



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

ESCUELA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

“Caracterización cultural, morfológica y fisiológica *in vitro* de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, agente causante de la Moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L), en comunidades kichwas amazónicas de la provincia de Napo-Ecuador”

Tesis previa a la obtención del Título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

AUTOR

LAURA ALEXANDRA MOSQUERA PAREDES

DIRECTORA

ING. KARINA MARÍA ELENA CARRERA SÁNCHEZ M.Sc.

PUYO-PASTAZA – ECUADOR

MAYO, 2014

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

Ing. Ricardo Abril Saltos. M.Sc.

Dr. Miguel Iparraaguirre

Ing. Sandra Soria Re. M.Sc

2014

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Laura Alexandra Mosquera Paredes egresada de la Escuela de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad Estatal Amazónica, bajo mi supervisión.

Ing. Karina Carrera Sánchez M. Sc

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por bendecirme para llegar a cumplir esta meta tan anhelada.

A mis padres y familiares por motivarme constantemente a culminar mis estudios.

A mi esposo e hijo por su infinita paciencia, por su tierna compañía y su inagotable apoyo, gracias por compartir mi vida y mis logros.

A mi directora de tesis, Ing. Karina Carrera M.Sc. por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mi investigación con éxito.

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

A Ing. Daisy Changoluisa por la dirección técnica en el manejo del experimento durante de la investigación.

A las autoridades y docentes de la Universidad Estatal Amazónica quienes oportunamente me apoyaron en el desarrollo de la Tesis.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios, por darme la vida a través de mis queridos Padres quienes con mucho cariño, amor y ejemplo han hecho de mí una persona con valores para poder desenvolverme como: Hija, Esposa, Madre y Profesional.

En especial a mi mami quien desde el cielo me da mucha paz y tranquilidad para terminar este sueño tan anhelado que fue impulsado desde siempre por ella.

A mi papá quien con su empuje y ánimos me ha ayudado a salir adelante frente a las adversidades encontradas durante esta trayectoria universitaria.

A mi Esposo Janio, que ha estado a mi lado dándome cariño, confianza y apoyo incondicional para seguir adelante y culminar esta etapa en mi vida.

A mi Hijo Zioly, que es el motivo y la razón que me ha llevado a seguir superándome día a día, para alcanzar mis más apreciados ideales de superación.

A mis compañeros de promoción y a toda la comunidad Universitaria, por completar mi formación profesional y personal.

RESPONSABILIDAD

Yo Laura Alexandra Mosquera Paredes, declaro que el contenido de la presente Tesis de Grado es de mi responsabilidad exclusiva.

Laura Alexandra Mosquera Paredes

Contenido

AGRADECIMIENTO	4
DEDICATORIA	5
RESPONSABILIDAD	6
Índice de Tablas.....	11
Índice de Figuras	11
Índice de Gráficos	13
Indice de Anexos	14
Capítulo I	15
1. Introducción	15
a. Objetivos.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos	18
b. Hipótesis.....	18
Capítulo II.....	19
2. Revisión bibliográfica.....	19
2.1. Descripción del cacao.....	19
2.2. Descripción botánica del cacao según Enríquez (2004)	22
2.3. Variedades de cacao	24
2.4. Comunidades Kichwas y su producción.....	25

2.5.	Principales enfermedades en el cultivo.....	27
2.6.	Origen de <i>M.roreri</i>	29
2.6.1.	Clasificación taxonómica según Bioscience, (2004).	29
2.6.2.	Etiología	31
2.6.3.	Ubicación de los grupos genéticos, hospedantes y adaptación	31
2.6.4.	Diseminación de <i>M. roreri</i>	32
2.6.5.	Hospedantes	32
2.6.6.	Epifitología	32
2.6.7.	Ciclo de vida del patógeno.....	33
2.6.8.	Signos y síntomas de la enfermedad	35
2.6.9.	Síntomas externos.....	35
2.6.10.	Síntomas internos.....	36
2.6.11.	Medidas de control	36
Capítulo III.....		39
3.	Materiales y métodos.....	39
3.1.	Localización y duración del experimento.	39
3.2.	Condiciones meteorológicas.....	39
3.3.	Materiales y equipos.....	40
3.3.1.	Físicos	40
3.3.2.	Biológicos (Material experimental)	40

3.3.3.	Equipos	40
3.3.4.	Medios de cultivo	41
3.3.5.	Software estadístico	41
3.4.	Factor de estudio	41
3.5.	Análisis estadístico	41
3.6.	Variables	42
3.7.	Manejo del experimento	44
3.7.1.	Análisis de la zona de estudio.	44
3.7.2.	Colecta de muestras	45
3.7.3.	Caracterización de los aislamientos de <i>M. roreri</i>	50
3.7.6.	Características fisiológicas	53
3.7.6.1.	Influencia de pH en el crecimiento de micelial de <i>M. roreri</i>	53
3.7.6.2.	Influencia de la temperatura en el crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> . 54	
3.7.6.3.	Influencia de diferentes condiciones de iluminacion en el crecimiendo micelial de <i>M. roreri</i>	56
	Capítulo IV	57
4.	Resultados y discusión	57
4.1.	Características culturales	58
4.1.1.	Crecimiento micelial de las cepas de <i>M. roreri</i>	58

4.1.2. Color del micelio de la cepa y el reverso de la caja Petri de <i>M. roreri</i> en medio semi sólido PDA.	60
4.1.3. Bordes y Texturas	64
4.1.4. Presencia de cristales y liquido de transpiración en <i>M. roreri</i>	64
4.1.5. Elevación de micelio en <i>M. roreri</i>	65
4.2. Características morfológicas.....	66
4.2.1. Formas de conidios y número de conidios por cepa	68
4.2.2. Tamaño de conidiofóros y conidios: largo y ancho	69
4.3. Características fisiológicas	71
4.3.1. Influencia de la temperatura de incubación en el crecimiento micelial de <i>M. roreri</i>	71
4.3.2. Influencia de diferentes condiciones de iluminación en el crecimiento micelial de <i>M. roreri</i>	71
4.3.3. Influencia de diferentes pH en el crecimiento micelial de <i>M. roreri</i>	72
Capítulo V	74
5. Conclusiones	74
6. Recomendaciones.....	75
7. Resumen	76
8. Summary	78
9. Bibliografía	79

10. Anexos	85
------------------	----

Índice de Tablas

Tabla 1 Variables empleadas en la investigación.....	43
Tabla 2 Fincas en las que se realizó la recolección de las mazorcas de cacao....	44
Tabla 3 Codificación de las cepas proveniente de las fincas.....	49
Tabla 4 Identificación de cepas <i>M. rozeri</i>	57
Tabla 5 Color de cepas de <i>M rozeri</i> . los 18 días de crecimiento en PDA.....	62
Tabla 6Tamaño de los conidióforos y conidios.....	70
Tabla 7 Crecimiento micelial de la cepa CC-UEA-Mr5.1 en diferentes condiciones de iluminación.....	72

Índice de Figuras

Figura 1 Variedades de cacao "Criollo, Trinitario y Forastero.....	24
Figura 2 Representación del ciclo infectivo de <i>Moniliophthora rozeri</i> (Evans, 1978)	34
Figura 3 a) Tejidos centrales, pulpa, almendras y cáscara formando una sola masa producto de la pudrición; b) Fruto mostrando una mancha café con borde irregular donde va avanzando la enfermedad; c) Fruto donde se observa el micelio del hongo; d) Mazorca con infecciones ocultas, presentando hinchazones como pequeños abultamientos o gibas (Sánchez, <i>et al.</i> , 2012).	36

Figura 4 Ubicación de las fincas que se recolectaron las mazorcas con síntomas de la enfermedad.	45
Figura 5 Mazorcas de cacao mostrando diferentes síntomas de la enfermedad, a) Micelio sobre la superficie de color blanco con borde irregular, b) manchas café con borde irregular donde va avanzando la enfermedad, c) Mancha color café con pequeña presencia de micelio del hongo. Mazorcas recolectadas en la finca del sector Colonia Bolivar del Señor Carlos Pozo.	46
Figura 6 Desinfección de las mazorcas recolectadas y montaje de cámara húmeda para un posterior aislamiento	47
Figura 7 Identificación y siembra en medio PDA.	48
Figura 8 Aislamiento de <i>M. royeri</i>	50
Figura 9 Medición de características culturales.....	51
Figura 10 Medición de características morfológicas.....	53
Figura 11 Cepas del pH para determinar su influencia sobre el crecimiento micelial de <i>M. royeri</i>	54
Figura 12 Diferentes temperaturas utilizadas acorde con la posición del refrigerador.	55
Figura 13 Diferentes condiciones de iluminación, a) fotoperiodo, b) luz blanca y c) luz negra.	56
Figura 14 Géneros de hongos anamorfos aislados a partir de síntomas típicos de <i>M. royeri</i> . a) <i>Aspergillus</i> , b) <i>Moniliophthora</i> , c) <i>Cylindrocladium</i> y d) <i>Colletotrichum</i>	58
Figura 15 Cepas con medio de cultivo V8MAA	67

Figura 16 Hifas, conidios y conidióforo de la cepa CC-UEA-Mr1.1. Microfotografía con un aumento de 1000.	67
Figura 17 Cepa CC-UEA-Mr1.1, conidios subglobosos. Microfotografía con un aumento de 1000.	68
Figura 18 Cepa CC-UEA-Mr1.2 conidios elípticos. . Microfotografía con un aumento de 1000.	68
Figura 19 Cepa CC-UEA-Mr5.3, conidios globosos. Microfotografía con un aumento de 1000.	68
Figura 20 Conidios de <i>M. roreri</i> producidos en medio de cultivo semi sólido V8MAA, a los 15 días de incubación a 26°C.	69
Figura 21 Conidióforo de <i>M. roreri</i> en medio de cultivo semi sólido V8MMA a los 15 días de incubación a 23°C. Microfotografía con un aumento de 200X, de la cepa CC-UEA-5.3.	70

Índice de Gráficos

Grafico 1 Comportamiento de la velocidad de crecimiento radial de <i>M. roreri</i> en medio PDA.	59
Grafico 2 Comportamiento en general de crecimiento de <i>M. roreri</i> en medio semi sólido	59
Grafico 3 Tonalidades de los colores de las cepas de <i>M. roreri</i> en medio PDA.	63
Grafico 4 Tonalidades de los colores de las cepas de <i>M. roreri</i> en medio semi sólido PDA.	63
Grafico 5 Presencia de cristales en <i>M. roreri</i>	64

Grafico 6 Elevación de micelio de cepas <i>M. roreri</i> en PDA a los 21 días.....	65
Grafico 7Crecimiento micelial de la cepa CC-UEA-Mr5.1 en diferentes pH.....	72

Indice de Anexos

Anexo 1 Planilla para las características culturales	85
Anexo 2 Planilla para la medición de las características morfológicas	86
Anexo 3 Recolección de las mazorcas de cacao con características de <i>M. roreri</i>	86
Anexo 4 Cepa infectada con hongos anamorfos	87
Anexo 5 Aislamiento de <i>M. roreri</i> en medio de cultivo semi sólido PDA	87

Capítulo I

1. Introducción

El cacao *Theobroma cacao* L., es una planta oriunda de los trópicos húmedos de América del sur. Su centro de origen se cree ser en el noroeste de América del sur, en la zona alta amazónica (Enríquez, 2004).

En Europa a partir del siglo XIX el desarrollo de la industria del chocolate la producción de cacao se incrementó a un ritmo acelerado, en función de esto, Brasil y Ecuador se convirtieron en países productores de este cultivo. Más tarde, los colonizadores de África promovieron el cultivo llegando primero a Ghana de mano de misioneros suizos y posteriormente se difundió por Nigeria, Camerún y Costa de Marfil. (Bastidas, 2009)

Desde 1830 Ecuador produce cacao fino de aroma utilizando como base la variedad nacional, que ocupa aproximadamente 243.146 ha, de las cuales solo 2.294 ha se fertilizan o manejan. Ecuador exporta mundialmente entre 110.000 y 150.000 Tm al año; lo cual constituye una de las principales fuentes generadoras de divisas y trabajo. En el año 2012 el país exportó 121.600 Tm de granos de cacao y semielaborados. Por otra parte, aproximadamente 600.000 personas se encuentran vinculadas directamente a la producción de cacao, lo que representa el 4,3% de la Población Económicamente Activa (PEA) del Ecuador y el 13% de la PEA agrícola. (ANECACAO, 2012).

El cacao es de importancia relevante en la economía del Ecuador, por ser un producto de exportación y que constituye una fuente de empleo para un alto

porcentaje de habitantes de los sectores rurales y urbanos (Quiroz, 2006). Esta especie representa uno de los rubros más importante para el país, constituyendo el 5% de la producción mundial, siendo también uno de los cultivos tradicionales de interés comercial en la provincia de Los Ríos (Sánchez- Mora, *et al.*, 2011).

La actividad cacaotera en Ecuador involucra alrededor de 100.000 familias de pequeños y medianos productores y una superficie estimada de 500.000 ha. En el país se cultiva cacao en 16 provincias de las 24 existentes, especialmente en la región Costa, Amazonia y en aquellas ubicadas en las estribaciones de la Cordillera de los Andes. De la superficie nacional el 8,86% corresponde a la región norte de la Amazonía con 44.300 ha de las cuales el 83% de la superficie corresponde a cacao de tipo nacional, y el restante 17% a otros tipos de cacao trinitarios (ANECACAO, 2012).

Siendo el cacao uno de los principales rubros desde el inicio de la colonia en la Región Amazónica Ecuatoriana (RAE) por su importancia en la generación de ingresos para las familias de los productores, el cultivo no está exento de problemas fitosanitarios como: Moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif. & Par.), mazorca negra (*Phytophthora sp.*) y escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa* Stahel); los cuales constituyen los factores limitantes de la producción; donde la única estrategia para tener éxito es el manejo integrado del cultivo. (Villavicencio, 2010).

La moniliasis es una de las enfermedades más destructivas del cacao, registrada en 11 países latinoamericanos. (Phillips-Mora, 2006). La intensidad de la

moniliasis, varía según la zona y época del año, de acuerdo con las condiciones climáticas (PROAMAZONIA, 2003).

En Ecuador, los daños de las cosechas por la presencia de la moniliasis puede llegar a un 60% (MAG/IICA, 2001), mientras que su incidencia en mazorcas alcanzo el 64,76% en el año 2008 (Sánchez-Mora, *et al.*, 2011).

Actualmente, no existen alternativas para el control de *M. royeri* en las plantaciones orgánicas de cacao en las comunidades kichwas de la provincia de Napo, ni se dispone de aislados adecuadamente caracterizados del agente causal, lo cual limita el desarrollo de alternativas biológicas para el control de moniliasis. Es por ello, que el rendimiento agrícola y la calidad del cacao fino de aroma se compromete así como los ingresos de los productores de este importante cultivo.

El presente trabajo está enmarcado a las líneas de investigación de la Universidad Estatal Amazónica, en la línea número 3 que corresponde a la Producción de Alimentos y Sistemas Agropecuarios. Sub línea A Agrotecnia y manejo integrado de los cultivos de interés regional.

a. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar cultural, morfológica y fisiológica *in vitro* de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, agente causante de la Moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.), en comunidades kichwas amazónicas de la provincia de Napo-Ecuador.

Objetivos específicos

- Caracterizar aislados de *M. roreri* en cacao en base a sus caracteres culturales, en comunidades kichwas amazónicas de la provincia de Napo-Ecuador.
- Caracterizar aislados de *M. roreri* en cacao en base a sus caracteres morfológicos, en comunidades kichwas amazónicas de la provincia de Napo-Ecuador.
- Caracterizar aislados de *M. roreri* en cacao en base a caracteres fisiológicos, en comunidades kichwas amazónicas de la provincia de Napo-Ecuador.

b. Hipótesis

Mediante el aislamiento e identificación *in vitro* de *Moniliophthora roreri* procedentes de comunidades kichwas amazónicas de la provincia de Napo-Ecuador, se podrá caracterizar la variabilidad cultural, morfológica y fisiológica del agente causal de la Moniliasis del cacao, como fundamento para desarrollar alternativas de control biológico en próximas investigaciones.

Capítulo II

2. Revisión bibliográfica

2.1. Descripción del cacao

El cultivo del cacao tuvo su origen en América pero no se puede indicar con precisión el lugar específico ni su distribución. Algunos autores indican que el cultivo del cacao se inició en México y América Central 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 y Orinoco y sus afluentes, donde aún hoy existen tipos genéticos de mucho valor. Los toltecas y los aztecas de México apreciaban el cacao desde hacía mucho tiempo, antes del descubrimiento de América. Cuando Hernán Cortés conquistó ese país encontró que los aztecas usaban las almendras del cacao no sólo para la preparación de bebidas sino también como moneda. Los aztecas 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. La civilización maya ocupaba las tierras bajas de bosques húmedos tropicales al sureste del imperio azteca. 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 y traficaban el producto con los aztecas, quienes muy pronto llegaron a apreciar sus cualidades. Alrededor de 20 años después del descubrimiento de América, los conquistadores españoles de México se

asombraron de las grandes cantidades de cacao que encontraron en los almacenes del emperador Moctezuma y de la gran popularidad que tenía en la corte la bebida que se hacía de él. Ésta es la razón por la que se estableció en Europa una firme creencia de relación entre los aztecas y el cacao. Según estudios de Pound y Cheesman (1934) mencionado por Batista, (2009).

El cacao es originario de América del Sur, del área del alto Amazonas, que comprende países como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil, donde se ha encontrado una alta variabilidad. 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 (Batista, 2009).

ECORAE (2001), manifiesta que uno de los principales centros de origen del cacao es la región amazónica. Se encuentra de manera silvestre en varias zonas de las seis provincias amazónicas, donde las precipitaciones fluctúan entre 2.000 y 4000 mm/año, en altitudes de 200 a 1.100 msnm, temperaturas entre 19 a 25°C y luminosidad entre 1.050 a 1.350 horas/año. En suelos del orden de los Inseptisoles, Ultisoles y Entisoles.

El Ecuador es el primer productor de cacao fino de aroma a nivel mundial con aproximadamente el 62% del volumen global, por lo tanto es fundamental preservar este legado cultural, social y económico. Además, es el producto ecuatoriano de exportación con mayor historia en la economía del país, que involucra alrededor de 100.000 familias de pequeños y medianos productores. El

cacao ecuatoriano es reconocido mundialmente por sus marcadas características de aroma y color sumamente apreciadas en la preparación de chocolates finos. (ACEPROCACAO, 2012).

Existen 500.000 ha de cacao, la mayoría asociadas con otras especies, establecidas en más de 100.000 fincas (familias), principalmente de pequeños productores de diversas culturas de las nacionalidades indígenas de la Amazonia. Siendo el tercer rubro agrícola más importante del país, generando el 6,7% del PIB agrícola (2012).

La clasificación botánica más aceptada para el cacao según Ayala (2008) es:

Reino: Plantae (plantas)

Subreino: Tracheobionta (plantas vasculares)

División: Magnoliophyta (plantas con flores, angiospermas)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledónea)

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Familia: Sterculiaceae

Subfamilia: Byttnerioideae

Género: *Theobroma*

Especie: *T. cacao* L.

2.2. Descripción botánica del cacao según Enríquez (2004)

Raíz: Tiene una raíz principal pivotante, la cual sirve de medio de anclaje; especialmente los primeros meses de vida de la planta, puede crecer normalmente entre 120 a 150 cm, alcanzando en suelos hasta 2 m, el sistema de raíces secundarias absorbe los nutrientes y agua disponibles en el suelo, este sistema secundario se halla a 30 cm de profundidad.

Tronco.- Tiene un tipo de crecimiento lateral o plagiotrópico, el cual puede variar su ángulo de crecimiento. Se desarrolla en formas muy variadas, según las condiciones ambientales y de manejo. Este tipo de árbol alcanza hasta 4 metros de altura.

Hojas: Las hojas adultas son simples y enteras, de tamaño medio, coriáceas de color verde. Cuando están pequeñas el color puede variar de verde pálido a café claro o pueden tener tonalidades rojizas. Las hojas del cacaotero son caducas, y por lo general cada dos o tres meses se presentan picos de brotación de nuevas hojas, que reemplazan a las que se caen.

El peciolo de la hoja del tronco ortotrópico, normalmente es largo, con un pulvínulo bien marcado y el de las hojas de las ramas laterales es menos desarrollado.

Flores: Las flores del cacao producen y desarrollan cojinetes florales, son de color rosado hermafroditas pentámeras; cada una compuesta por cinco sépalos, cinco pétalos, cinco estambres, cinco ovarios y cinco estaminodios que crecen en simetría radiada. Las flores tienen una viabilidad de hasta dos días; luego de lo cual, si no son fecundadas se caen.

Frutos: Los frutos son bayas indehiscentes, mejor conocidas como mazorcas que pueden variar de forma, espesor, rugosidad, color y tamaño según el origen genético. Se observa toda 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, café amarillento a rojizo anaranjados.

Los surcos y lomos se presentan en número de 10, siendo profundos o leves según la variedad de cacao. En su interior las mazorcas tienen cinco lóculos o cavidades donde están alojadas las semillas, las cuales varían en tamaño y número según la variedad. La cantidad de semillas en cada mazorca depende del número de óvulos en cada ovario. El color interno de las almendras es violeta pálido o lila, aunque en algunas ocasiones se observan semillas blancas.

La mazorca está unida al tronco del árbol por un pedúnculo grueso. El tiempo desde la fecundación hasta la madurez fisiológica de una mazorca es alrededor de 180 días.

Semilla: Son de forma oblonga y pueden variar mucho en el tamaño. Tienen un recubrimiento o cutícula que protege a los cotiledones y en la parte exterior está el mucilago que es la parte dulce que permite la fermentación de la semilla, además permite diferenciar algunos genotipos por su sabor.

Los cotiledones, son la parte que tienen los nutrientes para la próxima planta, pero también es el producto que fermentado y secado correctamente se comercializa, para dar el chocolate.

2.3. Variedades de cacao

Según Ayala (2008), el centro de dispersión del cacao está entre los 20° de latitud norte y 20° de latitud sur. En cada zona específica evolucionaron tipos o cultivares de cacao con diferentes características especiales y actualmente se reconocen tres grandes tipos de cacao: Criollos, Forastero y Trinitario.



Figura 1 Variedades de cacao "Criollo, Trinitario y Forastero

El Ecuador es uno de los países donde se encuentra la mayor diversidad genética de la especie *Theobroma cacao*.

Criollos.- Se desarrollan específicamente en una zona que abarca desde el norte del Ecuador (Esmeraldas), Colombia, Venezuela, Centroamérica hasta las selvas tropicales de México. Este tipo de cacao se caracteriza por tener mazorcas de coloraciones verdes y rojizas en estado inmaduro, tornándose amarillas y anaranjado rojizos, cuando están maduras. El cacao criollo, por haber sido el cacao domesticado y adaptado a diferentes regiones del planeta, ha sido el cacao más delicado y de poca productividad, y al mismo tiempo el más susceptible a enfermedades. Por esta razón cuando el mal de machete se expandió por el

continente Americano, este genotipo de cacao casi desaparece, especialmente en Panamá, Costa Rica y Nicaragua.

Forasteros amazónicos.- Evolucionaron en la cuenca alta del río Amazonas, encontrándose de modo silvestre en la Amazonía de Ecuador, Colombia, Perú, Venezuela y Brasil. Desde ahí se distribuyó al África, sudeste asiático y Oceanía. Es el tipo de cacao más cultivado en el mundo, ya que cerca del 80% de la superficie cacaotera mundial está sembrada con este. La coloración de las mazorcas es verde en estado inmaduro y amarillas en estado maduro.

Trinitarios.- Se formaron de manera espontánea del cruce entre cacaos criollos o forasteros amazónicos en la isla de Trinidad (de ahí deriva su nombre), pasando luego a Venezuela, Colombia y el resto del mundo. De este cruce heterogéneo se presentan diversidad de formas intermedias de mazorcas al igual que su coloración, hallando tonos verdes y rojizos, e inclusive una mezcla de ambos. De este material se han seleccionado la mayoría de las variedades de cacao que se explotan en el mundo, por cuanto son más resistentes a enfermedades y han podido adaptarse mejor a muchos ambientes.

2.4. Comunidades Kichwas y su producción.

La Asociación Agro Artesanal de Bienes Agrícolas, Pecuarios y Piscícolas de Napo (Kallari) se encuentra organizada en 120 comunidades, integradas por más de 2 000 familias indígenas que producen aproximadamente 100 t año^{-1} de cacao seco, cuyo objetivo principal es mejorar sus ingresos y satisfacer sus necesidades básicas sin recurrir a la tala de árboles o la venta de sus tierras. El promedio de

área cultivada de cacao fino y de aroma orgánico por familia es de 1,87 ha con una producción de 216 kg/ha; el precio promedio de venta del quintal de cacao seco alcanzó \$ 195 en el 2011 (USD 4290/t), lo que genera una dinámica económica de más de 5 millones USD a escala provincial. La comercialización de la producción de todas las chakras se realiza mediante el acopio por Kallari (Palomeque 2009; Moreno, 2011; Ordoñez *et al.*, 2011)

Las comunidades manejan sus cultivos mediante el Sistema de Chakra, sistema que asegura el sustento familiar, genera excedentes y rescata valores del Sumak Kawsay (Buen Vivir). Valores sociales, económicos, culturales y ambientales. El valor de las tradiciones, de la medicina ancestral, de las artesanías, el entorno, que no explota a la gente. (Pérez, 2013).

Las prácticas agrícolas en las comunidades son sustentables y amigables con el medio ambiente. Preparan el suelo, cultivan y cosechan todos sus cultivos a mano y también cuidan de mantener el suelo rotando su cosecha e intercalando con especies de legumbres nitrogenosas, las que aportan riqueza al suelo. En el proceso de cultivo utilizan solo sus manos y machetes y así aportan a no dañar la superficie cultivable. Las plantas cultivadas en su área incluyen: maíz, plátanos, papaya, frejoles, piñas, papa china, café, cacao, palmas, árboles frutales, madera dura y plantas de uso medicinal y artesanal. (Pérez, 2013).

2.5. Principales enfermedades en el cultivo.

Por lo general en el Ecuador las enfermedades del cacao causan más pérdida al agricultor que los insectos llegando hasta el 80%, entre las principales enfermedades en los cacaotales del país se señalan:

Escoba de bruja: Es causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa* (Phillips-Mora, 2005), se caracteriza por la proliferación de yemas apicales y axilares en ramas de cacao. El hongo afecta todos los órganos de crecimiento activo, principalmente los brotes nuevos, cojinetes florales, flores y frutos en los cuales producen hipertrofias y crecimientos anormales. Dependiendo del órgano de la planta y de la edad del hongo cuando infecta, se manifiesta una diversidad de síntomas a los cuales se les asigna una denominación particular, causando atrofas de los brotes vegetativos y reproductivos ocasionando un continuo debilitamiento del árbol. Cuando los frutos son afectados a temprana edad provoca el aborto de los mismos. (INIA, 2008).

Mal de machete: Es una enfermedad que se presenta en el tronco y las ramas de cacao, es producida por el hongo *Ceratocystis cacaofunesta*, la cual es transmitida por un insecto del género *Xyleborus spp.*, que es un coleóptero perforador del tronco, y también se transmite por las herramientas sin desinfectar. Los síntomas que presenta la enfermedad consisten en perforaciones y la presencia de aserrín en los sitios dónde hizo las perforaciones el insecto, los cuales, por lo general se encuentran en el tronco y las ramas primarias del árbol. Cuando la infección es transmitida por las herramientas se presentan en cualquier parte del árbol y esto se produce porque antes se utilizaron las herramientas en un árbol infectado y no

se tuvo el cuidado de desinfectarlas. Cuando la enfermedad se presenta en el tronco y las raíces causa la muerte total del árbol, el síntoma inicial de la enfermedad se presenta con un amarillamiento de las hojas que mueren rápidamente y quedan adheridas las ramas aún después de muerto el árbol. Esta enfermedad se manifiesta de forma rápida, es decir produce una muerte súbita del árbol. Para controlar la enfermedad lo mejor es a través de la prevención, por lo que se recomienda no utilizar las herramientas que hayan sido utilizadas en labores realizadas a plantas enfermas y cuando se tenga necesidad se debe desinfectar las herramientas utilizando sustancias como la formalina (formol) diluido en agua al 10% o el hipoclorito de sodio (Cloro comercial), inclusive los agricultores reportan que limpian sus herramientas con limón. También se debe realizar el control del insecto *Xyleborus* destruyendo los árboles secos o las partes secas de los árboles infectados y cicatrizar las cortes que se realicen en el árbol durante las podas. Para cicatrizar los cortes se recomienda utilizar una solución de un fungicida cúprico y un adherente o bien la pasta bordelesa. (CATIE, 2009).

Mazorca negra: Esta enfermedad es producida por *Phytophthora sp.* que es el agente causal, se encuentra con más frecuencia en la región de Centroamérica. Sin embargo, en otras regiones del mundo la enfermedad la producen otras especies del protista como *P. capsici*, *P. citrophthora* que se presentan mayormente en algunas regiones de América del Sur y el Caribe y *P. megakarya*, que solo está presente en ciertos países de África. Avances sobre el estudio de esta enfermedad en el Ecuador la asocia con el agente causal *Phytophthora palmivora*. (Evans. 2014).

Esta enfermedad ataca los frutos principalmente, produce daños de importancia económica, ya que reduce la producción de semillas, sin embargo, también puede atacar otras partes de los árboles como brotes tiernos, tronco, cojinetes florales, raíces y plántulas de cacao en vivero.

Phytophthora sp. se reproduce por esporas. Las estructuras del protista se conocen con el nombre de esporangios terminales que pueden germinar directamente emitiendo un tubo germinativo o indirectamente produciendo zoosporas. Estas dos estructuras (esporas y zoosporas) tienen la capacidad de producir infecciones, que afectan a los nuevos frutos. (CATIE, 2009).

2.6. Origen de *M.roreri*

La moniliasis es una enfermedad que se detectó en 1914 en Ecuador (Barros, 1977), pero recientes estudios realizados por Phillips-Mora (2006), menciona en función de los autores que el origen de esta grave enfermedad se dio en Colombia en el año 1800; desde entonces se ha dispersado a diferentes países sur y centro americanos productores de cacao (Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Honduras, Guatemala, Belice y México) ocasionando pérdidas superiores al 90% de la producción y el abandono del cultivo por miles de productores a lo largo del continente americano, situación que ha causado efectos negativos para productores en los agro ecosistemas.

2.6.1. Clasificación taxonómica según Bioscience, (2004).

- Reino: Fungi
- Phylum : Basidiomycota

- Subclase : Agaricomycetidae
- Orden: Agaricales
- Familia: Marasmiaceae
- Género: *Moniliophthora*
- Especies: *M. roreri*

La moniliasis constituye un factor muy importante de infección en las plantaciones de cacao, debido a que los seres humanos son los agentes más efectivos de diseminación a largas distancias, dado que el hongo está muy bien adaptado a este método indirecto de diseminación (Evans, 1986 citado por Hernández ,2007), sobre las plantaciones afectadas, existe una presencia permanente de conidios de *M. roreri*, flotando en el aire, por lo que la infección del fruto puede ocurrir en cualquier ambiente favorable. La regulación del microambiente ha sido una de las practicas más recomendables para el combate de Moniliasis (Phillips-Mora, 2004 citado por Hernández ,2007).

3.2.1 Nombres Comunes

- Moniliasis del cacao
- Pudrición de fruto
- Pudrición acuosa del fruto
- Helada
- Mancha ceniza
- Enfermedad de Quevedo

2.6.2. Etiología

Se sabe que el centro de origen de este patógeno está en la región nororiental de Colombia, capaz de afectar especies de los géneros *Herrania* y *Theobroma*.

El agente causal fue inicialmente llamado *Monilla roreri* por Ciferri y Parodi (1933) y clasificado dentro del filum Ascomicota, describiéndola como un hongo anamorfo debido a la aparente ausencia de un estado meiotico o de estructuras sexuales y sus similitudes morfológicas con otros fitopatógenos del género (Evans, *et al.*, 2003). Sin embargo, Evans, *et al.*, (1987), mediante estudios de microscopia electrónica, encontraron la presencia de septo doliporo (característico de hongos homobasidiomicetos) y un evento único de esporogénesis basipetal, resultado que motivó la creación del nuevo género *Moniliophthora* (Evans, *et al.*, 2003).

2.6.3. Ubicación de los grupos genéticos, hospedantes y adaptación

A nivel internacional se han identificado cinco grupos genéticos principales del hongo, tres son endémicos y están localizados en la cordillera central y oriental de Colombia y en Ecuador. Los otros dos están ampliamente distribuidos y se encuentran en una fase invasiva, localizándose uno de los grupos en el Oriente de Colombia y la periferia de Ecuador, Venezuela y Perú; y el otro en el Occidente de Colombia, Centro de Ecuador y América Central (Phillips-Mora, 2006).

Las investigaciones han permitido determinar que los síntomas varían con la edad del fruto de la infección, pero la velocidad de desarrollo depende de las condiciones ambientales, básicamente de la temperatura, de la humedad relativa y de la susceptibilidad del clon o variedad de cacao (Porras, *et al.*, 1991).

La época crítica para la infección de *M. roreri* son los cuatro primeros meses de formación de frutos desde la floración (Phillips-Mora *et al.* 2006).

2.6.4. Diseminación de *M. roreri*

Las conidios de *M. roreri* son los únicos propágulos infectivos, que se diseminan fácilmente por acción del viento y de las gotas de lluvia (Barros, 1977).

2.6.5. Hospedantes

M. roreri ha sido reportado solamente en especies de los géneros *Theobroma* y *Herrania*. Rorer (1918) reportó que en Ecuador el ataque fue a frutos de *T. bicolor* y *H. balaensis*. Además, Evans en 1981 reportó infecciones de *M. roreri* en *T. mammosum*, *T. simiarum*, *T. sylvestre*, *T. angustifolium*, *H. nítida*, *H. pulcherrima*. Posteriormente identificaron el patógeno en *T. grandiflora* y *H. purpurea*.

2.6.6. Epifitiología

Esta enfermedad ha sido descrita en un amplio rango altitudinal entre 0 y 1.520 msnm donde existe precipitación pluvial anual que fluctúa desde 780 – 5.500 mm y una temperatura de 18 a 28°C (Phillips-Mora, 2006).

Meléndez (1993) encontró que existe una estrecha relación entre la humedad relativa y el movimiento de conidios del hongo, indicando que la liberación es realizada entre el 71 y 74% de humedad relativa y en un horario que va desde las 10h00 hasta las 14h00 aproximadamente.

Las condiciones secas, humedad relativa baja y temperatura mayor a 26°C favorecen la liberación y dispersión de los conidios, y las lluvias intensas y

frecuentes favorecen la presencia de agua libre mientras que los frutos que facilitan la germinación y penetración de los conidios (Phillips-Mora, 2006).

2.6.7. Ciclo de vida del patógeno.

La sobrevivencia del patógeno empieza en los residuos de cosecha (mazorcas contaminadas). Luego, los conidios son diseminados por el viento y la lluvia, ocurriendo también contaminación de frutos o mazorcas con moniliasis de una plantación a otra (Navarro y Mendoza, 2006). Algo similar menciona Albuquerque., *et al* (2005), diciendo que la diseminación de los conidios se realiza por el viento, pudiendo el agua de lluvia tener un papel importante en las infecciones a corta distancia en la copa del cacao.

Además, debido al movimiento producido por las labores de cosecha los conidios se movilizan en el aire y bajo condiciones propicias de humedad y temperatura, infectan constantemente los frutos que recién están formándose (Amores, *et al*, 2009).

Según Meléndez en (1993), en su investigación sobre microambiente, la mayor cantidad de conidios de moniliasis se encuentran a 1 metro de altura en las plantas de cacao. Los conidios se depositan sobre el fruto, germinan si hay agua o mueren por la radiación/desecación; estas al germinar pueden penetrar directamente en la epidermis del fruto (Phillips-Mora, 2006).

Su penetración ocurre directamente a través de los estomas, creciendo entre las células del córtex, produciendo conidios dentro y en la superficie de los frutos (Albuquerque, *et al.*, 2005).

Una de las características del patógeno es su largo período de incubación antes de que los síntomas aparezcan (Johnson, *et al.*, 2008).

El tiempo de infección puede ser de 3 a 8 semanas, pudiendo variar según la edad del fruto, la severidad del ataque, la susceptibilidad del árbol y las condiciones de clima, principalmente presencia de lluvias, mientras que en frutos tiernos, en días lluviosos y calurosos, el período de incubación se acorta a tres semanas según la Fundación Hondureña (FHIA, 2003); sin embargo, Cruz en 1993 relata que el período de incubación fluctúa entre 30 y 70 días.

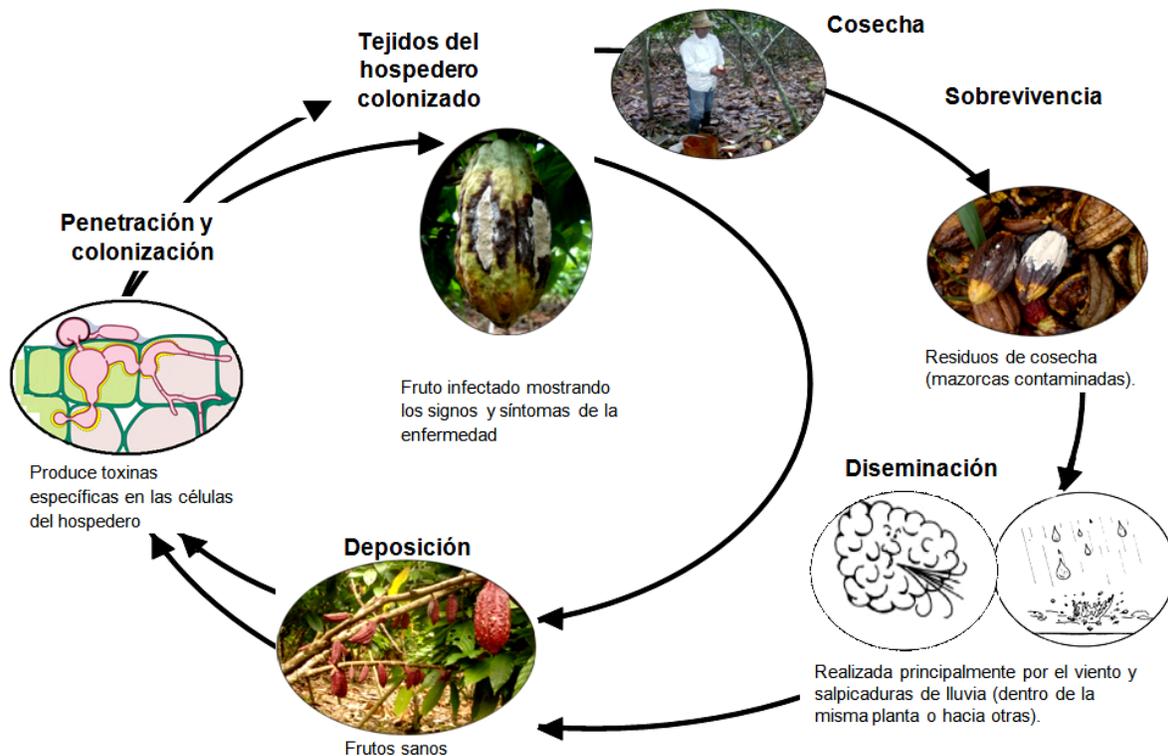


Figura 2 Representación del ciclo infeccioso de *Moniliophthora roreri* (Evans, 1978)

2.6.8. Signos y síntomas de la enfermedad

Una de las características del hongo *Moniliophthora roreri* es su largo periodo de incubación, es decir el tiempo que tarda desde que se infecta el fruto hasta que se observa algún síntoma externo. Este tiempo puede ser de tres a ocho semanas, dependiendo de la edad de la mazorca, la severidad del ataque, susceptibilidad del árbol de cacao y las condiciones de clima, principalmente presencia de lluvias (Hernández *et al.*, 1991).

2.6.9. Síntomas externos

Las mazorcas con edad menor a un mes presentan como síntomas externos: maduración prematura, marchitez y secamiento, si la infestación ocurre de uno a tres meses presentan deformaciones o abultamientos; en mazorcas de dos a tres meses muestran puntos de color verde oscuro o deformaciones. Luego de los primeros síntomas aparece la mancha color marrón o chocolate, a los pocos días sobre la macha café se desarrolla el micelio y luego las conidios de color crema (Hernández, *et al.*, 1991).

Los conidios que reproducen este hongo son tan abundantes que en un centímetro cuadrado se cuentan de 7 a 43 millones, bastando sólo una para iniciar la enfermedad (Johnson, *et al.*, 2008).

La infección también puede ocurrir en los frutos con más de tres meses de edad, en gran parte la podredumbre se limita a la piel del fruto y no alcanza a llegar a las almendras que así pueden aprovecharse como parte de la cosecha (Amores, *et al.*, 2009).



Figura 3 a) Tejidos centrales, pulpa, almendras y cáscara formando una sola masa producto de la pudrición; b) Fruto mostrando una mancha café con borde irregular donde va avanzando la enfermedad; c) Fruto donde se observa el micelio del hongo; d) Mazorca con infecciones ocultas, presentando hinchazones como pequeños abultamientos o gibas (Sánchez, *et al.*, 2012).

2.6.10. Síntomas internos

El daño interno causado por la moniliasis es aún más grave que el daño externo, porque se pierden casi todas las almendras sin importar la edad del fruto. En los frutos jóvenes no hay formación de semillas por lo que se genera una masa fibrosa debido a la descomposición de los tejidos y son más pesados que los sanos. En los frutos afectados de dos a tres meses de edad, se forman las semillas pero luego se pudren al ser infectadas por el hongo. (FEDECACAO, 2004).

2.6.11. Medidas de control

Evitar el excesivo crecimiento del árbol de cacao, ya que el auto sombreado reduce su actividad fotosintética, creando un microclima interno que estimula la infección y el desarrollo de la enfermedad en los frutos (Amores, *et al.*, 2009), lo que ayudaría también, a una adecuada recolección de frutos al momento de la

cosecha. Las podas sanitarias en la cosecha es otra buena práctica cultural para eliminar las partes afectadas por insectos o enfermedades (Enríquez, 2004).

La poda frecuente, regulación del estrato superior, buen drenaje, densidades de plantación apropiadas, buen control de malezas y correcto programa de fertilización, ayudan al óptimo desarrollo del árbol pues hace que los patógenos que ingresen a las plantaciones tengan pocas probabilidades de establecerse y desarrollarse; en caso de que la enfermedad llegue a establecerse, con un manejo cultural adecuado puede ser controlada económicamente y se podrá convivir con la enfermedad. Pero si la enfermedad ya está presente, es de suma importancia remover de la plantación, semanalmente las partes afectadas (frutos con síntomas de la enfermedad) del cacaotal (Johnson, *et al.*, 2008). También, es importante la recolección y destrucción de frutos enfermos de forma semanal, pues es el método de control más recomendado contra la moniliasis (Sánchez, *et al.*, 2003 y Krauss, *et al.*, 2003).

Los frutos con signos del hongo (mazorcas con aspecto de ceniza), se deben remover las primeras horas de la mañana o en la tarde después de las 16h00, evitando que la humedad no permita el desprendimiento de las conidios, y por último dependiendo de la cantidad de estos, puedan enterrarse o trasladarse a otro sitio (FEDECACAO, 2004).

Control biológico.- Actualmente se están evaluando la efectividad de algunos hongos antagonistas a los patógenos, entre ellos a *M. rozeri*. Entre estos antagonistas se encuentran 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 pueden ser consideradas como simbiosis mutualística. Se ha propuesto que muchos endófitos protegen a las plantas sus hospedantes a través de la producción de produciendo micotoxinas u otras sustancias que suprimen patógenos (SENASA, 2003).

Control químico.- Debido a la arquitectura del árbol y ubicación de las mazorcas se puede obtener éxito en el control de la moniliasis, utilizando sulfato de cobre (2 kg en siembras de alta densidad), realizando aplicaciones semanales durante tres meses, a partir de los primeros picos de floración y después dirigido a los frutos en el periodo de mayor crecimiento (Crespo, 1997).

Con la aplicación de productos químicos se consigue reprimir la enfermedad de manera significativa, demostrando los beneficios de los fungicidas en los frutos; los fungicidas sistémicos muestran un mejor control de *M. royeri* en comparación con los de contacto, lo cual implica reducir el número y los costos de aplicaciones; al complementar las labores culturales con los controles químicos, la producción de cacao sano se incrementa alrededor del 20%, mostrando resultados favorables y significativos. (Ayala, *et al.*, 2008).

Capítulo III

3. Materiales y métodos

3.1. Localización y duración del experimento.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Biología de la Universidad Estatal Amazónica ubicada en el Km 1^{1/2} vía Puyo-Tena, cantón Pastaza, parroquia Puyo, provincia de Pastaza.

La ubicación geográfica fue levantada directamente con un GPS.

Coordenadas geográficas	1°27'42" S 78°01'53,6" O
Altitud	935 msnm

El experimento tuvo una duración de 200 días de trabajo en campo y análisis e interpretación de datos, correspondiendo al periodo de Julio del 2013 a Abril del 2014.

3.2. Condiciones meteorológicas.

Los datos meteorológicos de la ciudad de Puyo registrados en la estación Veracruz durante el año 2013 indican:

Temperatura media anual	20,6°C
Humedad relativa	89,3%
Evapotranspiración	765,8 mm
Precipitación anual	4500

En el laboratorio las condiciones fueron controladas con una temperatura estable de 24°C y una humedad relativa de 85%.

3.3. Materiales y equipos

3.3.1. Físicos

Tijeras de podar, fundas Kraft, fundas plásticas, cajas Petri con dimensiones de 100 x 15 mm y 100 x 20 mm, Erlenmeyer de 500 y 1000 ml de marca CITOGLAS, lámpara de alcohol, sacabocados de 10 mm, embudo de malla artesanal, tijera de podar, cuchillo, asa, vasos de precipitación de 25 ml y 250 ml (marca OBEROI ^{UK}) porta objetos (marca ALFALAB, modelo CAT. NO.7105) dimensiones de 76,2 X 25,4 mm (1"X3"), cubre objetos (marca B&C GERMANY), dimensiones 22 x 22 mm, probetas de 500 ml, frascos lavadores, termómetros, bisturí # 20, calibrador pie de rey, parafilm (marca BEMIS®), de dimensiones 4INx125 FT. ROLL, papel filtro (marca Fisher Brand ®, dimensiones Ø 12,5 cm), lámparas de luz blanca, Gentamicina MK 160 mg/2ml.

3.3.2. Biológicos (Material experimental)

Mazorcas de cacao con diferentes síntomas de la enfermedad tales como: pequeños puntos aceitosos, con deformaciones o protuberancias, mazorcas modificadas con manchas de color café (manchas chocolate) y mazorcas que presenten un crecimiento micelial color blanco y con esporulación de color crema.

3.3.3. Equipos

Microscopio estereoscopio marca MOTIC, modelo DM143, microscopio clínico marca MOTIC, modelo Q720AD SERIES B1 con cámara digital incorporada con el software MOTIC IMAGES PLUS 2.0, modelo MULTI LANGUAGE Versión, cámara de flujo laminar ESCO CLASS II, modelo TIPO INFINITY FC2-4A1, incubadora

marca MEMMERT, modelo INB 400 , estufa, autoclave 121°C (con una presión de 0,7–1 bar) marca SHENAN, modelo LDZX-50FBS, cámara de fotos marca CANON, balanza analítica marca PIONEER OHAUS, modelo PA3102, plato agitador marca IKA, modelo C-MAG HS 10 S1, medidor de pH marca, refrigeradores de marca Indurama, computadora marca HP, cámara de esporulación con dos lámparas de luz negra modelo BLB40W 120V.

3.3.4. Medios de cultivo

Medio de cultivo semi sólido PDA Potato Dextrose Agar Cod: MO96-5006, medio de cultivo semi sólido V8MAA y Caldo de Papa Dextrosa (Código: 254920)

3.3.5. Software estadístico

Las variables evaluadas fueron realizadas con el paquete estadístico *IBM SPSS Statistic versión 21.0 para Windows*.

3.4. Factor de estudio

El factor en estudio considerado para la investigación fue la caracterización cultural, morfológica y fisiológica de aislados de *M. roreri*.

3.5. Análisis estadístico

Para el análisis y comparación de los datos se utilizó la prueba no paramétrica de *Kruska Wallis* que se aplicó para la medición de la velocidad del crecimiento radial de *M. roreri*, el conteo de conidios y para la influencia de pH en el crecimiento micelial de *M. roreri*, para determinar el color del micelio y el color del reverso de la caja Petri en donde se desarrolló el hongo, presencia de cristales y elevación del

micelio se utilizó la estadística descriptiva, utilizando gráficos de distribución de frecuencia.

3.6. Variables

Las variables independientes de la investigación corresponden a la caracterización cultural, morfológica y fisiológica de aislados *M. roreri*, mientras que las variables dependientes son velocidad de crecimiento del micelio en la caja Petri, el color del micelio, el color del reverso de la caja Petri, los líquidos de transpiración, forma, conteo y tamaño de conidios tamaño de conidióforos, tamaño de hifas, influencia de la temperatura sobre el crecimiento micelial, influencia del pH en el crecimiento micelial, influencia de la luz en el crecimiento micelial.

Tabla 1 Variables empleadas en la investigación.

Variab les independientes	Variab les dependientes	Descripción de la variable
Caracterización cultural	Velocidad de crecimiento de micelio de las cepas de <i>Moniliophthora roreri</i> .	Su valor se expresa en (mm.día ⁻¹)
	Color del micelio	Su valor puede ser blanco, durazno y café
	Color del reverso del micelio observado en la caja Petri.	
	Presencia de líquidos de transpiración	Se refiere a la presencia de cristales o exudados
Caracterización morfológica	Forma de conidios	Se refiere a la forma de los conidios esta puede ser elípticos, globosos o sub globosos
	Conteo de conidios s	Concentración de conidios por 10 ml de agua.
	Tamaño de conidios, conidióforos.	Su valor se expresa en µm
Características fisiológicas	Influencia de temperatura sobre el crecimiento micelial	Crece o no a 20, 25, 30 y 35 °C
	Influencia de las condiciones de iluminación en el crecimiento micelial	Crece o no en luz negra, blanca, fotoperiodo y oscuridad
	Influencia del pH sobre el crecimiento micelial	Crece o no en un pH de 4 a 8 con una escala de 0,05 y se expresa en gr.

3.7. Manejo del experimento

3.7.1. Análisis de la zona de estudio.

La investigación se llevó a cabo en 5 fincas de pequeños productores pertenecientes a la Asociación Kallari la cual está formada por 21 comunidades, 850 familias y 5.000 beneficiarios del Cantón Tena, en la Provincia de Napo ubicado en la Región Amazónica Ecuatoriana (Pérez, 2013) (Figura 4). Quienes conducen una producción orgánica mediante el manejo racional de los recursos naturales, sin la utilización de productos de síntesis química, para brindar alimentos sanos y abundantes, mantener e incrementar la fertilidad del suelo y la diversidad biológica. En las cuales se realizó un muestreo dirigido a las plantaciones de producción de cacao Nacional (tabla 2), esta selección se realizó con la ayuda de la Corporación Alemana (GÍZ) Amazonia Norte localizada en la provincia de Napo, cantón Tena. Como indica la tabla 2.

FINCA	PROPIETARIO	CANTON	PARROQUIA	SECTOR	EDAD	COORDENADAS GEOGRAFICAS	
1	Sr. Carlos Pozo	Tena	Ahuano	Colonia Bolívar	7 años	77°34"19' O	1°3"20' S
2	Sr. Cesar Dahua	Tena	Ahuano	Ahuano	8 años	77°34"17' O	1°4"1' S
3	Sra. Serafina Grefa	Archidona	Archidona	San Pablo	6 años	77°51"26' O	0°56"20' S
4	Sra. Norma Tanguila	Archidona	Archidona	Centro Shiguango	12 años	77°46"11' O	0°50"0' S
5	Sra. Mariana Rodríguez	Arosemena Tola	Arosemena Tola	Arosemena Tola	7 años	77°53"12' O	1°14"23' S

Tabla 2 Fincas en las que se realizó la recolección de las mazorcas de cacao.

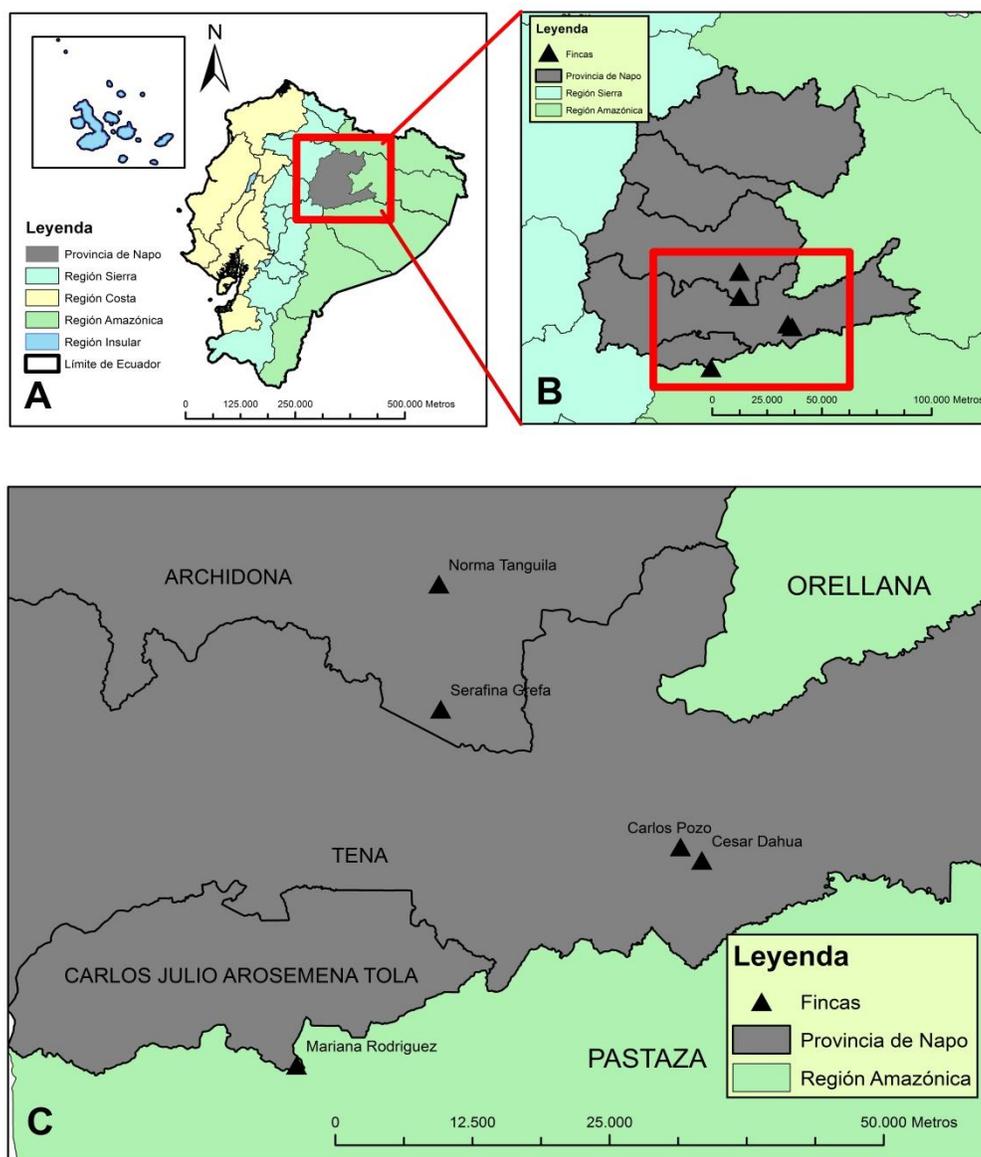


Figura 4 Ubicación de las fincas que se recolectaron las mazorcas con síntomas de la enfermedad.

3.7.2. Colecta de muestras

El trabajo de campo se inició con la recolección de 20 mazorcas por finca mediante un muestreo sistemático, que presentaban síntomas de la enfermedad, de acuerdo con los criterios de Ayala (2008), donde la presencia de pequeñas manchas de un color que sugiere una maduración prematura en mazorcas que aún no han alcanzado su desarrollo completo, frutos que en la superficie

mostraron manchas pardas rodeadas por una zona de transición de color amarillento. En cuanto a los signos sobre la superficie se observó una especie de felpa dura y blanca de micelio de *M. roreri*, sobre la cual se produjera gran cantidad de conidios que dan a la masa un color crema o marrón claro y mazorcas que presentaron deformaciones o abultamientos, fueron seleccionadas en cada zona de estudio. (Figura 5)



Figura 5 Mazorcas de cacao mostrando diferentes síntomas de la enfermedad, a) Micelio sobre la superficie de color blanco con borde irregular, b) manchas café con borde irregular donde va avanzando la enfermedad, c) Mancha color café con pequeña presencia de micelio del hongo. Mazorcas recolectadas en la finca del sector Colonia Bolivar del Señor Carlos Pozo.

Las mazorcas se recolectaron en fundas de papel Kraft, que fueron trasladadas al laboratorio, donde se tomaron fotos, se separaron según sus síntomas y codificadas de acuerdo a la finca de procedencia para su fácil manejo e identificación.

Con un sacabocado se obtuvo segmentos de mazorca con parte enferma y sana. Se colocaron las muestras en un Erlenmeyer de 500 ml para lavarlas con agua corriente durante 5 minutos utilizando un tamiz metálico, los fragmentos fueron desinfectados en agitación continua con alcohol al 70% durante 3 minutos y nuevamente agitados en el Erlenmeyer con agua estéril por 2 minutos y luego colocados en una cámara húmeda (caja Petri con papel filtro), también se realizó la desinfección en agitación continua con agua estéril durante 3 minutos antes de ser colocados en una cámara húmeda. Asimismo, se tomaron segmentos de mazorca que presentaban crecimiento micelial de color blanco y con esporulación de color crema en estos segmentos, los mismos se colocaron directamente en la cámara húmeda sin ser desinfectados previamente. (Figura 6).



Figura 6 Desinfección de las mazorcas recolectadas y montaje de cámara húmeda para un posterior aislamiento

Los segmentos ya debidamente desinfectados y colocados en la cajas Petri se identificaron acorde con la siguiente clasificación Pn (pequeños puntos

necrosados), Lg (lesiones puntiformes), Lgp (lesiones grasientas de color pardo, gris o negras) y Cs (conidios sobre la superficie) estas muestras se las dejó a la intemperie por unos 5 días aproximadamente, transcurrido este tiempo se identificaron los hongos filamentosos por medio del examen bajo el microscopio clínico (MOTIC) y luego se los aisló, con la ayuda de una asa previamente esterilizada. Bajo el microscopio estereoscópico (MOTIC) se realizó la siembra directa en la caja Petri que contenían el medio de cultivo semi sólido PDA con una dosis de 39 gr en 240 ml de agua destilada y 10 ml de Gentamicina, una vez realizada la siembra se colocaron en la cámara de luz negra para inducir su esporulación durante 15 días para la identificación de las estructuras morfológicas (conidios y conidióforos) eligiéndose el mismo cultivar para cada aislamiento acorde a lo referido por Johnson, *et al.*, (1946). Para la observación de las estructuras morfológicas se usó un microscopio clínico, con un aumento de 1000. (Figura 7)



Figura 7 Identificación y siembra en medio PDA.

Para el establecimiento de las cepas, se tomaron conidios individuales los cuales fueron colocados en placa Petri que contenían 10 ml del medio de cultivo PDA y se incubaron a 25°C durante 15 días, transcurrido este tiempo se seleccionaron las que tenían *M. roleri*.

La identificación de los aislamientos se realizó morfológicamente, utilizando las claves taxonómicas de Phillips, *et al.*, (2006) y Evans (1981).

Se tomaron 10 muestras de cada finca cuyas mediciones se hicieron por duplicado a nivel de laboratorio para comenzar la caracterización cultural, morfológica y fisiológica, a los 21 días, se observaron nuevamente en el microscopio clínico y se identificaron las cepas de *M. roleri*. Esta identificación se realizó de acuerdo a la finca, propietario y sector de procedencia de las mazorcas recolectadas. Las colonias fueron purificadas realizando repiques consecutivos en cajas Petri con medio semi sólido PDA, debido a que se evidenció cepas contaminadas por lo cual se realizó una nueva identificación, para el reconocimiento de cada uno de los aislados asignándoles un nuevo código de acuerdo a la finca proveniente.

Tabla 3 Codificación de las cepas proveniente de las fincas.

FINCA	CODIGO DE LA CEPA
Finca 1	CC-UEA-Mr1
Finca 2	CC-UEA-Mr2
Finca 3	CC-UEA-Mr3
Finca 4	CC-UEA-Mr4
Finca 5	CC-UEA-Mr5

Los aislamientos purificados fueron almacenados en incubadora a 26°C, durante 15 días.

3.7.3. Caracterización de los aislamientos de *M. roreri*.

Este estudio se realizó con el objetivo de caracterizar los diferentes aislados de *M. roreri* mediante la comprobación de los caracteres culturales, morfológicos y fisiológicos acorde con los criterios establecidos por Phillips-Mora (2006) y Evans (1987).



Figura 8 Aislamiento de *M. roreri*

3.7.4. Caracterización cultural

La caracterización cultural se realizó por medio de un análisis cualitativo y cuantitativo. Se evaluó el crecimiento diario de los aislados de *M. roreri* en medio de cultivo PDA acorde a lo referido por Evans (1987) y Phillips-Mora (2006) se describieron las características culturales como: Velocidad del crecimiento del micelio, color del micelio, color del reverso de la caja Petri de la cepa que contenía el micelio, presencia o no de líquidos de transpiración.

Se repicó cada aislado de *M. roreri* en cajas Petri que contenían 10 ml de PDA con una dosis de 39 gr en 240 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 5.6 y se adiciono 10 ml de Gentamicina. Se incluyeron siete repeticiones por aislado, estas se mantuvieron a 26°C en la incubadora hasta que la caja estuvo completamente cubierta.

Las mediciones fueron registradas diariamente. Se tomó el crecimiento de las cepas de *M. roreri*. Se determinó por observación visual el color del micelio, color de reverso de la placa, presencia de líquido transpirado, presencia de cristales, elevación del micelio (mm) de las colonias por cada aislado diariamente con la ayuda del calibrador pie de rey. El color de la superficie de las colonias se determinó también por observación visual.

El parámetro color demostró tonalidades de blanco a crema hasta café oscuro, se calificó siguiendo lo especificado en trabajos realizados por Villamil, *et al.*, (2012).



Figura 9 Medición características culturales

3.7.5. Caracterización morfológica

Se repicaron las cepas en medio de cultivo semi sólido V8MAA el cual se compone de agar 10 gr, CaCO₃ 1,5 gr, maltosa 5 gr, jugo V8 5 ml, esto se aforó a 500 ml de H₂O destilada, la solución se trasvaso a un Erlenmeyer de 1000 ml para la esterilización en la autoclave a 121°C y 1 atm por 15 minutos, según Phillips - Mora, *et al.*, (2006) y Villavicencio (2010).

Se realizaron tres réplicas por cepa que fueron colocadas en la incubadora a temperatura de 26°C durante 15 días según lo considerando por otros autores que han utilizado este medio Phillips-Mora, *et al.*, (2006) y Villavicencio (2010).

A partir de los 15 días se iniciaron las evaluaciones con el microscopio clínico invertido, se tomaron imágenes digitales con la cámara (software MOTIC IMAGES PLUS 2.0 ML, modelo MULTI LANGUAGE Versión) se usó un aumento de 1000, mediante esta técnica se determinaron las dimensiones (μm) de conidios y conidióforos.

Para la caracterización morfológica se observaron los microcultivos de cada aislado y se tuvieron en cuenta los criterios descritos por Evans (1987), para la identificación morfológica, se midió el largo y ancho por la zona más gruesa (μm) de 15 estructuras tomadas completamente al azar de cada una de las cepas.

Para el conteo de las conidios se adicionó 10ml de agua estéril por cepa en cada caja Petri, inmediatamente después de depositar el agua en el medio de cultivo, las cajas se agitaron en forma circular, en el sentido y en contra de las manecillas de reloj, hasta que la suspensión se dispersó completamente en el medio, se

tomaron 20 µl con la pipeta y se colocaron en la Cámara de Newbauer, para determinar la caracterización final de conidios por ml. La fórmula para el cálculo de la concentración utilizada fue utilizada fue la reportada por Bastidas, 2009.

$$C = \frac{\text{número de celda} * 10000}{\text{numeros de cuadros} * \text{disolución}}$$



Figura 10 Medición de características morfológicas

3.7.6. Características fisiológicas

3.7.6.1. Influencia de pH en el crecimiento de micelial de *M. royeri*.

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar la influencia del pH de incubación sobre crecimiento de *M. royeri*.

Se utilizó un medio líquido compuesto por Caldo de Papa Dextrosa (PDB Cod: 254920) con una dosis de 3,6 gr en 150 ml de agua destilada, que se dispensó en

un Erlenmeyer de 500 ml y esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atm por 15 minutos. En este medio se sembraron discos de micelio con la ayuda de un sacabocados de 4 mm de diámetro, el ajuste del pH se realizó antes de esterilizarlo, se modificaron con NaOH con una concentración de 0,001 Molar, manejándose un rango de pH desde 4 a 7,5 con una escala de 0,5 entre pH, se realizaron 5 réplicas por cada cepa se mantuvo en la incubadora a una temperatura de 26°C durante 21 días. Posteriormente se cosecho el micelio y se determinó la masa fresca y la masa seca del micelio de la cepa.



Figura 11 Cepas del pH para determinar su influencia sobre el crecimiento micelial de *M. roreri*.

3.7.6.2. Influencia de la temperatura en el crecimiento micelial de *M. roreri*.

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar la temperatura de incubación más favorable para el mejor crecimiento de *M. roreri*.

Se utilizó el medio de cultivo semi sólido PDA similar a los procedimientos anteriores, con 3 réplicas por cada cepa, las cuales fueron mantenidas a una temperatura de 5 °C en el congelador del refrigerador, entre 10 °C y 15 °C en la parte inferior del refrigerador, mientras que en la incubadora fueron colocadas en el rango térmico de 20 °C, 25 °C y 30 °C y en la estufa fueron incubadas a 35 °C evaluando su crecimiento mediante la observación diaria de las cepas.

Las temperaturas determinadas en cada equipo fueron monitoreadas por un periodo de 15 a 20 días para seleccionar la zona óptima de conservación de las cepas, estas temperaturas fueron evaluadas mediante la utilización de termómetros, hasta estar seguros que las zonas seleccionadas correspondían a las temperaturas planificadas para el ensayo.



Figura 12 Diferentes temperaturas utilizadas acorde con la posición del refrigerador.

3.7.6.3. Influencia de diferentes condiciones de iluminación en el crecimiento micelial de *M. royeri*.

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar las condiciones de iluminación favorables para el crecimiento de *M. royeri*.

Se repicaron las cepas en medio de cultivo semi sólido PDA con una dosis de 39 gr en 240 ml de agua destilada y 10 ml de Gentamicina, con 3 réplicas de cada cepa las cuales fueron evaluadas en condiciones de iluminación con luz blanca para ello se colocaron las cepas en un cajón con una lámpara de 200W, mientras que para la luz negra se colocó una lámpara modelo BLB40W 120V en la cámara de esporulación. La oscuridad se evaluó en la estufa apagada y el fotoperiodo se determinó dentro del laboratorio, las cepas fueron medidas diariamente hasta que el micelio complete su crecimiento en la caja Petri.

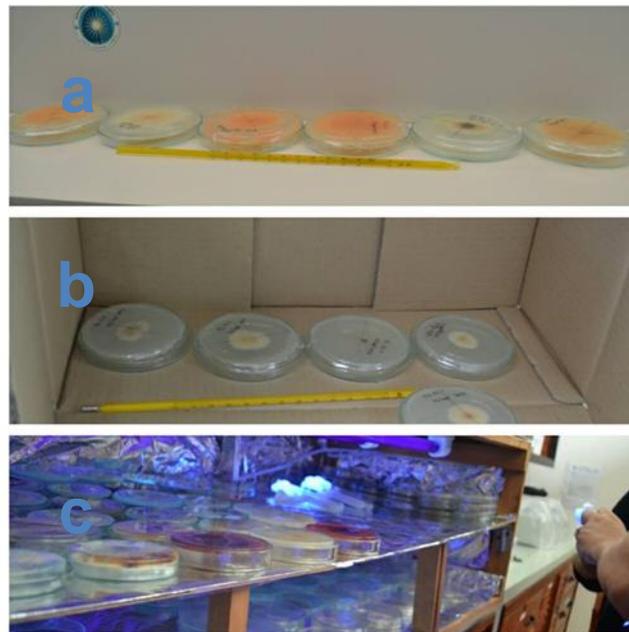


Figura 13 Diferentes condiciones de iluminación, a) fotoperiodo, b) luz blanca y c) luz negra.

Capítulo IV

4. Resultados y discusión

Se obtuvieron aislados correspondientes a la especie *M. roreri* (tabla 4) además se identificaron los géneros de hongos anamorfos: *Cylindrocladium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. y *Moniliophthora roreri* (Figura 14); los cuales presentaron las mismas características durante el desarrollo, concordando con lo reportado por Suárez (2004).

Tabla 4 Identificación de cepas *M. roreri*.

Código	Resultados
CC-UEA-Mr1	<i>Moniliophthora</i> sp.
CC-UEA-Mr2	<i>Fusarium</i> sp. <i>Colletotrichum</i> sp.
CC-UEA-Mr3	<i>Moniliophthora</i> sp.
CC-UEA-Mr4	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Cylindrocladium</i> sp.
CC-UEA-Mr5	<i>Moniliophthora</i> sp.

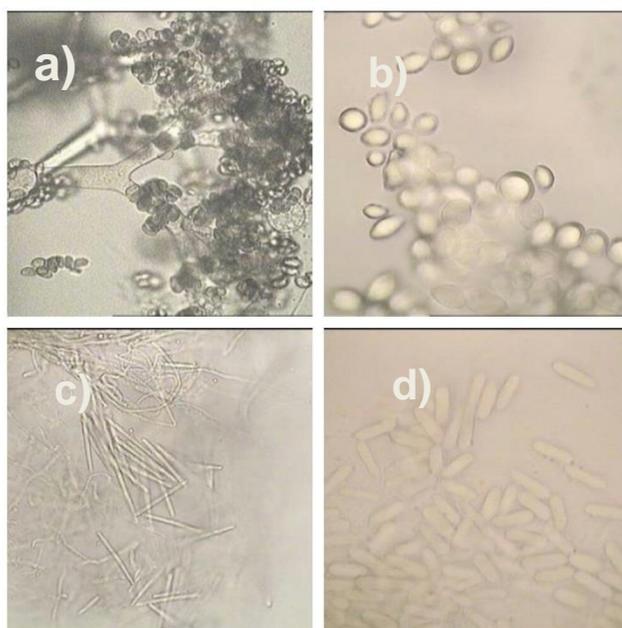


Figura 14 Géneros de hongos anamorfos aislados a partir de síntomas típicos de *M. roreri*. a) *Aspergillus*, b) *Moniliophthora*, c) *Cyindrocladium* y d) *Colletotrichum*.

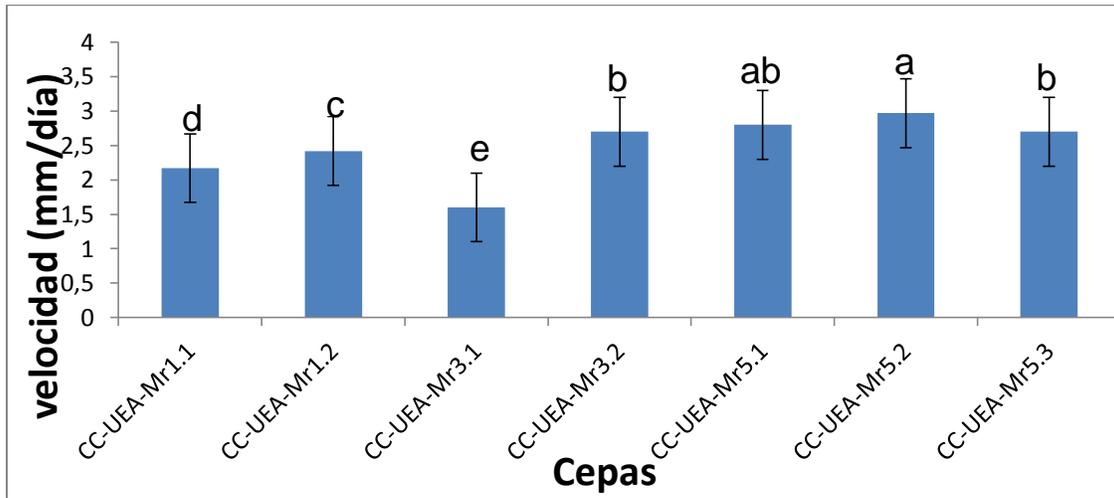
4.1. Características culturales

Las características culturales de las cepas fueron similares para todos los aislados en el medio de cultivo PDA coincidiendo con las referencias de otros autores que han utilizado este medio Philips-Mora (2006).

4.1.1. Crecimiento micelial de las cepas de *M. roreri*

La velocidad de crecimiento micelial de los aislados fue 2,48 mm/día aproximadamente, (Gráfico 1). La cepa CC-UEA-Mr5.2 y CC-UEA-Mr5.1 presentaron un mayor crecimiento diario, seguidas de las cepas CC-UEA-Mr3.2 y CC-UEA-Mr5.3 quienes mostraron un crecimiento similar entre sí, difiriendo significativamente con las demás cepas.

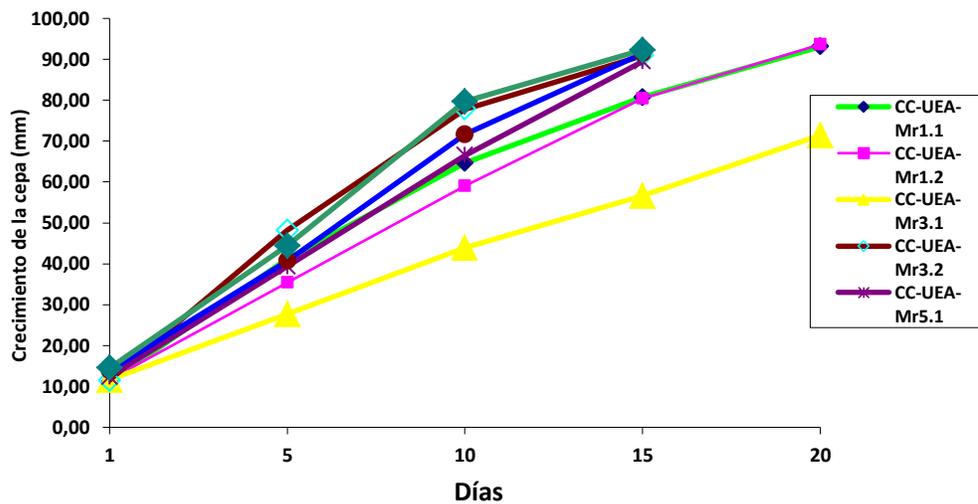
Grafico 1 Comportamiento de la velocidad de crecimiento radial de *M. royeri* en medio PDA.



Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $<0,05$

Existen diferencias significativas en el crecimiento micelial en mm de las cepas, siendo las cepas CC-UEA-Mr3.2, CC-UEA-Mr5.1, CC-UEA-Mr5.2 y CC-UEA-Mr5.3 las que alcanzaron mayor crecimiento a los 15 días con relación a las demás (Gráfico 2).

Grafico 2 Comportamiento de crecimiento de *M. royeri* en medio semi sólido



Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $<0,05$.

Coincidiendo con los resultados informados por Philips-Mora (2006) y Villavicencio (2010). Los cuales difieren de los obtenidos por Villamil, *et al.*, (2012) quienes demostraron que *M. roreri* a los tres días de incubación presentó una velocidad de crecimiento más lenta pues sus aislados cubrieron toda la caja Petri a los 48 días.

4.1.2. Color del micelio de la cepa y el reverso de la caja Petri de *M. roreri* en medio semi sólido PDA.

Inicialmente las tonalidades de los colores observados en las cepas fueron característico de *M. roreri*, apreciándose una considerable variabilidad, pues se detectaron colores como: blanco, durazno hasta el café oscuro, debido a la formación masiva de conidios con masa conidial pulverulenta similar a lo descrito por Evans (1987). No se observó pigmentación en el medio de cultivo semi sólido (PDA) en ninguna de las cepas evaluadas. En todos los casos las colonias de las cepas crecieron en forma radial con bordes regulares (Gráfico 3)

Las tonalidades de los colores del micelio observadas en las cepas variaron según los días de crecimiento (Gráfico 4). Las colonias de las cepas provenientes de la finca de Arosemena Tola CC-UEA-Mr5.2 y CC-UEA-Mr5.3 presentaron la tonalidad de durazno en el micelio y en el reverso. Las cepas obtenidas en las parroquias Ahuano y Archidona presentaron mayor variabilidad en la tonalidad de colores siendo la cepa CC-UEA-Mr3.2 quien presento las tonalidades de blanco a durazno y café en el micelio y el reverso, coincidiendo con la cepa CC-UEA-Mr1.2

con las tonalidades del reverso. La cepa CC-UEA-Mr1.1 y CC-UEA-Mr3.1 presentaron las tonalidades de blanco y durazno al reverso.

Las cepas mostraron considerable variabilidad cultural en cuanto a las tonalidades de colores del micelio y del reverso de la caja Petri, que variaron desde el blanco, durazno hasta el café, por lo que este parámetro no es un buen marcador cultural para diferenciar fenotipos entre cepas.

Tabla 5 Color de cepas de *M roreri* los 10 días de crecimiento en PDA

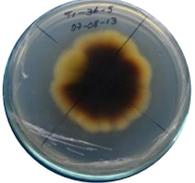
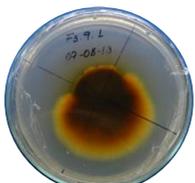
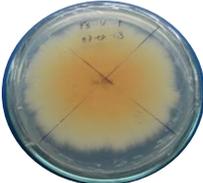
Código de la finca	Color del micelio	Color del Reverso de la caja Petri de la cepa
CC-UEA-Mr1.1		
CC-UEA-Mr1.2		
CC-UEA-Mr3.1		
CC-UEA-Mr3.2		
CC-UEA-Mr5.1		
CC-UEA-Mr5.2		
CC-UEA-Mr5.3		

Grafico 3 Color del micelio de las cepas de *M.roreri* en medio semi sólido PDA.

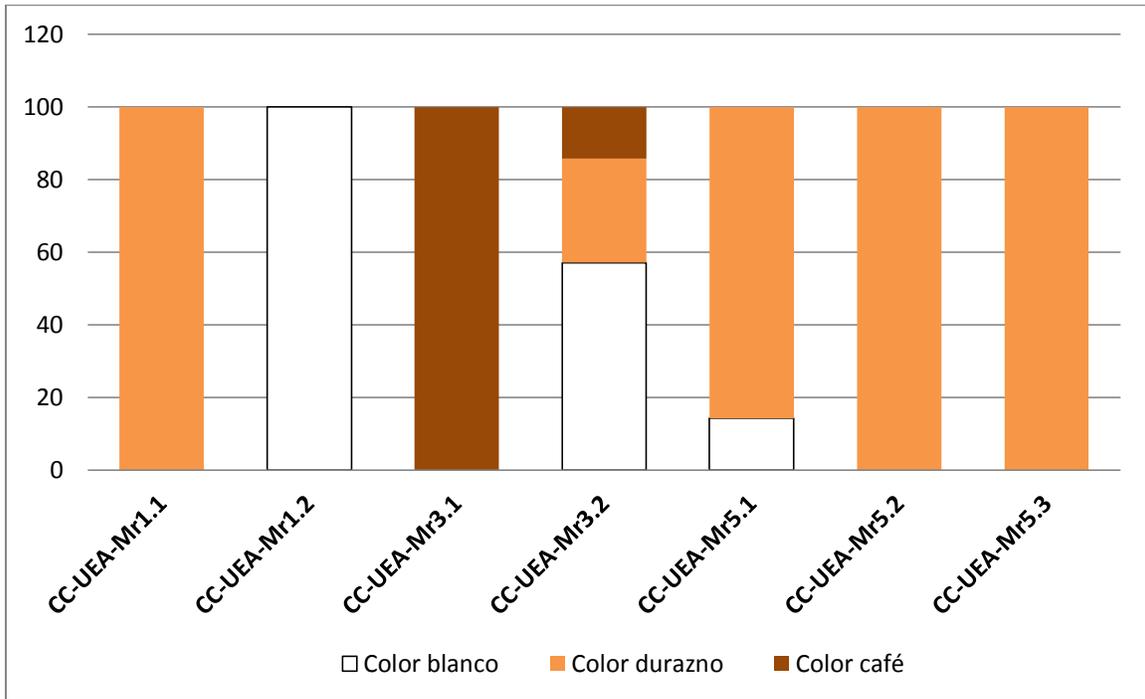


Gráfico de frecuencia, Estadística descriptiva

Grafico 4 Color del reverso de la caja Petri de las cepas de *M.roreri* en medio semi sólido PDA.

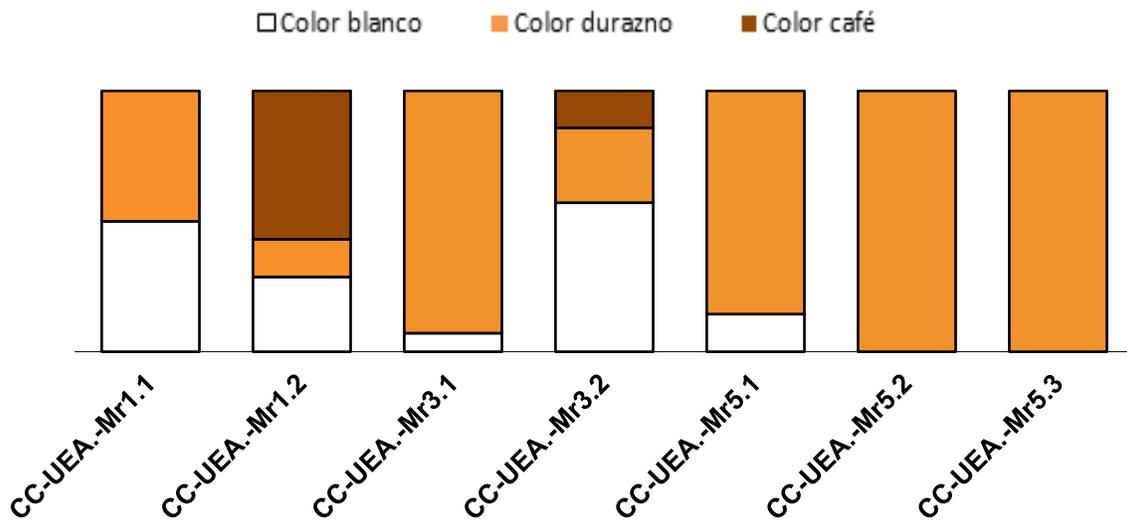


Gráfico de frecuencia, Estadística descriptiva

4.1.3. Bordes y Texturas

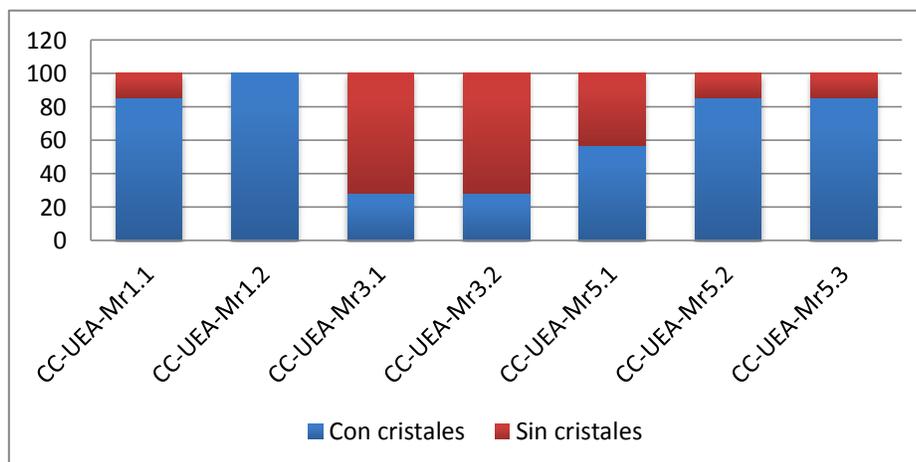
Todas las cepas al finalizar su crecimiento presentaron borde regular y textura pulverulenta, característica descrita por Phillips-Mora (2006). Al igual el micelio fue aterciopelado, superficial y compacto. Debido a la homogeneidad no se encontró diferencia significativa entre cepa.

4.1.4. Presencia de cristales y liquido de transpiración en *M. roreri*

En todas las cepas se observó la presencia de líquido de transpiración variando aunque en cantidades de pequeñas gotas muy frecuentes y gotas de mayor tamaño, menos frecuentes. En todos los casos fueron transparentes los líquidos transpirados.

Todas las cepas presentaron cristales durante su crecimiento, considerando que en la cepa CC-UEA-Mr1.2 se observaron cristales durante todo el crecimiento. Para la cepa CC-UEA-Mr3.1 los cristales se apreciaron en los primeros días de crecimiento con una frecuencia del 20%, de igual manera se evidencio en la cepa CC-UEA-Mr3.2; para el resto de cepas posee un valor intermedio.

Grafico 5 Presencia de cristales en cepa de *M. roreri*



4.1.5. Elevación de micelio en *M. royeri*.

Todas las cepas presentaron elevación en las colonias, considerando que en la cepa CC-UEA-Mr5.1 la elevación fue aumentando progresivamente de 0 a 2 mm con una frecuencia de 30%, de 2 a 6 mm con una frecuencia de 40% y de 6 a 10 mm con una frecuencia de 30%. Para la cepa CC-UEA-Mr3.1 la elevación fue de 2 a 6 mm con una frecuencia de 90% y de 6 a 10 mm con una frecuencia de 10%; para el resto de cepas la elevación posee un valor intermedio.

Gráfico 6 Elevación de micelio de cepas *M. royeri* en PDA a los 21 días

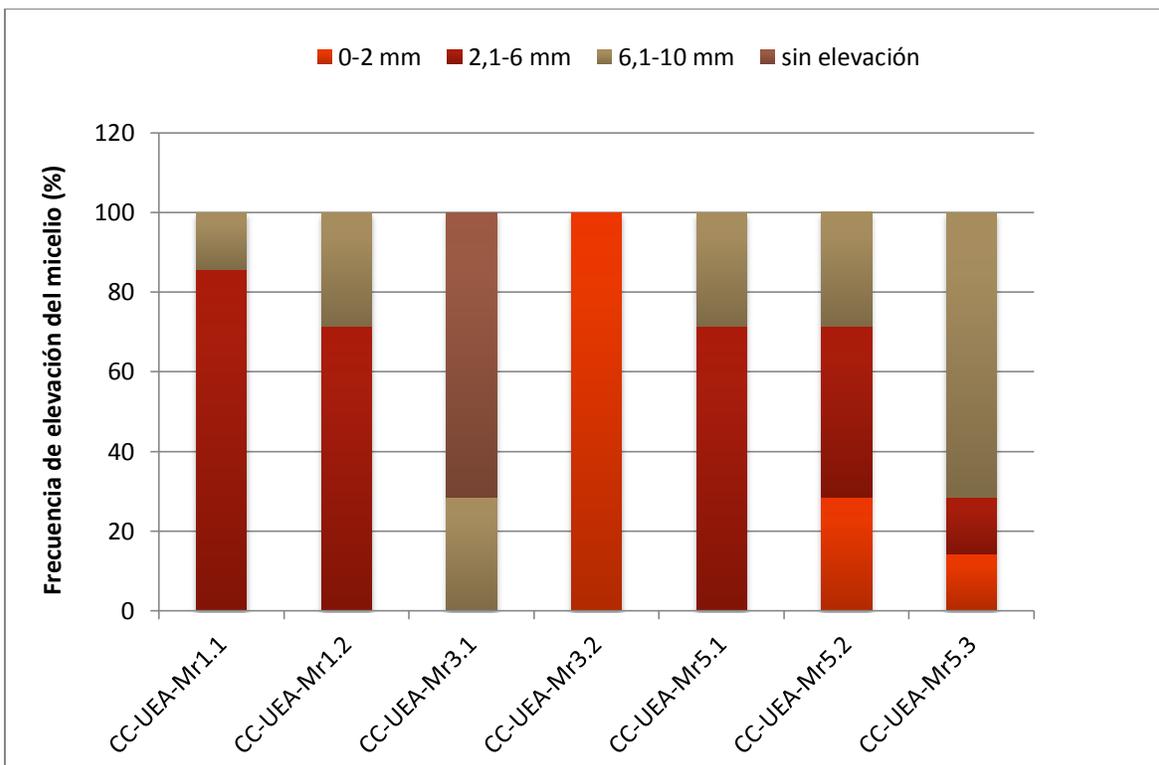


Gráfico de frecuencia, Estadística descriptiva

M. royeri es un hongo variable respecto a sus características culturales, considerando el predominio de los conidios como estructuras infectivas en condiciones naturales (Evans, *et al.*,2003). Durante el desarrollo de la enfermedad

se encuentran dos fases siendo la primera fase biotrófica y la segunda la fase hemibiotrófica (Tiburcio, *et al.*, 2010), lo cual implica una amplia variabilidad genética debido a que dichas estructuras son el resultado del proceso de reproducción (Evans, *et al.*, 2003) donde tiene lugar eventos recombinatorios producto del ciclo parasexual de los hongos anamorfos y a la recombinación meiótica que ocurre en el mismo. Este evento de variación genética, puede explicar las diferencias observadas respecto a los caracteres culturales de *M. roreri*.

4.2. Características morfológicas

Las características morfológicas de las colonias fueron similares para todos los aislados en el medio de cultivo semi sólido V8MAA, coincidiendo con los resultados de otros autores que lo han utilizado, Philips-Mora (2006), Villavicencio M. (2010).

M. roreri, creció rápidamente en medio de cultivo semi sólido V8MAA. Las cepas alcanzaron un diámetro de 60-80 mm a los 15 días después de sembrarlas, las tonalidades de los colores observados en las cepas tiene una considerable variabilidad ya que fueron: blanco a crema-durazno debido a la formación de conidios, con aspecto pulverulento similar a lo descrito por (Philips-Mora 2006), las cepas crecieron en forma circular y con bordes regulares (Figura 16). Características similares a las cepas que crecieron en medio de cultivo PDA.

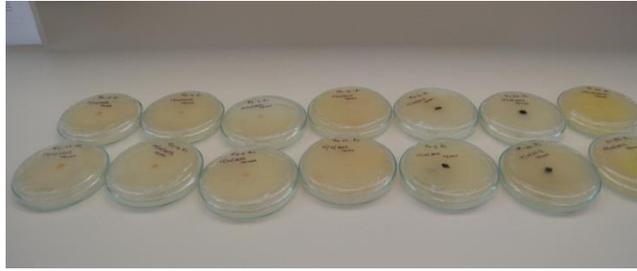


Figura 15 Cepas con medio de cultivo V8MAA

Las hifas fueron hialinas, con paredes delgadas, septadas y algunas veces levemente irregular, raramente ramificadas. Los conidióforos fueron ramificados dando lugar a cadenas maduras de conidios. Los conidios fueron fácilmente separables y con paredes gruesas similares a lo informado por Evans, *et al.*, (1987).



Figura 16 Hifas, conidios y conidióforo de la cepa CC-UEA-Mr1.1. Microfotografía con un aumento de 1000

4.2.1. Formas de conidios y número de conidios por cepa

La mayoría de las cepas produjeron conidios globosos, subglobosos y elípticos (Figura 18,19 y 20).

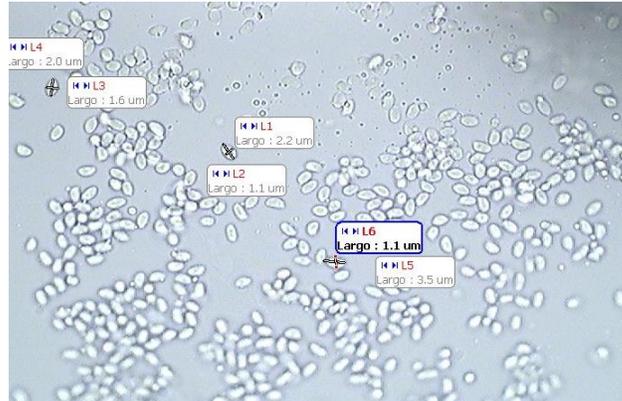


Figura 17 Cepa CC-UEA-Mr1.1, conidios subglobosos. Microfotografía con un aumento de 1000.



Figura 18 Cepa CC-UEA-Mr1.2 conidios elípticos. . Microfotografía con un aumento de 1000.



Figura 19 Cepa CC-UEA-Mr5.3, conidios globosos. Microfotografía con un aumento de 1000.

La forma de las conidios obtenidos en el medio de cultivo semiólido V8MMA, coincidieron con lo reportado por Evans (1987).

La concentracion de esporas evaluadas a las 15 dias de sembrarlas en 10 ml de agua destilada fue de $4,604 \times 10^6$ en la cepa CC-UEA-Mr1.1.

4.2.2. Tamaño de conidiofóros y conidios: largo y ancho

Las características de las conidios y conidiofóros de las cepas se correspondieron con las descritas por Evans (1987) para la especie de *M. roreri*.

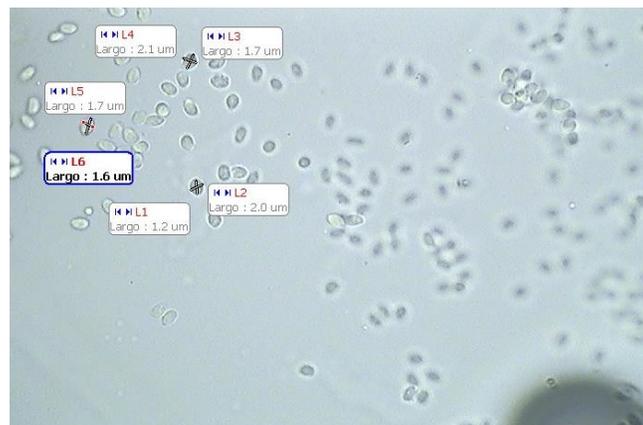


Figura 20 Conidios de *M. roreri* producidos en medio de cultivo semi sólido V8MAA, a los 15 días de incubación a 26°C.

El ancho promedio de los conidios en todos los aislados fue de 1,69 µm. Sin embargo, Evans (1987), describió valores entre 8-15 µm. En la tabla 6 se muestra caracteres como longitud de los conidios y conidiofóros de todos las cepas obtenidas. Los valores medios no coincidieron con los descritos por la literatura citada anteriormente.

Su puede observar diferencias entre cepas en cuanto a la longitud de los conidios y conidiofóros. Esta se manifestó con independencia del lugar de

procedencia ya que cepas de una misma localidad difirieron significativamente. Los valores extremos en las dimensiones de los conidióforos estuvieron dados por las cepas CC-UEA-Mr1.1 (11,12 μm) y CC-UEA-Mr5.2 (8,27 μm). Villavicencio (2010), determinó que los conidios maduros de *M. roreri* (obtenidos *in vitro*), variaron en la longitud y ancho.

Tabla 6 Tamaño de los conidióforos y conidios

Cepa	Conidióforos		Conidios	
	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Largo (μm)	Ancho (μm)
CC-UEA-Mr1.1	11.12	1.90 a	2.75	1.36 b
CC-UEA-Mr5.1	7.50	1.60 b	3.17	1.92 a
CC-UEA-Mr5.2	8.27	1.97 a	2.62	1.64 ab
CC-UEA-Mr5.3	6.72	1.60 b	2.97	1.83 a



Figura 21 Conidióforo de *M. roreri* en medio de cultivo semi sólido V8MMA a los 15 días de incubación a 23°C. Microfotografía con una magnificación de 200X, de la cepa CC-UEA-5.3.

4.3. Características fisiológicas

4.3.1. Influencia de la temperatura de incubación en el crecimiento micelial de *M. roreri*

Al evaluar el crecimiento micelial en PDA utilizando seis temperaturas de incubación diferentes se determinó que en las temperaturas de 20°C a 30°C se observó la presencia de micelio de *M. roreri*, sin embargo, a la temperatura de 25°C, el crecimiento micelial obtenido fue superior. Este resultado resalta la importancia de conocer la temperatura de incubación favorece el crecimiento micelial en condiciones controladas, catalogándolo como un patógeno psicrófilo facultativo.

Para la producción *in vitro* de micelio de *M. roreri* se ha utilizado diferentes temperaturas de incubación, Villamil, *et al.*, (2012) obtuvieron un crecimiento micelial con el empleo del medio de cultivo PDA a 25°C, que coinciden con los resultados de esta investigación.

En base a este resultado, se seleccionó la temperatura de 26°C para el desarrollo del resto de los experimentos.

4.3.2. Influencia de diferentes condiciones de iluminación en el crecimiento micelial de *M. roreri*

En todas las condiciones de iluminación utilizadas, se observó un crecimiento micelial de *M. roreri*. Sin embargo, la producción de micelio que se obtuvo en oscuridad fue superior con diferencias significativas respecto a las demás tipos condiciones de iluminación evaluadas (tabla 6).

Respecto a las diferentes condiciones de iluminación utilizadas en este estudio en la literatura científica consultada, no existen trabajos debido a que mayormente han manejado solo la temperatura de incubación más no las condiciones de iluminación.

Este resultado de igual modo indicó la necesidad de considerar el factor de iluminación pues tiene influencia sobre el crecimiento de micelio en condiciones controladas.

Tabla 7 Crecimiento micelial de la cepa CC-UEA-Mr5.1 en diferentes condiciones de iluminación.

Condiciones de iluminación	Crecimiento micelial (mm)
Fotoperiodo	1,81 b
Luz blanca	0,62 c
Luz negra	1,16 bc
Oscuridad	2,61 a
EE	± ,844

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren según la Prueba de Tukey HSD para $0,05$

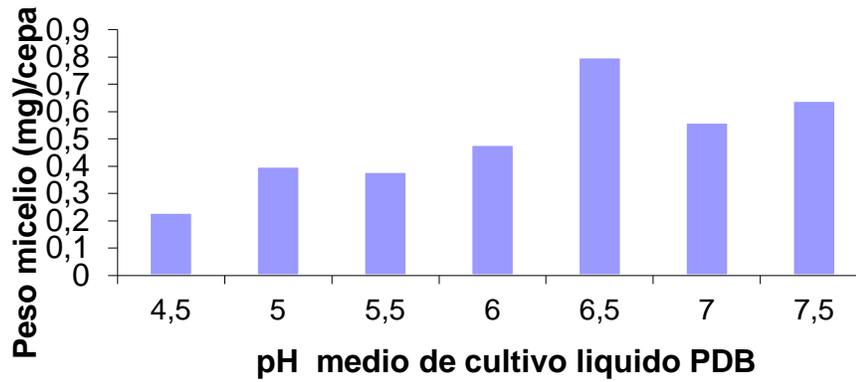
4.3.3. Influencia de diferentes pH en el crecimiento micelial de *M. roreri*.

El rango entre 4,5 a 7 de los pH utilizados, se observó el crecimiento micelial de *M. roreri*, Sin embargo los mayores valores se apreciaron en el pH 6,5 seguido por los pH 7,5, los cuales tuvieron diferencias significativas con los otros valores evaluados en la cepa CC-UEA-Mr5.3 (Gráfico. 8).

En condiciones controladas *M.roreri* crece y esporula fácilmente con un rango de pH entre 4,5 a 7, 5. Para el desarrollo micelial el pH está entre 5,0 y 6,5; mientras

que para la formación de conidios requiere pH 7,5. Para este parámetro no se reportan resultados con los cuales se pueda hacer una comparación.

Grafico 7Crecimiento micelial de la cepa CC-UEA-Mr5.1 en diferentes pH



Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $<0,05$.

Capítulo V

5. Conclusiones

- Se obtuvieron siete aislados cuyas características culturales, morfológicas y fisiológicas se correspondieron con la especie *M. roreri*.
- En la caracterización cultural de *M. roreri* no se encontró diferencia en cuanto a borde y textura de las colonias.
- De las cepas investigadas cuatro de ellas demostraron crecimiento óptimo en medio semi sólido PDA a los 15 días con una velocidad de crecimiento radial de 2,48 mm/día, sus elevación variaron de 0 a 10mm.
- Los colores observados en cada una de las cepas de *M. roreri* variaron según los días de crecimiento, a pesar de esta característica, no se debe considerarse como un parámetro para diferenciar fenotipos entre cepas debido a que esta especie reporta una gran variabilidad.
- Se observó conidios globosos, subglobosos y elípticos en las cepas de *M. roreri* y variación en el tamaño que evidencia heterogeneidad entre cepas.
- Las cepas CC-UEA-Mr5.1; CC-UEA-Mr5.2 y C-UEA-Mr5.3 son las que mayor crecimiento y desarrollo presentaron durante la investigación siendo cepas de una misma finca ubicada en Arosemena Tola, considerando que la incidencia de la enfermedad en dicha plantación se encontraba en niveles altos.
- Con la caracterización cultural, morfológica y fisiológica de *M. roreri* se podrá contar con una colección de aislados que serán de gran utilidad para apoyar programas de mejoramiento genético del cacao en la búsqueda de

genotipos resistentes al agente causal de la moniliasis en los cacaotales amazónicos.

6. Recomendaciones

- Realizar pruebas de caracterización patogénica y molecular que permita identificar la variación genética y la agresividad entre los aislamientos.
- Continuar con las investigaciones para lograr obtener una colección de aislados monospóricos de *M. rozeri* procedentes de la Amazonia.
- Acondicionar el laboratorio para facilitar y optimizar el desarrollo de investigaciones futuras y que estas prosigan sin dificultades.

7. Resumen

El presente trabajo constituye el primer reporte sobre el estudio de la caracterización cultural, morfológica y fisiológica *in vitro* en la región Amazónica del Ecuador del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans, *et al.*, agente causal de la Moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). A partir de mazorcas recolectadas en 5 fincas de producción de cacao Nacional orgánico ubicadas en la provincia de Napo, cantón Tena, parroquias Ahuano, Archidona y Arosemena Tola, pertenecientes a la Asociación Kallari .Se realizaron aislamientos que fueron evaluados e identificados mediante caracterización cultural (velocidad de crecimiento, color del micelio, color del reverso de la caja Petri de la cepa, presencia de líquidos de transpiración), morfológica (tamaño de conidios y conidióforos, forma y conteo de conidios) y fisiológica (Influencia de temperatura, pH y las condiciones de iluminación sobre el crecimiento micelial de *M.roreri*) con la finalidad de contar con un banco de aislados monosporicos para el control biológico en futuras investigaciones. Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Biología de la Universidad Estatal Amazónica. Para los ensayos se utilizaron medios de cultivo semi sólido (PDA y V8MAA) y medio de cultivo líquido PDB. No se encontraron diferencias culturales en el borde y textura de las colonias entre las cepas, pero sí variaciones en su coloración, con colores de blanco, durazno a café. También el tamaño y la forma de conidióforos y conidios presentaron diferencias, distinguiéndose conidios globosos, subglobosos y elípticos. Se determinó la temperatura óptima para el desarrollo de *M. roreri* siendo de 25°C, al igual que el pH de 6,5 para la formación de conidios y la condición de

iluminación adecuada que requiere para su crecimiento, como es el caso de oscuridad. Se observaron variaciones en cuanto al crecimiento de las colonias en los diferentes aislados, independientemente de su procedencia.

8. Summary

The aim of paper was to study cultural, morphological and physiological of characterization in the Amazon region of Ecuador *Moniliophthora roreri* fungus (Cif & Par) Evans, et al., Causal agent of Moniliasis cacao (*Theobroma cacao* L.). From cobs harvested at five farms producing organic Nacional cacao located in the province of Napo, Canton Tena, parishes Ahuano, Archidona and Arosemena Tola, belonging to the Kallari Association. Isolates were assessed and identified by culture characterization were performed (growth rate, color mycelium, reverse color, liquid perspiration), morphology (size of conidia and conidiophores conidia form and count) and physiological (Influence of temperature, pH and the lighting conditions on mycelial growth) order to initiate the characterization of fungal colonies in the region and have a bank isolated. These experiments were performed in the laboratory of Biology, Universidad Estatal Amazonica. For assays semisolid culture media (PDA and V8MAA) and PDB liquid medium were used. No cultural differences in the edge and texture of colonies between strains, but changes in coloration, with shades of white, peach coffee found. Also the size and shape of conidiophores and conidia showed differences, distinguishing globose, subglobose, elliptical conidia. The optimum temperature for development of *M. roreri*, as the pH for the formation of conidia and the appropriate illumination condition which requires for its growth was determined. Variations in the growth of the colonies in the different isolates, regardless of their origin were observed.

9. Bibliografía

1. ACEPROCACAO.2012. Proyecto de Fortalecimiento de la Asociación Ecuatoriana de Cacao Nacional Fino de Aroma. Ecuador.
2. Aime, M. C. y Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (Chocolate, *Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. Mycology. Pp. 1012-1022.
3. Albuquerque, P.S., C. N. Bastos, E. D. Luz y S. D. Silva. 2005. Doenças do cacauero (*Theobroma cacao*). En. Manual de Fitopatología. Brasil. Eds. 4. Vol. 2. Piracicaba, Brasil. Pp. 151-163
4. Amores, F. 1999. La dificultad para establecer el rumbo tecnológico que han limitado el impacto económico de la investigación de cacao durante los últimos 50 años. Tesis de maestría. Universidad Internacional. Quito, Ecuador. Pp. 188.
5. Amores, F., J. Agama, F. Mite, J. Jiménez, G. Loor y J. Quiroz. 2009. EET 544 y EET 558 nuevos clones de cacao nacional para la producción bajo riego en la Península de Santa Elena. En. Boletín divulgativo N 134. Estación Experimental Tropical.
6. Ampuero, E. 1967. Monilia pod rot of cocoa. Cocoa Grower's Bulletin 9:1518.
7. ANECACAO, (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao). (2012). Cacao de exportación. Sección: Elaborados.Pp.10.
8. ANECACAO, (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao). 2006. Manual de cultivo de cacao. Ecuador. Pp. 45.
9. Ayala, M. y D. Navia. 2008. Manejo integrado de moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales. En. CICYT –ESPOL. Guayaquil, Ecuador. Pp.6.
10. Barros, O. 1977 Investigaciones sobre el hongo *Monilla roreri* Cif & Par. Causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao, sus daños y control. El cacaotero colombiano. Pp. 42-52
11. Bastidas. Oscar. 2009. Technical Note-Neubaver Chamber Cell Counting.

12. Batista, L.; 2009. Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana. CEDAF 250pp. Santo Domingo, República Dominicana.
13. BIOSCIENCE, 2004. Databases. Classification based on 9th edition of Dictionary of the Fungi. Consultado 8 Noviembre, 2012. Disponible en <http://www.indexfungorum.org./Names/NamesRecord.asp?RecordID=219848>.
14. 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 MSc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. Pp.60.
15. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2009. Turrialba, Costa Rica. Pp 17.
16. Crespo Del Campo, E. y F. Crespo. 1997. Cultivo y beneficio del cacao CCN-51. Editorial El Conejo. Quito, Ecuador. Pp.133.
17. Cruz, B.S. 1993. Determinación de fuentes de resistencia de cacao de origen nacional al ataque de *Monilia roreri* (Cif. & Par.). Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Ecuador. Universidad de Guayaquil. Pp.101.
18. ECORAE. 2010. Compendio de recomendaciones tecnológicas para los principales cultivos de la Amazonia Ecuatoriana. Quito. Ecuador. Editorial. Nina comunicaciones. Pp. 13.
19. Enríquez G. 1895. Curso sobre el cultivo del cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba. Pp. 239.
20. Enríquez, G. 2004. Cacao Orgánico. En. Guía para productores ecuatorianos. Quito, Ecuador. Pp.360.
21. Evans, H. C. 2007. Cacao diseases - the trilogy revisited. Phytopathology. Pp. 1640-1643.
22. Evans, H.C, J.A. Stalpers, A.R. Samson, G.I. Benny. 1987. On the taxonomy of *Monilla roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany. Pp 2528- 2532.
23. Evans, H.C. 1981. Pod Rot of cacao caused by *Moniliophthera* (*Monilla*) *roreri*. Phytopathological. Pp. 24-49.

24. Evans, H.C., K. A Holmes., W. Phillips y J. M. Wilkinson. 2002. What is a name: *Crispinellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cacao. *Mycologist*. Pp. 148- 152.
25. Evans, H.C., K. A. Holmes y A.P. Reid. 2003. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology* 52: 476-485.
26. FEDECACAO (Federación Nacional de Cacaoteros). 2004. Reconocimiento y control de la Monilia del cacao. Colombia. Pp. 4.
27. FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola). 2003. Identificación y control de la moniliasis del cacao. Cortés, Honduras. Pp 24.
28. Helmuth,W. Manejo Integrado de Plagas en Cultivos de la Amazonia Ecuatoriana. 2000. Pp. 138.
29. Hernández, C. 2007. Caracterización del sistema proleotico de *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.*, Causante de la moniliasis del cacao. Tesis de maestría en ciencias. Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Tabasco. México.
30. Hernández, T., Ríos y E. Arevalo.1991. Enfermedades del cacao sistema de producción en la Amazonia peruana. Pp. 37-44.
31. IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2006. Protocolo estandarizado de oferta tecnológica para el cultivo del cacao. Lima, Perú. Pp.73.
32. INIA (Centro de Investigaciones del Estado Miranda). 2008. Venezuela
33. Johnson AE. (1946). An Improved Slide Culture Technique for the Study and Identification of Pathogenic Fungi. *J Bacteriol*. 51(6). Pp. 689-694.
34. Johnson, J., J. Bonilla y L. Agüero. 2008. Manual de manejo y producción del cacaotero. Leon. Nicaragua. Pp. 40.
35. Krauss, U., M. Hoopen, E. Hidalgo, A. Martínez, C. Arroyo, J. García, A. Portuguez y V. Sánchez. 2003. Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). Talamanca, Costa.
36. MAG/IICA. 2001. Identificación de mercados y tecnología para productos agrícolas tradicionales de exportación. Quito. Ecuador. Pp.45

37. Meléndez, L. 1993. Microambiente, cantidad de esporas en el aire e incidencia del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). Evans, et al. Bajo tres sistemas de manejo de sombra leguminosa en cacao (*Theobroma cacao* L). Tesis de Magister Scientiae en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Universidad de Costa Rica. CATIE. Turrialba, Costa Rica. Pp.98.
38. Moreno, A. y Flores Johanna, 2011. Fomento de la cadena de valor de cacao en organizaciones de pequeños productores de Esmeraldas y Napo. GIZ. Quito. Ecuador. Pp. 104 .
39. Navarro, M. y I. Mendoza. 2006. Cultivo del cacao en sistemas agroforestales. En. Guía técnica para promotores. Río San Juan. Pp. 67.
40. Ordoñez, L, C. Gavilánez y A, Salazar. 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.
41. Ordoñez, L; Gavilánez, C y 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.
42. Palomeque, E. 2009. Sistemas Agroforestales. México.
43. Pérez, S. 2013. Kallari, historia de un grupo de artesanos y agricultores emprendedores y patriotitas de la provincia de Napo. Ecuador.
44. Phillips, W. 1986. Evaluación de cultivares de cacao a *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al. Pp100.
45. 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.
46. Phillips-Mora, W., J. Cawich., W. Garnett y M. C. Aime., (2006). First report of frosty pod rot (moniliasis diases) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. Pp. 55.

47. Porras, V. J. Sánchez. 1991. Enfermedades del cacao. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola . La Lima. Cortez. Honduras. Pp 14.
48. PROAMAZONIA (Programa para el Desarrollo de la Amazonía). 2003. Caracterización de las zonas productoras de cacao en el Perú y su competitividad. Lima. Perú. Pp208.
49. Quiroz, J. 2006. Avances en la selección de clones de cacao nacional adaptadas a las condiciones ambientales de la península de Santa Elena. Memoria de reunión técnica. Guayas, Ecuador.
50. Ramírez, P. 2006. Estructura y dinámica de la cadena de cacao en el Ecuador. Sistematización de información y procesos en marcha. Documento técnico. Primer borrador. Junio. Quito, Ecuador.
51. Ramírez, S. 2008. La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao México. En Tecnología en Marcha. Vol. 21-1; 97-110; Recuperada de [http:// www.tec.ac.cr](http://www.tec.ac.cr)
52. Reuk, D. 1997. Monilia del cacao. En. Revista Café & Cacao: Noticias 2(8): 1-2
53. Rorer, J.B. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos apropiados al cultivo de cacao. Guayaquil, Ecuador. Pp 80.
54. Saltos, J. 2012. Revista El Agro. 08 Agosto 2012. Chocolate Amazónico para el Ecuador. Recupera el 22 de Octubre de 2012. de: www.magap.gov.ec
55. Sánchez, L., E. Gamboa y J. Rincón. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. En. Revista Facultad de Agronomía. Vol. 20. Pp.188-194.
56. Sánchez-Mora, F.; Garcés, F.R.; Vera, J.F.; Ramos, R.A.; Troya, F.; Díaz, T.G. 2011. Cuantificación de enfermedades en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la zona central del Litoral Ecuatoriano. In: Memorias del VIII Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe, Quito. Ecuador.
57. SENASA., Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Perú, 2003; en; [http:// www.sica.gov.ec](http://www.sica.gov.ec)
58. Soria, J. 2000. Breve historia del Cultivo de Cacao en el Ecuador. Recuperada de: www.sica.gov.ec

59. Suárez, L. 2004. Aislamiento e identificación de *M. roreri* causante de la monilla en municipios de nororiente Colombiano y ensayos preliminares para su control biológico, Universidad Francisco de Paula Santander. Pp. 3-8.
60. Tiburcio, R.A; G.G.L; Costa, M.F; Carazolle; J.M.C; Mondego; S.C; Schuster; J.E Carlson; M.J; Guiltinan; M.J; Bailey; B.A; Mieczkowski; P; Meinhardt; W.L; Pereira. 2010; G.A.G. Genes Acquired by Horizontal Transfer Are Potentially in *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, Two of the Major Pathogens of Cacao *Journal of Molecular Evolution* 70(1). Pp.85-97.
61. Urdaneta G.L. y A.A. Delgado. 2007. Identificación de la microbiota del filoplan del cacao (*Theobroma cacao* L.), en el municipio Carraciolo Parra Olmedo, estado Mérida. En. Revista Facultad de Agronomía. Venezuela. Vol. 24. Pp.47-68.
62. Urquillas L. 2004. Inducción de la germinación para mejorar la eficiencia de dos agentes antagónicos para el control de la Monilia (*Crinipellis roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) (tesis de Maestría) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. Pp. 72.
63. Villamil.C., J.Enrique., Valbuena., J.Orlando., V.Rosero., S.Edgar. 2012. Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Colombia. Vol.65. Pp.6305-6315
64. Villavicencio Mirian, E. V. 2010. Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana. Tesis de Ingeniera Agrícola y Biológica. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.

Anexo 2 Planilla para la medición de las características morfológicas

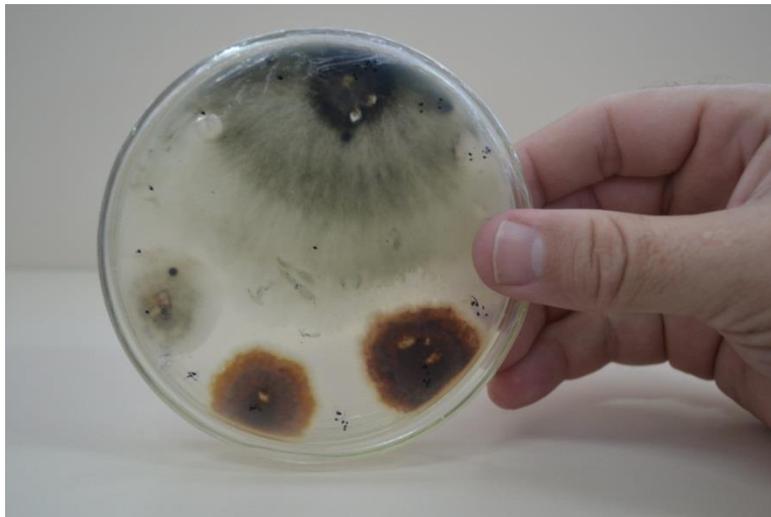
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS			
CEPA	CARACTERISTICAS	DESARROLLO (mm)	OBSERVACIONES
	Diámetro de los Conidióforos		
	Tamaño de los Conidióforos		
	Longitud de los conidios		
	Diámetro de los conidios		
	Diámetro de los Conidióforos		
	Tamaño de los Conidióforos		
	Longitud de los conidios		
	Diámetro de los conidios		
	Diámetro de los Conidióforos		
	Tamaño de los Conidióforos		
	Longitud de los conidios		
	Diámetro de los conidios		
	Diámetro de los Conidióforos		
	Tamaño de los Conidióforos		
	Longitud de los conidios		
	Diámetro de los conidios		
	Diámetro de los Conidióforos		
	Tamaño de los Conidióforos		
	Longitud de los conidios		
	Diámetro de los conidios		
	Diámetro de los Conidióforos		
	Tamaño de los Conidióforos		
	Longitud de los conidios		
	Diámetro de los conidios		

Anexo 3 Recolección con características



de las mazorcas de cacao de *M. royeri*

Anexo 4 Ceba infectada con hongos anamorfos



Anexo 5 Aislamiento de *M. royeri* en medio de cultivo semi sólido PDA



Anexo 6 Elaboración de cámara de luz negra



