UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA TIERRA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Caracterización cultural, morfológica y fisiológica *in vitro* de aislados de *Moniliophthora roreri* procedentes de tres provincias amazónicas del Ecuador.

Tesis previa a la obtención del Título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

AUTOR

TIRSA YAJANUA KUJA CHAMIK

DIRECTORA

ING. KARINA MARÍA ELENA CARRERA SÁNCHEZ M.Sc.

PUYO - PASTAZA - ECUADOR

2015

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

Dr. Yoel Rodríguez Guerra

Dra. María Adela Valdés Sáenz

MSc. Sandra Soria Re

2015

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Tirsa Yajanua Kuja Chamik egresada de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad Estatal Amazónica, bajo mi supervisión.

_____

Ing. Karina Carrera Sánchez M. Sc

AGRADECIMIENTO

A Dios por guiarme en el buen camino y bendecirme para llegar a cumplir mis metas con mucho amor y éxito.

A mis padres, por el apoyo infinito y su comprensión en todo el transcurso de mi vida académica.

A mis hermanas y hermanos, por sus consejos y motivación brindada.

A mi hijo, por su amor brindado a diario y ser mi mayor compañía.

A mi directora de tesis, Ing. Karina Carrera Sánchez M.Sc, por su inmensa paciencia, esfuerzo y dedicación brindada en el transcurso de toda mi investigación.

A la Ing. Daysi Changoluisa, por su pertinente asistencia técnica durante el trabajo experimental.

A la Dra. María Valdés, por su colaboración en la revisión de este documento.

Al Dr. Yoel Rodríguez e Ing. Sandra Soria, por su ayuda en el proceso de la culminación de mi carrera.

A las autoridades y docentes del Departamento de ciencias de la Tierra de la Universidad Estatal Amazónica, quienes me han apoyado al desarrollo de mi Tesis.

DEDICATORIA

Primeramente a Dios por otorgarme la dicha de la vida para servir al prójimo.

A mis padres, Tarcisio e Isabel, por su incondicional apoyo, amor y cariño brindado a lo largo de mi vida y ayudarme en mi formación personal y académica inculcándome valores para ser mejor día a día.

A mi hijo Alan, por ser mi mayor motivación e inspiración para lograr mis metas propuestas y regalarme mis mejores momentos.

A mis hermanas y hermanos, por ser mis amigos y consejeros, que a pesar de las circunstancias siempre seguimos unidos.

RESPONSABILIDAD

Yo Tirsa Yajanua Kuja Chamik, declaro que el contenido de la presente Tesis de Grado es de mi responsabilidad exclusiva.

_____

Tirsa Yajanua Kuja Chamik

Tabla de contenido

Capítulo I 1

1. Introducción 1

a. Objetivos 3

Objetivo general 3

Objetivo específicos 3

b. Hipótesis 3

Capítulo II 4

2. Revisión bibliográfica 4

2.1 El cacao en el mundo 4

2.2 Origen del cacao 4

2.3 Cacao en el Ecuador – Importancia económica 5

2.4 Botánica del cacao (*T. cacao*) según Enríquez (2010) 7

2.5 Principales variedades de cacao 9

2.6 Principales plagas y enfermedades del cultivo de cacao 11

2.7 Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) 14

2.8 Métodos de control 21

Capítulo III 24

3. Materiales y métodos 24

3.1 Localización y duración del experimento. 24

3.2 Condiciones meteorológicas. 24

3.3 Materiales y equipos 24

3.4 Factor de estudio 26

3.5 Análisis estadístico 26

3.6 Variables 26

3.7 Manejo del experimento 28

Análisis de la zona de estudio. 28

Aislamiento y obtención de cultivos puros de *M. roreri* 29

3.7.1 Determinación de los caracteres culturales de las colonias de los aislados de *M. roreri* 33

3.7.2 Evaluación de los caracteres morfológicos de los aislados de *M. roreri* 34

3.7.3 Caracterización de propiedades fisiológicas de los aislados de M. roreri 36

Capítulo IV..... 39

4. Resultados y discusión..... 39

4.1 Determinación de los caracteres culturales de las colonias de los aislados de *M. roreri*. 39

4.1.1 Crecimiento micelial de *M. roreri.*..... 39

4.1.2 Color de anverso y reverso del micelio de *M. roreri*..... 41

4.1.3 Bordes 45

4.1.4 Textura 45

4.1.5 Presencia de cristales..... 46

4.1.6 Presencia de líquidos de transpiración 46

4.1.7 Elevación del micelio 47

4.2 Evaluación de los caracteres morfológicos de los aislados de *M. roreri.* 48

4.2.1 Forma de conidios y mediciones 48

4.2.2 Concentración de conidios 50

4.3 Caracterización de propiedades fisiologicas de los aislados de *M. roreri.* 50

4.3.1 Influencia del pH en el crecimiento micelial de *M. roreri*..... 50

4.3.2 Influencia de la temperatura en el crecimiento micelial de *M. roreri* ……51

4.3.3 Influencia de la luz en el crecimiento micelial de *M. roreri*..... 52

Capítulo V..... 54

5. Conclusiones 54

6. Recomendaciones..... 55

7. Resumen 56

8. Summary .....**¡Error! Marcador no definido.**

9. Bibliografía..... 58

10. Anexos..... 68

Índice de Tablas

Tabla 1. Descripción de variables empleadas en la investigación..... 27

Tabla 2. Fincas donde se realizó la recolección de las mazorcas de cacao Nacional. 28

Tabla 3. Codificación de aislados provenientes de las seis fincas. 32

Tabla 4. Sitios de procedencia de los aislados de *M. roreri.* 39

Tabla 5. Color del micelio de las colonias en el anverso y reverso de los 20 aislados de *M. roreri,* en medio de cultivo semi sólido V8MAA a 26°C incubados durante 18 días. 43

Tabla 6. Dimensiones promedio de las esporas producidas por aislados de *M.roreri* 49

Tabla 7. Influencia de la temperatura sobre el crecimiento micelial de *M. roreri* en el aislado 52

Tabla 8. Influencia de la luz en el crecimiento micelial del aislado UEA-Mr8.9 53

Índice de Figuras

Figura 1. Pequeño productor amazónico de cacao. 6

Figura 2. Mazorcas tipo criollo en estado inmaduro 9

Figura 3. Cacao forastero en estado maduro. 10

Figura 4. Mazorcas de cacao Trinitario 10

Figura 5. Mazorca de cacao Nacional. 11

Figura 6. Mazorca infectada con moniliasis..... 15

Figura 7. Ciclo de vida del patógeno *M. roreri*..... 18

Figura 8. Diversos síntomas de M. roreri en mazorcas de cacao. a) Mazorcas con abultamientos o gibas b) Fruto con mancha marrón o chocolatada c) Mazorca con mancha café y aparece micelio d) Cubrimiento total de la mazorca con esporas de color crema. 19

Figura 9. Sitios de procedencia de las mazorcas de cacao Nacional. Proyección del mapa UTM, Datum WGS 84, Zona 18 sur. A) Ecuador, B) Provincias amazónicas, C) Lugares de procedencia de los frutos de cacao. 29

Figura 10. Mazorca de cacao Nacional con síntoma de Moniliasis. 30

Figura 11. Preparación de cámaras húmedas..... 31

Figura 12. Siembra de aislados de *M. roreri* en medio semi-sólido V8MAA.... 33

Figura 13. Registro y medición de caracteres culturales de colonias de *M. roreri.* 34

Figura 14. Elaboración de microcultivos y medición de conidios..... 35

Figura 15. Proceso para el conteo de conidios en la cámara de Neubauer. ... 36

Figura 16. Crecimiento micelial del aislado UEA-Mr8.9 en medio líquido PDB. 37

Figura 17. Aislado UEA-Mr8.9 conservada a 25 ºC en la incubadora. 38

Figura 18**.** Aislado UEA-Mr8.9 en medio semi sólido V8MAA, creciendo en luz negra colocada en la cámara de esporulación modelo BLB40W 120V. 38
Figura 19. Desarrollo del crecimiento micelial de los 20 aislados de *M. roreri* en medio de cultivo semi sólido V8MAA a 26 °C..... 40
Figura 20. Aislados de *M. roreri* que presentaron mayor velocidad de crecimiento micelial. 41
Figura 21. Color del micelio de los aislados de *M. roreri.* 42
Figura 22. Color del reverso de las colonias de aislados de *M. roreri.* 42
Figura 23. Textura del micelio de colonias de aislados *M. roreri.* 45
Figura 24. Presencia de cristales en aislados de *M. roreri*. 46
Figura 25. Presencia de líquido de transpiración en aislados de *M. roreri* 47
Figura 26. Elevación de micelio de aislados de *M. roreri* en medio de cultivo semi sólido V8MAA a 26°C. 47
Figura 27. Tipos de esporas. a) globosa b) subglobosa c) elíptica. 48
Figura 28. Observación de concentración de conidios en cámara de Neubauer. 50
Figura 29. Influencia del pH sobre el crecimiento micelial en medio PDB. 51

Índice de Anexos

Anexo 1. Elaboración de placas para la observación de estructuras morfológicas de *M. roreri.* 68

Anexo 2. Preparación de medio de cultivo semi sólido V8MAA. 69

Anexo 3. Planilla de toma de datos de los diferentes caracteres culturales. 70

Anexo 4. Registro de toma de datos de las diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 y 35 ºC). 71

Anexo 5. Hoja de registro de los diferentes caracteres fisiológicos. Variable de iluminación (luz natural, blanca, negra y oscuridad)..... 72

Glosario de siglas

ACORDAR: Alianza para crear Oportunidades de Desarrollo Rural a través de Relaciones Agro empresariales.

ANDES: Agencia Publica de Noticias del Ecuador y Suramérica.

ANECACAO: Asociación Nacional de Exportadores de Cacao.

CORPOICA: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

ECORAE: Instituto para el Ecodesarrollo de la Región Amazónica Ecuatoriana

FEDECACAO: Federación Nacional de Cacaoteros

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario

ICCO: International Cocoa Organization (Organización Internacional del Cacao)

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Agraria

Capítulo I

1. Introducción

El cacao (*Theobroma cacao L*.) cultivo originario de América que ha sido expandido en el mundo; es utilizado como materia prima para diversos productos de la agroindustria. Tiene gran importancia en la economía de los países productores por ser un producto muy cotizado (Angulo, 2009), por lo cual, ha sido apreciado mundialmente no sólo por su distintivo sabor, sino también por sus beneficios nutritivos, esta importancia lo ha transformado en un producto apetecido; debido a sus diferentes presentaciones (Egas, 2010).

La historia del cacao y su expansión en el mundo tuvieron como efecto el nacimiento de un nuevo mercado; ya sea con los mayas, los aztecas o los europeos siendo los primeros en la comercialización del cacao. Esta especie vegetal provocó una mayor demanda por lo que su siembra hizo que se extienda a través de tres continentes: África, América y Asia (Hipernova, 2012).

El cacao es un fruto originario de América del Sur, apareció por primera vez hace 4 000 años al este de los Andes, específicamente al Sur del Lago Maracaibo y el río Magdalena. Se cree que la difusión del cacao al resto del continente se llevó por medio: del ser humano, los animales y factores meteorológicos como el viento (Attanasia, 2007).

Ecuador se encuentra entre los mayores productores de cacao y el primero de cacao fino o de aroma, aportando el 50 % de la oferta que alimenta este pequeño pero importante segmento del mercado mundial (Loor y Sornoza, 2011; EL TELÉGRAFO, 2013). Las exportaciones de cacao en Ecuador, al finalizar el 2014 dieron volúmenes totales de 235 000 t, las cuales se distribuyeron en: envíos al exterior de granos de cacao, de productos semielaborados y productos terminados. En el primer semestre del año 2015 dio un total de 109 000 t exportadas, siendo superior en el mismo periodo del 2014 con un valor de 27 000 t (ANECACAO, 2015; LÍDERES, 2015).

En la región amazónica el cacao se cultiva desde hace siglos, conservando las prácticas ancestrales de siembra por lo que la calidad del grano es distinguible

debido a que las plantaciones están libres de pesticidas y fertilizantes (Andes, 2014). Las comunidades indígenas amazónicas alcanzan un promedio de 1,5 ha dedicadas al cultivo de cacao, la nacionalidad kiwcha con el 88 %, y otras nacionalidades: Secoya, Shuar Huaorani y Cofan representan un 12 % (Ordoñez *et. al.,* 2011).

El cultivo de cacao requiere un hábitat húmedo con temperaturas que varíen de 18 a 32 grados y lluvia abundante. El árbol de cacao necesita estar bajo la sombra de árboles que le ayudan a preservar la humedad necesaria para su crecimiento y que al mismo tiempo permiten la entrada de luz solar (ICCO, 2007).

En la producción de este cultivo, es necesario realizar buenas prácticas culturales que eviten la aparición de enfermedades, siendo la moniliasis (*Moniliophthora roreri) (Cif y Par)* Evans *et al.* de mayor importancia económica debido al daño que causa en el cultivo del cacao, se caracteriza por dañar frutos en cualquier estado de desarrollo, afecta a todas las especies de los géneros *Theobroma* y *Herrania*. Esta enfermedad también es denominada: monilla, pudrición acuosa, helada, mancha ceniza. Se creía que se originó en Ecuador y que de ahí pasó a Colombia, Perú, Bolivia y Venezuela. Recientes estudios demostraron que el centro de origen radica en Colombia (Arévalo *et al*., 2004; Phillips-Mora, 2006).

En la Amazonía se ha ido incrementado la producción de cacao, la misma que se ha visto afectada por *M. roreri*, convirtiéndose en un grave problema para los productores de la región, por lo cual es indispensable realizar el estudio de este patógeno y poder encontrar formas de control biológico del agente causal de esta enfermedad a través de aislados, los cuales permitirán caracterizar cultural, morfológica y fisiológicamente al hongo.

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

a. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar *in vitro* aislados de *Moniliophthora roreri* provenientes de tres provincias amazónicas del Ecuador en base a sus caracteres culturales, morfológicas y fisiológicas.

Objetivo específicos

- Determinar los caracteres culturales de las colonias de los aislados de *M. roreri.*
- Evaluar los caracteres morfológicos de los aislados de *M. roreri.*
- Caracterizar propiedades fisiológicas de los aislados de *M. roreri*

b. Hipótesis

Mediante la caracterización cultural, morfológica y fisiológica de aislados de *M. roreri*, procedentes de tres provincias amazónicas del Ecuador se podrá determinar la variabilidad de la respuesta de los aislados y a su vez viabilizar alternativas para el control biológico de este patógeno

Capítulo II

2. Revisión bibliográfica

2.1 El cacao en el mundo

En la actualidad los productores mundiales de cacao son 45 países de tres continentes: África, Asia y América. En el año 2011 del total de los granos cosechados, el 74,8 % se cultivaron en África, el 13 % en Asia y el 12,2 % en América (El Agro, 2014).

El cacao, planta originaria de las regiones tropicales de Centroamérica y Sudamérica, experimentando cambios en su geografía desde los primeros años del siglo XX. Se cultiva en una banda geográfica cerca del Ecuador debido a las condiciones climáticas. Se extiende por África occidental, Sudeste de Asia, partes de Centro y Sudamérica (Márques, 2014; United Cacao, 2015).

La ICCO destaca a los principales países productores de cacao a nivel mundial: Costa de Marfil, Ghana e Indonesia que constituyen un 70,7 %, otro 20 % producido por los cuatro mayores productores: Brasil, Nigeria, Camerún y Ecuador. Los otros contribuyentes relativamente poco significativos en el mercado mundial son: Perú, Colombia, México, República Dominicana y Nueva Guinea (Ramírez, 2008; United Cacao, 2015).

2.2 Origen del cacao

Algunos autores señalan que el cultivo del cacao se inició en México y América Central (Guatemala y Honduras), esta plantación forma parte de los recursos florísticos de la cuenca amazónica de las regiones donde confluyen los ríos Orinoco y Amazonas, en el cual existen tipos genéticos de mucho valor (Batista, 2009; Torres, 2010).

En México, el pueblo azteca empleaba las almendras del cacao como monedas y para la preparación de bebidas. Creían que el árbol del cacao era de origen divino y que su bebida confería discreción y sabiduría. Por eso Linneo asignó a

la especie el nombre de *Theobroma*, que significa alimento de los dioses. En los tiempos de Cristóbal Colón, los mayas eran los verdaderos cultivadores de cacao; perfeccionaron su cultivo, aprendieron a curar y conservar las semillas y hacer una bebida agradable (Batista, 2009).

Según Enríquez (2004) el cultivo del cacao tiene su origen en el noreste de América del Sur, extendiéndose hacia el Norte por la costa pacífica que integra países como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil, donde se ha encontrado una alta variabilidad genética. Desde este lugar de origen, las especies se fueron expandiendo y evolucionando en dos grupos de cacao correspondientes al tipo Criollo y Forastero, con características fenotípicas y genotípicas bien definidas.

2.3 Cacao en el Ecuador – Importancia económica

Según Yánez (2011), Ecuador ha sido uno de los países con mayor producción de cacao fino y de aroma. La actividad agrícola dedicada a esta especie tiene una historia relevante en la economía nacional; aportando así al aparecimiento de los primeros capitales y desarrollando sectores importantes como la banca, la industria y el comercio. Ecuador produce cacao desde el año 1780, llegando en 1911 a ser uno de los mayores exportadores a nivel mundial, sus ventas representaban entonces el 20 % del mercado global.

Ecuador produce más del 70 % de la producción mundial de Cacao Fino y Aroma. Este tipo de cacao, tiene características individuales distintivas, de toques florales, frutales, nueces, almendras, especias que lo hace único y especial, sobresaliendo con su ya conocido "sabor arriba**"**. Actualmente la mayor parte del cacao exportado por el país corresponde a una mezcla de Nacional y Trinitarios introducidos en 1930 y 1940, y se define como Complejo Tradicional (ANECACAO, 2013; LíDERES, 2014).

Según ANECACAO (2015), el cacao tiene constante demanda y es reconocido a nivel mundial, según proyecciones para el año 2015 con lo referente a la producción de cacao estaría alrededor de 260 000 t y 850 millones de dólares permitiendo un aporte a la economía y desarrollo del país.

El volumen de exportaciones de este cultivo presenta variaciones de un año a otro dependiendo fundamentalmente de los niveles de producción y factores climáticos que afectan a la especie. Los principales sitios de consumo de cacao ecuatoriano se encuentran en el mercado internacional con un 75 % de la producción total de cacao ya sea en granos, elaborados y semielaborados. Alemania, Francia e Inglaterra abarcan el 40 % de la demanda total y los Estados Unidos con el 33 % (ECUADOR COSTA AVENTURA, 2013).

El cacao se desarrolla en dos regiones del Ecuador: Costa y Amazonía cultivándose dos tipos de cacao: Nacional y CCN-51, ocupando alrededor de 500 000 ha, de las cuales 110 000 ha se encuentran en manos de pequeños agricultores con parcelas no mayores a cinco hectáreas (Figura 1) (Guerrero, 2014; LA REPÚBLICA, 2012).

La región amazónica constituye uno de los centros de origen del cacao, este cultivo se encuentra de una forma silvestre en diversas zonas, distribuidas en las seis provincias de esta región (ECORAE, 2001).

Figura 1. Pequeño productor amazónico de cacao**.**
Fuente: Propiedad del autor.

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

Reino: Plantae (plantas)

Subreino: Tracheobionta (plantas vasculares)

División: Magnoliophyta (plantas con flores, angiospermas)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Familia: Sterculiaceae

Subfamilia: Byttnerioideae

Género: *Theobroma*

Especie: *T. cacao*

2.4 Botánica del cacao (*T. cacao*) según Enríquez (2010)

El cacao especie diploide (2n = 20 cromosomas), puede alcanzar alturas de hasta 20 m o más cuando crece libremente, presenta un ciclo vegetativo perenne. Es una especie alógama se estima que su polinización cruzada está por encima del 95 %. Crece y se desarrolla usualmente bajo sombra en los bosques tropicales húmedos de América del Sur.

2.4.1 Morfología

2.4.1.1 Tallo

El tallo es recto, que alcanza de 80 a 120 cm de altura, se desarrolla en formas variadas de acuerdo a las condiciones ambientales y de manejo.

2.4.1.2 Raíz

La raíz principal es pivotante (penetra hacia abajo) y puede alcanzar entre 120 a 150 cm, en suelos sueltos puede llegar hasta dos metros. Las raíces secundarias

(hacia los lados), el mayor volumen (entre 85 a 90 %) se encuentra en los primeros 25 cm de profundidad.

2.4.1.3 Hojas

Las hojas son simples, enteras y con una distinta pigmentación, presentan pigmentación color verde, el mismo que varía desde verde pálido a café claro a veces con tonalidades rojizas de acuerdo a la edad de la planta. El tamaño varía mucho, con una alta respuesta al ambiente; con menos luz es más grande, con más luz, más pequeña. El peciolo de la hoja del tronco es largo (7 a 9 cm) con un pulvinus bien marcado.

2.4.1.4 Flores

Las flores del cacao son pequeñas muy conspicuas, coloreadas, hermafroditas, pentámeras, es decir, que están constituidas de cinco sépalos, pétalos, estaminodios, estambres, y lóculos por ovario, son completas (todos sus verticilios florales) y perfectas (con androceo y gineceo). Las flores aparecen y se desarrollan en cojines florales situadas en el tronco en forma solitaria o en grupos, su diámetro oscila entre 1 – 1,5 cm.

2.4.1.5 Frutos

Los frutos son drupas grandes, le sostiene un pedúnculo no muy largo pero robusto. Tienen cinco lóculos y cada lóculo tiene dos partes formadas por lomos o un surco interno. Su forma es variada: redondeados, amelonadas y alargadas. Tiene cáscara gruesa de diferentes espesores y resistencia a la ruptura. Presentan diversa coloración desde casi blancos con fondo blanco a verdes con fondo blanco y verde hasta colores morados fuertes y fondo blanco o verde. Cada fruto es característico de cada árbol y se usa para clasificar e identificar la planta.

2.4.1.6 Semillas

Las semillas son de forma oblonga y varían mucho de tamaño. Algunas son redondeadas, aplanadas y acorazonadas. Tienen un recubrimiento o cutícula que protege a los cotiledones tienen los nutrimentos para la próxima planta, y en la parte exterior está el mucílago (parte dulce mucilaginosa que permite la

fermentación de las semillas). El color de las semillas es variable desde un blanco ceniciento, blanco puro, hasta morado oscuro y todas las tonalidades.

2.5 Principales variedades de cacao

Ecuador es uno de los países donde se localiza la mayor diversidad genética del cacao. En la actualidad el centro de dispersión se localiza entre los 20º de latitud norte y 20º de latitud sur (Ayala, 2008).

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

- **Cacao criollo:** se caracteriza por tener mazorcas alargadas, sus colores en estado inmaduro son verdes y rojizos, tornándose amarillas y anaranjadas rojizas en su estado maduro (Figura 2). Se desarrollan en zonas específicas abarcando el norte del Ecuador (Esmeraldas), Colombia, Venezuela, Centroamérica hasta las selvas tropicales de México.

Figura 2. Mazorcas tipo criollo en estado inmaduro
Fuente: Paredes, (2009)

- **Cacao forastero amazónico:** Sus mazorcas son de forma redondeadas con una coloración verde en estado inmaduro y amarilla en estado maduro (Figura 3). 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.

Figura 3. Cacao forastero en estado maduro.
Fuente: Navarro y Mendoza (2009).

- **Cacao trinitario:** Se caracteriza por la diversidad de formas y coloración de sus mazorcas con tonos verdes y rojizos, e inclusive una mezcla de ambos (Figura 4). Este tipo de cacao es el resultado del cruce entre el cacao Trinitario y Forastero propagado en la cuenca del río Orinoco.

Figura 4. Mazorcas de cacao Trinitario
Fuente: Navarro y Mendoza (2009).

Se considera que el cacao del Ecuador es un cuarto tipo genético, teniendo en cuenta sus características propias y únicas de aroma y sabor, las cuales se diferencian de los tres grupos mencionados y se denomina Cacao Nacional Fino de Aroma (Batista, 2009).

- **Cacao nacional de Ecuador:** Las mazorcas son amelonadas, presenta estrangulaciones en el ápice y la base con surcos y lomos poco profundos, el color interno de las almendras es violeta pálido o lila, aunque también se pueden observar semillas blancas (Figura 5). De este tipo de cacao se obtienen los mejores chocolates del mundo por su sabor y aroma floral.

Figura 5. Mazorca de cacao Nacional.
Fuente: Propiedad del autor.

2.6 Principales plagas y enfermedades del cultivo de cacao

El cacao, como cualquier vegetal, es susceptible a la acción microorganismos que alteran su desarrollo al mismo tiempo que pueden sufrir daños considerables a causa de los insectos y en nuestro país es una de las principales causas para la baja productividad (Soria, 2001).

2.6.1 Plagas

En Ecuador algunos de los insectos que atacan al cacao no constituyen un problema económico grave, pero pueden convertirse en tal sino se lo combate oportunamente. Por tal motivo, se debe cuidar y prevenir que los insectos dañinos no se expandan y multipliquen hasta convertirse en una plaga severa (Saunders y Enríquez, 1989).

Según Enríquez (2010), algunas de las principales plagas más importantes son:

2.6.1.1 Áfidos

Insectos pequeños de color oscuro, están agrupados en colonias; atacan los brotes, las hojas y las flores; también atacan los frutos jóvenes. Es común encontrarlos en plantas jóvenes hasta los seis y siete años de edad.

2.6.1.2 Ácaros

Arañitas, habitualmente de color rojo o marrón; se localizan en el envés de la hoja. Atacan los brotes jóvenes produciendo atrofia, malformación y defoliación de los brotes terminales.

2.6.1.3 Cápsidos del cacao. (*Monalonion braconoides* Walker*)*

Daña las mazorcas y las yemas terminales; provocan deformaciones en las mazorcas al atacarlas y poner sus huevos. El daño principal es la muerte regresiva de las ramas jóvenes. Esta plaga está relacionada con la escasez de sombra, por esta razón se recomienda un buen uso de la misma.

2.6.1.4 Chinches

Son insectos chupadores, viven en colonias, en el pedúnculo de la mazorca, provocando lesiones parecidas a chancros o llagas oscuras de poca profundidad.

2.6.1.5 Barredor del tallo (*Steirastoma breve* Sulzer)

Hay dos tipos de estos insectos que afectan al cacao. El ataque de la mayoría de estos insectos es secundario. Algunas especies pueden matar las plantas cuando estas son jóvenes (menores de un año de edad). La hembra raspa la corteza tierna en la parte terminal y pone sus huevos, al desarrollarse la larva penetra en el tallo, alcanza su estado de pupa después de varios meses provocando la muerte de las plantas jóvenes o las ramas afectadas.

2.6.1.6 Hormigas o zompopas (*Atta* sp.)

Son de la familia Formicidae y la mayoría son del género Atta, estos insectos defolian la planta cortando porciones semicirculares típicas, fácilmente

identificables; una planta joven puede ser defoliada completamente en poco tiempo. En plantas adultas las partes más vulnerables o susceptibles son los brotes nuevos.

2.6.1.7 Trips

Estos insectos se localizan en las hojas y su ataque es fuerte. Atacan los frutos, éstos presentan un matiz herrumbroso, impidiendo la identificación de la madurez de las mazorcas, pues no se distingue el cambio de color.

2.6.2 Enfermedades

Los problemas fitosanitarios provocan enfermedades causadas por hongos fitopatógenos los cuales se han convertido en uno de los factores principales para una disminución de la producción de cacao y la baja calidad del producto final (Hebbar, 2007). Esta problemática se ha incrementado, debido a la falta de manejo adecuado en los cultivos y por los cambios ambientales provocados por acciones antrópicas (Fondo Nacional del Cacao, 2011).

2.6.2.1 Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa* Aimée & Phillips-Mora)

Originaria del norte de Sur América, entre la Guyana (Surinam) y Brasil en la zona amazónica. Es causada por el hongo *M. perniciosa* que afecta los tejidos en crecimiento de la planta (Enríquez y Soria, 1977; ICA, 2012).

Esta enfermedad puede ser transmitida por las partes vegetativas de la planta así también por medio de la mazorca. Los síntomas más frecuentes aparecen en los puntos de crecimiento de ramas, cojines florales y frutos. Las escobas de ramas presentan inicialmente un desarrollo vigoroso y excesivo con acortamiento de entrenudos, las hojas parecen normales excepto por el grosor del pecíolo (Enríquez, 2010; Villavicencio, 2010).

2.6.2.2 Mal de machete (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted)

Es una enfermedad del tronco de las ramas del cacao producida por el hongo *C. fimbriata*. Puede ser trasmitido por herramientas sin desinfectar o por un insecto del género *Xileborus*, coleóptero perforador del tronco (ICA, 2012).

Los síntomas de la enfermedad consisten en perforaciones y la presencia de aserrín, por lo general se localizan en el tronco y las ramas primarias del árbol. En el momento que la infección es transmitida por las herramientas se presentan en cualquier parte del árbol. Cuando la enfermedad aparece 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 (Alarcón *et al*., 2012).

2.6.2.3 Mazorca negra (*Phytophthora palmivora* Butter)

Esta enfermedad fue reportada por primera vez en el año de 1727 en la isla Trinidad. Se encuentra distribuida en todos los países que cultivan cacao. Las pérdidas causadas por este hongo a nivel mundial son del 10 al 20 %. Es considerada la enfermedad más importante en un 80 % de los países productores de cacao. Es causada por el hongo *P. palmivora,* ataca plántulas y diferentes partes del árbol de cacao, como cojines florales, chupones, brotes, hojas, ramas, tronco y raíces; el principal daño lo sufren las mazorcas. Se forma una mancha de color café oscuro que puede llegar a cubrir todo el fruto (ACORDAR, 2009; Villavicencio, 2010).

2.7 Moniliasis (*Moniliophthora roreri*)

2.7.1 Importancia económica

La monilla también denominada “helada”, pudrición acuosa de la mazorca” y “enfermedad de Quevedo”, causada por *M. roreri* es la enfermedad más destructiva del cacao (Figura 6). En una plantación de cacao sin presencia de ayuda técnica la moniliasis puede destruir hasta un 95 % de los frutos, su ataque

es a menudo tan fuerte que afecta la producción del grano de cacao. De Ecuador y Colombia se ha informado sobre pérdidas que van desde el 16 hasta el 80 %. La severidad del ataque de monilla varía de lugar a lugar y de año en año de acuerdo con las condiciones del clima (Phillips, 2003; ACORDAR, 2009; Enríquez, 2010).

Figura 6. Mazorca infectada con moniliasis.
Fuente: Propiedad del autor.

2.7.2 Origen y distribución geográfica

En Ecuador en el año 1916, fue descrita por primera vez la moniliasis por J. B. Rorer (1918). En la región costera (Los Ríos - Quevedo) de Ecuador, fue el lugar considerado por aproximadamente cien años como punto de origen de esta enfermedad, pero investigaciones efectuadas por Phillips-Mora (2006) demuestran que la enfermedad se originó en la zona de Sopetrán (Antioquia, Colombia) a finales del siglo XVIII. La enfermedad se encuentra en todos los países cacaoteros de Suramérica, como son: Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Surinam; hasta el 2012 sólo Brasil no reporta la presencia de este patógeno afectando sus plantaciones. También se encuentra en Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala, Belice y desde el 2008 se ha afectado plantaciones de cacao de México, a donde llegó introducida posiblemente desde Honduras (La Lima, 2012).

2.7.3 Etiología

El agente causal al comienzo llamado *Monilla roreri* por Ciferri y Parodi (1933) y clasificado dentro del Phylum Ascomicota, describiéndola como un hongo anamorfo debido a la carencia de estructuras sexuales y a sus semejanzas morfológicas con diferentes hongos fitopatógenos del género (Evans *et al*., 2003). Sin embargo Evans *et al*. (1978), por medio de estudios de microscopia electrónica, hallaron la presencia de septo dolíporo un evento único de esporogénesis basipetal, resultado que motivó la creación del nuevo género *Moniliophthora*.

2.7.4 Taxonomía

Según Bioscience (2004), la clasificación de este patógeno es:

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Basidiomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *roreri*

2.7.5 Nombres comunes

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

2.7.6 Ubicación de los grupos genéticos, hospedantes y adaptación

Se han identificado cinco grupos genéticos del hongo, tres endémicos ubicados en la cordillera central y oriental de Colombia y Ecuador, los dos grupos restantes distribuidos ampliamente y se encuentran en fase invasiva, uno de los grupos se

localiza en el oriente de Colombia y la periferia de Ecuador, Venezuela y Perú; el último grupo en el Occidente de Colombia, centro de Ecuador y América Central (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007).

Según Porras y Sánchez (1991), los síntomas varían con la edad del fruto, pero la velocidad de desarrollo depende de las condiciones ambientales, básicamente de la temperatura y de la susceptibilidad del clon o variedad de cacao.

2.7.7 Diseminación de *M. roreri*

Vectores como el viento y la lluvia facilitan la diseminación de las esporas de *M. roreri,* ya que son los únicos propágulos infectivos. También requieren de agua libre o de una humedad relativa cercana al 100 % para su germinación (Suarez, 1971; Barros, 1977; Phillips-Mora, 2006).

2.7.8 Hospedantes

M. roreri ha sido reportada en frutos de los géneros *Theobroma* (*T. cacao, T. mammosum, T. bicolor, T. grandiflorum, T. gileri)* y Herrania (Porras y Sánchez, 1991; Phillips-Mora *et al*., 2006).

2.7.9 Ciclo de vida del patógeno

El ciclo del patógeno dura entre 50 y 70 días, desde la infección hasta completar la esporulación (Arévalo *et al.,* 2004). Según Evans (1981) indica que el ciclo de vida del hongo inicia por la dispersión de las esporas asexuales infectivas de *M. roreri*, las condiciones ideales para su desarrollo y germinación están en: 25 ºC de temperatura con una precipitación entre el rango de 40 a 1 000 mm/año.

La aparición de los síntomas va a depender de la edad del fruto infectado, en sus primeros estados de crecimiento de la mazorca se desarrolla completamente la enfermedad y en frutos con más de cuatro meses de edad la infección generalmente queda limitada a la corteza, presentando solamente los síntomas iniciales y generalmente no causa daño interno en la semillas (Figura 7) (Rodríguez *et al*., 2005).

Se pueden considerar dos ciclos diferentes dependiendo si el inóculo llega a las mazorcas sanas a partir de frutos con infecciones recientes o de frutos infectados

de ciclos anteriores que quedan momificados en el árbol (Yánez, 2004). Los conidios se producen en cadenas en las superficies de las mazorcas enfermas que siguen siendo verdes, o en las mazorcas que están momificadas y de color pardo-negro (Purdy, 1999).

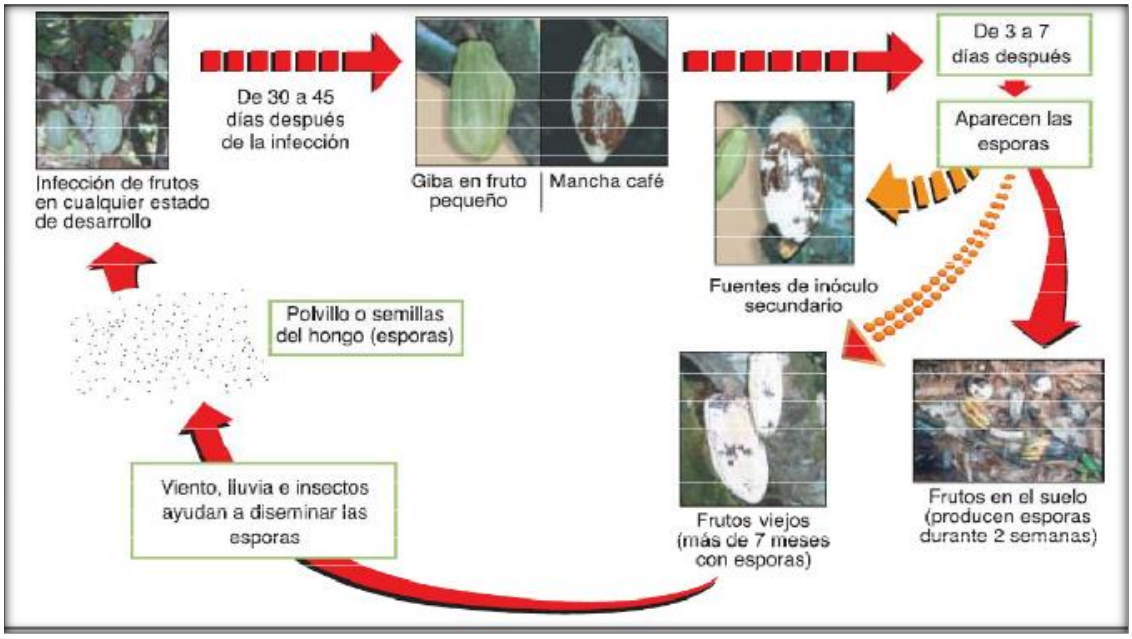


Figura 7. Ciclo de vida del patógeno *M. roreri*
Fuente: Robles (2008).

2.7.10 Descripción morfológica del cultivo de *M. roreri in vivo*

Según Evans *et al*. (1978) los conidios en germinación, invaden la epidermis de los frutos de cacao en cualquier etapa de crecimiento. Los tejidos intercelularmente son penetrados por hifas entre las células del parénquima cortical, estas hifas se presentan de forma hinchada con un diámetro de 4 - 7 µm. Se pueden desarrollar hinchamientos en frutos jóvenes, con síntomas ausentes hasta la formación de la lesión, que se manifiestan entre los 45 a 90 días posterior a la penetración.

En la fase necrotrófica, se manifiesta de forma rápida lesiones irregulares de color chocolate a café oscuro, uniéndose en el transcurso de los días hasta cubrir toda la superficie de la mazorca. Un pseudostroma de coloración blanco a crema se desarrolla sobre el fruto en un lapso de tres a ocho días después del comienzo

de la lesión cubriéndose con una capa polvorienta de esporas que cambian su coloración gris, canela o café (Evans *et al*., 1978).

2.7.11 Sintomatología

La mayoría de las variantes biológicas de cacao se infectan con facilidad con pudrición interna y externa únicamente en frutos. La infección inicia en etapas jóvenes del fruto, los pequeños son más susceptibles a la infección y al crecer expresan cierto nivel de tolerancia (Ampuero, 1967; Garrido y Solís, 2012).

En condiciones de campo, la enfermedad se ha encontrado sólo sobre frutos, artificialmente se han logrado infecciones sobre plántulas y primeros estadios foliares (Evans, 2007). En los frutos menores a dos meses la enfermedad se manifiesta con formación de pequeños abultamientos o gibas en la superficie de la mazorca, después se desarrolla una mancha café y sobre esta mancha aparece el micelio, a partir de los tres a siete días comienzan aparecer esporas de color crema, las cuales se dispersan con el viento. El hongo comienza a infectar a frutos sanos o del mismo árbol, sólo en un centímetro cuadrado de la superficie de un fruto afectado pueden contarse desde 7 hasta 43 millones de conidios, siendo necesario un solo conidio para dar inicio a la enfermedad (Figura 8) (Torres, 2010; Villavicencio, 2010).

Figura 8. Diversos síntomas de M. roreri en mazorcas de cacao. **a)** Mazorcas con abultamientos o gibas **b)** Fruto con mancha marrón o chocolatada **c)** Mazorca con mancha café y aparece micelio **d)** Cubrimiento total de la mazorca con esporas de color crema.

Fuente: Navarro y Mendoza (2009).

Síntomas externos

Los frutos menores a un mes presentan maduración prematura, marchitez y secamiento. Las mazorcas de uno a tres meses muestran abultamientos o deformaciones frutos de edad de dos a tres meses presentan puntos verdes oscuros. Después de los primeros síntomas brota una mancha color marrón o chocolatada, a los pocos días sobre la mancha café aparece el micelio y luego las esporas de color crema (Hernández *et al*., 1991; FEDECACAO 2006).

Síntomas internos

En la parte interna del fruto, la pulpa y los granos forman una masa compactada difícil de separar. La masa se encuentra rodeada por una sustancia acuosa que resulta de la descomposición de los frutos (Garrído y Solís, 2012).

2.7.12 Epidemiología

Las infecciones de esta enfermedad son favorecidas por condiciones ambientales como alta humedad relativa y temperatura, transportándose fácilmente las esporas que se producen sobre mazorcas enfermas por el viento y otros agentes, incluidas los seres humanos, hacia otras mazorcas donde reinician la infección (Enríquez y Soria, 1978).

La monilla, se desarrolla dentro de un rango de adaptación de 0 a 1 520 msnm, con precipitación anual de 780 a 5 500 mm, temperatura promedio anual de 18 a 28 °C. Se le considera un patógeno agresivo y excelente invasor de regiones geográficas al presentar un alto potencial de dispersión y una amplia plasticidad ecológica, es decir, resulta el nivel de adaptación a diferentes ambientes (Evans *et al*., 2002; Phillips, 2003; Phillips-Mora, 2006).

2.7.13 Descripción del aislado *M. roreri in vitro*

Según Evans *et al.* (1978) y Phillips (2003), *M. roreri* tiene un crecimiento lento sobre el medio de cultivo agar extracto de malta. Las colonias del aislado llegan a un diámetro aproximadamente de 8 – 15 mm después de 15 días, es inoloro con borde levantado. Su tonalidad de color va cambiando de salmón pálido a rosa beige, finalmente se vuelve de color beige canela a arcilla, o café lanoso. A

veces, el micelio en su inicio de crecimiento es suave a farináceo, de color blanco a crema. Con respecto a los caracteres morfológicos de este patógeno, las hifa son hialinas, de pared delgada, septada y ocasionalmente es irregular con hinchamientos de 1,5 - 5 µm de ancho. Los conidióforos ramificados dan lugar a cadenas de conidios, estos son separables, con paredes gruesas, sus formas son globosas o subglobosas, de 6,5 - 8,0 y de 15 - 25 µm de diámetro, algunas veces elipsoidales de 8 – 20 x 5 -14 µm, paredes de 2 µm de grosor.

2.8 Métodos de control

La comprobada eficacia de *M. roreri* como fitopatógeno en cacao ha complicado el manejo de la enfermedad. Su gran éxito radica en la notable capacidad de producir millones de esporas altamente infectivas que son fácilmente diseminadas por el ambiente (Phillips *et al*., 2003).

El conocimiento de mecanismos de dispersión y germinación de las esporas de la enfermedad ha permitido implementar el manejo, buscando un conjunto de técnicas y herramientas culturales, químicas, biológicas y genéticas, necesarias para mantener las poblaciones del patógeno a niveles inferiores al daño económico, medidas de control basadas en un manejo permanente y sistemático a través de todo el año (FEDECACAO, 2012).

2.8.12 Control cultural

Las prácticas de control cultural son fundamentales para que exista un ambiente favorable al cacao y a la vez desfavorable al patógeno, logrando la disminución de frutos enfermos y que la enfermedad avance en toda la plantación.

Según ACORDAR (2009), algunos de los trabajos del control cultural son los siguientes:

a) Podas.-

Se debe realizar dos veces al año, se podan los árboles de sombra y cacao, para controlar la humedad, permitiendo la penetración de los rayos solares hacia las ramas más bajas y que exista una mayor circulación de aire en el cacaotal.

Poda sanitaria: consiste en la eliminación de los frutos infectados con síntomas de la enfermedad. En época de lluvia y alta humedad se cortan cada ocho días y en época seca cada 15 días.

b) Regulación de sombra.-

La sombra no debe ser mayor del 30 %, por lo que se debe regular para evitar la humedad y así no establecer condiciones favorables para la propagación de la enfermedad.

c) Fertilización.-

Se debe fertilizar a las plantas con abonos orgánicos (biofertilizantes), foliares y al suelo.

d) Control de malezas.-

Se debe realizar tres veces al año, ayudando a controlar plagas y enfermedades. Esto incluye la eliminación del musgo que crece sobre las ramas y el tronco reduciendo el área de floración y sirve de lugar para las esporas.

e) Sistema de drenaje.-

Construir canales de drenaje o zanjas de desagüe para evitar el encharcamiento, ayudando a bajar la humedad del suelo y reduce la humedad del aire en la parcela.

f) Remoción de frutos enfermos.-

Los frutos cortados hay que enterrarlos o amontonarlos en un lugar y taparlos con tierra u hojarasca. Lo importante es que los frutos enfermos no queden en el árbol o en el suelo expulsando esporas.

2.8.13 Control químico

Según Arévalo (1992), el uso de fungicidas ha sido sugerido para controlar la moniliasis del cacao en diversos lugares; sin embargo, en la mayoría de casos

se considera que son poco efectivos y costosos, lo cual determina que este método sea poco apropiado a su vez causando varios daños en el ambiente y la salud humana, con efectos nocivos para los diferentes organismos que habían en el agroecosistema cacaotero motivo por el cual, no se recomienda su aplicación.

2.8.14 Control biológico

Consiste en la manipulación directa e indirecta por parte del hombre de agentes vivos que tienen la capacidad de control sobre determinado agente fitopatógeno. Esta manipulación provoca un aumento de su capacidad de ataque sobre las enfermedades (Yánez, 2004). Actualmente se está evaluando la efectividad de algunos hongos antagonistas a los patógenos, entre ellos a *M. roreri*. Entre estos antagonistas se encuentran miembros de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* (SENASA, 2003).

2.8.15 Control genético

Entre los cultivares de la especie *T. cacao* hay desigualdades en la susceptibilidad a *M. roreri*, lo cual muestra que en esta especie existen fuentes de resistencia al hongo. Aún no se ha descubierto un material inmune a *M. roreri*, pero de las pruebas en Ecuador, Colombia, Costa Rica y Honduras, se conoce que hay cultivares (clones o híbridos) que muestran menor número de frutos infectados (González y Robles, 2014).

Capítulo III

3. Materiales y métodos

3.1 Localización y duración del experimento.

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

La ubicación geográfica fue levantada directamente con un GPS.

Coordenadas geográficas: 1˚ 27’ 42’’ S

78° 01’ 53,6’’ O

Altitud: 935 msnm

Con una duración de 270 días, en trabajo de campo y laboratorio, así como la obtención de datos, tabulación, análisis estadístico e interpretación, correspondiente al periodo de Noviembre 2014 a Julio 2015.

3.2 Condiciones meteorológicas.

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

3.3 Materiales y equipos

3.3.1 Físicos

Asas de inoculación, atomizador plástico, bandejas plásticas, cajas de Petri con dimensiones de 100 x 15 mm y 100 x 20 mm, calibrador digital (TRUPER®), cámara de Neubauer, cámara de esporulación, cubre - objetos (B&C GERMANY) dimensiones 22 x 22 mm, cuchillo (TRAMONTINA), embudo de malla artesanal, erlenmeyer (CITOGLAS) de 100, 500 y 1 000 mL, espátula metálica, fundas Kraft, fundas plásticas, goteros de plástico, lámpara de alcohol, marcadores permanentes, micropipetas (SOCOREX) de 10 -100 µL y 100 - 1 000 µL, papel aluminio, papel filtro (MACHEREY NAGEL), parafilm (American National), pinzas

metálicas, porta-objeto (B&C GERMANY) dimensiones 76 x 26 mm, puntas micropipetas (BOECO), probetas (GLASSCO) de 50 y 250 mL, registro de datos, sacabocados 3,70, 4,30 y 10 mm, tapones, termómetros, tijeras de podar (PRETUL), vasos de precipitación 50 y 250 mL.

3.3.2 Biológicos (Material experimental)

Mazorcas de cacao nacional con los diferentes síntomas de la enfermedad como: mazorcas modificadas con manchas de color café, deformaciones o protuberancias, pequeños puntos aceitosos y frutos con presencia de crecimiento micelial color blanco y esporulación de color crema.

3.3.3 Equipos

Agitador magnético con calefacción (IKA®), autoclave vertical (DAIHAN Scientific), balanza compacta (ADAM®), cámara de flujo laminar (LABCONCO), cámara fotográfica (SONY), cámara de esporulación con dos lámparas de luz negra modelo BLB40W 120V, computadora de escritorio (ARI), estufa esterilizadora (MEMMERT), estéreo-microscopio binocular con zoom (KRUSS), incubadora (MEMMERT), pHmetro (ELICROM), microscopio trilocular óptico (MEIJI) con cámara (DINOLITE), refrigeradora (INDURAMA), ultracongelador (DAIHAN Scientific).

3.3.4 Insumos

Agua destilada estéril, alcohol al 70 y 90 % (v/v), lactofenol, tween 80.

3.3.5 Medios de cultivo

PDA (Potato Dextrose Agar): dosis de 9,75 g en 250 mL de agua destilada

V8MAA: 50 mL jugo V8, 3,75 g agar, 3,75 g malta, 0,75 g $CaCO_3$ esto se afora a 250 ml de agua destilada

PDB (caldo de papa dextrosa): 9,6 g en 400 mL de agua destilada.

3.3.6 Software estadístico

El procesamiento estadístico de las variables fueron evaluadas con el paquete estadístico *IBM SPSS Statistic versión 21.0 para Windows.*

3.4 Factor de estudio

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

3.5 Análisis estadístico

Para el análisis, comparación y procesamiento 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, presencia de líquidos de transpiración, textura y elevación del micelio se utilizó la estadística descriptiva, utilizando gráficos de distribución de frecuencia.

3.6 Variables

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

Tabla 1. Descripción de variables empleadas en la investigación.

Variables Independientes	Variables Dependientes	Descripción
Características Culturales	Velocidad de crecimiento radial	Su valor se expresa en (mm).
	Color de micelio	Su tonalidad de color puede ser blanco, salmón y café.
	Color de reverso	
	Textura	Su valor puede ser estriada, afelpada y polvosa.
	Borde	Su valor puede ser regular e irregular.
	Presencia de cristales	Se refiere a la presencia o ausencia de los mismos.
	Liquido de transpiración	
	Elevación	Su valor se expresa en (mm).
Características Morfológicas	Forma de conidios	Identificación a la forma de los conidios esta puede ser globosas, sub globosas y elipsoidales.
	Tamaño de conidios	Su valor se expresa en (µm).
	Conteo de conidios	Número de conidios por 10 mL H_2O de agua estéril.
Características Fisiológicas	Influencia de temperatura sobre el crecimiento micelial	Crece o no a 15, 20, 25, 30 y 35 °C
	Influencia de las condiciones de iluminación el crecimiento micelial.	Crece o no en luz natural, blanca, negra y oscuridad
	Influencia del pH sobre el crecimiento micelial	Crece o no en un pH de 6 a 7,5 con una escala de 0, 5 y se expresa en g/ caja de Petri

3.7 Manejo del experimento

Análisis de la zona de estudio.

La presente investigación se llevó a cabo en seis fincas de pequeños productores de cacao (Tabla 2), quienes se encuentran distribuidos en tres provincias amazónicas que son Napo, Pastaza y Morona Santiago (Figura 9). Quienes manejan una producción orgánica, lo cual es primordial para la investigación planteada. El muestreo se dirigió hacia las plantaciones de cacao Nacional.

Tabla 2. Fincas donde se realizó la recolección de las mazorcas de cacao Nacional.

FINCA	PROPIETARIO	PROVINCIA	CANTÓN	PARROQUIA	SECTOR	EDAD (años)
1	Carlos Pozo	Napo	Tena	Ahuano	Colonia Bolívar	7
2	Cesar Dahua	Napo	Tena	Ahuano	Ahuano	8
5	Mariana Rodríguez	Napo	Arosemena Tola	Arosemena Tola	Arosemena Tola	7
6	Misahualli	Napo	Tena	Misahualli	-	7
7	Wilson Avilez	Pastaza	Arajuno	Arajuno	Hushiño las peñas del pozo	8
8	Patricio Carreño	Morona Santiago	Palora	16 de Agosto	La Comanche	5

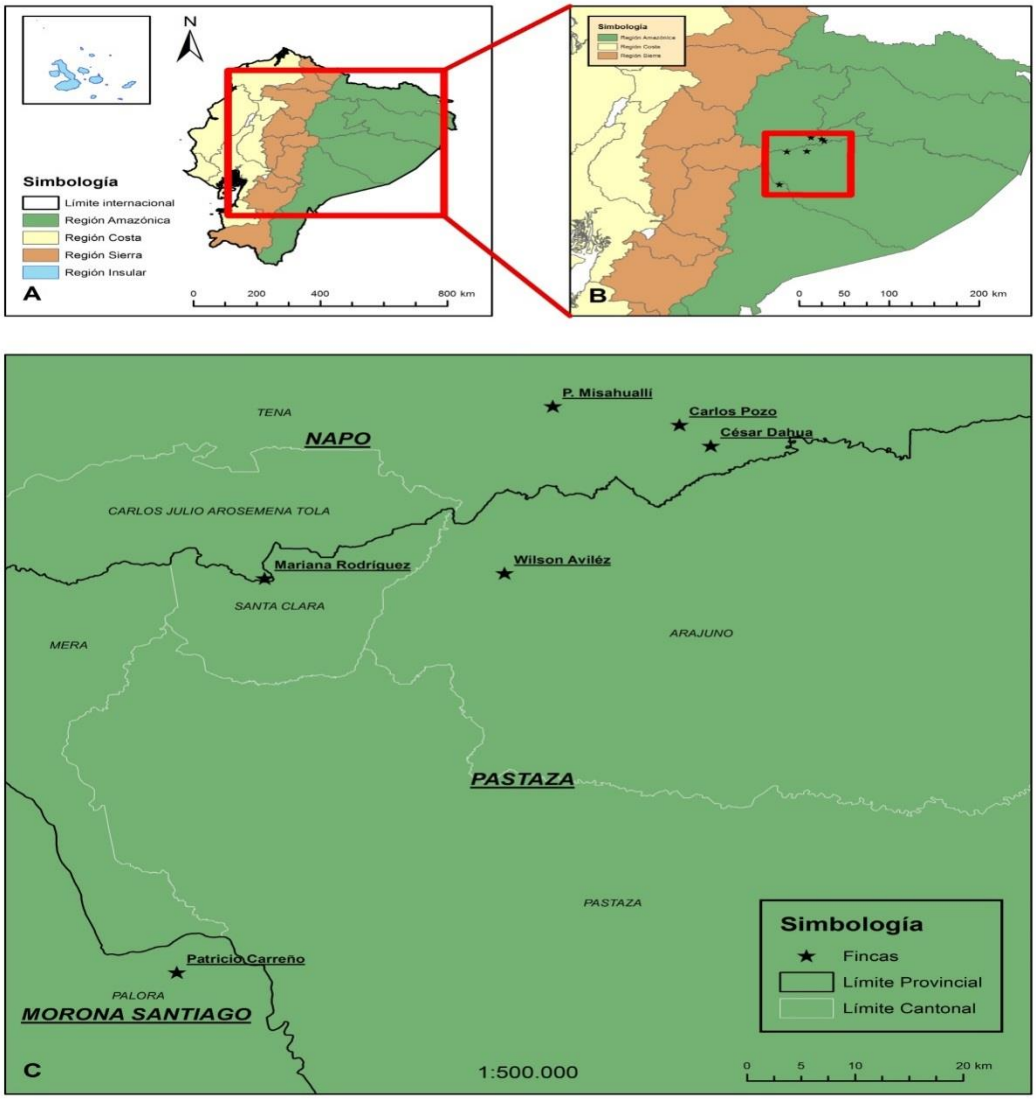


Figura 9. Sitios de procedencia de las mazorcas de cacao Nacional. Proyección del mapa UTM, Datum WGS 84, Zona 18 sur. **A)** Ecuador, **B)** Provincias amazónicas, **C)** Lugares de procedencia de los frutos de cacao.

Aislamiento y obtención de cultivos puros de *M. roreri.*

El trabajo de campo inició con la recolección de mazorcas de cacao nacional que presentaban características de la enfermedad, de acuerdo con los criterios de Ayala (2008) y CORPORICA (2008), como: manchas amarillentas y verdes en frutos menores de tres meses, mazorcas con deformaciones con apariencias de gibas o jorobas, puntos negros y brillantes que se unen para formar una mancha café, posteriormente se forma un manto blanco correspondiente a las esporas del hongo que después se transforma en un polvillo de color crema, fueron escogidas en cada zona de estudio (Figura 10).

Figura 10. Mazorca de cacao Nacional con síntoma de Moniliasis.
Fuente: Propiedad del autor.

Los frutos se recolectaron en fundas de papel Kraft e identificadas respectivamente, fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología donde se las fotografió y analizó de acuerdo a sus síntomas fueron codificadas según la finca de procedencia para permitir un adecuado manejo e identificación, se obtuvieron fragmentos de 10 mm de diámetro de mazorca con una parte enferma y sana mediante la utilización del sacabocado. Colocamos la muestra en un erlenmeyer de 100 mL para lavarlo con agua corriente de la llave durante cinco minutos usando un tamiz metálico, los discos fueron desinfectados en agitación continua con alcohol al 70 % durante tres minutos y nuevamente agitados en el erlenmeyer con agua estéril por dos minutos y colocados en la caja de Petri con papel filtro (cámara húmeda) (Figura 11). Luego se tomó fragmentos de mazorcas que muestran crecimiento micelial color blanco y con esporulación color crema estos fragmentos se colocaron en la cámara húmeda sin ser desinfectados.

Figura 11. Preparación de cámaras húmedas.

Conformada las cámaras húmedas fueron identificadas de acuerdo a las distintas formas de los segmentos como: Pn (puntos necrosos), Mch (manchas chocolatadas), Mac (manchas aceitosas), Tn (tejidos necrosados), Snd (segmentos no desinfectados), estas muestras se las colocó al ambiente del laboratorio aproximadamente por cinco días, después se identificaron los hongos filamentos con la utilización del microscopio estereoscopio. Se procedió a aislar el hongo con un asa estéril, se efectuó la siembra directa en la caja de Petri debidamente rotulada en ocho divisiones con medio de cultivo sólido PDA, se colocaron en la incubadora a una temperatura de 26 ºC para inducir la esporulación durante 15 días, se realizó placas que consta en hacer un raspado con un asa estéril sobre el micelio colocamos sobre el porta objeto previamente con presencia de una gota de lactofenol y se colocó el cubre objeto sobre la muestra (Anexo 1), con la utilización del microscopio clínico se permitirá la identificación de las estructuras morfológicas, según lo mencionado por Johnson *et al*. (1946).

Según Agrios (1996), para obtener colonias puras se realizan siembras en PDA, lo que consta repicar del borde de crecimiento del micelio del aislado en estudio. Para la multiplicación del hongo de las colonias puras se realizaron siembras en cajas de Petri con medio semi-sólido V8MAA (Anexo 2) las cuales se incubaron a 26 ºC durante 15 días, pasado ese tiempo se escogieron las que presentaban características típicas de *M. roreri.*

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

Se realizaron 10 repeticiones por aislado de cada finca para comenzar la caracterización cultural, morfológica y fisiológica, a los 21 días se observó nuevamente en el microscopio clínico y se identificaron los aislados de *M. roreri.* La codificación se realizó de acuerdo a la finca (Tabla 3). Las colonias fueron purificadas realizando repiques continuos en cajas de Petri con medio semi-sólido V8MAA debido a la contaminación de algunos repiques de los aislados.

Tabla 3. Codificación de aislados provenientes de las seis fincas.

FINCA	CÓDIGO DEL AISLADO
Finca 1	UEA-Mr1.6 UEA-Mr1.16 UEA-Mr1.29
Finca 2	UEA-Mr2.7 UEA-Mr2.12 UEA-Mr2.15
Finca 5	UEA-Mr5.3 UEA-Mr5.16 UEA-Mr5.17
Finca 6	UEA-Mr6.10
Finca 7	UEA-Mr7.13 UEA-Mr7.16 UEA-Mr7.17 UEA-Mr7.20 UEA-Mr7.28
Finca 8	UEA-Mr8.9 UEA-Mr8.10 UEA-Mr8.11 UEA-Mr8.19 UEA-Mr8.20

3.7.1 Determinación de los caracteres culturales de las colonias de los aislados de *M. roreri*

La caracterización cultural se efectuó por medio de un análisis cualitativo y cuantitativo. Evaluando el crecimiento diario de los aislados de *M. roreri* en medio de cultivo semi sólido V8MAA conforme a lo referido por Evans *et al.* (1978) y Phillips *et al.* (2006), se describieron las características culturales como la velocidad de crecimiento del micelio, color del micelio, color del reverso del micelio, textura, elevación, tipo de borde, presencia de cristales y líquidos de transpiración.

Se repicó cada aislado de *M. roreri* en cajas de Petri que contenían 18 mL de medio de cultivo semi sólido V8MAA, esterilizados en una autoclave a 121 °C y 1 atm por 15 minutos, según Phillips *et al.* (2006) y Villavicencio (2010). Se elaboró 10 repeticiones por aislado completamente selladas y codificadas, se colocaron a 26 °C en la incubadora hasta que el hongo completó su crecimiento micelial (Figura 12).

Figura 12. Siembra de aislados de *M. roreri* en medio semi-sólido V8MAA.

Diariamente se registró las diferentes variables establecidas para el hongo en estudio (Anexo 3). Por medio de observación visual se determinó el color del micelio, color de reverso de la caja, presencia de líquido transpiración, presencia de cristales, textura, elevación del micelio (mm) y borde, además se midió la velocidad de crecimiento (mm) de las colonias por cada aislado con la ayuda del calibrador pie de rey (Figura 13).

Figura 13. Registro y medición de caracteres culturales de colonias de *M. roreri.*

3.7.2 Evaluación de los caracteres morfológicos de los aislados de *M. roreri*

Se realizó la siembra de los aislados en medio de cultivo semi sólido V8MAA, donde se efectuó cuatro repeticiones por aislado luego fueron ubicadas en la incubadora a una temperatura de 26 °C durante 15 días, de acuerdo a lo indicado por Phillips *et al.* (2006) y Villavicencio (2010).

A partir de los 15 días se iniciaron las evaluaciones utilizando el microscopio trinocular óptico (100X), con cámara incluida Dino-Lite con el software DinoCapture 2.0, modelo MT4300H, con el que se diferenció sus estructuras y dimensiones (µm).

Para las mediciones de conidios se realizaron microcultivos donde se hizo la toma de segmentos de micelio, tanto del borde como centro del aislado, con un

asa estéril y colocada en porta-cubre objetos se observó en el microscopio trinocular óptico con un aumento de 100 X y se tuvieron en cuenta los criterios descritos por Evans (1978), para la identificación morfológica, se midió largo y ancho (µm) de 20 conidios tomadas completamente al azar de cada una de los aislados (Figura 14).

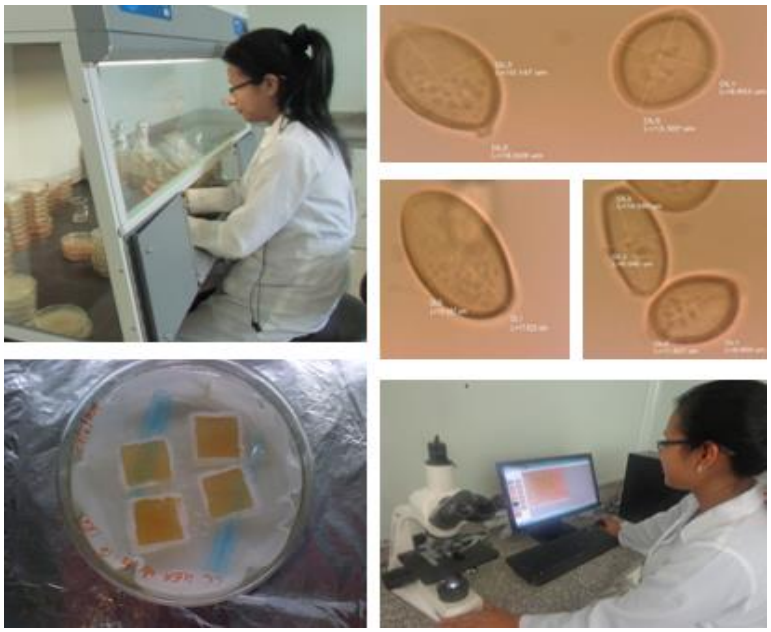


Figura 14. Elaboración de microcultivos y medición de conidios.

Para la realización del conteo de los conidios se preparó una solución de agua destilada estéril y una gota de Tween 80 (10 mL/aislado), esta solución se coloca dentro de la caja de Petri, después se agitan las cajas 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 procedió a tomar 10 µL con la micropipeta y colocar en la cámara de Newbauer (Figura 15).

Según Bastidas (2009), la fórmula utilizada para el cálculo de la concentracción de conidios es:

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

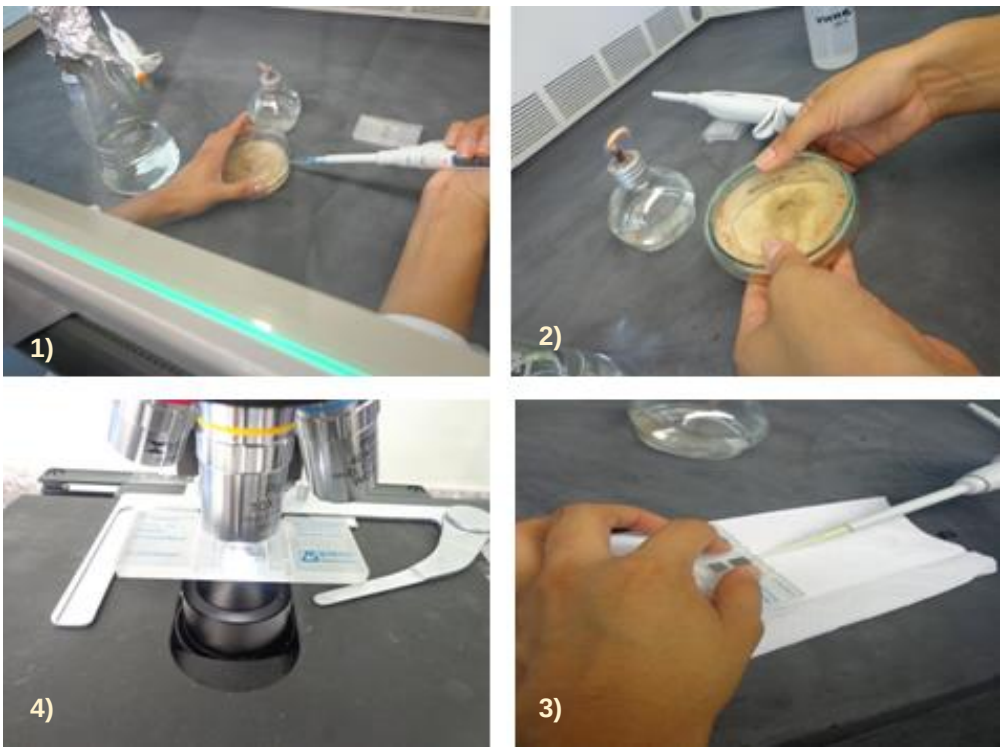


Figura 15. Proceso para el conteo de conidios en la cámara de Neubauer. **1)** Colocamos la disolución de agua destilada estéril con una gota de Tween 80 (10 mL/aislado). **2)** Agitamos la caja en forma circular en sentido y contra de las manecillas del reloj. **3)** Con la micropipeta se absorbe 10 µL y se coloca en la cámara de Neubauer. **4)** Se observa en el microscopio con el objetivo (10 X).

3.7.3 Caracterización de propiedades fisiológicas de los aislados de *M. roreri*

Para este estudio se utilizó el aislado UEA-Mr8.9 proveniente de la finca 8, correspondiente a la provincia de Morona Santiago debido a que presentó mayor crecimiento micelial en la caracterización cultural de *M. roreri.*

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

Se realizó con el propósito de determinar el pH de incubación más favorable para el crecimiento de *M.roreri.*

Se utilizó el medio líquido PDB esto se dispensó en dos Erlenmeyer de 500 mL, el pH fue modificado antes de esterilizarlo con hidróxido de sodio (NaOH) con una concentración 0,01 molar, luego se distribuyó en erlenmeyer de 100 mL con una concentración de 50 mL, fueron esterilizados en el autoclave a 121 °C y 1 atm por 15 minutos. Se dejó enfriar el medio para posteriormente realizar la

siembra de discos de micelio de 4,30 mm de diámetro en la cámara de flujo laminar con el asa de inoculación (Figura 16).

Figura 16. Crecimiento micelial del aislado UEA-Mr8.9 en medio líquido PDB.

Para este ensayo se utilizó una escala de 0,5 en un pH de 6 a 7,5 se realizaron 10 repeticiones por tratamiento se ubicó en la incubadora a una temperatura de 26 °C durante 21 días, tiempo transcurrido se realizó a la cosecha del micelio y obtener la masa húmeda y masa seca (mg) del micelio de cada repetición con la utilización de papel filtro.

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

Este segundo ensayo se desarrolló para determinar la temperatura de incubación adecuada para el crecimiento de *M.roreri.*

Se empleó el medio de cultivo semi sólido V8MAA donde se sembró el hongo en estudio con 10 repeticiones, con los diferentes tratamientos 15 °C se mantuvo en el refrigerador, mientras que en la incubadora se colocó a una temperatura de 20 y 25 °C (Figura 17), en la estufa a 30 y 35 °C, se fue evaluando por una duración de 15 a 20 días su crecimiento micelial (Anexo 4) y controlando su temperatura con termómetros de mercurio por medio de la observación diaria de las colonias.

Figura 17. Aislado UEA-Mr8.9 conservada a 25 ºC en la incubadora.

Influencia de la luz en el crecimiento de micelial de *M roreri.*

Este ensayo se realizó con la finalidad de determinar el tipo de luz más propicia para el crecimiento de *M. roreri.* Se inocularon discos de 4,30 mm en medio semi-sólido V8MAA con 10 repeticiones del aislado, los cuales fueron evaluados en diferentes condiciones de iluminación: luz blanca, natural, negra (figura 18) y oscuridad los aislados se midieron hasta que el micelio completó su crecimiento en la caja de Petri (Anexo 5).

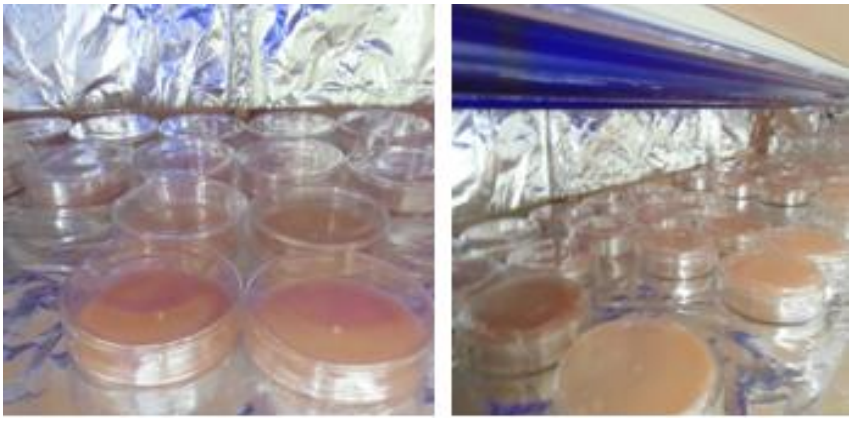


Figura 18. Aislado UEA-Mr8.9 en medio semi sólido V8MAA, creciendo en luz negra colocada en la cámara de esporulación modelo BLB40W 120V.

Capítulo IV

4. Resultados y discusión

Se obtuvieron 20 aislados que se correspondieron a los caracteres culturales, morfológicos y fisiológicos de *M. roreri* procedentes de seis fincas, de tres provincias amazónicas: Napo, Pastaza y Morona Santiago (Tabla 4).

Tabla 4. Sitios de procedencia de los aislados de *M. roreri.*

Finca	Provincia	Cantón	Sector	Código del aislado
1	Napo	Tena	Colonia Bolívar	UEA-Mr1.6 UEA-Mr1.16 UEA-Mr1.29
2	Napo	Tena	Ahuano	UEA-Mr2.7 UEA-Mr2.12 UEA-Mr2.15
5	Napo	Arosemena Tola	Arosemena Tola	UEA-Mr5.3 UEA-Mr5.16 UEA-Mr5.17
6	Napo	Tena	Misahualli	UEA-Mr6.10
7	Pastaza	Arajuno	Las peñas del Pozo	UEA-Mr7.13 UEA-Mr7.16 UEA-Mr7.17 UEA-Mr7.20 UEA-Mr7.28
8	Morona Santiago	Palora	La Comanche	UEA-Mr8.9 UEA-Mr8.10 UEA-Mr8.11 UEA-Mr8.19 UEA-Mr8.20

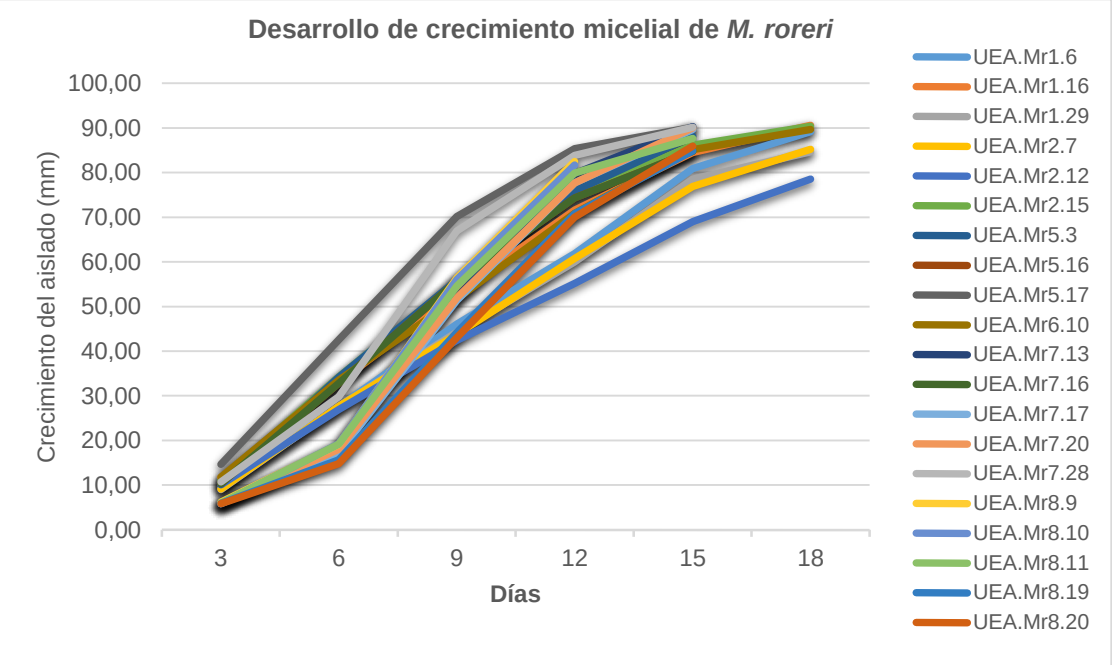
4.1 Determinación de los caracteres culturales de las colonias de los aislados de *M. roreri*.

4.1.1 Crecimiento micelial de *M. roreri.*

El crecimiento micelial inicial de *M. roreri* fue de 4,30 mm con un crecimiento final de 88 a 92 mm por caja de Petri completando el crecimiento entre los 12 a 18 días. La velocidad de crecimiento radial de los aislados fue de 7,30 mm/día,

resultado que coincide con lo mencionado por Phillips *et al.* (2006) y Villavicencio (2010).

La figura 19, indica que los aislados UEA-Mr8.9 y UEA-Mr8.10 procedentes de Morona Santiago llenaron la caja de Petri en 12 días, a los 15 días lo hicieron las colonias UEA-Mr5.3, UEA-Mr5.16, UEA-Mr5.17, UEA-Mr7.28 y UEA-Mr8.11, y entre 16 a 17 días los aislados UEA-Mr7.13, UEA-Mr7.16, UEA-Mr7.17, UEA-Mr7.20, UEA-Mr8.19, UEA-Mr8.20 y finalizaron el crecimiento micelial a los 18 días los aislados UEA-Mr1.6, UEA-Mr1.16, UEA-Mr1.29, UEA-Mr2.7, UEA-Mr2.12, UEA-Mr2.15 y UEA-Mr6.10, lo que coincide con lo informado por Villavicencio (2010), quien reporta que a los 15 días se desarrollaron aislados de *M. roreri* en medio V8MAA en la región costera de Ecuador.

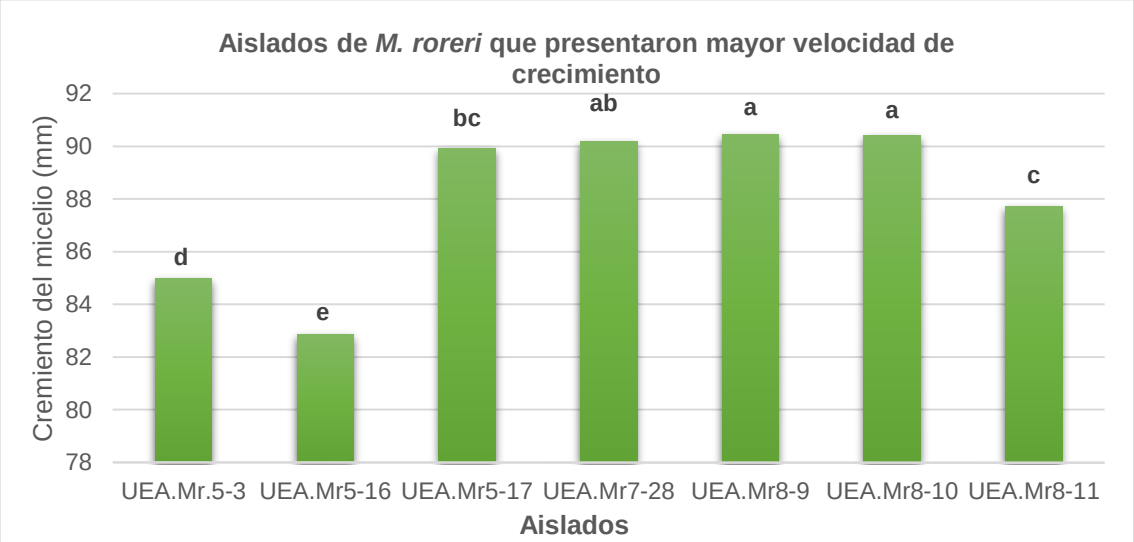


Prueba no paramétrica de Kruskall-Walis complementada con la prueba de Mann Whitney p ≤0,05 (n=10)

Figura 19. Desarrollo del crecimiento micelial de los 20 aislados de *M. roreri* en medio de cultivo semi sólido V8MAA a 26 °C**.**

De acuerdo a la figura 20, demuestra que de los 20 aislados de *M. roreri,* siete de ellos presentaron mayor velocidad de crecimiento micelial, donde a los 12 días se presentó un rápido desarrollo micelial correspondiente a UEA-Mr8.9 y UEA-Mr8.10, en comparación de los aislados UEA-Mr5.3, UEA-Mr5.16, UEA-

Mr5.17, UEA-Mr7.28 y UEA-Mr8.11 que lo hicieron a los 15 días en condiciones similares.



Prueba no paramétrica de Kruskall-Walis complementada con la prueba de Mann Whitney p≤0,05(n=10)

Figura 20. Aislados de *M. roreri* que presentaron mayor velocidad de crecimiento micelial.

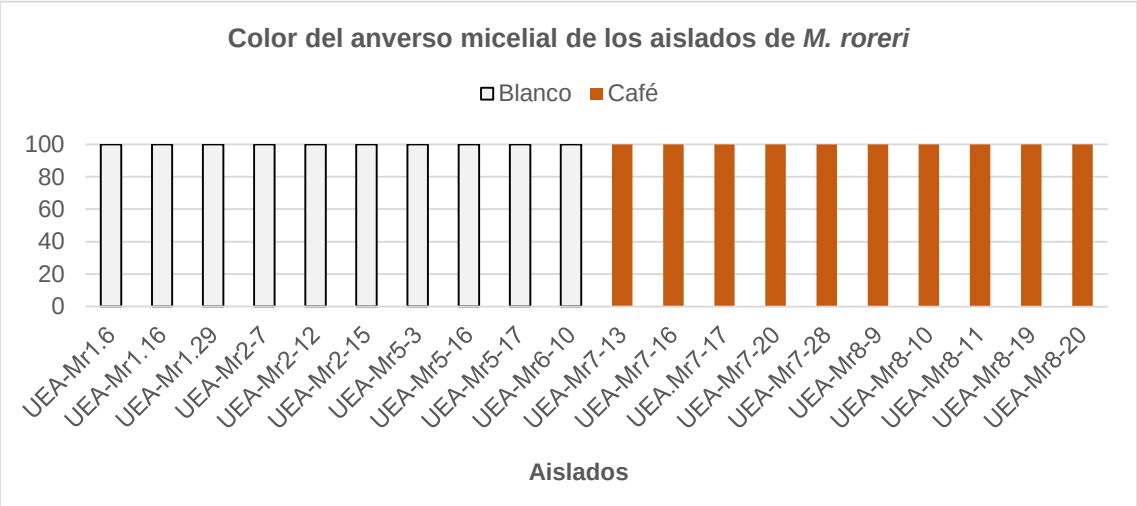
4.1.2 Color de anverso y reverso del micelio de *M. roreri*.

Las colonias de este hongo fitopatógeno, tienen una considerable variabilidad en cuanto a los tonos de coloración del micelio que varían del blanco, salmón, hasta el café (Phillips *et al.,* 2006), por lo que este parámetro no permite asegurar con certeza que los fenotipos de los aislados obtenidos pertenezcan a una misma especie.

Se observó en los aislados variedad en las tonalidades de los colores según el progreso de los días en el desarrollo del crecimiento micelial de *M. roreri*, manifestándose colores como: blanco, salmón y café debido a la formación de conidios con masa conidial pulverulenta (Tabla 5).

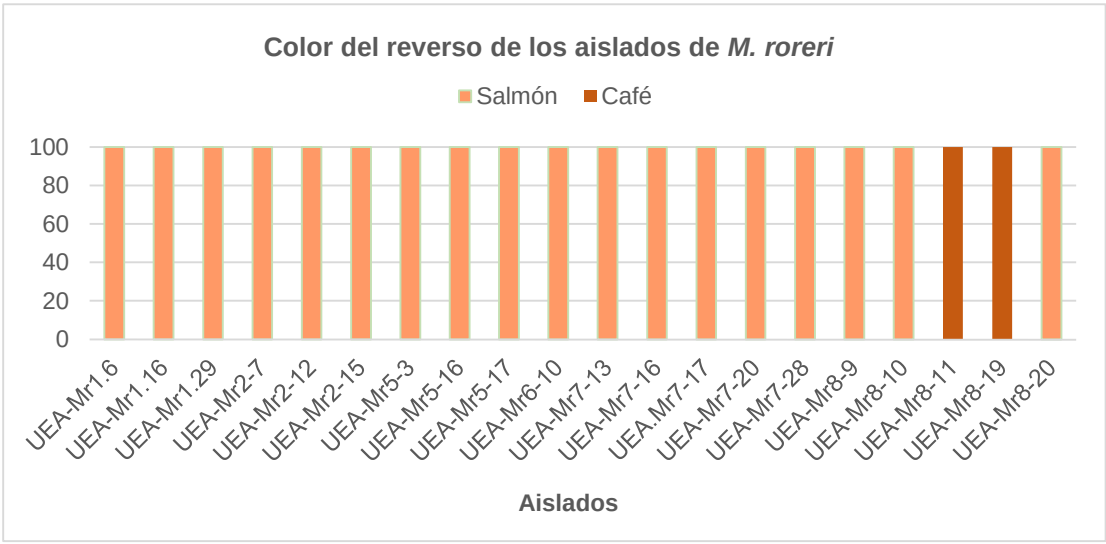
Existió variación en las tonalidades de los colores del micelio de los aislados en estudio, según la edad de las mismas, se pudo observar una coloración blanca en todo su desarrollo micelial en los aislados provenientes de Napo, mientras que los aislados procedentes de Pastaza y Morona Santiago se evidenció un cambio de color comenzando con una coloración blanca, luego con una

coloración salmón y finalizó con una tonalidad de color café coincidiendo con lo mencionado por Arbeláez (2010) y Villamil *et al.* (2012) (Figura 21).



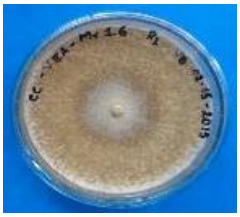
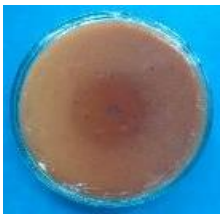
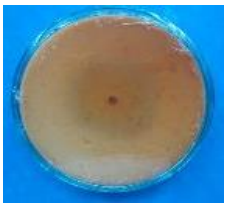
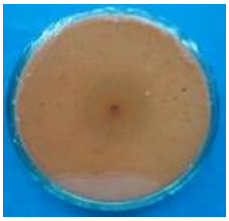
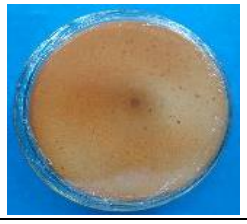
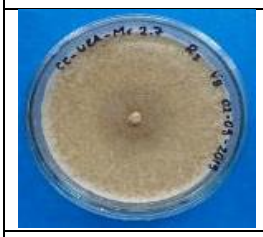
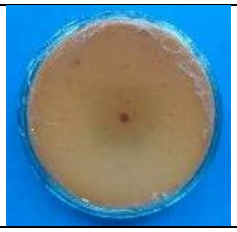
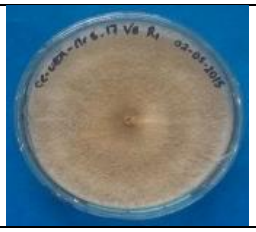
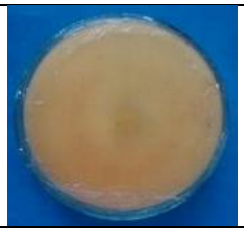
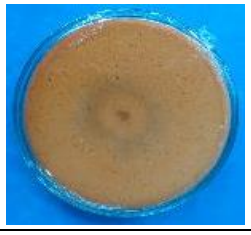
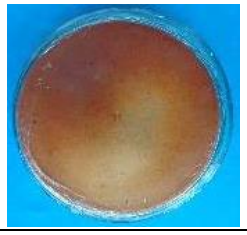
Distribución de frecuencias. Estadística descriptiva (n =10)
Figura 21. Color del micelio de los aislados de *M. roreri.*

Los colores del reverso de los aislados fue variando a medida del avance de los días sobre el crecimiento micelial, resultando tonalidades de color desde blanco a salmón, finalizando en café. De los 20 aislados, UEA-Mr8.11 y UEA-Mr8.19 procedentes de Morona Santiago (Palora) presentaron una coloración café, mientras que los aislados restantes se observó la tonalidad de color salmón coincidiendo con lo reportado por Evans *et al*. (1978) (Figura 22).

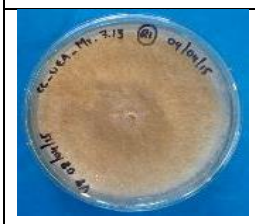
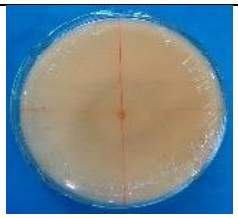
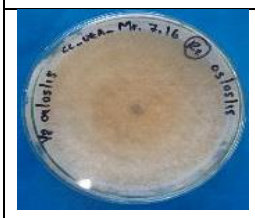
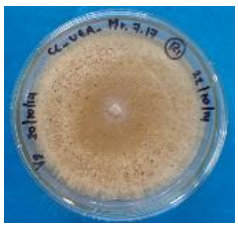
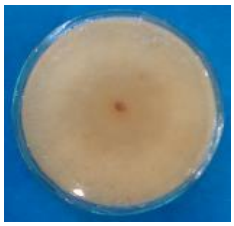
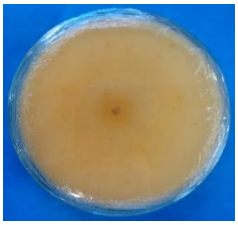
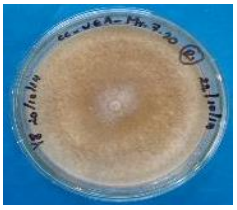
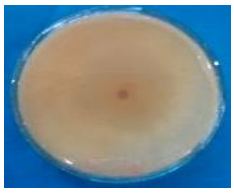
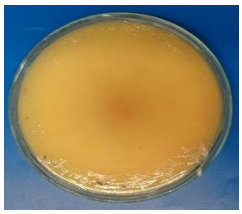
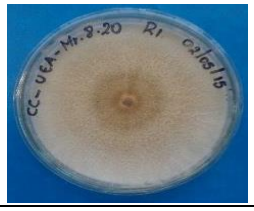


Distribución de frecuencia, Estadística descriptiva(n=10)
Figura 22. Color del reverso de las colonias de aislados de *M. roreri.*

Tabla 5. Color del micelio de las colonias en el anverso y reverso de los 20 aislados de *M. roreri,* en medio de cultivo semi sólido V8MAA a 26°C incubados durante 18 días.

Color del anverso del micelio	Color del reverso de la caja de Petri	Color del anverso del micelio	Color del reverso de la caja de Petri
UEA-Mr1.6		UEA-Mr2.12	
			
UEA-Mr1.16		UEA-Mr5.3	
			
UEA-Mr1.29		UEA-Mr5.16	
			
UEA-Mr2.7		UEA-Mr5.17	
			
UEA-Mr2.15		UEA-Mr6.10	
			

Continuación de la Tabla 5.

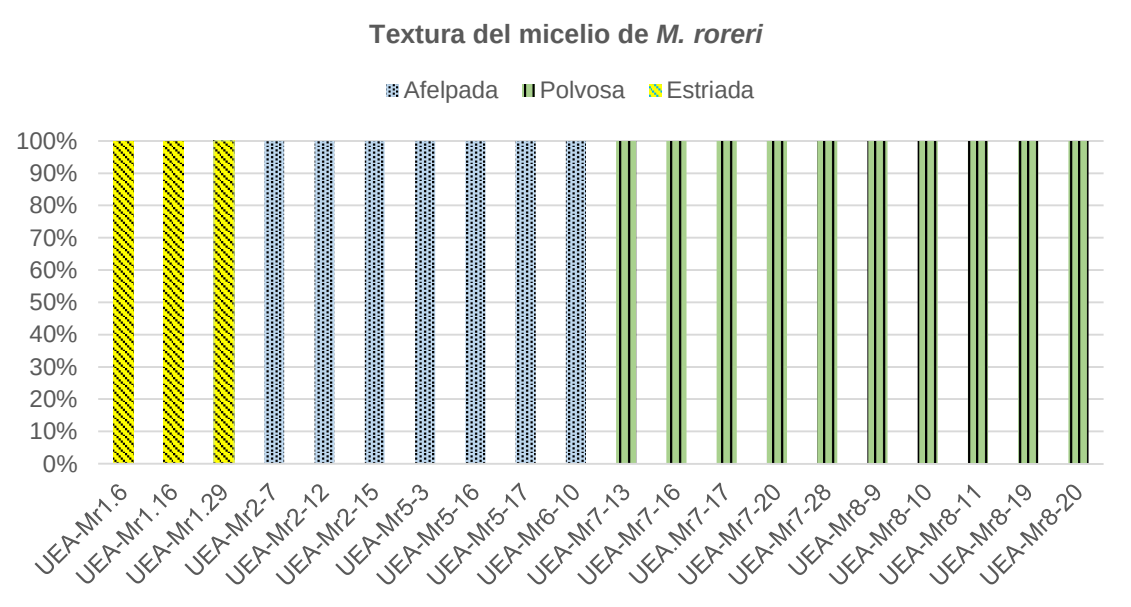
Color del anverso del micelio	Color del reverso de la caja de Petri	Color del anverso del micelio	Color del reverso de la caja de Petri
UEA-Mr7.13		UEA-Mr8.9	
			
UEA-Mr7.16		UEA-Mr8.10	
			
UEA-Mr7.17		UEA-Mr8.11	
			
UEA-Mr7.20		UEA-Mr8.19	
			
UEA-Mr7.28		UEA-Mr8.20	
			

4.1.3 Bordes

Todas las colonias de los aislados presentaron bordes regulares, coincidiendo con lo mencionado por Phillips *et al.* (2006), Villavicencio (2010) y Mosquera (2014) y difiriendo por Arbeláez (2010) quien destacó al borde plumoso como el más representativo en un estudio realizado en Colombia.

4.1.4 Textura

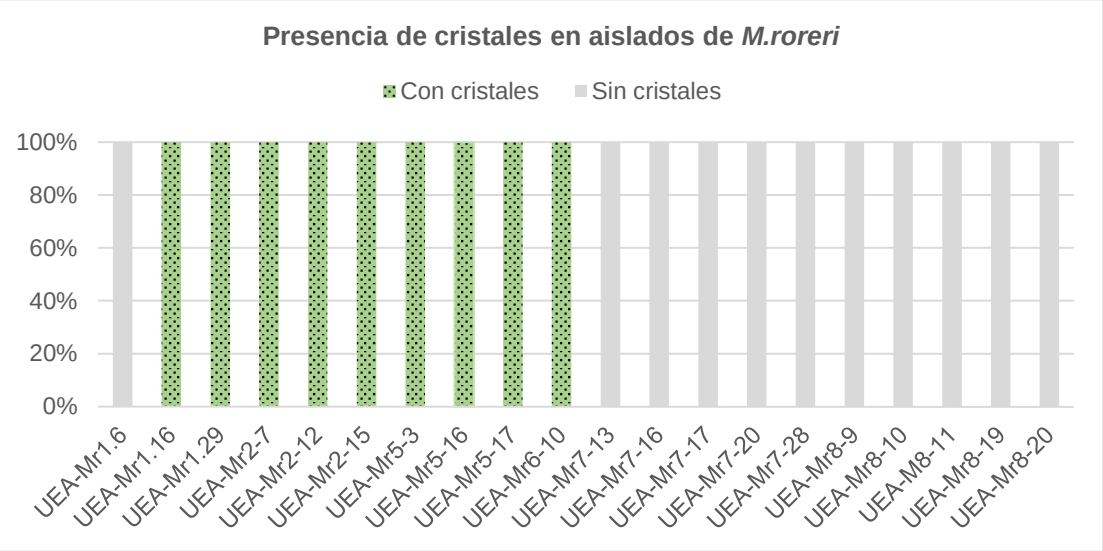
Se observó diversas texturas en las colonias, los aislados procedentes de Napo (Colonia Bolívar) presentaron textura estriada correspondiente al 15 %, la textura afelpada con 35 %, los aislados de Napo (Ahuano, Arosemena Tola y Misahualli); siendo la textura polvosa predominante con un 50 % en las colonias de Pastaza (Arajuno) y Morona Santiago (Palora) (Figura 23). Estos resultados se diferencian con el estudio de Arbeláez (2010), quien obtuvo una textura afelpada con el 79,3 % de las colonias de los aislados en Colombia.



Distribución de frecuencia, Estadística descriptiva (n=10)
Figura 23. Textura del micelio de colonias de aislados *M. roreri.*

4.1.5 Presencia de cristales

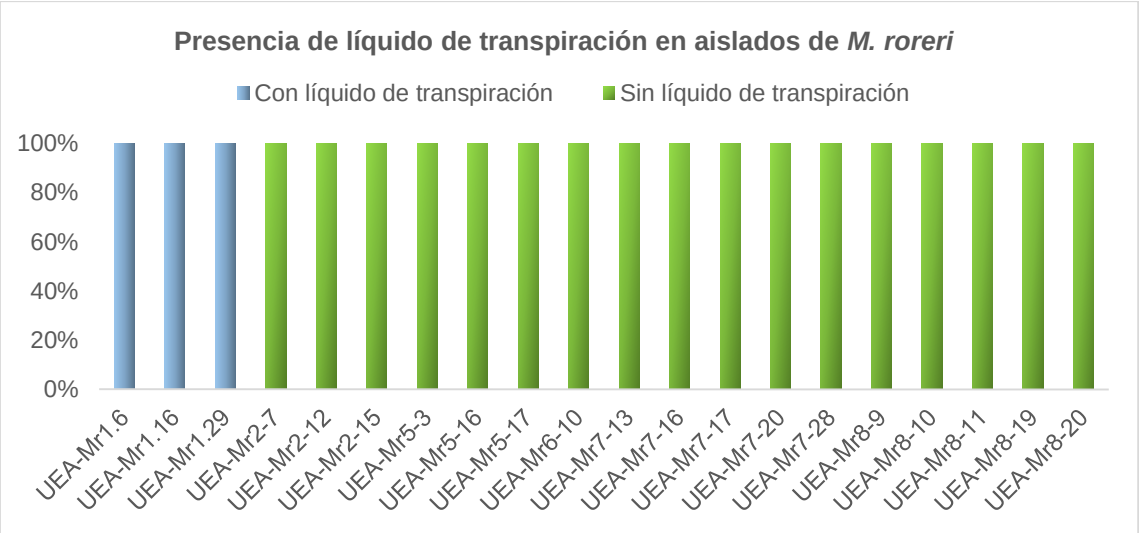
Esta variable se presenció en la mayoría de los aislados procedentes de la provincia de Napo a excepción del aislado UEA-Mr1.6, en todo su proceso de crecimiento. En el caso de Pastaza y Morona Santiago, no se observó la presencia de cristales en su desarrollo (Figura 24). Estos resultados coinciden con lo descrito por Mosquera (2014), quien al realizar un trabajo similar observo la presencia de cristales en todos los aislados de *M. roreri,* procedentes de la provincia del Napo – Ecuador.



Distribución de frecuencia, Estadística descriptiva(n=10)
Figura 24. Presencia de cristales en aislados de *M. roreri*.

4.1.6 Presencia de líquidos de transpiración

No se observó presencia de líquido de transpiración en 17 aislados, excepto en las colonias de los aislados UEA-Mr1.6, UEA-Mr1.16 y UEA-Mr1.29 procedentes de Napo (Ahuano), en donde se observaron gotas pequeñas (muy frecuentes) y grandes (menos frecuentes) (Figura 25). En la mayoría de los aislados los líquidos de transpiración fueron transparentes. Esto se diferencia con lo indicado por Mosquera (2014), quien reporta líquidos de transpiración en todos los aislados de su investigación.

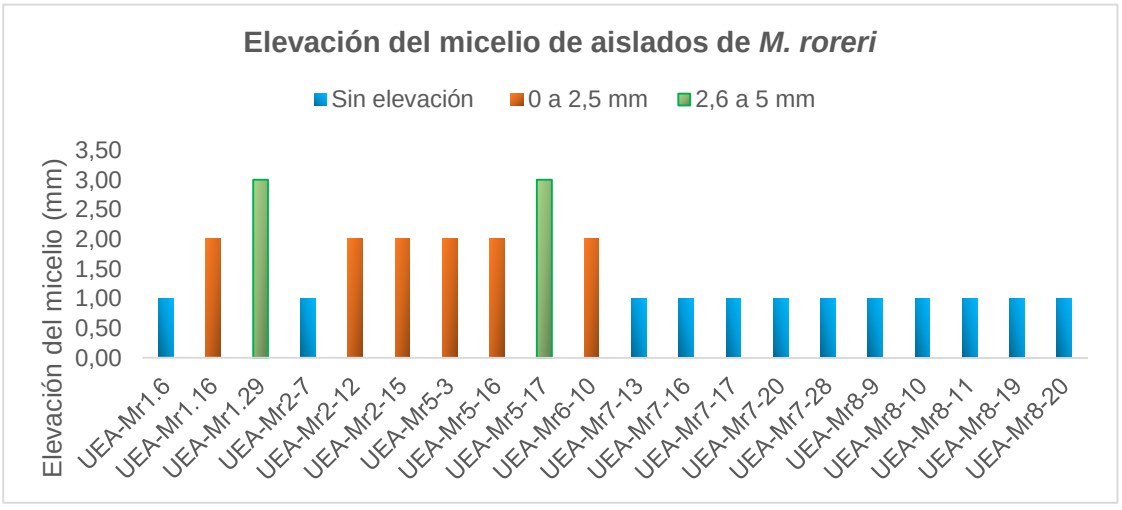


Distribución de frecuencia, Estadística descriptiva (n=10)

Figura 25. Presencia de líquido de transpiración en aislados de *M. roreri*

4.1.7 Elevación del micelio

En esta variable, las colonias de los aislados UEA-Mr1.6, UEA-Mr2.12, UEA-Mr2.15, UEA-Mr5.3, UEA-Mr5.16 y UEA-Mr6.10 procedentes de Napo presentaron una elevación en un rango de 0 a 2,5 mm los aislados UEA-Mr1.29 y UEA-Mr5.17 mostraron elevación de 2,6 a 5,0 mm durante los primeros 15 días de crecimiento, 12 aislados restantes no presentaron elevación (Figura 25). Estos resultados se diferencian con lo mencionado por Evans *et al*. (1978), quienes determinaron en la descripción taxonómica de *M. roreri* una elevación del diámetro de 8 a 15 mm en un período de crecimiento de 15 días.



Distribución de frecuencia, Estadística descriptiva (n=10)

Figura 26. Elevación de micelio de aislados de *M. roreri* en medio de cultivo semi sólido V8MAA a 26°C.

4.2 Evaluación de los caracteres morfológicos de los aislados de *M. roreri.*

Los caracteres culturales de las colonias fueron similares para todos los aislados sembrados en medio semi sólido V8MAA coincidiendo con lo referido por autores quienes han utilizado este medio para describir estos caracteres morfológicos. Luego de 15 días de haber inoculado los aislados tuvieron un desarrollo rápido alcanzando un diámetro de 80 a 92mm (Phillips *et al.* 2006; Arbeláez, 2010; Villavicencio 2010).

4.2.1 Forma de conidios y mediciones

En todos los aislados se presenció mayoritariamente esporas de forma globosas (7 – 9 µm de diámetro), sin embargo, también se encontraron formas subglobosas (12 – 16 µm de diámetro) y elípticas (8 – 20 x 5 -14 µm), obtenidas a partir de la conformación de microcultivos (Figura 27), coincidiendo con lo reportado por Evans *et al*. (1978).

Las formas de las esporas fueron globosas, subglobosas y elípticas coincidiendo con lo informado por Evans *et al.* (1978) y Suárez (2004), quienes describieron las formas de las esporas de *M. roreri* desde globosas a elipsoidales y por Holliday (1970), quien caracterizó a las esporas con formas globosas, sub-globosas o elipsoidales.

Figura 27. Tipos de esporas. **a)** globosa **b)** subglobosa **c)** elíptica.

No se pudo observar diferencias significativas entre aislados de *M. roreri* en cuanto al tamaño de las esporas. Presentaron un promedio en todos los aislados

de 8,60 µm. Las características de las esporas de los aislados correspondieron con las mencionadas por Evans *et al.* (1978), Phillips *et al.* (2006), Villavicencio (2010) para la especie de *M. roreri,* quienes describieron valores entre 8-15 µm.

En la Tabla 6, se muestra las dimensiones de ancho y largo promedio de las esporas producidas por los aislados de *M. roreri.*,donde se observa que el aislado UEA-Mr5.3 presentó el mayor valor de ancho con 8.93 µm, y el menor valor fue de 7,34 µm correspondiente al aislado UEA-Mr2.7. En relación al mayor valor promedio de largo corresponde a UEA-Mr8.9 con 10.78 µm, y el aislado de menor valor promedio fue UEA-Mr2.7 con 7,42 µm de largo.

Tabla 6. Dimensiones promedio de las esporas producidas por aislados de *M.roreri.*

Aislados	Ancho de las esporas (µm)	Largo de las esporas (µm)
UEA-Mr1.6	7.527±0.161 **efg**	7.771±0.152**efg**
UEA-Mr1.16	7.834±0.133 **cdefg**	7.967±0.133**efg**
UEA-Mr1.29	7.666±0.167 **defg**	7.679±0.175**fg**
UEA-Mr2.7	7.340±0.137 **g**	7.428±0.148 **g**
UEA-Mr2.12	7.419±0.137 **fg**	7.537±0.136 **g**
UEA-Mr2.15	7.342±0.137 **g**	7.458±0.128 **g**
UEA-Mr5.3	8.930±0.206 **a**	9.811±0.337**abc**
UEA-Mr5.16	8.587±0.175 **abcd**	9.750±0.411**abc**
UEA-Mr5.17	8.687±0.206 **abc**	9.460±0.331**abcd**
UEA-Mr6.10	7.407±0.156 **fg**	7.657±0.169**fg**
UEA-Mr7.13	7.922±0.220 **bcdefg**	8.196±0.246**defg**
UEA-Mr7.16	8.477±0.192 **abcde**	8.840±0.218**cdefg**
UEA-Mr7.17	8.704±0.171 **abc**	9.027±0.187**cdef**
UEA-Mr7.20	8.330±0.212 **abcdef**	8.731±0.206**cdefg**
UEA-Mr7.28	8.564±0.235 **abcd**	9.453±0.274**abcd**
UEA-Mr8.9	8.663±0.218 **abc**	10.781±0.605 **a**
UEA-Mr8.10	8.786±0.256 **ab**	10.557±0.603 **ab**
UEA-Mr8.11	8.719±0.213 **abc**	9.229±0.266**bcde**
UEA-Mr8.19	8.112±0.158 **abcdefg**	8.803±0.219**cdefg**
UEA-Mr8.20	8.678±0.201 **abc**	9.110±0.185**bcdef**

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren por la prueba de C de Dunnett para p≤0.05.

4.2.2 Concentración de conidios

La concentración de conidios a los 15 días fue de 1.02 x 10^6 esporas /mL^{-1} (figura 28) este resultado coincidió con lo reportado por Villavicencio (2010), quien utilizó agar extrato de malta al 2 %, determinó que la concentración de esporas fue de 1,00 x 10^6 esporas/ mL^{-1}. Estos resultados difieren con Arbélaez (2010), que alcanzó la producción de esporas en un rango muy amplio entre valores de 3,63 x 10^6 y 7,09 x 10^6 esporas/ mL^{-1}.

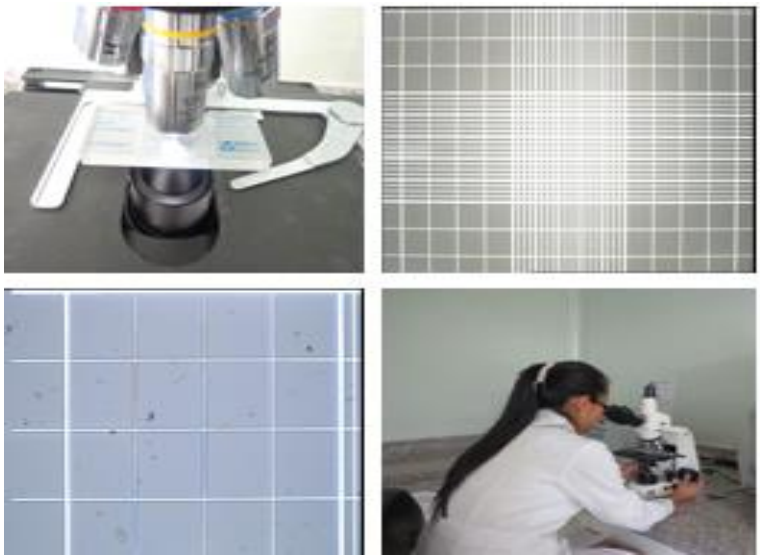


Figura 28. Observación de concentración de conidios en cámara de Neubauer.

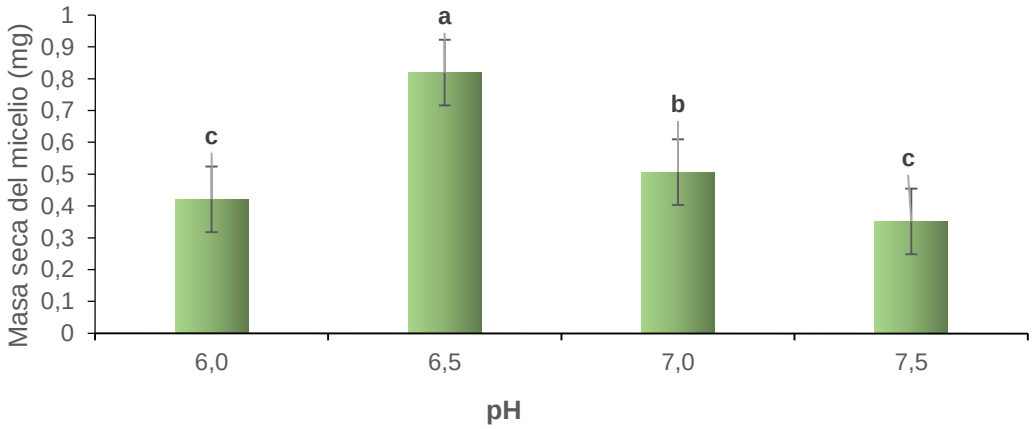
4.3 Caracterización de propiedades fisiologicas de los aislados de *M. roreri.*

El aislado UEA-Mr8.9 procedente de la provincia de Morona Santiago (Palora) perteneciente a la finca 8 (Sector La Comanche) fue el que presentó mayor crecimiento micelial en la caracterización cultural de *M. roreri* por lo que se escogió para la continuidad de los ensayos en esta caracterización.

4.3.1 Influencia del pH en el crecimiento micelial de *M. roreri*

Se utilizó para este parámetro el medio de cultivo líquido PDB, donde se presenció crecimiento micelial expresado en masa seca (mg). El pH 6,5 resultó el más favorable para un mejor crecimiento con una masa seca de 8.2 mg; en el pH 7,0 de 0.51 mg de masa seca, para pH 6,0 resultó con un valor de 0.42 mg

de masa seca y el pH 7,5 (0.35 mg), los cuales tuvieron diferencias significativas entre sí (Figura 29). Esto coincide con lo descrito por Villegas (1979), que al realizar un estudio similar en Colombia, determinó que *M. roreri* puede crecer en un rango de pH entre 3,5 y 8,0, donde el desarrollo micelial más abundante fue en un pH 5,0 y 6,0.



Prueba no paramétrica de Kruskall Waliscomplementada con la prueba de Mann Whitney p ≤0,05(n=10)

Figura 29. Influencia del pH sobre el crecimiento micelial en medio PDB.

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

El aislado UEA.Mr.8.9, fue evaluado en cinco diferentes temperaturas de incubación (15, 20, 25, 30 y 35 ºC), donde se determinó que hubo crecimiento micelial constante con temperaturas de 20 y 30 ºC. Mientras que a los 15 y 35 °C, existió un crecimiento lento debido que entre los 6 a 10 días se detuvo el crecimiento micelial. Continuamente a la temperatura de 25 °C se determinó una velocidad de crecimiento de 7,30 mm/día, convirtiéndose en una temperatura óptima con respecto a los demás tratamientos. Este parámetro permitió destacar la importancia de la temperatura de incubación que beneficia al crecimiento micelial de *M. roreri* en condiciones controladas.

Según Villamil *et al.* (2012), en la producción de micelio de *M. roreri in vitro* en medio de cultivo PDA se obtuvo un crecimiento micelial favorable a una temperatura de 25 °C, resultados similares al presente trabajo.

Con referencia a la investigación realizada por Evans *et al*. (1978), en la descripción de las características morfológicas de *M. roreri*, determinaron que las temperaturas de crecimiento óptimo fueron de 25 a 26 °C con una temperatura máxima de 33 °C, dando respuestas semejantes con la investigación en estudio.

Tabla 7. Influencia de la temperatura sobre el crecimiento micelial de *M. roreri* en el aislado UEA-Mr8.9

Días / Temperatura	3	6	9	12
15	7.20 e	7.20 d	10.75 d	10.90 d
20	35.90 b	26.10 b	25.50 c	27.00 c
25	25.05 c	39.80 a	44.70 a	45.50 a
30	44.80 a	40.60 a	36.30 b	34.00 b
35	14.55 d	13.80 c	10.25 d	10.10 d

Rangos promedios con letras diferentes en una misma columna difieren según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba de Mann-Whitney para p≤0.05.

4.3.3 Influencia de la luz en el crecimiento micelial de *M. roreri*

Se evaluaron distintas condiciones de iluminación (luz natural, blanca, negra y oscuridad), donde se utilizó el aislado UEA-Mr8.9 observando un crecimiento micelial de *M. roreri.* La tabla 8, nos muestra que en oscuridad se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento micelial con un valor de 7,30 mm/día, a su vez luz negra fue el tratamiento que demostró un crecimiento micelial más lento.

Los resultados coinciden con Rumbos *et al.* (2005) quienes indican que este patógeno crece lento y de forma irregular en condiciones de luz ambiente (alternancia luz-oscuridad), luz fluorescente continua y en ciclos alternos de fluorescentes y oscuridad. El parámetro iluminación es un factor importante que se debe considerar fundamental en la influencia sobre crecimiento micelial en condiciones controladas.

Tabla 8. Influencia de la luz en el crecimiento micelial del aislado UEA-Mr8.9

Días / Tratamientos	3	6	9	12	15
Oscuridad	31.85 a	34.90 a	35.50 a	35.50 a	35.50 a
Luz blanca	18.20 b	17.00 b	21.30 b	21.10 b	23.60 b
Luz natural	11.50 c	14.5 b	8.50 c	19.90 b	17.40 c
Luz negra	20.45 b	15.85 b	16.70 bc	5.50 c	5.50 d

Rangos promedios con letras diferentes en una misma columna difieren según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba de Mann-Whitney para p≤0.05 (n=10).

Capítulo V

5. Conclusiones

1. Se obtuvieron 20 aislados de la especie *M. roreri* procedentes de seis fincas correspondientes a las provincias de Napo, Pastaza y Morona Santiago.

2. Los aislados alcanzaron una velocidad de crecimiento de 7,30 mm/día, siendo UEA-Mr8.9, UEA-Mr8.10 los que presentaron mayor crecimiento, observándose tonalidades de coloración desde blanco, salmón hasta café, con una textura polvosa predominante con un 50 % en las colonias de los aislados de *M. roreri.*

3. Se observó tres formas de conidios: globosas, subglobosas y elípticas, con un tamaño promedio 8,60 µm entre todos los aislados.

4. La temperatura de 25 °C, el pH 6.5 y la oscuridad favorecieron el crecimiento del micelio de *M. roreri*, en el aislado UEA-Mr8.9

6. Recomendaciones

1. Para futuras investigaciones con *M. roreri* se recomienda utilizar el aislado UEA-Mr8.9, debido a su mejor respuesta en la caracterización cultural.

2. Conservar los aislados a corto o largo plazo, lo que facilite trabajos sobre el hongo de *M. roreri.*

3. Realizar una caracterización cultural, morfológicas y fisiológicas de nuevos aislados para conocer las distintas variables que pudiera existir entre los mismos, procedentes de diversas partes del país

4. Se recomienda la continuidad de la investigación de los aislados, a través de la caracterización molecular, lo que permitirá una identificación específica del patógeno.

7. Resumen

La presente investigación consistió en caracterizar cultural, morfológica y fisiológicamente aislados de *Moniliophthora roreri in vitro* procedentes de la Amazonía ecuatoriana. Se recolectaron frutos de cacao nacional con síntomas de moniliasis producidos de manera orgánica, procedentes de las provincias de Napo (Ahuano, Arosemena Tola y Misahualli), Pastaza (Arajuno) y Morona Santiago (Palora). Se realizaron aislamientos del patógeno donde fueron evaluados e identificadas mediante caracteres culturales (velocidad de crecimiento radial, color de micelio y color de reverso de la caja de Petri, textura, borde, presencia de líquidos de transpiración, elevación y presencia de cristales), características morfológicas (forma, tamaño y concentración de conidios) y caracteres fisiológicos (influencia de las condiciones de iluminación, temperatura y pH sobre el crecimiento micelial de *M. roreri*) con el propósito de viabilizar alternativas para el control biológico del patógeno. El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica. Para los diferentes ensayos se utilizaron medios de cultivo semi sólido (PDA y V8MAA) y líquido (PDB). En relación a las características culturales no hubo diferencia significativa en el borde, pero existió cambios en las tonalidades de color iniciando con blanco, pasando a salmón y café, con diferente textura como polvosa, estriada y afelpada. También el tamaño y forma de conidios se distinguieron, reconociendo a tres tipos de esporas como globosas, subglobosas y elipsoidales. Se estableció pH 6.5 como el óptimo para el crecimiento micelial de *M. roreri* con una temperatura de 25 °C, permitiendo un mejor desarrollo micelial en oscuridad.

Palabras claves: aislados, cacao, crecimiento micelial, conidios, medios de cultivo.

8. Abstract

This research was focused on cultural, morphological and physiological characterization of *Moniliophthora roreri* under *in vitro* conditions. It is a phytopathogenic fungus of cacao fruits, isolated from the Amazonian Ecuador. National cacao fruits with symptoms of thrush produced organically were collected from the provinces of Napo (Ahuano, Arosemena Tola and Misahualli), Pastaza (Arajuno) and Morona Santiago (Palora). The pathogenic isolates were assessed and identified by the cultural (radial growth rate, color of mycelium and color back of the Petri dish, texture, edge, presence of liquid perspiration, elevation and presence of crystals), morphological (shape, size and concentration of conidia) and physiological characteristics (influence of lighting conditions, temperature and pH on the mycelial growth) for the purpose of making viable alternative for the biological control of the pathogen. The experimental work was performed in the laboratory of Microbiology at the Amazon State University. For different assays, semi solid (PDA and V8MAA) and liquid culture media (PDB) were used. In relation to cultural characteristics there was no significant difference in the edge, but there were different color shades starting from white, passing salmon and coffee, with different texture and dusty, striated and velvety. Also the size and shape of conidia were varying, recognizing three types of spores as globose, subglobose and ellipsoidal. The optimal pH and temperature for the mycelia growth of *M. roreri* were 6.5 and 25 °C, respectively, allowing a better mycelial growth in darkness.

Keywords: isolates; cocoa; conida; mycelia growth; culture media

9. Bibliografía

1. Alianza para crear Oportunidades de Desarrollo Rural a través de Relaciones Agro empresariales (ACORDAR) 2009. Cacao Orgánico, Manual de cultivo. Managua-Nicaragua. 40 pp.

2. Agrios, G. 1996. Fitopatología; 2ª edición; Edit. Limusa ;México

3. Alarcón, J.; Arévalo, E.; Díaz, A. y J. Galindo. 2012. Manejo fitosanitario del cultivo de cacao. ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). Produmedios. Bogotá, Colombia. 17 pp.

4. Ampuero, E. 1967. Monilia pod rot of cocoa. Cocoa Grower's Bulletin. 9:1518.

5. Agencia Publica de Noticias del Ecuador y Suramérica (ANDES) 2015,06 de mayo (ANDES). La ruta amazónica del Cacao en Ecuador, un paraíso de sabores nacido de emprendimientos comunitarios. Recuperado el 4 de octubre de 2015, de http://www.andes.info.ec/es/noticias/ruta-amazonica-cacao-ecuador-paraiso-sabores-nacido-emprendimientos-comunitarios.html

6. Asociación Nacional de Exportadores de Cacao (ANECACAO). 2013.

   Recuperado el 7 de mayo de 2013, de http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-en-ecuador.html

7. Asociación Nacional de Exportadores de Cacao (ANECACAO). 2015. Recuperado el 12 de septiembre de 2015, de http://www.anecacao.com/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html

8. Angulo, F. 2009. *Evaluación de cuatro bioestimulantes comerciales en el desarrollo de plantas injertas de cacao (Theobroma cacao L.)cultivar nacional. (*Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador).

9. Arbeláez, L. 2010 Análisis de la diversidad intraespecie de *Moniliophthora roreri (*Cif) Evans et al., por medio de marcadores morfológicos y genéticos. Tesis para optar al título de Magister en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 80 pp.

10. Arévalo, GE. 1992. Estudio de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans *et. al*. en la Selva Norte del Perú. Tesis Msc. Escuela de Graduados. UNA La Molina. Lima, PE. 93 pp.

11. Arévalo, E.; Zúñiga, L.; Arévalo, C.; Adriazola, J. 2004. *Cacao. Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonía peruana*. ICT. Chiclayo, Perú. 184 pp.

12. Attanasia, A. 2007. Chocolate: Origen e Historia. Recuperado el 28 de agosto de 2015, http://www.monografias.com/trabajos7/choco/choco.shtml

13. Ayala, M. 2008. Manejo integrado de moniliasis (*Moniliophthora roreri)* en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L*.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agropecuario. ESPOL (Escuela Superior Politécnica del Litoral). Guayaquil, Ecuador. 115 pp.

14. 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.

15. Bastidas, O. 2009. Technical Note-Neubaver Chamber Cell Counting. 6 pp.

16. Batista, L. 2009. Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana. CEDAF .Santo Domingo, República Dominicana. 250 pp.

17. BIOSCIENCE, 2004. Databases. Classification based on 9th edition of Dictionary of the Fungi. Recuperado 8 Noviembre, 2012, http://www.indexfungorum.org./Names/NamesRecord.asp?RecordID=219848.

18. Ciferri, R. & Parodi, E. (1933). «Descrizione del fungo che causa la "Moniliasi" del cacao.». Phytopathologische Zeitschrift 5: 539–542.

19. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), (2008). Manejo Integral de la Moniliasis de Cacao. Una propuesta técnica y educativa. Bogotá-Colombia. 68 pp.

20. Instituto para el Ecodesarrollo de la Región Amazónica Ecuatoriana (ECORAE) 2001. Compendio de recomendaciones tecnológicas para los principales cultivos de la Amazonia Ecuatoriana. Quito. Ecuador. Editorial. Nina comunicaciones. 13 pp.

21. ECUADOR COSTA AVENTURA. (2013). Recuperado el 2 de septiembre de 2015, http://ecuadorcostaaventura.com/cacao.html

22. Egas, J. 2010. Efecto de la inoculación con azobactersp. en el crecimiento deplantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao*), genotipo nacional, en la provincia de esmeraldas. (Tesis de Pregrado, Escuela Politécnica Nacional, Esmeraldas, Ecuador).

23. El Agro. (2014, 31 de julio). Mercados del cacao. Recuperado el 4 de septiembre de 2015, http://www.revistaelagro.com/2014/07/31/mercados-del-cacao/

24. EL TELÉGRAFO. (2013, 15 de enero). ECONOMIA. Ecuador exporto $ 425,7 millones en cacao en 2012. Recuperado el 28 de Febrero de 2013, http://www.telegrafo.com.ec/economia/item/ecuador-exporto-4257-millones-en-cacao-en-2012.html

25. Enríquez, G. 2004. Cacao orgánico. *Guía para productores ecuatorianos*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Manual No. 54. Quito, Ecuador. pp 360.

26. Enríquez, G. 2010. Cacao orgánico. *Guía para productores ecuatorianos*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Manual No. 54. Quito, Ecuador. pp 407.

27. Enríquez, G.; Soria, V. 1977. Mejoramiento genético para resistencia a cinco enfermedades del cacao. Turrialba, Costa Rica, CATIE Internacional In Sexta Internacional sobre investigaciones en cacao. Caracas, Venezuela, pp 7.

28. Enríquez, G.; Soria, V. 1978. Monilia disease of cocoa in Costa Rica. Turrialba, Costa Rica. pp 339-340.

29. Evans, H.; Stalpers, J.; Samson, A. y G. Benny.1978. On the taxonomy of *Monilla roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany. 56: 2528- 2532.

30. Evans, C. 1981. Pod Rot of cacao caused by *Moniliophthora* (Monilla) *roreri.* Phytopathological. 44 pp.

31. Evans, H. 2007. Cacao diseases. The trilogy revisited. Phytopathology 97. pp 1640-1643.

32. Evans, C.; Holmes, K.; Phillips, W. y J. Wilkinson. 2002. What is a name: *Crinipellis,* the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cacao. Mycologist.16 (4): 148- 152.

33. Evans, H.; Holmes, K. y A. Reid. 2003. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. Plant Pathology 52: 476-485.

34. Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), 2012. Guía técnica del cultivo de del Cacao. Federación Nacional de Cacaoteros. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

35. Fondo nacional del Cacao. 2011. Campaña contra la Moniliasis del cacao. 22pp.

36. Garrido, E., y Solís, J. 2012. La Moniliasis (*Moniliophthora roreri Cif & Par*) del cacao: búsqueda de estrategias de manejo. México. 7pp

37. Guerrero, G. 2014. Revista Líderes. MERCADOS. El Cacao ecuatoriano Su historia empezó antes del siglo XV. *Los orígenes del cacao historia.* Recuperado el 04 de diciembre de 2014 de, http://www.revistalideres.ec/mercados/Cacao-Ecuador-chocolate-cultivo-exportacion_0_1153684651.html

38. González, A., y Robles, A. 2014. Aislamiento y caracterización del hongo Moniliophthora roreri (Monilla) en frutos de *Theobroma cacao L*. (Cacao) del cultivar San José del Real de la carrera Usulutan. UES. (Universidad de El Salvador). San Salvador, El Salvador. 193 pp.

39. Hebbar, P. 2007. Cacao Diseases: A global perspective from an industry point of view. Phytopath. 97:1658 - 1663.

40. Hernández, T.; Ríos, M. y E. Arévalo. 1991. Enfermedades del cacao sistema de producción en la Amazonia Peruana. pp 37-44.

41. Hipernova.cl. 2012. “El cacao: plantaciones, producción, polinización, plagas, variedades, Composición y efectos del cacao.” Recuperado de http://www.hipernova.cl/Notas/ElCacao.html

42. Holliday, P. 1970. *Monilia roreri.*C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria 226. Commowealth Agricultural Bure, London and Reading.

43. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2012. Manejo fitosanitario del cultivo de cacao (*Theobroma cacao L*.). Medidas para la temporada invernal. Bogotá D.C. Colombia. Código: 00.09.39.12C. pp 40.

44. International Cocoa Organization (Organización Internacional del Cacao) (ICCO). "GrowingCocoa" . 23 de Agosto de 2007. Recuperado el 05 de Mayo de 2013. http://www.icco.org./about/growing.aspx

45. Johnson, E. 1946. An Improved Slide Culture Technique for the Study and Identification of Pathogenic Fungi. J Bacteriol. 51(6): 689-694.

46. La Lima, Cortés, Honduras, C.A. (2012). Proyecto promoción de sistemas agroforestales de alto valor con cacao en honduras la moniliasis del cacao: el enemigo a vencer, Centro de Comunicación Agrícola de la FHIA, Honduras.

47. La Republica. (2012, 6 de julio). Ecuador, líder en la exportación de cacao fino que cautiva paladares europeos. Recuperado el 15 de Agosto del 2013 de, http://www.larepublica.ec/blog/economia/2012/07/06/ecuador-lider-en-la-exportacion-de-cacao-fino-que-cautiva-paladares-europeos/

48. LÍDERES (2014,09 de julio). El Cacao ecuatoriana Su historia empezó antes del siglo XV. Recuperado el 10 de septiembre de 2015, http://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano-historia-empezo-siglo.html

49. LÍDERES (2015, 30 de agosto). El cacao tiene que sortear algunos inconvenientes. Recuperado el 10 de octubre de 2015, http://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-produccion-exportaciones-magap.html

50. Loor, N., y Sornoza, C., 2011.Diseño e instalación de un sistema de riego por aspersión, para el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en el área de la carrera agrícola de la espam-mfl. (Tesis de pregrado, Escuela Superior

Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López,Calceta, Ecuador).

51. Marqués, 2014. EL CACAO. El cultivo del cacao en el mundo. Recuperado el 14 de agosto de 2015 de, http://www.confiteriamarques.com/index.php/m,38/el-cultivo-del-cacao-en-el-mundo.

52. Mosquera, L. 2014.Caracterizacion 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 para optar por el título de Ingeniería Agropecuaria UEA (Universidad Estatal Amazónica). Puyo, Ecuador. 89 pp.

53. Navarro M., y Mendoza., J. 2009.Guia técnica para promotores. Cultivo del Cacao en Sistemas Agroforestales. Rio San Juan-Nicaragua. pp 14,15-52.

54. 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.

55. Paredes, N. 2009. Manual de cultivo de cacao para la Amazonía ecuatoriana. Instituto nacional autónomo de investigaciones agropecuarias estación experimental central de la Amazonía DENAREF unidad de recursos fitogenéticos. Manual No. 76. INIAP, Quito-Ecuador. pp. 43.

56. Phillips, W. 2003. Origin, Biogeography, Genetic Diversity and Taxonomic Affinities of the cacao Fungus *Moniliophthora roreri* as determined using Molecular, Phytopathological and Morpho-Physiological Evidence.Tesis para aspirar al título de Doctor en Ciencias.UK: University of Reading. 349 pp.

57. Phillips-Mora, W. 2006. La moniliasis del cacao: un enemigo que podemos y debemos vencer. En: Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo, Ecuador. pp. 21-25.

58. Phillips, M.;Coutiño, F.; Ortiz, P.; López, J. y A. Hernández. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in México. Plant pathology. 55-58.

59. Phillips-Mora, W & M. Wilkinson. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. Symposium Cacao Diseases: Important threats to chocolate Production Worldwide. Phytopathology. 97 (12): 1644-1647.

60. Porras, V. y Sánchez, J. 1991. Enfermedades del cacao. Características de las enfermedades del cacao. Mazorca negra. Lima.

61. Purdy, L. 1999. Fangal disease of cacao. *In:* Research Methodology in biocontrol of plant disease with special reference to fungal diseases of cocoa. Workshop manual. CATIE. Turrialba, CR. pp 7 - 18.

62. Ramírez, S. 2008. La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao México. Tecnología en Marcha. 21 (1); 97-110.

63. Robles, B. 2008. Validación de biopesticidas en base a bacterias epífitas para el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par. Evans et al.)en el cultivo de cacao híbrido CCN 51. Tesis Ing. Agr. Escuela Politécnica del Ejército. Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA. Santo Domingo de los Colorados, EC. 118 pp.

64. Rodríguez, L., Mujica, J., y Cubillo, G. 2005.Manejo integrado de la moniliasis del cacao. Corpoica. Litografía La Bastilla Ltda. 48 p.

65. Rorer, J. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos modernos y apropiados al cultivo. Traducción al español por Abelardo Pachano, Guayaquil-Ecuador. pp 17-40.

66. Rumbos, R.; Hernández, J.; Moya, A.; Quevedo, H. y C.Gómez. 2005. Comportamiento *in vitro* del hongo (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) causante de la moniliasis de cacao en la zona Sur del lago de Maracaibo. Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Memorias de Congreso Venezolano de Fitopatología. Barquisimeto, Venezuela. 37 pp.

67. Saunder, J., Enríquez, G. 1989. Cacao. In Eds. Andrew, KL; Quezada, JR. Eds. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura. Estado actual y futuro. Tegucigalpa, HO, Escuela Agrícola Panamericana El

68. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), 2003. Perú. Recuperado el 24 de Octubre de 2015 de, http://www.senasa.gob.pe

69. Soria, J. 2001. Breve Historia del cultivo de cacao en el Ecuador: origen del cultivo y exportación en América tropical. En cadenas agroindustriales: cacao y elaborados. Panorama de la cadena, Quito, Proyecto SICA (Sistema de Información Agropecuaria)/ MAG, 2001.

70. Suárez, C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri* Cif & Par. en frutos de cacao *(Theobroma cacao L*.). Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. 59 pp.

71. 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. Respuestas 11 (1): 3-8.

72. Torres, M. 2010. Progreso temporal y manejo integrado de la moniliasis *[Moniliophthora roreri (*Cif y Par.) Evans *et al.]* Del cacao

(Theobroma cacao) en Tabasco, México. Tesis para optar por el título de Doctor en ciencias, especialista en Fitopatología. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. 99 pp.

73. United Cacao.2015. Recuperado el 28 de septiembre del 2015 de, http://www.unitedcacao.com/index.php/es/corporate-profile-es/global-cocoa-market-es

74. Villamil, J.; Blanco, J. y S. Rosero. 2012. Evaluación *in vitro* de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliphthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao L*.).Revista Facultad Nacional de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Medellín - Colombia. 65 (1): 6305-6315.

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

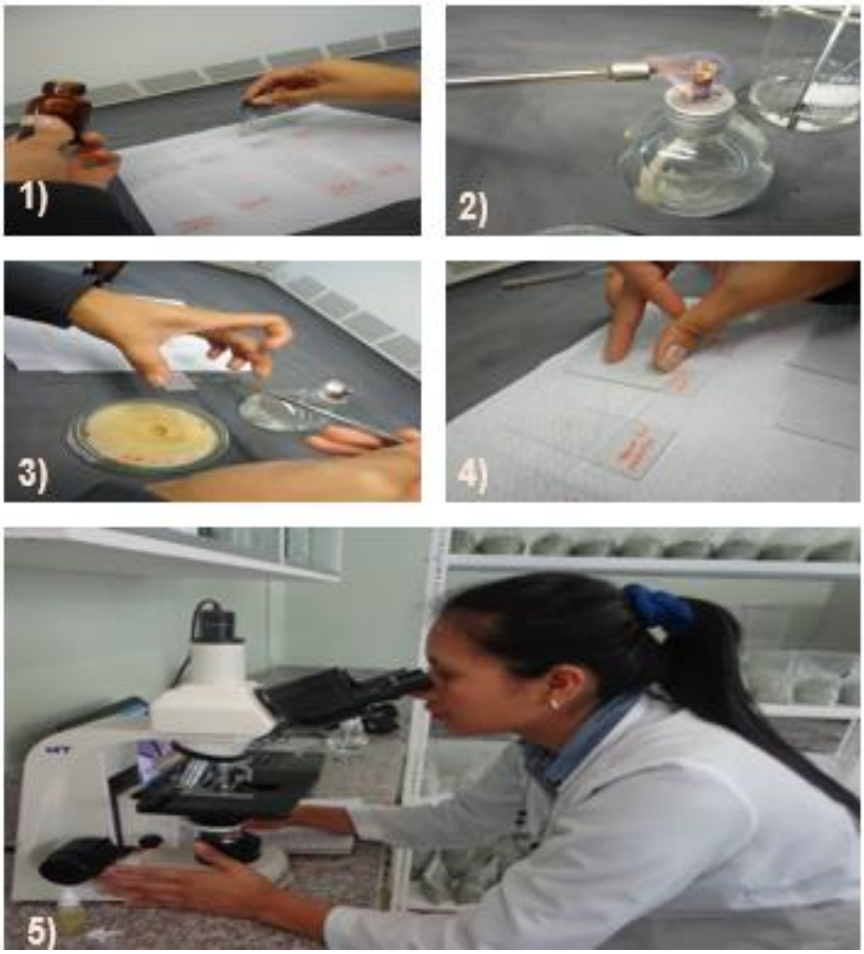
76. Villegas, C. 1979. Moniliasis; Bibliografía parcialmente anotada. Comp. Por C. Villegas y G. Enríquez. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 45 pp.

77. Yánez, MV. del R. 2004; Control biológico de *Moniliophthora roreri* en el campo mediante el uso de biopreparados a base de Pseudomonas cepacia, Bacillus subtilis en cacao Tenguel 25 (EET 103). Tesis M.Sc. Escuela Politécnica del Ejército. Magíster en Ciencias del Control biológico. Sangolquí, EC. 83 pp.

78. Yánez, C. 2011. Plan de exportación de pasta de cacao hacia el país de Japón ciudad de Tokio elaborado por la Asociación Kallari ubicada en la ciudad de Tena, provincia de Napo, período 2010-2015.Tesis para optar por el título de Ingeniería en Comercio Exterior. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.99 pp.

10. Anexos

Anexo 1. Elaboración de placas para la observación de estructuras morfológicas de *M. roreri.*



Anexo 2. Preparación de medio de cultivo semi sólido V8MAA.

Anexo 3. Planilla de toma de datos de los diferentes caracteres culturales.

		CARACTERÍSTICAS CULTURALES DEL AISLADO					
HORA	FECHA	COLOR DE REVERSO	COLOR DE MICELIO	VELOCIDAD (mm)	TEXTURA	BORDE	OBSERVACIONES

Anexo 4. Registro de toma de datos de las diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 y 35 ºC**)**.

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS **TEMPERATURA**		**Aislado:**	
Fecha:	Velocidad (mm)	Fecha:	Velocidad (mm)

Anexo 5. Hoja de registro de los diferentes caracteres fisiológicos. Variable de iluminación (luz natural, blanca, negra y oscuridad).

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS - LUZ		**Aislado:**	
Fecha:	Velocidad (mm)	Fecha:	Velocidad (mm)