micelio), y patogénicos (tiempo de aparición y severidad de síntomas), con la finalidad de iniciar la caracterización de las poblaciones del hongo en el país y contar con un banco de aislamientos para investigaciones posteriores a diferentes niveles.

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Fitopatología del CIBE-ESPOL. Se utilizaron medios de cultivo sólido y líquido para evaluar las características morfológicas y fisiológicas de 50 aislamientos obtenidos. La

patogenicidad de los 50 aislamientos fue evaluada inoculando frutos sanos con el método de las conidias secas durante un período de catorce días.

No se encontraron diferencias morfológicas en el borde y textura de las colonias entre los aislamientos estudiados, pero sí variaciones en su coloración, con tonalidades de color blanco, crema, café claro, hasta el café oscuro. También el tamaño y la forma de las conidias presentaron diferencias, distinguiéndose conidias globosas, subglobosas y elípticas.

Se observaron variaciones en cuanto al crecimiento de las colonias y el peso de micelio en los diferentes aislados, independientemente de su procedencia, con la excepción del 80% de los procedentes de áreas de la provincia de Los Ríos, que presentaron una mayor velocidad de crecimiento en medio sólido.

Algunos de los aislamientos evaluados en la patogenicidad, coincidieron con los que presentaron un mayor crecimiento en medio sólido.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ABREVIATURAS.....	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. EL CACAO EN EL ECUADOR: SITUACIÓN ECONÓMICA Y PROBLEMAS FITOSANITARIOS.....	4
1.1. Importancia económica del cultivo.....	4
1.2. Enfermedades fungosas en los frutos.....	7
1.3. Moniliasis.....	9
1.3.1. Origen y distribución.....	9
1.3.2. Signos y síntomas de la enfermedad.....	13
1.3.3. Manejo de la enfermedad.....	15
1.3.4. Importancia económica de la enfermedad.....	19

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1. Análisis de la zona en estudio.....	21
2.1.1. Evaluación de la evolución de la enfermedad en las diferentes zonas de estudio.....	23
2.2. Metodología de campo.....	23
2.2.1. Recolección e identificación de mazorcas con síntomas de Moniliasis de las zonas en estudio.....	23
2.2.2. Observación macroscópica del crecimiento del hongo.....	24
2.3. Protocolo para aislamientos de <i>Moniliophthora roreri</i>	24
2.3.1. Desinfección de las muestras.....	25
2.3.2. Siembra de las muestras.....	25
2.3.3. Crecimiento en medio líquido.....	26
2.4. Caracterización morfológica del hongo.....	27
2.4.1. Selección de muestras por el color y textura.....	28
2.4.2. Forma y tamaño de conidias.....	28
2.5. Caracterización fisiológica del hongo.....	29
2.5.1. Crecimiento en medio líquido.....	30
2.5.2. Producción y conteo de conidias.....	30
2.5.3. Medición de crecimiento del hongo en placa.....	31
2.6. Prueba de patogenicidad.....	31

2.7. Protocolo para conservación del hongo.....	33
2.8. Análisis estadísticos.....	33

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
--------------------------------	----

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	57
--	----

BIBLIOGRAFÍA

APÉNDICES

ABREVIATURAS

AN	Agar Nutritivo
PDB	Caldo de Papa Dextrosa
g	Gramos
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
ml	Mililitros
mm	Milímetros
Min	Minutos
PDA	Papa Dextrosa Agar
qq	Quintales
r.p.m	Revoluciones por Minuto
TM	Tonelada Métrica

SIMBOLOGÍA

°C	Grados Centígrados
lb.	Libras
µm	Micras
mbar	Milibares
%	Por ciento
pulg.	Pulgadas

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1	Procedimiento para la obtención de aislamientos puros de <i>M. royeri</i> 24
Figura 3.1	Análisis comparativo del estatus sanitario con respecto a la infección de <i>M. royeri</i> en las diferentes fincas, basadas en el porcentaje de mazorcas enfermas. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas al 5%..... 36
Figura 3.2	Muestras de mazorcas con síntomas y signos de Moniliasis encontrados en las evaluaciones en campo; (a) Deformaciones; (b) Mancha chocolate; (c) Esporulación; (d) Momificación..... 37
Figura 3.3	Porcentaje de daño de la enfermedad Moniliasis evaluado a través de síntomas y signos característicos en mazorcas, obtenidas en las diferentes fincas de las cinco provincias..... 38
Figura 3.4	Colonias de <i>M. royeri</i> con coloración más predominante en medio V8MAA a los 15 días (a) Aislamiento E5; (b) Aislamiento M1; (c) Aislamiento G2; (d) Aislamiento R1; (e) Aislamiento O2..... 40
Figura 3.5	Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales para la caracterización del micelio según la coloración en los diferentes aislamientos de <i>M. royeri</i> procedentes de fincas ubicadas en cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. Se incluyen los colores analizados por categorías..... 41
Figura 3.6	Aislamiento E5 de <i>M. royeri</i> con borde regular y textura pulverulenta, en medio V8MAA a los 15 días..... 42
Figura 3.7	Forma de las conidias en los diferentes aislamientos de <i>M. royeri</i> . (a) Aislamiento M1, conidias globosas; (b) Aislamiento E5, conidias subglobosas; (c) Aislamiento R3, conidias elípticas..... 43
Figura 3.8	Comportamiento del tamaño (largo y ancho) de conidias en los diferentes aislamientos de <i>M. royeri</i> procedentes de fincas localizadas en cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. Los aislamientos se

	desarrollaron en medio sólido V8MAA durante 15 días.....	45
Figura 3.9	Distribución de los aislamientos que presentaron conidias de longitud inferior a 8 μm . Las conidias evaluadas fueron obtenidas a partir de los aislamientos en medio sólidos V8MAA de muestras procedentes de diferentes fincas en cinco provincias de la Costa.....	46
Figura 3.10	Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales para la caracterización del peso de masa micelial de aislamientos de <i>M. royeri</i> en las diferentes fincas de las cinco provincias a los 21 y 30 días en medio líquido.....	48
Figura 3.11	Dendograma obtenido del análisis de conglomerado, aplicando el método del promedio y distancia Euclídea para evaluar el comportamiento del crecimiento de las colonias de <i>M. royeri</i> en un periodo de quince días en medio sólido.....	49
Figura 3.12	Síntomas de la enfermedad caracterizados según la escala de severidad; (a) Aislamiento O1-I con grado 1; (b) Aislamiento M3-II con grado 2; (c) Aislamiento M10-I con grado 3; (d) Aislamiento R5-I con grado 4; (e) Aislamiento E5-I con grado 5.....	52
Figura 3.13	Comportamiento de la patogenicidad de aislamientos de <i>M. royeri</i> , basado en inoculaciones dirigidas del hongo en mazorcas sanas de cacao Nacional. Evaluación de los síntomas de la enfermedad mediante una escala de severidad externa (grados 0 a 5), realizada a los 8 y 11 días después de la inoculación.....	53
Figura 3.14	Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales considerando los parámetros evaluados de crecimiento de colonias, tamaño de conidias y severidad externa de la enfermedad entre los aislados obtenidos en fincas de las cinco provincias de la Costa Ecuatoriana.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Datos climatológicos de las zonas evaluadas.....	Pág. 22
Tabla 2.	Rango de colores para evaluar a los aislamientos morfológicamente con respecto al color de las colonias.....	28

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) que se cultiva en la actualidad constituye un complejo genético de elevado polimorfismo, cuya diversidad no ha sido completamente caracterizada [40]. Aunque botánicamente se reconocen tres grandes grupos: Criollos, Forasteros y Trinitarios, se ha demostrado mediante trabajos de caracterización fenotípica y molecular que el cacao Nacional de Ecuador, considerado por algunos autores dentro del grupo de los Criollos y por otros como parte del grupo Forastero, tiene características morfológicas y organolépticas propias e independientes de esos grupos [31].

El estudio reciente de accesiones colectadas en Ecuador en 1930, identificadas como grupo de cacao “Refractario”, han mostrado que su perfil genético es diferente al de los restantes grupos de germoplasma, con excepción del cacao Nacional de la costa ecuatoriana [41]. Los grupos de cacao también se diferencian por su comportamiento frente a las principales enfermedades del cultivo.

El grupo “Forastero” se caracteriza por su relativa resistencia a ciertas enfermedades y su alta productividad; sin embargo, en cuanto a calidad no se lo clasifica como “cacao fino”.

El cacao “Criollo”, referido inicialmente al cacao cultivado en Venezuela en la época de la conquista española y que actualmente agrupa los cacaos con

características similares a las de los antiguos criollos venezolanos, es afectado por las principales enfermedades fungosas del cacao. Sin embargo, el grupo “Trinitario”, botánicamente complejo y conformado por poblaciones híbridas de los dos anteriores, con características morfológicas, genéticas y organolépticas intermedias entre los dos grupos anteriores, presenta un mejor comportamiento frente a las enfermedades. Dentro de este grupo se ubica el clon CCN51 que es producto de investigaciones realizadas en el Ecuador, en la zona de Naranjal, por el Agrónomo Homero Castro [3]. Este clon presenta características de alta producción y tolerancia a las enfermedades pero no tiene el aroma que posee el Nacional, cacao Fino de Aroma o de Arriba.

El cacao Nacional ecuatoriano se distingue por su fino aroma frutal y floral. También denominado como cacao “arriba”, debido a que se lo cultivaba en la zona superior del Río Guayas (río arriba), constituye un rubro de elevada importancia económica para el país, altamente cotizado en el mercado internacional por su calidad y características propias. Sin embargo, sus frutos son susceptibles a enfermedades, principalmente a la Moniliasis causada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans *et al.* Esta enfermedad es la que más afecta la producción cacaotera del país, llegando a producir pérdidas económicas del 80% de la producción total esperada [19].

Debido a la importancia económica de la enfermedad para la producción de cacao en el país y a la reducida disponibilidad de información acerca de la biología, patogenicidad y epidemiología del agente causal en Ecuador, el presente trabajo de investigación tiene como hipótesis la existencia de variabilidad entre los aislados del patógeno en las distintas zonas productoras de la Costa Ecuatoriana.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Caracterizar morfológica, fisiológica y patogénicamente poblaciones de *Moniliophthora roreri* provenientes de fincas ubicadas en cinco provincias de la Costa Ecuatoriana, como parte inicial del estudio de las poblaciones del hongo en el país.

Objetivos Específicos

- Evaluar la evolución de la enfermedad en las zonas de estudio.
- Caracterizar morfológica y fisiológicamente los diferentes aislamientos en estudio.
- Evaluar la patogenicidad de aislamientos de *M. roreri*.

CAPÍTULO 1

1. EL CACAO EN EL ECUADOR: SITUACIÓN ECONÓMICA Y PROBLEMAS FITOSANITARIOS

1.1. Importancia económica del cultivo

El Ecuador ha sido tradicionalmente uno de los principales productores de cacao fino y de aroma. La actividad agrícola dedicada al cultivo de cacao tiene una historia relevante en la economía nacional y dominó varias décadas en la generación de divisas para el país, dando lugar a la aparición de los primeros capitales y el desarrollo de sectores importantes como la banca, la industria y el comercio [17].

Originalmente el cultivo de cacao tuvo su apogeo en la zona de Vinces, en la Provincia de Los Ríos y en la actualidad este cultivo se ubica a nivel nacional [34].

Desde principios de 1600 ya había pequeñas plantaciones de cacao a orillas del río Guayas y se expandieron a orillas de sus afluentes el Daule y el Babahoyo, ríos arriba, lo cual originó el nombre de cacao arriba en el mercado internacional. La variedad nacional, productora del cacao arriba y reconocido mundialmente por su aroma floral, es producido exclusivamente por Ecuador, conociéndolo como cacao fino y de aroma [35].

Entre 1820 y 1860 la producción tuvo una tendencia variable entre 120.000 a 160.000 qq por año, debido a la crisis del mercado mundial y las revoluciones internas en el país. A partir de esa década, se produjo un incremento de 15.000 TM (330.000 qq) en 1880 y 1890, siendo en este período el mayor exportador mundial del cacao [36].

La principal provincia productora de cacao del país es Los Ríos con el 28% de la superficie cultivada; le siguen las provincias del Guayas (22 %), Manabí (18%), Esmeraldas (7.5%), El Oro (5 %), Bolívar (4.4%),

Cotopaxi (4%) y Pichincha (3.6%). El 11.10 % restante está repartido entre las provincias del Azuay, Cañar, Chimborazo, Loja, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Sucumbíos [36].

Las exportaciones de cacao han ido en ascenso durante los últimos años. Es así que al finalizar el año 2006 se exportó \$178 millones; en 2007 se alcanzó los \$250 millones [9]; al cierre del 2008 las exportaciones ascendieron a 290 millones de dólares [24] y en el 2009 los ingresos por exportaciones de cacao sumaron unos 396 millones de dólares, con un total de 146.000 toneladas exportadas [10].

El cacao representa el tercer rubro de exportación agrícola del Ecuador y constituye una fuente de ingreso para más de 100.000 pequeños productores en diferentes provincias. Las exportaciones de cacao representan el 6.7% del PIB (Producto Interno Bruto), y los exportadores y productores constituyen el 12% de la PEA (Población Económicamente Activa) [11].

El Ecuador es el séptimo mayor productor de cacao del mundo, con una producción de más del 3% del total mundial. Apenas un 5% del cacao mundial se considera “fino y de aroma”, y el Ecuador es el

responsable de aproximadamente el 63% de su producción. Del total de la exportación ecuatoriana se estima que un 80% es cacao fino de aroma, mientras que el restante 20% pertenece a otras variedades como CCN51 [10,20].

1.2. Enfermedades fungosas en los frutos.

El cacao, como cualquier vegetal, es susceptible a la acción de microorganismos que alteran su desarrollo y en nuestro país es una de las principales causas para la baja productividad [37].

Las principales enfermedades fungosas que afectan a los frutos de cacao en el Ecuador son:

Escoba de bruja

El hongo causante de la enfermedad se lo conoce como *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (anteriormente *Crinipellis perniciosa*). Afecta a todos los órganos en crecimiento como brotes vegetativos y cojinetes florales; los síntomas se caracterizan por la presencia típica de escoba, o brotes hipertrofiados [2]. En condiciones apropiadas, las escobas se mantienen produciendo basidiocarpos y esporas durante meses [38,39].

Moniliasis

La enfermedad, conocida con los nombres de Monilla, Moniliasis, Pudrición acuosa, Helada, Mancha Ceniza o Enfermedad de Quevedo, es causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans *et. al.* La primera señal de la infección es la aparición de puntos o pequeñas manchas de un color que sugiere una maduración prematura en mazorcas que aún no han alcanzado su desarrollo completo. Las mazorcas con infecciones ocultas con frecuencia presentan tumefacciones [6,37]. Con el tiempo aparece en la superficie de la mazorca una mancha parda rodeada por una zona de transición de color amarillento [13].

Pudrición parda

Esta enfermedad es causada por el hongo *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, ataca 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. En el fruto la infección aparece bajo la forma de manchas pardas, oscuras, aproximadamente circulares, que rápidamente se agrandan y extienden por toda la superficie a través de la mazorca [19].

1.3. Moniliasis

1.3.1. Origen y distribución.

El primer informe de la existencia de la enfermedad fue dado por Martínez, citado por Rorer, en 1914, donde se hizo la descripción de la enfermedad y se estableció su primera aparición en Quevedo, provincia de Los Ríos, Ecuador [37].

En 1925, Rorer describió al agente causal de la moniliasis como un hongo del género *Monilia*. En 1931, Obando creyó que la enfermedad era causada por el hongo *Monilia fructigena*. En 1933, Ciferri y Parodi describieron las características fisiológicas y morfológicas del hongo y lo denominaron *Monilia roreri*.

En 1978, Evans y colaboradores, redescubrieron al hongo *M. roreri*; luego de observaciones al microscopio electrónico, determinaron la presencia de una septa doliporo en el micelio vegetativo, indicando afinidad con la clase Basidiomycetes, y describieron el desarrollo de las conidias en forma basipétala, por lo que propusieron ubicar al agente causal de la moniliasis en el género *Moniliophthora*. A partir de ese trabajo, el hongo

se denomina *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par) Evans *et al*, y corresponde a la siguiente clasificación taxonómica:

Clase: Basidiomycetes

Orden: Trycholomataceae

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *M. roreri* (Cif. & Par). Evans *et al*

La enfermedad moniliasis durante muchos años se dijo que se detectó en el año de 1914 en Ecuador (Ampuero, 1967; Barros, 1980), pero recientes estudios realizados por Phillips (2006), mencionan que el origen de esta grave enfermedad se dio en Colombia hacia el año 1800; desde entonces se ha dispersado a 11 diferentes países sur y centroamericanos productores de cacao (Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Honduras, Guatemala, Belice y México) [29,37,38,39], ocasionando pérdidas superiores al 90% de la producción y el abandono del cultivo por miles de productores a lo largo del continente americano, situación que ha causado efectos negativos en la comunidad de cacaocultores y en estos agroecosistemas [32].

Ubicación de los grupos genéticos, rango de hospedantes y de adaptación de la enfermedad.

A nivel internacional, se han identificado cinco grupos genéticos principales del hongo, tres son endémicos y están localizados dos en la Cordillera Central y Oriental de Colombia y uno en Ecuador. Los otros dos están ampliamente distribuidos y se encuentran en una fase invasiva, localizándose uno de los grupos en el Oriente de Colombia y la periferia de Ecuador, Venezuela y Perú; y el otro en el Occidente de Colombia, Centro de Ecuador y América Central [28].

El rango de adaptación de la enfermedad se encuentra en una altitud entre 0 - 1520 m.s.n.m., con una precipitación promedio de 780 - 5500 mm y una temperatura promedio de 18 a 28 °C. Las esporas requieren de agua libre o de una humedad relativa cercana al 100% para su germinación.

Las investigaciones han permitido determinar que los síntomas varían con la edad del fruto al momento de la infección, pero la velocidad de desarrollo depende de las condiciones

ambientales, básicamente de la temperatura [5] y de la susceptibilidad del clon o variedad de cacao [30].

La época crítica para la infección de *M. roreri*, son los cuatro primeros meses de formación de frutos desde la floración.

Los únicos hospedantes son los frutos de los géneros *Theobroma* (*T. cacao*, *T. mammosum*, *T. gileri*, *T. bicolor* y *T. grandiflorum*) y *Herrania* [25,30].

Diseminación de *M. roreri*

Las esporas de *M. roreri* son los únicos propágulos infectivos, que se diseminan fácilmente por acción del viento y de las gotas de lluvia [4,33,38].

Sobrevivencia del patógeno

El patógeno permanece en el estado de conidias, que son de forma globosas, subglobosas y elípticas (8-20 x 5-14 μm) [15] en los frutos infectados que se encuentran adheridos a las plantas. En frutos momificados, el hongo produce varios ciclos de esporulación, hasta por períodos de más de nueve meses [21].

En frutos caídos al suelo o colocados debajo de la hojarasca, el patógeno sobrevive menos tiempo, debido a que el fruto es atacado por los microorganismos, lo cual lleva a su descomposición; algunos microorganismos presentes en el suelo pueden afectar al patógeno, ya sea por antibiosis o parasitismo [33].

Las esporas germinan sobre la mazorca y penetran vía intercelular directamente a través de la epidermis, a cualquier edad de la mazorca; posteriormente el patógeno se torna intracelular, momento en el cual comienzan los síntomas de la enfermedad [29]. Finalmente a través de los estomas asoma micelio, que produce abundante cantidad de esporas a partir de conidióforos simples [14].

1.3.2. Signos y síntomas de la enfermedad

Una de las características del hongo *Moniliophthora roreri* es su largo período de incubación (tiempo que tarda desde que infecta el fruto hasta que se observa algún síntoma externo en él). Este tiempo puede ser de tres a ocho semanas, dependiendo de la edad del fruto, la severidad del ataque, la

susceptibilidad del árbol y las condiciones de clima, principalmente presencia de lluvias.

Síntomas externos

Las mazorcas con edad menor a un mes presentan maduración prematura, marchitez y secamiento.

Los frutos de uno a tres meses presentan deformaciones o abultamientos; mazorcas de dos a tres meses presentan puntos verde oscuro o deformaciones.

Luego de los primeros síntomas aparece la mancha color marrón o chocolate, a los pocos días sobre la mancha café aparece el micelio y luego las esporas de color crema [16,18].

Síntomas internos

El daño interno causado por la moniliasis es aún más grave que el daño externo, porque se pierden casi todas las almendras, sin importar la edad del fruto. En los frutos jóvenes no hay formación de semillas por lo que se genera una masa fibrosa, debido a la descomposición de los tejidos y son más pesados que los sanos [16].

En frutos afectados de dos a tres meses de edad, se forman las semillas pero luego se pudren al ser infectadas por el hongo.

1.3.3. Manejo de la enfermedad.

Para el combate de la enfermedad se ha recomendado un manejo de la sombra que permita un mayor paso de luz y una mayor aireación para reducir la humedad ambiente; realizar podas periódicas; cosechar los frutos maduros periódicamente; evitar el encharcamiento del cultivo y eliminar los frutos afectados enterrándolos, tratando de no diseminar las esporas del hongo por la plantación [8,19,23]. Dentro del manejo integrado para el control de la moniliasis del cacao se considera:

Prácticas culturales

El control se basa en la creación de un ambiente favorable al cacao y a la vez desfavorable al patógeno, permitiendo una menor pérdida de frutos pero en convivencia con la enfermedad.

Entre las prácticas de cultivo que conducen a una modificación del ambiente, tornándolo inapropiado para el desarrollo de la enfermedad, se destacan las siguientes:

- a) Podas suaves y frecuentes, que ayuden a mantener los troncos y ramas principales libres de brotes, chupones o hijos y de ramillas perjudiciales.

La poda oportuna permite que la luz solar penetre al interior de la plantación y que circule mejor el aire dentro de la misma [22]. También es fundamental para estimular la floración y a la vez facilitar la labor de cosecha de los frutos sanos.

- b) Regulación del sombrío permanente, así se obtiene una apropiada entrada de luz en la plantación y una buena cantidad de aire en circulación, favoreciendo un rápido escape del vapor de agua. Además, es indispensable regular el sombrío para un mejor aprovechamiento de los fertilizantes.

- c) Adecuado sistema de drenaje, para evitar el encharcamiento del agua de las lluvias y reducir la alta humedad relativa dentro del ambiente de la plantación.

- d) Deshierbes frecuentes y oportunas, para facilitar la libre circulación del aire y hacer que el ambiente se mantenga más seco, evitando la condensación del rocío durante las noches.

- e) Eliminar dos veces por semana en los meses de lluvia los frutos afectados por la moniliasis que se encuentren en la plantación, para evitar que el hongo forme las estructuras reproductivas.

Prácticas fitosanitarias

Estas prácticas buscan disminuir la fuente de inóculo de las enfermedades y reducir el número de plagas, la cual considera la remoción de tejidos enfermos que deberán ser eliminados con las ramas indeseables al momento de poda.

Otras posibilidades de control

Control químico

El uso de fungicidas ha sido sugerido para controlar la moniliasis del cacao en diversos lugares, sin embargo son poco efectivos y costosos, lo cual determina que este método sea poco apropiado.

Control biológico

Actualmente se está evaluando la efectividad de algunos hongos antagonistas a los patógenos, entre ellos a *M. roleri*. Entre estos antagonistas se encuentran miembros de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* [33].

Los hongos endofíticos son habitantes de los tejidos internos de las plantas, sin causar daño aparente y existen en una relación que puede ser considerada como simbiosis mutualística. Se ha propuesto que muchos endófitos protegen sus hospedantes (plantas) produciendo micotoxinas que disuaden a los herbívoros de atacarlos y antibióticos u otras sustancias que suprimen patógenos [33].

Según el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) existen gusanos de una polilla no identificada que se alimenta de *M. roreri* [17].

1.3.4. Importancia económica de la enfermedad

La Moniliasis ha provocado, en casi todos los países donde ha llegado, el abandono de muchas plantaciones, ya que se puede perder hasta el 80% de la producción [12].

En Ecuador, Ampuero (1967) señala que las pérdidas estimadas van desde un 15% hasta un 80% [14,32]. En Venezuela, Meza y León (1972) y Capriles señalan pérdidas entre el 40 y 50% de la producción por su daño [32].

En Colombia se han reportado pérdidas del 55% de la cosecha [12]. En Costa Rica, Enríquez y Suárez (1978) y Enríquez y colaboradores (1979) mencionan que la producción nacional en 1978 fue de 9.500 toneladas por año y debido a la presencia de la enfermedad, el rendimiento se redujo en 1982 a 3.500 toneladas; en cinco años de ingresada la enfermedad, la producción se redujo al 72% [32]. En Honduras, la producción de cacao en 1997, antes de la llegada de la

moniliasis, fue de 4.500 toneladas de cacao; en 2003, por efecto de esta enfermedad, la producción tan solo alcanzó 900 toneladas [32]. En México a dos años de su detección, las pérdidas debidas a este patógeno son de alrededor del 50% [32].

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Análisis de la zona en estudio.

El presente trabajo se llevó a cabo en 10 fincas de pequeños productores, localizadas en cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. Su selección fue a través de un muestreo dirigido en las plantaciones con producción de Cacao Nacional.

La tabla 1 muestra un resumen de los datos climáticos de las zonas evaluadas.

TABLA 1. Datos climatológicos de las zonas evaluadas

Zonas	Altitud (msnm)	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)	H.R (%)
Quinindé-Esmeraldas	15	30 +/- 2	2000	87
Calceta- Manabí	6	30 +/- 1	1300	82
Balao-Guayas	10	26 +/- 2	1000	76
Vinces-Los Ríos	6	31 +/- 3	1867	85
Santa Rosa-El Oro	13	30.5 +/- 1	1500	76

Fuente: Datos tomados del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), 2009.

En estas fincas de las cinco provincias se evaluó la evolución de la enfermedad en 10 árboles de cacao en cada finca de forma completamente aleatoria; se recolectó 20 frutos con los diferentes síntomas de la enfermedad, descritos en detalle en el epígrafe 2.2.1, que posteriormente fueron llevados al laboratorio para continuar con el estudio.

2.1.1. Evaluación de la evolución de la enfermedad en las diferentes zonas de estudio.

A los árboles seleccionados se les evaluó la evolución de la enfermedad. Previamente se elaboró una ficha de campo (ANEXO 1), la cual sirvió para el registro de datos de la presencia de la enfermedad en las fincas evaluadas.

2.2. Metodología de campo

La metodología de campo aplicada en este estudio, considera procedimientos desde el reconocimiento de síntomas hasta la obtención de muestras para el aislamiento del agente causal.

2.2.1. Recolección e identificación de mazorcas con síntomas de Moniliasis de las zonas en estudio

Un total de 20 mazorcas que presentaban características de la enfermedad, de acuerdo a los criterios de Ampuero (1967), Suárez (1971), Barros (1977) y Campuzano (1980), fueron seleccionadas en cada una de las zonas de estudio. Se seleccionaron mazorcas con diferentes síntomas: pequeños puntos aceitosos, con deformaciones o protuberancias,

mazorcas momificadas, con manchas de color café (mancha chocolate) y mazorcas que mostraban un crecimiento micelial color blanco y con esporulación de color crema.

2.2.2. Observación macroscópica del crecimiento del hongo

Por medio de observación directa se pudieron observar las características morfológicas del crecimiento del hongo.

2.3. Protocolo para aislamientos de *Moniliophthora roreri*

El protocolo utilizado en este estudio fue el propuesto por Phillips-Mora (2006). La Figura 2.1 muestra gráficamente los pasos fundamentales para la obtención de aislamientos puros de *M. roreri*.



FIGURA 2.1 Procedimiento para la obtención de aislamientos puros de *M. roreri*.

2.3.1. Desinfección de las muestras

Las muestras de mazorcas recolectadas en campo, se colocaron en fundas de papel kraft; luego fueron llevadas al laboratorio donde fueron fotografiadas, analizadas según sus síntomas y codificadas. Seguidamente se seccionaron (semilla, mucílago, parte interna sana, parte interna enferma, etc.) y colocaron en hipoclorito de sodio al 10% para su desinfección. Una vez transcurridos dos minutos, los fragmentos de tejidos se enjuagaron tres veces, sumergiéndolos en agua destilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito, procediendo al secado de las muestras antes de la siembra.

2.3.2. Siembra de las muestras

Las muestras ya desinfectadas se sembraron en cajas Petri que contenían medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y Agar Nutritivo (AN); posteriormente se colocaron en una incubadora a 27°C en oscuridad para el crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

Una vez identificado el patógeno de interés, los cultivos fueron transferidos a un medio específico (V8MAA: Jugo V8-Maltosa-Asparagina-Agar) para medir el crecimiento diario y el peso

micelial en medio líquido (V8MA+PDB), utilizando 10 aislados por cada una de las provincias (ANEXO 2) y realizando cinco repeticiones por cada uno de los aislados. El medio específico mencionado es indispensable para que el hongo se desarrolle y produzca mayor número de conidias (Ausebel, 1989).

Las pruebas de caracterización se realizaron utilizando discos de micelio que fueron cortados con un sacabocados de 7mm de diámetro.

2.3.3. Crecimiento en medio líquido.

Para el crecimiento de *M. roreri* en medio líquido se utilizó V8MA (Jugo V8-Maltosa-Asparagina) + PDB (Caldo de Papa Dextrosa). Esta mezcla de medios se dispensó en frascos de vidrio y fueron esterilizados en una autoclave a 121°C y 15lb./pulg² por 25 minutos.

Una vez esterilizado el medio de cultivo se procedió al proceso de siembra. Discos de micelios de las cajas en medio sólido fueron obtenidos con la ayuda de un sacabocados de 7mm; depositados en el medio líquido y puestos en una zaranda con

una agitación a 120 r.p.m bajo oscuridad a 26°C para su crecimiento. Para realizar este ensayo se utilizaron los aislados E5, E6, E7, E8, E9, M1, M3, M6, M9, M10, G2, G3, G6, G7, G10, R1, R2, R4, R6, R8, O2, O3, O4, O6, O8, realizando tres repeticiones por cada uno.

2.4. Caracterización morfológica del hongo

Las 50 colonias del hongo que se obtuvieron fueron evaluadas periódicamente en base a características morfológicas como color y borde de las colonias, tipo de micelio (textura) y su crecimiento, realizando cinco repeticiones por cada aislamiento.

El parámetro color fue calificado siguiendo lo especificado en trabajos realizados por Phillips-Mora (2006), en el que describe los colores de las colonias de *M. roreri* (Tabla 3).

TABLA 2. Rango de colores para evaluar a los aislamientos morfológicamente con respecto al color de las colonias.

NÚMERO	COLOR
1	café claro
2	café claro – blanco
3	café oscuro - café claro – blanco
4	crema- café oscuro - café claro – blanco
5	café oscuro – blanco
6	café oscuro - crema – blanco
7	crema- café claro- blanco

2.4.1. Selección de muestras por el color y textura

De las 50 muestras obtenidas en cada una de las zonas evaluadas, se eligieron crecimientos del hongo *M. roreri* de acuerdo a las características morfológicas diversas que presentaron, basada en las observaciones diarias de color y textura de la colonia, realizando cinco repeticiones por cada uno de los aislados.

2.4.2. Forma y tamaño de conidias

La evaluación de la forma y tamaño de las conidias se realizó a partir de los microcultivos obtenidos en medio sólido V8MAA sobre láminas porta-objeto. El medio de cultivo fue depositado

en las láminas; se realizó la inoculación con esporas del hongo y posteriormente se colocó en una incubadora a 27°C en oscuridad. A partir de los tres días se iniciaron las evaluaciones utilizando microscopio invertido (40X), con el que se diferenció sus estructuras de diseminación.

El tamaño de conidias de los 50 aislamientos obtenidos se determinó midiendo el largo y ancho de 10 conidias escogidas completamente al azar, utilizando un micrómetro ocular. La fórmula aplicada para determinar el tamaño real de las conidias en un lente de 40X fue la siguiente:

$$\text{Ø campo visual objetivo} = \text{Ø campo visual ocular} / \text{magnificación}$$

2.5. Caracterización fisiológica del hongo.

Esta caracterización se basó en el crecimiento diario del hongo, evaluado por el peso de micelio cuando se empleó medio líquido a 26°C y por el diámetro de las colonias al utilizar medio sólido a 27°C.

2.5.1. Crecimiento en medio líquido.

El micelio que creció en medio líquido a 26°C, se pesó a los 21 y 30 días. A las dos horas se obtuvo el peso húmedo y a las cuarenta y ocho horas el peso seco. Para realizar el análisis de los datos se utilizó los promedios del peso seco de cada aislamiento. Este ensayo se realizó en base al protocolo que es usado para evaluar el peso de micelio de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Jiménez, 2009).

2.5.2. Producción y conteo de conidias

La producción de conidias fue utilizada para el estudio de la patogenicidad de los 50 aislamientos. Su proceso se realizó en medio sólido después de 15 días de crecimiento de los aislamientos. Para el conteo de las conidias se preparó una solución en agua destilada estéril y se determinó el número de conidias en la suspensión. Este conteo se realizó en una cámara de Neubauer donde se colocó 20 μ l de la solución conidial y con ayuda de un microscopio de luz se contó las conidias contenidas por ml. Se determinó una concentración de 1×10^6 conidias/ml por cada una de las muestras, las que se utilizaron para el proceso de inoculación.

2.5.3. Medición de crecimiento del hongo en placa.

El crecimiento radial de cada uno de los aislamientos se evaluó en cajas Petri con medio V8MAA mantenidas a 27°C en oscuridad.

Las mediciones del crecimiento de *M. royeri* fueron registradas diariamente durante 15 días, tiempo en que el hongo alcanzó su crecimiento completo en la caja Petri.

2.6. Prueba de patogenicidad.

La prueba de patogenicidad se realizó con el fin de observar la capacidad de los 50 aislamientos para reproducir los síntomas de la enfermedad sobre frutos sanos. Se emplearon dos mazorcas por aislamiento, utilizando para las inoculaciones un total de 100 mazorcas pequeñas de aproximadamente 10 cm de largo de cacao “Nacional”

La inoculación dirigida se realizó utilizando el método de conidias secas (Phillips-Mora, 1987), las mismas que fueron adheridas a la cabeza con un alfiler, depositándola en una zona de la mazorca de aproximadamente dos centímetros cuadrados, previamente marcada

y humedecida con agua estéril. Las mazorcas inoculadas fueron colocadas en una cámara húmeda para favorecer la germinación de las esporas. El sitio de inoculación se marcó para facilitar el seguimiento del desarrollo de la enfermedad y la evaluación de síntomas.

Se evaluó la severidad externa, siguiendo lo recomendado por Sánchez (1982), mediante una escala sintomatológica de 0 a 5, cuyas características se describen a continuación:

Grado 0= Ningún síntoma aparente

Grado 1= Pequeños y pocos puntos aceitosos

Grado 2= Puntos aceitosos bien definidos y abundantes, mas deformación o madurez irregular

Grado 3= Necrosis sin esporulación

Grado 4= Necrosis más esporulación en un área menor de la cuarta parte de la superficie necrótica

Grado 5= Necrosis más esporulación en un área mayor de la cuarta parte de la superficie necrótica.

2.7. Protocolo para conservación del hongo

La conservación de los 50 aislamientos obtenidos se realizó a través del método de liofilización. A partir de las colonias puras de los aislamientos obtenidos y caracterizados, se prepararon suspensiones de micelio de 2 ml de agua destilada estéril por cada caja Petri, y fueron colocadas en frascos para liofilizar. Previo a la liofilización se procedió a realizar una precongelación a $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 27 min. Luego se inició el proceso de liofilización a una presión de 133×10^{-3} mbar y una temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$; se concluyó el proceso transcurridas 20 horas, con una presión de 46×10^{-3} mbar y una temperatura de $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se retiró los frascos del liofilizador, se envasó su contenido en tubos de 15ml y se colocaron en un congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.8. Análisis estadísticos

Para caracterizar los diferentes aislamientos obtenidos de las provincias estudiadas, se utilizaron métodos de estadística multivariada, tales como Análisis de Conglomerado, Componentes Principales y Regresión Polinómica. Para determinar si existen diferencias significativas entre los parámetros evaluados, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey. Previo a ello se

realizaron las pruebas de normalidad (Kolmogorov Smirnov) y la homogeneidad de varianzas (Levene). Para ello se utilizó el Software INFOSTAT, versión Estudiantil y el SPSS versión 12.0.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la evolución de la moniliasis en las zonas de estudio

De manera general se resume el estatus sanitario de las áreas evaluadas en las fincas monitoreadas (figura 3.1). En todas las fincas el porcentaje de mazorcas infectadas fue superior al 25%. Las áreas evaluadas en la provincia de Guayas presentaron los menores porcentajes de infección, difiriendo significativamente ($P \leq 0,05$) de las restantes. Los mayores porcentajes de infección de mazorcas fueron encontrados en las fincas de las provincias de Los Ríos, Esmeraldas y Manabí, cuyos resultados no difirieron significativamente entre sí ($P \leq 0,05$).

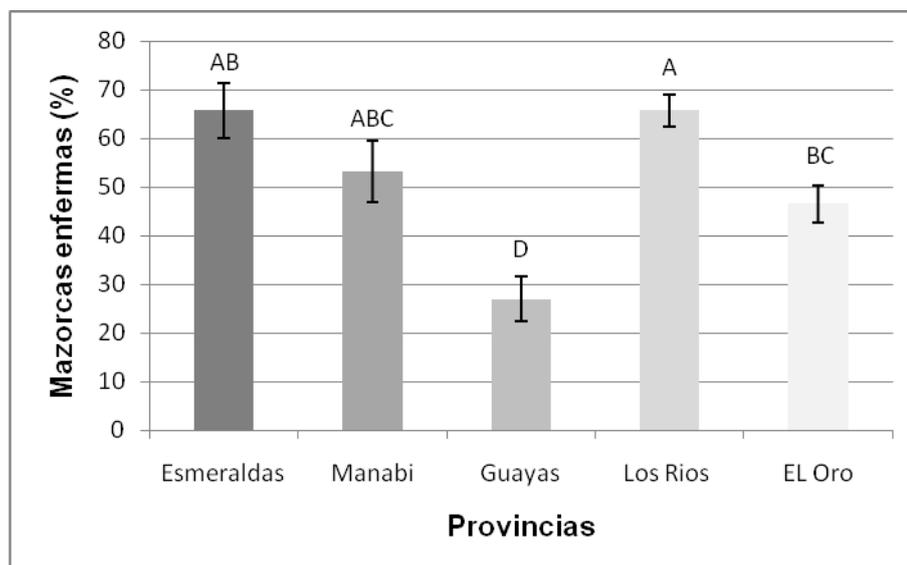


FIGURA 3.1 Análisis comparativo del estatus sanitario con respecto a la infección de *M. royeri* en las diferentes fincas, basadas en el porcentaje de mazorcas enfermas. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

El mayor porcentaje de mazorcas enfermas encontrado en las áreas evaluadas de las provincias de Los Ríos y Esmeraldas, puede deberse a condiciones ambientales propicias para el desarrollo de la enfermedad en la zona de estudio (temperaturas extremas, humedad, exposición a la luz ultravioleta, etc.) tal como señala Porras y Sánchez (1991), así como también a las condiciones de las plantaciones en el momento de la evaluación (control inadecuado de malezas, plantas de cacao mal podadas, etc.).

Síntomas y signos de la enfermedad evaluadas en las zonas de estudio

Los síntomas y signos característicos de la enfermedad en las diferentes áreas evaluadas se presentan en la figura 3.2, mientras que el porcentaje en que cada uno de estos fue encontrado se muestra en la figura 3.3.



FIGURA 3.2 Muestras de mazorcas con síntomas y signos de Moniliasis encontrados en las evaluaciones en campo; (a) Deformaciones; (b) Mancha chocolate; (c) Esporulación; (d) Momificación.

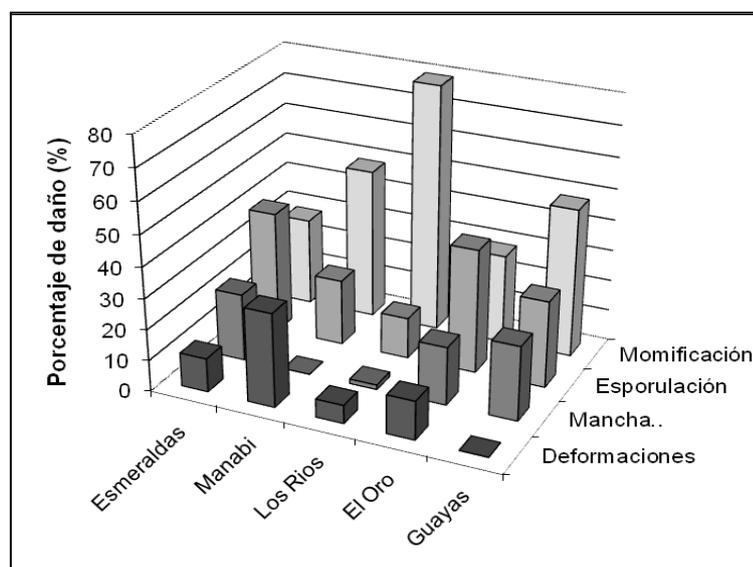


FIGURA 3.3 Porcentaje de daño de la enfermedad Moniliasis evaluado a través de síntomas y signos característicos en mazorcas, obtenidas en las diferentes fincas de las cinco provincias.

Caracterización Morfológica

Color de micelio

Las tonalidades de colores del micelio observados en los aislamientos variaron según los días de crecimiento. La figura 3.4 muestra las colonias predominantes con los colores descritos.

La figura 3.5 muestra el agrupamiento de las colonias de acuerdo a las tonalidades de colores que presentaron los aislamientos procedentes de las fincas muestreadas. En la provincia de Los Ríos se ubicaron en un solo grupo; en ellos el color de las colonias fue el crema-café claro-blanco y no se observó mucha variación en cuanto a las tonalidades del

color. La mayoría de los aislamientos de las fincas muestreadas en la provincia de Esmeraldas presentaron la tonalidad de color café claro-blanco, excepto para el aislamiento E9, que presentó tonalidades de café oscuro-blanco a café oscuro-café claro, y se agrupó junto a los aislamientos provenientes de las fincas muestreadas de las provincias de Manabí y Guayas, así como a los aislamientos O6, O9, O10 (fincas de la provincia de El Oro). En general, los aislamientos obtenidos en áreas de la provincia de El Oro presentan mayor variabilidad en la tonalidad de colores, observándose para el aislamiento O1 mayor cantidad de colonias con color café oscuro-café claro-crema-blanco; los aislamientos O2, O3, O5, O7, con colores que van del café oscuro-café claro a café oscuro-café claro-crema-blanco; los aislamientos O4, O8 presentaron colores muy diferentes a los demás aislados, al mostrar tonalidad de colores de café-claro a café oscuro-café claro-crema-blanco.

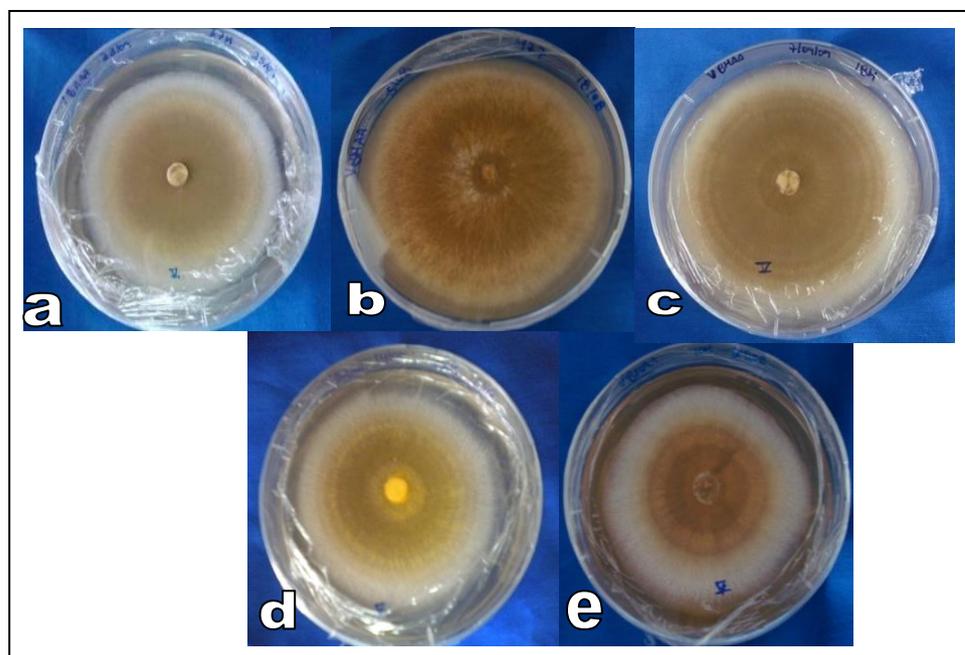


FIGURA 3.4 Colonias de *M. royeri* con coloración más predominante en medio V8MAA a los 15 días (a) Aislamiento E5; (b) Aislamiento M1; (c) Aislamiento G2; (d) Aislamiento R1; (e) Aislamiento O2.

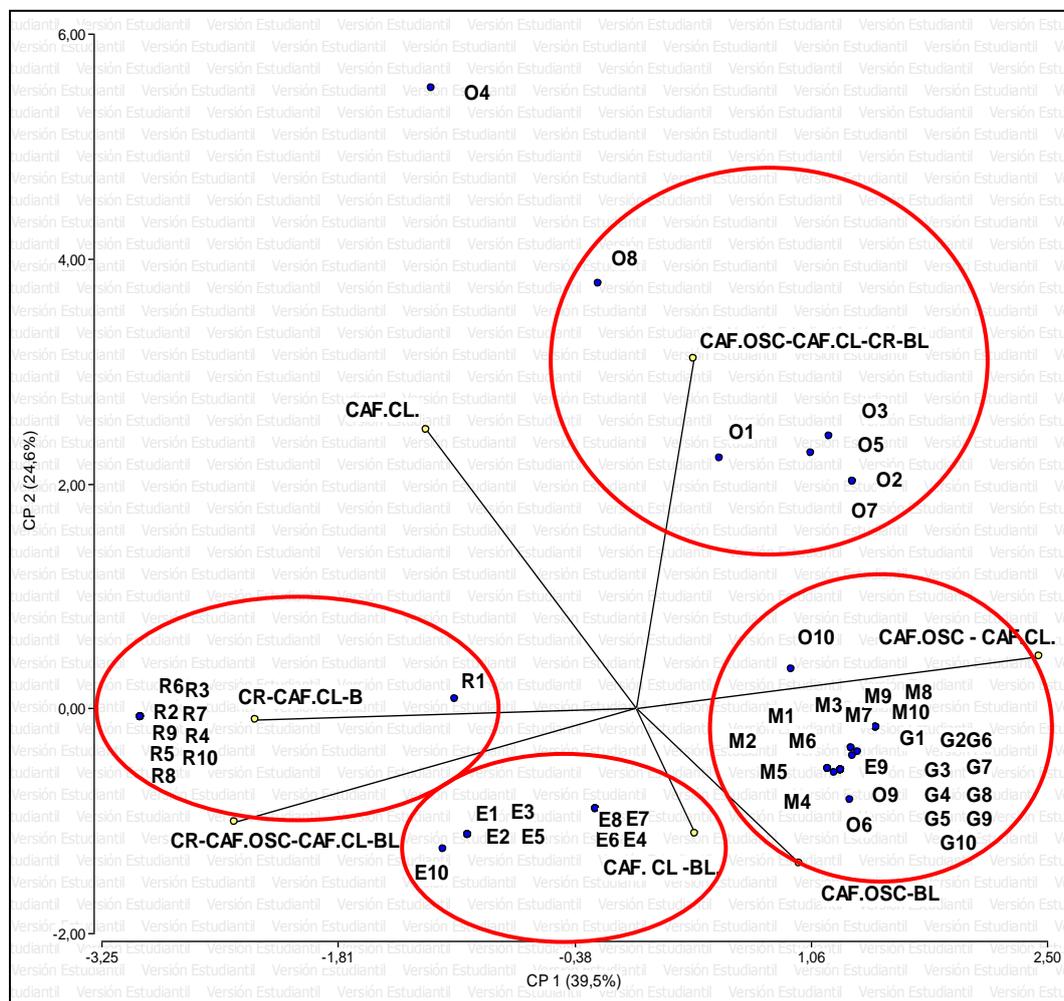


FIGURA 3.5 Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales para la caracterización del micelio según la coloración en los diferentes aislamientos de *M. royeri* procedentes de fincas ubicadas en cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. Se incluyen los colores analizados por categorías.

Las tonalidades de colores observados en las colonias son características de *M. roreri*, de acuerdo a lo manifestado por algunos autores (Castaño, 1952; Cubillos, 1970; Barros 1977; Suárez 2004).

Las colonias de *M. roreri* tienen una considerable variabilidad morfológica en cuanto a tonos de coloración del micelio que varían del blanco, crema, hasta el pardo (Phillips-Mora, 2006), por lo que este parámetro no es un marcador morfológico para diferenciar fenotipos entre los aislados. Sin embargo, el aislamiento O4 varió en la tonalidad de los colores predominantes que muestran los demás aislamientos, lo que sugiere una posible variación morfológica con respecto a los demás aislamientos.

Borde y textura de colonia

Todas las colonias obtenidas presentaron borde regular y textura pulverulenta (figura 3.6), característica morfológica descrita por Phillips-Mora (2006) y Pérez (2008). Debido a la homogeneidad de estos parámetros morfológicos, no se encontraron diferencias significativas entre los aislados.

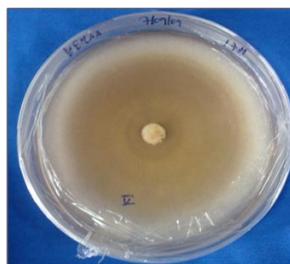


FIGURA 3.6 Aislamiento E5 de *M. roreri* con borde regular y textura pulverulenta, en medio V8MAA a los 15 días.

Forma de conidias

Las conidias presentaron formas globosas, subglobosas y elípticas (figura 3.7).

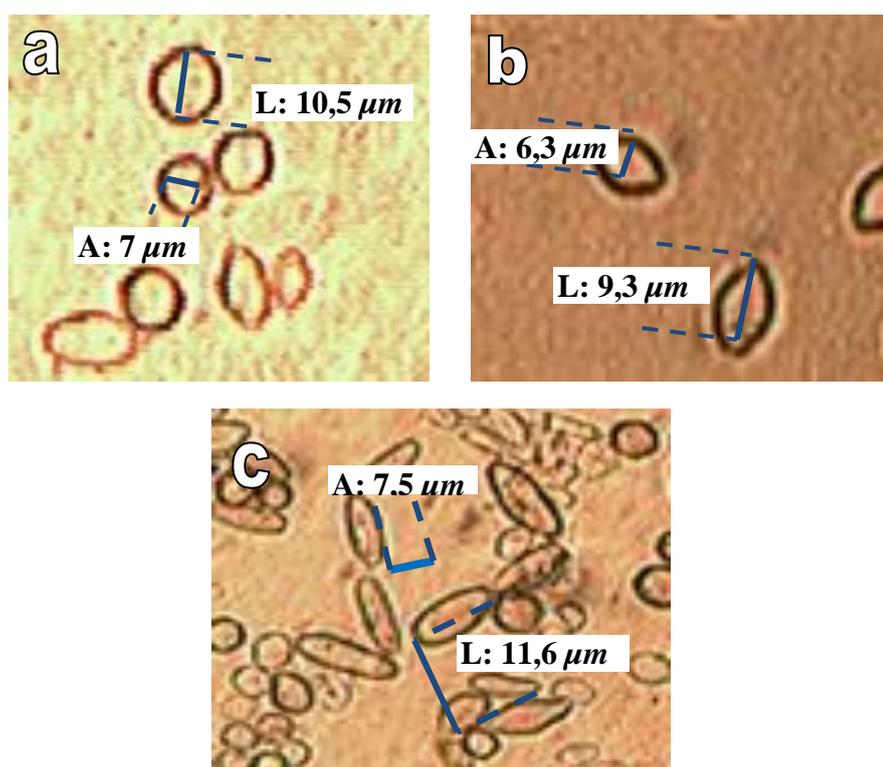


FIGURA 3.7 Forma de las conidias en los diferentes aislamientos de *M. royeri*. (a) Aislamiento M1, conidias globosas; (b) Aislamiento E5, conidias subglobosas; (c) Aislamiento R3, conidias elípticas.

La forma de las conidias obtenidas en medios de cultivos sólidos coincide con las reportadas por Evans (1978) y Suárez (2004), quienes describen la forma de conidias de *M. royeri* desde globosas a elipsoidales y por

Holiday (1970), el que caracteriza a las conidias como variables con forma globosa, sub-globosa o elipsoidal.

Tamaño de conidias: largo y ancho

En el tamaño de conidias, se obtuvieron aislados con diferentes tamaños en cuanto a largo y ancho. La mayoría de los aislados presentaron las dimensiones descritas por Evans (1978), los aislados M3, O5, M6, O1, O9, E5, M8, O6, M10, O10, G8, G4, O3, G3 presentan menores valores en el largo y ancho de sus conidias (figura 3.8).

La figura 3.9 muestra la frecuencia de los aislados que presentaron valores inferiores a los descritos por Evans (1978) para la longitud de conidias, el cual manifiesta que su longitud está entre 8-15 μm de. Los aislados M3 y M6 se distinguen por poseer mayor número de conidias más cortas que 8 μm , seguidas por los aislados O1, O5, O9.

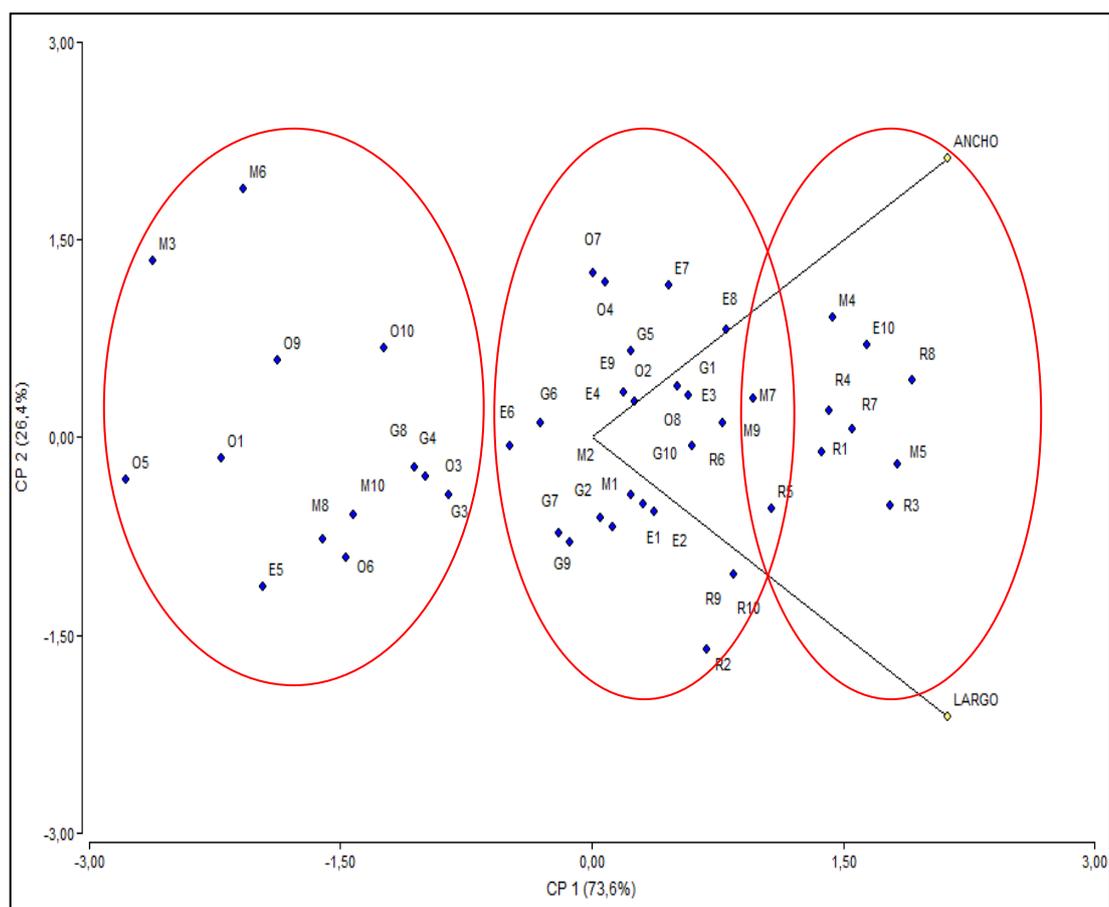


FIGURA 3.8 Comportamiento del tamaño (largo y ancho) de conidias en los diferentes aislamientos de *M. royeri* procedentes de fincas localizadas en cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. Los aislamientos se desarrollaron en medio sólido V8MAA durante 15 días.

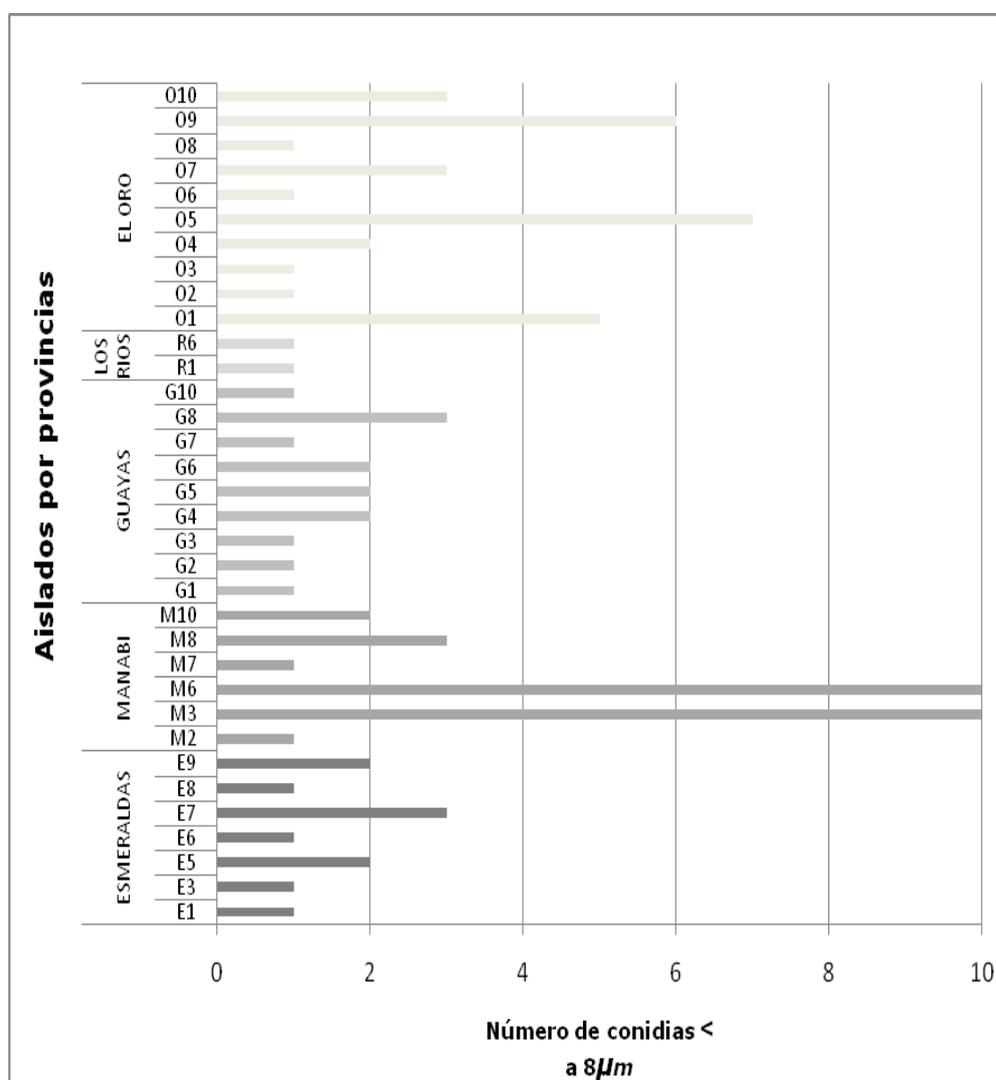


FIGURA 3.9 Distribución de los aislamientos que presentaron conidias de longitud inferior a 8 μm . Las conidias evaluadas fueron obtenidas a partir de los aislamientos en medio sólidos V8MAA de muestras procedentes de diferentes fincas en cinco provincias de la Costa.

Según estudios realizados en otros hongos por Adaskaveg y Hartin (1997), se considera que el tamaño de las conidias es una característica que puede variar tanto en condiciones de campo como en condiciones controladas.

Caracterización Fisiológica

Crecimiento en medio líquido evaluado mediante el peso de micelio

En la evaluación realizada se muestra los resultados del crecimiento de los aislamientos de las fincas muestreadas en las diferentes provincias en medio líquido (figura 3.10), evaluado a través del peso del micelio a los 21 y 30 días de incubación. Al analizar estos resultados se evidencian diferencias en el comportamiento del desarrollo de los aislados bajo estudio a través del tiempo. A los 21 días los aislamientos E7 y E9 mantienen su máximo desarrollo seguidos por los aislamientos O2, O6, O4, R1, E5, R8, O3 y E6.

Al evaluar los aislados en el lapso de 30 días se puede evidenciar que la mayoría de los aislamientos de la provincia de Guayas tienen una mayor masa micelial, excepto el aislamiento G2 que posee menos peso, seguidos por los aislados M1, M9, M10 y M6; en cuanto a las muestras de fincas de Manabí, estos mantienen su masa micelial similar a los de los 21 días. El mismo comportamiento se observa para los aislamientos R4, R6 y O8.

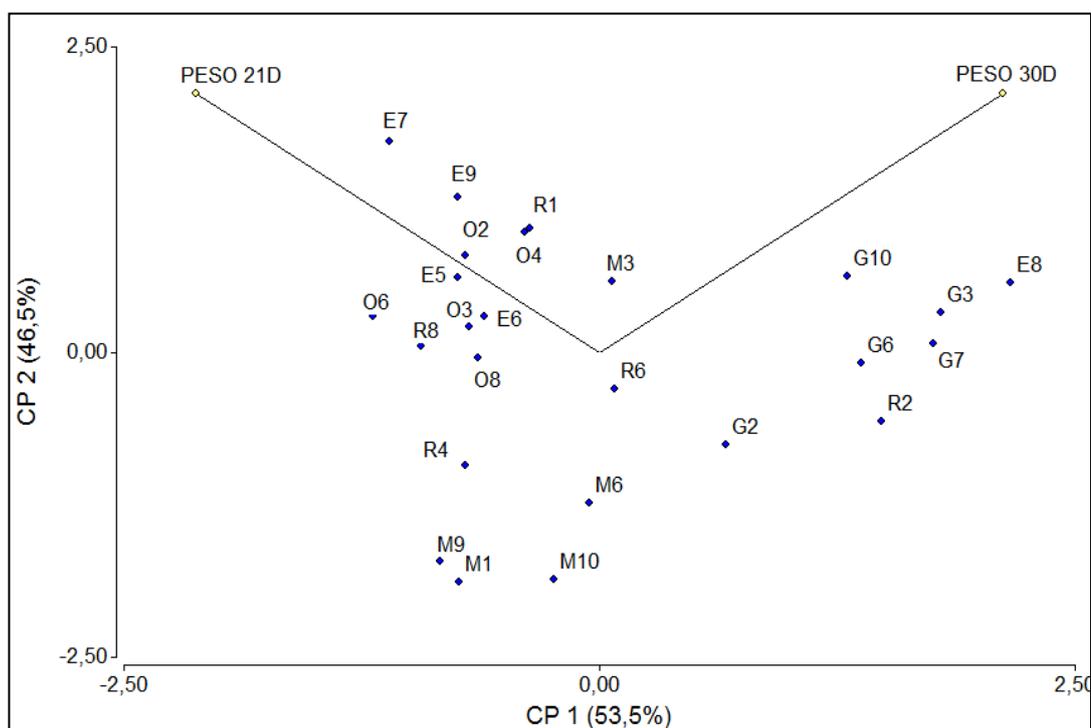


FIGURA 3.10 Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales para la caracterización del peso de masa micelial de aislamientos de *M. roreri* en las diferentes fincas de las cinco provincias a los 21 y 30 días en medio líquido.

Crecimiento en medio sólido

El comportamiento del crecimiento de los aislamientos en cada una de las fincas muestreadas en las provincias estudiadas se resume en la figura 3.11. Los aislamientos E6, E7 y los aislamientos de Los Ríos, excepto los aislados R1 y R8, mostraron un crecimiento mayor al de los demás aislamientos a partir del primer día de evaluación, en

contraposición a los aislados de fincas del Guayas y El Oro, cuyo crecimiento fue el más bajo, al igual que los aislamientos M4 y M6. Los demás aislamientos mantuvieron un comportamiento homogéneo.

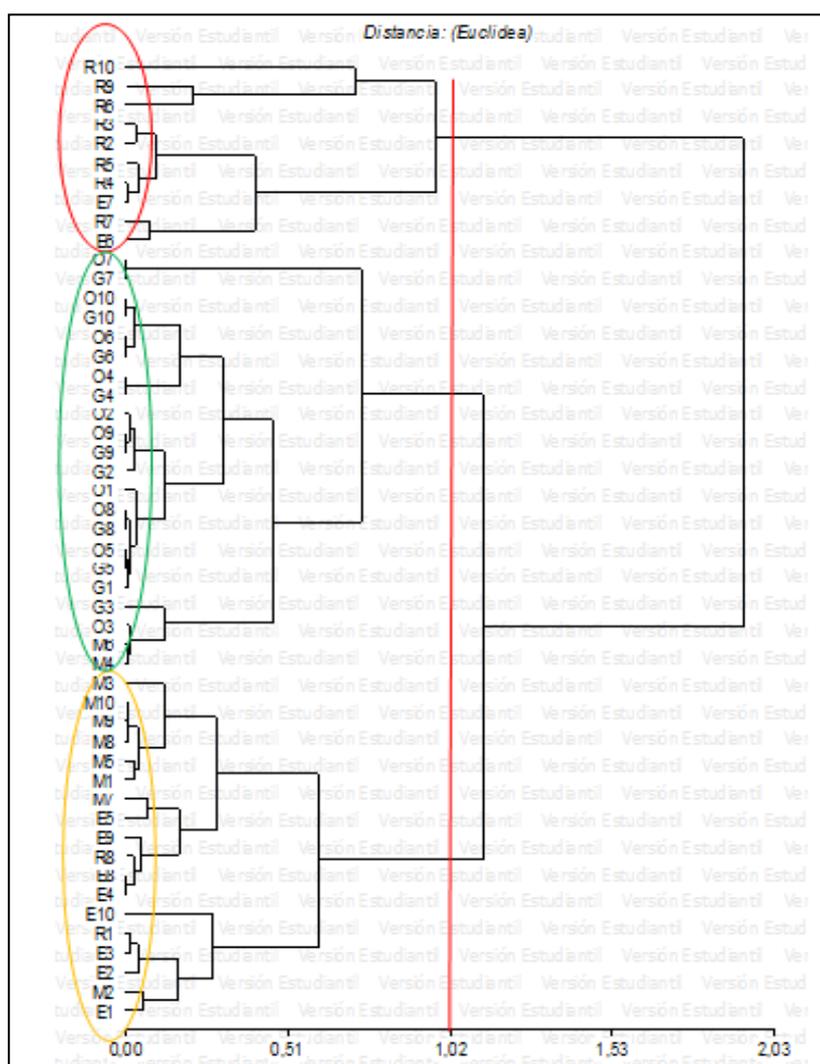


FIGURA 3.11 Dendrograma obtenido del análisis de conglomerado, aplicando el método del promedio y distancia Euclídea para evaluar el comportamiento del crecimiento de las colonias de *M. roveri* en un periodo de quince días en medio sólido.

La variabilidad presente en el crecimiento de las colonias se considera en respuesta a las características fisiológicas de cada aislamiento y su interacción con factores ambientales y el medio de cultivo, de acuerdo a lo expresado por Rivero (1986) en estudios con otros hongos. Sin embargo en este estudio no se consideraron estos parámetros ya que las condiciones de incubación, temperatura, oscuridad y medio utilizado fueron las mismas para todos los aislamientos, por lo que la variabilidad presente en los aislamientos pudiera ser una indicación de variabilidad en las poblaciones de este patógeno, aspectos en los cuales debe continuar profundizándose.

Caracterización Patogénica

Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad realizada mostró que los 50 aislamientos obtenidos, bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente, fueron capaces de reproducir los síntomas característicos de la enfermedad en los frutos, según lo descrito por otros investigadores (Ampuero, 1967; Suárez, 1971; Barros, 1977; Campuzano, 1980).

La figura 3.12 muestra los síntomas obtenidos, caracterizados por la escala de severidad descrita por Sánchez (1982).

En la figura 3.13 se observa que en el primer período de evaluación, a los ocho días después de la inoculación, los aislamientos E5-I, E5-II, E6-I, E7-I, E8-II, E10-II, M8-I, G9-I, O9-I y O9-II, mostraron una mayor virulencia en comparación con los demás aislamientos, evidenciando su capacidad para producir enfermedad y síntomas más severos (necrosis más esporulación en un área mayor de la cuarta parte de la superficie necrótica) en una mayor cantidad de mazorcas.

En la evaluación realizada a los once días, la cantidad de mazorcas evaluadas con síntomas correspondientes a los grados 4 y 5 fue superior en la mayoría de los aislamientos, excepto para E3-I, E4-I, M2-II, M3-II, M6-II, G1-II, G3-II, G4-I, G6-I, G6-II, G10-II, O2-I y O7-I, que mostraron una menor virulencia en comparación con los demás aislados (Grados 2 y 3). No se consideró la evaluación realizada a los catorce días porque los síntomas expresados en las mazorcas por los aislamientos inoculados, se comportaron uniformemente en el transcurso de los días y no se observó diferencias entre ellos.

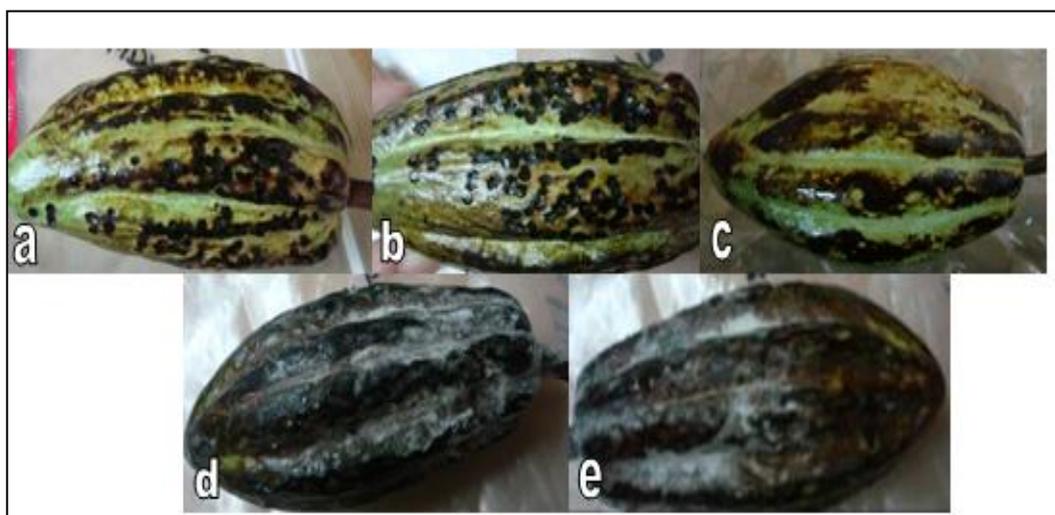


FIGURA 3.12 Síntomas de la enfermedad caracterizados según la escala de severidad; (a) Aislamiento O1-I con grado 1; (b) Aislamiento M3-II con grado 2; (c) Aislamiento M10-I con grado 3; (d) Aislamiento R5-I con grado 4; (e) Aislamiento E5-I con grado 5.

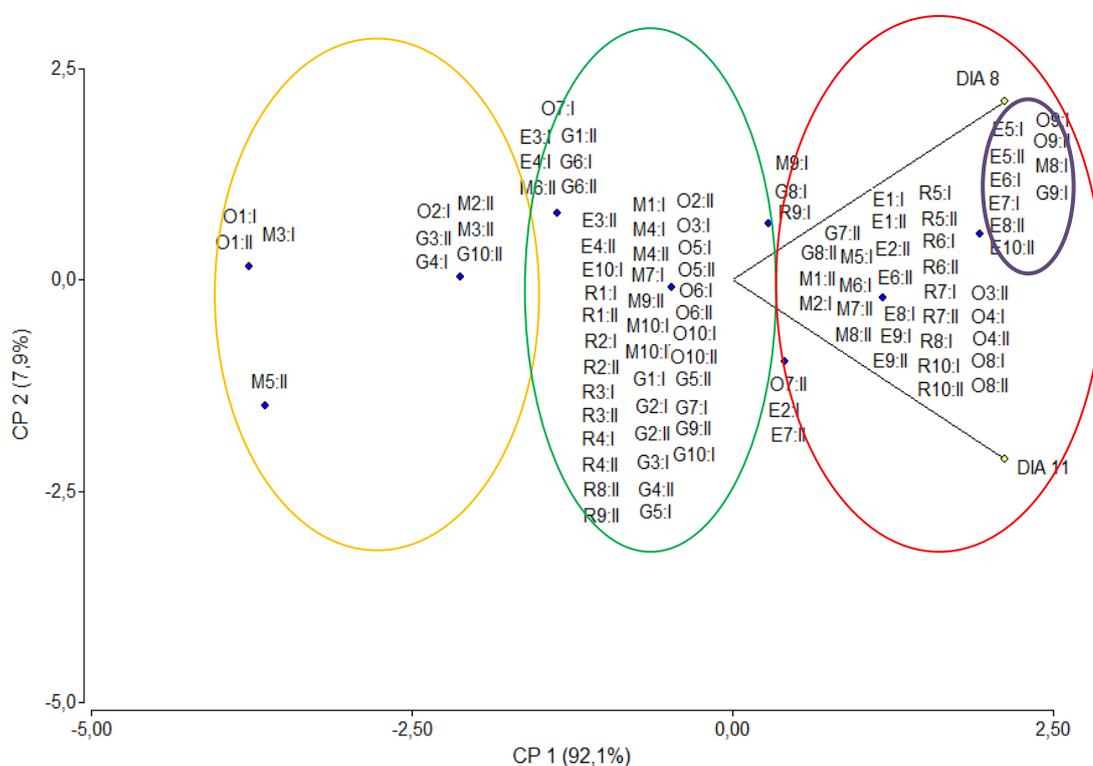


FIGURA 3.13 Comportamiento de la patogenicidad de aislamientos de *M. royeri*, basado en inoculaciones dirigidas del hongo en mazorcas sanas de cacao Nacional. Evaluación de los síntomas de la enfermedad mediante una escala de severidad externa (grados 0 a 5), realizada a los 8 y 11 días después de la inoculación. Los aislamientos más virulentos se encuentran sub agrupados.

La virulencia de los aislamientos observados por medio del daño producido en los frutos inoculados puede explicarse por características fisiológicas del hongo, en los cuales se evidenció que existieron aislamientos más agresivos que otros en los determinados periodos de evaluación.

Los síntomas de la enfermedad evolucionaron de manera favorable debido a que las condiciones de humedad mantenidas fueron apropiadas, lo que coincide con los estudios realizados por Bejarano (1961) y López (1954), autores que indican que un ambiente de alta humedad favorece al desarrollo de la enfermedad.

Agrupamiento de los aislados en relación a parámetros morfológicos y patogénicos evaluados

Los aislamientos obtenidos de las fincas muestreadas en las cinco provincias se agruparon en conjuntos diferenciales en cuanto a los parámetros evaluados de tamaño de conidias, crecimiento de colonias y severidad externa de la enfermedad.

La figura 3.14 muestra la agrupación de los aislamientos de las fincas muestreadas en las cinco provincias. En el análisis se evidenció ciertas coincidencias para algunos aislamientos, es decir, en algunos casos el tiempo de aparición de los síntomas coinciden con el crecimiento de las colonias, como los aislados R5, R6, R7, R10 y E6 que poseen el mayor crecimiento en medio sólido y el tiempo de aparición de los síntomas en la prueba de patogenicidad fue más rápido. De la misma manera que al observar aislamientos con menores crecimiento de las colonias su tiempo de aparición de síntomas es más tardío, como el aislamiento O1.

También se puede explicar que el tamaño de sus conidias (largo y ancho) no está relacionado con el crecimiento de las colonias de *M. roreri* al observar a los aislamientos que se mantienen homogéneos para los parámetros de evaluación que se encuentran agrupados.

Es importante referirse a los aislamientos que poseen mayor variabilidad en los parámetros evaluados de tamaño de conidias, crecimiento de las colonias, virulencia de los aislamientos, en comparación con los demás aislamientos. Entre ellos se destacaron los aislamientos O1, O5, M3 y M6, los cuales, de acuerdo a los resultados obtenidos indican la posibilidad de variaciones en las poblaciones de *Moniliophthora roreri* en el país, aspecto que, por su interés, debe continuar investigándose.

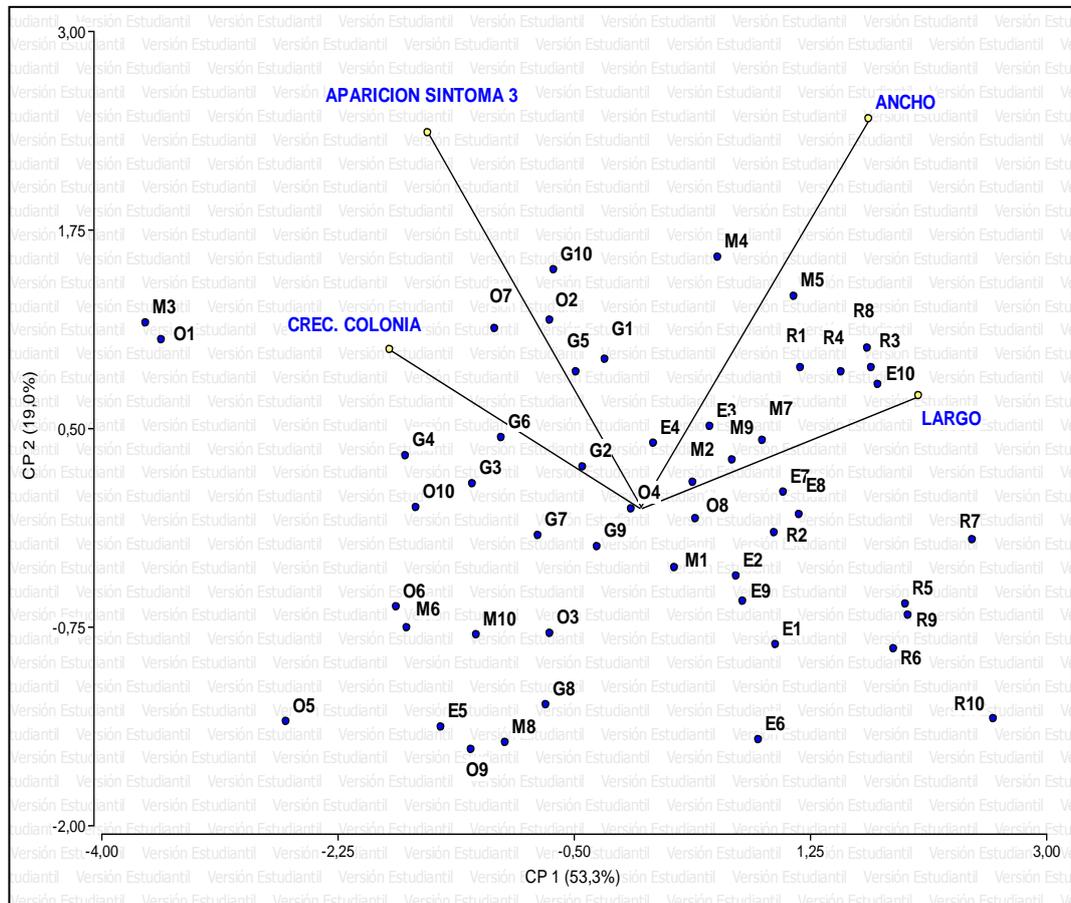


FIGURA 3.14 Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales considerando los parámetros evaluados de crecimiento de colonias, tamaño de conidias y severidad externa de la enfermedad entre los aislados obtenidos en fincas de las cinco provincias de la Costa Ecuatoriana.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Los resultados de la presente investigación permiten concluir:

- En el estudio morfológico de las colonias de *M. roreri*, no se encontraron diferencias en cuanto a borde y textura.
- Las tonalidades de color observados en cada uno de los aislamientos de *M. roreri* variaron según los días de crecimiento; sin embargo, no debe considerarse como un parámetro para diferenciar fenotipos entre los aislados ya que

esta especie reporta una gran variabilidad morfológica para esta característica.

- Se presentó varias formas de conidias en los aislamientos de *M. roreri* y variaciones en el tamaño que evidencian de alguna manera heterogeneidad entre los aislamientos.
- No existió relación entre el crecimiento de las colonias y la patogenicidad para la mayoría de los aislados; sin embargo, existieron aislamientos que presentaron una aparente relación.
- Los aislamientos E5-I, E5-II, E6-I, E7-I, E8-II, E10-II, M8-I, G9-I, O9-I y O9-II después de la inoculación en mazorcas fueron los que presentaron mayor agresividad a los ocho días de evaluación, diferenciándose de los demás aislamientos.
- La mayor variabilidad existente en los aislamientos O1, O5, M3 y M6, indican que podrían existir variantes entre los aislamientos nacionales de esta especie.

Recomendaciones

- Debido a la ausencia de resultados sobre caracterización morfológica y fisiológica de *Moniliophthora roreri* en el país, el presente trabajo es una parte inicial del estudio de las poblaciones del hongo en diferentes áreas, por lo cual se recomienda continuar y profundizar estas investigaciones con un mayor número de aislamientos procedentes de todas las zonas donde se cultiva el cacao y las principales variedades cultivadas.
- A nivel de laboratorio, profundizar en la caracterización morfológica y fisiológica de aislamientos del hongo, introduciendo diferentes temperaturas y medios de cultivo, para determinar posibles diferencias en el comportamiento de los aislamientos de *M. roreri*.
- Realizar pruebas de caracterización molecular que permitan identificar si existen variaciones genéticas entre los aislamientos obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

[1] AGRIOS G., Fitopatología. 4ta ed. México. 1997; 838pp.

[2] ANDEBRHAN T., Witches Broom, *Crinipellis pernicioso* (STAHEL) Singer: Principal diseases of Cacao (*Theobroma cacao* L.) in the Brazilian Amazon. 1986; p. 479-487.

[3] APROCAFA. Asociación de productores de cacao fino y de aroma. 2004; Disponible en; <http://www.sudnordnews.org>

[4] BARROS O., Investigaciones sobre el hongo *Monilia roreri* Cif. & Par., causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao: sus daños y control. El Cacaotero Colombiano. 1977; p. 42-52.

[5] BEJARANO G., Métodos de inoculación artificial y factores favorables para la infección de *Monilia roreri* Cif.& Par. Tesis Ing. Agr. Quito, Universidad Central, 1961; 69 p.

[6] BRENES O., Evaluación de la resistencia a *Monilia roreri* y su relación con algunas características morfológicas del fruto de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis MSc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 1983; p.60.

[7] CAÑEDO V., Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Perú. 2004; p. 62.

[8] DANIEL O., Publicación Puro Cacao. 2009; Disponible en; <http://purocacaounesur.blogspot.com/>

[9] DIARIO HOY., Economía Ecuabusiness. 2008; Disponible en; <http://ecuabusiness.blogspot.com>

[10] DIARIO HOY., "El cacao ecuatoriano cautiva al mercado internacional". 2009; Disponible en; <http://www.planamanecer.com>

[11] EL COMERCIO., "Ecuador prevee más ingresos por exportaciones de cacao". 2010; Disponible en; <http://www.elcomercio.com>

[12] EL UNIVERSO., La Monilia afecta la producción de cacao. 2009; Disponible en; <http://www.eluniverso.com>

[13] ENRÍQUEZ G., Curso sobre el cultivo del cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba. 1985; p. 239.

- [14] ENRÍQUEZ G., Curso sobre el cultivo del cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba. 1986; 240pp.
- [15] EVANS. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany. 1978; p. 56.
- [16] FEDECACAO., Federación Nacional de Cacaoteros. 2006; Disponible en; <http://www.agronet.gov.co>
- [17] HELMUTH W., Manejo Integrado de Plagas en Cultivos de la Amazonia Ecuatoriana. 2000; 138pp.
- [18] HERNÁNDEZ T., RÍOS Y ARÉVALO E., Enfermedades del cacao. Sistemas de producción en la Amazonía peruana. 1991; p. 37-44.
- [19] INFOAGRO., Sistema de Información del Sector Agropecuario. Disponible en; <http://www.infoagro.go.cr>
- [20] JEWELL C., "Ecuador 2009 - celebración de un bicentenario". 2009; Disponible en; <http://www.wipo.int>

[21] JIMÉNEZ M., Combate biológico de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*) causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, mediante bacterias epifitas en la Zona Atlántica de Costa Rica. Edit. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Departamento de Producción Animal, Turrialba, Costa Rica. 1986

[22] MATEOS P., Mantenimiento y Conservación De Microorganismos Industriales. 2002; Disponible en; www.revistaciencias.com

[23] MEJÍA L., Manejo Integrado del Cultivo de Cacao. Colombia, Bucaramanga. 2005; p. 23.

[24] NUTRINET., 2008; Disponible en; <http://ecuador.nutrinet.org>

[25] PHILLIPS M., COUTIÑO F., ORTÍZ P., LÓPEZ J., HERNANDEZ A., First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa. México. 2006; p. 55-58.

[26] PHILLIPS-MORA W., CAWICH J., GARNETT W., & AIME M.C., First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. 2006; p. 55: 584.

[27] PHILLIPS W., COUTIÑO A., ORTIZ C.F., LÓPEZ A.P., HERNÁNDEZ, & AIME M.C. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. New Disease Reports. 2006; p.12:41. Disponible en; <http://www.ndrs.org>

[28] PHILLIPS-MORA. Taller Regional Andino de Aplicación Tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo, Los Ríos - Ecuador. 2006; p. 21.

[29] PORRAS V., Fitiología de la moniliasis del cacao y su relación con la producción del árbol en la zona de Matina. Tesis de Grado, Facultad de Agronomía, Costa Rica. 1982; p.47.

[30] PORRAS V., SÁNCHEZ J., Enfermedades del cacao. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. La Lima, Cortes, Honduras. 1991; p.14.

[31] QUIROZ-VERA J.G., Caracterización molecular y morfológica de genotipos superiores de cacao nacional (*Theobroma cacao* L) de Ecuador. Tesis de Maestría, CATIE-Escuela de Posgrado, Costa Rica, 2002; 111 pp. Disponible en; <http://orton.catie.ac.cr>

[32] RAMÍREZ-GONZÁLEZ, S.I., La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. Tecnología en Marcha. 2008; Vol 21-1:97-110; Disponible en; <http://www.tec.ac.cr>

[33] SENASA., Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Perú. 2003; en; <http://www.senasa.gob.pe>

[34] SICA., Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. 2007; Disponible en; <http://www.sica.gov.ec>

[35] SICA., Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. 2007; Disponible en; <http://www.sica.gov.ec>

[36] SICA., Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. 2007; Disponible en; <http://www.sica.gov.ec>

[37] SORIA J., Breve Historia del Cultivo del Cacao en el Ecuador. 2000; Disponible en; <http://www.sica.gov.ec>

[38] SUÁREZ C., Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roveri* Cif & Par. en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de grado (Ing. Agrónomo) Guayaquil, Ecuador. 1971; p.59.

[39] TOVAR G., La Escoba de Bruja del Cacao (*Crinipellis pernicioso* (Stahel Singer)): Descripción de síntomas de la enfermedad. Agronomía Colombia, V 8, No 1: 1991; p 227-239.

[40] ZHANG D., ARÉVALO-GARDINI E., MISCHKE S., ZÚÑIGA-CERNADES L., BARRETO-CHÁVEZ A., ADRIAZOLA DEL ÁGUILA J., Genetic Diversity and Structure of Managed and Semi-natural Populations of Cocoa (*Theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali Valleys of Peru. *Annals of Botany*. 2006; p.98: 647–655.

[41] ZHANG D., BOCCARA M., MOTILAL L., BUTLER D.R., UMAHARAN P., MISCHKE S., MEINHARDT L., Microsatellite variation and population structure in the “Refractario” cacao of Ecuador. *Conserve Genet*. 2008; p. 9:327–337.



FICHA DE CAMPO PARA EVALUACIÓN DE MONILIA EN CACAO



Datos Informativos:

Nombre de la Finca: Área: Dueño de la Finca: Zona/Provincia: Lugar:
Fecha de Evaluación: Hora de inicio: Hora final:
Edad del cultivo: Variedad:
Otros Cultivos:

PARÁMETROS DE EVALUACIÓN:

Número de Planta	Tamaño de los frutos	Mazorcas con síntomas de Moniliasis				Total enfermas	Total sanas	Observaciones
		Deformaciones	Mancha Chocolate y/o cloróticas	Esporulación	Momificación			
P1	G							
	M							
	P							
	Total P1							
P2	G							
	M							
	P							
	Total P2							
P3	G							
	M							
	P							
	Total P3							
P4	G							
	M							
	P							
	Total P4							

ANEXO 1

P5	G							
	M							
	P							
	Total P5							

P6	G							
	M							
	P							
	Total P6							
P7	G							
	M							
	P							
	Total P7							
P8	G							
	M							
	P							
	Total P8							
P9	G							
	M							
	P							
	Total P9							
P10	G							
	M							
	P							
	Total P10							

ANEXO 2

AISLAMIENTOS DE *MONILIOPHTHORA RORERI* ESTUDIADOS

AISLAMIENTO	ESPECIE	HUESPED	PROCEDENCIA
E1	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
E2	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
E3	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
E4	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
E5	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
E6	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
E7	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
E8	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
E9	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
E10	Moniliophthora roreri	Mazorca	Quinindé-Esmeraldas
M1	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
M2	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
M3	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
M4	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
M5	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
M6	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
M7	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
M8	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
M9	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
M10	Moniliophthora roreri	Mazorca	Calceta-Manabí
G1	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
G2	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
G3	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
G4	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
G5	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
G6	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
G7	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
G8	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
G9	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
G10	Moniliophthora roreri	Mazorca	Balao-Guayas
R1	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos
R2	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos
R3	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos
R4	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos
R5	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos
R6	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos
R7	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos
R8	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos
R9	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos
R10	Moniliophthora roreri	Mazorca	Vinces-Los Ríos

ANEXO 2

AISLAMIENTO	ESPECIE	HUESPED	PROCEDENCIA
O2	Moniliophthora roreri	Mazorca	Santa Rosa-El Oro
O3	Moniliophthora roreri	Mazorca	Santa Rosa-El Oro
O4	Moniliophthora roreri	Mazorca	Santa Rosa-El Oro
O5	Moniliophthora roreri	Mazorca	Santa Rosa-El Oro
O6	Moniliophthora roreri	Mazorca	Santa Rosa-El Oro
O7	Moniliophthora roreri	Mazorca	Santa Rosa-El Oro
O8	Moniliophthora roreri	Mazorca	Santa Rosa-El Oro
O9	Moniliophthora roreri	Mazorca	Santa Rosa-El Oro
O10	Moniliophthora roreri	Mazorca	Santa Rosa-El Oro