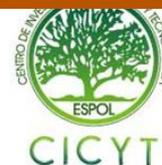




ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



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

M. Villavicencio ^(1,2), M. Jiménez ⁽¹⁾

⁽¹⁾Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral, Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador.

mirvilla@espol.edu.ec ^(1,2); mariaisabelj@gmail.com ⁽¹⁾

⁽²⁾Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral, Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador

Resumen

La Moniliasis del cacao, causada por el hongo Moniliophthora roreri, es el principal problema fitosanitario, por lo que es necesario profundizar en el conocimiento del agente causal y las diferencias existentes entre poblaciones del hongo de diversa procedencia. Para lograr los objetivos de esta investigación, se realizó 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. Se utilizaron medios de cultivo sólido y líquido para evaluar las características morfológicas y fisiológicas de 50 aislamientos obtenidos. La patogenicidad 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 si 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.

Palabras claves: *Moniliophthora roreri, Moniliasis, cacao, aislamientos*

Abstract

The moniliasis of cacao, caused by the fungus Moniliophthora roreri, is the main problem, so is necessary to deepen the knowledge of the agent and the differences between populations of the fungus from various sources. To achieve the objectives of this research was carried out on samples collected in ten cocoa production farms located in five provinces of the Coast, was carried out isolates that were evaluated and identified by morphological criteria (diameter, edge, color and texture of colonies; type and size of conidia, etc.), physiological (development at a given temperature, weight of mycelium) and pathogenic (time of onset and severity of symptoms), in order to initiate the characterization of populations of the fungus in the country and have a bank of isolates for further investigation at different levels. We used culture media and liquid to assess the morphological and physiological characteristics of 50 isolates. The pathogenicity was evaluated by inoculating healthy fruit with dry conidia method over a period of fourteen days. No morphological differences were found on the edge and texture of the colonies among isolates studied, but variations in color, with shades of white, cream, light brown to dark brown. Also the size and shape of conidia differences, distinguishing conidia globose, subglobose, elliptical. There were variations in the growth of the colonies and the weight of mycelium in different isolates, regardless of their origin, with the exception of 80% of those from areas of the province of Los Rios, who had a higher growth rate on solid medium.

Key words: *Moniliophthora roreri, Moniliasis, cocoa, isolates.*

1. Introducción

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 [1].

La Moniliasis a pesar de ser una de las principales enfermedades en el cultivo de cacao, en nuestro país existe muy reducida información sobre el conocimiento del agente causal de esta enfermedad, siendo el principal problema la falta de conocimiento acerca de la biología, patogenicidad y epidemiología del agente causal en Ecuador.

2. Marco teórico

Enfermedades fungosas en los frutos

El cacao como cualquier vegetal, es susceptible a enfermedades a la acción de microorganismos que alteran su desarrollo y en nuestro país es una de las principales causas para la baja productividad [2]. Las principales enfermedades fungosas que afectan a los frutos de cacao en el Ecuador son: Escoba de bruja, Pudrición parda y Moniliasis, siendo esta última una de las principales enfermedades para el cultivo de cacao.

Moniliasis

En Ecuador esta enfermedad apareció en el año 1914, en Quevedo, provincia de Los Ríos [2]. 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.

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 [3]. 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.

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) [4] en los frutos infectados que se encuentran adheridos a las plantas. 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 [5].

Síntomas y signos de la enfermedad

• 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 [6,7].

• Síntomas internos

El daño interno es aún más grave que el daño externo, porque se pierden casi todas las almendras, sin importar la edad del fruto, debido a la descomposición de los tejidos.

Manejo de la enfermedad

Dentro del manejo integrado para el control de la moniliasis del cacao se considera:

Prácticas culturales.

- Podas suaves y frecuentes, que ayuden a mantener los troncos y ramas principales libres de brotes, chupones o hijos y de ramillas perjudiciales.
- Regulación del sombrero permanente.
- Adecuado sistema de drenaje.
- Deshierbes frecuentes y oportunas, para facilitar la libre circulación del aire.
- Eliminar dos veces por semana en los meses de lluvia los frutos afectados por la moniliasis que se encuentren en la plantación.

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

Entre los hongos antagonistas se encuentran miembros de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* [8]. Según el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) existen gusanos de una polilla no identificada que se alimenta de *M. royeri* [9].

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 [10].

En Ecuador, Ampuero (1967) señala que las pérdidas estimadas van desde un 15% hasta un 80% [11,12]. En Venezuela, Meza y León (1972) y Capriles señalan pérdidas entre el 40 y 50% de la producción por su daño [12].

En Colombia se han reportado pérdidas del 55% de la cosecha [10]. 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, la producción se redujo al 72% [12].

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 [12]. En México a dos años de su detección, las pérdidas debidas a este patógeno son de alrededor del 50% [12].

3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

“Existe variabilidad entre los aislados del patógeno en las distintas zonas productoras de la Costa Ecuatoriana”

3.2 Objetivo General

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

3.3 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. royeri*.

4. Materiales y Métodos

4.1 Análisis de la zona en estudio

En las cinco fincas 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, que posteriormente fueron llevados al laboratorio para continuar con el estudio.

4.2 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.

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.

Observación macroscópica del crecimiento del hongo

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

4.3 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 4.3: Procedimiento para la obtención de aislamientos puros de *M. roreri*.

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.

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 y realizando cinco repeticiones por cada uno de los aislados. Las pruebas de caracterización se realizaron utilizando discos de micelio que fueron cortados con un sacabocados de 7mm de diámetro.

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. 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.

4.4 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 1).

TABLA 1: 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

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.

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.

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:

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

4.5 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.

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.

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 µl 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.

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. roreri* fueron registradas diariamente durante 15 días, tiempo en que

el hongo alcanzó su crecimiento completo en la caja Petri.

4.6 Prueba de patogenicidad

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, humedecida con agua estéril. Las mazorcas inoculadas fueron colocadas en una cámara húmeda para favorecer la germinación de las esporas. 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.

4.7 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 °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°C; se concluyó el proceso transcurridas 20 horas, con una presión de 46×10^{-3} mbar y una temperatura de - 48°C.

Posteriormente se retiró los frascos del liofilizador, se envasó su contenido en tubos de 15ml y se colocaron en un congelador de - 80 °C.

4.8 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.

5. Resultados y Discusión

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

En la FIGURA 5.1 se resume el estatus sanitario de las áreas evaluadas en las fincas monitoreadas.

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 ($P \leq 0,05$).

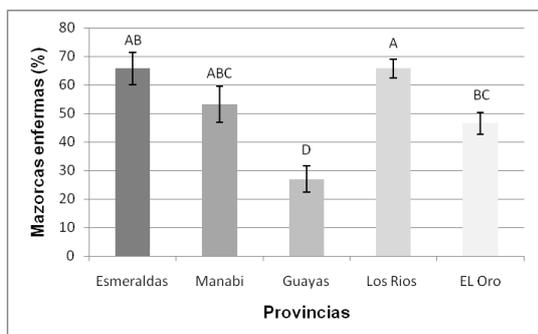


FIGURA 5.1: Análisis comparativo del estatus sanitario con respecto a la infección de *M. rozeri* en las diferentes fincas, basadas en el porcentaje de mazorcas enfermas.

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.).

5.2 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 5.2.1, mientras que el porcentaje en que cada uno de estos fue encontrado se muestra en la FIGURA 5.2.2

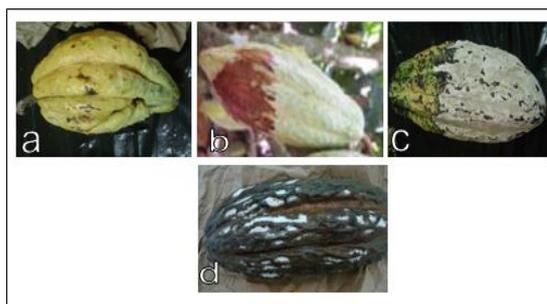


FIGURA 5.2.1: Muestras de mazorcas con síntomas y signos de Moniliasis encontrados en las evaluaciones en campo; (a) Deformaciones; (b) Mancha chocolate; (c) Esporulación; (d) Momificación.

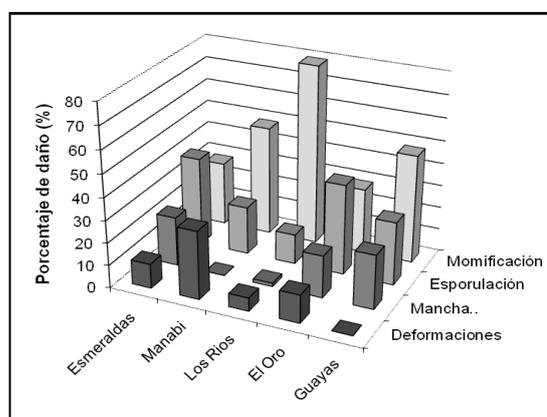


FIGURA 5.2.2: Porcentaje de daño de la enfermedad Moniliasis evaluado a través de síntomas y signos característicos en mazorcas, obtenidas en las diferentes fincas de las cinco provincias.

5.3 Caracterización Morfológica

Color de micelio

La FIGURA 5.3.1 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.

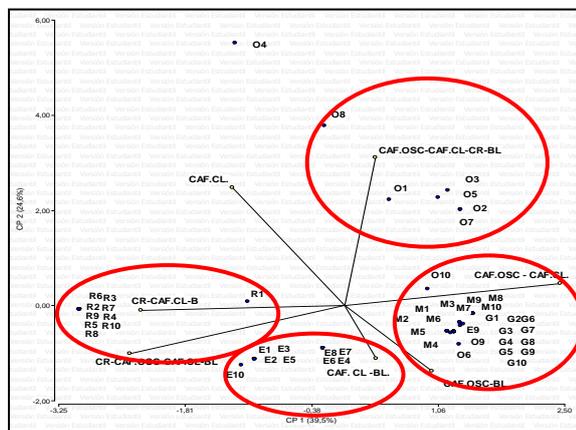


FIGURA 5.3.1: Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales para la caracterización del micelio según la coloración en los diferentes aislamientos de *M. roseri* procedentes de fincas ubicadas en cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. Se incluyen los colores analizados por categorías.

Las colonias de *M. roseri* 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

Todas las colonias obtenidas presentaron borde regular y textura pulverulenta (FIGURA 5.3.2), 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 5.3.2: Aislamiento E5 de *M. roseri* con borde regular y textura pulverulenta, en medio V8MAA a los 15 días.

Forma de conidias

La FIGURA 5.3.3 muestra las formas de conidias que fueron globosas, subglobosas y elípticas

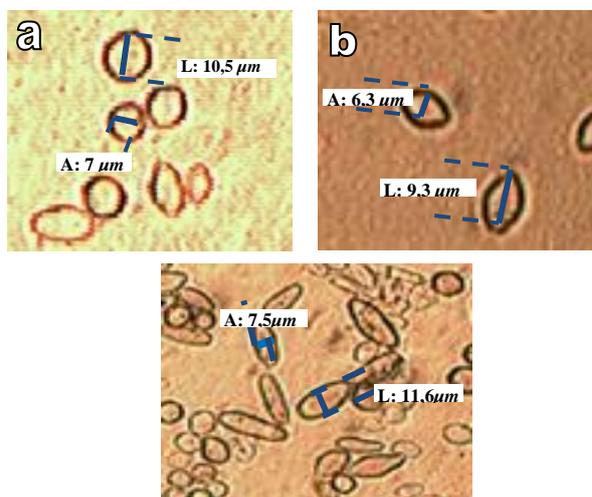


FIGURA 5.3.3: Forma de las conidias en los diferentes aislamientos de *M. roseri*. (a) Aislamiento M1, conidias globosas; (b) Aislamiento E5, conidias subglobosas; (c) Aislamiento R3, conidias elípticas.

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. roseri* 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 5.3.4).

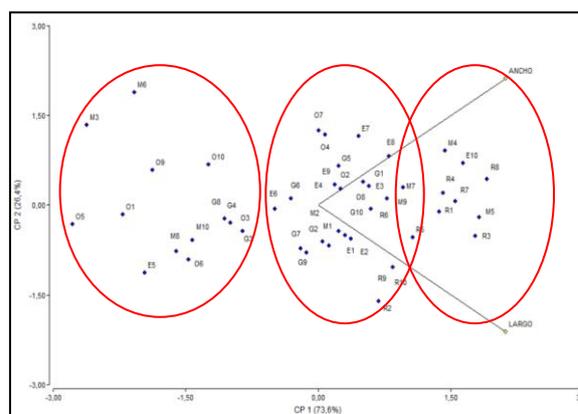


FIGURA 5.3.4: Comportamiento del tamaño (largo y ancho) de conidias en los diferentes aislamientos de *M. roseri* procedentes de fincas

localizadas en cinco provincias de la Costa Ecuatoriana.

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.

5.4 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 5.4.1), 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.

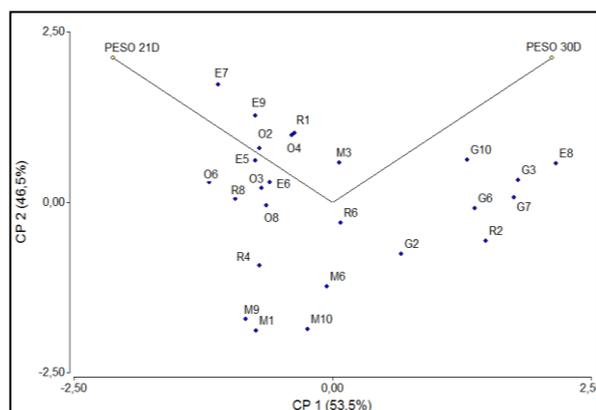


FIGURA 5.4.1: Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales para la caracterización del peso de masa micelial de aislamientos de *M. royeri* en las diferentes fincas de las cinco provincias a los 21 y 30 días en medio líquido.

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 5.4.2 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.

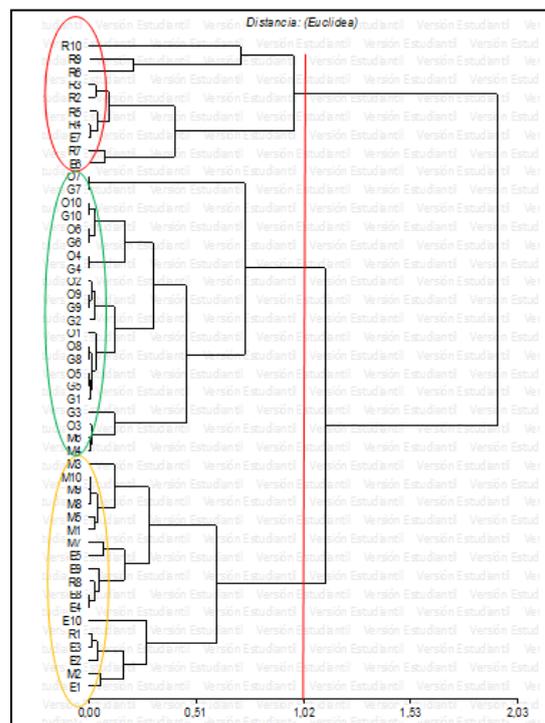


FIGURA 5.4.2: Dendrograma obtenido del análisis de conglomerado, aplicando el método del promedio y distancia Euclídea para evaluar el comportamiento del crecimiento de las colonias de *M. royeri* en un periodo de quince días en medio sólido.

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.

5.5 Caracterización Patogénica

Prueba de patogenicidad

En la FIGURA 5.5 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.

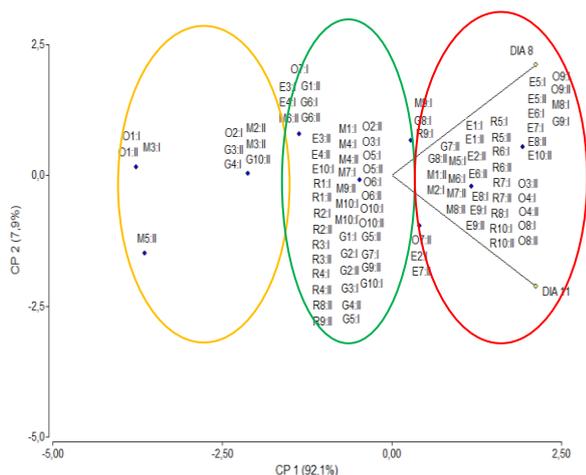


FIGURA 5.5: Comportamiento de la patogenicidad de aislamientos de *M. roseri*, basado en inoculaciones dirigidas del hongo en mazorcas sanas de cacao Nacional. Evaluación de los síntomas de la enfermedad mediante una escala de severidad externa (grados 0 a 5), realizada a los 8 y 11 días después de la inoculación.

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.

5.6 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 5.6 muestra la agrupación de los aislamientos. 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. roseri* al observar a los aislamientos que se mantienen homogéneos para los parámetros de evaluación que se encuentran agrupados.

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 *M. roseri* en el país, aspecto que, por su interés, debe continuar investigándose.

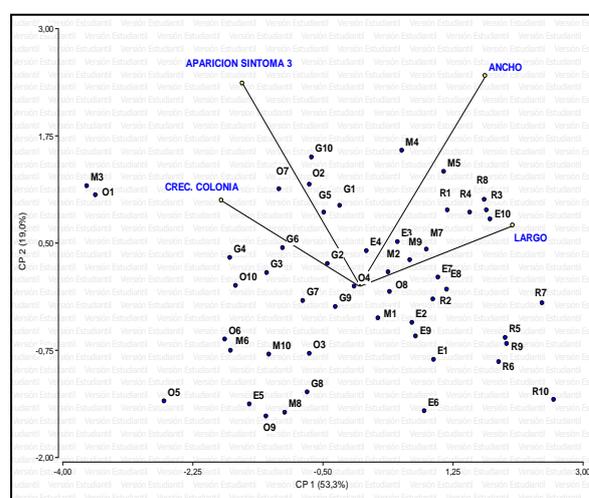


FIGURA 5.6: Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales considerando los parámetros evaluados de crecimiento de colonias, tamaño de conidias y severidad externa de la enfermedad entre los aislados obtenidos en fincas de las cinco provincias de la Costa.

6. Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

- En el estudio morfológico de las colonias de *M. roseri*, no se encontraron diferencias en cuanto a borde y textura
- Las tonalidades de color observados en cada uno de los aislamientos de *M. roseri* 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. roseri* 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.

7. Agradecimientos

A los Ing. Omar Ruíz, Gabriela Maridueña y Dras. Esther Peralta y María Jiménez por el invaluable apoyo y al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por las facilidades prestadas.

8. Bibliografía

- [1]. INFOAGRO., Sistema de Información del Sector Agropecuario. Disponible en; <http://www.infoagro.go.cr>
- [2]. SORIA J., Breve Historia del Cultivo del Cacao en el Ecuador. 2000; Disponible en; <http://www.sica.gov.ec>
- [3]. PHILLIPS-MORA. Taller Regional Andino de Aplicación Tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo, Los Ríos - Ecuador. 2006; p. 21.

- [4]. EVANS. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*. 1978; p. 56.
- [5]. 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.
- [6]. FEDECACAO., Federación Nacional de Cacaoteros. 2006; Disponible en; <http://www.agronet.gov.co>
- [7]. HERNÁNDEZ T., RÍOS Y ARÉVALO E., Enfermedades del cacao. *Sistemas de producción en la Amazonía peruana*. 1991; p. 37-44.
- [8]. SENASA., Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Perú. 2003; en; <http://www.senasa.gob.pe>
- [9]. HELMUTH W., Manejo Integrado de Plagas en Cultivos de la Amazonia Ecuatoriana. 2000; 138pp.
- [10]. EL UNIVERSO., La *Monilia* afecta la producción de cacao. 2009; Disponible en; <http://www.eluniverso.com>
- [11]. ENRÍQUEZ G., Curso sobre el cultivo del cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba. 1986; 240pp.
- [12]. 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>