

Micobiota asociada a frutos de cacao con síntomas de moniliasis en la amazonía ecuatoriana

Associated mycobiota to cocoa fruits with symptoms of moniliasis in the equatorial Amazon

Karina Carrera-Sánchez¹, Lidcay Herrera Isla², Manuel Díaz Castellanos², Michel Leiva-Mora²

¹ Universidad Estatal Amazónica. Campus Principal km 2 ½ vía a Napo (Paso Lateral), Puyo –Pastaza – Ecuador. CP 160150.

² Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, carretera a Camajuaní km 5½, Santa Clara, Cuba. CP 54830.

E-mail: mcarrera@uea.edu.ec

RESUMEN. El cacao nacional fino y de aroma, por su exquisito sabor, fragancia y exigencia del mercado de exportación, es una especie estratégica para la agroindustria ecuatoriana. El presente trabajo se propuso como objetivo caracterizar la micobiota asociada a frutos de cacao con síntomas de Moniliasis sobre la base de los caracteres morfológicos en la Amazonía ecuatoriana. Para la colecta del material vegetal, se tomaron muestras de flores y frutos con síntomas del patógeno. En laboratorio se procedió a lavarlos y al montaje de cámaras húmedas. Una vez aislados, utilizando la técnica de cámaras húmedas y en base a los criterios morfológicos se identificaron los siguientes géneros y especies de hongos filamentosos asociados con frutos de cacao: *Cylindrocladium* (Morgan), *Dichobotrys* (Hennebert), *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, *Colletotrichum* (Corda) y *Phytophthora palmivora* (E.J. Butler). Los resultados obtenidos indicaron la utilidad de las características morfológicas para identificar y caracterizar hongos filamentosos asociados con mazorcas de cacao. Estos microorganismos pueden causar deterioro del material cosechado.

Palabras clave: Biodiversidad, Ecuador, hongos, *Moniliophthora roreri*, *Theobroma cacao*.

ABSTRACT. The cocoa cultivated in Ecuador is having greatest aroma, exquisite flavor, fragrance and quality for exportation market; it is a strategic species for the Ecuadorian agribusiness. The present study was aimed at characterizing the associate mycobiota to cocoa fruits with symptoms of Moniliasis based on morphological characters in the Ecuadorian Amazon. Infected plant materials (flowers, and fruits) were collected and processed in the laboratory to prepare humid cameras. Once isolated, using the technique of humid cameras and based on morphological criteria the following genera and species of filamentous fungi associated with cacao fruits were identified: *Cylindrocladium* (Morgan), *Dichobotrys* (Hennebert) *Moniliophthora roreri* (Cif.) HC Evans, Stalpers (Samson & Benny), *Colletotrichum* (Corda) and *Phytophthora palmivora* (EJ Butler). The results indicated that the morphological features are very useful to identify and characterize filamentous fungi associated with cacao pods. These microorganisms can cause deterioration of the harvested material.

Keywords: Biodiversity, Ecuador, fungi, *Moniliophthora roreri*, *Theobroma cacao*.

INTRODUCCIÓN

El cacao es una planta originaria de los trópicos de América del Sur. Se considera que su centro de origen está situado en el noroeste de América del Sur, en la zona alta amazónica, entre Perú, Ecuador y Colombia (Enríquez, 2010).

Ecuador posee tradición cacaotera, ya que este cultivo constituye una importante fuente de ingreso para los agricultores. El cacao involucra

alrededor de 100 000 familias de productores (80 % pequeños productores). Se estima que existen más de 500 000 ha de cacao (más del 80 % corresponde a cacao de aroma), las cuales se encuentran establecidas en sistemas agroforestales (Ordoñez *et al.*, 2011; Phillips-Mora y Amores, 2013).

Según Ordoñez *et al.* (2011), en la Amazonía ecuatoriana, el cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie fundamental para garantizar un sistema

agroforestal multifuncional, debido a que la especie es útil en la reforestación, a la preservación de los ecosistemas y su biodiversidad. Localmente, las comunidades *kichwas* utilizan prácticas de conservación y manejo orgánico para su cultivo, con pocas herramientas que no ocasionen efectos negativos en el suelo. Los productores prefieren el cultivar de cacao nacional fino y de aroma, por su exquisito sabor y aroma, así como por la gran demanda que exige el mercado de exportación de divisas en Ecuador.

Algunos autores señalan que en el manejo del cultivo de cacao se incluyen labores fitosanitarias que de no hacerlas, pueden afectar hasta un 30 % de la producción de los cacaotales. Las enfermedades de mayor importancia en el cacao para el Ecuador son: moniliasis, causada por *Moniliophthora roreri*, escoba de bruja, provocada por *Moniliophthora perniciosa*, mazorca negra, cuyo agente etiológico es *Phytophthora palmivora* y el mal de machete, *Ceratocystis cacaofunesta* (Engelbrecht y Harrington), en menor proporción (Fulton, 1989; Jaimes y Aranzazu 2010; Sánchez-Mora, 2011). Desde los años 1800, donde se establecieron las primeras plantaciones comerciales de cacao, se considera a la moniliasis como la enfermedad más grave del cacao (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007).

En la región amazónica de Ecuador existen condiciones ambientales de alta humedad, donde se pierde más del 40 % de la producción, es decir, unas 8 000 t de cacao, lo que representa 20 millones de dólares por año (Phillips-Mora y Amores, 2013).

Según Jaimes y Aranzazu (2010), las lesiones de este patógeno, se caracterizan por la presencia de una masa densa pulverulenta (esporas del hongo) sobre las mazorcas o frutos de cacao infectados, que van cambiando gradualmente de ceniza a marrón.

Para el control de la moniliasis, se desarrollaron métodos convencionales, químicos y biológicos, los cuales no siempre han logrado resultados efectivos.

Sin embargo, en la Amazonía ecuatoriana poco se sabe de las especies de hongos asociados con el cultivo del cacao, en particular aquellas que están presentes en frutos enfermos. La presente investigación tuvo como objetivo, identificar los hongos asociados con frutos de cacao con síntomas de moniliasis, en plantaciones de las comunidades *kichwas*.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación y selección de fincas

Las zonas evaluadas correspondieron a fincas

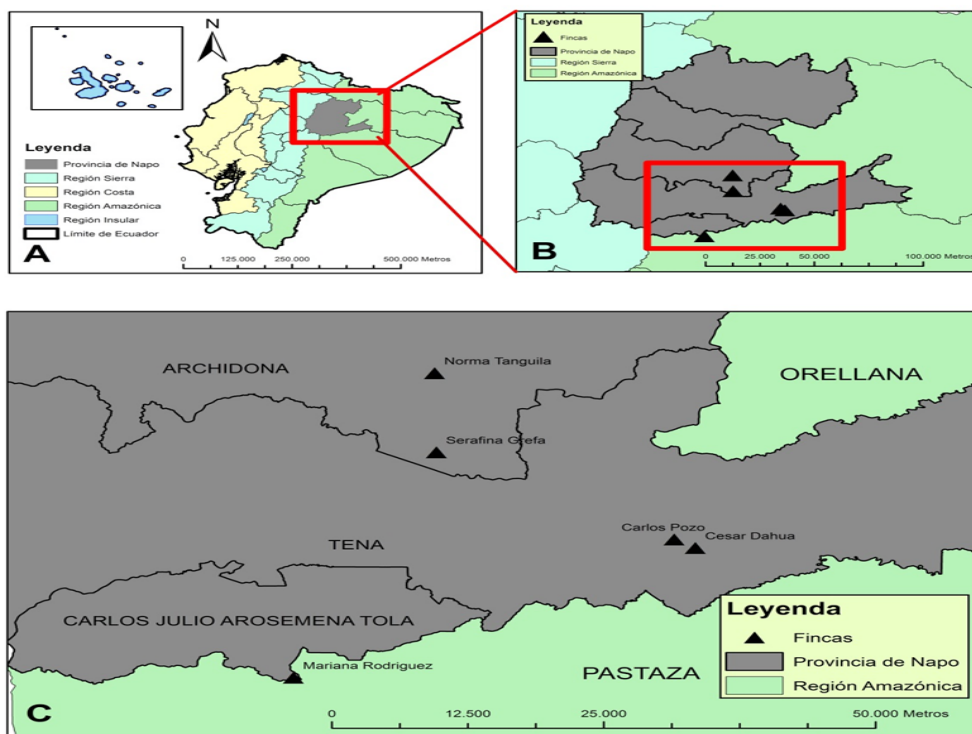


Figura 1. Geolocalización de los principales cantones y sectores, donde se realizaron colectas de muestras de frutos de cacao con síntomas de *M. roreri*

de pequeños productores de cacao fino de aroma de los cantones: Tena, Arosemena Tola, Archidona de la Provincia Napo – Ecuador (figura 1).

Colecta del material vegetal

Para la colecta del material vegetal se tomaron muestras de frutos con presencia de puntos negros, manchas necróticas, pudrición, maduración prematura, deformaciones, lesiones acuosas y con la presencia de masa de esporas en su superficie. Para el traslado de las muestras se emplearon bolsas de papel kraf debidamente etiquetadas, conservadas frescas y trasladadas al Laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica (tabla).

Procesamiento de las muestras

Los frutos colectados, se lavaron superficialmente durante 30 min con agua corriente en el laboratorio de microbiología de

la Universidad Estatal Amazónica. Con la ayuda de un microscopio estereoscopio (MOTIC) se seleccionaron secciones de los tejidos que presentaban síntomas y signos correspondientes con la moniliasis del cacao. Posteriormente se secaron con papel de filtro (marca Fisher Brand®, 12,5 cm de diámetro) y se tomaron discos de 1 cm de diámetro y 0,5 cm de profundidad mediante un horador. Los discos de cada muestra fueron introducidos en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad que contenían 50 ml de agua desionizada estéril (5 discos por cada fruto por recipiente) y se colocaron en un agitador orbital a 200 rpm por 20 min, a 28 °C de temperatura.

Posteriormente se vertió el agua y se añadió 50 ml de alcohol al 70 % (v/v) durante 2 min, se enjuagaron con agua estéril y se pusieron a secar en placas de Petri. Finalmente, se colocaron cuatro discos de cada muestra en placas de Petri con papel de filtro humedecido para facilitar el

Tabla 1. Datos relacionados con las muestras colectadas a partir de frutos de cacao con síntomas de moniliasis

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

desarrollo de estructuras de los hongos y se incubaron a 28 °C y oscuridad por cinco días.

Se preparó medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (*Potato Dextrose Agar Ref.: 213400, Difco®*), en un beaker de 500 ml de capacidad, con la ayuda de un plato agitador-calentador (IKA, modelo C-MAG HS 10 S1). Posteriormente, el medio fue distribuido en Erlenmeyer de 500 ml, los cuales fueron previamente esterilizados durante 15 min con una presión de 1 atm en una autoclave (marca SHENAN, modelo LDZX-50FBS a 121°C). Antes de que el medio fuera vertido en placas, se le adicionó 2 ml de una solución *stock*

de Sulfato de estreptomina, para evitar el crecimiento de bacterias.

Aislamiento e identificación de los agentes

Bajo el microscopio estereoscopio y con ayuda de una aguja de siembra, se extrajeron fragmentos de micelio que se colocaron en placas de Petri de 90 cm de diámetro con 15 mL de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa a pH=5,6. El crecimiento de los aislados de los hongos asociados con los frutos del cacao se realizó en una incubadora (marca MEMMERT, modelo INB 400), durante 10 días con oscuridad a 25 °C de temperatura.

Para observar las estructuras reproductivas de los hongos asociados con frutos de cacao con síntomas de moniliasis, se prepararon microcultivos para cada uno de los aislados de hongos filamentosos obtenidos y se utilizó el método de Riddell (1950). Los microcultivos fueron incubados en una cámara de esporulación con luz negra (modelo BLB40W 120 V) durante 10 días.

Posteriormente, se observaron las principales estructuras morfológicas bajo un microscopio clínico (marca MOTIC modelo Q720AD SERIES B1), con énfasis en la morfología de los conidios y conidióforos, que fueron medidos mediante el uso de un microscopio clínico (Carls Zeiss), con un aumento de 200x. Para *Cylindrocladium*, *Dichobotrys*, *M. rorerii* y *Colletotrichum*, se realizaron mediciones a 100 conidios y 50 conidióforos respectivamente. Para la identificación de los géneros *Cylindrocladium*, *Dichobotrys* y *Colletotrichum* se utilizó la metodología de Barnett y Hunter (1972). Para *M. rorerii* se utilizaron los criterios establecidos por Evans *et al.* (1978), mientras para la identificación de *P. palmivora* se tomaron en cuenta las características descritas por Brasier y Griffin (1979). Las mejores imágenes para cada género, se tomaron con una cámara digital, acoplada al microscopio clínico y a una computadora con el uso del software MOTIC IMAGES PLUS 2.0, modelo MULTI LANGUAGE para el tratamiento de las imágenes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los frutos de cacao con síntomas de Moniliasis, procedentes de la Amazonía ecuatoriana, e identificaron los siguientes géneros de hongos anamorfos: *Cylindrocladium*, *Dichobotrys*, *Moniliophthora*, *Colletotrichum* y *Phytophthora* (figura 2).

En *Cylindrocladium* (Morgan) se observaron conidióforos erectos, penicilados, con ramificaciones primarias, con vesícula terminal, con la presencia de masas de conidios cilíndricos monocelulares en sus extremos. No se observó la producción de clamidosporas. Los conidióforos tuvieron una longitud promedio de 160 μm y 7 μm de ancho. Las ramas primarias, secundarias y terciarias mostraron una longitud promedio de 14,01 μm , 18,24 μm y 10,4 μm , respectivamente. Las fiálides, tuvieron una longitud de 13,4 μm y 3,2 μm de ancho. Los conidios mostraron una longitud de 40,5 μm y 3,5 μm de ancho.

Respecto a estos resultados, Feitosa *et al.* (1987) demostraron que *Cylindrocladium floridanus* Sober & Seymour fue patógena en cacao; sin embargo, estos autores no describieron las dimensiones de las estructuras asexuales. Por otra parte, Bastos y Bezerra (2010), refirieron la presencia de *Cylindrocladium scoparium* Morg, causando la pudrición de frutos de cacao, pero no efectuaron una caracterización morfológica de este agente causal. Asimismo, Evans *et al.* (2010) informaron la presencia de aislados presuntamente micoparasíticos pertenecientes al género *Cylindrocladium* afectando mazorcas de *Theobroma gileri* infectada con *Crinipellis roreri*, sin embargo, no describieron la morfología ni las dimensiones de las estructuras asexuales. Disponer de una caracterización morfológica correcta de esta especie, aislada a partir de frutos de cacao con síntomas de moniliasis, permitirá discriminarla del resto de la micobiota de esta especie.

Dichobotrys (Hennebert). Se observó la presencia de conidióforos largos, con ramificaciones dicotómicas regulares, delgados, con la presencia de células fértiles algo infladas, globosas, productoras de conidios simultáneamente, con la presencia de conidios del tipo botryoblastosporas casi globosas, hialinos, monocelulares unidos a denticulos cortos. Los conidióforos tuvieron un largo de 4,8 μm , sin embargo, no fue posible determinar las dimensiones de los conidios ni de sus hifas. En la literatura consultada no se encontraron especies relacionadas con este género informadas para el cultivo de cacao.

M. rorerii (Cif y Par) Evans. Las hifas fueron hialinas, con paredes delgadas, septadas y algunas veces levemente irregulares, raramente ramificadas. Se observaron conidióforos ramificados dando lugar a cadenas maduras de conidios. Los conidios fueron fácilmente separables, con paredes gruesas, globosos, subglobosos o elipsoidales, con una longitud promedio de 10,48 μm y un ancho de 9,64 μm , similar a lo referido por Evans *et al.* (1978).

Colletotrichum (Corda). Se determinó, la presencia de acérvulos similares a puntos negros incluido en las placas de cultivo en el medio de cultivo PDA. En los microcultivos se observaron conidióforos hialinos, simples, erectos, sustentando 1 conidio en cada ápice de las fiálides. Se determinó la presencia de conidios hialinos, cilíndricos, ovoides y monocelulares. En los cultivos realizados en medios sintéticos

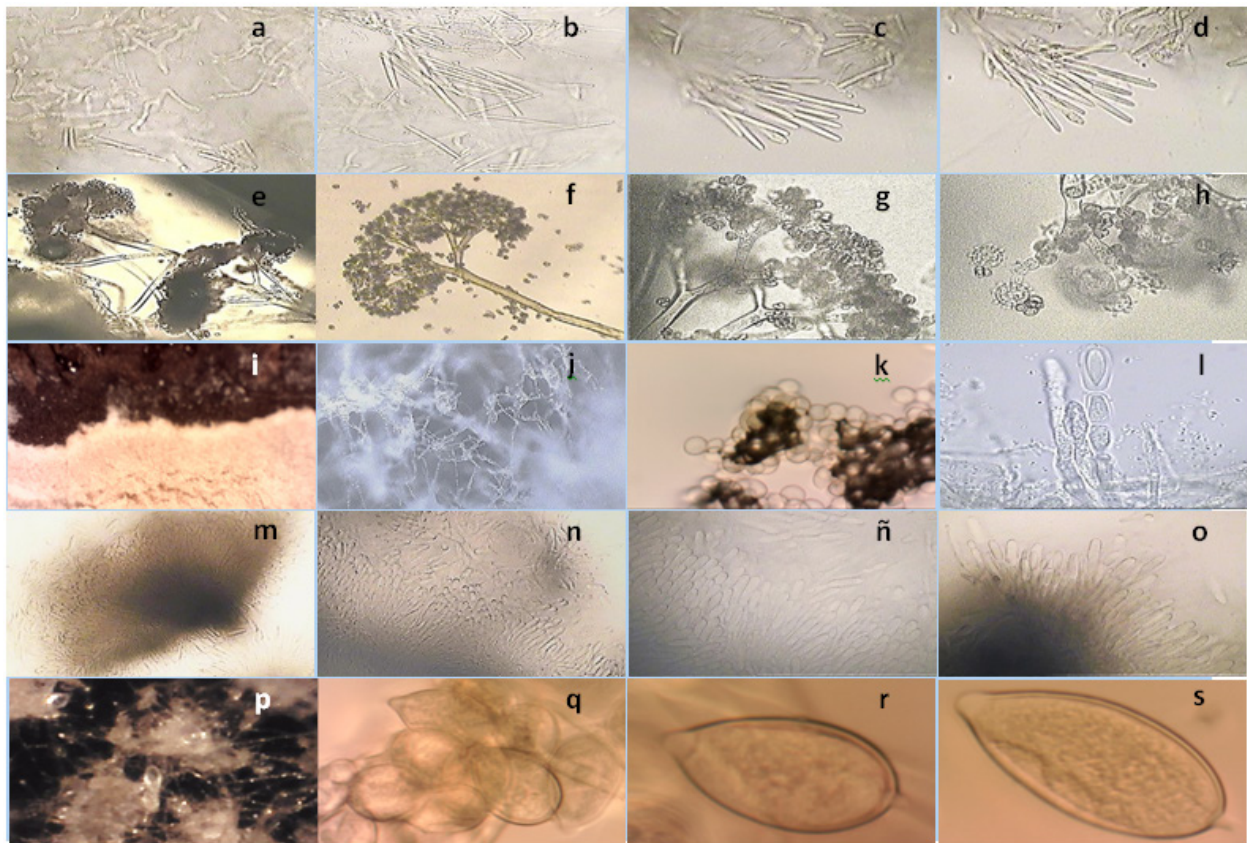


Figura 2. Géneros y especies de hongos filamentosos asociados con frutos de cacao con síntomas de Moniliasis *Cyindrocladium* (a,b,c,d), *Dichobotrys* (e,f,g,h), *M. roreri* (i,j,k,l), *Colletotrichum* (m,n,ñ,o) y *P. palmivora* (p,q,r,s)

no se observaron setas. Las hifas tuvieron un ancho promedio de $2,47 \mu\text{m}$, los conidióforos mostraron una longitud promedio de $9,56 \mu\text{m}$ y ancho de $3,82 \mu\text{m}$. La longitud promedio de los conidios fue de $7,07 \mu\text{m}$ y un ancho de $2,37 \mu\text{m}$. En la descripción de las características del género, estas se asemejan a lo referido por Rojas *et al.* (2010), a pesar de que en nuestro trabajo las dimensiones de los conidios y conidióforos fueron menores.

P. palmivora (E.J. Butler). Se observó la presencia de micelio cenocítico, sin la formación de estructuras reproductivas sexuales, presencia de esporangios diferenciados conteniendo zoosporas. Se observaron abundantes esporangios papilados de forma ovoide que tenían como promedio $40,65 \mu\text{m}$ de largo y $23,62 \mu\text{m}$ de ancho. Estas dimensiones fueron similares a las encontradas por Stamps (1998), quien denotó que dichas estructuras se forman fácilmente en medios de cultivo y que los esporangios presentan paredes bien definidas prevaleciendo las formas ovoides a elipsoidales.

Mfegue *et al.* (2012) determinaron que la principal especie causante de la pudrición de la

mazorca de cacao en África es *Phytophthora megakarya* en lugar de *P. palmivora* que prevalece en América. Sin embargo, lo anterior sugiere la posibilidad de la existencia de varias especies de este género, causando una misma sintomatología a nivel de mazorcas de cacao; por lo que resulta de interés, caracterizar morfológicamente este patógeno para discriminar los daños que puedan provocar en la producción de cacao.

Las características de *M. roreri* y *Colletotrichum* coincidieron con lo descrito por Maridueña (2011), en un estudio similar, sin embargo estos autores identificaron una mayor diversidad de especies asociadas a la mazorca de cacao.

CONCLUSIONES

1. La microbiota del cacao en la Amazonia del Ecuador es abundante, identificándose *Cyindrocladium*, *Dichobotrys*, *Moniliophthora*, *Colletotrichum*, y *Phytophthora*, fitopatógenos del cacao, los que fueron caracterizados de acuerdo con su morfología.

2. Los organismos fitopatógenos identificados, se corresponden a agentes causales de las

principales enfermedades del cacao en las condiciones de la región amazónica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barnett, H. and B. Hunter: Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd Edition. Burgess Co., USA, 225p. 1972. ISBN: 0808702661
2. Bastos, C. y J. Bezerra: Podridao de frutos do cautiverio causada por *Cylindrocladium scoparium* Morg. *Agrotropica*, 22 (2): 107-110; 2010.
3. Brasier, C. y M. Griffin: Taxonomy of 'Phytophthora palmivora' on cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, 72 (1): 111-143, 1979.
4. Enríquez, G.: Cacao Orgánico. Guía para productores ecuatorianos. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). . 2da Edición, Quito, Ecuador, 360p. 2010.
5. Evans, H.; J. Stalpers; A. Samson and G. Benny: On the taxonomy of *Monilla roleri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*, 56: 2528-2532, 1978.
6. Evans, H.; K. Holmes and S. Thomas: Endophytes and mycoparasites associated with and indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2: 149-160, 2003.
7. Feitosa, M.; C. Pimente; V. Olivieira, y B. Faria: *Cylindrocladium floridanum*, fungo patogeno en cacaoteiros (*Theobroma cacao*) no estado de Sao Paulo. *Fitopatología Brasileira*, 11 (3): 455-463, 1986.
8. Fulton, R.: The cacao disease trilogy: black pod, monilia pod rot, and witches broom. *Plant disease*, 73: 601-603, 1989.
9. Jaimes, Y. y F. Aranzazu: Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao*) en Colombia con énfasis en Monilia (*Moniliothora roleri*). Primera edición, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Colombia, 2010, 90 p. ISBN: 978-958-740-034-2
10. Maridueña, M.: Estudio de la micobiota patogénica de cacao criollo (*Theobroma cacao*) en cinco provincias de la costa Ecuatoriana y evaluación de la efectividad in vitro de los bioles locales para su control. Tesis para optar al título de Master en Biotecnología Agrícola. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil, Ecuador. 2011, 154 p.
11. Mfegue, C.; C. Herail; H. Adreit; M. Mbenoun; Z. Techou; M. Ten Hoopen; D. Tharreau and M. Ducamp: Microsatellite markers for population studies of *Phytophthora megakarya* (Pythiaceae), a cacao pathogen in Africa. *Am. J. Bot.* 29 August, doi: 10.3732/ajb.1200053, 2012.
12. Ordoñez, L.; C. Gavilánez, y A. Salazar: Estudio Técnico: Secuestro de carbono en biomasa aérea de sistemas forestales de café y cacao en la Reserva de Biosfera Sumaco. Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ). Quito, Ecuador. Noción Imprenta. 2011, 44 p.
13. Phillips-Mora, W. and M. Wilkinson: Frosty pod of cacao: A disease with limited geographic range but limited potential for damage. *Phytopathology*, 97: 1634 – 1639, 2007.
14. Phillips-Mora, W. y F. Amores: CropLife. Moniliasis del cacao. San José, Costa Rica. 2013. En sitio web: <http://www.croplifela.org/es/plaga-del-mes.html?id=472> Consultado el 10 de octubre 2015.
15. Riddel, R.W.: Permanent strained mycological preparation obtained by slide cultures. *Micología*, 82: 265-270, 1950.
16. Rojas, E.; S. Rehner; G. Samuels; S. VanBael; E. Here; P. Cannon [et al.]: *Colletotrichum gloesporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*. 102:1318-1338, 2010.
17. Sánchez-Mora, F.; F. Garcés; J. Vera; R. Ramos; F. Troya, y T. Díaz: Cuantificación de enfermedades en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la zona central del

Litoral Ecuatoriano. VII Simposio Internacional de recursos genéticos para América Latina y el Caribe, del 21 al 23 de noviembre de 2011. Quito, Ecuador.

18. Stamps, J.: *Phytophthora palmivora*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. n° 831. Set n° 84. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK, 2 pp.1998.

Recibido el 5 de julio y aceptado el 18 de octubre de 2015