

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA TIERRA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Caracterización patogénica de aislados de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, en cacao (*Theobroma cacao* L), en tres provincias amazónicas del Ecuador.

Tesis previa a la obtención del Título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

AUTOR

KATHERINE LIZBETH CEVALLOS GUILLÉN

DIRECTORA

ING. KARINA MARÍA ELENA CARRERA SÁNCHEZ M.Sc.

PUYO - PASTAZA - ECUADOR

2015

ÉSTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL SIGUIENTE TRIBUNAL
DE GRADO

Ing. Alexandra Torres M. Sc.

Ing. Sandra Soria Re. M. Sc.

Dr. C Javier Domínguez Brito

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Katherine Lizbeth Cevallos Guillén egresada de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad Estatal Amazónica, bajo mi supervisión.

Ing. Karina Carrera Sánchez M. Sc

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen, por ser mi fortaleza y mi guía durante toda mi trayectoria universitaria.

A mi madre Leticia Guillén, por apoyarme en todo momento, ser la motivación constante que me ha permitido lograr ser una persona de bien. Por sus consejos, valores que me ha inculcado a lo largo de mi vida, por enseñarme que a pesar de las circunstancias que acontecen en el día a día hay que luchar y salir adelante apoyados de la mano de nuestro señor Jesucristo.

A mis hermanos Byron, Saúl y Nilda, por creer en mí y apoyarme en todas las decisiones de mi vida.

A Xavier Narváez, por ser esa persona especial, que día a día me motiva para seguir adelante.

A mi sobrinos Daniela, Dannia, Diego, Isaac, Bryan y Byron John por su aprecio y confianza.

A mis amigos y compañeros de promoción con quienes compartí momentos de alegría y tristeza.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por regalarme salud y vida para lograr mi tan anhelado objetivo.

A la Universidad Estatal, Amazónica por abrir las puertas de esta prestigiosa institución y permitir formarme como profesional.

A mi madre, por regalarme la vida y apoyarme en cada momento para formarme como profesional.

A mis hermanos, por su cariño y consejos brindados.

A Xavier Narváez, por formar parte de mi vida, brindarme su confianza, cariño y amor incondicional.

A mi directora de tesis, Ing. Karina Carrera Sánchez M.Sc por su esfuerzo y dedicación. Quien con su apoyo, paciencia, conocimientos y experiencia me ha motivado a terminar mi investigación con éxito.

A la Ing. Sandra Soria, por dedicar parte de su tiempo a la revisión de la investigación.

A la Ing. Daysi Changoluisa, por su oportuna colaboración durante el trabajo experimental.

A Dr. C Michel Leiva Mora, por dedicar parte de su tiempo al procesamiento, revisión y corrección de la investigación.

A mis profesores del Departamento de ciencias de la Tierra, por todo el apoyo y conocimiento brindado.

A quienes de una u otra forma contribuyeron a la realización del presente trabajo.

Al Ing. Henry Navarrete por su apoyo en la interpretación de la información geográfica.

RESPONSABILIDAD

Yo Katherine Lizbeth Cevallos Guillén, declaro que el contenido de la presente Tesis de Grado es de mi responsabilidad exclusiva.

Katherine Lizbeth Cevallos Guillén

Tabla de contenido

Capítulo I	1
1. Introducción.....	1
a. Objetivos.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
b. Hipótesis.....	3
Capítulo II	4
2. Revisión bibliográfica.....	4
2.1 El cacao en el mundo.....	4
2.2 Origen del cacao.....	4
2.3 Cacao en el Ecuador- Importancia económica	5
2.4 Botánica del cacao (<i>Teobroma cacao L.</i>) según Enríquez (2004)	7
2.5 Características de las principales variedades de cacao	10
2.6 Enfermedades fúngicas del cacao	13
2.7 Monilia (<i>M. roreni</i>)	16
2.8 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)	23
2.9 Conservación de hongos filamentosos según Ángel (2006)	24
Capítulo III	27
3. Materiales y métodos.....	27
3.1 Localización y duración del experimento.....	27
3.2 Condiciones meteorológicas.	27
3.3 Materiales y equipos	27
3.4 Factor de estudio	28
3.5 Análisis estadístico.....	28
3.6 Variables.....	29
3.7 Manejo del experimento	30

Capítulo IV	39
4. Resultados y discusión.....	39
4.1 Evaluación de la patogenicidad y agresividad de aislados de <i>M. roreri</i> en mazorcas de <i>T. cacao</i>	39
4.2 Conformación de una colección de aislados de <i>M. roreri</i>	51
4.3 Determinación de la respuesta de genotipos de cacao frente a la inoculación artificial de <i>M. roreri</i> en un ensayo monocíclico.	54
Capítulo V	61
5. Conclusiones.....	61
6. Recomendaciones.....	62
7. Resumen.....	63
8. Summary.....	64
9. Bibliografía.....	65
10. Anexos.....	74

Índice de Tablas

Tabla 1. Variables empleadas en la investigación.....	29
Tabla 2. Sitios donde se realizó la recolección de las mazorcas enfermas de cacao e identificación de aislados	30
Tabla 3. Escala de valoración de severidad externa propuesta por Brenes (1983)	35
Tabla 4. Escala de valoración de severidad interna propuesta por Sánchez <i>et al.</i> , (1987).....	36
Tabla 5. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 10 días con intervalo continuo.....	41
Tabla 6. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 6 días con intervalo continuo	42
Tabla 7. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 8 días con intervalo continuo	43
Tabla 8. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 12 días con intervalo continuo	44
Tabla 9. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 14 días con intervalo continuo	45
Tabla 10. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad con intervalo discontinuo 8 – 9 días	46
Tabla 11. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad con intervalo discontinuo 9 – 10 días	47
Tabla 12. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad con intervalo discontinuo 10 – 11 días.	48
Tabla 13. Viabilidad evaluada de los aislados a diferentes métodos de conservación.....	52
Tabla 14. Respuesta de cinco genotipos de cacao en base al valor del ABCPE hasta los 10 días posteriores a la inoculación artificial de sus mazorcas con una suspensión de micelio de <i>M. royeri</i> (aislados: CC-UEA-Mr 6.10, CC-UEA-Mr 1.6, CC-UEA-Mr 7.13, CC-UEA-Mr 2.7) con una concentración aproximada de 10^5 ufc.mL ⁻¹ a 27°C y oscuridad.....	60

Índice de Figuras

Figura 1. Productor ecuatoriano de cacao.....	7
Figura 2. Órganos vegetativos y reproductivos del cacao.	9
Figura 3. Mazorcas de cacao Criollo en estado maduro e inmaduro.	10
Figura 4. Mazorcas maduras de cacao Forastero.	11
Figura 5. Mazorcas cacao Trinitario.	11
Figura 6. Mazorcas de cacao Nacional.	12
Figura 7. Características de las mazorcas de los clones de cacao a) CCN-51 b) EET-95 c) EET-96 d) EET-103 (El productor, 2012).....	13
Figura 8. Síntoma de mazorca negra.	14
Figura 9. Árbol afectado por escoba de bruja (INIA, 2008).....	14
Figura 10. Síntomas en frutos causados por <i>M. pernicioso</i> a) Fruto chirimoya; b) y c) Protuberancias; d) Mancha chocolate.	15
Figura 11. Árbol infectado por Mal de machete.	16
Figura 12. Ciclo de vida del hongo <i>M. royeri</i> (Evans, 1978).....	19
Figura 13. Síntomas y signos de <i>M. royeri</i> (a Deformaciones – Gibas; (b Maduración prematura-puntos aceitosos; (c Manchas irregulares; (d Pudrición de almendras; (e Micelio del hongo sobre la mancha, etapa contagiosa; (f Fruto momificado.	20
Figura 14. Lugares de procedencia de los aislados. Proyección del mapa UTM, Datum WGS 84, Zona 18 sur. A) Ecuador, B) Provincias amazónicas, C) Sitios de procedencia de los aislados	31
Figura 15. Preparación del medio de cultivo PDB.	33
Figura 16. Preparación de la suspensión del medio.	33
Figura 17. Inoculación de las mazorcas de cacao.	34
Figura 18. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislado de <i>M. royeri</i> en ensayo monocíclico. a) puntos aceitosos (dos días) b) tumefacción o clorosis (cinco días) c) mancha necrótica (siete días) d) micelio en un 25% de la mancha (once días) e) micelio en más del 25% de la mancha (doce días).....	40
Figura 19. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por aislados de <i>M. royeri</i> en ensayo monocíclico a) grado 0 b) grado 1 c) grado 2 d) grado 3 e) grado 4 f) grado 5.	40

Figura 20. Progresión ABCPE de aislados de <i>M. royeri</i> con agresividad diferencial.	49
Figura 21. Porcentaje de viabilidad de Aislados de <i>M. royeri</i> a -80°C.	53
Figura 22. Porcentaje de viabilidad de los aislados de <i>M. royeri</i> a -4°C.	53
Figura 23. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de <i>M. royeri</i> en ensayo monocíclico en el cultivar Nacional a) fruto sano b) puntos aceitosos c) tumefacción o clorosis d) mancha necrótica e) micelio en un 25% de la mancha f) micelio en más del 25% de la mancha	54
Figura 24. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de <i>M. royeri</i> en ensayo monocíclico en el clon CCN-51 a) fruto sano b) puntos aceitosos c) mancha necrótica d) micelio en un 25% de la mancha e) micelio en más del 25% de la mancha.	55
Figura 25. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de <i>M. royeri</i> en ensayo monocíclico en el clon EET-95 a) fruto sano b) puntos aceitosos c) tumefacción o clorosis d) mancha necrótica e) micelio en un 25% de la mancha f) micelio en más del 25% de la mancha	56
Figura 26. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de <i>M. royeri</i> en ensayo monocíclico en el clon EET-96. a) fruto sano b) puntos aceitosos c) tumefacción o clorosis d) mancha necrótica e) micelio en un 25% de la mancha f) micelio en más del 25% de la mancha	56
Figura 27. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de <i>M. royeri</i> en ensayo monocíclico en el clon EET-103 a) fruto sano b) puntos aceitosos c) tumefacción o clorosis d) mancha necrótica e) micelio en un 25% de la mancha f) micelio en más del 25% de la mancha	57
Figura 28. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de <i>M. royeri</i> en ensayo monocíclico cultivar Nacional a) grado 0 (cero área necrosada) b) grado 1 (1-20% del área necrosada) c) grado 2 (21-40% del área necrosada) d) grado 3	

(41-60% del área necrosada) e) grado 4 (61-80% del área necrosada) f) grado 5 (100% del área necrosada).....58

Figura 29. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon CCN-51 a) grado 0 (cero área necrosada) b) grado 1 (1-20% del área necrosada) c) grado 2 (21-40% del área necrosada) d) grado 3 (41-60% del área necrosada) e) grado 4 (61-80% del área necrosada) f) grado 5 (100% del área necrosada).....58

Figura 30. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon EET-95 a) grado 0 (cero área necrosada) b) grado 1 (1-20% del área necrosada) c) grado 2 (21-40% del área necrosada) d) grado 3 (41-60% del área necrosada) e) grado 4 (61-80% del área necrosada) f) grado 5 (100% del área necrosada)..... 58

Figura 31. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon EET-96 a) grado 0 (cero área necrosada) b) grado 1 (1-20% del área necrosada) c) grado 2 (21-40% del área necrosada) d) grado 3 (41-60% del área necrosada) e) grado 4 (61-80% del área necrosada) f) grado 5 (100% del área necrosada)59

Figura 32. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon EET-103 a) grado 0 (cero área necrosada) b) grado 1 (1-20% del área necrosada) c) grado 2 (21-40% del área necrosada) d) grado 3 (41-60% del área necrosada) e) grado 4 (61-80% del área necrosada) f) grado 5 (100% del área necrosada).59

Índice de Anexos

Anexo 1. Planilla de recolección de datos (caracterización patogénica y respuesta de genotipos de cacao frente <i>M. royeri</i>)	74
---	----

Capítulo I

1. Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L) es un cultivo reconocido por su agradable sabor, y su alto valor nutritivo. Estas características lo han convertido en un producto deseado, constituyendo uno de los principales en el sector de las materias primas en el mercado internacional. La producción de cacao adquirió importancia cuando empezó a desarrollarse la industria del chocolate en Europa. Ecuador y Brasil se convirtieron en los principales productores a nivel mundial, posteriormente colonizadores europeos llevaron esta especie a África, primero a Ghana y luego a Nigeria, Camerún y Costa de Marfil (Santander, 2010).

Según Leandro (2011), el centro de origen del cacao se encuentra en la cuenca del río Amazonas y el río Orinoco. Esta especie pertenece a la familia Malvaceae, siendo una de las 22 especies del género *Theobroma*. Es un árbol perenne que posee una altura promedio de 5 a 6 m y follaje denso. A sus frutos se los conoce como mazorcas y su vida productiva es de 25 a 30 años.

El cultivo de cacao constituye una propuesta agroecológica de producción sustentable, para los habitantes de la Amazonía ecuatoriana, debido a que éste cumple con los requerimientos sociales, ambientales y productivos, por lo cual constituye como una alternativa de conservación de los biorecursos en las zonas de producción de la Amazonía (Lecaro, Gavilanes & Carrillo, 2004).

Según Ordoñez (2011), los hogares indígenas de la Amazonía Ecuatoriana tienen en promedio 1,5 ha dedicadas al cultivo de cacao, de estas el 88% son cultivadas por kiwchas y el 12% restante corresponde a otras nacionalidades (Shuar, Cofán, Huaorani y Secoya).

Las principales enfermedades fúngicas que afectan a los frutos de cacao en el Ecuador son: mazorca negra causada por *Phytophthora palmivora* (Butler), escoba de bruja causada por *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime y Phillips-Mora, mal del machete causada por *Ceratocystis fimbriata* (Ellis & Halst) y monilia causada por *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al*, se

caracteriza por la presencia de una cubierta blanquecina polvorienta en las mazorcas o frutos de cacao, que se cubren de esporas y posteriormente se oscurecen (ANECACAO, 2006).

Siendo la principal limitante para la expansión y desarrollo del cultivo de cacao, la cual puede ocasionar pérdidas superiores al 90% de la producción y el abandono del cultivo por parte de productores a lo largo del continente americano. Además determina una pérdida significativa en los ingresos de los pequeños productores y por consiguiente el aumento de problemas sociales y de desigualdad (Phillips, 2006).

Hasta ahora, las prácticas culturales han sido el método de control más utilizado para combatir la monilia, el control químico es una alternativa poco común debido a los altos costos de los pesticidas que no pueden ser costeados por los pequeños productores (INIAP, 1993; ANECACAO, 2006; Enríquez, 2004).

En las provincias amazónicas, no se dispone de aislados de *M. royeri* que hayan sido caracterizados patogénicamente ni se conoce la agresividad de los mismos, lo cual limita el desarrollo futuro de alternativas para lograr un manejo orgánico de las plantaciones de cacao frente al agente causal de la monilia. A su vez, esto limita la posibilidad de reducir las pérdidas que la enfermedad ocasiona en los sistemas de producción de cacao orgánico.

La presente investigación se propone, caracterizar patogénicamente aislados de *M. royeri* procedentes de provincias amazónicas y determinar la respuesta de genotipos de cacao, con la finalidad de identificar la agresividad de los mismos, en un ensayo de inoculación monocíclico, bajo condiciones controladas para en un futuro desarrollar estrategias de control biológico de esta enfermedad, en sistemas de producción de cacao orgánico.

El presente trabajo está enmarcado dentro de las líneas de investigación de la Universidad Estatal Amazónica, en la línea número 3 que comprende producción de alimentos y sistemas pecuarios. Sub línea A: Agrotecnia y manejo integrado de los cultivos de interés regional.

a. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar patogénicamente aislados de *Moniliophthora roreri* en cacao (*Theobroma cacao* L), procedentes de tres provincias amazónicas del Ecuador.

Objetivos específicos

- Evaluar la patogenicidad y agresividad de aislados de *M. roreri* en mazorcas de cacao (*T. cacao*) procedentes de tres provincias amazónicas del Ecuador, mediante un ensayo de inoculación monocíclico.
- Conformar una colección de aislados de *M. roreri* procedentes de tres provincias amazónicas del Ecuador.
- Determinar la respuesta de genotipos de cacao frente a la inoculación artificial de *M. roreri* en un ensayo monocíclico.

b. Hipótesis

Mediante la caracterización patogénica y la agresividad de aislados de *M. roreri*, procedentes de tres provincias amazónicas del Ecuador, se podría conformar una colección de cultivo para determinar la respuesta de genotipos de cacao con un ensayo de inoculación artificial monocíclico y sentar las bases para desarrollar estrategias de control biológico de esta enfermedad, en sistemas de producción de cacao orgánico.

Capítulo II

2. Revisión bibliográfica

2.1. El cacao en el mundo

Hoy en día los productores mundiales de cacao, son 45 países de 3 continentes: África, Asia y América. En el año 2011 del total de los granos cosechados, el 74.8% se cultivaron en África, el 13% en Asia y el 12.2% en América. *T. cacao* es una planta originaria de las regiones tropicales de Centroamérica y Sudamérica, experimentando cambios en su geografía desde los primeros años del siglo XX. A inicios del año de 1900, alrededor del 85% del cacao mundial procedía de América del sur. Mientras que Ecuador y Brasil se repartían la supremacía mundial como productores, pero la situación cambió drásticamente al arraigarse el cultivo en el occidente de África. Nuevas plantaciones la mayoría de ellas híbridas propiciaron que el mapa del cultivo del cacao diese un gran vuelco en apenas medio siglo (Marqués, 2014; Argüelles, 2014).

Según Argüelles (2014), los principales productores de cacao a nivel mundial son: Costa de Marfil, productor número uno de cacao del mundo cosechándose 1 242 000 t, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador y en el resto del mundo existen varios países que producen cacao, pero no representan ni el 1% del total producido en el mundo. Entre los pequeños productores sobresalen Madagascar y Trinidad y Tobago, con el mejor cacao del mundo considerado así por muchos.

2.2 Origen del cacao

Algunos autores indican que el cultivo del cacao se inició en México y América Central (Guatemala y Honduras), donde su uso está atestiguado alrededor del año 2000 a. C. y señalan al mismo tiempo que los españoles no lo vieron cultivado en América del Sur cuando arribaron al continente, aunque lo encontraron creciendo en forma natural en muchos bosques a lo largo de los ríos Amazonas, Orinoco y sus afluentes, donde aún hoy existen tipos genéticos de mucho valor (Batista, 2009; Soria, 2014).

En México se encontró que los aztecas usaban las almendras del cacao no sólo para la preparación de bebidas sino también como moneda. Estos creían que el árbol del cacao era de origen divino y que su bebida confería discreción y sabiduría. Por eso Linneo asignó a la especie el nombre de *Theobroma*, que significa alimento de los dioses. En los tiempos de Cristóbal Colón, los Mayas eran los verdaderos cultivadores de cacao; perfeccionaron su cultivo, aprendieron a curar y conservar las semillas y hacer una bebida agradable. Ricos y pobres consumían la bebida en su dieta diaria e intercambiaban el producto con los Aztecas, quienes muy pronto llegaron a apreciar sus cualidades (Batista, 2009).

Otros autores consideran que el cultivo del cacao tiene su origen en el noreste de América del Sur, (Alto Amazonas) dispersándose hacia el Norte por la costa pacífica que comprende países como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil, donde se ha encontrado una alta variabilidad genética. Desde este lugar de origen, las especies se fueron difundiendo y evolucionando en dos grupos de cacao con características fenotípicas y genotípicas bien definidas, las cuales corresponden a los cacaos Criollo y Forastero (Enríquez, 2004).

Investigaciones a través de la comparación de huellas genéticas de ADN del material nativo con los representantes de la variedad Nacional, demostraron el gran parentesco existente con algunos árboles colectados hace más de 30 años en la región amazónica de Zamora Chinchipe, siendo utilizada en la región por más de 5000 años. A pesar de que en la actualidad su cultivo se encuentra más desarrollado en la región costera del Pacífico, la región oriental de Zamora Chinchipe resulta ser entonces el centro de origen de la domesticación probable de la variedad Nacional (ANECACAO, 2012; EL TIEMPO, 2014).

2.3 Cacao en el Ecuador- Importancia económica

Según Guerrero (2014), el cacao es uno de los productos más significativos del país, en el año 2011 Ecuador recibió el premio como "mejor cacao por su calidad oral" y "mejor grano de cacao por región geográfica" en el Salón du Chocolat en París, Francia. El orden socio-económico ecuatoriano se

desarrollaba en gran medida alrededor del mercado internacional del cacao durante casi un siglo.

En 1830 se declaró la fundación de Ecuador, año donde la mayoría de las familias adineradas dedicaron sus tierras a la producción de cacao. Estas haciendas estaban ubicadas en Vinces y otros cantones de Los Ríos, la producción en el año de 1880 se duplicó (15 000 t), luego se triplicó (40 000 t). Convirtiéndose Ecuador en el año de 1890 como el mayor exportador mundial de cacao, siendo esta la base sólida para la economía nacional (ANECACAO, 2013).

El país produce más del 70 % de cacao del volumen mundial. *T. cacao* presenta características únicas que lo hacen especial, sobresaliendo con su conocido sabor “cacao arriba”. Los detalles de aroma y sabor de la fruta se encuentran en el grano que se logra con un buen manejo post-cosecha, condiciones naturales de suelo, clima, temperatura, luminosidad en un solo territorio, en un solo punto del mundo “Ecuador” (ANECACAO, 2013).

Según EL COMERCIO (2014), la producción de cacao en el año 2008 aumento de USD 94,3 millones a USD 229 millones en el año 2013, es decir existió un alza de USD 205 millones a la producción global casi al equivalente de la producción anual de Brasil, la “pepa de oro” obedece también a los buenos precios que se pagan en el mercado internacional, durante el año 2012 el precio promedio por tonelada fue de USD 2.392, en el 2013 fue de 2.439 y en el 2014 este precio subió a USD 3.126 según datos de Inside Future.

El cacao básicamente se produce en las regiones Costa y Amazonía del Ecuador concentrándose principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos, cultivándose cacao de dos tipos: cacao Nacional y cacao CCN-51 (“Colección Castro Naranjal”, este tipo de cacao fue producto de un injerto de varias cepas realizado por el ecuatoriano Homero Castro en el año 1965 con el objetivo de combatir plagas), ocupando aproximadamente 500.000 ha, de las cuales 110.000 ha se encuentran en manos de pequeños agricultores, con parcelas no mayores a 5 ha. Este producto representa el 7% del Producto Interno Bruto (PIB) del país,

beneficiando a pequeños y medianos productores agrícolas (Figura 1) (EL COMERCIO, 2014; Guerrero, 2014; LA REPÚBLICA, 2012; EL TELÉGRAFO, 2013).



Figura 1. Productor ecuatoriano de cacao.

Según Ayala (2008), la clasificación botánica más aceptada de *T. cacao* es:

Reino: Plantae (plantas)

Subreino: Tracheobionta (plantas vasculares)

División: Magnoliophyta (plantas con flores, angiospermas)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Familia: Sterculiaceae

Subfamilia: Byttnerioideae

Género: *Theobroma*

Especie: *T. cacao*

2.4 Botánica del cacao (*Theobroma cacao* L.) según Enríquez (2004)

El Cacao es una especie diploide ($2n = 20$ cromosomas), puede alcanzar alturas de hasta 20 m o más cuando crece libremente, presenta un ciclo vegetativo perenne. Es una especie alógama ya que se estima que su polinización cruzada está por encima del 95%. Crece y se desarrolla

usualmente bajo sombra en los bosques tropicales húmedos de América del Sur.

2.4.1 Morfología

2.4.1.1 Raíz

La raíz principal es pivotante y puede alcanzar entre 1,20 a 1,50 m, en suelos sueltos puede llegar hasta 2 m. Las raíces secundarias o raicillas en su mayoría se encuentran en los primeros 0,25 a 0,30 m del suelo alrededor del árbol, pudiendo alcanzar los 5 – 6 m de longitud horizontal (Figura 2a).

2.4.1.2 Tallo

El tallo, en la primera fase de crecimiento, es ortotrópico (vertical) que perdura por 12-15 meses. Luego, este crecimiento se interrumpe para dar lugar a la formación de 4 - 5 ramas secundarias (“horqueta”), que son de crecimiento plagiotrópico (horizontal). Debajo de la horqueta aparece con frecuencia brotes ortotrópicos o “chupones” que darán lugar a una nueva horqueta y este evento, puede repetirse por 3 a 4 veces consecutivas (Figura 2b).

2.4.1.3 Hojas

Las hojas adultas son simples y enteras, presentan una pigmentación color verde, el mismo que varía desde verde pálido a café claro a veces con tonalidades rojizas de acuerdo a la edad de la planta. Las hojas del cacaotero son caducas por lo que presentan picos de brotación reemplazando así a las que caen. El peciolo de las hojas laterales es pequeño y el de la hoja del tronco es normalmente largo con un pulvinus bien marcado (Figura 2c).

2.4.1.4 Flores

Las flores del cacao son hermafroditas, pentámeras es decir que están constituidas de cinco (sépalos, pétalos, estaminodios, estambres, y lóculos por ovario), son completas (todos sus verticilios florales) y perfectas (con androceo y gineceo). Las flores aparecen en el tronco en forma solitaria o en grupos (cojinetes florares), su diámetro oscila entre 1 – 1,5 cm (Figura 2d).

2.4.1.5 Frutos

Los frutos son bayas indehiscentes, conocidas como mazorcas, las cuales se encuentran sostenidas por el pedúnculo no muy largo que se origina del crecimiento del pedicelo de la flor. Según el origen genético del cacao estos pueden variar de forma, espesor, rugosidad, color y tamaño. Presentan una exodermis o cascara gruesa muy resistente, cuando maduros la cascara se separa de la semilla que se va secando. Los frutos presentan una gama de colores que en estado inmaduro van de tonos verdes, rojizos y cafés; con surcos y lomos pigmentados, mientras que en estado maduro varían de amarillo a rojizos anaranjados. Las bayas tienen cinco lóculos y cada uno tiene dos partes formadas por dos lomos o un surco interno, lo que en algunos frutos es evidente y en otros casi ha desaparecido (Figura 2e).

2.4.1.6 Semillas

Las semillas presentan una forma oblonga y varían mucho de tamaño según el tipo de cacao, tal es el caso del cacao tipo Criollo y del Nacional de Ecuador que son las semillas largas y redondas, otros son aplanados en el caso de los Forasteros. Tienen un recubrimiento o cutícula que protege los cotiledones, en la parte exterior se encuentra el mucílago que es la pulpa dulce de la semilla, permitiendo diferenciar algunos genotipos de cacao. El color de la semilla también varía de acuerdo al genotipo desde blanco ceniciento, blanco puro, hasta un morado oscuro y todas las tonalidades intermedias (Figura 2f).

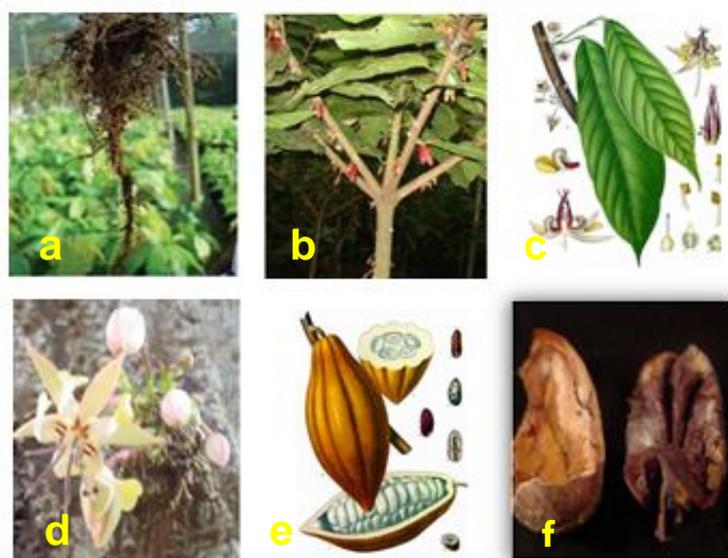


Figura 2. Órganos vegetativos y reproductivos del cacao.

2.5 Características de las principales variedades de cacao

Ecuador es uno de los países donde existe la mayor diversidad genética de *T. cacao*. Hoy en día el centro de dispersión se encuentra entre los 20° de latitud norte y 20° de latitud sur. Por su origen y características genéticas se desarrollaron cultivares diferentes de cacao en cada zona específica (Ayala, 2008; Paredes, 2009).

Según Paredes (2009), El cacao está clasificado en cuatro tipos:

- **Cacao Criollo:** Son árboles bajos y poco robustos, su copa es de color verde, gruesa, redonda con hojas pequeñas y sus almendras son de color blanco marfil con sabor a nuez y fruta. La principal característica de este tipo de cacao está en la mazorca al ser alargada, de colores verdes y rojizos en estado inmaduro, amarillas y anaranjadas al alcanzar la madurez (Figura 3). Este tipo de cacao se desarrolló al norte de Ecuador (Esmeraldas), Colombia, Venezuela, Centroamérica hasta las selvas tropicales de México.



Figura 3. Mazorcas de cacao Criollo en estado maduro e inmaduro.

- **Cacao Forastero Amazónico:** Se los conoce como amazónicos al encontrarse distribuidos en la cuenca del Río Amazonas y sus afluentes. La mazorcas en estado inmaduro son de color verde y amarillas cuando han alcanzado su madurez, presenta forma de cuello de botella, las almendras son aplanadas con cotiledones de color morado (Figura 4). De este tipo de cacao se obtiene chocolate con sabor básico de cacao proporcionando el 80 % de la producción mundial.



Figura 4. Mazorcas maduras de cacao Forastero.

- Cacao Trinitario:** Es producto del cruce entre cacao criollo de Trinidad (de ahí deriva su nombre) y Forastero multiplicado en la cuenca del río Orinoco. Este tipo de cacao abastece del 10 al 15% de la producción mundial. Son más resistentes a enfermedades y han podido adaptarse mejor a muchos ambientes, presenta sabor a cacao de medio a alto, usualmente asociado además con sabor a frutas y nueces (Figura 5). Este tipo de cacao es el que mas se cultiva en América, presenta diversas formas intermedias de mazorcas al igual que su coloración desde tonos verdes y rojizos, e inclusive una mezcla de ambos.



Figura 5. Mazorcas cacao Trinitario.

- Cacao Nacional de Ecuador:** Es el único grupo natural de cacao que se cultiva en el occidente de Ecuador. Por su fina calidad de almendra, éste grupo está más relacionado al grupo Criollo que al grupo Forastero. Las mazorcas son amelonadas, presenta estrangulaciones en el ápice y la base, con surcos y lomos poco profundos, el color interno de las almendras es violeta pálido o lila aunque también se puede observar semillas blancas.

De este tipo de cacao se obtiene los mejores chocolates del mundo por su sabor y aroma floral (Figura 6).



Figura 6. Mazorcas de cacao Nacional.

Clones: Según INIAP (2000), son variedades producidas por el hombre que se identifican con letras y números provenientes de investigaciones tal es el caso del:

CCN-51: tipo de cacao que actualmente cubre una parte de las plantaciones de la Amazonía ecuatoriana. Las mazorcas en estado inmaduro son de color rojizas-moradas y en estado maduro presentan un color rojizo anaranjado. Tienen sabor a cacao de medio a bajo, el potencial de esta variedad es la producción de manteca de cacao (Figura 7a).

EET-95: denominación original Tenguel-33, cacao que tiende a desarrollarse en suelos franco arcilloso-limoso con buen drenaje y ricos en materia orgánica. Las mazorcas se caracterizan por tener forma de cuello de botella, en estado inmaduro son de color verde y en la madurez presentan un color amarillo, sus semillas son cilíndricas de color púrpura oscuro. El rendimiento de semilla es de 1368 kg/ha (Figura 7b).

EET-96: denominación original Porvenir-10, se adapta a una temperatura de 21 a 28°C con poca variación entre el día y la noche, suelo franco arcilloso-limoso con buen drenaje. Las mazorcas presentan una base ancha, surcos profundos, superficie rugosa, en estado inmaduro son de color verde y en estado maduro verde amarillento, las semillas son cilíndricas. El rendimiento de semilla es de 1140 kg/ha (Figura 7c).

EET-103: dominación original Tenguel-25, adaptable a una temperatura de 21 a 28°C con poca variación entre el día y la noche, suelo franco arcilloso-limoso

con buen drenaje. Sus frutos son ovoides, amelonados (superficie lisa, poco rugosos), en estado inmaduro son de color verde y en la madurez amarillo. El rendimiento de semilla es de 1330 kg/ha (Figura 7d).



Figura 7. Características de las mazorcas de los clones de cacao a) CCN-51 b) EET-95 c) EET-96 d) EET-103 (El productor, 2012).

2.6 Enfermedades fúngicas del cacao

El cacao como cualquier vegetal es atacado por microorganismos que afectan su producción y calidad, y por consiguiente incrementan los costos de producción (Porras & Sánchez, 1991). En el Ecuador las enfermedades del cacao causan más pérdidas al agricultor que los insectos, llegando hasta el 80% (Phillips-Mora & Wilkinson, 2007), entre las principales enfermedades en los cacaotales del Ecuador se señalan:

2.6.1 Mazorca negra (*P. palmivora*)

Enfermedad conocida también como pudrición parda, atacando a todas las partes de la planta: flores, hojas, ramas, tronco y raíces, pero las mayores pérdidas son por daños al fruto presentándose en forma de manchas circulares oscuras (Figura 8), extendiéndose rápidamente por toda la mazorca (CORPOICA, 2010; Villavicencio, 2010).

El mal manejo de la plantación, exceso de sombra, mal drenaje y falta de podas favorecen la presencia de la enfermedad sobre todo cuando se presentan temperaturas bajas y lluvias más frecuentes (Paredes, 2009).

Según estudios moleculares indican que el centro de origen de este microorganismo es África originado al momento de la introducción de las primeras plantas al continente hoy en día la enfermedad se encuentra distribuida por todo el mundo. (CORPOICA, 2010; ICA, 2012)



Figura 8. Síntoma de mazorca negra.

2.6.2 Escoba de bruja (*M. perniciosus*)

Enfermedad que se caracteriza por la proliferación de yemas apicales y axilares en ramas, afectan a flores, frutos, brotes nuevos, cojinetes flores (Figura 9) produciendo hipertrofias y crecimientos anormales en la planta. De igual manera provoca debilitamiento al árbol, y abortos de frutos cuando son afectados en edades tempranas (Parra, Contreras & Pineda, 2008).



Figura 9. Árbol afectado por escoba de bruja (INIA, 2008).

Los frutos afectados presentan diferentes síntomas los mismos que dependen del estado de desarrollo a la infestación, pueden tomar forma de chirimoyas, fresas o zanahorias (Figura 10a), en frutos enfermos de 1 a 4 meses de edad,

se presentan deformaciones, hinchazón (Figura 10b y 10c) y se forma un área necrótica (Figura 10d) más oscura que la ocasionada por la pudrición por monilia, enfermedades fúngicas relacionadas entre sí (CORPOICA, 2010).

Las escobas producen estructuras reproductivas, con forma de pequeñas sombrillas, que producen millones de esporas. Estas son dispersadas por el viento y la lluvia. Se ha comprobado que la enfermedad puede ser transmitida por semilla por partes vegetativas de la planta, ya que el organismo se establece en tejidos maduros por un tiempo más o menos largo. Otra forma de transmitir la enfermedad es por medio de la mazorca (ICA, 2012; Paredes, 2009).



Figura 10. Síntomas en frutos causados por *M. perniciosa* a) Fruto chirimoya; b) y c) Protuberancias; d) Mancha chocolate.

2.6.3 Mal de machete (*C. fimbriata*)

La enfermedad puede destruir árboles enteros ocasionando pérdidas muy altas. El hongo siempre infecta al cacao por medio de lesiones en los troncos y ramas principales, los primeros síntomas son marchitez y amarillamiento de hojas hasta que el árbol se seca completamente (Figura 11). El hongo se disemina muy fácilmente por lo que al realizar recolección de frutos, podas, labores culturales en cacaotales con herramientas estas se deben desinfectar, de igual manera evitar hacer daño a los árboles durante la limpieza, poda y remoción de chupones. Las ramas infectadas o los árboles enteros, muertos por la enfermedad, deben retirarse del cacaotal y quemarse (FUNDESYRAM, 2013).



Figura 11. Árbol infectado por Mal de machete.

2.7 Monilia (*M. roreri*)

2.7.1 Importancia económica

Considerada la principal enfermedad del cacao al provocar lesiones tan severas en el cacaotal. Ecuador y Colombia reportan pérdidas que van desde el 16 hasta el 80%, siendo uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de cacao a nivel nacional. Cuando la enfermedad llega a su grado máximo de desarrollo se caracteriza por la presencia de una cubierta blanquecina polvorienta en las mazorcas, las cuales se cubren de esporas, que posteriormente se oscurecen. Esta enfermedad ataca específicamente a los frutos de cacao en cualquier etapa de desarrollo, siendo más susceptibles las mazorcas jóvenes (ANECACAO, 2006; Paredes, 2009).

La severidad de la enfermedad varía de una zona a otra, aspectos que depende de las condiciones climáticas del sitio dónde se encuentre la plantación. En un cacaotal desatendido la monilia puede provocar la pérdida total de la producción lo que hace poco rentable aun en época de excelente precio en el mercado. Por el contrario al realizar prácticas de manejo en la plantación como control de malezas, podas, regulación de sombra, eliminación de frutos enfermos y mejora de los drenajes entre otras prácticas culturales la pérdida en la producción puede reducirse a menos del 8% (Porrás & Sánchez, 1991; FHIA, 2012).

2.7.2 Origen y distribución geográfica.

En Ecuador la monilia fue descrita por primera vez en el año de 1916, por J. B. Rorer, considerando la región de Quevedo como el centro de origen. Phillips

(2006) demostró que en la zona de Antioquia, Colombia apareció la enfermedad a fines de siglo XVIII. La enfermedad se encuentra en todos los países de Sudamérica donde se dedican al cultivo de cacao como son: Ecuador, Colombia, Perú, Venezuela y Surinam; Brasil es el único país que hasta el 2012 no presentaba reportes de la enfermedad en plantaciones de cacao. La monilia se la encuentra también en Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala, Belice y hasta el 2008 se conoció que México se vio afectado por la enfermedad posiblemente introducida de Honduras (FHIA, 2012).

Conociendo la gran susceptibilidad de los genotipos comerciales de cacao, la agresividad del patógeno, su excepcional capacidad para sobrevivir en diferentes condiciones ambientales y la rápida dispersión natural mediada por el hombre, se considera que *M. roreri* es una gran amenaza para los agricultores de cacao en el mundo (Phillips-Mora & Wilkinson, 2007).

2.7.3 Etiología

Se conoce que el centro de origen del patógeno está en la región nororiente de Colombia. El agente causal de la moniliasis fue inicialmente llamado *Monilia roreri* por Ciferri y Parodi (1933), dándole la siguiente clasificación: clase: Deuteromycetes, orden: Hyphales, género: Monilia y especie: *M. roreri*, filum Ascomicota hongo anamórfico debido a la aparente ausencia de un estado meiótico o de estructuras sexuales y sus similitudes morfológicas con otros fitopatógenos del género (Evans *et al.*, 2003 citado por CORPOICA, 2010). Evans *et al.* (1978) mediante el uso del microscopio observó características de Basidiomycetes, por lo que lo agrupó dentro de esta clase y se creó un nuevo nombre: *Moniliophthora roreri*. Phillips-Mora (2003), mediante el uso de técnicas moleculares confirmó que el hongo es un Basidiomycete. Posteriormente, Aime y Phillips-Mora (2005) reafirmaron la ubicación de *M. roreri* dentro de la familia Tricholomataceae.

2.7.4 Taxonomía

Según Bioscience (2004), este patógeno se encuentra clasificado de la siguiente manera:

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Basidiomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *roreri*

Nombres comunes de la enfermedad según IDIAF, 2012:

Moniliasis del cacao, pudrición de fruto, pudrición acuosa del fruto, helada mancha ceniza, enfermedad de Quevedo.

2.7.5 Ciclo de vida del hongo *M. roreri*

El agente causal de la monilia presenta un período de incubación (largo) de 3 a 8 semanas de acuerdo a la edad del fruto, aunque el ciclo es más corto en climas calientes y húmedos que en climas frescos. En días de abundante lluvia y calor los síntomas de la enfermedad aparecen a los 15 y 20 días en frutos tiernos. Se considera que la primera etapa (menor de 3 meses) de desarrollo del cacao son las más susceptibles a la infestación del hongo el ataque es intercelular y emite conidióforos ramificados para propagarse en la parte interior del tejido; produce nuevas hifas infectivas tornándose el hongo intracelular alcanzando de esta manera su forma adulta, e iniciando la manifestación de los síntomas en la mazorca.

A los dos o tres días aparecen manchas color café, dependiendo de las condiciones climáticas se producen esporas, las mismas que se desprenden y son fácilmente transportadas por el viento, dando inicio un nuevo ciclo en mazorcas sanas. Después de la destrucción total de los tejidos, pasado los cuatro meses pocas mazorcas se puede aprovechar ya que la enfermedad

alcanzó la madurez momificando las mazorcas (Ayala, 2008; Phillips Mora & Cerda, 2009; Torres, 2010) (Figura 12).

Investigaciones del ICA entre 1960 y 1980 sobre etiología, epidemiología y control de la moniliasis, resaltan que los conidios sólo germinan en presencia de una película de agua, con mayor germinación cerca de los 24°C (CORPOICA, 2010).

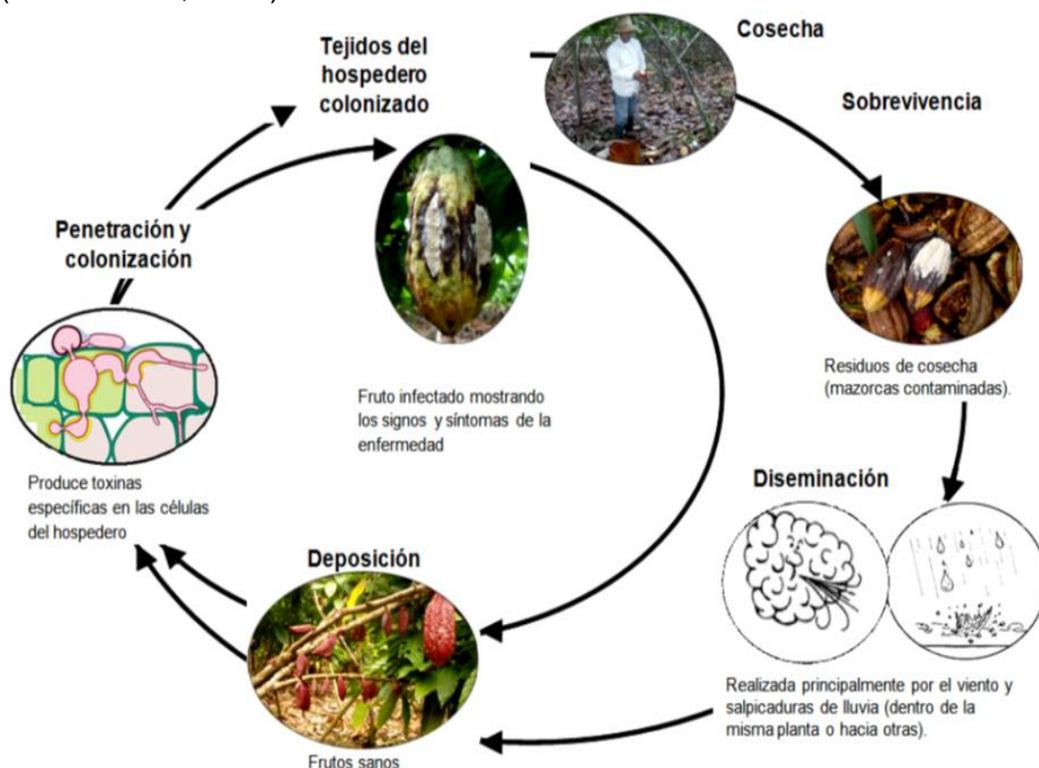


Figura 12. Ciclo de vida del hongo *M. royeri* (Evans, 1978).

En condiciones de campo, la enfermedad se ha encontrado sólo sobre frutos, artificialmente se han logrado infecciones sobre plántulas y primeros estadios foliares (Evans, 2007). La susceptibilidad de los frutos es inversamente proporcional a su edad, es decir que a mayor edad menor susceptibilidad. Es por tal motivo que en frutos menores a dos meses, la enfermedad ya se manifiesta con pequeños abultamientos o gibas en la superficie de la mazorca; síntomas típicos de la monilia. Después de la giba, se desarrolla una mancha café y sobre esta mancha aparece el micelio; a partir de los tres a siete días comienzan aparecer esporas de color crema, las cuales se dispersan con el viento. El hongo vuelve a infectar a frutos sanos o del mismo árbol, sólo en un centímetro cuadrado de la superficie de un fruto afectado, pueden contarse

desde 7 hasta 43 millones de conidios, siendo necesaria un solo conidio para dar inicio a la enfermedad (Torres, 2010; Villavicencio, 2010) (Figura 13).

Otro síntoma común de la monilia es la apariencia de madurez prematura del fruto, provocando un cambio de color en las mazorcas, las cuales aparentan una madurez normal en frutos que no tienen tamaño ni edad de cosecha, el daño que esta enfermedad produce con más severidad es en las almendras sin importar el estado fenológico del fruto (FHIA, 2012).

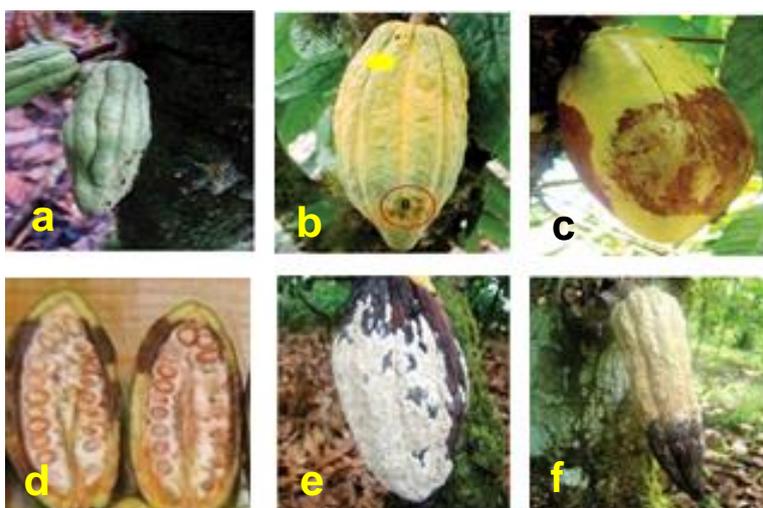


Figura 13. Síntomas y signos de *M. roseri* (a Deformaciones – Gibas; (b) Maduración prematura-puntos aceitosos; (c) Manchas irregulares; (d) Pudrición de almendras; (e) Micelio del hongo sobre la mancha, etapa contagiosa; (f) Fruto momificado (FUNDESYRAM, 2014).

2.7.6 Epidemiología

Estudios demostraron que las infecciones de esta enfermedad son favorecidas por condiciones de alta humedad relativa y temperaturas, transportando fácilmente las esporas que se producen sobre mazorcas enfermas por el viento y otros agentes, incluidos los seres humanos, hacia otras mazorcas donde reinician la infección (Enríquez & Soria, 1978).

La moniliasis, se desarrolla de 0 a 1520 msnm, con precipitación anual de 780 a 5.500 mm, temperatura promedio anual de 18,6 a 28°C. Se le considera un patógeno agresivo y excelente invasor de regiones geográficas al presentar un alto potencial de dispersión y una amplia plasticidad ecológica, es decir el nivel de adaptación a diferentes ambientes (Evans, 2002; Phillips-Mora, 2003; Phillips-Mora, 2006).

2.7.8 Rango de hospederos

M. roreri ha sido reportado solamente en especies de los géneros *Theobroma* y *Herrania*. Rorer en 1918 reportó el ataque de frutos de *T. bicolor* y *H. balaensis* en Ecuador. Baker *et al.* (1954) reportaron infecciones en *T. gireli*. Además, Evans (1981) reportó infecciones de *M. roreri* en *T. mammosum*, *T. simiarum*, *T. sylvestre*, *T. angustifolium*, *H. nítida*, *H. pulcherrima*. Posteriormente, Enríquez y Soria (1981) identificaron el patógeno en *T. grandiflora* y *H. purpurea* (Cuhn, 2006).

2.7.9 Métodos de control

Se conoce que la presencia de monilia en el cultivo de cacao es a causa de la deficiente ejecución de prácticas culturales, el control de esta enfermedad es relativamente fácil, pues se conoce que a *M. roreri* le benefician las condiciones húmedas, la oscuridad, el entrecruzamiento de las ramas dentro del mismo árbol o entre árboles vecinos, por lo que su control se basa principalmente en un buen manejo de la plantación evitando condiciones favorables para el desarrollo del hongo. Así para un buen control se necesita atender la plantación con mayor eficiencia (FHIA, 2012; Porras, 2012).

2.7.9.1 Control cultural según CORPIOCA, 2010 y Porras, 2012

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

Se realiza al menos dos veces al año para mantener las ramas y el tronco libre de brotes, chupones y de ramillas entrecruzadas dentro del árbol o entre arboles vecinos. También se puede realizar podas suaves donde se despunta las ramas eliminando chupones. De esta manera se contribuye a mantener un ambiente seco y fresco permitiendo una buena circulación de aire y facilitando la ejecución de otras labores.

b. Regulación del sombrío permanente

Esta práctica conjuntamente con la poda en los arboles de cacao permite una apropiada entrada de luz a la plantación, y una buena circulación de aire, favoreciendo el escape del vapor de agua. La regulación de la sombra también permite un uso más eficiente de la luz solar y por ende realizar una mejor fotosíntesis.

c. Adecuado sistema de drenaje

Es indispensable realizar drenajes para evitar encharcamientos del agua lluvia y evitar humedad dentro del ambiente de plantación.

d. Control de malezas

Eliminar malezas del cacaotal facilita la libre circulación del aire, contribuyendo a un ambiente equilibrado, evitando la condensación del rocío durante las noches ya que esta favorece la germinación de las esporas en el fruto.

e. Remoción de frutos enfermos

En épocas de lluvia se debe eliminar del árbol los frutos enfermos con cualquiera de los síntomas, práctica que se realiza al menos dos veces por semana, evitando que se conviertan en fuente de infección de los nuevos frutos que se desarrollan en el mismo árbol o arboles vecinos. Esta actividad se debe realizar minuciosamente para ir detectando cualquier fruto con síntomas aun en estado inicial. Los frutos enfermos que se remueven y caen se los deja ahí para que se descompongan debido a la actividad de los microorganismos del suelo.

2.7.9.2 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.

Los primeros intentos para el control químico de las enfermedades de los frutos de cacao, en el Ecuador, principalmente de la monilia, se realizaron por Rorer (1918) con la aspersion de caldo bordelés, en diferentes formulaciones, pero

sin obtener resultados convincentes, por lo que se consideró inconveniente su aplicación (Ayala, 2008; Villavicencio, 2010).

2.7.9.3 Control biológico

Uno de los enfoques más exitosos del manejo integrado de plagas sin químicos es el control biológico, considerado valioso en los programas de manejo integrado de plagas (MIP). Sin embargo, el control biológico o biocontrol surgió hace pocas décadas con el desarrollo del MIP como una práctica eficiente para el manejo de plagas o enfermedades (Peshin & Dhawan, 2009).

En los últimos años se ha demostrado el gran potencial de hongos y bacterias endófitos para el control de la moniliasis. Los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, así como hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*. 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 (SENASA, 2003 citado por Villavicencio, 2010; Suárez & Rangel, 2014).

2.7.9.3 Control por medio de resistencia genética

Los cultivares de *T. cacao* presentan diferencias en la susceptibilidad a *M. royeri*, lo que indica que dentro de esta especie existe resistencia al hongo. No se ha descubierto material inmune a *M. royeri*. Pruebas realizadas en Ecuador, Colombia, Costa Rica y Honduras han permitido encontrar cultivares (clones o híbridos) que muestran menor número de mazorcas infectadas, o si son infectadas la severidad de la enfermedad es menor (daños internos o externos). Ejemplo de los cultivares son los clones: UF-273, UF-712, PA-169, ARF-22, EET-75, EET-233, UF-296, IMC-67, entre otros (FHIA, 2012).

2.8 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)

Van der Plank (1963) propuso una modificación al modelo epifitológico de puntos múltiples, en el cual el ABCPE fue usada como descriptor de la epifiticia vegetal, basada en la determinación de las pérdidas de diferentes cultivos afectados por agentes fitopatógenos. Esta variable, relaciona las pérdidas de

los cultivos con las sumas de enfermedades, durante un periodo de tiempo dado en un período específico del crecimiento del cultivo Shaner y Finney (1977). A su vez lograron definir matemáticamente la fórmula que actualmente se utiliza para su cálculo. Para determinar el ABCPE, se puede hacer mediante el método del punto medio o mediante el método de integración trapezoidal en dos intervalos de tiempo dados (Campbell y Madden, 1990). Generalmente, se utiliza en epifitias de corta duración, que se presentan de forma tardía durante el crecimiento del cultivo. A medida que menor es los intervalos de tiempos en los cuales se evalúa la epifitia, mayor exactitud se logra del ABCPE. Esta variable asume, que el daño al huésped es proporcional a la cantidad de tejido enfermo y a la duración de la enfermedad.

2.9 Conservación de hongos filamentosos según Ángel (2006)

2.9.1 Métodos para la conservación a largo plazo

Estos métodos son considerados los mejores, porque con ellos se paraliza el crecimiento y el metabolismo de las células microbianas sin que mueran. Garantizando así al máximo la estabilidad genética de la especie que se desea conservar. Sin embargo, durante la fase preparatoria del material biológico que se desea crioconservar, no se puede descartar la posibilidad que se originen cambios genéticos. Entre las técnicas de conservación pertenecientes a este grupo están la liofilización y la criocongelación.

2.9.1.1 Liofilización

Por este método, se puede preservar a largo plazo bacterias, hongos, levaduras y virus, siendo introducido en 1903 cuando Vansteenberghé liofilizó el virus de la rabia sobre ácido sulfúrico en condiciones de vacío. El principio básico para hongos es congelar la suspensión conidial y remover el agua por sublimación mediante vacío. El periodo de viabilidad para algunos hongos conservados bajo este método es de hasta 23 años.

2.9.1.2 Criocongelación

Mediante este método, los microorganismos pueden ser preservados entre -5 a -20°C por 1 a 2 años en cultivo, en caldo o en suspensiones celulares utilizando viales. Para los procesos de profunda congelación se requieren

crioprotectores como el glicerol o dimetil sulfóxido (DMSO), cuando la criocongelación es a -70°C o en nitrógeno líquido de -156 a -196°C . Con cultivos en caldo se toman de la mitad o pasada la fase logarítmica del crecimiento y mezclados con un volumen igual de 10 a 20% (v/v) de glicerol ó de 5 a 10% (v/v) de DMSO.

Lo mejor es conservar en tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura aproximada de -196°C , o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C . Se pueden emplear sustancias crioprotectantes, que protejan del daño a las células microbianas en el momento de la congelación entre esas se encuentra el glicerol a una concentración del 15 al 20%, o a la vez se puede utilizar dimetilsulfóxido, leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismos que se desea conservar.

2.9.2 Métodos a corto plazo

Son métodos que ayudan al mantenimiento de las cepas, generalmente para el uso frecuente donde se requiere la cepa activa.

2.9.2.1 Conservación por suspensión en agua destilada

Es un método alternativo que da altos porcentajes de viabilidad en especies de *Phytophthora*, *Pythium*, ascomicetos, basidiomicetos y hongos mitospóricos; alcanzando viabilidad entre 2 y 7 años. Esta conservación consiste en suspender en agua estéril conidias, esporas, esclerocidos, entre otros, los resultados obtenidos muestran altos porcentajes de viabilidad en periodos a veces superiores a 5 años.

2.9.2.2 Conservación con aceite mineral

El aceite mineral está compuesto de aceite lubricante producido a partir del petróleo o de la hulla. Este método, consiste en recubrir con aceite mineral estéril un cultivo que se encuentre en condiciones óptimas de crecimiento micelial y esporulación, generalmente se utiliza aceite mineral de alta calidad

de grado medicinal, esta técnica disminuye la deshidratación del medio, retarda la actividad metabólica del cultivo por la reducción de la tensión del oxígeno además de reducir la infestación por ácaros. Este método es aplicable a formas no esporuladas o estrictamente miceliales, para las cuales la liofilización o la criopreservación no pueden ser utilizadas.

Capítulo III

3. Materiales y métodos

3.1 Localización y duración del experimento.

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en el Km. 2 ½ Vía Napo (Paso lateral) provincia de Pastaza, parroquia Puyo.

Con una duración de trabajo en el laboratorio de 180 días, sistematización e interpretación de la información obtenida, correspondiente al periodo de Junio 2014 a Marzo 2015.

La ubicación geográfica fue levantada directamente con un GPS.

Coordenadas geográficas: 1°27'42" S

78°01'53,6" O

Altitud: 935 m.s.n.m

3.2 Condiciones meteorológicas.

En el laboratorio la temperatura fue controlada a 24°C y una humedad relativa del 85%.

3.3 Materiales y equipos

3.3.1 Físicos

Tijeras de podar (PRETUL), balde plástico de capacidad 50 litros, papel periódico, pinzas metálicas, Erlenmeyer de 100 mL, 500 mL y 1000 mL (CITOGLAS), cajas petri de dimensión 100 x 15 mm, asa de inoculación, sacabocados de 4,30 mm y 3,70 mm, lámpara de alcohol, cuchillo (TRAMONTINA), vasos de precipitación de 50 mL, 250 mL y 600 mL (OBEROI UK), probeta de 250 mL, bandejas plásticas, gasa, tubos eppendorf de 2cc, parafilm (BEMIS®), papel filtro, micro pipeta (SOCOREX SWISS 10-100 µl), bolsas herméticas con cierra fácil (16,5 cm x 14,9 cm), vaso plástico de licuadora de 250 mL, termómetro de -10°C, goteros plásticos, espátula

metálica, marcadores permanentes, cámara de Neubauer, atomizador plástico, gradilla plástica para eppendorf, registro de datos.

3.3.2 Biológicos (Material experimental)

Mazorcas pequeñas de aproximadamente 10 cm de largo de cacao cultivar Nacional, clones CCN-51 EET-95, EET-96, EET-103 y aislados monospóricos de *M. royeri*.

3.3.3 Equipos

Autoclave (Wisd LABORATORY INSTRUMENTS), cámara de flujo laminar (LABCONCO), incubadora (MEMMERT IN 110), cámara fotográfica (SONY), refrigerador (INDURAMA), pHmetro (HANNA), plato agitador magnético (IKA C-MAG HS 7), balanza analítica (22 ADAM), ultra congelador (WUF-D300; Wisd), microscopio trinocular (MEIJI), computador portátil (Hp).

3.3.4 Insumos

Agua destilada estéril, glicerol al 15% (v/v), alcohol al 70% (v/v) y 90% (v/v), medio de cultivo líquido Difco™ Potato Dextrose Broth (Código: 254920), medio de cultivo semi sólido V8MAA.

3.3.5 Software estadístico

El procesamiento estadístico de las variables utilizadas en este trabajo, se realizó mediante el paquete estadístico *IBM SPSS Statistic versión 21.0 para Windows*.

3.4 Factor de estudio

El factor en estudio para la investigación fue la caracterización patogénica y la agresividad de aislados de *M. royeri*.

3.5 Análisis estadístico

Para el análisis, comparación y procesamiento de datos del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) se utilizó la prueba de *Dunnet*.

De igual manera se utilizó la prueba no paramétrica de *Kruska Wallis* complementada con la prueba de *Mann Whitney* para determinar la respuesta

de cinco genotipos de cacao en base al valor del ABCPE hasta los 10 días posteriores a la inoculación artificial de sus mazorcas.

3.6 Variables

Las variables independientes de la investigación correspondieron a la patogenicidad y la agresividad de los aislados *M. royeri*, mientras que las variables dependientes fueron severidad externa e interna, así como el ABCPE (Tabla 1).

Tabla 1. Variables empleadas en la investigación

Variables independientes	Variables dependientes	Descripción de la variable
Caracterización patogénica	Severidad interna	Niveles de infestación de la enfermedad siguiendo lo recomendado por Sánchez (1982), mediante una escala sintomatológica de 0 a 5, sobre mazorcas sanas; tiempo de evolución de la enfermedad.
	Severidad externa	Basada en la experiencia externa el fruto y los signos del patógeno, utilizando la escala propuesta por Brenes, 1983.
Agresividad de los aislados de <i>M. royeri</i>	ABCPE	En base a una escala diagramática propuesta por Brenes (1983). Para determinar el ABCPE, se utilizó la fórmula propuesta por Shaner y Finney (1977) usando el método de integración trapezoidal.

3.7 Manejo del experimento

3.7.1 Análisis de la zona de estudio.

Para la investigación se usaron los aislados de la colección de cultivo de *M. royeri* de la Universidad Estatal Amazónica procedentes de 3 provincias amazónicas (Tabla 2 y Figura 14).

Tabla 2. Sitios donde se realizó la recolección de las mazorcas enfermas de cacao e identificación de aislados

AISLADO	FINCA	PROPIETARIO	PROVINCIA	CANTON	PARROQUIA	SECTOR	EDAD (años)
CC-UEA-Mr1.6 CC-UEA-Mr1.16 CC-UEA-Mr1.29	1	Sr. Carlos Pozo	Napo	Tena	Ahuano	Colonia Bolívar	7
CC-UEA-Mr2.7 CC-UEA-Mr2.12 CC-UEA-Mr2.15	2	Sr. Cesar Dahua	Napo	Tena	Ahuano	Ahuano	8
CC-UEA-Mr5.3 CC-UEA-Mr5.16 CC-UEA-Mr5.17	5	Sra. Mariana Rodríguez	Napo	Arosemena Tola	Arosemena Tola	Arosemena Tola	7
CC-UEA-Mr6.10	6	Pto. Misahualli	Napo	Tena	Misahualli	-	7
CC-UEA-Mr7.13 CC-UEA-Mr7.16 CC-UEA-Mr7.17 CC-UEA-Mr7.20 CC-UEA-Mr7.28	7	Sr. Wilson Avilez	Pastaza	Arajuno	Arajuno	Hushiño las peñas del pozo	8
CC-UEA-Mr8.9 CC-UEA-Mr8.10 CC-UEA-Mr8.11 CC-UEA-Mr8.19 CC-UEA-Mr8.20	8	Sr. Patricio Carreño	Morona Santiago	Palora	16 de Agosto	La Comanche	5

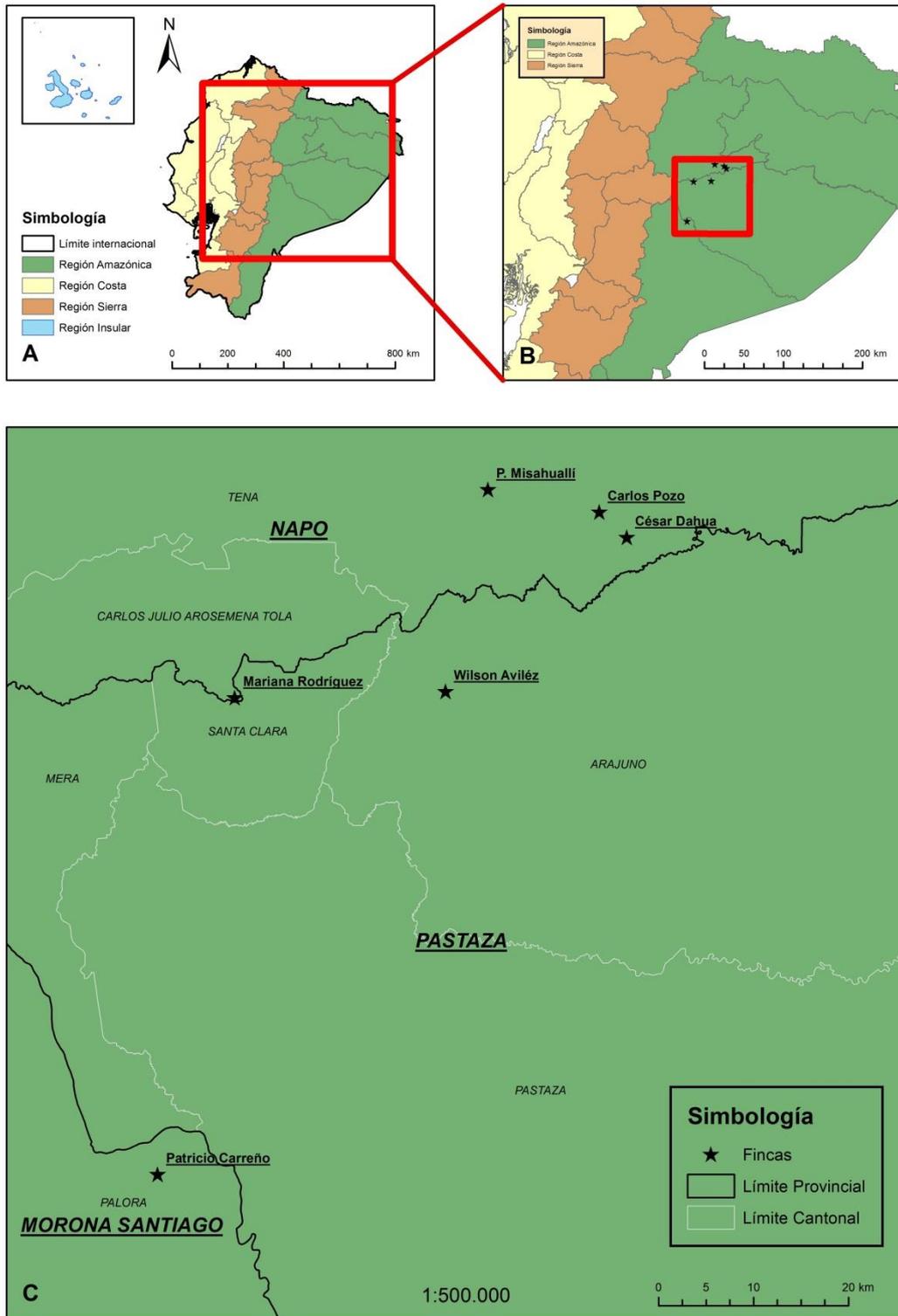


Figura 14. Lugares de procedencia de los aislados. Proyección del mapa UTM, Datum WGS 84, Zona 18 sur. **A)** Ecuador, **B)** Provincias amazónicas, **C)** Sitios de procedencia de lo aislados.

3.7.2 Evaluación de la patogenicidad y agresividad de los aislados de *M. royeri* en un ensayo monocíclico en condiciones controladas (Phillips, 1986).

Este estudio se realizó con el fin de determinar la capacidad infectiva de 20 aislados de *M. royeri* sobre mazorcas sanas del cultivar Nacional de cacao así como para comprobar los síntomas y su correspondencia con lo observado en condiciones naturales. Los aislados utilizados pertenecen a la Colección de Cultivo de *M. royeri* de la Universidad Estatal Amazónica.

3.7.2.1 Preparación del material vegetal

Se utilizaron diez mazorcas por aislamiento y diez mazorcas sin incubar como control, requiriéndose un total de 210 mazorcas pequeñas de aproximadamente 10 cm de largo de cacao Nacional. La colecta de las mazorcas para el experimento se realizó en el Centro de Investigación, Posgrado y Conservación de la Biodiversidad Amazónica (CIPCA) de la Universidad Estatal Amazónica, procedentes de un sistema agroforestal con manejo orgánico. Para su transporte, las mazorcas fueron envueltas con papel periódico humedecido y colocadas en un recipiente plástico.

Una vez en el laboratorio los frutos de cacao fueron lavados con agua corriente durante 5 min, luego se desinfectaron con alcohol al 70% cada una durante 3 min y posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada estéril por 2 min.

3.7.2.2 Preparación del medio.

Para el crecimiento del micelio de los aislados de *M. royeri*, se empleó medio de cultivo líquido, Difco™ Potato Dextrose Broth para lo cual se utilizó 250 mL de medio líquido por aislado. El pH se ajustó a 5,8. Se distribuyeron 50 mL de medio líquido en los erlenmeyers de 100 mL. Se esterilizaron en autoclave, a una temperatura de 121°C y 1 atmósfera de presión por 15 min. Se dejó enfriar el medio de cultivo, dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a sembrar un disco de micelio con la ayuda de un sacabocados de 3,70 mm de diámetro. Los erlenmeyers, se colocaron en una incubadora a 27°C y se mantuvieron durante 12 días (Figura 15).



Figura 15. Preparación del medio de cultivo PDB.

3.7.2.3 Preparación de la suspensión del micelio.

Transcurridos los 12 días de inoculación, se colectó el micelio dentro de la cámara de flujo laminar. El micelio colectado de cada aislado se unió en un vaso plástico de licuadora de 250 mL de capacidad y se homogenizó el contenido con la ayuda de la licuadora marca Oster®, durante 2 min (Figura 16). El homogenizado micelial, se filtró por cuatro capas de gasa estéril. Posteriormente se determinó la concentración de micelio filtrado en la cámara de Neubauer, la misma que fue ajustada a una concentración aproximada de $1.2 \cdot 10^5 \text{ ufc.mL}^{-1}$.



Figura 16. Preparación de la suspensión del medio.

3.7.2.4 Inoculación

En la cámara de flujo laminar, con la ayuda de una micro pipeta se tomó 0,5 mL de solución y se colocó en la mazorca. Una vez inoculadas y secas, las mazorcas fueron ubicadas en bolsas de polietileno herméticas (16,5 cm x 14,9 cm) con papel filtro humedecido con 25 mL de agua destilada estéril. El objetivo de esta labor fue proveer, de una película de agua, condición indispensable para que ocurra la infección. Las bolsas fueron incubadas a 27°C durante 3 semanas. El papel filtro se retiró 48 horas después de la inoculación con la ayuda de una pinza (Figura 17).

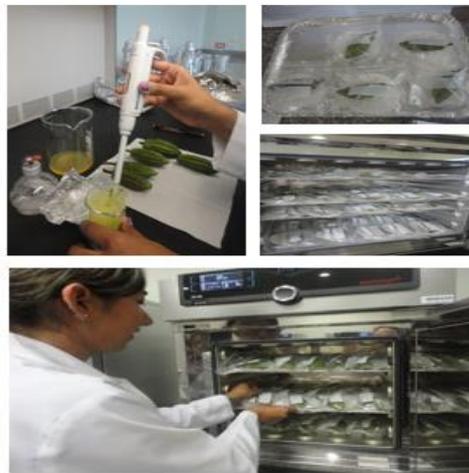


Figura 17. Inoculación de las mazorcas de cacao.

3.7.2.5 Evaluación.

Para evaluar la patogenicidad y agresividad se determinó la presencia o ausencia de síntomas sobre las mazorcas inoculadas así como la magnitud del daño causada, por cada aislado. Para esto se utilizaron las siguientes variables:

a. Severidad externa: basada en la apariencia externa del fruto, los síntomas y signos inducidos por la incubación de los aislados sobre las mazorcas de cacao, utilizando la escala propuesta por Brenes (1983) (Tabla 3).

Tabla 3. Escala de valoración de severidad externa propuesta por Brenes (1983)

Escala	Características	Correspondencia visual
Grado 0	Fruto sano	
Grado 1	Puntos aceitosos	
Grado 2	Tumefacción o clorosis	
Grado 3	Mancha oscura (necrosis)	
Grado 4	Micelio hasta un 25% de la mancha	
Grado 5	Micelio en más del 25% de la mancha	

b. Severidad interna: basada en el porcentaje de necrosis interna observada en el fruto cuando este sea cortado longitudinalmente y medido con relación a la escala desarrollada por Sánchez, *et al* (1987) (Tabla 4).

Tabla 4. Escala de valoración de severidad interna propuesta por Sánchez *et al.*, (1987)

Escala	Características	Correspondencia visual
Grado 0	Cero área necrosada	
Grado 1	1-20% del área necrosada	
Grado 2	21-40% del área necrosada.	
Grado 3	41-60% del área necrosada	
Grado 4	61-80% del área necrosada.	
Grado 5	100% del área necrosada	

c. **Índice de infección:** propuesto por Townsend y Heuberger, 1943.

$$I = \sum nb \div (N - 1)T \times 100$$

Dónde n= número de porción de cada mazorca en cada nivel, b= valor de severidad acorde con la escala evaluativa, N= número de niveles de la escala, T= número total porciones (parte basal, parte media y parte distal de la mazorca) por cada mazorca inoculada.

d. **Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE):** Se calculó mediante la fórmula propuesta por Shaner and Finney (1977):

$$ABCPE = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Donde y_i representa el índice de infección (severidad), en diferentes momentos de evaluación (t_i). Las evaluaciones fueron realizadas diariamente

3.7.3 Conformación de una colección de aislados de *M. royeri*

Los aislados de *M. royeri* fueron sembrados en cajas petri que contenían medio de cultivo semi solido V8MAA. Transcurridos 15 días de su crecimiento, se procedió a conservarlos. Se utilizaron 20 tubos eppendorf de 2 mL por aislado. En autoclave, se esterilizó 400 eppendorf, 200 mL de agua destilada, y 200 mL de glicerol al 15% a una temperatura de 121°C y 1 atm por 15 min. Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a colocar 1 mL de agua destilada estéril en 10 eppendorf y en los 10 restantes se colocó 1 mL de glicerol al 15%.

Con la ayuda de un sacabocados de 4,30 mm de diámetro se colocó tres discos de micelio en cada eppendorf y se los selló con parafilm. Se procedió a conservar 5 muestras en glicerol y 5 muestras en agua estéril de cada aislado a una temperatura de -4°C en refrigerador y las diez muestras restantes de cada aislado (5 muestras en glicerol y 5 muestras en agua estéril) en el ultra congelador a una temperatura de -80°C. Además, se conservaron dos cajas petri de cada aislado a una temperatura de -4°C en refrigerador y en la incubadora a una temperatura de 27°C.

Prueba de viabilidad.

Se realizó con el fin de evaluar la estabilidad morfológica, viabilidad y pureza de los aislados que fueron conservados a valores de temperaturas diferentes (-80°C, -4°C, 27°C) en dos soluciones (agua estéril y glicerol al 15%).

Se preparó medio semi sólido V8MAA, el mismo que fue colocado en cajas Petri previamente rotuladas. Transcurrido 24 horas se procedió a sembrar un disco de micelio con la ayuda de un sacabocados de 3,70 mm de diámetro, realizando 10 repeticiones de cada aislado conservado. La evaluación del crecimiento micelial de los aislados se realizó diariamente.

3.7.4 Determinación de la respuesta de genotipos de cacao frente a la inoculación artificial de *M. royeri* en un ensayo monocíclico.

Este estudio se realizó con el fin de determinar la capacidad infectiva de los aislados CC-UEA-Mr 6.10, CC-UEA-Mr 1.6, CC-UEA-Mr 7.13, CC-UEA-Mr 2.7 de *M. royeri* (siendo los que mejor respuesta presentaron en las pruebas de patogenicidad y conservación) sobre mazorcas sanas de cultivar Nacional, clones: CCN-51, EET-95, EET-96, EET-103 de cacao así como para comprobar los síntomas y su correspondencia con lo observado en condiciones naturales.

La metodología empleada, es la utilizada en el objetivo específico uno: Evaluación de la patogenicidad y agresividad de aislados de *M. royeri* en mazorcas de cacao (*T. cacao*) precedentes de tres provincias amazónicas-Ecuador. Utilizando como material vegetal quince mazorcas por aislado, diez mazorcas inoculadas con el aislado, tres mazorcas inoculadas con agua estéril y dos mazorcas sin inocular como control, requiriéndose un total de 75 mazorcas pequeñas de aproximadamente 10 cm de largo de cacao. Para la preparación de la suspensión del micelio, se colectó los cuatro aislados (CC-UEA-Mr 6.10, CC-UEA-Mr 1.6, CC-UEA-Mr 7.13, CC-UEA-Mr 2.7) en un vaso plástico de 250 mL de capacidad y se homogenizó el contenido con la ayuda de la licuadora durante 2 min.

Capítulo IV

4. Resultados y discusión

4.1 Evaluación de la patogenicidad y agresividad de aislados de *M. royeri* en mazorcas de *T. cacao*.

Los 20 aislados de *M. royeri* fueron patogénicos, capaces de reproducir los síntomas característicos de la moniliasis, en los frutos inoculados de cacao Nacional. Estos fueron similares a los observados en condiciones naturales en campo en donde el periodo de incubación es de 3 a 8 semanas de acuerdo a la edad del fruto, mientras que a nivel del laboratorio los síntomas se desarrollan con mayor velocidad (en un periodo de 12 días). Coincidiendo con lo reportado por Ampuero, (1967); Suárez, (1971); Barros, (1977) y Villavicencio, (2010).

Severidad externa.- Se realizó la evaluación diaria de las mazorcas inoculadas en donde se evidenció los siguientes síntomas: al día dos de la inoculación se manifiesta el grado 1 (puntos aceitosos), el día cinco presenta grado 2 (tumefacciones o clorosis). En el día siete se observó grado 3 (mancha necrótica). En la evaluación realizada al día 11 se observó grado 4 (micelio hasta en un 25% de la mancha), y al día 12 grado 5 (micelio en más del 25 % de la mancha) en la mayoría de los aislados, excepto para CC-UEA-Mr1.6, (Napo-Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr2.7 (Napo – Ahuano), CC-UEA-Mr6.10 (Napo- Puerto Misahualli), CC-UEA-Mr7.13 (Pastaza- Hushiño), aislados que manifestaron los síntomas de grado cinco a los 8 días, esto coincide con lo reportado por Villavicencio (2010), quién observa el primer período de evaluación a los ocho días después de la inoculación, de diez aislados procedentes de la costa ecuatoriana, 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).

A los 15 días los síntomas expresados en las mazorcas por los aislamientos inoculados, se comportaron uniformemente en el transcurso de los días y no se observó diferencia entre ellos (Figura 18).

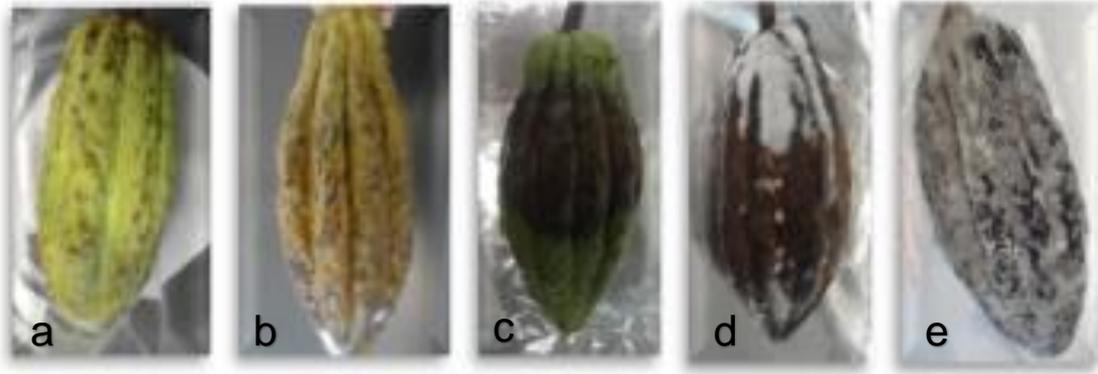


Figura 18. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico. **a)** puntos aceitosos (dos días) **b)** tumefacción o clorosis (cinco días) **c)** mancha necrótica (siete días) **d)** micelio en un 25% de la mancha (once días) **e)** micelio en más del 25% de la mancha (doce días).

Severidad interna.- Los primeros síntomas internos se manifestaron a los cinco días de la inoculación se observó grado 1 (1-20% área necrosada), a los siete días se manifestó grado 2 (21-40% área necrosada), a los nueve días presentó grado 3 (41-60% área necrosada), a los 11 días se observó grado 4 (61-80% área necrosada) y a los 15 días la mazorca se encontró infectada completamente grado 5 (100% área necrosada). En relación a esta variable en la literatura científica no se ha encontrado referencias previas al uso de la misma para determinar la severidad interna de aislados de *M. royeri*, lo cual implica un aporte del presente trabajo para enriquecer la caracterización patogénica de este hongo (Figura 19).

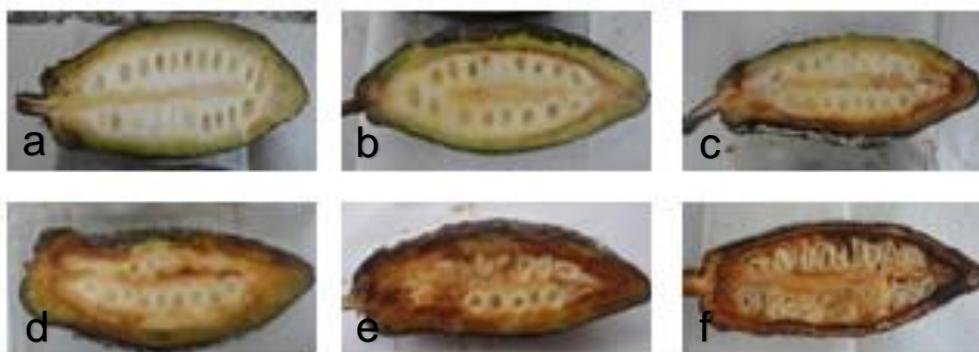


Figura 19. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico **a)** grado 0 **b)** grado 1 **c)** grado 2 **d)** grado 3 **e)** grado 4 **f)** grado 5.

Agresividad.- Para determinar la agresividad se realizó la evaluación diaria de las mazorcas inoculadas observándose que los aislados CC-UEA-Mr6.10 (Napo- Puerto Misahualli), CC-UEA-Mr1.6 (Napo-Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr7.13 (Pastaza- Hushiño), CC-UEA-Mr1.16 (Napo-Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr8.11 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr7.17 (Pastaza-Hushiño), CC-UEA-Mr2.7 (Napo – Ahuano), fueron los que mostraron los mayores valores de ABCPE, siendo los más agresivos. Donde el aislado CC-UEA-Mr6.10 (Napo – Puerto Misahualli) fue el que mayor valor mostró mientras que el aislado CC-UEA-Mr7.20 (Pastaza – Arajuno) reflejó los menores valores del ABCPE (Tabla 5).

Tabla 5. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 10 días con intervalo continuo.

Aislados	Medias	Rangos promedios	
CC-UEA-Mr6.10	550	181,5	a
CC-UEA-Mr1.6	474	173,9	ab
CC-UEA-Mr7.13	520	163,5	ab
CC-UEA-Mr1.16	426	157,1	abc
CC-UEA-Mr8.11	412	144,3	abcd
CC-UEA-Mr7.17	412	139,3	abcd
CC-UEA-Mr2.7	382	127,5	abcdef
CC-UEA-Mr2.12	340	124,5	bcdef
CC-UEA-Mr8.20	320	110,8	bcdef
CC-UEA-Mr8.10	320	110,3	bcdef
CC-UEA-Mr8.19	324	107,1	bcdef
CC-UEA-Mr5.3	328	100,5	bcdef
CC-UEA-Mr5.17	278	92,1	cdef
CC-UEA-Mr8.9	250	81,6	cdef
CC-UEA-Mr7.28	256	79,1	cdef
CC-UEA-Mr2.15	232	68,1	def
CC-UEA-Mr1.29	232	67,3	def
CC-UEA-Mr7.16	226	67,3	ef
CC-UEA-Mr5.16	210	58,5	f
CC-UEA-Mr7.20	188	55,7	f

Medias con letras diferentes, en una mismas columna difieren según la prueba de Dunnet $p \leq 0,05$ ($n=10$)

En el caso de los aislados CC-UEA-Mr6-10 (Napo - Puerto Misahualli), CC-UEA-Mr1.16 (Napo-Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr1.6 (Napo-Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr7.13 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr7.17 (Pastaza - Hushiño) y CC-UEA-Mr2.7 (Napo - Ahuano) no difieren estadísticamente en agresividad a los 6 días, siendo el aislado CC-UEA-Mr6-10 (Napo - Puerto Misahualli) el que mayor valor de ABCPE obtuvo, y el aislado CC-UEA-Mr7.20 (Pastaza - Hushiño) presentó el menor valor (Tabla 6).

Tabla 6. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 6 días con intervalo continuo.

Aislados	Medias	Rangos promedios	
CC-UEA-Mr6.10	202	174,7	a
CC-UEA-Mr1.16	132	166,7	ab
CC-UEA-Mr1.6	134	163,5	ab
CC-UEA-Mr7.13	196	161,1	ab
CC-UEA-Mr7.17	128	130,5	ab
CC-UEA-Mr2.7	132	125,7	ab
CC-UEA-Mr8.11	114	115,1	b
CC-UEA-Mr5.17	94	112,5	b
CC-UEA-Mr8.19	98	112,3	b
CC-UEA-Mr2.12	90	102,5	b
CC-UEA-Mr8.10	96	102,5	b
CC-UEA-Mr8.20	78	99,7	b
CC-UEA-Mr8.9	76	95,1	b
CC-UEA-Mr5.3	96	93,7	b
CC-UEA-Mr7.16	128	87,9	b
CC-UEA-Mr1.29	78	83,1	b
CC-UEA-Mr7.28	64	82,7	bc
CC-UEA-Mr5.16	62	75,5	bc
CC-UEA-Mr215	58	70,9	bc
CC-UEA-Mr7.20	36	47,3	c

Medias con letras diferentes, en una mismas columna difieren según la prueba de Dunnet $p \leq 0,05$ ($n=10$)

En la evaluación realizada a los aislados CC-UEA-Mr6-10 (Napo - Puerto Misahualli), CC-UEA-Mr1.6 (Napo-Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr7.13 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr7.17 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr5.3 (Napo – Arosemena Tola), CC-UEA-Mr1.16 (Napo - Colonia Bolívar) y CC-UEA-Mr2.7 (Napo - Ahuano) se demostró que no difieren estadísticamente en agresividad a los 8 días, manifestando el mayor valor del ABCPE el aislado CC-UEA-Mr6-10 (Napo - Puerto Misahualli), y el CC-UEA-Mr7.20 (Pastaza - Hushiño) fue el que menor valor mostró (Tabla 7).

Tabla 7. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 8 días con intervalo continuo.

Aislados	Medias	Rangos promedios	
CC-UEA-Mr6.10	368	127	a
CC-UEA-Mr1.6	284	123	a
CC-UEA-Mr7.13	350	115	a
CC-UEA-Mr7.17	248	105	ab
CC-UEA-Mr5.3	190	95	ab
CC-UEA-Mr1.16	270	87	ab
CC-UEA-Mr2.7	246	75	ab
CC-UEA-Mr8.11	244	75	b
CC-UEA-Mr8.19	182	75	bc
CC-UEA-Mr8.10	190	73	bc
CC-UEA-Mr8.20	176	71	bc
CC-UEA-Mr2.15	128	67	dc
CC-UEA-Mr2.12	190	55	dc
CC-UEA-Mr5.17	176	55	dc
CC-UEA-Mr1.29	138	55	dc
CC-UEA-Mr8.9	138	55	dc
CC-UEA-Mr7.28	132	55	dc
CC-UEA-Mr7.16	126	55	dc
CC-UEA-Mr5.16	118	55	dc
CC-UEA-Mr7.20	88	55	dc

Medias con letras diferentes, en una mismas columna difieren según la prueba de Dunnet $p \leq 0,05$ ($n=10$)

Se observó que los aislados CC-UEA-Mr6-10 (Napó - Puerto Misahualli), CC-UEA-Mr1.6 (Napó - Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr7.13 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr1.16 (Napó - Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr8.11 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr7.17 (Pastaza – Hushiño), CC-UEA-Mr2.7 (Napó - Ahuano) y CC-UEA-Mr2.12 (Napó - Ahuano) no difirieron estadísticamente en agresividad a los 12 días, siendo el aislado CC-UEA-Mr6-10 (Napó - Puerto Misahualli) el que mayor valor del ABCPE presentó, y el aislado CC-UEA-Mr7.20 (Pastaza - Hushiño) mostró el menor valor (Tabla 8).

Tabla 8. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 12 días con intervalo continuo.

Aislado	Medias	Rangos promedios	
CC-UEA-Mr6.10	746	171,5	a
CC-UEA-Mr1.6	674	163,9	ab
CC-UEA-Mr7.13	710	153,5	ab
CC-UEA-Mr1.16	610	147,1	abc
CC-UEA-Mr8.11	606	134,3	abc
CC-UEA-Mr7.17	598	129,3	abcd
CC-UEA-Mr2.7	550	117,5	abcde
CC-UEA-Mr2.12	530	114,5	abcde
CC-UEA-Mr8.20	498	100,8	bcde
CC-UEA-Mr8.10	484	100,3	bcde
CC-UEA-Mr8.19	502	97,1	bcde
CC-UEA-Mr5.3	506	90,5	bcde
CC-UEA-Mr5.17	413	82,1	cde
CC-UEA-Mr8.9	404	71,6	cde
CC-UEA-Mr7.28	412	69,1	cde
CC-UEA-Mr2.15	360	58,1	e
CC-UEA-Mr1.29	370	57,3	de
CC-UEA-Mr7.16	366	57,3	e
CC-UEA-Mr5.16	344	48,5	e
CC-UEA-Mr7.20	338	45,7	e

Medias con letras diferentes, en una mismas columna difieren según la prueba de Dunnet $p \leq 0,05$ ($n=10$)

Los aislados CC-UEA-Mr6-10 (Napo - Puerto Misahualli), CC-UEA-Mr7.13 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr1.6 (Napo - Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr1.16 (Napo - Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr8.11 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr7.17 (Pastaza – Hushiño), CC-UEA-Mr2.7 (Napo - Ahuano) y CC-UEA-Mr2.12 (Napo - Ahuano) y CC-UEA-Mr5.3 (Napo – Arosemena Tola) no difieren estadísticamente en agresividad a los 14 días, alcanzando el mayor valor del ABCPE el aislado CC-UEA-Mr6-10 (Napo - Puerto Misahualli), y el CC-UEA-Mr5.16 (Napo – Arosemena Tola) el que menor valor mostró (Tabla 9).

Tabla 9. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad 1 – 14 días con intervalo continuo.

Aislados	Medias	Rangos promedios	
CC-UEA-Mr6.10	946	181,1	a
CC-UEA-Mr7.13	910	164,3	ab
CC-UEA-Mr1.6	874	173,9	ab
CC-UEA-Mr1.16	810	149,7	abc
CC-UEA-Mr8.11	806	147,7	abc
CC-UEA-Mr7.17	798	141,7	abc
CC-UEA-Mr2.7	750	126,9	abcd
CC-UEA-Mr2.12	730	129,5	abcd
CC-UEA-Mr5.3	706	111,7	abcd
CC-UEA-Mr8.19	702	110,9	bcd
CC-UEA-Mr8.20	698	114,9	abcd
CC-UEA-Mr8.10	670	106,3	bcd
CC-UEA-Mr7.28	602	80,1	cd
CC-UEA-Mr8.9	582	77	cd
CC-UEA-Mr5.17	570	81,4	cd
CC-UEA-Mr1.29	547	67,1	d
CC-UEA-Mr2.15	520	62,8	d
CC-UEA-Mr7.16	520	65,3	d
CC-UEA-Mr7.20	512	63,6	d
CC-UEA-Mr5.16	510	54,1	d

Medias con letras diferentes, en una mismas columna difieren según la prueba de Dunnet $p \leq 0,05$ ($n=10$)

Se observó que los aislados CC-UEA-Mr1.6 (Napo – Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr6.10 (Napo – Puerto Misahualli), CC-UEA-Mr8.11 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr7.13 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr7.17 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr2.12 (Napo - Ahuano), CC-UEA-Mr1.16 (Napo – Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr8.19 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr2.7 (Napo - Ahuano), CC-UEA-Mr8.20 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr5.3 (Napo – Arosemena Tola) no difirieron estadísticamente en su agresividad del día 8 al 9, siendo estos los más agresivos.

El aislado CC-UEA-Mr1.6 (Napo – Colonia Bolívar) es el que mostró el mayor valor del ABCPE. El aislado que menor ABCPE obtuvo fue CC-UEA-Mr1.29 (Napo – Colonia Bolívar) (Tabla 10).

Intervalo discontinuo.- En base a este resultado se requirió realizar un análisis con intervalo discontinuo en entorno de 8-9, 9-10, 10-11 días.

Tabla 10. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad con intervalo discontinuo 8 – 9 días.

Aislados	Medias	Rangos promedios	
CC-UEA-Mr1.6	100	178,5	a
CC-UEA-Mr6-10	92	155,7	ab
CC-UEA-Mr8.11	88	144,3	ab
CC-UEA-Mr7.13	86	134,9	abc
CC-UEA-Mr7.17	84	129,1	abcd
CC-UEA-Mr2.12	80	121,5	abcde
CC-UEA-Mr1.16	80	116,5	abcde
CC-UEA-Mr8.19	78	109,7	abcdef
CC-UEA-Mr2.7	72	109,1	abcdef
CC-UEA-Mr8.20	76	106,7	abcdef
CC-UEA-Mr5.3	74	104,3	abcdef
CC-UEA-Mr8.10	68	87,1	bcdef
CC-UEA-Mr7.28	68	79,9	bcdef
CC-UEA-Mr8.9	62	67,7	bcdef
CC-UEA-Mr5.17	56	65,9	cdef
CC-UEA-Mr7.20	56	64,7	cdef
CC-UEA-Mr7.16	54	64,7	def
CC-UEA-Mr5.16	52	62,9	ef
CC-UEA-Mr2.15	56	57,7	cdef
CC-UEA-Mr1.29	48	49,1	f

Medias con letras diferentes, en una mismas columna difieren según la prueba de Dunnet $p \leq 0,05$ ($n=10$)

Los aislados más agresivos fueron CC-UEA-Mr1.6 (Napo – Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr6.10 (Napo – Puerto Misahualli), CC-UEA-Mr8.11 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr7.13 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr7.17 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr1.16 (Napo – Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr2.12 (Napo - Ahuano), CC-UEA-Mr2.7 (Napo - Ahuano), CC-UEA-Mr5.3 (Napo – Arosemena Tola), CC-UEA-Mr8.19 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr8.20 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr8.10 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr7.16 (Pastaza – Hushiño), los mismos que no difirieron estadísticamente en su agresividad del día 9 al 10.

En el caso del aislado CC-UEA-Mr1.6 (Napo – Colonia Bolívar) fue el que registró el mayor valor del ABCPE y el aislado que menor ABCPE reportó fue CC-UEA-Mr2.15 (Napo - Ahuano) (Tabla 11).

Tabla 11. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad con intervalo discontinuo 9 – 10 días.

Aislados	Medias	Rangos promedios	
CC-UEA-Mr1.6	100	181,50	a
CC-UEA-Mr6.10	96	162,70	ab
CC-UEA-Mr8.11	94	153,30	ab
CC-UEA-Mr7.13	92	149,00	abc
CC-UEA-Mr7.17	90	142,00	abc
CC-UEA-Mr1.16	88	135,30	abc
CC-UEA-Mr2.12	90	134,50	abc
CC-UEA-Mr2.7	78	122,10	abcd
CC-UEA-Mr5.3	84	118,90	abcd
CC-UEA-Mr8.19	84	118,90	abcd
CC-UEA-Mr8.20	84	118,90	abcd
CC-UEA-Mr8.10	78	102,70	abcd
CC-UEA-Mr7.16	66	88,30	abcd
CC-UEA-Mr7.20	70	82,60	bcd
CC-UEA-Mr7.28	74	81,20	bcd
CC-UEA-Mr8.9	72	76,60	cd
CC-UEA-Mr5.17	66	71,50	cd
CC-UEA-Mr5.16	60	57,90	d
CC-UEA-Mr1.29	60	56,10	d
CC-UEA-Mr2.15	58	56,00	d

Medias con letras diferentes, en una mismas columna difieren según la prueba de Dunnet $p \leq 0,05$ ($n=10$)

Los aislados CC-UEA-Mr1.6 (Napo – Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr2.12 (Napo – Ahuano), CC-UEA-Mr6.10 (Napo – Puerto Misahualli), UEA-Mr8.11 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr7.13 (Pastaza - Hushiño), CC-UEA-Mr1.16 (Napo – Colonia Bolívar), CC-UEA-Mr7.17 (Pastaza – Hushiño), CC-UEA-Mr2.7 (Napo - Ahuano), CC-UEA-Mr5.3 (Napo – Arosemena Tola), CC-UEA-Mr8.19 (Morona Santiago – La Comanche), UEA-Mr8.20 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr7.16 (Pastaza – Hushiño), CC-UEA-Mr8.10 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr8.9 (Morona Santiago – La Comanche), CC-UEA-Mr7.20 (Pastaza - Hushiño), no difirieron estadísticamente en su agresividad del día 10 al 11, siendo los más agresivos.

Donde el aislado CC-UEA-Mr1.6 (Napo – Colonia Bolívar) fue el que mostró el mayor valor del ABCPE. El aislado que menor ABCPE obtuvo fue CC-UEA-Mr5.17 (Napo – Arosemena Tola) (Tabla 12).

Tabla 12. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad con intervalo discontinuo 10 – 11 días.

Aislados	Medias	Rangos promedios	
CC-UEA-Mr1.6	100	163,50	a
CC-UEA-Mr2.12	100	163,50	a
CC-UEA-Mr6.10	100	163,50	a
CC-UEA-Mr8.11	100	163,50	a
CC-UEA-Mr7.13	98	148,70	ab
CC-UEA-Mr1.16	96	133,90	ab
CC-UEA-Mr7.17	96	133,90	ab
CC-UEA-Mr2.7	90	121,60	abc
CC-UEA-Mr5.3	94	119,10	abc
CC-UEA-Mr8.19	94	119,10	abc
CC-UEA-Mr8.20	94	119,10	abcd
CC-UEA-Mr7.16	74	103,90	abcd
CC-UEA-Mr8.10	86	100,10	abcd
CC-UEA-Mr8.9	82	82,80	abcd
CC-UEA-Mr7.20	80	76,10	abcd
CC-UEA-Mr7.28	82	66,90	bcd
CC-UEA-Mr1.29	78	64,90	cd
CC-UEA-Mr2.15	70	61,50	cd
CC-UEA-Mr5.16	74	55,70	d
CC-UEA-Mr5.17	69	48,70	d

Medias con letras diferentes, en una mismas columna difieren según la prueba de Dunnet $p \leq 0,05$ ($n=10$)

Para construir el gráfico de progresión del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad de aislados de *M.roreri*, con agresividad diferencial, se tomaron los valores de intervalo continuo de 1 a 17 días, de los aislados CC-UEA-Mr6.10, CC-UEA-Mr1.6, CC-UEA-Mr7.13 que fueron los de mejor respuesta; CC-UEA-Mr2.7 de respuesta intermedia; y CC-UEA-Mr7.20 de menor respuesta (Figura 20).

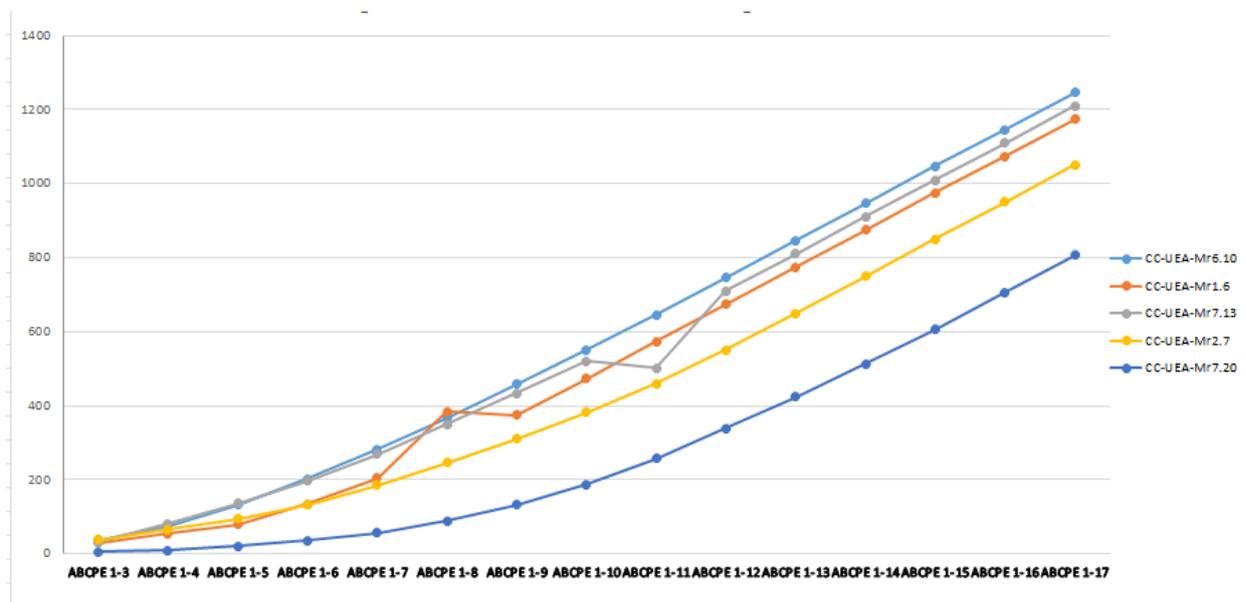


Figura 20. Progresión ABCPE de aislados de *M. roreri* con agresividad diferencial.

Por vez primera se logra a través de un ensayo monocíclico construir el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) vinculado con la respuesta diferencial de aislados de *M. roreri*, tomando como unidad experimental mazorcas de cacao Nacional. Igualmente en cacao, Torres *et al.*, (2011) utilizaron esta variable para determinar el progreso temporal de *M. roreri* en plantaciones de cacao de la provincia mexicana de Tabasco, sin determinar la carga de inóculo y bajo condiciones de inóculo natural. A diferencia del presente trabajo, estos autores determinaron la incidencia final acumulada y la tasa aparente de infección con el objetivo de lograr un manejo integrado de la enfermedad en condiciones de campo, pero no determinaron la agresividad de los aislados.

Para determinar la efectividad de alternativas de control de la escoba de bruja en cacao se utilizó el ABCPE en el contexto del manejo integrado de *M. perniciososa*, un agente muy similar a *M. roreri*. Los resultados de estos autores

permitieron, demostrar mediante los valores del ABCPE que *Trichoderma stromaticum* junto a fungicidas cúpricos, permitieron lograr un manejo integrado eficiente de la escoba de bruja, así como incrementar los rendimientos agrícolas y el retorno económico del cultivo (Medeiro *et al.*, 2010).

Empleándose también el ABCPE en un estudio realizado en Santo Domingo–Ecuador con el fin de mitigar la moniliasis en cacao híbrido nacional x trinitario utilizando biopreparados. Resultados que fueron evaluados mediante la escala propuesta por Sánchez y Gonzáles (1989), siendo estos valores la base para calcular el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad, demostrando que el tratamiento Cepacide (*P. cepacia*) presenta un área menor con relación a la incidencia de la monilia, lo que denota que este tratamiento es el que mejor controló el patógeno en el tiempo con 1211,0 unidades (Estrella & Cedeño, 2012).

Con el objetivo de evaluar la respuesta de 18 líneas experimentales y dos genotipos comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ante la infección natural de patógenos (*Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*, *Nacobbus* spp. y *Meloidogyne* spp.), se realizó un ensayo en la Universidad Autónoma Chapingo-México, donde se evaluó el grado de severidad de cinco patógenos sobre las plantas de los genotipos considerados. En cuanto a tolerancia al tizón temprano (*A. solani*) mediante el ABCPE las mejores líneas fueron la 60 y 10 (1215 y 1147, respectivamente), y con porcentajes de severidad de 33 y 35, respectivamente, mientras que las líneas 14 y 28 se comportaron como las susceptibles, con mayor ABCPE (1935 y 2169, respectivamente) y porcentajes de severidad de 56 y 76, respectivamente (Santos *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta los resultados del presente trabajo, se señala que el ABCPE puede ser un excelente descriptor de la agresividad de aislados de *M. roleri*, si tomamos en cuenta que permitió determinar el efecto cuantitativo negativo de los aislados del hongo fitopatógeno sobre frutos de cacao, reflejando la cantidad relativa del daño causada sobre las mazorcas inoculadas. A pesar de que en esta investigación, solo se caracterizaron 7

aislados, se pudo apreciar que existieron diferencias respecto a la agresividad de los mismos, lo cual es un aspecto de vital importancia para la investigación aplicada al mejoramiento genético del cacao en la amazonía ecuatoriana, una vez que desee seleccionar aislados de *M. rozeri* para realizar evaluaciones del germoplasma de cacao en condiciones controladas y semi controladas.

4.2 Conformación de una colección de aislados de *M. rozeri*.

En el seguimiento diario de los 20 aislados conservados, tres meses antes en agua estéril y glicerol al 15% y tres diferentes valores de temperatura (-80°C, -4°C, 27°C) permitió observar que todos los aislados fueron viables (Tabla 13). De los tres métodos de conservación se evidenció que los aislados conservados a -80°C en glicerol presentaron un 94.8% de viabilidad, en agua 79.5% de viabilidad. En un 93.8% los aislados conservados a -4°C en glicerol, y en agua un 76.5%. Los aislados conservados a 27°C presentaron un 100% de viabilidad.

La menor viabilidad (40%) se presentó en agua a -4°C (aislado CC-UEA-Mr7.17). Según el estudio de evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes realizado en Bogotá-Colombia por Ángel (2006), determinó que el método de conservación en agua destilada presentó características de viabilidad y pureza, recuperando 16 de las 18 cepas (*Botrytis* spp. y *Scopulariopsis* spp. no se recuperaron), coincidiendo con los resultados del presente trabajo.

La pérdida de 40% del aislado CC-UEA-Mr7.17 conservados en agua a -80°C presentó un caso de contaminación, posiblemente por el número y tipo de manipulaciones coincidiendo con lo reportado por Panizo, Vera, Montes & González, (2005).

Los aislados CC-UEA-Mr5.3, CC-UEA-Mr5.16, CC-UEA-Mr5.17, CC-UEA-Mr7.13, CC-UEA-Mr7.28, CC-UEA-Mr8.10, fueron los que obtuvieron mayor viabilidad en las tres pruebas realizadas, siendo los de mejor respuesta para futuros ensayos con *M. rozeri*.

Tabla 13. Viabilidad evaluada de los aislados a diferentes métodos de conservación.

VIABILIDAD (% DE AISLADOS RECUPERADOS)					
AISLADO	VALORES DE TEMPERATURA				
	-80°C		-4°C		27°C
	Agua	Glicerol	Agua	Glicerol	
CC-UEA-Mr1.6	80	100	80	100	100
CC-UEA-Mr1.16	80	90	80	95	100
CC-UEA-Mr1.29	85	95	75	100	100
CC-UEA-Mr2.7	65	95	65	80	100
CC-UEA-Mr2.12	80	100	60	95	100
CC-UEA-Mr2.15	60	90	60	85	100
CC-UEA-Mr5.3	95	90	95	100	100
CC-UEA-Mr5.16	95	90	95	100	100
CC-UEA-Mr5.17	90	90	90	95	100
CC-UEA-Mr6.10	85	90	85	90	100
CC-UEA-Mr7.13	95	100	95	100	100
CC-UEA-Mr7.16	70	90	70	80	100
CC-UEA-Mr7.17	60	100	40	100	100
CC-UEA-Mr7.20	90	100	85	100	100
CC-UEA-Mr7.28	95	90	95	100	100
CC-UEA-Mr8.9	65	100	65	100	100
CC-UEA-Mr8.10	90	90	90	100	100
CC-UEA-Mr8.11	65	95	60	90	100
CC-UEA-Mr8.19	75	100	75	85	100
CC-UEA-Mr8.20	70	100	70	80	100

Como se observa en la figura 21, los 20 aislados recuperados a -80°C, tanto en glicerol como en agua presentaron viabilidad. Se observó que el aislado con menos porcentaje viable fue CC-UEA-Mr7.17 en agua. La mayor efectividad se evidenció con los aislados conservados en glicerol al 15 %, tal es el caso de CC-UEA-Mr1.6, CC-UEA-Mr2.12, CC-UEA-Mr7.13, CC-UEA-Mr7.17, CC-UEA-Mr7.20, CC-UEA-Mr8.9, CC-UEA-Mr8.19, CC-UEA-Mr8.20 obteniéndose viabilidad del 100%, coincidiendo con lo reportado por Pinzón, Bustamante & Buitrago, (2009) donde manifiestan que la estabilidad evidenciada en los métodos de conservación a largo plazo supone una actividad eficiente de los criopreservantes tal es el caso del glicerol.

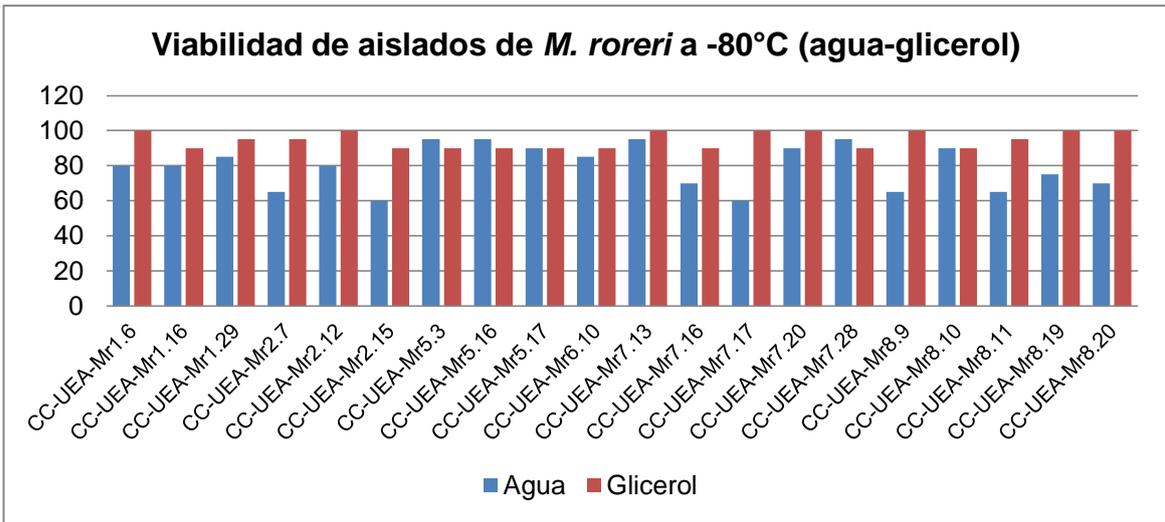


Figura 21. Porcentaje de viabilidad de Aislados de *M. royeri* a -80°C.

En la figura 22 se observa los 20 aislados recuperados a una temperatura de -4°C, tanto en glicerol como en agua presentaron viabilidad, aunque con mayor efectividad se evidenció con los aislados conservados en glicerol al 15 %, tal es el caso de CC-UEA-Mr1.6, CC-UEA-Mr1.29, CC-UEA-Mr5.3, CC-UEA-Mr5.16, CC-UEA-Mr7.13, CC-UEA-Mr7.17, CC-UEA-Mr7.20, CC-UEA-Mr7.28, CC-UEA-Mr8.9, CC-UEA-Mr8.10, obteniéndose viabilidad del 100%, mientras que el aislado con menor porcentaje de viabilidad fue CC-UEA-Mr7.17 en agua. El mejor resultado se obtuvo con los aislados que estuvieron conservados en incubadora a una temperatura de 27°C, obteniéndose 100% de viabilidad.

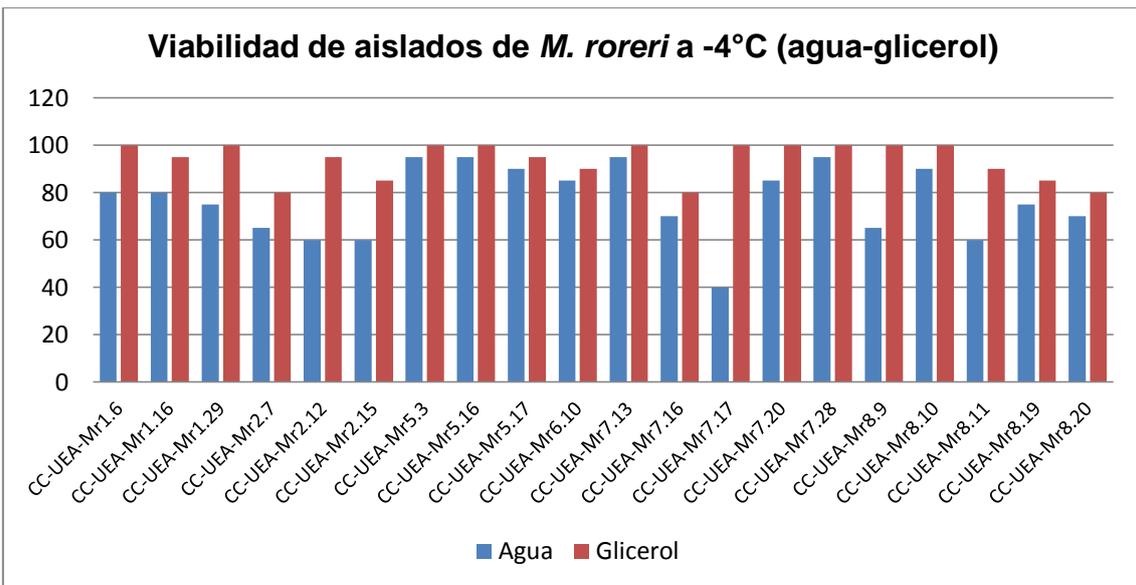


Figura 22. Porcentaje de viabilidad de los aislados de *M. royeri* a -4°C.

4.3 Determinación de la respuesta de genotipos de cacao frente a la inoculación artificial de *M. royeri* en un ensayo monocíclico.

Las cincuenta mazorcas de los genotipos de cacao inoculados artificialmente con una suspensión de micelio de *M. royeri* (aislados: CC-UEA-Mr 6.10, CC-UEA-Mr 1.6, CC-UEA-Mr 7.13, CC-UEA-Mr 2.7) a una concentración aproximada de 10^5 ufc.mL⁻¹ a 25°C y en oscuridad fueron capaces de reproducir los síntomas característicos de la moniliasis. Estos fueron similares a los observados en condiciones naturales en campo en donde el periodo de incubación es de 3 a 8 semanas de acuerdo a la edad del fruto, mientras que a nivel del laboratorio los síntomas se desarrollan con mayor velocidad (en un periodo de hasta 19 días). Coincidiendo con lo reportado por Ampuero, (1967); Suárez, (1971); Barros, (1977) y Villavicencio, (2010), quienes realizan ensayos en campo.

Severidad externa.- Se realizó la evaluación diaria de las mazorcas inoculadas en donde se evidenció los siguientes síntomas:

Mazorcas de cacao Nacional, al día tres de la inoculación manifestaron grado 1 (puntos aceitosos) y grado 2 (tumefacción o clorosis). A partir del día cuatro se observó grado 3 (mancha necrótica). En la evaluación realizada del día nueve al día 11 se observó grado 4 (micelio hasta en un 25% de la mancha), y al día 13 grado 5 (micelio en más del 25 % de la mancha) en la mayoría de las repeticiones. Concordando con lo reportado por Saquicela, (2010), donde manifiesta que el cacao fino de aroma (tipo Nacional) de Ecuador es altamente susceptible a moniliasis (Figura 23).



Figura 23. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el cultivar Nacional **a)** fruto sano **b)** puntos aceitosos **c)** tumefacción o clorosis **d)** mancha necrótica **e)** micelio en un 25% de la mancha **f)** micelio en más del 25% de la mancha.

Mazorcas de clon CCN-51 al día seis de la inoculación manifestaron grado 1 (puntos aceitosos), a partir del día nueve se observó grado 3 (mancha necrótica), el grado 4 (micelio hasta en un 25% de la mancha) se manifestó al día 18, y el grado 5 (micelio en más del 25 % de la mancha) se observó al día 19 en la mayoría de las repeticiones. No se pudo evidenciar la presencia de grado 2 (tumefacción o clorosis), debido al color rojo que presenta este tipo de clon. Coincidiendo con lo reportado por Rodríguez, (2005); García, (2009) y Avendaño, Mendoza, Hernández, López, Martínez, Caballero, Guillén & Espinosa, (2010) quienes manifiestan que el índice de severidad externa no permite identificar infecciones ocultas (Ampuero, 1967; Evans, 1981), y es muy difícil identificar síntomas anteriores a la formación de la mancha sobre todo en genotipos de color rojo, siendo este clon moderadamente susceptible a *M. royeri* (Figura 24).



Figura 24. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon CCN-51 **a)** fruto sano **b)** puntos aceitosos **c)** mancha necrótica **d)** micelio en un 25% de la mancha **e)** micelio en más del 25% de la mancha.

García, (2009) en el catálogo de cultivares de cacao del Perú manifiesta que los clones EET-95, EET-96, EET-103, etc. son moderadamente susceptibles frente al ataque de *M. royeri*, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde se observó que los tres clones antes mencionados presentaron moderada susceptibilidad a los síntomas característicos de *M. royeri* valorados según la escala sintomatológica de Brenes (1983).

Mazorcas de clon EET-95, se observó grado 1 (puntos aceitosos) a los tres días después de la inoculación, grado 2 (tumefacción o clorosis) se manifestó al día siete. A partir del día ocho presentó grado 3 (mancha necrótica), grado 4 (micelio hasta en un 25% de la mancha) se evidenció al día 13 y al día 16 se observó grado 5 (micelio en más del 25 % de la mancha) (Figura 25). A los 19 días los síntomas expresados en las mazorcas por la mezcla de los aislados inoculados, se comportaron uniformemente en el transcurso de los días y no se observó diferencia entre ellos.

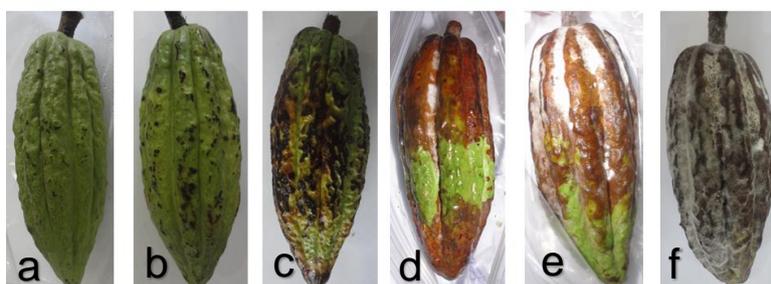


Figura 25. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon EET-95 **a)** fruto sano **b)** puntos aceitosos **c)** tumefacción o clorosis **d)** mancha necrótica **e)** micelio en un 25% de la mancha **f)** micelio en más del 25% de la mancha.

Mazorcas de clon EET-96, manifestó grado 1 (puntos aceitosos) al día tres después de la inoculación artificial, al día ocho se observó grado 2 (tumefacción o clorosis). A partir del día nueve las mazorcas manifestaron grado 3 (mancha necrótica), al día 13 presentó grado 4 (micelio hasta en un 25% de la mancha) y grado 5 (micelio en más del 25 % de la mancha) manifestó al día 16 (Figura 26). A los 17 días los síntomas expresados en las mazorcas por la mezcla de aislados inoculados, se comportaron uniformemente en el transcurso de los días y no se observó diferencia entre ellos.



Figura 26. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon EET-96. **a)** fruto sano **b)** puntos aceitosos **c)** tumefacción o clorosis **d)** mancha necrótica **e)** micelio en un 25% de la mancha **f)** micelio en más del 25% de la mancha.

Mazorcas de clon EET-103, al día tres de la inoculación artificial manifestó grado 1 (puntos aceitosos), al día siete presentó grado 2 (tumefacción o clorosis). A partir del día ocho se observó grado 3 (mancha necrótica), grado 4 (micelio hasta en un 25% de la mancha) manifestó al día 14, y grado 5 (micelio en más del 25 % de la mancha) se observó al día 16 en la mayoría de las repeticiones (Figura 27). A los 17 días los síntomas expresados en las mazorcas por la mezcla de los aislados inoculados, se comportaron uniformemente en el transcurso de los días y no se observó diferencia entre ellos.



Figura 27. Severidad externa acorde con la escala de Brenes (1983) del daño ocasionado por aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon EET-103 **a)** fruto sano **b)** puntos aceitosos **c)** tumefacción o clorosis **d)** mancha necrótica **e)** micelio en un 25% de la mancha **f)** micelio en más del 25% de la mancha.

Severidad interna.- En relación a esta variable en la literatura científica no se ha encontrado referencias previas al uso de la misma para determinar la severidad interna de cuatro aislados de *M. royeri* en variedad de clones, lo cual implica un aporte del presente trabajo para enriquecer la determinación de la respuesta de genotipos de cacao frente a la inoculación artificial de *M. royeri*. Obteniéndose los siguientes síntomas de los cinco genotipos de cacao:

Cultivar Nacional

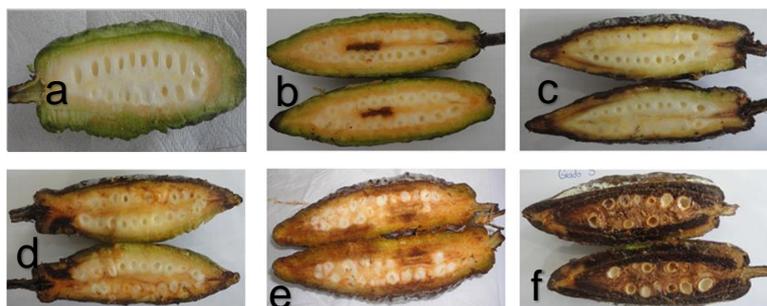


Figura 28. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de *M. roreri* en ensayo monocíclico cultivar Nacional **a)** grado 0 (cero área necrosada) **b)** grado 1 (1-20% del área necrosada) **c)** grado 2 (21-40% del área necrosada) **d)** grado 3 (41-60% del área necrosada) **e)** grado 4 (61-80% del área necrosada) **f)** grado 5 (100% del área necrosada).

Clon CCN-51

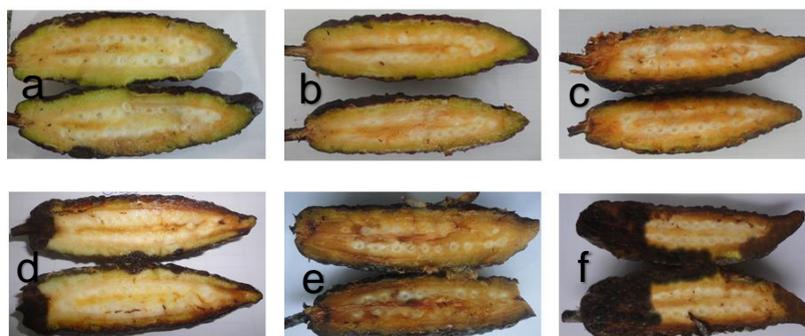


Figura 29. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de *M. roreri* en ensayo monocíclico en el clon CCN-51 **a)** grado 0 (cero área necrosada) **b)** grado 1 (1-20% del área necrosada) **c)** grado 2 (21-40% del área necrosada) **d)** grado 3 (41-60% del área necrosada) **e)** grado 4 (61-80% del área necrosada) **f)** grado 5 (100% del área necrosada).

Clon EET-95

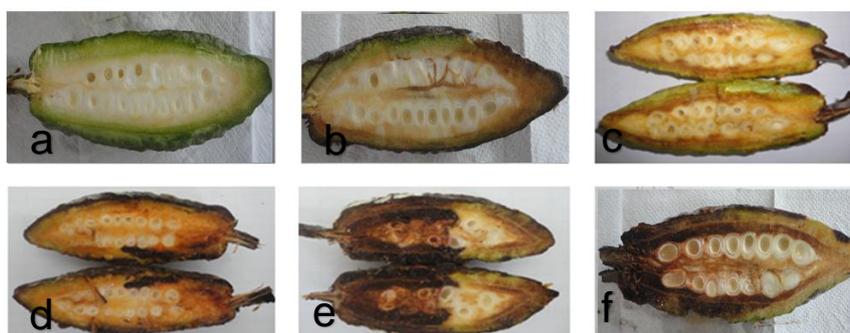


Figura 30. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de *M. roreri* en ensayo monocíclico en el clon EET-95 **a)** grado 0 (cero área necrosada) **b)** grado 1 (1-20% del área necrosada) **c)** grado 2 (21-40% del área necrosada) **d)** grado 3 (41-60% del área necrosada) **e)** grado 4 (61-80% del área necrosada) **f)** grado 5 (100% del área necrosada).

Clon EET-96

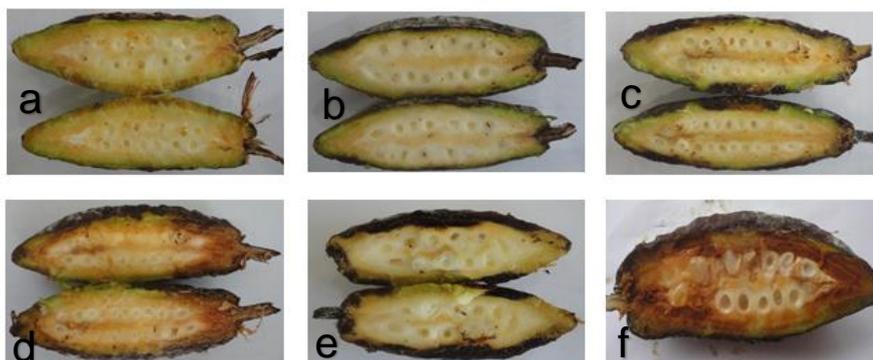


Figura 31. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon EET-96 **a)** grado 0 (cero área necrosada) **b)** grado 1 (1-20% del área necrosada) **c)** grado 2 (21-40% del área necrosada) **d)** grado 3 (41-60% del área necrosada) **e)** grado 4 (61-80% del área necrosada) **f)** grado 5 (100% del área necrosada).

Clon EET-103

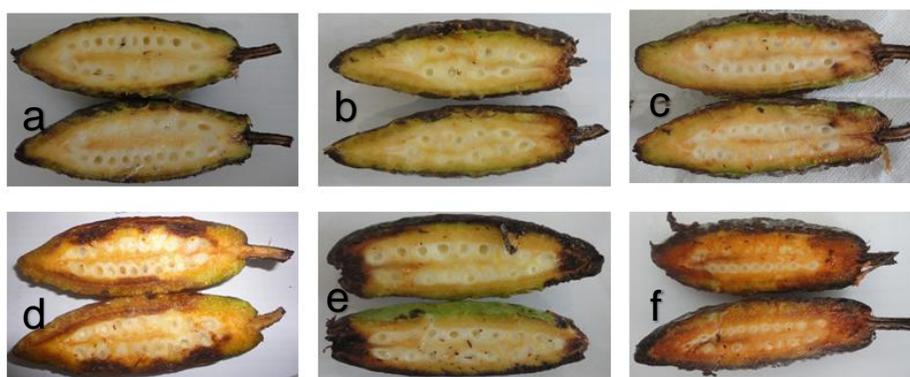


Figura 32. Severidad interna acorde a la escala de Sánchez (1987) del daño ocasionado por la mezcla de los cuatro aislados de *M. royeri* en ensayo monocíclico en el clon EET-103 **a)** grado 0 (cero área necrosada) **b)** grado 1 (1-20% del área necrosada) **c)** grado 2 (21-40% del área necrosada) **d)** grado 3 (41-60% del área necrosada) **e)** grado 4 (61-80% del área necrosada) **f)** grado 5 (100% del área necrosada).

Agresividad.- para determinar la agresividad se realizó la evaluación diaria de las mazorcas inoculadas en donde el cultivar Nacional fue el que mostró mayor valor de ABCPE, siendo el más susceptible en relación con CCN-51, EET-95, EET-96, EET-103 (Tabla 14), genotipos evaluados que son los que se recomiendan para la región de la amazonia central del Ecuador, coincidiendo con lo que ocurre en campo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Saquicela (2010), quien al evaluar los componentes de manejo integrado de cacao Nacional en campo, determina la alta susceptibilidad que presenta este cultivar ante la moniliasis. Por vez primera se logra determinar la agresividad

de genotipos en ensayo monocíclico de cacao. Demostrando que con ensayos de inoculación artificial de *M. royeri* se pueden diferenciar genotipos de cacao, sin tener que realizar inoculaciones en condiciones de campo.

Tabla 14. Respuesta de cinco genotipos de cacao en base al valor del ABCPE hasta los 10 días posteriores a la inoculación artificial de sus mazorcas con una suspensión de micelio de *M. royeri* (aislados: CC-UEA-Mr 6.10, CC-UEA-Mr 1.6, CC-UEA-Mr 7.13, CC-UEA-Mr 2.7) con una concentración aproximada de 10^5 ufc.mL⁻¹ a 27°C y oscuridad.

Genotipos de cacao	ABCPE ₁₋₁₀	Rango promedio
Medias reales		
Nacional	350	41.60 a
CCN-51	279	24.10 b
EET-95	279	24.40 b
EET-96	252	18.70 b
EET-103	252	18.70 b

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según la Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis complementada con la prueba de Mann Whitney $p \leq 0,05$ $n=10$

Capítulo V

5. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la investigación arribamos a las siguientes conclusiones:

1. Todos los aislados fueron patogénicos, siendo los más agresivos CC-UEA-Mr6.10, CC-UEA-Mr1.6, CC-UEA-Mr7.13, CC-UEA-Mr2.7, CC-UEA-Mr7.20, acorde con los valores del Área Bajo la Curva del Progreso de la enfermedad (ABCPE) obtenidos.
2. Por vez primera se logra a través de un ensayo monocíclico construir el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) vinculado con la respuesta diferencial de aislados de *M. roreri*, tomando como unidad experimental mazorcas de cacao Nacional.
3. Al evaluar los aislados de *M. roreri*, se observó que los tres métodos de conservación fueron viables, se evidenció que los aislados conservados a -80°C en glicerol presentaron un 94.8% de viabilidad, en agua 79.5% de viabilidad. En un 93.8% los aislados conservados a -4°C en glicerol, y en agua un 76.5%. Los aislados conservados a 27°C presentaron un 100% de viabilidad.
4. Los aislados CC-UEA-Mr5.3, CC-UEA-Mr5.16, CC-UEA-Mr5.17, CC-UEA-Mr7.13, CC-UEA-Mr7.28, CC-UEA-Mr8.10, fueron los que obtuvieron mayor viabilidad en las tres pruebas de conservación realizadas.
5. El cultivar Nacional fue el que mostró el mayor valor de ABCPE, siendo el más susceptible en relación con CCN-51, EET-95, EET-96, EET-103.

6. Recomendaciones

1. Para futuros ensayos de investigación con *M. royeri* se recomienda utilizar los aislados CC-UEA-Mr5.3, CC-UEA-Mr5.16, CC-UEA-Mr5.17, CC-UEA-Mr7.13, CC-UEA-Mr7.28, CC-UEA-Mr8.10, que fueron los que obtuvieron mayor viabilidad en las tres pruebas de conservación realizadas.
2. Realizar pruebas de caracterización molecular que permitan identificar si existen variaciones genéticas entre los aislados evaluados patogénicamente.
3. El método de conservación a largo plazo en agua destilada no es aconsejable por la baja respuesta que presenta en las pruebas de viabilidad.
4. Realizar varios métodos de conservación para la preservación de los aislados fúngicos de *M. royeri* para un periodo de tiempo prolongado.
5. Realizar ensayos monocíclicos sobre mazorcas con diferentes genotipos de cacao, para evitar liberar aislados que puedan impactar negativamente sobre el agro ecosistema cacaotero de producción orgánica en la amazonia ecuatoriana.

7. Resumen

El presente trabajo constituye el primer reporte sobre el estudio de caracterización patogénica y severidad en tres provincias amazónicas del Ecuador, del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans, *et al.*, agente causal de la Moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). A partir de la colección de aislados de *M. roreri* de la Universidad Estatal Amazónica procedentes de: Napo, Pastaza y Morona Santiago. Se evaluó e identificó mediante caracterización patogénica (presencia o ausencia de síntomas externos e internos según la escala propuesta por Brenes, 1983 y Sánchez *et al* 1987, inoculando mazorcas de cacao Nacional con el hongo de *M. roreri*) y de agresividad (Área Bajo la Curva del Progreso de la enfermedad, ABCPE). Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica. Para los ensayos se utilizaron medios de cultivo semi sólido (V8MAA) y medio de cultivo líquido PDB. Los aislados CC-UEA-Mr6.10, CC-UEA-Mr1.6, CC-UEA-Mr7.13, CC-UEA-Mr2.7 y CC-UEA-Mr7.20, fueron los más agresivos. Los aislados fueron conservados en agua estéril y glicerol al 15%, en tres diferentes valores de temperatura (-80°C, -4°C, 27°C), con el fin de determinar su viabilidad. Se utilizó medio semisólido V8MAA para su crecimiento. Los tres métodos de conservación fueron viables, los aislados conservados a -80°C en glicerol presentaron un 94.8% de viabilidad, en agua 79.5% de viabilidad. En un 93.8% los aislados conservados a -4°C en glicerol, y en agua un 76.5%. Los aislados conservados a 27°C presentaron un 100% de viabilidad. En la evaluación de genotipos de cacao frente a la inoculación artificial de *M. roreri* el cultivar Nacional fue el que mostró el mayor valor de ABCPE, siendo el más susceptible en relación con CCN-51, EET-95, EET-96, EET-103.

Palabras clave: aislado, Amazonía, fitopatógeno, monilia, *Theobroma cacao*, genotipo.

8. Summary

This work constitutes the first report on the study of pathogenic fungus *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans characterization and aggressiveness in three Amazonian provinces of Ecuador, causal agent of Moniliasis cacao (*Theobroma cacao* L.). From culture collection of *M. roreri* at Amazon State University (Napó, Pastaza and Morona Santiago). It was evaluated and identified by pathogenic characterization (presence or absence of internal and external symptoms as the scale proposed by Brenes, 1983 and Sanchez et al 1987, inoculating National cocoa pods fungus *M. roreri*) and aggressiveness (Area Under the Progress Curve disease, AUDPC). The experiments were performed in the laboratory of Microbiology of the Amazon State University. For assays semisolid culture media (V8MAA) and PDB liquid medium were used. Isolated DC-UEA-Mr6.10, CC-UEA-Mr1.6, CC-UEA-Mr7.13, CC-UEA-Mr2.7 and CC-UEA-Mr7.20 were the most aggressive. Isolates were kept in sterile water and 15% glycerol, at three different temperatures (-80 ° C, -4 ° C, 27 ° C), in order to determine their viability. V8MAA semisolid medium used for growth. Three preservation methods were viable, the isolates held at -80 ° C in glycerol showed a 94.8% viability, water 79.5% viability. In 93.8% isolates stored at 4 ° C in glycerol, and 76.5% water. The isolates preserved at 27 °C showed 100% viability. During evaluating of cacao genotypes using artificial inoculation of *M. roreri*, the National cultivar showed the highest value of AUDPC, being the most susceptible in relation to CCN-51, EET-95, 96-EET, EET- 103.

Key words: isolated, Amazon, fitopatógeno, monilia, *Theobroma cacao*, genotype.

9. Bibliografía

1. Ángel, D. 2006. Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Tesis para optar por el título de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Carrera de microbiología industrial. Bogotá, Colombia. 152 pp.
2. Ampuero, E. 1967. Monilia pod rot of cocoa. Cocoa Grower's Bulletin. 9:1518.
3. ANECACAO, (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao). 2013. Recuperado el 29 de abril de 2013, de <http://www.anecacao.com/index.php/es/cacao-en-ecuador/historia-del-cacao.html>
4. ANECACAO, (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao). 2013. Historia del cacao. Recuperado el 03 de septiembre de 2014 de, <http://www.anecacao.com/es/historia-del-cacao/>
5. Arredondo, B. 2013. Cacao: Una brevísima historia de la que fuera moneda de México. Recuperado el 15 de Octubre de 2014 de, <http://vamonosalbable.blogspot.com/2013/03/cacao-una-brevisima-historia-de-la-que.html>
6. Argüelles, T. 2014. El cacao en el mundo: principales países productores. Comida. eHow en español. Recuperado el 25 de Septiembre de 2014 de, http://www.ehowenespanol.com/cacao-mundo-principales-paises-productores-galeria_168538/
7. Avendaño, C.; Mendoza, A.; Hernández, E.; López G.; Martínez, M.; Caballero, J.; Guillén, S. & Espinosa, S. 2010. Mejoramiento genético participativo en cacao (*Theobroma cacao L.*). pp 79.
8. Bastidas, O. 2009. Technical Note-Neubaver Chamber Cell Counting. 6 pp.
9. Baker, E., Cope, W., Holliday, C., Bartley, G. & Taylor, J. 1954. The Anglo-Colombian Cacao-collecting expedition. Report of Cacao Research. Trinidad, v1953, pp 8-29.

10. Barros, O. 1977. 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. pp 42-52.
11. BIOSCIENCE, 2004. Databases. Classification based on 9th edition of Dictionary of the Fungi. Recuperado el 29 de mayo de 2013 de, <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=219848>.
12. Brenes, O. 1983. Evaluación de la resistencia a *Monilia roreri* y su relación con algunas características morfológicas del fruto de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis para optar por el título de Magister en Ciencias. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). Turrialba, Costa Rica. 60 pp.
13. Campbell, C. & Madden, L. 1990. Monitoring epidemics: disease, in *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley. New York. pp 107-128.
14. Canacacao, (Asociación Cámara Nacional de Cacao Fino de Costa Rica). 2012. Cultivo. Plagas y enfermedades. 1 pp.
15. Confitería Marqués, 2014. EL CACAO. El cultivo del cacao en el mundo. Recuperado el 03 de septiembre de 2014 de, <http://www.confiteriamarques.com/index.php/m,38/el-cultivo-del-cacao-en-el-mundo>.
16. CORPOICA, (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). 2010. *Manejo de las enfermedades del cacao en Colombia*. Programa nacional de investigación para incrementar la sostenibilidad y competitividad del cacao cultura en Colombia. Colombia. pp 90.
17. Cuhn, R. 2006. Estructura genética de populações de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD y SSR. Tesis de doctorado. Universidad Estadual Paulista. Saõ Paulo, Brasil. 117 pp.
18. EL COMERCIO. (2014, 25 de agosto). Actualidad. El mercado mundial demanda cada vez más cacao ecuatoriano. Recuperado el 25 de Septiembre de 2014 de, <http://www.elcomercio.com.ec/actualidad/mercado-mundial-demanda-cacao-ecuadoriano.html>

19. EL COMERCIO. (2014, 26 de agosto). Actualidad. Ecuador puede ser un referente en el mercado mundial del chocolate. Recuperado el 03 de Octubre del 2014 de, <http://www.elcomercio.com.ec/actualidad/ecuador-referente-mercado-mundial-chocolate.html>
20. EL TELÉGRAFO. (2013, 15 de enero). ECONOMIA. Ecuador exporto \$ 425,7 millones en cacao en 2012. Recuperado el 21 de Junio del 2013 de, <http://www.telegrafo.com.ec/economia/item/ecuador-exporto-4257-millones-en-cacao-en-2012.html>
21. EL TIEMPO. (2014, 15 de septiembre). El origen del cacao es la Amazonía, según una investigación. Recuperado 03 de octubre de 2014 de, <http://www.eltiempo.com.ec/noticias-cuenca/129341-el-origen-del-cacao-es-la-amazona-a-sega-n-una-investigacion/>
22. El productor. El periódico del campo. (2012, 22 de noviembre). Artículos técnicos. Agrícolas. Rehabilitación de Huertas de Cacao.
23. Enríquez, G. & Soria, V. 1978. Monilia disease of cocoa in Costa Rica. Turrialba, Costa Rica. pp 339-340.
24. Enríquez, G. 2004. Cacao orgánico. *Guía para productores ecuatorianos*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Manual No. 54. Quito, Ecuador. pp 360.
25. Estrella, E. & Cedeño, J. 2012. Medidas de control de bajo impacto ambiental para mitigar la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par. Evans *et al.*) en cacao híbrido nacional x trinitario en Santo Domingo de los Tsáchilas. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejército. Santo Domingo, Ecuador. 139 pp.
26. Evans, H. 2007. Cacao diseases. The trilogy revisited. *Phytopathology* 97. pp 1640-1643.
27. FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola). 2012. Proyecto promoción de sistemas agroforestales de alto valor con cacao en Honduras. La moniliasis del cacao: el enemigo a vencer. La Lima, Cortés, Honduras, C. A. pp 30.

28. FUNDESYRAM, 2014. La moniliasis Causada por el hongo (*Moniliophthora roreri*). Manejo Agroecológico de Cacao. El Salvador. Código: 900247
29. FUNDESYRAM, 2013. Mal del Machete (*Ceratocystis fimbriata*), en cacao y su control. Manejo Agroecológico de Cacao. El Salvador. Código: 900097
30. Guerrero, G. 2014. Revista Líderes. MERCADOS. El Cacao ecuatoriano Su historia empezó antes del siglo XV. *Los orígenes del cacao historia*. Recuperado el 30 de septiembre de 2014 de, http://www.revistalideres.ec/mercados/Cacao-Ecuador-chocolate-cultivo-exportacion_0_1153684651.html
31. ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), 2012. Manejo fitosanitario del cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*). Medidas para la temporada invernal. Bogotá D.C. Colombia. Código: 00.09.39.12C. pp 40.
32. ICCO, (International Cocoa Organization). 2009. Recuperado el 1 de mayo de 2013, de <http://www.icco.org/about-cocoa/growing-cocoa.html>
33. IDIAF, (Instituto Dominicano de Investigación Agropecuarias y Forestales). 2012. Conozca y prevenga las enfermedades devastadoras del cacao. Programa de mercados y competitividad.
34. IDIAF, (Instituto Dominicano de Investigación Agropecuarias y Forestales). 2007. Orientan sobre enfermedades devastadoras del cacao Moniliasis y Escoba de Bruja. Recuperado el 22 de Octubre de 2014 de, <http://www.idiaf.gov.do/noticias/detallemain.php?ID=422>
35. INAMHI, (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología). Red de estaciones Meteorológicas. Quito-Ecuador.
36. INIA (Centro de Investigaciones del Estado Miranda). 2008. Venezuela.
37. INIAP (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS). Programa nacional de cacao y café. Características agronómicas de clones recomendadas por INIAP PICHILINGUE. 2000. Ecuador.
38. La Republica. (2012, 6 de julio). Ecuador, líder en la exportación de cacao fino que cautiva paladares europeos. Recuperado el 21 de Junio del 2013 de,

<http://www.larepublica.ec/blog/economia/2012/07/06/ecuador-lider-en-la-exportacion-de-cacao-fino-que-cautiva-paladares-europeos/>

39. Lecaro, J.; Gavilanes, M. y Carrillo, C. 2004. Diagnóstico de la situación actual y potencial de la producción de cacao en la Amazonia Ecuatoriana. Programa GTZ – GESOREN. Quito-Ecuador. pp 3.
40. Leandro, M. 2011. Efecto de los factores macro y micro climáticas y las características productivas del cacao sobre la epidemiología de la moniliasis. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) Tesis para optar por el título de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica. 87 pp.
41. García, L. 2009. Catálogo de cultivares de cacao del Perú. pp 47-49.
42. Rodríguez, L. 2005. Caracterización de clones de cacao por respuesta a monilia (*Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans *et al*) en Santander. Santander. pp 6.
43. Leyva-Mir, S.; González-Solano, C.; Rodríguez-Pérez, J. & Montalvo-Hernández, D. 2013. Comportamiento de líneas avanzadas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a fitopatógenos en Chapingo, México. Universidad autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. pp 301-313
44. Medeiros, F.; Pomella, A.; De Souza, J.; Niella, G.; Valle, R.; Bateman, R.; Fravel, D. Vinyard, B. y P. Hebbbar. 2010. A novel, integrated method for management of witches broom diseases in cacao, in Bahia, Brazil. Cop Protection 29: 704-713.
45. Ordoñez, L., Gavilánez, C. & Salazar, A. 2011. Secuestro de Carbono en Biomasa Aérea en Sistemas Agroforestales de Cacao y Café ubicados en la Reserva de Biosfera Sumaco. Programa GTZ – GESOREN. Quito-Ecuador. pp 44.
46. Panizo, M.; Vera, R.; Montes, W & González, G. 2005. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.25 n.1 Caracas.
47. Parra, D., Contreras, I. & Pineda, J. 2008. Aspectos fitosanitarios. Escoba de bruja del cacao en Venezuela. INIA. (Centro de Investigaciones del Estado Miranda). 52-56 pp.

48. Peshin, R. & Dhawan, A. 2009. Integrated Pest Management: Innovation-Development Process. DOI 10.1007/978-1-4020-8992-3 15.
49. Paredes, N. 2009. Manual de cultivo de cacao para la Amazonía ecuatoriana. Instituto nacional autónomo de investigaciones agropecuarias estación experimental central de la Amazonía DENAREF - unidad de recursos fitogenéticos. Manual No. 76. INIAP, Quito-Ecuador. pp 43.
50. Pinochet, J. 1987. Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región Centroamérica. CATIE (Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza). Panamá. 59 pp.
51. Phillips, W. 1986. Evaluación de la resistencia de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) a *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.). Universidad de Costa Rica, San José (Costa Rica). CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). Turrialba, Costa Rica.
52. Phillips-Mora, W. 2006. La moniliasis del cacao: un enemigo que podemos y debemos vencer. Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo, Ecuador. pp 21-25
53. Phillips, W. 2006. Origen, biogeografía, diversidad genética y afinidades taxonómicas del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif) Evans *et al.* del cacao (*Theobroma cacao* L.) determinadas mediante evidencia molecular, fitopatológica y morfofisiológica. www. Catie. ac.cr.
54. Phillips-Mora, W & M. Wilkinson. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. Symposium Cacao Diseases: Important threats to chocolate Production Worldwide. Phytopathology. 97 (12): 1644-1647.
55. Phillips Mora, W & Cerda, R. 2009. Catálogo: enfermedades del cacao en Centroamérica. Serie Técnica. Manual Técnico. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). Turrialba, Costa Rica. No. 93. 24 pp.
56. Porras, V. 1982. Fitología de la moniliasis del cacao y su relación con la producción del árbol en la zona de Matina. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Costa Rica. 47 pp.

57. Porras, V. 2012. Lo mejor que le pudo pasar al cacao de México: que le llegara la monilia. Recuperado el 24 de Octubre de 2014 de, http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_REVISTA_MONILIA_MEXICO_FUNDACION_PRODUCER.pdf
58. Porras, V. & Sánchez, J. 1991. Enfermedades del cacao. Características de las enfermedades del cacao. Mazorca negra. Lima.
59. Ploper, D. Epidemiología vegetal. Manejo integrado de plagas. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de agronomía y zootecnia. Recuperado el 17 de septiembre del 2014 de, [file:///C:/Users/Liz/Downloads/1410982999.Epidemiolog%C3%ADa-ManejoIntegradoPlagas\[1\]%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Liz/Downloads/1410982999.Epidemiolog%C3%ADa-ManejoIntegradoPlagas[1]%20(1).pdf)
60. PROECUADOR, (Instituto de promoción de exportaciones e inversiones). 2013. Recuperado el 29 de abril del 2013 de, <http://www.proecuador.gob.ec/2013/03/07/ecuador-presente-en-cita-mundial-de-chocolate-sostenible/>
61. Rorer, J. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos modernos y apropiados al cultivo. Traducción al español por Abelardo Pachano, Guayaquil-Ecuador. pp 17-40.
62. Sánchez, F., Gamboa, E. & Rincón, J. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreni* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. Revista de la Facultad de Agronomía. v.20 n.2 Caracas.
63. Santander, V. 2010. Plan de comercio exterior y negociación internacional para exportar cacao en grano "fino y de aroma" desde la parroquia La unión, Esmeraldas hacia Hamburgo, Alemania. Tesis para optar por el título de Ingeniera en Comercio Exterior y Negociación Internacional. ESPE (Escuela Politécnica del Ejército). Quito, Ecuador. 251 pp.
64. Saquicela, D. 2010. Evaluación económica de los componentes del manejo integrado para el control de enfermedades de cacao tipo nacional. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agropecuario. (ESPE) Escuela Politécnica del Ejército. Santo Domingo, Ecuador. pp 13.

65. SENASA, (Servicio Nacional de Sanidad Agraria). 2003. Perú. Recuperado el 24 de Octubre de 2014 de, <http://www.senasa.gob.pe>
66. Shaner, E. & R. Finney. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67: 1051-1056.
67. Suárez, C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roleri* Cif & Par. en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. 59 pp.
68. Soria, J. 2014. Ecuacocoa. *Breve Historia del Cultivo de Cacao en el Ecuador*. Origen del cultivo y exportación en América Tropical. Recuperado el 03 de septiembre de 2014 de, http://www.ecuacocoa.com/espanol/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=51
69. Suárez, L. & Rangel, A. 2014. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roleri*. *Acta agronómica*. 62 (4) 370-378.
70. Torres, M. 2010. Progreso temporal y manejo integrado de la moniliasis [*Moniliophthora roleri* (Cif y Par.) Evans *et al.*] Del cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México. Tesis para optar por el título de Doctor en ciencias, especialista en Fitopatología. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. 99 pp.
71. Torres de la Cruz, M.; Ortiz, C.; Téliz, D.; Mora, A. & Nava, C. 2011. Temporal Progress and integrated management of frosty pod rot (*Moniliophthora roleri*) of cocoa in Tabasco Mexico. *Plant Pathology* 93(1): 31-36
72. UNGERER, (El futuro se siembra hoy). 2014. El mundo demanda más cacao orgánico. Recuperado el 20 de Noviembre de 2014 de, <http://www.ungerer.com.ec/productos-agricolas-ganan-mercado-gracias-al-banano.html>
73. Uquillas, W. 2004. Inducción de la germinación para mejorar la eficacia de dos agentes antagónicos para el control de la monilia (*Crinipellis roleri*) del cacao (*Theobroma cacao*). Tesis para aspirar al título de

Magister en Ciencias. (CATIE) Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Turrialba, Costa rica. 71 pp.

74. Van der Plank, J. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press. London. 349 pp.

75. Villavicencio, M. 2010. Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana. Tesis para optar por el título de Ingeniera Agrícola y Biológica. ESPOL (Escuela Superior Politécnica del Litoral). Guayaquil, Ecuador. 85 pp.

