



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMÍA

Trabajo de Integración Curricular
previo a la obtención del Grado
Académico de Ingeniero
Agrónomo

Proyecto de Investigación

DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE *Lasiodiplodia theobromae* EN RELACIÓN AL
MODELO DE INFECCIÓN EN GENOTIPO DE *Theobroma cacao* L.

Autor:

Katherine Gissella Miranda Clas

Director del Proyecto de Investigación

Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD.

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2024



DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Katherine Gissella Miranda Clas**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Katherine Gissella Miranda Clas

1206895151



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

El suscrito, **Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martinez PhD.** Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo certifica que el estudiante Katherine Gissella Miranda Clas, realizó el Trabajo de Integración Curricular titulado “**Dinámica de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* y su relación al modelo de infección en genotipo de *Theobroma cacao* L.**”, previo a la obtención del Grado Académico de Ingeniero Agrónomo, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martinez PhD.
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito **Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD.**, mediante el presente cumpla en presentar a usted el informe de Proyecto de Investigación titulado “**Dinámica de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* y su relación al modelo de infección en genotipo de *Theobroma cacao* L.**”, presentado por la estudiante **Katherine Gissella Miranda Clas** egresada de la Carrera de Agronomía, que fue revisado bajo mi dirección según resolución del Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, que se ha desarrollado de acuerdo al Reglamento de la Unidad de Integración Curricular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y cumple con el requerimiento de análisis de COMPILATIO el cual avala los niveles de originalidad en un 93% y similitud 7% del trabajo investigativo. Valido este documento para que la estudiante siga con los trámites pertinentes, de acuerdo como lo establece el Reglamento.



Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martinez PhD.
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“Dinámica de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* y su relación al modelo de infección en genotipo de *Theobroma cacao L.*”

Presentado al Consejo Directivo de Facultad como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Pablo César Ramos Corrales PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. César Ramiro Bermeo Toledo MSc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Carlos Luis Sánchez Fonseca PhD.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2024

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios, a nuestros estimados miembros de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, me dirijo a ustedes con profunda gratitud para expresar mi reconocimiento por el apoyo invaluable brindado hacia el proyecto de investigación.

Agradezco sinceramente al compromiso, dedicación y conocimientos aportados por los profesionales docentes, cuya guía y asesoramiento fueron pilares fundamentales en el desarrollo de este proyecto. Al personal del laboratorio en general, estoy muy agradecida por su apoyo.

Gracias a los ingenieros Erick, Cristian, Dayanara y Kevin por su tiempo paciencia y dedicación en compartir sus conocimientos y experiencias. Su disposición para compartir sus conocimientos, sus consejos expertos y su apoyo, estoy sinceramente agradecida.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Hayron Canchignia Martínez y el Dr. Pablo Ramos por su invaluable orientación, dedicación y apoyo. Su liderazgo conocimiento y compromiso fueron fundamentales en el desarrollo exitoso de este proyecto de investigación.

Agradezco de todo corazón a mi estimado amigo Ing. Ángel Cedeño Moreira, su guía experta, su disposición para brindar consejos y su constante motivación fueron elementos esenciales que me permitieron crecer académica y profesionalmente durante este proceso.

Asimismo, deseo agradecer a mi padre, hermanos y a mi familia, a mi extraordinaria amiga Pabblina Janet sin su apoyo y constante voz de aliento que me dieron fuerzas para seguir. Agradezco profundamente a Dios por ayudarme a cumplir este sueño.

DEDICATORIA

A mamá,

Tu amor incondicional y tu dedicación han sido la fuerza que ha iluminado mi camino en cada paso de mi vida. Gracias por ser mi guía y mi apoyo incondicional. Tu sabiduría y fortaleza han moldeado mi ser y han sido luz en momentos oscuros.

Cada logro, cada sonrisa y cada paso adelante, son testamentos de tu sacrificio y entrega. Eres mi ejemplo de valentía, compasión y fortaleza. Tu amor ha sido el mayor regalo que la vida me ha dado.

Esta dedicación es un pequeño homenaje a una mujer extraordinaria y a la luz que ha sido en mi vida. Lourdes Clas.

Gissella Miranda Clas

RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao* L) es una planta cultivada en regiones neotropicales, originalmente de la Amazonía en Suramérica, y es vital para muchos pequeños agricultores a nivel global. La producción de cacao en Ecuador da sustento a unas cien mil familias, con niveles bajos de productividad. El país produce el 62% del cacao fino de aroma a nivel mundial. Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la "UTEQ". El objetivo de este trabajo fue examinar la dinámica de crecimiento de *L. theobromae*, en relación al modelo de infección en genotipo de *Theobroma. cacao* L. Se empleó un diseño completamente aleatorio (DCA) y se utilizaron dos cepas de *L. theobromae* para los experimentos de crecimiento e infección del patógeno. La temperatura óptima para el desarrollo micelial del patógeno se encontró en 28°C, con un menor crecimiento a temperaturas más altas. La propagación del patógeno muestra una leve infección en la parte superior de la planta, con niveles de infección entre 0,09 y 1,71 mm desde el punto de inserción, mientras que se observó una mayor infección en la parte inferior, con niveles entre 0,40 y 3,19 mm. Con el tiempo, la infección se desplazó hacia la parte basal, siendo el período crítico de agresividad más pronunciado entre el día 25 y el día 50 después de la infección, lo que subraya la importancia del factor temporal en la interacción planta-patógeno. El período crítico de agresividad, está más presente en la parte basal de la planta y este abarca desde el día 1 hasta 50 días después de la infección, con niveles de infección de hasta 3,17 mm. Estos hallazgos proporcionan información crucial para el desarrollo de estrategias de manejo y control de enfermedades en cultivos agrícolas y forestales, enfatizando la necesidad de considerar factores ambientales y temporales en la gestión de enfermedades vegetales.

Palabras Clave: Dinámica, *Lasiopdiplodia theobromae*, Modelo de infección, Genotipo CCN51

ABSTRACT

Cacao (*Theobroma cacao* L) is a plant cultivated in neotropical regions, originally from the Amazon in South America, and is vital for many small farmers globally. Cocoa production in Ecuador supports some 100,000 families, with low levels of productivity. The country produces 62% of the world's fine aroma cocoa. This study was carried out in the laboratory of Microbiology and Molecular Biology of the “UTEQ”. The objective of this work was to examine the growth dynamics of *L. theobromae*, in relation to the infection model in genotype of *Theobroma. cacao* L. A completely randomized design (CRD) was used and two strains of *L. theobromae* were used for the growth and infection experiments of the pathogen. The optimum temperature for mycelial development of the pathogen was found to be 28°C, with less growth at higher temperatures. The spread of the pathogen showed a slight infection in the upper part of the plant, with infection levels between 0.09 and 1.71 mm from the point of insertion, while a greater infection was observed in the lower part, with levels between 0.40 and 3.19 mm. Over time, infection shifted towards the basal part, with the critical period of aggressiveness being most pronounced between day 25 and day 50 after infection, underlining the importance of the temporal factor in plant-pathogen interaction. The critical period of aggressiveness is more present in the basal part of the plant and it spans from day 1 to 50 days post infection, with infection levels up to 3.17 mm. These findings provide crucial information for the development of disease management and control strategies in agricultural and forestry crops, emphasizing the need to consider environmental and temporal factors in plant disease management.

Keywords: Dynamics, *Lasiopodiopodia theobromae*, Infection model, CCN51 genotype.

TABLA DE CONTENIDO

Portada	i
Declaración de auditoría y sesión de derechos	ii
Certificación de culminación del trabajo de integración curricular	iii
Reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.....	iv
Certificado de aprobación por tribunal de sustentación.....	v
Agradecimiento.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Tabla de contenido.....	x
Índice de figuras.....	xv
Índice de anexos.....	xvi
Código dublin.....	xvii
Introducción	1
CAPITULO I	
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1. Problema de investigación	4
1.1.1. <i>Planteamiento del problema</i>	4
Diagnóstico.	4
Pronóstico.....	5
1.1.2. <i>Formulación Del Problema</i>	5
1.1.3. <i>Sistematización Del Problema</i>	5
1.2. Objetivos	6
1.2.1. <i>Objetivo General</i>	6
1.2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	6
1.3. Justificación.....	7

CAPITULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	8
2.1. Marco Conceptual	9
2.1.1. <i>Infeción</i>	9
2.1.2. <i>Genotipo</i>	9
2.1.3. <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	9
2.1.4. <i>Theobroma cacao</i> L. CCN51	9
2.1.5. <i>Patógeno</i>	10
2.2. Marco Referencial.....	10
2.2.1. <i>Theobroma cacao</i> L. CCN51	10
2.2.2. <i>Origen del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.)</i>	11
2.2.3. <i>El cultivo de cacao en el Ecuador</i>	11
2.2.4. <i>Problemas en la producción de cacao</i>	12
2.2.5. <i>Enfermedades en el cultivo de cacao</i>	12
2.2.6. <i>Lasiodiplodia theobromae en cacao</i>	13
2.2.7. <i>Biología</i>	13
2.2.8. <i>Taxonomía</i>	14
2.2.9. <i>Ciclo de la enfermedad</i>	14
2.2.10. <i>Sintomatología</i>	15
2.2.11. <i>Dinámica de crecimiento</i>	15
2.2.12. <i>Modelo de infección</i>	16
2.2.13. <i>Patógeno</i>	16
2.2.14. <i>Síntomas</i>	16
2.2.15. <i>Fitopatógeno</i>	17
2.2.16. <i>Propagación</i>	17
2.2.17. <i>Colonización</i>	18
2.2.18. <i>Tejido</i>	18
2.2.19. <i>Sistema Vascular</i>	19
2.3. <i>Revisión histórica del tema en estudio</i>	19

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	22
3.1. Localización	23
3.2. Tipo de investigación	23
3.3. Método de investigación	23
3.4. Fuentes de recopilación de la información.....	23
3.5. Diseño de la investigación.....	24
3.5.1. <i>Tratamientos</i>	24
3.5.1.1. <i>Determinación del desarrollo micelial de L. theobromae (Experimento 1).</i>	24
3.5.3. <i>Diseño Experimental</i>	25
3.6. Instrumentos de investigación.....	26
3.6.1. <i>Manejo del experimento</i>	26
3.6.1.1. <i>Desarrollo micelial de Lasiodiplodia theobromae en condiciones in vitro. (Experimento 1).</i> ..	26
3.6.1.2. <i>Aislamiento de Lasiodiplodia theobromae.</i>	26
3.6.1.3. <i>Reactivación de la cepa.</i>	27
3.6.1.4. <i>Purificación de la sepa.</i>	27
3.6.1.5. <i>Caracterización morfológica.</i>	27
3.6.1.6. <i>Crecimiento micelial.</i>	28
3.6.1.7. <i>Proceso de infección de Lasiodiplodia. theobromae en genotiposde Theobroma cacao L. (Experimento 2).</i>	28
3.6.1.8. <i>Escarificación de semillas.</i>	28
3.6.1.9. <i>Germinación de las semillas.</i>	28
3.6.1.10. <i>Recolección de tierra</i>	29
3.6.1.11. <i>Siembra de semillas.</i>	29
3.6.1.12. <i>Infección de plantas.</i>	29
3.6.1.13. <i>Toma de muestras</i>	30
3.6.1.14. <i>Desinfección de muestras.</i>	30
3.6.1.15. <i>Siembra de muestras</i>	31
3.6.2. <i>Variables a evaluar</i>	31

3.8. Recursos Humanos y Materiales	32
3.8.1. <i>Recursos Humanos</i>	32
3.8.2. <i>Equipos</i>	32
3.8.3. <i>Materiales</i>	32
3.8.4. <i>Material Vegetal</i>	33
3.8.5. <i>Material genético</i>	33
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1. Experimento 1	35
4.1.1. <i>Desarrollo micelial de Lasiodiplodia theobromae</i> en diferentes rangos de temperatura.	35
4.1.2. Experimento 2	37
4.1.2.1. Dinámica de infección de <i>Lasiodiplodia. theobromae</i> en genotipo de <i>Theobroma. cacao L. CCN51</i>	37
4.2. Discusión	42
4.2.1. <i>Experimento 1</i>	42
4.2.2. <i>Experimento 2</i>	43
CAPITULO V	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
5.1. Conclusiones	46
5.2. Recomendaciones	47
6. Bibliografía	49
CAPITULO VII	
ANEXOS	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía de la <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	14
Tabla 2: Tratamientos Experimento 1. Evaluados para cada cepa de <i>L. theobromae</i>	24
Tabla 3: Tratamientos Experimento 2. Evaluados para cada cepa de <i>L. theobromae</i>	25
Tabla 4: Esquema de análisis estadístico. Experimento 1	25
Tabla 5: Esquema de análisis estadístico. Experimento 2	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de infección de la planta.	29
Figura 2: Modelo de toma de muestras de la planta.	30
Figura 3: Crecimiento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en diferentes rangos de temperatura.	35
Figura 4: Crecimiento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en diferentes rangos de temperatura.....	36
Figura 5: Dinámica de crecimiento de <i>L. theobromae</i> al día 1 cepa 1A post-infección	37
Figura 6: Dinámica de crecimiento de <i>L. theobromae</i> al día 1 cepa 2A post-infección.....	38
Figura 7: Dinámica de crecimiento de <i>L. theobromae</i> al día 25 cepa 1A post-infección	39
Figura 8: Dinámica de infección de <i>L. theobromae</i> al día 25 cepa 2A post-infección	40
Figura 9: Dinámica de crecimiento de <i>L. theobromae</i> al día 50 cepa 1A post-infección.....	41
Figura 10: Dinámica de crecimiento de <i>L. theobromae</i> al día 50 cepa 2A post-infección	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Crecimiento de <i>L. theobromae</i> en diferentes rangos de temperatura	54
Anexo B: Avance de la infección de <i>L. theobromae</i> en plántulas de <i>T. cacao</i> L. del día 0 post-infección	54
Anexo C: Avance de la infección por <i>L. theobromae</i> en plántulas de <i>T. cacao</i> L. el día 1 post-infección	55
Anexo D: Avance de la infección por <i>L. theobromae</i> en plántulas de <i>T. cacao</i> L. el día 25 post-infección	55
Anexo E: Avance de la infección por <i>L. theobromae</i> en plántulas de <i>T. cacao</i> L. día 50 post-infección	56
Anexo F: Infección de <i>L. theobromae</i> en fragmentos de tallos.....	56
Anexo G: Infección de <i>L. theobromae</i> en fragmentos de tallos.....	57
Anexo H: Infección de <i>L. theobromae</i> en fragmentos de tallos.....	57
Anexo I: Infección de <i>L. theobromae</i> en fragmentos de tallos	57
Anexo J: Aislamiento y caracterización morfológica de <i>L. theobromae</i>	58
Anexo K: Análisis de Varianza.....	58

CÓDIGO DUBLIN

Título:	Dinámica de crecimiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y su relación al modelo de infección en genotipo de <i>Theobroma cacao L.</i>				
Autor:	<u>Miranda Clas Katherine Gissella</u>				
Palabras clave:	Dinámica	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Modelo de infección	Genotipo	
Fecha de publicación:					
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2024				
Resumen:	El cacao (<i>Theobroma cacao L</i>) es una planta cultivada en regiones neotropicales, originalmente de la Amazonía en Suramérica, y es vital para muchos pequeños agricultores a nivel global. Aunque el patógeno <i>Lasiodiplodia theobromae</i> es saprófito, se considera latente, habitando como endófito en tejidos sanos de la planta. Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la "UTEQ". Su objetivo es examinar la dinámica de crecimiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , centrándose en su interacción con el genotipo CCN51 de <i>Theobroma cacao L</i>				
Abstract:	Cacao (<i>Theobroma cacao L</i>) is a plant cultivated in neotropical regions, originally from the Amazon in South America, and is vital for many small farmers globally. Cocoa production in Ecuador supports some 100,000 families, with low levels of productivity. The country produces 62% of the world's fine aroma cocoa. Although the pathogen <i>Lasiodiplodia theobromae</i> is saprophytic, it is considered latent, inhabiting healthy plant tissues as an endophyte. This study was carried out in the laboratory of Microbiology and Molecular Biology of the "UTEQ". Its objective is to examine the growth dynamics of <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , focusing on its interaction with the CCN51 genotype of <i>Theobroma cacao L</i>				
Descripción:	75 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162				
URL:					

Introducción

Theobroma cacao L. es un cultivo neotropical, originario de la región amazónica de Suramérica (Bartley, 2015), y que ha sido cultivado, comercializado y consumido desde la época precolombina por Aztecas, Mayas, Olmecas y Toltecas. Es considerado uno de los cultivos más importantes a nivel mundial principalmente para pequeños agricultores (Hurts *et al.*, 2020). Las almendras (granos) extraídas de sus frutos (mazorca), son materia prima para la industria alimenticia mundial, valorada en más de 47.000 millones de dólares en exportaciones mundiales (Várguez *et al.*, 2017).

La industria cacaotera se ha visto devastada debido a un desenfrenado declive ocasionado por enfermedades emergentes causadas por varios patógenos, algunos causando muerte en árboles, manteniéndose a flote gracias al establecimiento de nuevas plantaciones (Marelli *et al.*, 2019). El cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) a lo largo del tiempo se ha visto afectado por innumerables enfermedades, algunas de estas causadas por *Lasiodiplodia theobromae* y *Phytophthora palmivora* (Satatista, 2021).

L. theobromae es la especie tipo del género *Lasiodiplodia* es un hongo que fue descrito por primera vez alrededor de 1890 por Saccardo, afectando plantaciones y principalmente frutos de cacao (*Theobromae cacao* L.) (Picos *et al.*, 2015). *L. theobromae* es un hongo patógeno que ha tomado importancia en los diferentes países de América Latina, causando principalmente muerte regresiva y pudrición de frutos en cultivos comerciales de cacao (Satatista, 2021).

L. theobromae es saprófito, pero se le considera un patógeno latente, encontrándose como endófito en tejidos sanos de la planta, convirtiéndose en patógeno cuando el hospedero está debilitado o estresado (García *et al.*, 2015). En cacao, *L. theobromae* puede sobrevivir en el suelo y restos de cultivo en forma de picnidios y clamidósporas, diseminándose por diferentes factores hasta alcanzar los tejidos vegetales, permaneciendo ahí como endófito (Murillo *et al.*, 2021).

En esta investigación, se analiza la dinámica de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae*, centrándose en cómo este hongo interactúa con el genotipo CCN51 de *Theobroma cacao* L. Se busca comprender los mecanismos moleculares y fisiológicos que influyen en la infección, así

como identificar posibles estrategias para mitigar los efectos negativos de esta interacción patogénica en la producción de cacao.

Este estudio contribuye al avance del conocimiento sobre la fitopatología del cacao y puede tener implicaciones prácticas para el desarrollo de estrategias de manejo de enfermedades en los cultivos de cacao.

CAPITULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

El problema de las enfermedades en el cultivo de cacao, particularmente la amenaza que representa el hongo *Lasiodiplodia theobromae*, adquiere una dimensión crítica no solo a nivel local, sino también a escala global. El cacao es uno de los productos agrícolas más importantes y ampliamente comercializados en el mundo, y su producción sostenible es esencial tanto para las economías de los países productores como para la industria chocolatera internacional.

Las enfermedades, y en especial la infección causada por *Lasiodiplodia theobromae*, presentan un desafío significativo para la producción de cacao en Latinoamérica y más allá. Este hongo es conocido por desencadenar diversas enfermedades en el cacao, como la "pudrición del cuello" y la "pudrición de la mazorca", lo que resulta en una disminución drástica en la cantidad y calidad de los granos de cacao cosechados. Esta disminución en la producción no solo afecta a los agricultores locales, sino que tiene repercusiones directas en la cadena de suministro global de cacao.

La capacidad del hongo para propagarse rápidamente y adaptarse a diferentes condiciones climáticas y ambientales agrava aún más el problema. La naturaleza altamente contagiosa de *Lasiodiplodia theobromae* puede llevar a brotes epidémicos que comprometen extensas áreas de cultivo, afectando la seguridad alimentaria y generando pérdidas económicas significativas.

Diagnóstico

La investigación se centra en comprender la dinámica de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae*. Esto implica analizar cómo el hongo se desarrolla y se propaga en presencia del genotipo CCN51. Este análisis probablemente incluirá la observación de tasas de crecimiento, patrones de colonización y la identificación de posibles factores que contribuyen o limitan el desarrollo del patógeno en este genotipo específico.

La referencia al "modelo de infección" sugiere que se está investigando la secuencia de eventos que conducen a la infección por *Lasiodiplodia theobromae* en el genotipo CCN51. Este modelo podría abordar aspectos como la penetración del hongo en los tejidos de la planta, la formación de estructuras de infección y la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo.

El diagnóstico sugiere que se busca ir más allá de la comprensión básica de la dinámica de crecimiento del patógeno y su interacción con el genotipo CCN51. Se espera que los resultados de esta investigación tengan aplicaciones prácticas, como el desarrollo de medidas preventivas o estrategias de resistencia que puedan implementarse en entornos de cultivo real.

Pronóstico

Se espera proporcionar una identificación detallada de los factores críticos que influyen en la dinámica de crecimiento de *L. theobromae* en el genotipo CCN51. Esto incluirá factores genéticos, ambientales y fisiológicos que pueden modular la interacción planta-patógeno. Se contribuirá al desarrollo de modelos de infección específicos para *L. theobromae* en el genotipo CCN51. Estos modelos podrían ayudar a prever la propagación de la enfermedad y permitir la identificación de puntos críticos para intervenciones efectivas.

Se espera dar información valiosa sobre estrategias de manejo que podrían mitigar los efectos de *L. theobromae* en dicho genotipo. Esto podría incluir la identificación de prácticas agronómicas, tratamientos químicos o enfoques biológicos que mejoren la resistencia del cacao a la infección. Se espera que los resultados tengan aplicaciones más allá del ámbito local, contribuyendo al conocimiento global sobre las interacciones planta-patógeno en los cultivos de cacao.

1.1.2. Formulación Del Problema

- ¿Cuál es la dinámica de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* y cuál es su relación al modelo de infección en genotipos de *Theobroma cacao* L?

1.1.3. Sistematización Del Problema

- ¿Cómo se desarrolla el micelio de *Lasiodiplodia theobromae* a diferentes rangos de temperaturas en condiciones *in vitro*?
- ¿Cómo ocurre el proceso de infección de *Lasiodiplodia theobromae* en el genotipo de *Theobroma cacao* L.?

1.2. Objetivos

1.2.1. *Objetivo General*

- Evaluar la dinámica de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* y su relación al modelo de infección en genotipo de *Theobroma cacao* L.

1.2.2. *Objetivos Específicos*

- Determinar el desarrollo micelial de *Lasiodiplodia theobromae* a diferentes rangos de temperaturas en condiciones *in vitro*
- Evaluar la dinámica de infección de *Lasiodiplodia theobromae* en plántulas de *Theobroma cacao* L.

.

1.3. Justificación

Estudiar la dinámica de infección de *Lasiodiplodia theobromae* y como esta infecta genotipos de *Theobroma cacao* L. radica en la importancia económica y ecológica del cacao. El cacao es un cultivo de gran relevancia en varios países, como Ecuador, donde su producción y exportación desempeñan un papel crucial en la economía.

L. theobromae afecta negativamente la producción de cacao. Esta enfermedad, puede causar pérdidas significativas en los rendimientos y la calidad de los granos de cacao. Además, el hongo puede persistir en el suelo y propagarse a través de las semillas, lo que dificulta aún más el control de la enfermedad.

La comprensión de la dinámica de infección de *L. theobromae* es fundamental para desarrollar estrategias efectivas de manejo y control de la enfermedad. Al estudiar cómo el hongo se desarrolla en diferentes genotipos de *T. cacao* L., es posible identificar aquellos genotipos que presentan una mayor resistencia o tolerancia a la infección. Esto permitiría seleccionar y promover variedades de cacao más resistentes, lo que a su vez contribuiría a reducir las pérdidas económicas y mejorar la sostenibilidad del cultivo.

La relación entre el crecimiento del hongo y el modelo de infección en los genotipos de cacao también puede brindar información sobre los mecanismos subyacentes de resistencia del cacao a *L. theobromae*. Esto podría ayudar en el desarrollo de estrategias de mejoramiento genético para producir variedades de cacao aún más resistentes a la enfermedad.

Investigar la dinámica de crecimiento de *L. theobromae* es fundamental para comprender y controlar eficazmente la podredumbre de la mazorca. Esta investigación tiene implicaciones directas en la mejora de la productividad, la calidad y la sostenibilidad del cultivo de cacao, así como en la protección del medio ambiente al reducir la necesidad de utilizar fungicidas químicos.

CAPITULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual

2.1.1. Infección

La infección por hongo en una planta representa una intrincada secuencia de eventos que subyacen en la interacción entre un hongo fitopatógeno y la planta hospedante. Este proceso es crucial en la dinámica de la fitopatología, ya que los hongos pueden causar enfermedades que afectan la salud y productividad de las plantas cultivadas. La comprensión detallada de este fenómeno es esencial para el desarrollo de estrategias efectivas de manejo y control de enfermedades (UNECOL, 2017).

2.1.2. Genotipo

El genotipo se refiere a la composición genética única de un organismo, es decir, al conjunto completo de genes que posee. Estos genes están formados por secuencias específicas de ADN que contienen la información necesaria para determinar las características y funciones de un individuo. El genotipo es fundamental para el desarrollo y el funcionamiento de un organismo, y junto con factores ambientales, contribuye a la expresión fenotípica, es decir, a cómo se manifiestan físicamente las características heredadas (Institute, 2020).

2.1.3. *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae es un hongo fitopatógeno perteneciente al género *Lasiodiplodia*, el cual engloba una variedad de patógenos que afectan una amplia gama de plantas, siendo notablemente conocido por su capacidad de causar enfermedades en el cacao (*Theobroma cacao*) y otras especies vegetales. Su morfología presenta características distintivas que desempeñan un papel crucial en su capacidad de propagación y colonización en las plantas hospedantes (Murillo *et al.*, 2021)

2.1.4. *Theobroma cacao* L. CCN51

Theobroma cacao L CCN51 es un genotipo específico de cacao que se distingue por sus características genéticas únicas. Estas características pueden incluir rasgos como la resistencia

a ciertas condiciones climáticas, la capacidad de adaptarse a diferentes suelos y la expresión de genes asociados con la calidad del grano de cacao. La variabilidad genética entre diferentes genotipos de cacao, incluyendo CCN51, es fundamental para comprender cómo estas plantas interactúan con patógenos como *Lasiodiplodia theobromae* (Asqui, 2006).

2.1.5. Patógeno

Los patógenos son entidades biológicas capaces de desencadenar enfermedades al invadir y proliferar en un organismo huésped. Esta capacidad de causar daño se deriva de la habilidad del patógeno para evadir o superar las defensas del sistema inmunológico del huésped. Estos agentes pueden ser diversos en su naturaleza y estructura, abarcando bacterias, virus, hongos, parásitos y otros microorganismos. Cada tipo de patógeno tiene estrategias específicas para colonizar, replicarse y persistir en el huésped (Bush, 2022).

2.2. Marco Referencial

2.2.1. *Theobroma cacao* L. CCN51

Theobroma cacao L. CCN51 es un genotipo específico de cacao que se distingue por sus características genéticas únicas. Estas características pueden incluir rasgos como la resistencia a ciertas condiciones climáticas, la capacidad de adaptarse a diferentes suelos y la expresión de genes asociados con la calidad del grano de cacao. La variabilidad genética entre diferentes genotipos de cacao, incluyendo CCN51, es fundamental para comprender cómo estas plantas interactúan con patógenos como *Lasiodiplodia theobromae* (Asqui, 2006).

La susceptibilidad de *Theobroma cacao* L. CCN51 a patógenos, como *Lasiodiplodia theobromae*, desempeña un papel fundamental en la comprensión de la dinámica de crecimiento de este fitopatógeno en plantaciones de cacao. La evaluación de la respuesta del genotipo CCN51 a la infección por el patógeno *Lasiodiplodia theobromae* incluye aspectos como la velocidad de propagación de la enfermedad, además de esto la capacidad de la planta para activar mecanismos de defensa y la eventual recuperación o resistencia a la infección (Asqui, 2006).

2.2.2. Origen del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.)

El cacao tuvo su origen en América, pero no se puede indicar con precisión el lugar específico ni su distribución. Algunos autores indican que el cultivo de cacao se inició en México y América Central y señalan que los españoles no lo vieron cultivado en América del Sur cuando arribaron a ese continente, lo encontraron creciendo en forma natural en muchos bosques a lo largo de los ríos Amazonas y Orinoco y sus afluentes, donde aún hoy existen tipos genéticos de mucho valor (Batista, 2009).

El cacao tipo Forastero o Calabacillo es originario de la Amazonía y Brasil, presenta menor diversidad de sabor y el aroma. De cada 100 granos de cacao que se producen en el mundo, 80 granos son de Cacao tipo Forastero. El cruce de estos dos grupos dio origen al cacao tipo Trinitario, llamado así por tener su origen en la Isla de Trinidad, frente a las costas de Venezuela. Del cruce repetido entre ellos, se originaron los diferentes tipos de cacao que se conocen y utilizan en la actualidad (Camacho *et al.*, 2020).

2.2.3. El cultivo de cacao en el Ecuador

El cacao es uno de los principales productos tradicionales de exportación ecuatoriana, y ha posicionado al Ecuador como el país más competitivo de América Latina en este campo, exportando dos variedades de cacao: CCN-51 y elaborados de cacao. El cacao se encuentra relacionado con dos sectores esenciales en el desarrollo de la riqueza nacional y en la generación de empleo, como son la agricultura, ganadería, silvicultura y pesca y en la industria manufacturera con los elaborados de cacao y chocolate (Sanchez *et al.*, 2013).

La producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Ecuador da sustento a unas cien mil familias, con niveles bajos de productividad en los cultivos. El país produce el 62% del cacao fino de aroma a nivel mundial. La producción de cacao se localiza, principalmente, en la región litoral, aunque se produce en 23 de las 24 provincias. En la zona norte, unas 80,000 has están sembradas en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Pichincha y Cotopaxi. Esta zona está caracterizada por suelos de origen volcánico, con precipitaciones de 2,000 mm (Sánchez *et al.*, 2015).

2.2.4. Problemas en la producción de cacao

La producción de cacao está determinada principalmente por factores como la edad de las plantaciones, en donde las que superan los 25 años. Presentan muchos problemas de enfermedades, carecen de asistencia técnica, y de un financiamiento acorde a las condiciones de producción de esta zona. La mayoría de las fincas no utilizan el manejo agronómico, tienen un escaso o nulo mantenimiento técnico del cultivo, y la cosecha se realiza según se vean frutos en los lotes de plantas (Rendiles *et al.*, 2009).

Diferentes factores afectan la producción de cacao en todo el mundo. Dentro de los factores bióticos, las enfermedades causadas por hongos y oomicetes constituyen las más importantes del cultivo. Dentro de estas se destacan la escoba de bruja causada por *Moniliophthora perniciosa*, la moniliasis provocada por *Moniliophthora roreri* y la pudrición negra de la mazorca (*Phytophthora spp.*). La pudrición negra de la mazorca constituye una de las enfermedades que con mayor frecuencia se detectan en plantaciones de cacao del país y con mayor impacto en la producción (De la Parte y Perez, 2015).

2.2.5. Enfermedades en el cultivo de cacao

Como en cualquier otra planta o cultivo, el árbol de cacao puede ser muy vulnerable a diferentes enfermedades. Y es que las condiciones donde nace este árbol hacen que sea muy propicio el desarrollo de todo tipo de enfermedades y plagas, sobre todo por las condiciones climáticas y de suelo. Estas plagas y enfermedades son uno de los más grandes enemigos del cacao, ya que pueden provocar que este se estropee por completo. (Nallar, 2021)

En Ecuador el cultivo de cacao es afectado por dos enfermedades primarias y endémicas, la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y monilia (*Moniliophthora roreri*) estas son causantes de hasta el 80% de pérdidas en la producción cacaotera, pudiendo llegar al 100% en épocas de alta infección. Entre éstas se destacan la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) el mal de machete (*Ceratocystis fimbriata*) y la muerte regresiva (*Lasiodiplodia theobromae*) que pueden causar la pérdida de la unidad productiva. Además, factores como el cambio climático y la falta de prácticas agronómicas adecuadas contribuyen al aumento de la incidencia de estas enfermedades. Es fundamental implementar estrategias de manejo integrado para mitigar los impactos devastadores en la industria del cacao (Solís *et al.*, 2021).

2.2.6. *Lasiodiplodia theobromae* en cacao

Lasiodiplodia theobromae es un hongo fitopatógeno perteneciente al género *Lasiodiplodia*, el cual engloba una variedad de patógenos que afectan una amplia gama de plantas, siendo notablemente conocido por su capacidad de causar enfermedades en el cacao (*Theobroma cacao* L.) y otras especies vegetales. Su morfología presenta características distintivas que desempeñan un papel crucial en su capacidad de propagación y colonización en las plantas hospedantes (Murillo *et al.*, 2021).

Muerte regresiva y pudrición negra o carbón de las mazorcas son enfermedades causadas por el hongo *Lasiodiplodia theobromae*, que afecta a las mazorcas y puede combinarse con monilia. El patógeno penetra a través de heridas sin protección y de tejidos en descomposición, causa necrosis en su interior y la marchitez en los brotes y ramas terminales; un síntoma común de su ataque es la aparición de “puntas desnudas”, también se lo ha encontrado afectando a las raíces (Alves *et al.*, 2008).

El hongo *L. theobromae* puede causar infección durante todo el año. En las mazorcas, la enfermedad inicia como una mancha de color negra, que se desarrolla en forma rápida, recubriéndola en unos ocho días con las estructuras reproductivas del hongo (conidios de color negro) a manera de polvo de carbón, lo cual se acelera si presentan heridas. La fuente de inóculo inicial son las mazorcas enfermas y momificadas que permanecen en la planta, desde allí los conidios son dispersados por el viento, el agua, los implementos de trabajo o los insectos perforadores del tronco (Alves *et al.*, 2008).

2.2.7. *Biología*

La morfología de su ascocarpo es de color café oscuro a negro, agregado, con pared gruesa de color café oscuro y hialino en capas internas, de 250-400 µm de diámetro. El asca es bitunicada, estipitada, con 8 esporas, de 90-120 µm de longitud. Las ascosporas son biseriadas, hialinas, aseptadas de 30-35 x 11-14 µm. El conidiomata es estromático, simple o agregado, inmerso en el hospedero y una vez maduro emerge de éste, de color café oscuro, unilocular, de pared gruesa o delgada de color marrón, con frecuencia setoso, de hasta 5 mm de ancho, ostiolo central, único, papillado. Paráfisis hialinas, cilíndricas, tabicadas, ocasionalmente ramificadas con los extremos redondeado hasta 55 µm de largo y 3-4 µm de ancho (Phillips *et al.*, 2013).

2.2.8. Taxonomía

Tabla 1:

Taxonomía de la Lasiodiplodia theobromae

CLASIFICACIÓN	NOMBRE
REINO:	Hongos
FILO:	Ascomycota
SUBFILO:	Pezizomycotina
CLASE:	Dothideomycetes
ORDEN:	Botryosphaerales
FAMILIA:	Botryosphaeriaceae
GÉNERO:	Lasiodiplodia
ESPECIE:	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>

Fuente: (EPPO, 2002)

2.2.9. Ciclo de la enfermedad

El fitopatógeno sobrevive en el suelo y en restos culturales, principalmente en forma de picnidios, esclerocios o clamidósporas que actúan como estructuras de resistencia en restos de tejidos infectados o en el suelo (Kuswinanti *et al.*, 2019). El microorganismo en esta fase del ciclo tal vez podría permanecer como un saprófito. Las esporas contenidas en los picnidios son liberadas al ambiente en condiciones óptimas, siendo diseminadas por el viento, la lluvia o transportadas a través de herramientas e insectos de la familia Miridae (*Helopeltis thetvora*, *H. ammonli* y *H. theobromae*) (Vázquez *et al.*, 2017).

Una vez que el hongo penetra la planta, su presencia se manifiesta mediante la aparición de lesiones en los brotes jóvenes. No solo afectan la apariencia física de la planta, sino que también comprometen su salud y rendimiento. En los frutos, las lesiones pueden provocar la descomposición prematura, resultando en una reducción significativa del rendimiento de las mazorcas. Este impacto es aún más pronunciado en variedades de cacao susceptibles, donde la propagación del hongo puede ser más rápida y devastadora. (Kuswinanti *et al.*, 2019).

2.2.10. Sintomatología

El patógeno puede infectar tejidos vegetales sanos sin que presenten síntomas, comportándose como un endófito. Sin embargo, si la planta atraviesa algún tipo de estrés los síntomas se pueden hacer visibles (Mohali *et al.*, 2005). En condiciones controladas, los primeros síntomas pueden ser visibles a los 14 días después de la inoculación de *L. theobromae* en plantas de cacao, pudiendo estas morir en un lapso de 10 semanas. A nivel de campo, el patógeno puede afectar ramillas jóvenes, causándoles la muerte sin afectar ramas principales. Con la colonización del patógeno en los tejidos pueden observarse clorosis en todo el follaje, marchitamiento y posteriormente muerte de la planta, fenómeno que toma el nombre de “muerte regresiva” (Mvondo *et al.*, 2019).

Otros de los síntomas observados en campo son la pudrición y la momificación de mazorcas. Luego que el hongo penetra muy fácilmente los tejidos de mazorcas sanas aparecen manchas de coloración marrón en la corteza, pudiendo alcanzar las almendras de cacao, donde finalmente se puede observar la mazorca totalmente necrosada e inviable. Las mazorcas afectadas presentan en su interior una masa de micelio negruzco que envuelve las almendras. Aunque otros síntomas como gomosis, canchros y agallas pueden también observarse en el tallo, en cacao aún no hay evidencias al respecto (Castillo *et al.*, 2016).

2.2.11. Dinámica de crecimiento

La dinámica de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* constituye un aspecto crucial para comprender la interacción del hongo con sus plantas hospedantes, siendo esta interacción influenciada de manera significativa por diversos factores ambientales. La medición de la tasa de crecimiento se convierte así en una herramienta esencial para desentrañar los procesos biológicos y patológicos involucrados (Murillo *et al.*, 2021).

La tasa de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* se mide mediante la observación y cuantificación de la expansión del micelio, la estructura filamentosa del hongo, en diferentes condiciones experimentales. Este proceso implica la toma de muestras en intervalos específicos y la evaluación del crecimiento del hongo en medios de cultivo o directamente en tejidos vegetales. La velocidad a la que *Lasiodiplodia theobromae* coloniza estos sustratos

proporciona información valiosa sobre su capacidad de adaptación y respuesta a las condiciones ambientales (Murillo *et al.*, 2021).

2.2.12. Modelo de infección

El modelo de infección de *L. theobromae* se refiere a la secuencia de eventos moleculares, celulares y fisiológicos que caracterizan la interacción entre el hongo fitopatógeno y su planta hospedante, específicamente en el contexto del cacao, particularmente en el genotipo CCN51. Este modelo proporciona una representación detallada de cómo *L. theobromae* coloniza y causa daño en las células de la planta hospedante, influyendo en su dinámica de crecimiento y, en última instancia, en la salud y rendimiento del cultivo (Nallar, 2021).

2.2.13. Patógeno

Los patógenos son entidades biológicas capaces de desencadenar enfermedades al invadir y proliferar en un organismo huésped. Esta capacidad de causar daño se deriva de la habilidad del patógeno para evadir o superar las defensas del sistema inmunológico del huésped. Estos agentes pueden ser diversos en su naturaleza y estructura, abarcando bacterias, virus, hongos, parásitos y otros microorganismos. Cada tipo de patógeno tiene estrategias específicas para colonizar, replicarse y persistir en el huésped (Batista, 2009).

Cuando un patógeno invade un organismo hospedador, desencadena respuestas inmunológicas destinadas a neutralizar y eliminar la amenaza. Las respuestas inmunológicas pueden implicar la movilización de células del sistema inmunitario, la liberación de moléculas señalizadoras y la activación de cascadas moleculares. Sin embargo, algunos patógenos han evolucionado mecanismos sofisticados para evadir estas respuestas, permitiéndoles establecer infecciones persistentes (Casadevall, 2000).

2.2.14. Síntomas

Un síntoma es una manifestación subjetiva u objetiva de una enfermedad o trastorno que es percibida por el individuo afectado o por un observador externo. Estos signos indican la presencia de una alteración en la salud y pueden variar desde sensaciones subjetivas, como

dolor o fatiga, hasta manifestaciones objetivas, como fiebre o erupciones cutáneas (Agrios, 2004).

El síntoma de una infección por hongo en una planta se refiere a los cambios visibles o evidentes en la morfología, fisiología o estructura de la planta que resultan de la interacción con un hongo patógeno. Estos síntomas son indicativos de la presencia de una enfermedad fúngica y pueden variar según el tipo de hongo, la planta hospedadora y las condiciones ambientales. Algunos síntomas comunes de infecciones fúngicas en plantas incluyen: lesiones en el tejido vegetal, deformaciones y malformaciones, cambios en la textura y estructura, entre otros (Agrios, 2004).

2.2.15. *Fitopatógeno*

Los fitopatógenos son microorganismos o agentes biológicos especializados en atacar y afectar la salud de las plantas, lo que puede tener consecuencias significativas en la agricultura y la producción de alimentos. Estos organismos pueden incluir hongos, bacterias, virus y nematodos que han evolucionado estrategias específicas para colonizar las plantas, aprovechando sus recursos para su propio beneficio. La relación entre los fitopatógenos y las plantas es dinámica y compleja, y su interacción puede tener un impacto considerable en los ecosistemas agrícolas (Agrios, 2004).

Los fitopatógenos a menudo ingresan a las plantas a través de heridas, estomas u otras aberturas naturales, y luego colonizan los tejidos vegetales. Durante esta colonización, los patógenos liberan enzimas y toxinas que facilitan su invasión y desencadenan respuestas específicas en las plantas. La presencia de fitopatógenos desencadena respuestas fisiológicas y bioquímicas en las plantas afectadas. Estas respuestas incluyen la producción de fitoalexinas, moléculas antimicrobianas que buscan contrarrestar la infección, así como la activación de rutas de señalización celular para coordinar la defensa contra el patógeno (Agrios, 2004).

2.2.16. *Propagación*

La propagación de la enfermedad se refiere al proceso mediante el cual los agentes patógenos, ya sean bacterias, virus, hongos u otros microorganismos, se transmiten de un individuo a otro, extendiendo la infección en una población. Este fenómeno puede ocurrir de diversas maneras,

como a través del contacto directo entre individuos, la transmisión por vectores (organismos que transportan y transmiten el patógeno), o mediante la dispersión de esporas o partículas infecciosas en el entorno (Anderson y May, 1992).

La propagación de enfermedades puede tener consecuencias significativas en la salud de los organismos afectados, ya sean plantas, animales o seres humanos. Comprender los mecanismos de propagación es fundamental para el diseño de estrategias efectivas de control y prevención de enfermedades (Anderson y May, 1992).

2.2.17. Colonización

La colonización biológica representa una intrincada danza entre organismos y su entorno, abarcando desde la colonización beneficiosa hasta la invasión perjudicial. Este proceso implica el establecimiento y la proliferación exitosa de organismos en un hábitat específico, manifestándose en diversos contextos biológicos (Camacho *et al.*, 2020).

En el reino microbiano, la colonización abarca la ocupación de superficies, tejidos o ambientes específicos por bacterias, hongos y otros microorganismos. Por ejemplo, la colonización de la rizosfera por bacterias beneficiosas puede promover el crecimiento de las plantas al facilitar la absorción de nutrientes o al proporcionar protección contra patógenos (Camacho *et al.*, 2020).

Las plantas también experimentan colonización, ya sea por simbiontes beneficiosos como micorrizas o por patógenos que comprometen su salud. La relación entre las plantas y los microorganismos puede influir en el desarrollo, la resistencia a enfermedades y la adaptación al entorno (Taussat *et al.*, 2004).

2.2.18. Tejido

El tejido emerge como la unidad básica que organiza y coordina las numerosas funciones vitales de estos organismos multicelulares. Un tejido vegetal consiste en un conjunto de células especializadas que comparten similitudes estructurales y funcionales, colaborando para ejecutar tareas específicas que contribuyen al desarrollo y la supervivencia global de la planta (Esau, 1977).

Tejido Parenquimático; Conformado por células vivas con paredes celulares delgadas, el tejido parenquimático es versátil y se encuentra en diversas partes de la planta. Desempeña funciones como el almacenamiento de nutrientes, la fotosíntesis y la respiración. Tejido Colenquimático; Las células colenquimáticas tienen paredes celulares más gruesas y proporcionan soporte estructural a las partes en crecimiento de la planta, como brotes jóvenes y hojas en desarrollo (Esau, 1977).

2.2.19. Sistema Vascular

El sistema vascular en una planta es una red organizada de tejidos especializados, principalmente el xilema y el floema, que facilita el transporte de agua, nutrientes y compuestos orgánicos a lo largo de la planta. Este sistema desempeña un papel crucial en la distribución eficiente de sustancias esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, conectando las raíces, tallos y hojas en un sistema integrado (Taiz, 2017).

2.3. Revisión histórica del tema en estudio

Un estudio titulado "Patogenicidad y Endofitismo" proporciona una visión detallada sobre la capacidad endofítica de *Lasiodiplodia theobromae*, una especie reconocida por su habilidad para colonizar una amplia variedad de plantas tanto como endófito como patógeno. Este estudio demuestra que el estrés vegetal juega un papel fundamental en la estimulación del comportamiento patógeno de *L. theobromae*, considerando también los casos de fallos ocasionales en las inoculaciones artificiales durante los ensayos de patogenicidad. Además, se examina la interacción entre el patógeno y la planta huésped, destacando cómo el estrés ambiental puede influir en la virulencia del patógeno y en la respuesta del huésped a la infección. Estos hallazgos subrayan la importancia de comprender los mecanismos subyacentes detrás de la virulencia y la adaptación de *L. theobromae*, lo que es crucial para desarrollar estrategias efectivas de manejo de enfermedades en los sistemas agrícolas (Mullen *et al.*, 1991).

En un artículo de revisión titulado "Metabolitos Secundarios de *Lasiodiplodia theobromae*: Distribución, Diversidad Química, Bioactividad e Implicaciones de su Aparición", se realiza un análisis exhaustivo de la amplia literatura disponible sobre los metabolitos secundarios producidos por *L. theobromae*. Este estudio revela que esta especie fúngica es capaz de sintetizar una amplia gama de compuestos con diversas propiedades químicas y biológicas.

Además de los metabolitos de bajo peso molecular, se ha descubierto que *L. theobromae* también puede ser un productor de compuestos de alto peso molecular, como los polisacáridos. Estos hallazgos resaltan la versatilidad metabólica de *L. theobromae* y sugieren su potencial aplicación en diversos campos, incluyendo la agricultura, la medicina y la industria (Salvatore *et al.*, 2020).

En un estudio se ha demostrado que *Lasiodiplodia theobromae* exhibe un comportamiento saprófito, si bien se le clasifica como un patógeno latente. Este hongo se ha identificado como un endófito presente en tejidos vegetales sanos, donde coexiste en un estado de quiescencia. Sin embargo, su papel como patógeno se manifiesta cuando el huésped experimenta condiciones de debilitamiento o estrés. En tales circunstancias, *L. theobromae* puede activarse y desencadenar respuestas patogénicas, comprometiendo la salud y el rendimiento de la planta hospedera (Rubini *et al.*, 2005).

En un estudio de evaluación de la sensibilidad de *L. theobromae* hacia dos grupos de fungicidas se concluyó que un 91.6 % de 120 aislados provenientes de huertos de papaya fueron sensibles a los ingredientes activos del grupo de carbamatos del tipo metil benzimidazol (benomyl y tiabendazol). En cuanto al grupo de fungicidas del tipo inhibición por demetilación (Imazalil, procloraz, tebuconazol) se encontró gran variabilidad en cuanto al grado de sensibilidad de los aislados analizados concluyendo que *L. theobromae* es menos sensible a este grupo de fungicidas (Silva *et al.*, 2012).

En los últimos años la severidad y sus daños han venido aumentando, causando una serie de problemas en diferentes cultivos incluyendo el cacao (Pereira *et al.*, 2006), lo que ha hecho que se tome más interés en esta patología. *L. theobromae* pasó de ser un hongo con actividad endófito a ser un patógeno oportunista, y ahora es considerado potencial mente una amenaza para el cultivo de cacao

En un estudio genómico y trangenómico reciente realizado, donde se investigaron 13061 genes codificadores de proteínas en 52 cepas de *L. theobromae* aislados de tejidos sintomáticos de cacao, se encontraron 2862 exclusivos para la especie en estudio, en comparación con otras miembros de *Botryosphaeriaceae* estrechamente relacionadas. Mientras tanto, a nivel bioquímico se conoce que *L. theobromae* posee 134 compuestos químicamente definidos

pertenecientes a las clases de metabolitos secundarios y ácidos grasos, i.e. ciclohexenos y ciclohexenonas, indoles, jasmonatos, lactonas, melleínas, fenoles y otros (Ali *et al.*, 2019).

Evaluaron el efecto del ozono, yodo y cloro en la germinación de esporas de *L. theobromae* aislado de frutos de mango y encontraron que en la aplicación de yodo (500 mg. L⁻¹) la germinación de esporas de *L. theobromae* fue de 10%; mientras que con ozono (2.2 mg. L⁻¹) y cloro (360 mg. L⁻¹) la germinación de esporas fue de 30 y 40%, respectivamente (Barbosa *et al.*, 2002).

Reportaron que la combinación de lavado y posterior aplicación de tiabendazol redujo la incidencia de la enfermedad ocasionada por *L. theobromae* hasta un 81 % en injertos de zapote. Los fungicidas ciprodinil+fludioxinil, piraclostrobin+boscalid, procloraz, tebuconazol, iprodione fueron eficaces para inhibir el crecimiento micelial de *L. theobromae in vitro* (Tovar *et al.*, 2013).

Un estudio demuestra que *L. theobromae* puede sobrevivir durante 12 meses con semillas de calabaza gravemente infectadas. De hecho, su supervivencia dependería del nivel de infección de las semillas. Duraría 7 meses en semillas de calabaza. Su micelio y sus picnidios garantizarían notablemente su conservación (Ephytia, 2021).

CAPITULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “La María” ubicado en el km 7 vía Quevedo – El empalme, cantón Mocache, provincia de los Ríos. Sus coordenadas geográficas son 01° 02′24″ latitud Sur y 76° 26 a 79° 30 de longitud Oeste, a una altura de 66 m.

3.2. Tipo de investigación

Se empleó el enfoque empírico-analítico, el cual se fundamenta en la experimentación y el razonamiento empírico, respaldado por referencias bibliográficas y conocimientos previos pertinentes, para llevar a cabo la detección e identificación de hongos.

3.3. Método de investigación

En la investigación se emplearon los métodos deductivos, analítico y de observación teniendo en cuenta la bibliografía mencionada en este proyecto.

- En el método deductivo, comenzamos examinando teoremas, leyes, postulados y principios que son universalmente válidos y ampliamente probados, y luego los aplicamos a situaciones o casos específicos.
- El método analítico implica descomponer un objeto de estudio en sus partes individuales para analizarlas por separado.
- El método de observación implica la habilidad de elegir cuidadosamente lo que deseamos examinar.

3.4. Fuentes de recopilación de la información

Se implementó un enfoque exhaustivo para recopilar información, haciendo uso tanto de fuentes primarias como secundarias. Las fuentes primarias, como revistas especializadas, documentos científicos y tesis, proporcionaron datos de primera mano y hallazgos de investigaciones directas sobre el tema.

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Tratamientos

3.5.1.1. Determinación del desarrollo micelial de *L. theobromae* (Experimento 1).

Se analizaron de forma independiente los grados de adaptación a siete temperaturas, de las cepas *L. theobromae* (Cepa 1A) y (Cepa 2A). Los grados de temperatura empleados se pueden encontrar detallados en la (Tabla 2).

Tabla 2:

Tratamientos (Experimento 1)

Tratamientos	Descripción
T1	16°C
T2	20°C
T3	24°C
T4	28°C
T5	32°C
T6	36°C
T7	40°C

Elaborado: Autor

3.5.2. Dinámica de infección de *L. theobromae* en plántulas de CCN51 (Experimento 2).

Los ensayos de la dinámica de crecimiento del patógeno se evaluaron de forma independiente para cada cepa (Cepa 1A Y Cepa 2A). Se muestreo tejido vegetal a cada cm del tallo partiendo del punto de inserción de los cotiledones, tanto hacia la parte superior como hacia la parte inferior (Figura 1). Se emplearon 5 tratamientos y 4 repeticiones (Tabla 3).

Tabla 3:

Tratamientos (Experimento 2)

Tratamientos	Descripción
T1	Nivel de infección Sector 1 (0 a 1 cm)
T2	Nivel de infección Sector 2 (1 a 2 cm)
T3	Nivel de infección Sector 3 (2 a 3 cm)
T4	Nivel de infección Sector 4 (3 a 4 cm)
T5	Nivel de infección Sector 5 (4 a 5 cm)

Elaborado: Autor

3.5.3. Diseño Experimental

Para cada experimento, se empleó el diseño completamente al azar (DCA) con cuatro repeticiones. Este diseño experimental será aplicado de manera independiente en ambas cepas de *L. theobromae* (Tabla 4).

Tabla 4:

Esquema de análisis estadístico. Experimento 1

Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	6
Error	21
Total	27

Elaborado: Autor

Tabla 5:

Esquema de análisis estadístico. Experimento 2

Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	4
Error	15
Total	19

Elaborado: Autor

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Manejo del experimento

3.6.1.1. Desarrollo micelial de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones in vitro. (Experimento 1).

Se obtuvieron mazorcas afectadas por el hongo *Lasiodiplodia theobromae* en diversas regiones dedicadas al cultivo de cacao CCN-51. Estas mazorcas fueron recopiladas con el propósito de establecer un conjunto de cepas que forman parte del laboratorio de biología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo Campus “La María”.

3.6.1.2. Aislamiento de *Lasiodiplodia theobromae*.

Para aislar las cepas, se realizaron extracciones de muestras que mostraban síntomas de mazorca negra. Se obtuvieron dos submuestras de cada región con el propósito de garantizar la presencia del agente patógeno. Después de recoger las muestras, se procedió a desinfectar su superficie utilizando una solución al 10% de hipoclorito de sodio. Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada para eliminar cualquier residuo del desinfectante. Después

de transcurridos cinco minutos desde el último enjuague, las muestras fueron rociadas con alcohol al 50% y luego colocadas en un entorno ventilado para que el alcohol se evaporara.

3.6.1.3. *Reactivación de la cepa.*

Las mazorcas de cacao CCN-51 que se obtuvieron fueron lavadas con jabón líquido y una esponja para no dañar el tejido externo de la mazorca, se realizaron tres enjuagues y se secaron con papel toalla. Una vez ya secas se procedió a realizar la infección con las cepas del patógeno a reactivar. Se realizaron dos cortes en la mazorca, uno en cada extremo de esta, en cada corte fue colocado el patógeno. La mazorca se coloca en una funda de polipropileno con un papel toalla previamente húmedo para que el patógeno pueda desarrollarse.

3.6.1.4. *Purificación de la sepa.*

Se purificó al organismo en medio de cultivo PDA (Patata-Dextrosa-Agar) suplementado con complejo B. Se dejó incubar a 28 °C durante un período de 72 horas sin fotoperiodo para favorecer el crecimiento del microorganismo. Posteriormente, se procedió a la replicación de las muestras en medio de cultivo PDA + complejo B y se realizaron incubándolas a diferentes temperaturas: 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 °C.

Cada cultivo se dejó incubar durante un período de 96 horas. Finalmente, una vez transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo una evaluación del crecimiento de las colonias resultantes de cada una de las cepas de estudio. Esta evaluación permitió obtener información relevante sobre el impacto de las distintas temperaturas en el desarrollo y viabilidad del organismo en estudio.

3.6.1.5. *Caracterización morfológica.*

En el proceso de caracterización morfológica, se utilizó el enfoque metodológico delineado por (Díaz, 2011). Tras examinar las características estructurales, la rapidez de crecimiento y el aspecto de la colonia de cada muestra, se realizaron una serie de pruebas de patogenicidad. El propósito de estas pruebas fue descartar aquellos aislamientos que no presentaran los síntomas iniciales, garantizando de esta manera una selección precisa de los aislamientos a tener en cuenta.

3.6.1.6. Crecimiento micelial.

Para llevar a cabo la caracterización de la apariencia de las colonias, se utilizó el medio de cultivo PDA. Cada aislamiento fue inoculado de manera individual y luego se incubó a una temperatura de 28 °C durante un lapso de tres días. Después de este período de incubación, se realizó una evaluación, los bordes y el color de las colonias.

3.6.1.7. Proceso de infección de *Lasiodiplodia theobromae* en genotipos de *Theobroma cacao* L. (Experimento 2).

Para la evaluación de la infección se obtuvieron mazorcas sanas de cacao CCN-51 en diferentes zonas, se aseguró que las plantas y mazorcas de cacao no hayan sido previamente fumigadas. Estas mazorcas fueron recopiladas con el propósito de sembrar las semillas y obtener plántulas de cacao para poder evaluar el proceso de infección.

3.6.1.8. Escarificación de semillas.

Se obtuvieron mazorcas sanas de cacao CCN-51, estas fueron lavadas y cortadas a la mitad para poder obtener las semillas. Las semillas fueron escarificadas realizándoles un corte con bisturí, una vez que ya se obtiene la semilla sin el mucilago se realiza la desinfección con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada.

3.6.1.9. Germinación de las semillas.

Después de completar el proceso de desinfección de las semillas, se procede a preparar un ambiente propicio para su germinación. Las semillas tratadas se colocan cuidadosamente en un recipiente de aluminio, que ha sido previamente preparado con papel toalla humedecido. Este papel toalla proporciona el nivel adecuado de humedad para el inicio del proceso de germinación. Una vez que las semillas están dispuestas en el recipiente, se las cubre con otra capa de papel toalla húmedo para asegurar una distribución uniforme de la humedad y favorecer un ambiente óptimo para la germinación. Para mantener las condiciones ideales de humedad y temperatura, el recipiente que contiene las semillas es envuelto cuidadosamente con fundas plásticas. Estas fundas plásticas actúan como una barrera protectora.

3.6.1.10. *Recolección de tierra*

Para la preparación del sustrato de siembra, se procedió a la obtención de tierra proveniente de un área cacaotera situada en la Finca experimental “La María”. Posteriormente, esta tierra fue transportada al laboratorio con el fin de someterla a un proceso de desinfección. Para ello, fue depositada en bolsas de polipropileno y llevada a la autoclave para su esterilización a alta presión y temperatura, asegurando así la eliminación de microorganismos potencialmente nocivos. Una vez completado el ciclo de esterilización, se permitirá que la tierra se enfríe a temperatura ambiente, siendo recomendable un período de espera de al menos 24 horas para garantizar su total enfriamiento antes de su utilización en los experimentos subsiguientes.

3.6.1.11. *Siembra de semillas.*

Después de transcurridos 7 días desde la germinación de las semillas, se llevó a cabo el proceso de siembra. La mezcla de sustrato, compuesta por tierra previamente enfriada y perlita para mejorar la retención de humedad, fue preparada meticulosamente. Esta mezcla se dispuso en recipientes de plástico tipo vaso cervecero, donde posteriormente se colocaron las semillas. A continuación, se les suministró agua destilada y los recipientes fueron ubicados en un ambiente cerrado, iluminado artificialmente.

3.6.1.12. *Infección de plantas.*

Una vez que las plántulas alcanzaron el estado fenológico de cotiledón caído, fueron inoculadas con el inóculo patógeno en proximidad directa a las yemas inferiores del tallo (Figura 1).

Figura 1:

Modelo de infección de la planta.

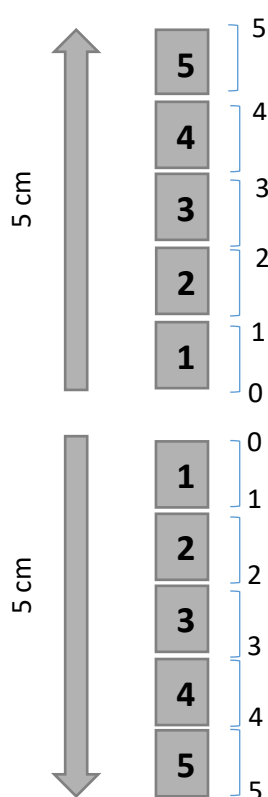


3.6.1.13. Toma de muestras

En el instante de la inoculación, se efectuaron extracciones de muestras del tejido del tallo de las plantas. Se llevaron a cabo cortes verticales uniformes en el tallo para obtener dos secciones simétricas. Posteriormente, se recolectaron muestras de 1 cm de longitud de cada segmento del tallo, tanto de la porción superior como de la inferior con respecto al sitio de la infección (Figura 2).

Figura 2:

Modelo de toma de muestras de la planta.



3.6.1.14. Desinfección de muestras

Tras la recolección de las muestras, se llevó a cabo un riguroso proceso de desinfección para eliminar cualquier contaminación externa. En primer lugar, las muestras fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante un período de 5 minutos. Previamente a este paso, se realizaron sumersiones breves en alcohol al 75% durante 30 segundos para desinfectar la superficie de las muestras. Seguidamente, se procedió a realizar tres enjuagues con agua destilada para eliminar cualquier residuo de los agentes desinfectantes. Una vez

completado este proceso, las muestras fueron cuidadosamente secadas con papel filtro para eliminar el exceso de humedad y prepararlas para su análisis subsiguiente. Este protocolo de desinfección garantiza la integridad de las muestras y minimiza el riesgo de contaminación cruzada durante el análisis posterior.

3.6.1.15. *Siembra de muestras*

Después de la extracción de las muestras, estas fueron sembradas en medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) para su posterior incubación. Las placas de cultivo fueron mantenidas a una temperatura controlada de 28°C, óptima para el crecimiento del patógeno en estudio. Este proceso de toma de muestras y siembra se llevó a cabo en cuatro momentos temporales distintos: en el día 0, 1, 30 y 45 antes de la inoculación de las plantas, con el propósito de establecer una línea de base y monitorear la evolución del crecimiento del patógeno en el medio de cultivo antes de su introducción en el sistema vegetal.

3.6.2. *Variables a evaluar*

3.6.2.1. *Desarrollo en diferentes rangos de temperatura*

Esta evaluación se realiza con distintas temperaturas 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 40°C que nos permitirá obtener información sobre el desarrollo y viabilidad del patógeno

3.6.2.2. *Movilidad del patógeno en la planta*

Se tomarán muestras del tallo cada 5 cm, de la parte superior a la infección y de la parte inferior a la infección, también de la parte radicular de la planta, se sembrarán en medio PDA, y en base a su desarrollo y crecimiento veremos si hay mayor infección en la parte superior o en la parte inferior a la infección.

3.7. Tratamiento de los datos

La información se tabuló en el programa InfoStat bajo el siguiente análisis:

- Análisis de varianza

- Separación de medias para prueba múltiple de probabilidad, Tukey al 5%

3.8. Recursos Humanos y Materiales

3.8.1. *Recursos Humanos*

- Director del proyecto de investigación
- Técnicos de laboratorio
- Pasantes

3.8.2. *Equipos*

- Autoclave
- Cabina
- Nevera
- Microscopio
- Incubadora
- Balanza

3.8.3. *Materiales*

- Complejo B
- Papel Toalla
- Fundas de polipropileno
- Cajas petri
- Mecheros
- Matraz enlarmeyer
- Bisturí
- Alcohol
- Hipoclorito de sodio
- Vaso de precipitado
- Papel aluminio
- Regla
- Plástico

- Vasos de plástico
- Timer
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio
- Tierra
- Perlita
- PDA (Papa Dextrosa Agar)

3.8.4. *Material Vegetal*

- Plántulas de cacao (De 3 a 4 meses de edad)

3.8.5. *Material genético*

- *Lasiodiplodia theobromae* (Patógeno)
- *Theobroma cacao* L. (mazorcas)

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

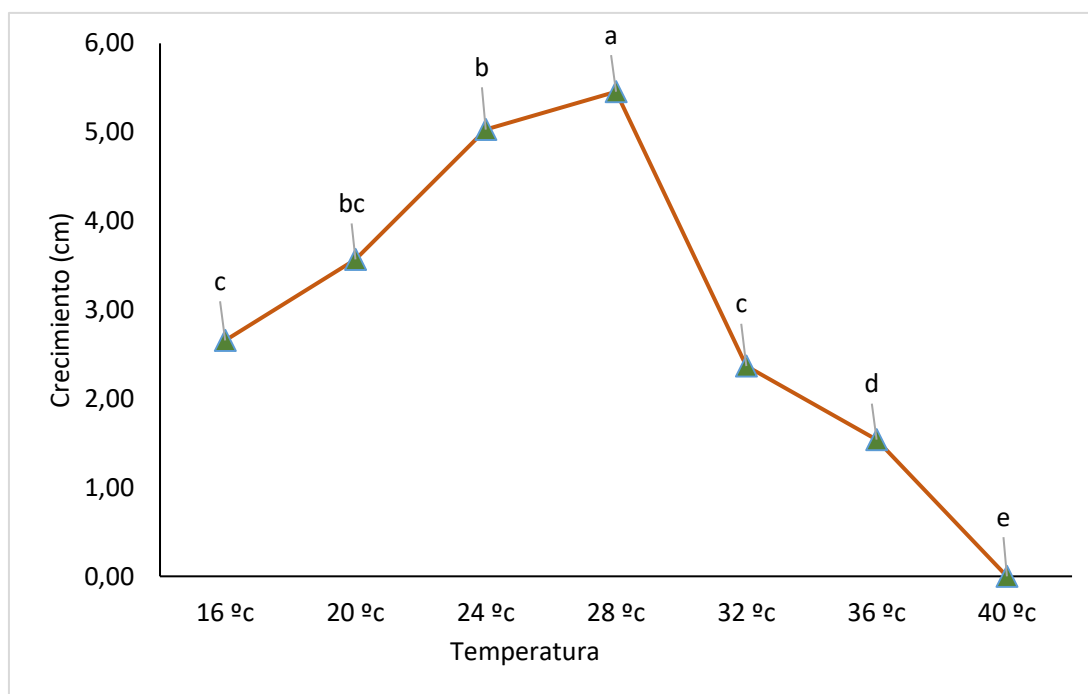
4.1. Experimento 1

4.1.1. Desarrollo micelial de *Lasiodiplodia theobromae* en diferentes rangos de temperatura.

Lasiodiplodia theobromae Cepa 1A. La observación y análisis de las condiciones de crecimiento de la especie fúngica de *L. theobromae* ha evidenciado diferencia significativa para los rangos de temperatura. Ha revelado un patrón discernible en el crecimiento del micelio, destacando que el rango de temperatura óptimo para el crecimiento de la cepa 1A de *L. theobromae* es de 28°C. Con un incremento del micelio de 5 cm, determinando que a mayor grado de temperatura donde sobrepasa los 28°C disminuye el crecimiento del micelio de 4 a 0 cm. Definiendo que los rangos de crecimiento óptimos de temperatura para *L. theobromae* están desde 24 a 28°C (Figura 1).

Figura 3:

Crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* en diferentes rangos de temperatura.

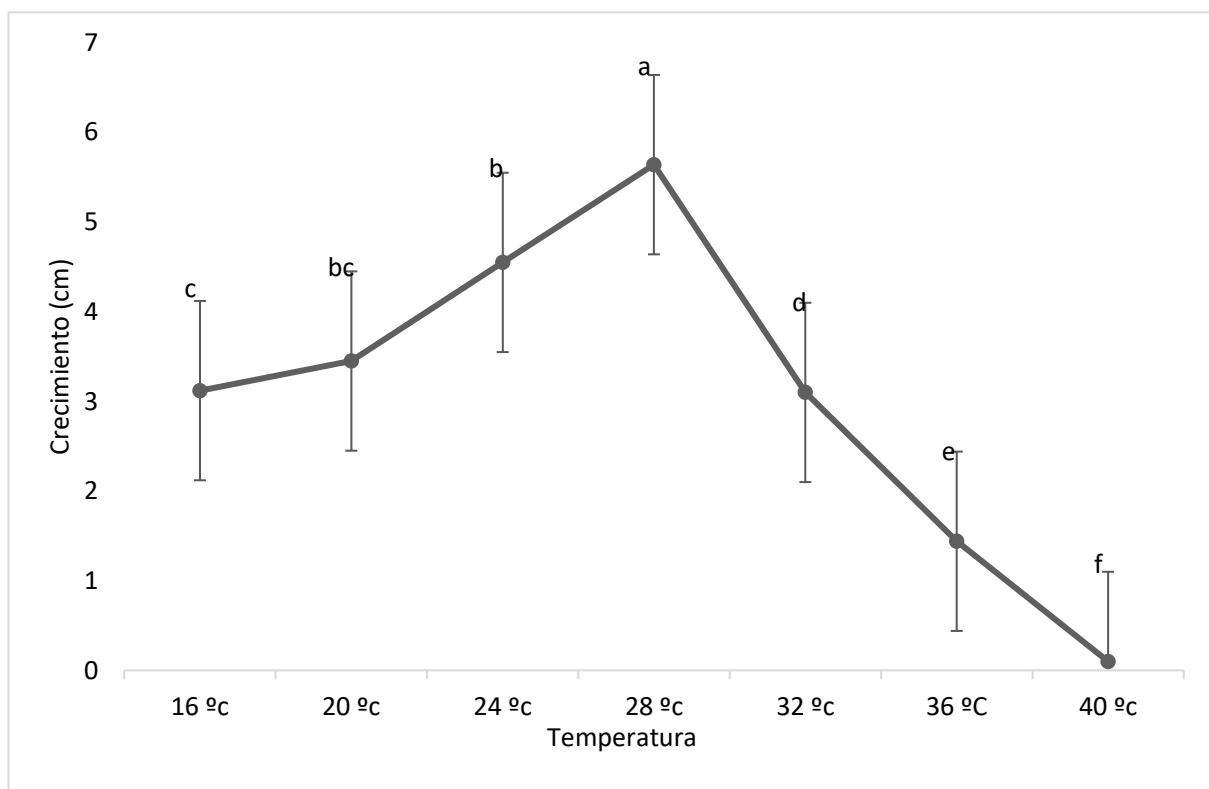


Nota: Las barras $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios (Tukey $p < 0.05$).

En relación a *Lasiodiplodia theobromae* Cepa 2A, se ha observado y analizado el efecto de diferentes condiciones de temperatura en su crecimiento. Se ha notado una variación significativa en los rangos de temperatura, con un patrón claro en el desarrollo del micelio. Se destaca que la temperatura óptima para el crecimiento de la cepa 2A de *L. theobromae* es de 28°C al igual que la cepa 1A. Se ha observado que el crecimiento micelial *in vitro* de la cepa 2A es máximo en un rango de temperatura entre 24 y 28°C, con un incremento del micelio de 5,64 cm. Sin embargo, se ha determinado que, a temperaturas mayores a 28°C el crecimiento micelial disminuye, llegando a crecer el micelio de 3,1 a 0 cm a temperaturas más altas (Figura 2).

Figura 4:

Crecimiento micelial de Lasiodiplodia theobromae en diferentes rangos de temperatura



Nota: Las barras $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios (Tukey $p < 0.05$).

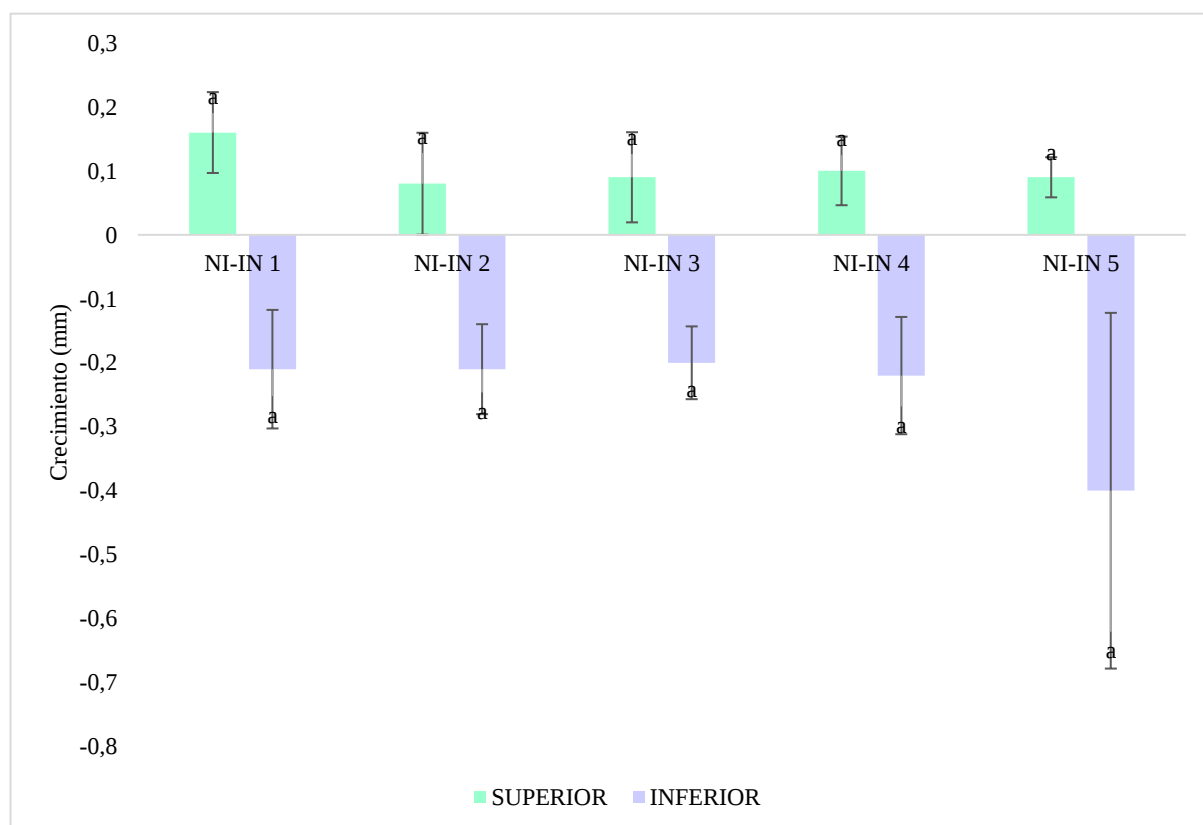
4.1.2. Experimento 2

4.1.2.1. Dinámica de infección de *Lasiodiplodia theobromae* en genotipo de *Theobroma cacao* L. CCN51.

El análisis de la dinámica de crecimiento del fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae* ha puesto de manifiesto una serie de patrones distintivos. Se ha observado que, dentro de las 24 horas posteriores a la infección, dicho fitopatógeno exhibe un desplazamiento hacia la región basal del tallo. Se resalta que los niveles de infección en la región apical oscilan entre 0,09 y 0,16 mm, mientras que en la región basal los niveles de infección se sitúan entre 0,21 y 0,40 mm (Figura 5).

Figura 5:

Dinámica de crecimiento de *L. theobromae* al día 1 cepa 1A post-infección

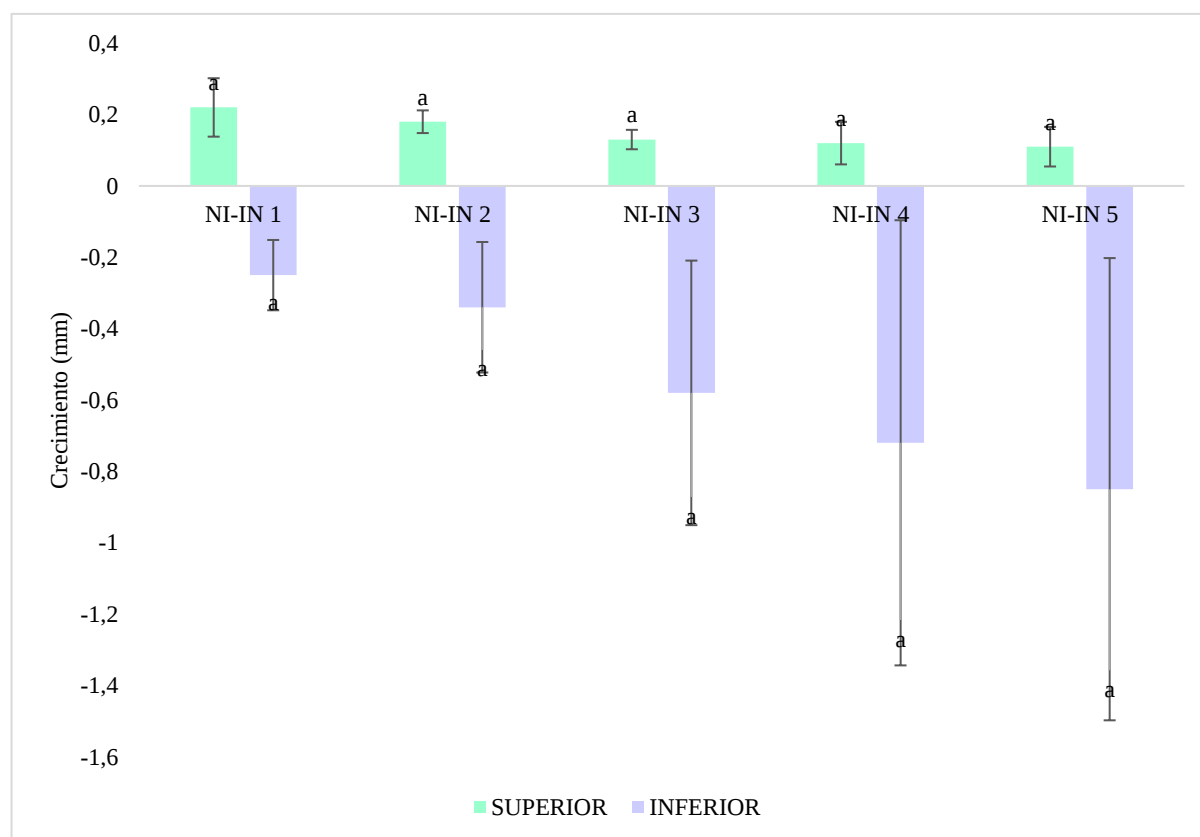


Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación estándar; Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

En el caso de la cepa 2A, se ha observado que en a las 24 horas después de la infección, este patógeno tiende a desplazarse hacia la parte superior, pero hay un notorio incremento de la infección en la parte inferior del tallo. Se destaca que los niveles de infección en la parte superior varían entre 0,11 y 0,22 mm, mientras que en la parte inferior oscilan entre 0,25 y 0,85 mm (Figura 6).

Figura 6:

Dinámica de crecimiento de L. theobromae al día 1 cepa 2A post-infección

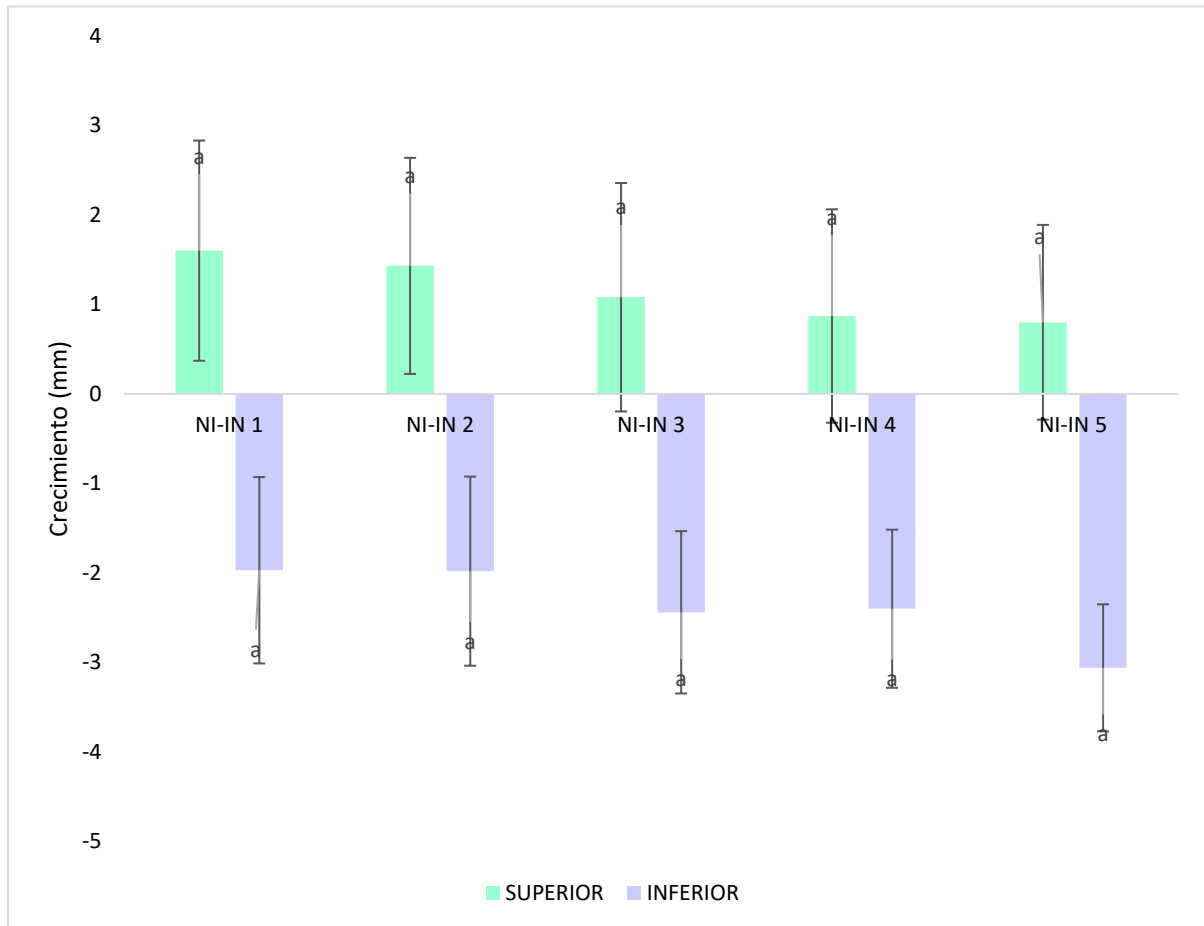


Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

Luego de 25 días posteriores a la infección, dicho fitopatógeno muestra una notable disminución de la infección en la parte apical del tallo, mientras se observa un notorio incremento de la infección en la parte basal del tallo. Se destaca que los niveles de infección en la región apical oscilan entre 0,80 y 1,6 mm, mientras que en la región basal los niveles de infección se sitúan entre 1,97 y 3,06 mm, demostrando así un mayor incremento de infección a través del tiempo (Figura 7).

Figura 7:

Dinámica de crecimiento de L. theobromae al día 25 cepa 1A post-infección

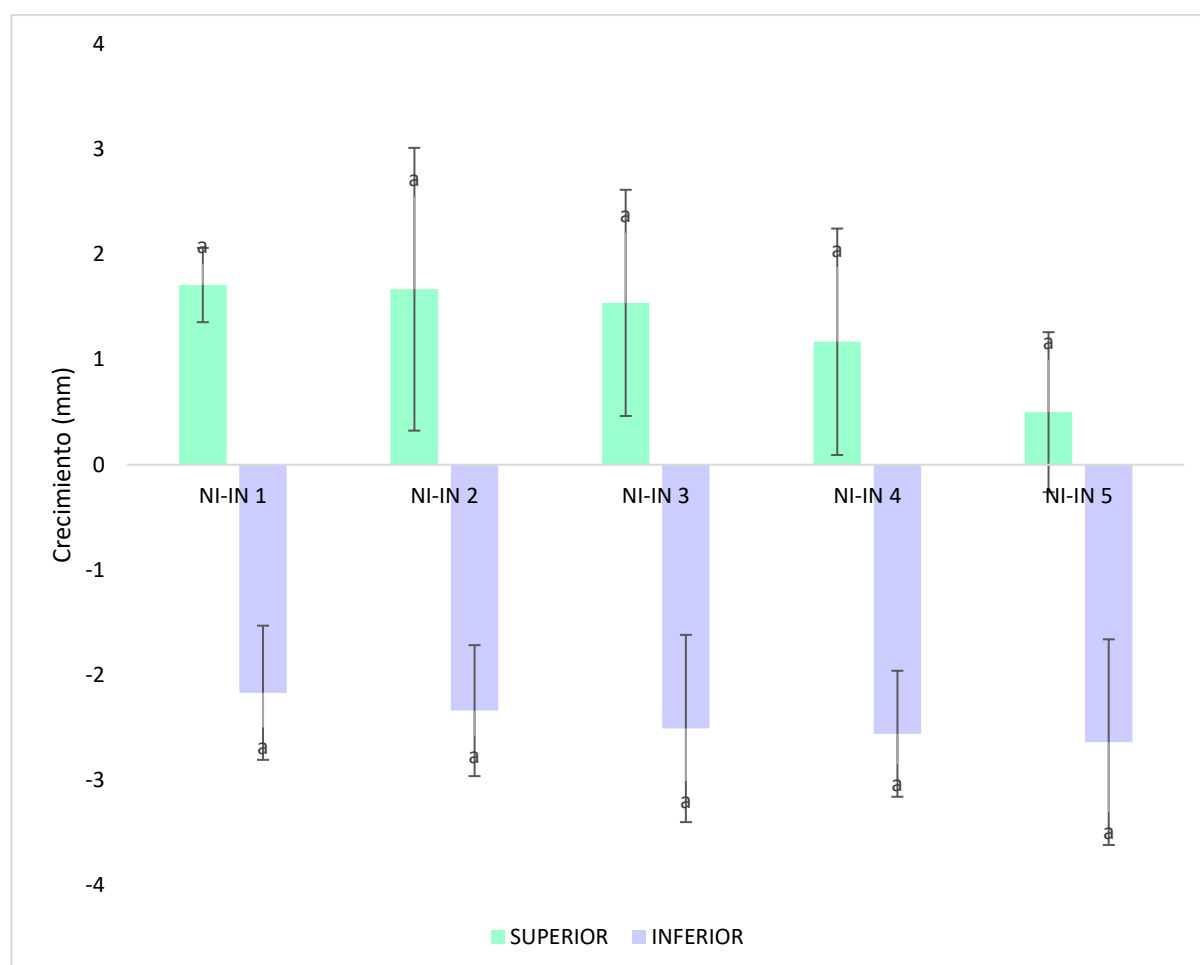


Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

En el caso de la cepa 2A, se ha observado que en a los 25 días después de la infección, este patógeno tiende a desplazarse hacia la parte superior, pero hay un notorio incremento de la infección en la parte inferior del tallo. Los registros meticulosos muestran que, en la parte superior del tallo, los niveles de infección fluctúan entre 0,5 y 1,71 milímetros, indicando una propagación más lenta pero constante. En marcado contraste, en la sección inferior, los niveles de infección aumentan considerablemente, alcanzando valores que oscilan entre 2,17 y 2,64 milímetros, demostrando así in mayor incremento de infección a través del tiempo (Figura 8)

Figura 8:

Dinámica de infección de L. theobromae al día 25 cepa 2A post-infección



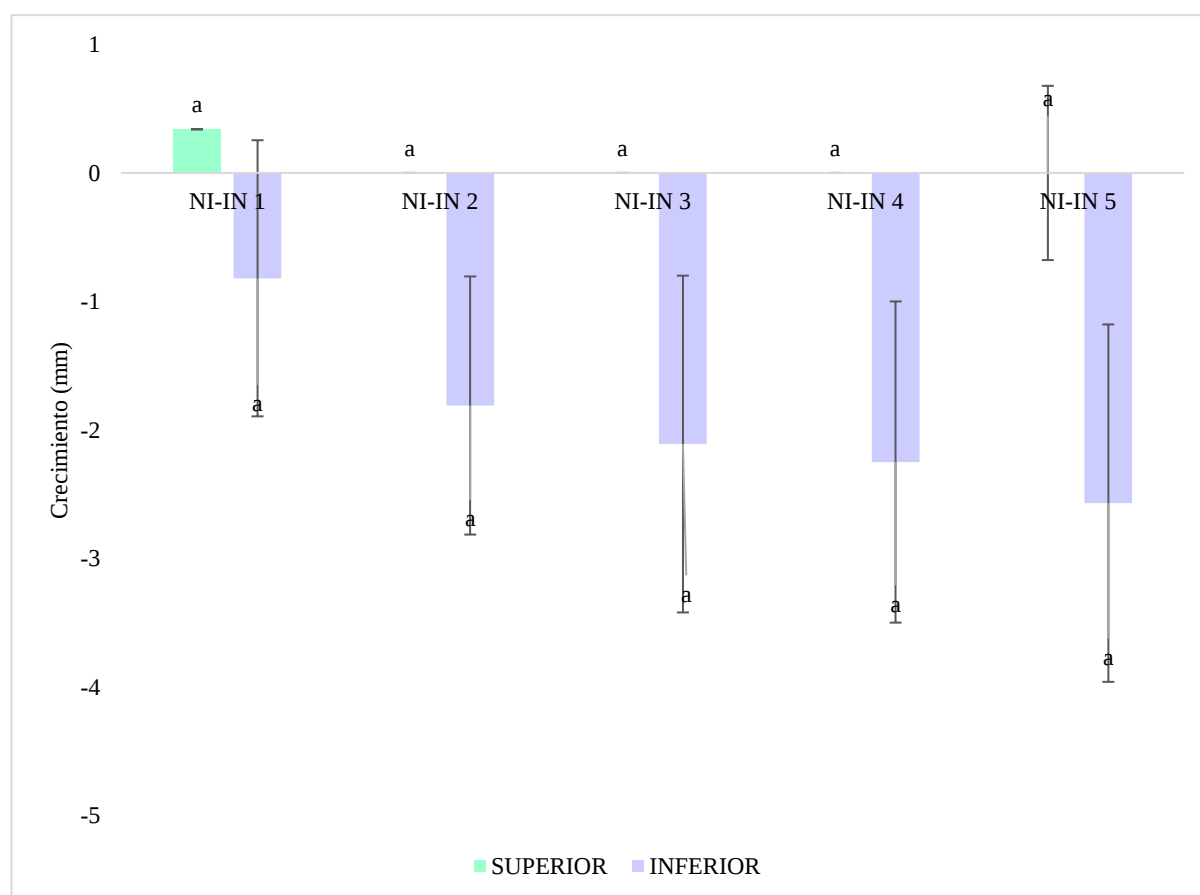
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

Para el día 50 post-infección el patógeno muestra una gran disminución en la parte superior del tallo, de hecho, la infección ya no se encuentra en la parte superior, donde se puede observar un notable desplazamiento de la infección hacia la parte inferior del tallo. Se resalta que niveles de infección en la parte inferior del tallo oscilan entre 0,82 y 2,57 mm (Figura 9).

Esta diversidad en la intensidad de la infección sugiere la complejidad del proceso y la necesidad de estrategias específicas de control adaptadas a las diferentes áreas afectadas del tallo.

Figura 9:

Dinámica de crecimiento de L. theobromae al día 50 cepa 1A post-infección

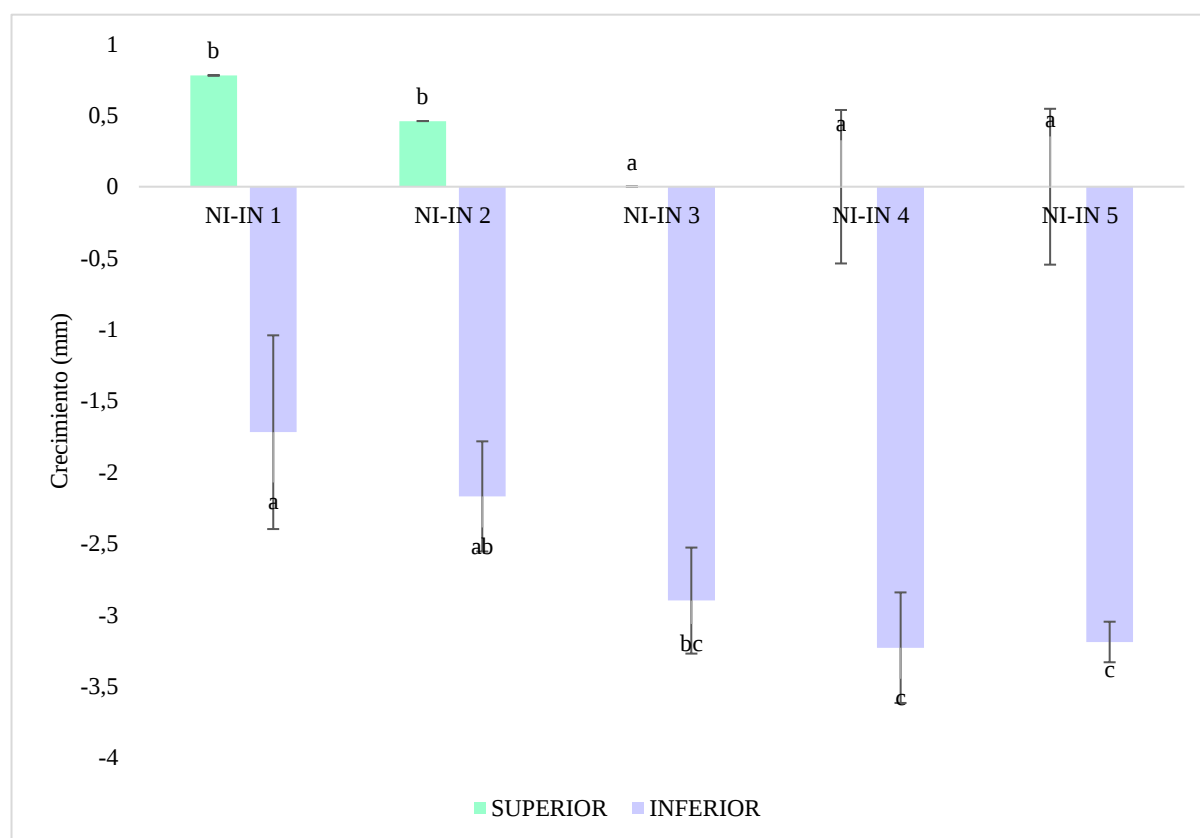


Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

Mientras en la cepa 2A, tras el transcurso de 50 días desde la infección inicial, se detecta un cambio dramático en la dinámica de propagación del patógeno a lo largo del tallo de la planta, la porción superior del tallo muestra una notable disminución en los niveles de infección, mientras se observa el desplazamiento e incremento de la infección en la parte inferior del tallo. Es crucial destacar que, para el día 50, los niveles de infección en la parte inferior del tallo varían significativamente, alcanzando valores que oscilan entre 1,72 y 3,19 milímetros. Esta amplia gama de intensidades de infección subraya la complejidad de la interacción entre la planta y el patógeno (Figura 10).

Figura 10:

Dinámica de crecimiento de L. theobromae al día 50 cepa 2A post-infección



Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios (Tukey $p < 0.05$).

4.2. Discusión

4.2.1. Experimento 1

Los resultados obtenidos de (Eng *et al.*, 2003) presenta una visión detallada de la influencia de la temperatura en la densidad de crecimiento de *B. theobromae* RC1 en el medio de EMA. Es evidente que la temperatura juega un papel crucial en la viabilidad y proliferación de esta cepa fúngica, como lo demuestra la ausencia de crecimiento a 40°C, lo cual demuestra una limitación significativa para su desarrollo en condiciones térmicas extremas, estos resultados corroboran los realizados por esta investigación donde a los 40°C, hay una limitación total de crecimiento micelial del patógeno.

La observación de una mayor densidad de crecimiento a 30°C en comparación con otras temperaturas ensayadas (26°C, 35°C y 40°C) destaca la preferencia termofílica de *B. theobromae* RC1 en el medio de EMA. Este hallazgo sugiere que la temperatura de 30°C proporciona condiciones óptimas para la actividad metabólica y la reproducción de esta especie fúngica en dicho medio (Eng *et al.*, 2003).

La falta de crecimiento a 40°C puede atribuirse a la sensibilidad de *B. theobromae* RC1 a temperaturas extremas, lo que podría inhibir sus procesos metabólicos y restringir su capacidad para colonizar el medio de cultivo. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han documentado las preferencias de temperatura de varias especies de hongos, destacando la importancia de comprender y controlar las condiciones ambientales para el cultivo de microorganismos.

(Alama *et al.*, 2006) Determinan que la velocidad de crecimiento del hongo *L. theobromae* dependió de los factores estudiados. La temperatura y el medio de cultivo. A 30°C en medio PDA el patógeno creció 20, 22 mm/día llenando la placa en 4,5 días. En medio CMA la velocidad de crecimiento fue de 11,03 y complementó la placa en 8 días. A 28°C el patógeno creció 14,46 mm/día en PDA y 8,74 en CMA. El menor crecimiento del hongo se dio a 35°C.

4.2.2. Experimento 2

En el cultivo de palto *L. theorbomae* mostró mayor incidencia de la enfermedad tuvo un porcentaje inicial del 52% de plantas afectadas, valor que luego de incrementó a 65% y terminó en 86% (Alama *et al.*, 2006). Todos los aislamientos de *Lasiodiplodia spp.* provocaron la formación de chancros con secreciones, como la muerte regresiva. Se mostraron osiols en la parte apical por donde son expulsadas las conidias. La formación de los picnidios también se observó sobre muestras vegetales infectadas por el patógeno y expuestas en la luz solar (Alama *et al.*, 2006).

En la investigación realizada por (Calle, 2013) se obtuvo como resultado que para los parámetros de Ramas necróticas se obtuvieron diferencias significativas dando como mejor tratamiento a Phyton-27 fue mejor en los Fundos San Manuel (Saturno) y Bora Bora (Sunshine) con unos resultados de 9.74% y 12.27%. Respectivamente, teniendo en cuenta los brotes

emitidos durante toda la campaña el producto Phyton-27 fue el mejor en los Fundos San Manuel (Saturno) y Bora Bora (Sunshine) con resultados de 116 y 78 brotes nuevos respectivamente en las zonas en estudio, con respecto a pudrición peduncular se obtuvieron diferencias significativas teniendo que en el fundo San Manuel (Saturno) estadísticamente los mejores tratamientos

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El estudio de la dinámica de infección del patógeno *Lasiodiplodia theobromae* revela la importancia de las condiciones ambientales, específicamente la temperatura, en su agresividad y proliferación en las plantas hospederas. La temperatura óptima de 28°C favorece un mayor crecimiento del patógeno, lo que puede conducir a una infección más virulenta. Mientras que el patógeno limita su crecimiento a temperaturas que sobrepasan los 32°C.
- El período crítico de agresividad, está más presente en la parte basal de la planta y este abarca desde el día 1 hasta 50 días después de la infección, con niveles de infección de hasta 3,17 mm. Estos hallazgos proporcionan información crucial para el desarrollo de estrategias de manejo y control de enfermedades en cultivos agrícolas y forestales, enfatizando la necesidad de considerar factores ambientales y temporales en la gestión de enfermedades vegetales.

5.2. Recomendaciones

- Implementar medidas de manejo integrado de plagas y enfermedades agrícolas que tengan en cuenta la influencia de la temperatura. Esto podría incluir la selección de variedades de cultivos más resistentes a la infección en condiciones de temperatura óptima para el crecimiento del patógeno, así como el monitoreo regular de la temperatura ambiental en áreas de cultivo y la aplicación oportuna de prácticas de control cuando las condiciones sean propicias para la proliferación del patógeno.
- Diseñar estrategias de control de enfermedades vegetales que se centren en la parte inferior de las plantas, especialmente durante el período crítico de agresividad identificado en el estudio (día 25 a día 50 después de la infección). Esto podría implicar la aplicación dirigida de fungicidas u otras medidas de control específicamente en la parte inferior de las plantas durante este período, con el fin de minimizar el daño causado por *Lasiodiplodia theobromae* y reducir su impacto en la producción agrícola y la salud de los ecosistemas forestales.

CAPITULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

- Agrios, G. N. (2004). *Plant Pathology*. New Jersey: ELSEVIER.
- Alama, I., Maldonado, E., y Rodriguez, E. (2006). *Dialnet Uniroja*. Dialnet Uniroja: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2924536.pdf>
- Alexopoulos, C. J. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons.
- Ali, S., Asmán, A., shao, j., Balidion, J., Strem, M. D., Puig, A., Meinhardt, L., y Bailey, B. (3 de octubre de 2019). *National Library of Medicine*. National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31580730/>
- Alves, A., Crous, P., Correia, A., & Phillips, A. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity*, 28, 1-13. <https://doi.org/https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>
- Anderson, R., & May, R. (1992). *Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control*. Oxford: Oxford University Press.
- Asqui, M. P. (2006). Retrieved 26 de enero de 2024, from Universidad Técnica de Ambato: <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3341>
- Barbosa, C., LP, L.-G., Sánchez, S., y D., a. N.-A. (2002). Effects of ozone, iodine and chlorine on spore germination of fungi isolated from mango fruits. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 60-65. https://doi.org/https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S0185-3309201500010005400006&lng=en
- Bartley, B. (15 de Abril de 2015). *CABI*. CABI: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/book/10.1079/9780851996196.0000>
- Batista, L. (2009). El cultivo de cacao. *Santo Domingo: Centro para el desarrollo Agropecuario y Forestal*, 45-54.
- Bush, L. (agosto de 2022). *Manual MSD*. Manual MSD: <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/biolog%C3%ADa-de-las-enfermedades-infecciosas/mecanismos-de-defensa-del-hu%C3%A9sped-frente-a-la-infecci%C3%B3n>
- Calle, J. A. (2013). *Alicia.Concytec*. Alicia.Concytec: <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/1091>
- Camacho, Á., Relief, L. W., y Orozco, L. (20 de enero de 2020). *Cacao Movil*. Cacao Movil: <https://cacaomovil.com/site/guide/el-cacao-en-sistemas-agroforestales-df638640-b491-4be2-a0e0-479d7b616e5f/9/cual-es-el-origen-del-cacao>
- Casadevall, A. (1 de diciembre de 2000). *ASM Journals*. ASM Journals: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.68.12.6511-6518.2000>
- Castillo, D. d., Parra, D., Noceda, C., & Pérez, S. (2016). Co-occurrence of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium decemcellulare* and *Lasiodiplodia theobromae* isolates in

- cushion galls disease of cacao (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Plant Protection Research*, 56(2), 129-138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0020>
- De la Parte, E. M., y Perez, L. V. (agosto de 2015). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 87-96. https://doi.org/http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000200002
- Eng, F., Gutierrez, M., y Favela, E. (2003). Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1. *Iberoam Micol*, 172-175.
- Ephytia. (6 de enero de 2021). *ephytia*. ephytia: <https://ephytia.inra.fr/es/C/7945/Melon-Lasiodiplodia-theobromae>
- EPPO. (10 de abril de 2002). *EPPO Global Database*. EPPO Global Database: <https://gd.eppo.int/taxon/PHYORH>
- Esau, K. (1977). *Anatomy of Seed Plants*. John Wiley & Sons.
- García, R., Picos, P. A., y Allende Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Scielo*, 33-62.
- Hurts, W. J., Jr, S. M., Powis, T. G., y Hester, F. V. (2020). Cacao usage by the earliest Maya civilization. *Nature*, 289-294.
- Institute, N. H. (2020). *National Human Genome Research Institute*. National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Genotipo>
- Kuswinanti, T., Junaid, M., Melina, Surapati, U., y Ratnawaty. (2019). A promising microbial use on cocoa: decomposing cocoa waste and controlling *Lasiodiplodia theobromae* in-vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 343(012256). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/343/1/012256>
- Marelli, J.-P., Guest, D. I., Bailey, B. A., Evans, H. C., Brown, J. K., Junaid, M., Barreto, R. W., Lisboa, D. O., y Puig, a. A. (2019). Chocolate Under Threat from Old and New Cacao Diseases. *Phytopathology*, 1331-1343.
- Mohali, S., Burgess, T. I., y Wingfield, M. J. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*, 35(6), 385-396. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2005.00418.x>
- Mullen, J., Gilliam, C., Alaska, H., y Morgan, J. (1991). Cancro del cornejo causado por *Lasiodiplodia theobromae* , una enfermedad influenciada por el estrés por sequía o la selección de cultivares. En *Cancro del cornejo causado por Lasiodiplodia theobromae , una enfermedad influenciada por el estrés por sequía o la selección de cultivares*. (págs. 886 - 889). CrossRef.
- Murillo, A. A., Moreira, Á. V., Martinez, H. F., y Fiallos, F. R. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia*. *Scientia Agropecuaria*, 653-662.

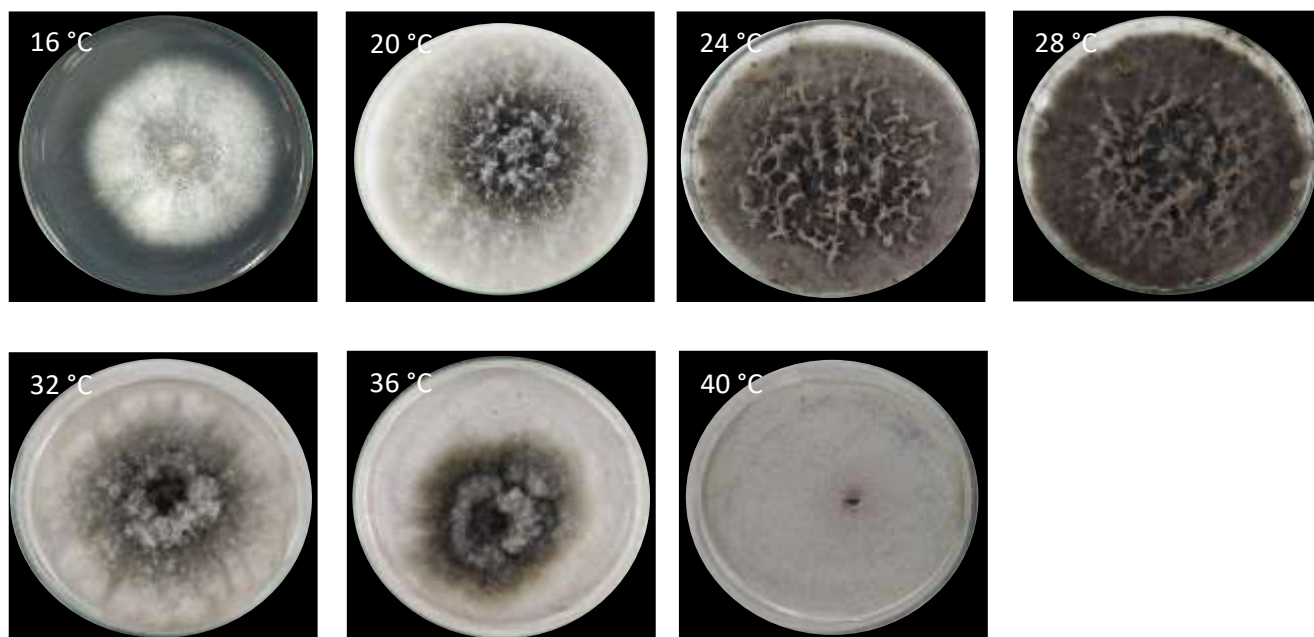
- Mvondo, N. D., Manga, E. F., Kone, N. A., Ndogho, P. A., y Ambang, Z. (2019). Pathogenicity and in vitro control of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium* sp., pathogens associated with cocoa dieback in Cameroon. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 6(7), 1-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.20546/ijcrbp.2019.607.001>
- Nallar, S. G. (14 de marzo de 2021). Enfermedades del cacao. *Enfermedades del cacao*.
- Phillips, A., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M., y PW, G. J. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51-167. <https://doi.org/https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Picos, A., Raymundo, G., León, J., Sañudo-Barajas, A., y Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Rev. mex. fitopatol vol.33*, 54-74.
- Rendiles, E., Dimas, A., y Montero, L. (2009). Estudio preliminar sobre el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el municipio Tucupita del estado Delta Amacuro, Venezuela. *UDO Agrícola*, 9(1), 268-272. <https://doi.org/https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3294050>
- Rubini, M., Silva, R., Pomella, A., Maki, C., Araujo, W., y Azevedo, D. d. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of witches' broom disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1, 24-33. https://doi.org/https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S0185-3309201500010005400052&lng=en
- Salvatore, M. M., Alves, A., y Andolfi, A. (2020). Metabolitos secundarios de *Lasiodiplodia theobromae* : distribución, diversidad química, bioactividad e implicaciones de su aparición. *Toxinas*, 7(12). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxins12070457>
- Sanchez, A., Vayas, T., Mayorga, F., y Freire, C. (2013). Sector Cacaotero Ecuatoriano. *Sector Cacaotero Ecuatoriano*.
- Sánchez, M., Jaramillo, E., y Ramirez, I. (2015). Enfermedades del cacao. Machala.
- Satatista. (2 de abril de 2021). *Satatista*. Satatista: <https://www.statista.com/statistics/263139/production-of-cocoa-beans-since-2003-by-region/>
- Silva, A. D., Brainer, R., Michereff, S., y Saraiva, M. d. (2012). Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *Scielo*, 132, 489-498. https://doi.org/https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S0185-3309201500010005400017&lng=en
- Solís, K., Peñaherrera, S., y Vera, D. (2021). Las enfermedades del cacao . *las enfermedades del cacao y las buenas prácticas agronómicas para su manejo*. iniap.
- Taiz, L. Z. (2017). *Fisiología Vegetal*. Artmed Editora.

- Taussat, V., Muriel, A., Citti, E., y Christine, y. P. (2004). *Molecular Microbiology of Intracellular Bacterial Pathogens*. CRC Press.
- Tovar, J. M., Aguilera, J. A., Díaz, C. N., Ortiz, D. T., y Mir, Á. V. (3 de septiembre de 2013). *Scielo*. Scielo: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000300007
- UNECOL. (2017). *UNECOL*. UNECOL: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1042-conociendo-a-los-hongos-fitopatogenos>
- Vázquez, A., López-Puc, G., Góngora-Canul, C. C., y Aguilera-Cauich, G. M.-S. (2017). Spatio-temporal spread of foot rot (*Lasioidiplodia theobromae*) in *Jatropha curcas* L. plantations in Yucatan, Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, 991-1000.

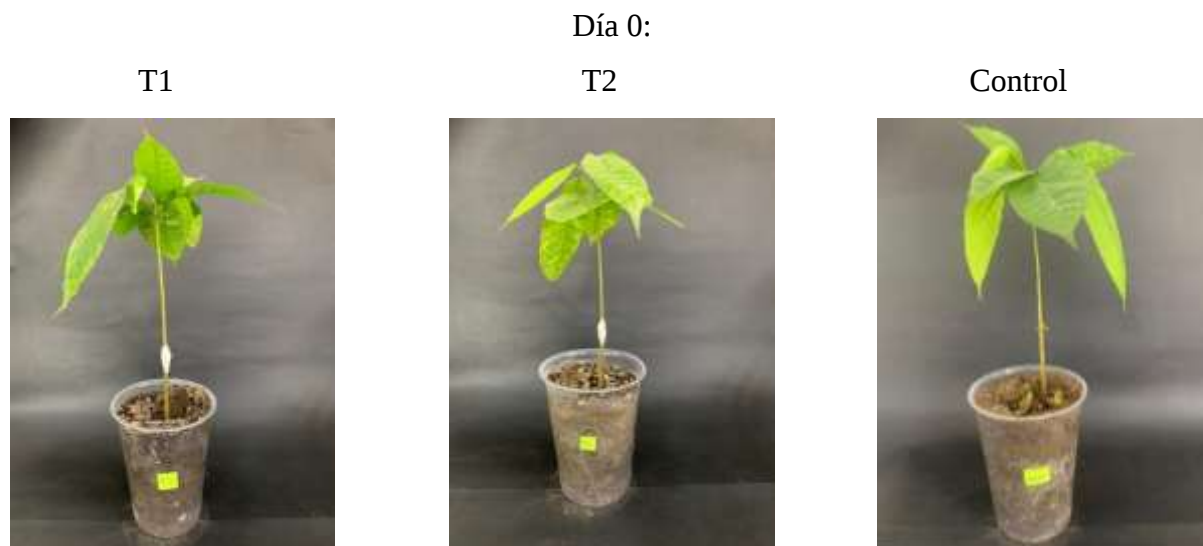
CAPITULO VII

ANEXOS

Anexo A: Crecimiento de *L. theobromae* en diferentes rangos de temperatura



Anexo B: Avance de la infección de *L. theobromae* en plántulas de *T. cacao* L. del día 0 post-infección



Anexo C: Avance de la infección por *L. theobromae* en plántulas de *T. cacao* L. el día 1 post-infección

Día 1:

T1



T2



Control



Anexo D: Avance de la infección por *L. theobromae* en plántulas de *T. cacao* L. el día 25 post-infección

Día 25

T1



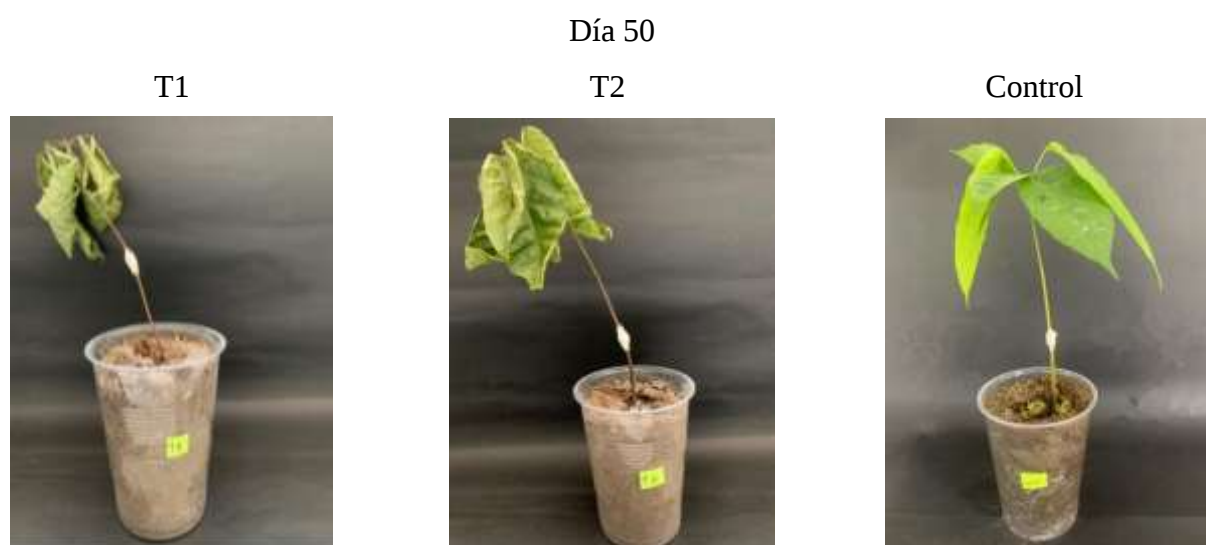
T2



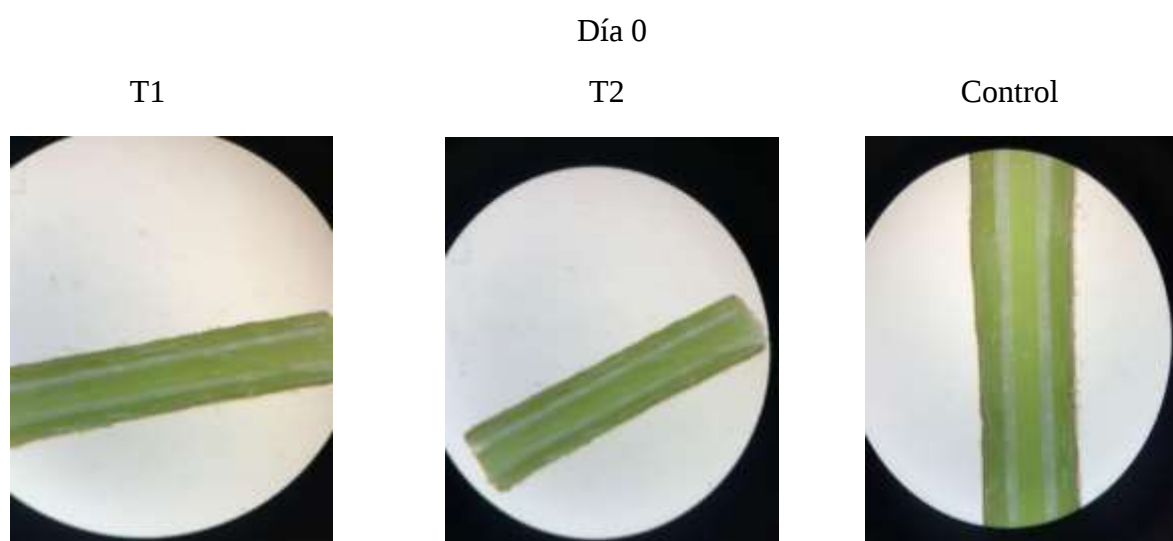
Control



Anexo E: Avance de la infección por *L. theobromae* en plántulas de *T. cacao* L. día 50 post-infección



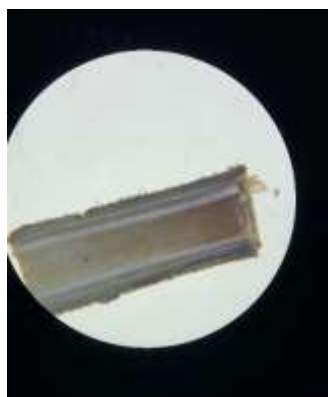
Anexo F: Infección de *L. theobromae* en fragmentos de tallos



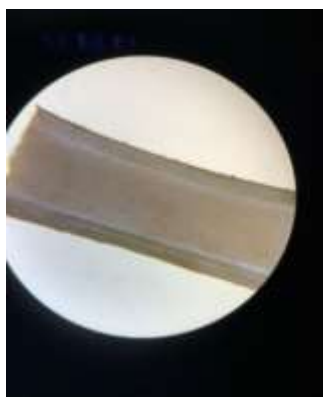
Anexo G: Infección de *L. theobromae* en fragmentos de tallos

Día 1

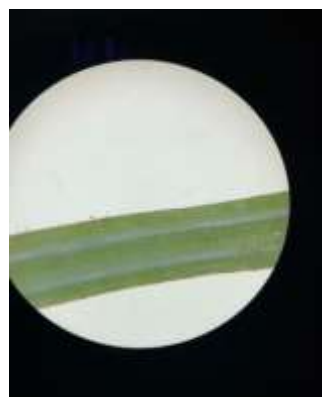
T1



T2



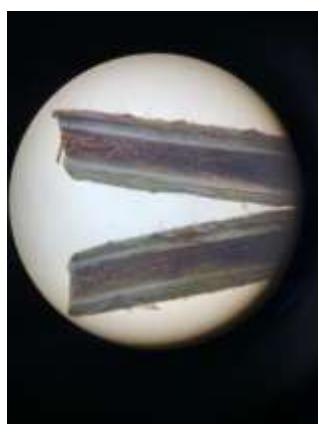
Control



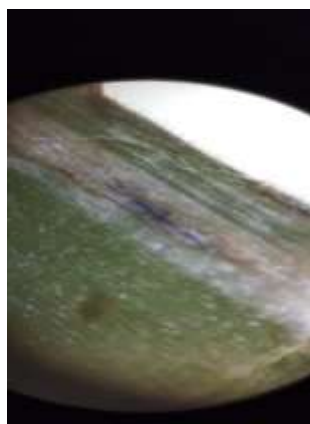
Anexo H: Infección de *L. theobromae* en fragmentos de tallos

Día 25

T1



T2



Control



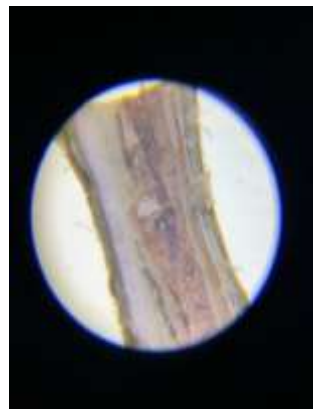
Anexo I: Infección de *L. theobromae* en fragmentos de tallos

Día 50

T1



T2



Control



Anexo J: Aislamiento y caracterización morfológica de *L. theobromae*



Anexo K: Análisis de Varianza

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	46,53	14	3,32	9,15	<0,0001
FRAG	16,89	1	16,89	46,47	<0,0001
CEP	0,74	1	0,74	2,04	0,1625
DIA	19,73	2	9,86	27,15	<0,0001
REP	1,70	3	0,57	1,56	0,2176
FRAG*CEP	0,17	1	0,17	0,47	0,4975
FRAG*DIA	6,83	2	3,41	9,39	0,0006
CEP*DIA	0,26	2	0,13	0,36	0,6976
FRAG*CEP*DIA	0,20	2	0,10	0,28	0,7565
Error	11,99	33	0,36		
Total	58,52	47			