# UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
## FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
### CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

## Título del Proyecto de Investigación:

**"**Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de ***Moniliophthora perniciosa***, en ***Theobroma cacao* L.**, y el efecto antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (*PGPRs'*)"


## AUTOR:

**Javier Andrés Auhing Arcos**

## Director del Proyecto de Investigación:

**Hayron Fabricio Canchignia Martínez *PhD.***


**Quevedo – Los Ríos - Ecuador**

**2018**

# DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **JAVIER ANDRÉS AUHING ARCOS** 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 trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

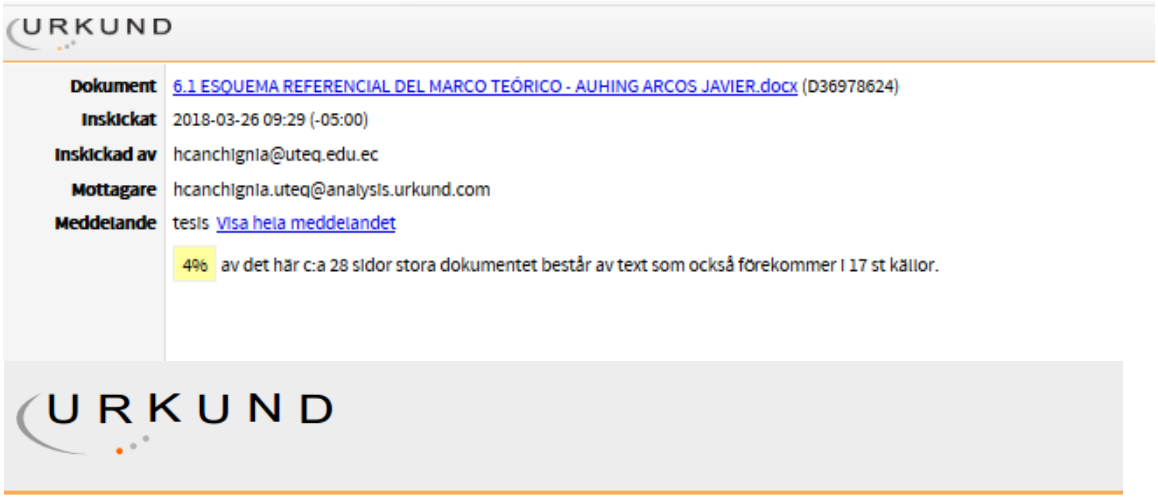
**JAVIER ANDRÉS AUHING ARCOS**
**C.I: 1204794950**

# CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresado **Javier Andrés Auhing Arcos**, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado "Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de *Moniliophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L., y el efecto antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs')", bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

**Dr. Hayron Canchignia Martínez**
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

# CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO


URKUND

| | |
|---|---|
| **Dokument** | 6.1 ESQUEMA REFERENCIAL DEL MARCO TEÓRICO - AUHING ARCOS JAVIER.docx (D36978624) |
| **Inskickat** | 2018-03-26 09:29 (-05:00) |
| **Inskickad av** | hcanchignia@uteq.edu.ec |
| **Mottagare** | hcanchignia.uteq@analysis.urkund.com |
| **Meddelande** | tesis Visa hela meddelandet |

4% av det här c:a 28 sidor stora dokumentet består av text som också förekommer i 17 st källor.

URKUND

## Urkund Analysis Result

| | |
|---|---|
| **Analysed Document:** | 6.1 ESQUEMA REFERENCIAL DEL MARCO TEÓRICO - AUHING ARCOS JAVIER.docx (D36978624) |
| **Submitted:** | 3/26/2018 4:29:00 PM |
| **Submitted By:** | hcanchignia@uteq.edu.ec |
| **Significance:** | 4 % |

Sources included in the report:

Caso Gongora revision II.docx (D24733603)
CAPÍTULO II Tesis de Grado Ricardo Romero.docx (D36763339)
https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008716000479
http://www.worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/files_mf/1383601839Evans2013DiseasesPestsReview.pdf
https://www.cabi.org/isc/datasheet/16054
http://www.ingentaconnect.com/content/doaj/18238262/2009/00000005/00000001/art00002
http://nar.oxfordjournals.org/content/25/9/1788.short
http://external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/temas/m2t13.pdf
https://ia801206.us.archive.org/16/items/inoculationmetho00fria/inoculationmetho00fria.pdf
https://doi.org/10.1038/hdy.1994.38
https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=urs9QCMKOw4C&oi=fnd&pg=PA80&dq=planting+material+toxopeus,+H.&ots=3LsNkCP9GQ&sig=_JQwo0KzJ_poTI_arL5vT9ZCCBo#v=onepage&q&f=false
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12396108%255Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12396108
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC312505/pdf/nar00087-0197.pdf
https://doi.org/10.1007/s12275-015-5354-3

**Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez**

**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
# FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
# CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

**"Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de *Moniliophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L., y el efecto antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs')"**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

**Aprobado por:**

Ing. Silvia Saucedo M.Sc
**PRESIDENTA DEL TRIBUNAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Dr. Daniel Vera
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Dra. Marisol Rivero
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**Quevedo – Los Ríos- Ecuador**
**2018**

## DEDICATORIA

Al Dios creador del universo, fuente de todo…

"YO SOY la actividad cumplida y el Poder sostenedor de toda cosa constructiva que yo desee." "YO SOY aquí y YO SOY allí."

A la memoria de mis abuelitos S. José Auhing y Alejandro Arcos por haberme brindado su incondicional amor y cariño sirviendo de estímulo en todo los instantes de mi vida y formación personal.

A mis padres Jessica Arcos y Javier Auhing, mi gratitud en vida, gracias a su constante amor, cuidados y sabiduría supieron crearme posibilidades infinitas para materializar mis sueños.

A mi esposa y amiga fiel Beatriz Almeida Morán quien con su amor y ternura complementa mi existir.

A mi hija Luisana, eres el motor de mi vida, Te Amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Arianna y José Auhing por su apoyo constante.

A mis suegros Sra. Patricia Morán y Abg. Luis Almeida, por su apoyo incondicional.

A mis familiares por estar ahí en este momento tan especial en mi vida.

***Javier Auhing Arcos***

# AGRADECIMIENTO

El autor de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjó mis conocimientos.

Le agradezco a mi Director de tesis, Dr. Hayron Canchignia Martínez, por su amistad, enseñanzas, por su confianza para la ejecución y culminación de este trabajo de investigación.

A la Dra. Carmita Suárez Capello por brindarme su amistad y guía durante el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros de investigación Ángel Cedeño Moreira, Ricardo Romero, Ángel Verdesoto, Jorge Rodríguez Acosta y Jefferson Guato, por su amistad, confianza y apoyo durante el desarrollo del proyecto de investigación.

Al Dr. Camilo Mestanza, por su amistad, conocimientos y apoyo durante el proyecto de investigación.

Ing. M.Sc Silvia Saucedo, Dr. Daniel Vera y Dra. Marisol Rivero miembros del tribunal, por su guía y correcciones de este trabajo de investigación.

A mis profesores Ing. Msc. Ramiro Gaibor, Ing. Msc. César Varas, Ing. Msc. Ignacio Sotomayor, Ing. Msc. David Campi, Ing. Msc. César Bermeo, Ing. Msc. Luis Llerena, Ec. Flavio Ramos, Ing. Msc. Luduvick Amores, Ing. Msc. Alfonso Vasco, Ing. Msc. Pedro Rosero e Ing. Msc. Leonardo Matute.

A mis amigos de aula que han formado parte de mi vida profesional, agradecerles su amistad, apoyo, ánimo y compañía en los buenos y malos momentos.

***Javier Auhing Arcos***

La responsabilidad por las investigaciones, resultados y conclusiones presentados en esta tesis pertenecen exclusivamente al autor.

**JAVIER AUHING ARCOS**

# RESUMEN EJECUTIVO

*Moniliophthora perniciosa*, agente causante de la enfermedad 'escoba de bruja' en cacao (*Theobroma cacao*), presenta una elevada variabilidad genética, es una de las enfermedades más importantes en plantaciones cacaoteras que ocasiona pérdidas económicas a nivel mundial cercanas al 70%. La información sobre las poblaciones de estos hongos es importante para entender mejor la dinámica de epidemias y ayudar al desarrollo de sistemas de control biológico, utilización de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR), por efecto de producción de metabolitos secundarios con actividad proteolítica o antibióticos. En este estudio tuvo como objetivo analizar 12 aislamientos del hongo obtenidos de diferentes materiales de cacao a su distribución altitudinal en el Ecuador para la identificación de la biodiversidad intraespecífica y los rangos de agresividad de los ecotipos de *M. perniciosa*. Se realizó mediante el agrupamiento por caracteres morfológicos y caracteres fisiológicos con respecto al grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa* y la utilización de herramientas moleculares como el *Espaciador Transcrito Interno* (ITS) y *Secuencias Intergénicas* de *Consenso Repetitivas de Enterobacterias* (ERIC-PCR). Se evaluó el factor antagónico de los extractos celulares al 15 %, donde la aplicación del extracto de *S. marcescens* (PM3-8), *P. protegens* (CHA0), *B. subtilis* (ATCC 55405) y *E. asburiae* (PM3-14) redujeron significativamente el desarrollo de los tubos germinativos a las 48 h e inhibieron la germinación de basidiosporas, impidiendo la dicariotización del hongo. El empleo en conjunto de estos biocontroladores en la agricultura ofrecerá una alternativa para beneficiar en la reducción del uso de agroquímicos.

**Palabras claves:** *Moniliophthora perniciosa*, *Theobroma cacao*, Biodiversidad, Ecotipos, *S. marcescens*, *P. protegens*, *B. subtilis* y *E. asburiae*.

# ABSTRAC

*Moniliophthora perniciosa*, causal agent of the 'witch's broom disease' in cocoa (*Theobroma cacao*), presents a high genetic variability is one of the most important diseases in cocoa plantations that causes economic losses worldwide close to 70%. The information on the populations of these fungi is important to better understand the dynamics of epidemics and help the development of biological control systems, utilization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), by production of secondary metabolites with proteolytic activity or antibiotics. The objective of this study was to analyze 12 isolates of the fungus obtained from different cocoa materials at their altitudinal distribution in Ecuador for the identification of intraspecific biodiversity and the ranges of aggressiveness of the ecotypes of *M. perniciosa*. It was carried out by grouping by morphological characters and physiological characters with respect to the degree of severity of the ecotypes of *M. perniciosa* and the use of molecular tools such as the *Internal Transcribed Spacer* (ITS) and *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR). The antagonistic factor of the cellular extracts was evaluated at 15%, where the application of the extract of *S. marcescens* (PM3-8), *P. protegens* (CHA0), *B. subtilis* (ATCC 55405) and *E. asburiae* (PM3-14) significantly reduced the development of germinative tubes at 48 h and inhibited the germination of basidiospores, preventing the dikaryotization of the fungus. The joint use of these bio controllers in agriculture will offer an alternative to benefit in reducing the use of agrochemicals.

**Keywords:** *Moniliophthora perniciosa*, witch's broom disease, *Theobroma cacao*, Biodiversity, Ecotypes, *S. marcescens*, *P. protegens*, *B. subtilis* y *E. asburiae*.

# TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA……..……..I
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS.....II
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN. III
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO ..... IV
AGRADECIMIENTO.....VII
RESUMEN EJECUTIVO ..... IX
ABSTRAC.....X
TABLA DE CONTENIDOS..... XI
ÍNDICE DE CUADROS……..XVI
ÍNDICE DE FIGURAS ..... XVI
ÍNDICE DE ANEXOS .....XVIII
CÓDIGO DUBLÍN ..... XIX
INTRODUCCIÓN..... 1
**CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**..... 2
1.1. Problema de Investigación..... 3
1.1.1. Diagnostico ..... 3
1.1.2. Planteamiento del problema ..... 3
1.1.3. Sistematización del Problema..... 3
1.2. Objetivos ..... 4
1.2.1. Objetivo General ..... 4
1.2.2. Objetivos Específicos ..... 4
1.3. Justificación ..... 5
**CAPITULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**.... 6
2.1. El Hongo ..... 7
2.1.1. Clasificación taxonómica..... 7
2.2. La enfermedad “Escoba de Bruja” del cacao ..... 8
2.3. Hospedero ..... 9
2.4. Crecimiento del hongo en cacao ..... 9
2.4.1. Penetración..... 10
2.4.2. Crecimiento y distribución en “Escobas” ..... 10
2.4.3. Producción de esporóforos en “Escobas” ..... 11

2.5. Ciclo de vida del hongo *Moniliophthora perniciosa*, agente causal de la enfermedad "Escoba de Bruja"……..13
2.6. Descripción morfológica ..... 13
2.7. Síntomas ..... 14
2.7.1. Síntomas en plantas adultas y mazorcas de cacao ..... 14
2.7.2. Síntomas en Plántulas Provenientes de Semilla pregerminadas ..... 15
2.7.2.1. Decoloración e entumecimiento ..... 16
2.7.2.2. Escobas terminales y axilares ..... 16
2.7.2.3. Escobas látigo ..... 16
2.7.2.4. Escobas recurrente ..... 17
2.7.2.5. Elongación de la yema terminal ..... 17
2.7.2.6. Superbrotamiento ..... 17
2.7.2.7. Entumecimiento y curvatura en los vástagos ..... 18
2.7.2.8. Cáncer ..... 18
2.7.2.9. Escobas cotiledonales ..... 18
2.8. Relevancia evolutiva de la biodiversidad de ecotipos de *M. perniciosa* ..... 18
2.9. La biología molecular como herramienta en la búsqueda de la biodiversidad de ecotipos de *M. perniciosa* ..... 19
2.9.1. Marcador molecular ..... 19
2.9.2. Gen del ARN ribosómico 5.8S ..... 20
2.9.3. ERIC-PCR "Huella Dactilar del Genoma" ..... 20
2.10. Rizobacterias Promotoras De Crecimiento Vegetal (PGPR) ..... 22
2.10.1. Etiología de las PGPR ..... 23
2.10.1.1. *Pseudomonas sp* ..... 23
2.10.1.2. *Bacillus subtilis* ..... 24
2.10.1.3. *Acinetobacter calcoaceticus* ..... 24
2.10.1.4. *Serratia marcescens* ..... 24
2.10.1.5. *Enterobacter asburiae* ..... 24
**CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN** ..... 25
3.1. Ubicación ..... 26
3.2. Tipo de investigación ..... 26
3.3. Método de investigación ..... 26
3.4. Fuentes de recopilación de información ..... 26
3.5. Generar un banco de ecotipos de *M. perniciosa* de pisos altitudinales de *Theobroma cacao* L. y su caracterización morfológica y molecular. ..... 27

3.5.1. Almacenamiento de esporas de los diferentes Ecotipos de *M. perniciosa* para su correspondiente análisis ..... 27

3.5.1.1. Preparación de las soluciones para la colección y almacenamiento de basidiosporas..... 27

Almacenamiento de basidiosporas..... 29

3.5.2. Caracterización morfológica de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal. ..... .....30

3.5.2.1. Producción de esporóforos de *M. perniciosa* de los diferentes Ecotipos…….. .....30

3.5.2.2. Diámetro de esporóforos de *M. perniciosa* de los diferentes Ecotipos……..30

3.5.2.3. Producción de basidiosporas/ml, el ancho y longitud de las basidiosporas por basidiocarpo de los diferente Ecotipos de *M. perniciosa*. ..... 31

3.5.2.3.1.Longitud y ancho de basidiosporas de los diferentes Ecotipos de *M. perniciosa* …..... 32

3.5.3. Caracterización molecular de ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador..... 33

3.5.3.1. Extracción de ADN de los diferentes Ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal..... 33

3.5.3.2. Amplificación y recuperación de fragmentos ITS ..... 33

3.5.3.3. ERIC-PCR perfiles de huellas dactilares ..... 34

3.6. Analizar el grado de severidad de infección de *M. perniciosa* al estado fisiológico de cacao nacional EET-19 ..... 35

3.6.1. Estado fisiológico en EET-19 al grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa*..... 35

3.6.1.1. Conteo de basidiosporas..... 35

3.6.1.2. Inoculación de semillas pre-germinadas de EET-19 *T. cacao* mediante basidiosporas de los 12 ecotipos de *M. perniciosa*, para la medición del grado de severidad del patógeno..... 37

3.6.1.2.1.Método de Inoculación ..... 37

3.6.1.2.2.Ambiente en la inoculación ..... 37

3.7. Evaluar el efecto de la aplicación de PGPR como antagonista en condiciones *in vitro*. ..... 39

3.7.1. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento (PGPRs') ..... 39

3.7.2. Obtención de sobrenadantes de las PGPRs' con actividad proteolítica ..... 39

3.7.2.1. Ensayo antagonista..... 40

3.8. Materiales y Equipos ..... 42

3.8.1. Material de laboratorio ..... 42

3.8.2. Material de oficina ..... 42

3.8.3. Equipos de Laboratorio ..... 42
3.8.4. Reactivos ..... 43
**CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** ..... 44
4.1. Generación de un banco de ecotipos de *M. perniciosa* y su caracterización morfológica y molecular. ..... 45
4.1.1. Banco de cepas de ecotipos de *M. perniciosa* de pisos altitudinales de *T. cacao*……..... 45
4.1.2. Caracterización morfológica de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador. ..... 46
4.1.2.1. Diámetro basal medio de escobas secas recolectadas. ..... 46
4.1.2.2. Longitud de escobas secas recolectadas. ..... 47
4.1.2.3. Producción de esporóforos en "escobas secas" ..... 48
4.1.2.4. Producción de Basidiosporas por mL de *M. perniciosa* ..... 50
4.1.2.5. Diámetro de los esporóforos de *M. perniciosa* ..... 51
4.1.2.6. Longitud de Basidiosporas (µm) de *M. perniciosa* ..... 52
4.1.2.7. Ancho de Basidiosporas (µm) de *M. perniciosa* ..... 53
4.1.3. Caracterización molecular de los ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador. ..... 54
4.1.3.1. Extracción de ADN de los diferentes Ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal y la amplificación y recuperación de fragmentos ITS. ..... 54
4.1.3.1.1. Relación filogénica de los ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador, determinado en base a la secuencia del ITS. ..... 55
4.1.3.2. Árbol filogenético ERIC-PCR ..... 57
4.2. Análisis del grado de severidad de infección de *M. perniciosa* al estado fisiológico de cacao nacional EET-19 ..... 59
4.2.1. Estado fisiológico en EET-19 al grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa* ..... 59
4.2.1.1. Evaluación de la severidad de infección de *M. perniciosa* en semillas de EET-19 a 30 días. ..... 59
4.2.1.2. Evaluación del aspecto fisiológico al diámetro basal del Hipocotilo por inoculación de *M. perniciosa.* ..... 63
4.2.1.3. Evaluación del aspecto fisiológico al diámetro del Epicótilo ..... 63
4.2.1.4. Diámetro basal de escobas vegetativas en plántulas de EET-19 ..... 64
4.2.1.5. Longitud de escobas vegetativas en plántulas de EET-19 ..... 65
4.2.1.6. Número de brotes en tejidos afectados (Escobas Vegetativas) ..... 65
4.2.1.7. Evaluación de atrofia del sistema radicular por efecto de *M. perniciosa* ..... 66

4.2.2. Agrupamiento por caracteres morfológicos y caracteres fisiológicos con respecto al grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa* en plántulas de cacao. ..... 69

4.2.3. Triángulo de la Enfermedad ..... 70

4.3. Evaluación del efecto de la aplicación de PGPR como antagonista en condiciones *in vitro*..... ..... 71

4.3.1. Evaluación del efecto antagonista de los sobrenadantes en la germinación de basidiosporas de *M. perniciosa* ..... 71

4.3.2. Evaluación del efecto antagonista de los sobrenadantes en la inhibición del tubo germinal de *M. perniciosa* ..... 73

4.4. Discusión ..... 77

4.4.1. Caracterización genética y filogenética de ecotipos de *M. perniciosa* ..... 77

4.4.2. Análisis de Patogenicidad ..... 78

4.4.3. Efecto Antagonista a nivel *in vitro* de los Sobrenadantes de las PGPR en Basidiosporas de *M. perniciosa*. ..... 80

**CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES** ..... 83

5.1. Conclusiones ..... 84

5.2. Recomendaciones ..... 85

**CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA ..... 86**

6.1 Bibliografía ..... 87

**CAPITULO VII. ANEXOS ..... 98**

7.1 Anexos ..... 99

## ÍNDICE DE CUADROS


| | | |
|---|---|---|
| Cuadro 1. | Esquema del Análisis de Varianza…….. | 30 |
| Cuadro 2. | Esquema del Análisis de Varianza…….. | 31 |
| Cuadro 3. | Esquema del Análisis de Varianza…….. | 33 |
| Cuadro 4. | Esquema del Análisis de Varianza…….. | 38 |
| Cuadro 5. | Esquema del Análisis de Varianza…….. | 41 |
| Cuadro 6. | Codificación de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador…… | 46 |
| Cuadro 7. | Identidad de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador a la Base de datos de NCBI de GenBank…….. | 57 |


## ÍNDICE DE FIGURAS


| | | |
|---|---|---|
| Figura 1. | Ciclo de Vida del Hongo *M. perniciosa*……. | 13 |
| Figura 2. | Las PGPR…….. | 23 |
| Figura 3. | Cámara Neubauer Conteo de basidiosporas……. | 32 |
| Figura 4. | Cámara Neubauer Conteo de basidiosporas……..... | 35 |
| Figura 5. | Ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal en el Ecuador…..... | 45 |
| Figura 6. | Diámetro basal medio de escobas secas recolectadas…… | 47 |
| Figura 7. | Longitud de escobas secas recolectadas……. | 48 |
| Figura 8. | Ilustración de esporóforos o basidiocarpos en escobas secas de los ecotipos de *M. perniciosa*…… | 49 |
| Figura 9. | Producción de esporóforos en “escobas secas”…….. | 49 |
| Figura 10. | Producción de Basidiosporas/mL de los ecotipos de *M. perniciosa*…….... | 50 |
| Figura 11. | Ilustración de la concentración de Basidiosporas/mL en cámara neubauer… | 51 |
| Figura 12. | Diámetro de los esporóforos de *M. perniciosa*…… | 51 |
| Figura 13. | Ilustración de los esporóforos donde se verifico el diámetro (cm)…… | 52 |
| Figura 14. | Longitud µm de las basidiosporas de los diferentes ecotipos de *M. perniciosa*…….. | 52 |
| Figura 15. | Ilustración de basidiosporas BX100 de los ecotipos de *M. perniciosa*…….. | 53 |
| Figura 16. | Ancho µm de las basidiosporas de ecotipos de *M. perniciosa*…… | 54 |
| Figura 17. | Amplificación del ARN ribosomal 8.5S en *M. perniciosa*…….. | 55 |

Figura 18. Relación filogenético de aislados de *M. perniciosa* basadas en la región ITS 56
Figura 19. ERIC-PCR de *Moniliophthora perniciosa* aislados de *Theobroma cacao*…. 58
Figura 20. Relación filogenético de aislados de *M. perniciosa* basadas en la amplificación de *Secuencias Repetitivas de Consenso Intergénico de Enterobacterias* (ERIC-PCR)……... 59
Figura 21. Severidad de infección de ecotipos de *M. perniciosa*…… 60
Figura 22. Ilustración de los síntomas provocados por los ecotipos del hongo *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador inoculadas en plántulas de cacao (ETT-19)……. 61
Figura 23. Ilustración de los síntomas provocados por los ecotipos del hongo *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador inoculadas en plántulas de cacao (ETT-19)……. 62
Figura 24. Evaluación del aspecto fisiológico al diámetro basal del hipocótilo por inoculación de *M. perniciosa* en plántulas de cacao EET-19……. 63
Figura 25. Evaluación del aspecto fisiológico al diámetro basal del epicótilo por inoculación de *M. perniciosa* en plántulas de cacao EET-19……. 64
Figura 26. Diámetro basal (cm) de Escobas Vegetativas en plántulas de cacao ETT-19 inoculadas con ecotipos de *M. perniciosa*…….... 64
Figura 27. Longitud (cm) de las Escobas Vegetativas presentes en las plántulas de cacao inoculadas con ecotipos de *M. perniciosa*…… 65
Figura 28. Número de brotes (Escobas Vegetativas) presentes en las plántulas de cacao inoculadas con ecotipos de *M. perniciosa*…….. 66
Figura 29. Porcentaje de inhibición de raíces en plántulas de cacao inoculadas con ecotipos de *M. perniciosa*…… 67
Figura 30. Ilustración de la inhibición del crecimiento radicular provocado por los ecotipos del hongo *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador inoculadas en plántulas de cacao (EET-19)…….. 68
Figura 31. Ilustración de la inhibición del crecimiento radicular provocado por los ecotipos del hongo *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador inoculadas en plántulas de cacao (EET-19)…….. 68
Figura 32. Análisis de componentes principales del grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador…… 69
Figura 33. Ilustración del Triángulo de la Enfermedad "Escoba de Bruja"……. 70

Figura 34. Efecto de los sobrenadantes de las PGPR en el % de inhibición de la germinación de las Basidiosporas del hongo *M. perniciosa*…….. 72
Figura 35. Ilustración del efecto de los sobrenadantes de las PGPR en la inhibición de la germinación de basidiosporas de *Moniliophthora perniciosa* a las 24 horas…… 73
Figura 36. Efecto de los sobrenadantes de las PGPR en la inhibición del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 24 y 48 horas….. 74
Figura 37. Efecto de los sobrenadantes de las PGPR en la inhibición del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 24 horas…… 75
Figura 38. Efecto de los sobrenadantes de las PGPR en la inhibición del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 48 horas……... 75
Figura 39. Ilustración del efecto de los sobrenadantes de las PGPR en el tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 24 horas…….. 76
Figura 40. Ilustración del efecto de los sobrenadantes de las PGPR en el tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 48 horas……... 76
Figura 41. Basidiosporas después de 24 h en agua destilada estéril……. 81

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Obtención de un banco de cepas de *M. perniciosa*…… 99
Anexo 2. Construcción del Escobero…… 99
Anexo 3. Preparación de la Soluciones A (Contenedora de Basidiosporas)……. 100
Anexo 4. Verificación de los caracteres Morfológicos de *M. perniciosa*……. 100
Anexo 5. Determinación de la Fisiología……. 101
Anexo 6. Protocolo del DNeasy® Plant Mini Kit…… 102
Anexo 7. PureLink® Quick Gel Extraction Kit Catalog…….. 103
Anexo 8. Extracción de ADN……... 104
Anexo 9. Conteo de germinación de basidiosporas…….. 104
Anexo 10. Evaluación del efecto antagonista de las PGPR in vitro…… 105

# CÓDIGO DUBLÍN

| | |
|---|---|
| Título: | "Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de *Moniliophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L., y el efecto antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs')" |
| Autor: | Auhing Arcos Javier Andrés |
| Palabras clave: | *Moniliophthora perniciosa, Theobroma cacao,* Biodiversidad, Ecotipos, *S. marcescens, P. protegens, B. subtilis* y *E. asburiae*. |
| Fecha de publicación: | |
| Editorial: | Quevedo: UTEQ 2018 |
| Resumen:<br>(hasta 300 palabras) | *Moniliophthora perniciosa*, agente causante de la enfermedad 'Escoba de Bruja' en cacao (*Theobroma cacao*), presenta una elevada variabilidad genética es una de las enfermedades más importantes en plantaciones cacaoteras que ocasiona pérdidas económicas a nivel mundial cercanas al 70%. La información sobre las poblaciones de estos hongos es importante para entender mejor la dinámica de epidemias y ayudar al desarrollo de sistemas de control biológico, utilización de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR), por efecto de producción de metabolitos secundarios con actividad proteolítica o antibióticos. En este estudio tuvo como objetivo analizar 12 aislamientos del hongo obtenidos de diferentes materiales de cacao a su distribución altitudinal en el Ecuador para la identificación de la biodiversidad intraespecífica y los rangos de agresividad de los ecotipos de *M. perniciosa*. Se realizó mediante el agrupamiento por caracteres Morfológicos y caracteres Fisiológicos con respecto al grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa* y la utilización de herramientas moleculares como el *Espaciador Transcrito Interno* (ITS) y *Secuencias Intergénicas de Consenso Repetitivas de Enterobacterias* (ERIC-PCR). Se evaluó el factor antagónico de los extractos celulares al 15 %, donde la aplicación del extracto de *S. marcescens* (PM3-8), *P. protegens* (CHA0), *B. subtilis* (ATCC 55405) y *E. asburiae* (PM3-14) redujeron significativamente el desarrollo de los tubos germinativos a las 48 h e inhibieron la germinación de basidiosporas, impidiendo la dicariotización del hongo. El empleo en conjunto de estos bio-controladores en la agricultura ofrecerá una alternativa para beneficiar en la reducción del uso de agroquímicos. |
| Descripción: | Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162 |
| URI: | |

# INTRODUCCIÓN

Ecuador es famoso por su cacao 'Arriba' de alta calidad. La variedad de cacao local, 'cacao Nacional', se lo reconoce por tener una fermentación muy corta y dar un chocolate suave de buen sabor y aroma, por lo que es reconocido a nivel mundial con la clasificación fino o de aroma, es probablemente autóctono del oeste de Ecuador y sus características distintivas de sabor lo hicieron uno de los más valorados en el mercado mundial. Las enfermedades del cacao representan un factor importante en la economía y cultura de nuestro país, y altos costos para su control. Los efectos devastadores de la enfermedad conocida como "Escoba de Bruja" del cacao, causada por el hongo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, afecta con las reducciones del rendimiento del 50-90% (Meinhardt et al., 2008). En su ataque a los frutos puede asociarse con otras enfermedades como la Moniliasis y Antracnosis. El patógeno ataca tejidos meristemáticos en crecimientos e induce hipertrofias e hiperplasias, síntomas que varían de acuerdo a las condiciones ambientales, cultivares y la biodiversidad de ecotipos de *M. perniciosa* (Suarez C., 1977).

Se estima que dentro de las colonias ecuatorianas se pueden distinguir ecotipos del patógeno. La especiación es el surgimiento de una nueva especie a partir de una población ancestral, que ocurre cuando una población se separa geográficamente del resto de la especie y evoluciona. En este proyecto se revisa la importancia de los ecotipos en el concepto evolutivo de las especie. La biodiversidad de ecotipos a su distribución altitudinal del patógeno en el Ecuador para lograr una comprensión acertada de la epidemiología de esta enfermedad. La información sobre las poblaciones de estos hongos es importante para entender mejor la dinámica de epidemias y ayudar al desarrollo de sistemas de control biológico, mediante la utilización de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR), por efecto de producción de metabolitos secundarios con actividad proteolítica o antibióticos. La selección de estos microorganismos contribuye al desarrollo de temas de investigación al control biológico, y reemplazar la matriz productiva al reducir la dependencia al empleo de fungicidas.

# CAPÍTULO I

# CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

# 1. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

## 1.1. Problema de Investigación

### 1.1.1. Diagnostico

El hongo *Moniliophthora perniciosa,* ataca principalmente a tejidos meristemáticos en crecimiento activo, ocasionando la formación de escobas vegetativas y malformaciones en frutos conocidos como chirimoyas o frutos zanahoria. Influenciados por el medio ambiente y la variedad climática, cumplen su ciclo de vida ininterrumpidamente, causando grandes daños en la producción y pérdidas económicas, haciendo de la producción de cacao algo poco rentable.

### 1.1.2. Planteamiento del problema

Se estima que en el Ecuador existe una amplia diversidad genética de los Ecotipos del hongo *M. perniciosa*, recolectados a diferentes pisos altitudinales, influenciados por el medio ambiente, la variabilidad climática y al aumento de la uniformidad génica del cultivo de cacao, cual es el rangos de severidad del patógeno dependiendo de su ecología, hay efecto antagonista producidos por los metabolitos secundarios de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR's) en la germinación e inhibición del crecimiento del tubo germinal de las basidiosporas.

### 1.1.3. Sistematización del Problema

- ¿Hay biodiversidad en ecotipos de ***M. perniciosa*** a diferentes pisos altitudinales?
- ¿Existe diferencia en los grados de severidad de severidad en el patógeno a diferentes pisos altitudinales?
- ¿Cuál es el efecto *in vitro* de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento (PGPR) sobre la germinación de las basidiosporas?

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo General

Establecer la biodiversidad de ecotipos y su porcentaje de agresividad del hongo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, y verificar la actividad antagonista de las PGPRs' en condiciones *in vitro*.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Generar un banco de ecotipos de *M. perniciosa* de pisos altitudinales de *Theobroma cacao* L. y su caracterización morfológica y molecular.

- Analizar el grado de severidad de infección de *M. perniciosa* al estado fisiológico de cacao nacional EET-19.

- Evaluar el efecto de la aplicación de PGPR como antagonista en condiciones *in vitro.*

## 1.3. Justificación

La biodiversidad genética del patógeno es importante para lograr una comprensión acertada de la epidemiología de esta enfermedad. La información sobre las poblaciones de estos hongos es importante para entender mejor la dinámica de epidemias y la necesidad de buscar alternativas que sean viables para productores, da la pauta para el desarrollo de sistemas de control biológico y evaluar la actividad antagonista de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, que beneficiarían en el futuro a un gran número de productores y comercializadores, ya que se daría a conocer un método para combatir o controlar al agente causal de la enfermedad "Escoba de Bruja" como es el hongo *Moniliophthora perniciosa*.

Este es el primer estudio de biodiversidad de ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal de Ecuador mediante la ayuda de herramientas moleculares como *Espaciador Transcrito Interno* (ITS) y la amplificación de *Secuencias Intergénicas de Consenso Repetitivas de Enterobacterias* (ERIC-PCR), se evaluara doce subpoblaciones genéticamente diferenciada que están restringidas a un hábitat específico, a un ambiente particular o a un ecosistema definido, con límites de tolerancia particulares, a los factores ambientales locales.

La investigación aportara con el desarrollo productivo del sector agrario local, generando datos de suma importancia de la identificación de los diferentes ecotipos del hongo *M. perniciosa*, y promover la utilización de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR), el uso de microorganismos para el control de patógenos tiene un sinnúmero de beneficios ya que éstos atacan directamente al patógeno siendo amigable con el medio ambiente, así como también promover la reducción del uso de agroquímicos, que son los principales contaminantes de los recursos no renovables como el agua, suelo y el aire, por consiguiente asegurar la biodiversidad y salud humana. Facilitando así su control, manejo y bajos costos de producción del cultivo.

# CAPITULO II

# FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

# 2. ESQUEMA REFERENCIAL DEL MARCO TEÓRICO

## 2.1. El Hongo

*Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (Orden Agarícales, Familia Agaricaceae) es autóctono de Sudamérica y es parasito de *Theobroma* L. la fuente del chocolate y estrechamente relacionada con el género *Herrania* spp., también es parasito de algunas Lianas (Especies no identificadas) en Ecuador. Es capaz de interrumpir el equilibrio hormonal del huésped, provocando hipertrofias e hiperplasia seguido de necrosis tisular (Holliday P., 1980). Fue descrito por Stahel, (1915), quien determinó su etiología y lo describió, denominándolo como *Marasmius perniciosa* Stahel, posteriormente fue nombrada por Singer en 1942 como *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (Baker R.E.D. & Holliday P., 1956).

Con esta denominación fue conocido hasta antes del 2005, cuando en estudios elaborados por Aime & Phillips-Mora, (2005) utilizando secuencias de ADN, definieron la existencia de un estrecho parentesco con el patógeno *Moniliophthora roreri*, y a la vez, más distante de especies del tipo *Crinipellis*, renombrándolo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, en esta, al igual que en las últimas investigaciones se usará solamente el nuevo nombre del género.

Es un hongo basidiomiceto, hemibiotrófico (de naturaleza altamente específica: para perennizar su ciclo deben re-infectar el hospedero continuamente), causante de la enfermedad “Escoba de Bruja” en cacao (*Theobroma cacao* L.). Estudios realizados por Wheeler & Mepsted, (1988), determinan una diversidad de síntomas en función de la biodiversidad de ecotipos de *M. perniciosa* existentes en su área de dispersión; los mencionados autores establecieron que las cepas del Ecuador presentaron la más alta patogenicidad y virulencia frente al hospedero.

### 2.1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, (Meinhardt *et al*., 2008) es la siguiente: Reino: Fungi, Super-reino: Eukaryota, Phylum:

Basidiomycota, Subphylum: Agaromycota, Clase: Agaricomyctes, Subclase: Agaricomycetidae, Orden: Agaricales, Familia: Marasmiaceae, Género: *Moniliophthora*, Especie: *Moniliophthora perniciosa.*

## 2.2. La enfermedad “Escoba de Bruja” del cacao

La enfermedad se encuentra en Sur y Centro América y puede causar perdida en la producción hasta un 80% (Purdy & Schmidt, 1996), según las condiciones ambientales predominantes en las diferentes localidades, época del año, condiciones de manejo y susceptibilidad de los árboles (Hedger *et al.*, 1987). Fue reportada por primera vez en Surinam en el año de 1895, a su vez en Ecuador se reporta por primera vez en el cantón Balao provincia del Guayas en 1918 y en 1922 ya se había extendido por toda la provincia. En junio de 1923 abundaba en la provincia de "Los Ríos", la principal zona productora del cacao llamado de "arriba", esto provocó la gran debacle del cacao Ecuatoriano (Garces, 1946). A lo largo de 1900 la enfermedad apareció en el resto de Sudamérica en donde se tornó endémica (Pickering & Hedger, 1987).

El síntoma más notorio causado por *M. perniciosa* en el cacao (*T. cacao* L.) es una proliferación de brotes verticales que forman la denominada escoba de brujas. Sin embargo, existe una gama de síntomas que involucran hipertrofia e hiperplasia, cuya intensidad varía con el tipo y la edad del tejido involucrado y la constitución genética del árbol (Baker & Crowdy, 1943). Los principales síntomas macroscópicos de la enfermedad han sido ampliamente descritos (Evans H.C., 1977; Evans H.C., 2013 & Silva *et al.*, 2002).

En el campo, además de las escobas terminales y laterales que varían desde unos pocos centímetros hasta 15 m de largo, también puede haber hinchazones localizadas del tallo (conocidas como 'escobas crecidas'), cancros, hojas con pulvinos hinchado que permanecen erectos y rígidos en contraste con las hojas normales, y callos anormales y agallas asociadas con heridas expuestas. El hongo también puede infectar los cojines florales causando la producción de flores anormales. Las mazorcas que están infectadas durante las primeras etapas de desarrollo maduran de manera desigual y por lo general están distorsionadas. Las infecciones posteriores provocan la pudrición de las mazorcas, que es difícil de distinguir de la causada por otros patógenos. Algunas veces las infecciones resultan en la formación

de escobas muy pequeñas que mueren rápidamente. Se ha considerado que esto indica una respuesta hipersensible (Suarez C., 1977).

Los experimentos de laboratorio e invernadero sobre la enfermedad de la escoba de bruja a menudo implican la inoculación de plántulas de cacao en la etapa de cotiledón (4 días de edad). En este caso, las infecciones exitosas resultan en una hinchazón del hipocótilo que puede incluir la región del cotiledón y generalmente induce la proliferación del brote. A veces, la hipertrofia se acompaña de una disminución en el crecimiento del epicótilo y una muerte rápida de la plántula (Evans H.C., 2013 & Silva *et al.*, 2002).

## 2.3. Hospedero

El cacao (***Theobroma cacao* L.**) es considerado uno de los cultivos perennes más importantes a nivel mundial, el Ecuador es el séptimo productor de cacao a nivel mundial y el primero junto Brasil en Sudamérica; siendo el primero en la producción de cacao fino de aroma, con un área de siembra de 354,000 ha. La producción de cacao ecuatoriano se encuentra localizada en las zonas del trópico húmedo ocupando el 83% del área de cultivo, lo que aporta el 5% del cacao que se consume a nivel mundial (Sinagap, 2016).

*M. perniciosa* tiene como hospederos a especies de los géneros *Theobroma spp* y *Herrania spp.* En la actualidad se conoce que además existen diferentes "Biotipos" de *M. perniciosa* que tiene como hospederos asintomáticos especies de *Solanáceas, Bignoniáceas, Bixáceas,* y *Malpighiaceas* pero estos huéspedes son específicos para cada Biotipo de *M. perniciosa* (Bastos & Evans, 1985; Cronshaw D.K & Evans H.C., 1977; Griffith G.W. *et al.*, 2003). Nombrándose Biotipo-C a los aislamientos provenientes de las *Malvaceae,* cuya infección predominante es a los géneros *Theobroma spp* y *Herrania spp*, representado el grupo que causa mayores pérdidas económicas; Biotipo-S para las Solanáceas (Hedger *et al.*, 1987), Biotipo B para las Bixáceas (*Bixa Orellana*), Biotipo-H para las *Malpighiaceas* (*H. Acutifolia*) y Biotipo-L para los procedentes de Lianas (Griffith *et al.*, 2003; Griffith G.W. & Hedger J.N., 1994; Pickering & Hedger, 1987), la patogenicidad de cada biotipo aún no está probada en cacao.

## 2.4. Crecimiento del hongo en cacao

### 2.4.1. Penetración

La Escoba de Bruja del cacao comienza con la producción de basidiosporas de pequeños basidiocarpos rosa (hongos) formados en tejidos vegetales infectados previamente, incluyendo las mazorcas y el tejido vegetativo afectado. La dispersión aerotransportada de las basidiosporas se produce principalmente durante períodos nocturnos. Bajo alta humedad (Frias G.A *et al.*, 1991), las basidiosporas tienen la capacidad de infectar cualquier tejido meristemático del cacao, incluyendo brotes, flores y frutas jóvenes en desarrollo (Evans H.C, 1980). Se ha informado en varias ocasiones infecciones por aberturas estomáticas realizada por los tubos germinales de las basidiosporas (Suareaz C., 1977; Sreenivasan, 1989), Frias G.A *et al*., (1991) observaron la infección a través de las bases de tricomas dañados en descargas no concentradas. En esta etapa en el ciclo de la enfermedad, la densidad del micelio fúngico en la planta es muy bajo (Penman *et al.*, 2000) y el hongo se encuentra en la fase de crecimiento biotrófico, que es reconocido por la producción de hifas intercelulares contorneadas más anchas que carecen de conexiones de abrazadera (Evans H.C, 1980). La penetración del micelio se ramifica intercelularmente dentro del hospedero, proceso que tarda de 4 a 15 horas dependiendo de la temperatura y la humedad relativa (Purdy & Schmidt, 1996).

### 2.4.2. Crecimiento y distribución en "Escobas"

Observaciones tempranas del estado nuclear de este micelio en los meristemas de cacao sugirieron que era uninucleado (Calle *et al.*, 1982), aunque Griffith G. W. & Hedger J.N., (1994) encontraron esto mucho más variable (hasta diez núcleos por célula) en micelio biotróficos formado en cultivo dual de callos de papa. Durante la fase biotrófica, la interacción hongo-huésped produce síntomas distintos como: hipertrofia e hiperplasia de los tejidos distales al sitio de infección (Holliday P., 1980), pérdida de la dominancia apical, proliferación de brotes axilares y la formación de tallos anormales que resultan en una estructura tipo escoba llamada "Escoba Verde". La infección de las flores cauliformes resulta en la formación de escobas de cojín o pequeños frutos partenocárpicos.

Luego de 1-2 meses de alteraciones en el desarrollo, la necrosis y muerte de los tejidos infectados da lugar a la estructura llamada "escoba seca" (Evans H.C., 1980). Ninguno de

estos tejidos necróticos forma capas de abscisión con el objetivo de que los tejidos necróticos infectados no se desprendan. En algún momento durante o antes de la muerte de los tejidos infectados, el hongo prolifera colonizando el huésped necrótico o células muertas y se somete a un cambio morfológico con hifas más estrechas y menos complicadas, con conexiones en hebilla y micelio regular binucleado (dicariótico), éste es el inicio de la fase saprofítica. Durante la transición de escobas verdes a secas está presente tanto el micelio biotrófico como el saprófito dentro del tejido infectado (Purdy & Schmidt, 1996). El momento exacto, los mecanismos y los factores de señalización involucrada en las alteraciones del desarrollo de la planta y el hongo siguen siendo desconocidos.

*M. perniciosa* también es responsable de una de las enfermedades principales de podredumbre de la mazorca del cacao, anteriormente conocidas como "*Crinipellis* pod rot" o "podredumbre de la mazorca *Crinipellis*" (Maddison *et al.*, 1995). *T. cacao* produce mazorcas grandes y gruesas que contienen de 30-40 semillas que requieren aproximadamente 6 meses para alcanzar la madurez. Las frutas en desarrollo son susceptibles a la infección durante todo su crecimiento; la planta aborta las mazorcas jóvenes si se infectan durante las primeras semanas. Como la mazorca crece, la infección progresa, eventualmente causando una pudrición acuosa en mazorcas maduras con la pérdida completa de las semillas, la infección en mazorcas maduras darán lugar a una pérdida parcial del semillas. Esto se ha vuelto especialmente importante en Brasil, ya que la mayoría de los clones de cacao con resistencia a las infecciones por meristemas apicales son todavía susceptible a nivel de mazorcas (Meinhardt *et al*., 2008).

### 2.4.3. Producción de esporóforos en "Escobas"

Los signos de esta enfermedad son los paraguas o esporóforos del hongo, desarrollados en los órganos viejos muertos, escobas y mazorcas ya destruidos por el micelio. Estos esporóforos nunca se han encontrado en escobas o mazorcas verdes o recién muertas, y se encuentran más frecuentemente en las escobas aún prendidas del árbol. También se producen, sin embargo, en escobas y mazorcas caídas, sobre el suelo. Se estima que el tiempo necesario para que mueran las escobas varía de unas pocas semanas a varios meses (Baker & Crowdy, 1943; Baker R. & Holliday P., 1956). Transcurriendo entre 10 y 66 semanas antes de que se produzcan esporóforos en la "escoba muerta" o "escoba seca". En el campo, los esporóforos aparecen en escobas de la época anterior, inmediatamente después

del inicio de la temporada de lluvias. Primero hay un intenso flujo de cuerpos fructíferos, seguido de una producción regular de pequeñas cantidades durante todo el período lluvioso. Su número disminuye al final de las lluvias y no se producen durante el período seco. Relativamente poco se ha publicado sobre la producción de cuerpos fructíferos desde el trabajo de (Baker & Crowdy, 1943). Descubrieron que se producían más esporóforos en escobas grandes y durante un período más prolongado que en escobas pequeñas (Suarez C., 1977).

"La producción de esporóforos fue favorecida por periodos altos de humedad y períodos frecuentes pero cortos de lluvia. Los efectos de la luz y la temperatura no se han estudiado, pero dado que estos factores permanecen prácticamente constantes durante todo el año en el hábitat natural de *M. perniciosa*, es probable que sean de menor importancia" (Suarez C., 1977). Los cuerpos fructíferos se pueden producir fácilmente en escobas separadas para trabajos experimentales a nivel de laboratorio. Es una práctica común mantener las escobas muertas en cámaras húmedas y equipadas con un sistema de rociadores para proporcionar la alta humedad requerida.

Los experimentos han demostrado que mantener las escobas en cámaras húmedas cerradas o regarlas excesivamente reduce la cantidad de esporóforos y la vida de la escoba que porta los esporóforos. Sin embargo, algunas veces es posible inducir la formación de muchos esporóforos al permitir que las escobas se sequen durante 2 o 3 días durante cada período de 2 semanas y luego se riegan en periodos alternos de 8 horas de agua y 16 hora de sequía (Rocha & Wheeler, 1985; Suarez C., 1977), y temperatura entre 22 a 28 °C (Característica del inicio de la época lluviosa en nuestro país) sobre las escobas secas se desarrollan los basidiocarpos (Purdy & Schmidt, 1996). Sin embargo, la formación de esporóforos es errática e incluso en condiciones aparentemente ideales, los esporóforos se forman solo en aproximadamente el 50% de las escobas (Suarez C., 1977).

La colección de esporóforos para experimentos se basa en conjeturas en lugar de conocimiento científico. Las fases iniciales del cuerpo fructífero pueden permanecer secas durante varias semanas y reanudar el desarrollo cuando las condiciones vuelvan a ser favorables. Los esporóforos maduros también exhiben un considerable poder de recuperación de desecaciones tales como varios días de sequía o una hora en un desecador (Baker R. & Holliday P., 1956; Suarez C., 1977).

Después de alternar períodos húmedo y seco (Almeida *et al.*, 1997; Rocha & Wheeler, 1985; Suarez C., 1977), la producción de basidiocarpos y la posterior formación de esporas puede ocurrir en cualquier tejido necrótico infectado, completando así el ciclo de la enfermedad. La formación de basidiocarpos y la producción de esporas de una sola "escoba seca" pueden ocurrir repetidamente durante un período de varios años. Una característica adicional de la fase biotrófica que se ha observado en escobas verdes senescentes (Suarez C., 1977), en tricomas de hojas y en cultivos dual de callos de papa (Griffith & Hedger, 1994) es la formación de clamidosporas. El rol de estas esporas intercaladas de paredes gruesas en "Escoba de Bruja" no se conoce pero pueden representar una fase latente después de la infección del huésped.

## 2.5. Ciclo de vida del hongo *Moniliophthora perniciosa*, agente causal de la enfermedad "Escoba de Bruja"

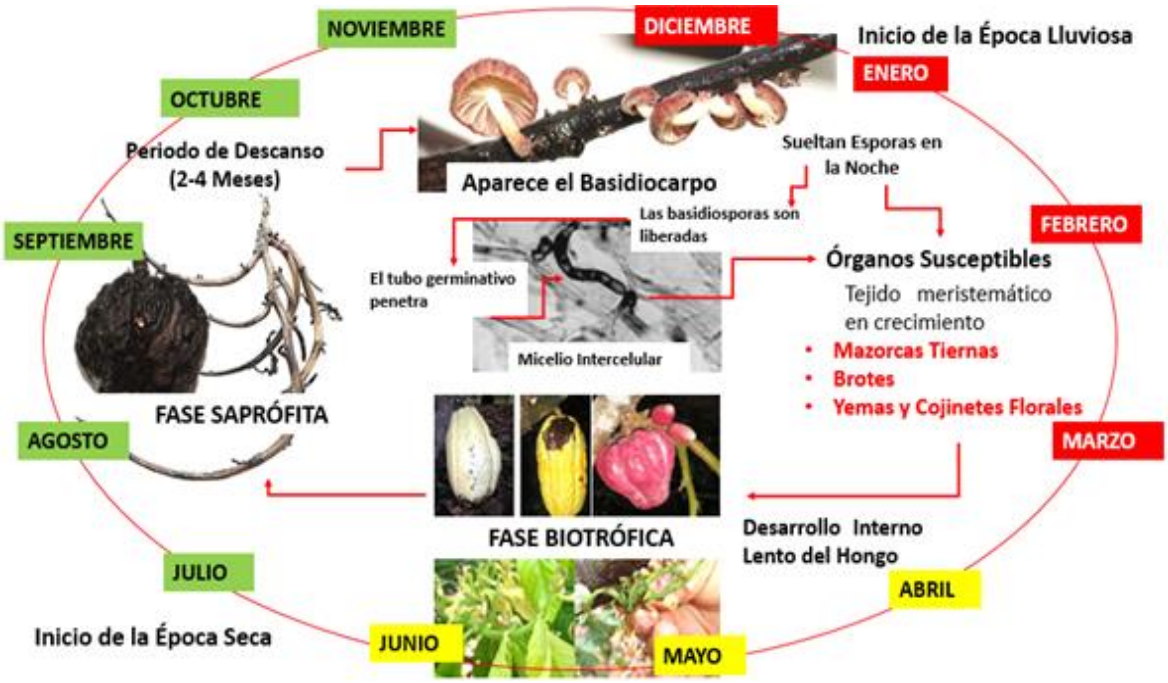



**Figura 1. Ciclo de Vida del Hongo *M. perniciosa*** Fuente: (Hidalgo S.K, 2005; Purdy & Schmidt, 1996; Suarez C., 1977).

## 2.6. Descripción morfológica

*M. perniciosa* presenta un píleo color rojo carmesí, generalmente frágil, conforme madura pierde color; en el centro sobresale una mancha conspicua de color rojo oscuro, con líneas

radiales del mismo color, en forma de campana, arrugado o flácido cuando se deshidrata y turgente cuando hay humedad, diámetro de 5 a 30 mm con surcos radiales convexos y deprimido en el centro, la lámela es blanquecina con más de 15 laminillas correspondiente a los surcos del píleo, el estipe es hueco de color blanco cremoso y mide de 5 a 10 mm, su base es engrosada de color pardo. Las basidias producen cuatro basidiosporas unicelulares y el resto del himenio es similar al de los otros basidiomicetos (Baker R. & Holliday P., 1956; Holliday P., 1970). De esta manera las basidiocarpos proveen de esporas para inicio de nuevas infecciones sobre brotes y yemas florales durante el ciclo de vida de la planta. Los cuerpos fructíferos (basidiocarpos) no se desarrollan en tejido vegetal vivo, sólo se desarrollan en ramas, frutos y hojas muertas (López, 1991).

Las basidiosporas son estructuras hialinas, ovales, en estudios realizados por Holliday P., (1998) determino un tamaño de 7–11 μm de largo x 4-5 μm de ancho, en mediciones realizadas por Evans, H.C. & Bastos, (1980) determinaron un tamaño de 12 μm de largo x 6 μm de ancho. A partir de ellas se forma el micelio biotrófico monocariótico, sin conexiones de gancho. En investigaciones realizadas previamente por Pegler, (1978) examinó un rango de basidiocarpos atribuidos a *M. perniciosa* colectadas en Sudamérica y designó tres variedades basándose en el color del píleo y el tamaño de las basidiosporas, denominadas: var. ***Perniciosa*** (píleo color carmesí a rojo oscuro y un diámetro de 5-25 mm, con un tamaño de esporas de 9-12.5 μm de largo x 4.5-6 μm de ancho), var. ***Ecuadoriensis*** (Stahel) (píleo color rojo carmesí sin áreas blanquecinas y un diámetro de 35 mm, con un tamaño de esporas de 8.7-12.3 μm de largo x 4.7-6.9 μm de ancho) y var. ***Citriniceps*** (píleo amarillo y un diámetro de 8-16 mm, con un tamaño de esporas de 10-13 μm de largo x 4.5-7 μm de ancho).

## 2.7. Síntomas

### 2.7.1. Síntomas en plantas adultas y mazorcas de cacao

Se consultó publicaciones respecto a los síntomas producidos por *M. perniciosa* en plantas adultas y frutos, para tener una noción más amplia y poder recolectar las “escobas secas” en las huertas de cacao a diferentes pisos altitudinales, para el presente trabajo de investigación. El tipo de síntoma a presentar depende del estadío del tejido en desarrollo al ser infectado. El árbol de cacao tiene un hábito de ramificación dimórfico, en los dos tipos de ramificación existen yemas en cada axila foliar. Dependiendo de las condiciones climáticas y la

disposición de inoculo en el área, cualquier punto de crecimiento podría ser infectado por el patógeno. Cuando la infección por *M. perniciosa* se efectúa en una yema apical o axilar, en un nudo o entrenudos en crecimiento activo, estimulando la formación de un brote hipertrofiado y/o ramificado, que se constituye en una "Escoba Vegetativa" (Silva *et al.*, 2002).

En cojinetes florales infectados por las basidiosporas de *M. perniciosa* se produce hiperplasia principalmente, es decir se forman brotes vegetativos y cuando el ovario no ha sido fecundado, se producen frutos partenocárpicos en forma de chirimolla; y cuando el ovario ya está fecundado frutos en forma de zanahoria (Baker & Crowdy, 1943; Baker R. & Holliday P., 1956), también se produce hipertrofia, en las flores y pedúnculos. Las escobas de este tipo pueden variar considerablemente de apariencia y tamaño. Los síntomas en frutos infectados después de las primeras semanas de desarrollo son muy variados y dependen del genotipo de planta, de la edad del fruto y de la época de la infección. Cuando ésta ocurre al inicio de la maduración, una o más lesiones necróticas e irregulares se presentan, una a trece semanas después de la penetración del hongo (Silva *et al*., 2002).

### 2.7.2. Síntomas en Plántulas Provenientes de Semilla pregerminadas

A nivel *in vivo* con inoculaciones artificiales, se han observado síntomas en plántulas a partir de los 9 días después de la inoculación en semillas germinadas y el período de incubación de 19 días en cruces muy susceptibles (Baker R. & Holliday P., 1956). En plántulas inoculadas en las hojas primarias del meristema apical el período de incubación es de 18 a 22 días.

Las semillas pre-germinadas e inoculadas artificialmente, producen plántulas con síntomas similares a aquellas originadas de semillas aparentemente sanas, provenientes de frutos infectados. El sistema radicular de las plántulas enfermas es atrofiado en relación con las plántulas sanas, el hipocótilo se presenta hipertrofiado y la presencia de escobas vegetativas, son producidas a partir de yemas situadas en el nudo cotiledonal. Los cotiledones permanecen adheridos por un período prolongado. La infección en este estadio, generalmente causa la muerte de las plántulas. Algunas plántulas antes de morir pueden presentar debilidad en las hojas y en posición anormal. Las hojas pueden estar cloróticas, delgadas y de consistencia apergaminada antes de secar, presentando una consistencia

quebradiza (Silva *et al.*, 2002). Las escobas secas de plántulas producen basidiocarpos, sometidas a las mismas condiciones de las escobas de plantas adultas con períodos intercalados de sequía y mojado (Silva *et al*., 2002). En estudios realizados previamente (Evans H.C, 2013; Silva *et al*., 2002 & Tovar, 1991) se han descrito los principales síntomas en plántulas inoculadas artificialmente con concentraciones que van de 10000 esporas/ml (Suarez C., 1977) a 75000 esporas/ml (Frias G.A., 1987 & Silva *et al*., 2002) en diferentes estados de desarrollo, dando lugar a una gama de síntomas que se describen a continuación:

#### 2.7.2.1. Decoloración e entumecimiento

Después de 15 días de la inoculación, en el punto donde fue depositado el inóculo, aparecieron los primeros síntomas externos, en la forma descendente e entumecimiento de la yema, causados por hipertrofia de las células. También puede ocurrir una quema de las expansiones laminares aciculares que envuelven la yema apical, que se asemeja a una reacción de hipersensibilidad. En este último caso, difícilmente escobas se desarrollan a partir de las yemas terminales (Silva *et al*., 2002).

#### 2.7.2.2. Escobas terminales y axilares

La deformación de una yema apical, en forma de estiramiento y engrosamiento, resulta en la formación de una escoba terminal, que continúa desarrollándose, presentando también entumecimiento de los pecíolos y pulvinos de las hojas. A partir de las axilas de las hojas hay una proliferación de brotes, dando origen a escobas axilares de diferentes tamaños, que continúan proliferando lateralmente. Las hojas de estas escobas, se presentan generalmente cloróticas (Silva *et al*., 2002).

En algunas ocasiones, en el punto de la infección, ocurre la atrofia de la yema terminal y el entumecimiento por debajo del punto inoculado. Las extrañas deformaciones se generan, con una o más escobas, partiendo de las axilas de las hojas ya existentes en el momento de la inoculación. Según Silva *et al*., (2002) síntomas similares se observaron en plántulas de cacao mantenidas a nivel de invernaderos e infectadas naturalmente.

#### 2.7.2.3. Escobas látigo

La yema apical se presenta alargada, algunas veces más anchas en la base, adelgazándose hasta el ápice; las yemas axilares no se desarrollan o el crecimiento es restringido, en el lugar de la abscisión de las hojas, se forma una cicatriz. Las hojas pueden presentarse pequeñas y cloróticas. A nivel de invernaderos, se presentaron pequeñas escobas axilares, partiendo de las cicatrices foliares (Rudgard, 1986; Silva *et al*., 2002 & Tovar, 1991).

#### 2.7.2.4. Escobas recurrente

Después de la infección de la yema apical y la forma de escoba terminal, la remoción de esta escoba puede estimular la aparición de una escoba lateral opuesta a la axila de una de las hojas preexistentes en el momento de la inoculación. Anteriormente, en este punto, no había ningún síntoma externo de infección. Estas escobillas laterales normalmente son vigorosas y con numerosos brotes axilares. Las hojas que se originan a partir de estas escobas, presentan entumecimiento de pulvinos, pecíolos, clorosis y otras deformaciones (Silva *et al.*, 2002).

#### 2.7.2.5. Elongación de la yema terminal

En algunos genotipos, después de la inoculación de la yema terminal en el segundo lanzamiento foliar de las plántulas o después de la infección natural en el vivero, presentan una elongación exagerada de los internudos, un crecimiento acentuado de las plántulas en relación con las demás. El micelio del patógeno fue observado en el espacio intercelular, cuando se realizaron cortes transversales en esas regiones de estiramiento (Silva *et al.*, 2002).

#### 2.7.2.6. Superbrotamiento

En estudios realizados por Silva *et al.*, (2002) han observado también en algunos genotipos el desarrollo de internudos cortos desde el punto inoculado o del punto infectado naturalmente. Los entrenudos no pueden formar hojas, estos son más cortos y las hojas se forman anormales a partir de los nudos solamente dando un aspecto de superbrotamiento. Tanto en el caso de estiramiento de la yema como en el de superbrotamiento, las plántulas pueden retornar a su desarrollo normal y no presentar más síntomas de escoba de bruja. Estos síntomas pueden ser considerados como reacciones de resistencia.

#### 2.7.2.7. Entumecimiento y curvatura en los vástagos

Las plántulas inoculadas pueden no presentar síntomas en la yema apical, pero se pueden observar en los vástagos la formación de zonas entumecidas, tanto por encima y por debajo del nudo cotiledonal. En algunas ocasiones, cuando el entumecimiento no es prominente, es posible sentir por el tacto, la formación de esos nódulos internos. En otros casos, el entumecimiento puede ser seguido del curvado de los vástagos, dando aspecto grotesco las plántulas (Silva *et al.*, 2002).

#### 2.7.2.8. Cáncer

De los vástagos entumecidos pueden presentar hendidura en la corteza que se desprenden, exponiendo pequeñas hebras del leño. A partir de estos cánceres, pueden surgir nuevas escobas en las plantas, principalmente cuando ocurren debajo de la yema cotiledonal (Silva *et al*., 2002).

#### 2.7.2.9. Escobas cotiledonales

La inoculación en la yema apical de las plántulas, es relativamente común tener como resultado escobas cotiledonales que se forman predominantemente en algunos genotipos. Estas escobas pueden producirse aisladamente o acompañadas con otros síntomas. A partir del nudo cotiledonal, surgen brotes laterales con hipertrofia. El propio cotiledón puede permanecer adherido en el vástago, mostrando deformación y superbrotamiento de yemas (Silva *et al*., 2002).

## 2.8. Relevancia evolutiva de la biodiversidad de ecotipos de *M. perniciosa*

Se conoce como ecotipo a una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, a un ambiente particular o a un ecosistema definido, con límites de tolerancia particulares, a los factores ambientales locales. La adaptación a un ecosistema o a un hábitat particular implica cambios genéticos que se establecen de acuerdo con los límites de tolerancia de las especies. Lo anterior indica que las especies no son estáticas, ya que deben de adaptarse al medio en el que viven, e incluso algunas llegan a modificarlo de tal

modo que realizan repoblaciones de sitios alterados, asegurándose de que los ejemplares introducidos pertenezcan a un ecotipo adaptado a vivir en las condiciones específicas del lugar (González M. & Rojas M., 2014).

En el artículo publicado por Valen, (2011), el concepto ecológico se desarrolla dentro de una concepción adaptacionista, en la que se supone que cuando ocurre alguna modificación de las condiciones y los recursos de determinado ambiente se crea un nicho vacío, el cual activa la selección natural hasta que la población alcanza un nuevo pico adaptativo asociado a ese nicho y con ello se genera una nueva especie. No obstante, este concepto también puede ser funcional dentro del punto de vista neutral, en cuyo caso se argumenta que los organismos tienen la capacidad de modificar su propio nicho de tal manera que muchos de los caracteres que se observan en los organismos son producto de la deriva génica (González M. & Rojas M., 2014).

Los resultados de un análisis filogenético se pueden representar en un dendograma donde los grupos o clúster más pequeños dentro de esta relación son considerados unidades evolutivas separadas (Cerritos F., 2008). El concepto filogenético asume que entre los grupos formados hubo un proceso de especiación, por lo que el flujo génico entre estos grupos es casi nulo y que probablemente la selección natural, la deriva génica y la mutación actúan de manera diferencial sobre los caracteres de los individuos. Los caracteres que se toman para reconocer y delimitar especies filogenéticas pueden ser fenotípicos (morfológicos, fisiológicos, bioquímicos o moleculares) o genotípicos, siempre y cuando reflejen una relación ancestral en común entre los grupos (Cerritos F., 2008).

## 2.9. La biología molecular como herramienta en la búsqueda de la biodiversidad de ecotipos de *M. perniciosa*

### 2.9.1. Marcador molecular

Con la revolución de técnicas modernas de biología molecular inclinada a la comprensión de procesos biológicos fundamentales, surgieron métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel del ADN. Además el desarrollo del proceso de amplificación en cadena con una ADN-polimerasa (PCR), llevó a la descripción de otros marcadores

moleculares ligados a características fenotípicas de interés con lo que se reduce el tiempo empleado en los trabajos de mejoramiento tradicionales con plantas diferenciales y la compresión de la epidemiología y virulencia de patógenos (Landry *et al.*, 1991 & Weising, 1995). PCR es la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima polimerasa, la reacción se basa en el apareamiento y polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos iniciadores sintetizados artificialmente para que su secuencia sea complementaria a la que delimita la secuencia de ADN doble cadena objetivo, blanco o "target" de la amplificación (Landry *et al.*, 1991 & Weising, 1995).

### 2.9.2. Gen del ARN ribosómico 5.8S

Entre los marcadores moleculares más conocidos están los ITS (*Internal Transcriptional Sequence*), capaces de distinguir variabilidad genética entre las diferentes poblaciones de *M. perniciosa*, la región ITS que contiene las secuencias (ITS1, ITS2 y 5.8S), fueron amplificados por White & Taylor J., (1990) con los primers ITS1 e ITS4. En estudios realizados por Orozco S. & Rivera, (2012); & Osorio S. *et al.* (2012) *M. perniciosa* presentó un producto de 750 pb. Estás regiones son más susceptibles de acumular mutaciones atreves de los años y por lo tanto tienen gran interés para el estudio de la identificación y tipificación de especies fúngicas.

Dentro de los ITS se encuentra una región codificante del gen del ARN ribosómico 5.8S (rRNA 5.8S) que es un componente de ARN no codificante de la subunidad grande del ribosoma de las eucariotas y así desempeña un papel importante en la traducción de proteínas (Elela *et al.*, 1997). Similar a las otras regiones codificantes, la secuencia 5.8S evoluciona de forma relativamente lenta, pero debido a su ubicación dentro del ITS, se ha demostrado que contiene considerable información filogenética (Lewis, 1996).

### 2.9.3. ERIC-PCR "Huella Dactilar del Genoma"

Hulton *et al.* (1991) & Martin *et al.*, (1992) describieron familias de elementos repetitivos cortos intercalados en eubacterias, que son los elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP), ERIC-PCR (amplificación de *secuencias intergénicas* de *consenso*

*repetitivas* de *enterobacterias)* y el elemento BOX. Los datos de secuencia para los elementos REP y ERIC se han descrito solo en Enterobacterias Gram-negativas y phyla estrechamente relacionadas (Hulton *et al*., 1991 & Versalovic *et al.*, 1991), mientras que el elemento BOX se ha descrito solo en el Streptoco Gram-positivo. *Tococcus pneumoniae* (Martin *et al.*, 1992). Los primers de consenso para cada uno de los elementos se han utilizado en reacciones en cadena de la polimerasa diseñadas para amplificar regiones entre elementos repetitivos vecinos. Este proceso, llamado rep-PCR, genera huellas dactilares de ADN que permiten la diferenciación de especies y cepas eubacteriales (Versalovic *et al.*, 1991).

Según Gillings & Holley, (1997); & Ohno, (1990) se pueden entender que una secuencia palindrómica o palíndromo, es una secuencia de ácido nucleico (ADN o ARN) que es lo mismo si se lee de 5' (5-*prima*) a 3' (3-*prima*) en un filamento o de 5' a 3' en el filamento complementario, con el cual forma una doble hélice. Puesto que una doble hélice está formada por dos hebras pares de nucleótidos que corren en direcciones opuestas en el sentido de 5' a 3' y los nucleótidos par siempre de la misma manera (adenina (A) con timina (T) para el ADN, con uracilo (U) por ARN; Citosina (C) con guanina (G)), una secuencia de nucleótidos (monocatenario) se dice que es un palíndromo si es igual a su complemento inverso.

Por ejemplo, la secuencia de ADN "ACCTAGGT" es palindrómica porque su complemento del nucleótido-por-nucleótido es "TGGATCCA", e invirtiendo el orden de los nucleótidos en el complemento da la secuencia original. Una secuencia de nucleótidos palindrómica puede formar una horquilla. Los palíndromos del ADN se encuentran en la mayoría de los genomas o conjuntos de instrucciones genéticas (Gillings & Holley, 1997; & Ohno, 1990). Estas publicaciones plantean la cuestión de qué tan amplia es la gama de organismos que pueden analizarse con ERIC-PCR. (Welsh & McClelland, 1990; & Williams *et al.*, 1990), muestran que los patrones complejos de ERIC-PCR pueden generarse fácilmente a partir de eucariotas y bacteriófagos, así como de eubacteria o procariotas, cuando se utilizan las temperaturas de hibridación estándar.

Esta observación, tomada con los resultados de análisis realizados, sugieren que ERIC-PCR, es una variante altamente reproducible del ADN polimórfico amplificado aleatoriamente.

## 2.10. Rizobacterias Promotoras De Crecimiento Vegetal (PGPR)

Esta es un área nueva en lo relativo a cacao y por lo tanto se describen lo que estas hacen en otros patosistemas. Las rizobacterias son una alternativa para combatir el hongo *Moniliophthora perniciosa* causante de la "Escoba de Bruja" en el cacao, que ha demostrado no generar resistencia en los fitopatógenos. Cepas de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) cumplen un rol importante en el biocontrol, Siendo las PGPR una alternativa biológica para combatir enfermedades de *T. cacao* L, por su amplia diversidad de compuestos bioactivos hacia el control de patógenos de plantas. Aislados de *Pseudomona fluorescens, Pseudomona veronii, Bacillus subtilis, Acinetobacter calcoaceticus, Serratia marcescens* y *Enterobacter asburiae* tienen la capacidad de disminuir la viabilidad de agentes patógenos como: hongos, bacterias, nematodos mediante un mecanismo antagonista y de inducir los sistemas de defensa de plantas por la resistencia sistémica inducida (ISR) (Somers *et al.*, 2004).

Estos organismos se encuentran mayormente viviendo libremente en la rizósfera o puede estar asociado a la superficie de las raíces, observándose en el extremo de la raíz o libres de bacterias, mientras otras áreas pueden estar altamente pobladas (Fukui *et al.*, 1994). Las rizobacterias que promueven el crecimiento de la planta (PGPR) son bacterias de suelo que tiene la disponibilidad a colonizar la raíz y estimular a las plantas en su crecimiento. Las plantas están expuestas a un sin número de patógenos en su medio natural, como parte de su proceso evolutivo han desarrollado múltiples y complejas estrategias de defensa, permitiendo adaptarse a diferentes entornos ambientales y defenderse al ataque de patógenos. Para contrarrestar este ataque, ellas tienen involucrado un largo paso de respuestas a defensa, dentro de estas defensas incluye las barreras pre-existentes físicas y químicas, así como respuestas inducibles que son activadas antes y después de la percepción del patógeno (Hammond K. & Jones, 1996).

Los mecanismo de defensa, frente al ataque de un patógeno la planta presenta barreras físicas, como la pared celular o la cutícula, esto dificultan la entrada de diferentes agentes invasores, he impiden el ingreso del patógeno al citoplasma celular y sus nutrientes (Figura 2), siendo este mecanismo particularmente notable para el control de patógenos biotróficos (Mauch-Mani & Slusarenko, 1993). Las barreras químicas representan un mecanismo de

defensa más sofisticado, involucra cambios bioquímicos, está defensa es inducido después de la detección de un microorganismo patogénico por la vía de reconocimiento, realizada por una molécula elicitora durante la interacción planta-patógeno (Eder & Cosio, 1994). Además, se mantiene una síntesis de fitoalexinas, incrementando el fortalecimiento de la pared celular y la producción de proteínas anti-fúngicas (Jackson & Taylor, 1996).

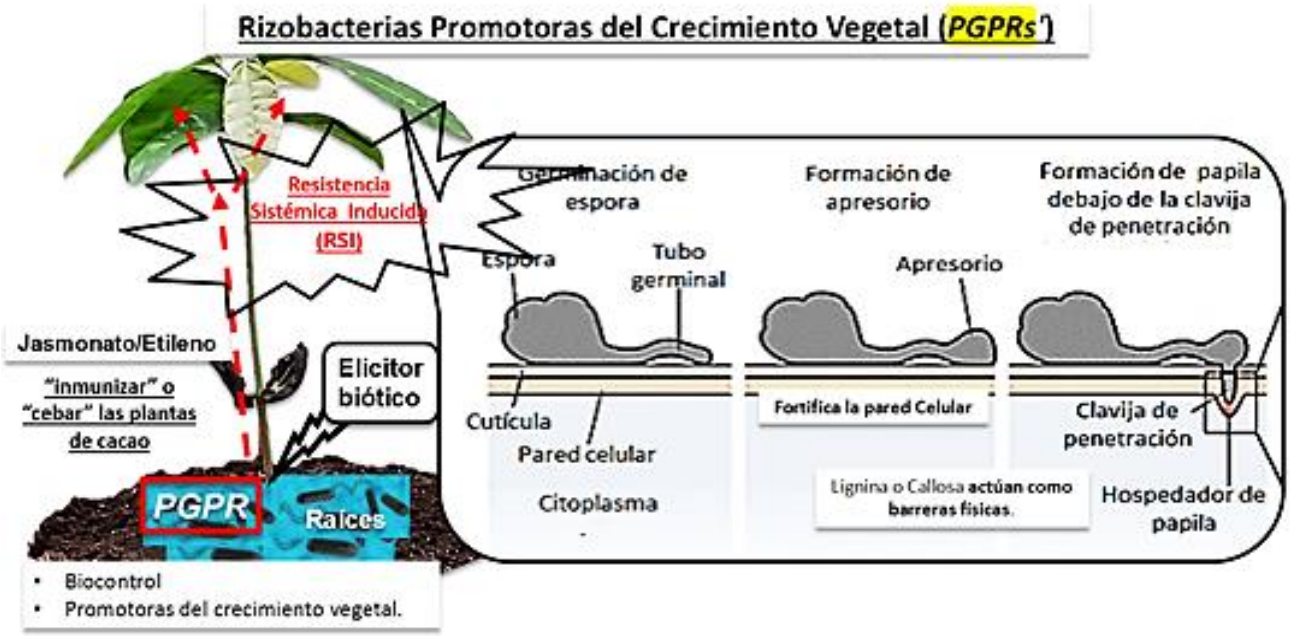



**Figura 2. Las PGPR** segregan enzimas líticas que degradan la quitina y glucanos presentes en la pared celular del hongo, como quitinasas y glucanasas. **Fuente:** (Ramamoorthy *et al.*, 2002)**.**

Los antibióticos o metabolitos secundarios como *pioluteorina* (Plt), *pirrolnitrina* (Prn), ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) y 2,4- *diacetilfloroglucinol* (2,4 DAPG) y enzimas como *quitinasas* (Chi), son los principales controladores biológicos de hongos y bacterias. Por aislamientos directos y técnicas moleculares se ha demostrado que estos antibióticos son producidos en la rizosfera y desempeñan un rol en la supresión de patógenos de plantas en el suelo (Jones *et al.*, 1986 & Raaijmakers *et al.*, 1997).

## 2.10.1. Etiología de las PGPR

### 2.10.1.1. *Pseudomonas sp.*

Son bacilos Gram-negativos, Su pigmento fluorescente (fluoresceína) la hace reaccionar frente a la luz ultravioleta (Park & Kloepper, 2000).

**Taxonomía** (Anzai *et al.*, 2000): Dominio: Bacteria, Filo: Protobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Orden: Pseudomonadales, Familia: Pseudomonadaceae, Género: *Pseudomonas*, Especie: *P. fluorescens* y *P. veronii*

#### 2.10.1.2. *Bacillus subtilis*

Es una bacteria Gram-positiva, Dentro de los compuestos producidos por *Bacillus sp.*, se incluyen la fengicina y quitinasa (son antifúngicas e inhibe hongos filamentosos) *(Wu et al*., 2007).

**Taxonomía:** Dominio: Bacteria, Filo: Firmicutes, Clase: Bacilli, Orden: Bacillales, Familia: Bacillaceae, Género: *Bacillus,* Especie: *B. subtilis.*

#### 2.10.1.3. *Acinetobacter calcoaceticus*

Es una especie de bacterias Gram-negativas que pertenece al filo Proteobacteria.

**Taxonomía** (Nemec *et al.*, 2016)**:** Dominio: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Gamma proteobacteria, Orden: Pseudomonadales, Familia: Moraxellaceae, Género: Acinetobacter, Especie: *A. calcoaceticus*

#### 2.10.1.4. *Serratia marcescens*

Es un bacilo Gram-negativo de la familia Enterobacteriaceae, Secreta quitinasa extracelular; varias proteasas, una nucleasas y una lipasa (Silva O., 2010).

**Taxonomía:** Dominio: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Gamma proteobacteria, Orden: Enterobacteriales, Familia: Enterobacteriaceae, Género: *Serratia,* Especie: *S. marcescens*

#### 2.10.1.5. *Enterobacter asburiae*

Es un género de bacterias Gram negativas facultativamente anaeróbicas de la familia de las Enterobacteriaceae.

**Taxonomía:** Dominio: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Gamma proteobacteria, Orden: Enterobacteriales, Familia: Enterobacteriaceae, Género: *Enterobacter,* Especie: *E. asburia*

# CAPÍTULO III

# METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

# 3. MÉTODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN

## 3.1. Ubicación

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y de Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario "Manuel Haz Álvarez" ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo. Sus coordenadas geográficas son 01° 01" de latitud Sur y 79° 47" de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm.

## 3.2. Tipo de investigación

Se utilizó el método experimental comparando información existente en la literatura de la biodiversidad de ecotipos de *Moniliophthora perniciosa*, presentes en *Theobroma cacao* L. y los rangos de agresividad del patógeno.

## 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.

- **Método deductivo:** El método se inicia con el análisis de los teoremas, leyes, postulados y principios de aplicación universal y de comprobada validez, para aplicarlos a soluciones o hechos particulares.
- **Método analítico:** Consiste en descomponer un objeto de estudio separando cada una de las partes del todo para estudiarlas en forma individual.
- **Método de observación:** Consiste en saber seleccionar aquello que queremos analizar.

## 3.4. Fuentes de recopilación de información

Las fuentes utilizadas para la obtención de información fueron secundarias ya que se obtuvieron de: revistas, publicaciones científicas, libros y tesis.

## 3.5. Generar un banco de ecotipos de *M. perniciosa* de pisos altitudinales de *Theobroma cacao* L. y su caracterización morfológica y molecular

Escobas secas provocadas por el hongo *M. perniciosa,* se recolectaron en doce ecotipos de huertas de cacao nacional a su distribución altitudinal (m.s.n.m) del Ecuador, formando así un banco de cepas para el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Se registró los datos de temperatura Max y Min y el promedio del % Humedad relativa de los ecotipos. En la matriz se describe los doce ecotipos de *M. perniciosa,* designado códigos a cada ecotipo. Se georreferencio por el empleo de GPS al lugar de recolección. Se asignó su ubicación por Microsoft Power Map para Excel al lugar de origen de cada ecotipo en el Ecuador.

### 3.5.1. Almacenamiento de esporas de ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador

Para obtener basidiosporas de *M. perniciosa* se siguió la metodología propuesta por Rocha & Wheeler, (1985) y Suarez C., (1977), las "Escobas Secas" son susceptibles a la ruptura y el lumen de color café claro. Se recolectó y almacenó a baja humedad relativa (< 50%) por un periodo de 7 a 15 días, se sumergió en una solución de Benomyl al 2% por 24 horas, para eliminar saprofitos y estimular la producción de basidiocarpos.

Se diseñó un umbráculo (Escobero) de 8 horas de humedad y 16 horas de sequía (Rocha & Wheeler, 1985; Suarez C., 1977); según Purdy & Schmidt (1996), las condiciones óptimas para estimular la producción de basidiocarpos son: alta humedad relativa (80%), precipitación de 1000 a 2000 mm y temperatura entre 22 a 28 °C. Al transcurrir aproximadamente un mes, se procedió a la recolección de los basidiocarpos, esta operación se realizó en horas de la tarde con la ayuda de una pinza quirúrgica y una caja petri con papel estéril en su interior.

#### 3.5.1.1. Preparación de las soluciones para la colección y almacenamiento de basidiosporas

Para la preparación de los buffers (Solución A, B y C), se siguió la metodología propuesta por (Frias G.A., 1987).

- ✓ **Solución A (Colectora):**

Usada para recolectar basidiosporas de *M. perniciosa* y mantenerlas sin germinar.

Reactivos:

**0.01 M MES y Glicerol al 16%**

- 1.95 g. de buffer MES (2-N-Morpholinoethanensulfonic acid)
- 160 ml de Glicerol.
- 840 ml de agua destilada
- 0.01% de Tween-20
- El pH fue ajustado a 6.2

**Preparación:** Se agregó 1.95 g de MES en 840 ml de agua destilada estéril y se aforo a 1000 ml con 160 ml de Glicerol, en agitación constante, para ajustar luego el pH a 6.2 utilizando K (OH) concentrado. La solución fue esterilizada en la autoclave (SANYO MLS-3751 L-PE) por 45 min, a 17 kg/cm2 de presión y una temperatura de 121 °C. Al momento de usarla se añade Tween 20 – 0.01%.

- ✓ **Solución B (Diluyente):**

Usada para bajar la concentración de Glicerol de la solución colectora del 16 al 3%.

Reactivos:

**0.01 M MES y Glicerol al 3%**

- 1.95 g. de buffer MES (2-N-Morpholinoethanensulfonic acid)
- 970 ml de agua destilada
- 30 ml de Glicerol

**Preparación:** Se agregó 1.95 g de MES en 970 ml de agua destilada y con los 30 ml de Glicerol se aforó a 1000 ml la solución que está en constante agitación, ajustando el PH a 6.2 con la utilización de K (OH) concentrado. La solución fue esterilizada en el autoclave

SANYO MLS-3751L-PE) por 45 min a 17 kg/cm2 de presión y una temperatura de 121 °C, al momento de usarla se añade Tween 20 – 0.01%.

- ✓ **Solución C (Diluyente):**

Usada para bajar la concentración de Glicerol de la solución colectora y permitir la germinación de las basidiosporas.

Reactivos:

**0.01 M MES**

- 1,95 g de buffer MES (2-N-Morpholinoethanensulfonic acid)
- 1000 ml de agua destilada
- El pH ajustado a 6,2 con K (OH)

**Preparación:** Se agregó 1.95 g. de MES. En 1000 ml de agua destilada estéril en constante agitación, ajustado el pH de 6.2 con el uso de K (OH) concentrado. La solución fue esterilizada en el autoclave (SANYO MLS-3751L-PE) por 45 minutos a 17 kg/cm2 de presión y una temperatura de 121 °C, al momento del uso se añade Tween 20 – 0.01%.

**Almacenamiento de basidiosporas**

Se almacenó basidiosporas y se conservaron en Nitrógeno Líquido (N2). La descarga de las basidiosporas se realizó, a 25 °C. Se adhirió el píleo de los basidiocarpos untando vaselina a la superficie de la parte interna de la tapa de la caja petri, la base contenía 10 ml de la solución colectora (A) para concentrar el inóculo, placa recubierta en papel aluminio, al ser las basidiosporas fotosensibles. Agitador magnético en agitación por 24 horas a 50-60 rpm (Elmi DOS-20L Digital Orbital Shaker) y de esa manera obtener la mayor concentración posible de basidiosporas de los basidiocarpos (Suarez C., 1977).

La verificación de la viabilidad de las esporas recolectadas, colocando 4 gotas de la solución (A) en agar agua y en dos horas observar el proceso de germinación. Se estableció la concentración de basidiosporas de la solución mediante la Cámara de recuento Neubauer (Marienfeld-Superior -Germany-). La conservación en Nitrógeno Líquido (N2), se procedió a colocar la Solución A (Solución colectora) basidiosporas en viales 2 mL de capacidad,

para posteriormente ser conservadas en nitrógeno líquido (Thermolyne Bio-CaneTM 20) -320 °C (Frias G.A., 1987).

## 3.5.2. Caracterización morfológica de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal

Diámetro basal (medio) y la longitud de las "Escobas Secas" recolectadas de Ecotipos ubicados a diferentes altitudes. Mediante la utilización de un calibrador vernier se determinó en (cm) el diámetro basal medio y la longitud se midió en (cm) mediante la utilización de una regla.

### 3.5.2.1. Producción de esporóforos de *M. perniciosa* de los diferentes Ecotipos

**Diseño Experimental:** Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), generado por 12 tratamientos de 5 repeticiones cada uno con 2 unidades experimentales. Variable dependiente: Diámetro Basal (medio) E.B secas, Longitud E.B secas y Producción de Basidiocarpos.

**Cuadro 1.** Esquema del Análisis de Varianza

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---|---|
| Total | 59 |
| Tratamientos | 11 |
| Error | 48 |

Elaborado: Autor

### 3.5.2.2. Diámetro de los esporóforos de *M. perniciosa* de los diferentes Ecotipos

**Diseño Experimental.-** Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), generado por 12 tratamientos de 4 repeticiones cada uno.
Los datos se normalizaron (RAÍZ) para que estos tengan una distribución normal.

**Cuadro 2.** Esquema del Análisis de Varianza

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---|---|
| Total | 47 |
| Tratamientos | 11 |
| Error | 36 |

Elaborado: Autor

### 3.5.2.3. Producción de basidiosporas/ml, el ancho y longitud de las basidiosporas por basidiocarpo de los diferente Ecotipos de *M. perniciosa*

Producción de basidiosporas/ml por descarga de cada ecotipo a su distribución altitudinal del hongo *M. perniciosa*, se realizó en Cámara de recuento Neubauer (Marienfeld-Superior -Germany-), utilizando la metodología propuesta por Bastidas, (2011).

**Protocolo:**

- Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, y se coloca en posición horizontal sobre la mesa, en un lugar donde nos sea cómodo pipetear.
- Se introdujo una punta desechable en el extremo de la micropipeta,
- Se ajustó la micropipeta para succionar 10 µL del líquido contenedor de las basidiosporas. Generalmente este ajuste se realiza girando el botón del embolo para seleccionar el volumen deseado.
- Se introdujo la punta de la micropipeta en la muestra
- Se pulsa el pistón o embolo superior de la pipeta suavemente hasta que se siente como el pistón llega al final de su recorrido.
- Se saca la punta de la pipeta de la muestra, y siempre manteniéndola en posición vertical se lleva hasta la cámara de Neubauer.
- Se colocará la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer. Se trata de dejar que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad.
- Se suelta el pistón suavemente mientras se supervisa que el líquido está entrando correctamente y de forma uniforme en la cámara.

- En caso de que aparezcan burbujas, el cubreobjetos se haya movido o algo no haya salido bien, repetir la operación

**Conteo de basidiosporas**

Mediante un microscopio óptico bajo el lente BX20 y con la utilización de una cámara neubauer, se contó en el área de 0,20 x 0.20 mm y el número de cuadros a evaluar 5, para aplicar la siguiente formula, como se indica en la Figura 3.

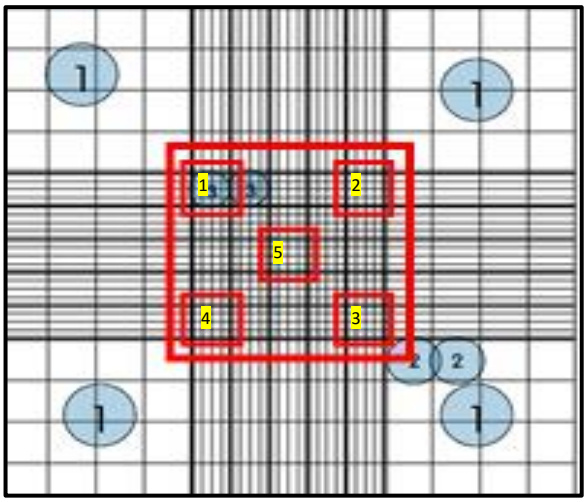


**Figura 3.** Cámara neubauer (Bastidas, 2011)

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la concentración de basidiosporas/ml (Celeromics, 2008). Los datos obtenidos se normalizaron con LOG 10, para estabilizar la variación de los grupos de datos.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total Células Contadas x 250.000}}{\text{Número de Cuadrados}}$$

### 3.5.2.3.1. Longitud y ancho de basidiosporas de los diferentes ecotipos de *M. perniciosa*

Mediante un microscopio óptico bajo el lente BX20 y la utilización del programa ISCapture Professional Imaging, se midió la longitud y ancho en µm de las basidiosporas de los diferentes ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal.

**Diseño Experimental:**

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), generado por 12 tratamientos de 4 repeticiones cada uno con 4 unidades experimentales.

Variable dependiente: basidiosporas/ml, alto y ancho de las basidiosporas.

**Cuadro 3.** Esquema del Análisis de Varianza

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---|---|
| Total | 47 |
| Tratamientos | 11 |
| Error | 36 |

Elaborado: Autor

### 3.5.3. Caracterización molecular de ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador

#### 3.5.3.1. Extracción de ADN de los diferentes Ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal

Las extracciones de ADN, se efectuó de basidiocarpos frescos antes de la esporulación, producidos en el umbráculo construido en el invernadero del Laboratorio del Programa de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal De Quevedo. Por medio del Quick-StartProtocol siguiendo las instrucciones del fabricante y se comprobó la calidad del ADN, poniendo 2 µl de ADN y 1 µl del Tampón de carga de gel BlueJuice (10X), en un gel de agarosa al 1.5 %.

#### 3.5.3.2. Amplificación y recuperación de fragmentos ITS

La amplificación de bandas se realizó mediante la técnica molecular PCR, tomando como molde el ADNg extraído previamente de los 12 ecotipos de *M. perniciosa*. Se empleó los primer ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G->3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC->3') universales (White & Taylor J., 1990). Que amplifica una región específica de la subunidad ribosomal 8.5S. El volumen final de cada reacción de PCR fue de 20 µl y contiene 4 µL de Thermo Scientific DreamTaq Green Buffer (10X), 1 µL de DNTP`s,

1 µl / Cada primer, 0.14 µL de Thermo Scientific DreamTaq DNA Polymerase, 3 µl de ADN, 9.86 µl de H2O.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne FTC41H2D) adhiriendo 10 µL de aceite mineral en cada tubo de PCR, utilizando el siguiente programa: 95ºC por 5 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95ºC, por 1 minuto a 60ºC, por 1 minuto a 72ºC, una elongación final de 72ºC por 6 minutos y a 4°C por 5 minutos (Osorio S. *et al.*, 2012). Los productos de amplificación se separaron por electroforesis (ENDURO™ 300V power supply) a 90 voltios por 1:30 horas/min, en gel de agarosa al 2%, haciendo uso de buffer TAE 1x [Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0,5M].

Se realizó cortes de bandas del producto amplificado de los ecotipos y se purificó empleando el kit Invitrogen PureLink™. (GERMANY), el producto obtenido se envió a secuenciar a Macrogen, las secuencias nucleotídicas se analizaron mediante el programa Mega para generar el árbol filogénico y mediante Blast en www.ncbi.nlm.nih.gov se comparó las secuencias de los ecotipos a la base de datos de NCBI.

#### 3.5.3.3. ERIC-PCR perfiles de huellas dactilares

Se utilizó para medir similitud genética entre los 12 aislamientos de *M. perniciosa*. Cada una de las bandas con diferente movilidad electroforética se le asignó un número y una puntuación de 1 o 0 en función de la presencia o ausencia de la banda y mediante el software Mega6 se realizó un Árbol Filogenético. El protocolo de ERIC-PCR se llevó a cabo como describen Louws *et al.*, (1994) con algunas modificaciones. Cada 20 µL contiene: 1 µL de los dos primers opuestos

- ERIC1R (5′ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3′)
- ERIC2 (5′AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3′)

2 µL de ADN genómico, 1.5 µL de DNTP, 0.3 µL de Thermo Scientific DreamTaq DNA Polymerase, 9.2 µL de H2O y 5 µL de Thermo Scientific DreamTaq Green Buffer (10X).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne FTC41H2D) adhiriendo 10 µL de aceite mineral en cada tubito de PCR, utilizando el siguiente programa: 94ºC por 3 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94ºC, por 2 minuto a

37ºC, por 2 minuto a 72ºC, una elongación final de 72ºC por 7 minutos y a 4°C por 5 minutos. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis (ENDURO™ 300V power supply) a 60 voltios por 5:30 horas/min, en gel de agarosa al 2.5%, haciendo uso de buffer TAE 1x [Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0,5M].

## 3.6. Analizar el grado de severidad de infección de *M. perniciosa* al estado fisiológico de cacao nacional EET-19

### 3.6.1. Estado fisiológico en EET-19 al grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa*

La descongelación de las basidiosporas se realizó mediante calor corporal. Una vez descongelado el inóculo se reduce la concentración de Glicerol del 16 al 3% para conseguir la germinación, lográndose esto con el uso de la solución B y solución C.

#### 3.6.1.1. Conteo de basidiosporas

Mediante un microscopio óptico bajo el lente BX20 y la utilización de una cámara neubauer, se contó en el área de 1 x 1 mm y el número de cuadros a evaluar 5, para aplicar la siguiente formula, como se indica en la Figura 4.

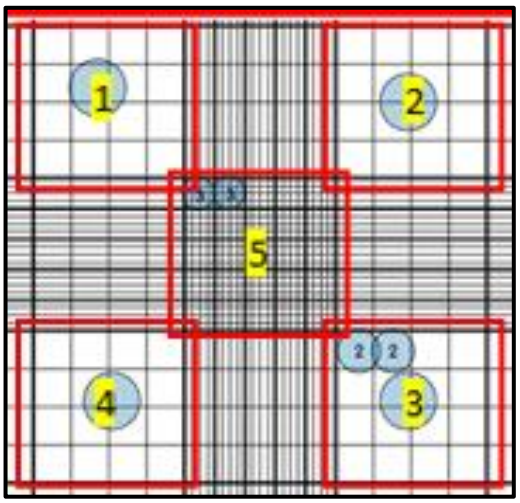


**Figura 4.** Cámara neubauer (Bastidas, 2011)

Se utilizó la siguiente fórmula propuestas por Celeromics, (2008) para calcular la concentración de basidiosporas/ml.

$$\textbf{Concentración} = \frac{\text{Total Células Contadas x } 10.000}{\text{Número de Cuadrados}}$$

#### 3.6.1.1.1. Calculó del número de basidiosporas en la suspensión original

**Xn** = % de germinación x concentración.

#### 3.6.1.1.2. Cantidad de solución A (esporas – inóculo)

$$\boldsymbol{Sol.A} = \frac{Xci \times CD}{Xn}$$

**Xci:** Cantidad de inóculo deseado

**CD:** Concentración deseada.

**Xn:** Número de esporas / ml en la suspensión original.

#### 3.6.1.1.3. Cantidad de solución B (diluyente)

$$\boldsymbol{Sol.B} = Xsa \times 5.33$$

**Xsa**: Cantidad de solución A

**5.33:** Coeficiente de dilución

#### 3.6.1.1.4. Cantidad de solución C (diluyente)

$$\mathbf{Sol.C} = \text{Xci} - (\text{Xsa} + \text{Xsb})$$

**Xc**i: Cantidad de inóculo deseado

**Xsa:** Cantidad de solución A.

**Xsb:** Cantidad de solución B.

Se realizó la mezcla de solución B en una bureta, dispensándose gota a gota (aproximadamente 35 a 45 gotas / minuto) sobre la solución C ubicada en un matraz en agitación por 10 minutos. Se colectó la mezcla de las Soluciones B y solución C, y se colocó nuevamente en la bureta para ir dispensando gota a gota (aproximadamente 35 a 45 gotas/minutos) sobre la solución A que contiene a las basidiosporas, contenida en otro matraz estéril forrado de papel en constante agitación.

### 3.6.1.2. Inoculación de semillas pre-germinadas de EET-19 *T. cacao* mediante basidiosporas de los 12 ecotipos de *M. perniciosa,* para la medición del grado de severidad del patógeno

Las semillas de EET-19 *T. cacao* para la realización del experimento, se adquirieron en la colección de clones de cacao de la Finca Experimental La María De La Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), fueron elegidas para representar el grado de severidad del patógeno, en términos de formación de síntomas producidos por los ecotipos de *M. perniciosa*.

- EET-19 Tipo nacional (criollo) en el cual se producen escobas medianas a grandes pero relativamente pocas escobas de cojinetes florales infectados (Suarez C., 1977).

#### 3.6.1.2.1. Método de Inoculación

Se aplicó la metodología propuesta por Suarez C. *et al.*, (2006) & Suarez C., (1977), se removió la testa y el mucílago de semillas de libre polinización de cacao EET-19, se colocaron a germinar en cámaras húmedas por 4 días, dentro de cajas petri de vidrio (150 x 30 mm) sobre papel absorbente estéril y humedecido con agua destilada. La inoculación consiste en asperjar la solución de basidiosporas de *M. perniciosa* sobre las semillas pregerminadas empleando un atomizador de Villbiss, rociando aproximadamente 1 ml/plántula con la suspensión de 55000 basidiosporas/ml de concentración del inoculo, luego de pasar un proceso de incubación, se procedió a sembrarlas en vasos plásticos con sustrato (tierra negra cernida + turba Biolan).

#### 3.6.1.2.2. Ambiente en la inoculación

Frias G.A, (1987) & Frias G.A. *et al.*, (1991) “sugieren mantener las plántulas y semillas inoculadas en una cámara húmeda bajo condiciones de 24 – 28 °C y 100% de humedad relativa, manteniendo la superficie de la hoja húmeda asegurando máxima germinación y penetración del tubo germinativo”. Surujdeo M. *et al.*, 2003) “a su vez recomienda largos tiempos de inoculación (> 48 horas), para evitar el escape, incluso con genotipos susceptibles”.

**Diseño Experimental:** Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), generado por 13 tratamientos de 3 repeticiones cada uno con 2 unidades experimentales.

**Cuadro 4.** Esquema del Análisis de Varianza

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---|---|
| Total | 38 |
| Tratamientos | 12 |
| Error | 26 |

Elaborado: Autor

**Variables dependientes:**

- **Periodo de Incubación**

  Esta variable se registró diariamente a partir de los 8 días después de la incubación y se determinó como el tiempo promedio transcurrido entre la inoculación y el aparecimiento del primer signo de la enfermedad. El cual fue expresado en días después de la inoculación.

- **Diámetro basal del Hipocótilo y Epicótilo de las plántulas**

  Esta variable se registró semanalmente a partir de los 14 días después de la inoculación, mediante un calibrador vernier.

- **Diámetro basal de la escoba (DB)**

  La lectura de esta variable se realizó midiendo con un calibrador Vernier la parte más ancha del tejido hipertrofiado y se expresara en centímetros.

- **Longitud de la escoba (LE)**

  Esta variable se evaluó utilizando una regla y se midió la longitud del tejido enfermo y se expresó en centímetros.

- **Número de brotes en el tejido afectado (Escobas Vegetativas)**

Esta variable se registró contando el número de Escobas vegetativas producidos por *M. perniciosa* en las plántulas. Los datos se normalizaron (Raíz) para asegurar que estos tengan una distribución normal.

- **Porcentaje de Inhibición del peso fresco radicular de las plántulas inoculadas**

Esta variable se verifico pesando en una balanza electrónica digital (3000 gr x 5 gr, marca ohaus) el peso fresco radicular cortado desde la inserción del nudo cotiledonal, luego mediante la fórmula del %inhibición, se verifico el poder de infección de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador.

$$\%\ \boldsymbol{inhibición} = \frac{crecimiento\ del\ testigo\ (gr) - \ crecimiento\ del\ tratamiento(gr)}{\text{crecimiento del testigo (gr)}} * 100$$

## 3.7. Evaluar el efecto de la aplicación de PGPR como antagonista en condiciones *in vitro*

### 3.7.1. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento (PGPRs')

- *Pseudomonas protegens, cepa CHA0*
- *Pseudomonas veroni, cepa R4*
- *Bacillus subtilis, cepa ATCC 55405*
- *Enterobacter asburiae, Fuente PM3-14, cepa ZJB-LLJ*
- *Acinetobacter calcoaceticus, Fuente BMR2-12, cepa NIPH2168*
- *Serratia marcescens, Fuente PM3-8, cepa LPK411*

### 3.7.2. Obtención de sobrenadantes de las PGPRs' con actividad proteolítica

Las bacterias fueron obtenidas del banco de cepas del laboratorio de microbiología y biotecnología molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo almacenadas a -40

°C, se reactivaron poniendo 15 µl de las bacterias en 50 ml del medio King B líquido (Peptona 20gr, fosfato de potasio 1.5gr, sulfato de magnesio 1.5gr, glicerol 15ml/ 1L), sobre un agitador magnético (Elmi DOS-20L Digital Orbital Shaker) a 150 rpm por 48 h, se centrifugó en tubos falcon de 15 ml a 300 x g por 3 min. Se recuperara el sobrenadante descartando el pellet, por triplicado. El sobrenadante se ubicó en tubos eppendorf de 1,5 ml para otro proceso de centrifugación a 10 x g por 3 min. Las muestras se filtraron empleando Nalgene Syringe de 0.2 µm y posteriormente se sometieron a un choque térmico de 15 mina 90ºC y 15 min a -40ºC (dirección técnica por el coordinador del proyecto Dr. H. Canchignia, 2017).

#### 3.7.2.1. Ensayo antagonista

Con los sobrenadantes obtenidos de las bacterias en el porcentaje de germinación y el porcentaje de inhibición del germinal de las basidiosporas de *M. perniciosa*. Dentro de una cabina de flujo laminar vertical (BIOBASE), se colocó en la base de una caja petri 9.8 ml de agar al 2 % y con movimientos suaves se disemino 0.2 ml de cada sobrenadante de las 6 bacterias usando una Asa de DIGRALSKY estéril, los ensayos antagónicos se realizaron al 15 % y evaluados a las 24 h después de la inoculación de una concentración de 100000 basidiosporas/mL, se colocó 20 µl de la solución en la placa Petri y mediante un asa de DIGRALSKY con movimientos suaves de disemino.

Se incubaron las placas a 27°C y se evaluó a las 24 horas la germinación de las basidiosporas. En la base de la caja Petri se adhirió una hoja de acetato milimetrada (5 mm), para efectuar el conteo de las basidiosporas germinadas. El porcentaje de germinación se determinó contando 10 basidiosporas por cada 0.5 $cm^2$ en el microscopio óptico bajo el lente BX10 y BX20 y mediante un microscopio óptico bajo el lente BX20 y la utilización del programa ISCapture Professional Imaging, se midió la longitud en µm del tubo germinal de las basidiosporas.

**Diseño Experimental:**

Estará generado por 7 tratamientos de 3 repeticiones cada uno con 6 unidades experimentales.

**Cuadro 5.** Esquema del Análisis de Varianza

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---|---|
| Total | 20 |
| Tratamientos | 6 |
| Error | 14 |

Elaborado: Autor

**Variables dependientes:**

- **Germinación**

Se registró el número de esporas de *M. perniciosa* germinadas y se calculara el porcentaje de germinación por el efecto antagonista de los sobrenadantes de las PGPRs', como el número de esporas germinadas multiplicado por cien y dividido para el número total de esporas (germinadas y no germinadas).

$$\% \textbf{ Germinación}: \frac{N°.de\ Esporas\ germinadas}{\text{N°.Total de Esporas}}\ x\ 100$$

- **Inhibición del crecimiento del tubo germinal de las basidiosporas**

Se registró el efecto antagonista de las PGPR en la longitud en μm a las 24 y 48 h del tubo germinal de las basidiosporas.

## 3.8. Materiales y Equipos

### 3.8.1. Material de laboratorio

- Puntas amarillas 5-200 µl. Pk/1000
- Papel toalla
- Microtubos 1.5 ml. Pk/1000
- Puntas azules 1000 µl. Pk/1000
- Tubo PCR individual 0.2 ml. Cs/1000.
- Cajas petri
- Botella Para Esterilización De 500 Ml
- Guantes quirúrgicos talla M
- Vasos de precipitación
- Papel Parafil
- Papel aluminio
- Juego de micro-pipetas (5 unidades: 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 5 µl, 2 µl)
- Kit de extracción de ADN, PureLink® Genomic DNA.
- Kit de purificación de PCR Invitrogen

### 3.8.2. Material de oficina

- Cuaderno
- Computador
- Lapiceros
- USB prendrive

### 3.8.3. Equipos de Laboratorio

- Nevera de -20 °C
- Balanza 0.001 g
- Termociclador
- Campana extractora de gases

- Cámara fotográfica
- UV transiluminador
- Baño María
- Centrífuga
- Congelador -40 °C
- Vortex
- Caja electroforética
- Horno Microondas
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Agitador
- Estufa
- Destilador de agua
- Microscopio

### 3.8.4. Reactivos

- PDA (Papa Dextrosa Agar)
- King B
- Agar
- Buffer 10x
- Blue Juice
- Dream Taq Pol
- Bromuro de Etidio
- Partidores (ITS1; ITS4)
- DNTPs
- Glicerol
- Buffer MES
- Alcohol 99 (40 L)
- Agua ultra pura libre de Rnasa (1000 ml)
- Agarosa (50g)
- Peptona (1000 g)

# CAPÍTULO IV

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

# 4. Resultados y Discusión

## 4.1. Generación de un banco de ecotipos de *M. perniciosa* y su caracterización morfológica y molecular

### 4.1.1. Banco de cepas de ecotipos de *M. perniciosa* de pisos altitudinales de *T. cacao*

Del muestreo de tejidos infectados por *M. perniciosa* procedentes de los distintos pisos altitudinales, se generó un banco de germoplasma con una colección de 10 unidades de tejidos infectados por cada ecotipo de plantaciones de cacao. Las muestras fueron georreferenciadas y codificando los tejidos infectados de acuerdo a su procedencia (Cuadro 6). En la Figura 5 se ilustra el mapa del Ecuador y los sitios con puntos muestran los doce Ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador.

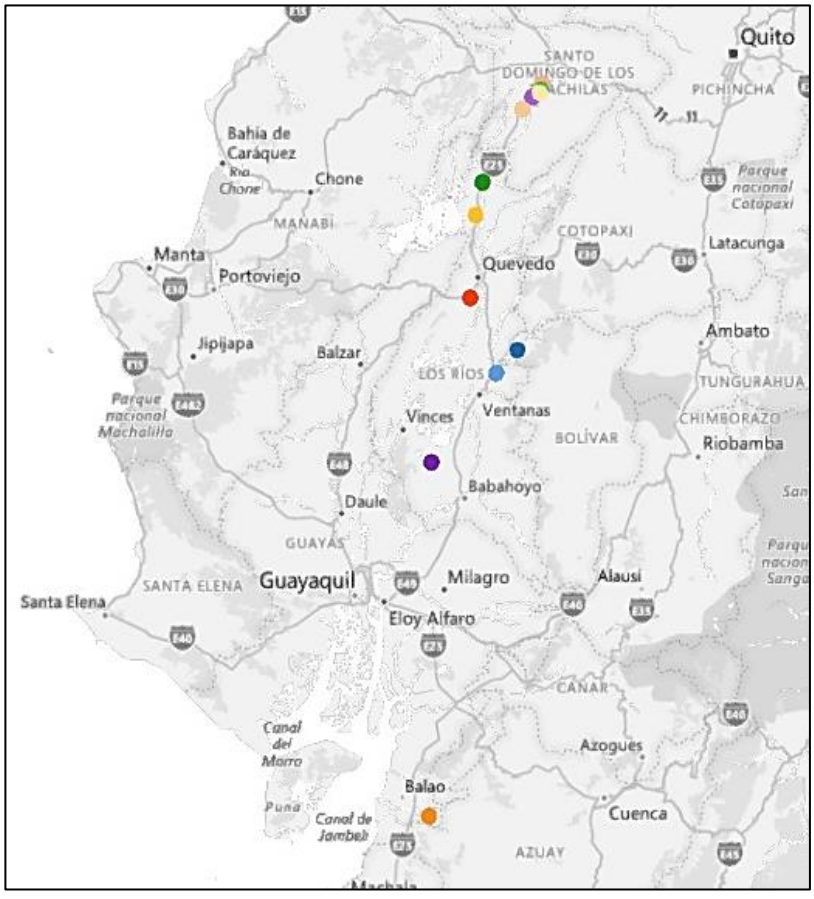



**Figura 5.** S**e ilustra con un punto de color los ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal en el Ecuador**.

**Cuadro 6:** Codificación de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador.

| | | | | | | | Temperatura °C (Promedio del 2001-2010 y Semanal 2018) | | Humedad relativa % (Promedio del 2001-2010 y Semanal 2018) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Piso** | **Rango** | **Altura (m.s.n.m)** | **Código** | **Coordenada** | **Cantón** | **Provincia** | **Max** | **Min** | |
| **1** | 0-100 | 8 | MpLRBA-101 | 1°40'40.4"S 79°38'37.4"W | Baba | Los Ríos | 29,62 | 22,24 | 79,76 |
| | | 32 | MpLRVE-102 | 1°21'22.4"S 79°24'04.0"W | Ventanas | Los Ríos | 27,33 | 20,10 | 80,48 |
| | | 74 | MpLRMO-103 | 1°05'04.5"S 79°29'54.5"W | Mocache | Los Ríos | 29,46 | 21,33 | 77,53 |
| **2** | 100-200 | 80 | MpGUBA-104 | 2°57'9"S 79°39'11"W | Balao | Guayas | 29,70 | 22,70 | 84,02 |
| | | 117 | MpLRBF-105 | 0°47'11.0"S 79°28'44.7"W | Buena Fe | Los Ríos | 29,18 | 21,25 | 80,39 |
| | | 140 | MpLRBF-106 | 0°40'03.6"S 79°27'08.3"W | Buena Fe | Los Ríos | 29,46 | 25,47 | 77,53 |
| **3** | 200-400 | 193 | MpBOLN-107 | 1°16'20.5"S 79°19'20.7"W | Las Naves | Bolívar | 20,68 | 12,12 | 83,25 |
| | | 299 | MpSDSD-108 | 0°24'18.0"S 79°18'10.0"W | Sto. Domingo | Santo Domingo de los Tsáchilas | 27,93 | 21,78 | 85,22 |
| | | 358 | MpSDSD-109 | 0°21'38.3"S 79°15'55.1"W | Sto. Domingo | Santo Domingo de los Tsáchilas | 28,17 | 21,33 | 83,56 |
| **4** | 400-500 | 455 | MpSDSD-110 | 0°20'40.4"S 79°14'18.7"W | Sto. Domingo | Santo Domingo de los Tsáchilas | 28,14 | 21,57 | 84,51 |
| | | 470 | MpSDSD-111 | 0°19'59.3"S 79°14'10.2"W | Sto. Domingo | Santo Domingo de los Tsáchilas | 28,43 | 20,64 | 80,94 |
| | | 518 | MpSDSD-112 | 0°18'46.1"S 79°13'43.5"W | Sto. Domingo | Santo Domingo de los Tsáchilas | 27,79 | 20,38 | 85,79 |

**Fuente:** Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (**INAMHI**)

## 4.1.2. Caracterización morfológica de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador

### 4.1.2.1. Diámetro basal medio de escobas secas recolectadas

El diámetro basal medio de las escobas secas de los doce ecotipos reveló que la hipertrofia del tejido seco es variable dependiendo del ecotipo. En la Figura 6 se aprecia que la cepa MpGUBA-104 presento un promedio de Ø 0.95 cm, siendo el de mayor diámetro de hipertrofia en los tejidos recolectados, seguida de las cepas MpLRBA-101 y MpLRMO-103, ambas con un promedio de Ø 0.85 cm.

Las cepas que presentaron menor diámetro de hipertrofia en los tejidos fueron MpLRBF-105 y MpBOLN-107, con Ø 0.67 y 0.66 cm.

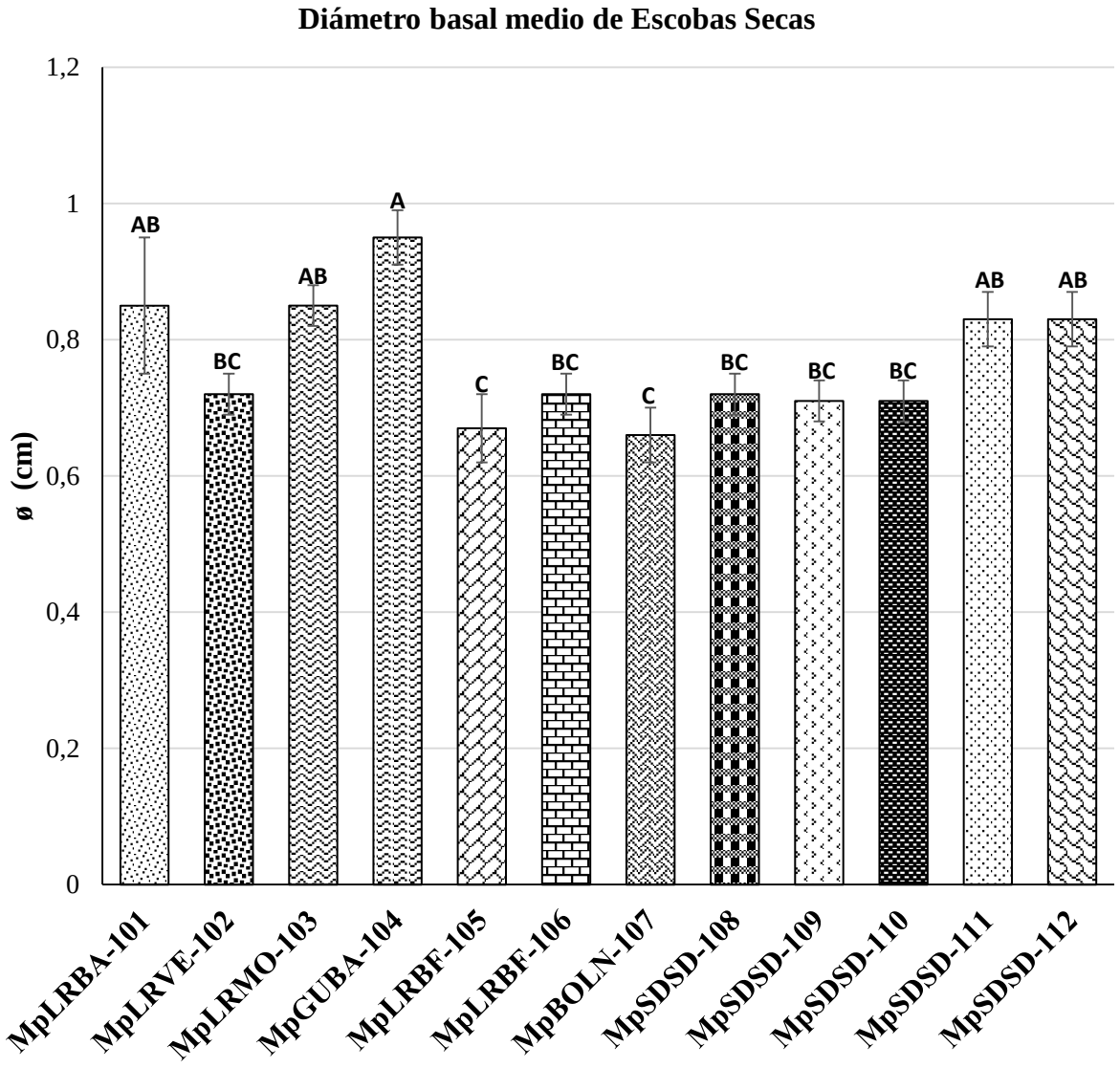



**Figura 6.- Diámetro basal medio de escobas secas recolectadas**, Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a p<0.05 (test de Duncan).

### 4.1.2.2. Longitud de escobas secas recolectadas

La medición de longitud de las escobas secas recolectados, reveló variabilidad en el tamaño de los tejidos infectados por *M. perniciosa* dependiendo el ecotipo, en la Figura 7 se observa que la cepa MpSDSD-110, obtuvo el mayor promedio de longitud con 33.78 cm, seguida de las cepas MpGUBA-104 y MpSDSD-111 con 30.80 y 29.90 cm de longitud.

Las cepas que presentaron el menor promedio de longitud en las escobas secas son MpSDSD-109 y MpLRVE-102, con 21.88 y 21.43 cm.

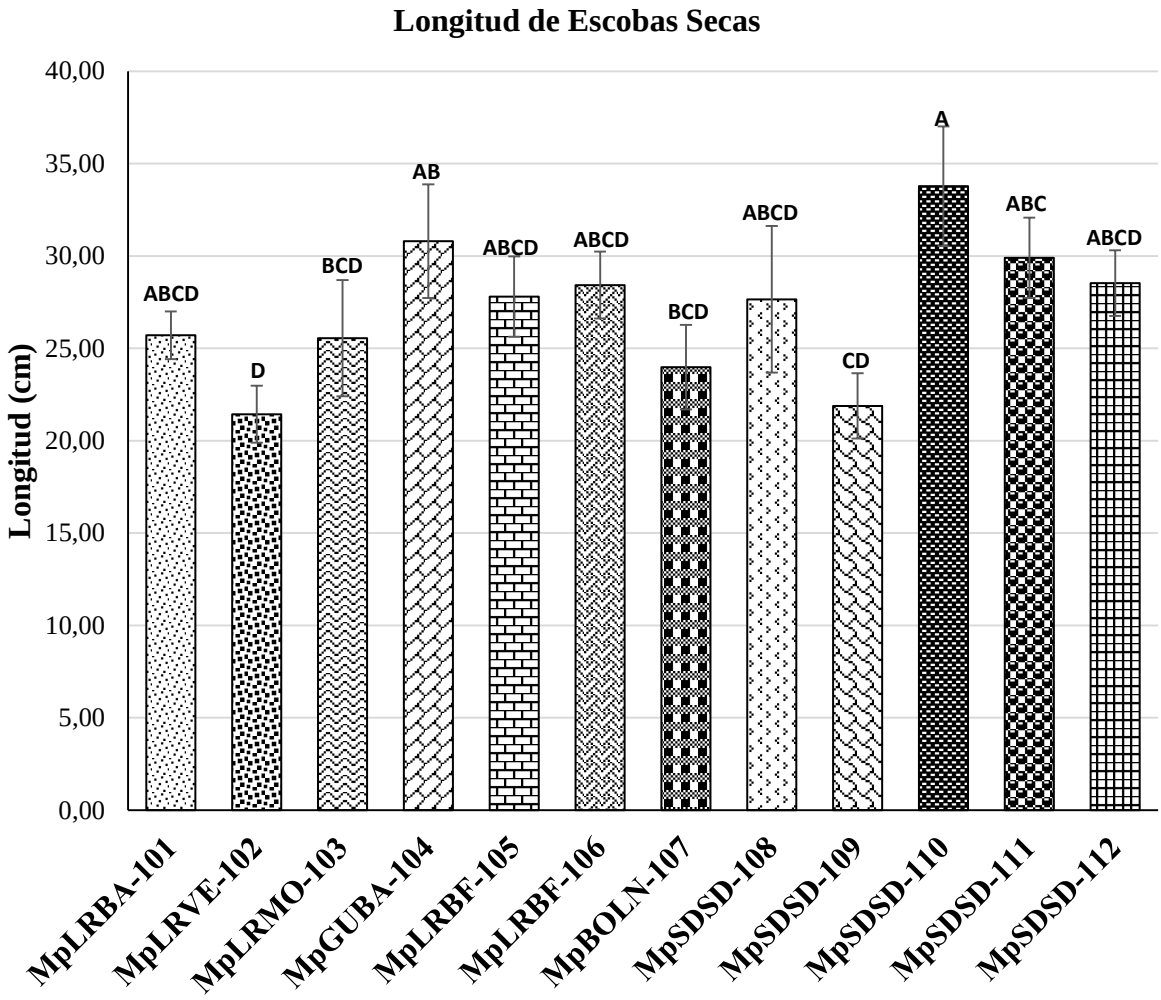



**Figura 7.- Longitud de escobas secas recolectadas**, Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Duncan).

### 4.1.2.3. Producción de esporóforos en "escobas secas"

Se registró la producción de esporóforos por un periodo de doce meses (de enero hasta diciembre del 2017) simulando las condiciones óptimas para la producción de esporóforos (Figura 8).

En la Figura 9 se observó variabilidad en la producción de esporóforos donde la cepa MpSDSD-112 se verifica la mayor cantidad de cuerpos fructíferos por escoba, con un promedio de 24 esporóforos/escoba, seguida de las cepas MpBOLN-107 y MpLRMO-102, con un promedio de 22 y 16 esporóforos/escoba. Las cepas de menor producción de cuerpos fructíferos por escoba seca son MpSDSD-111 y MpLRBA-101, con 11 y 8 esporóforos/escoba.

**Figura 8.- Ilustración de esporóforos o basidiocarpos** en escobas secas de los ecotipos de *M. perniciosa.* Fotografías obtenidas por el autor.

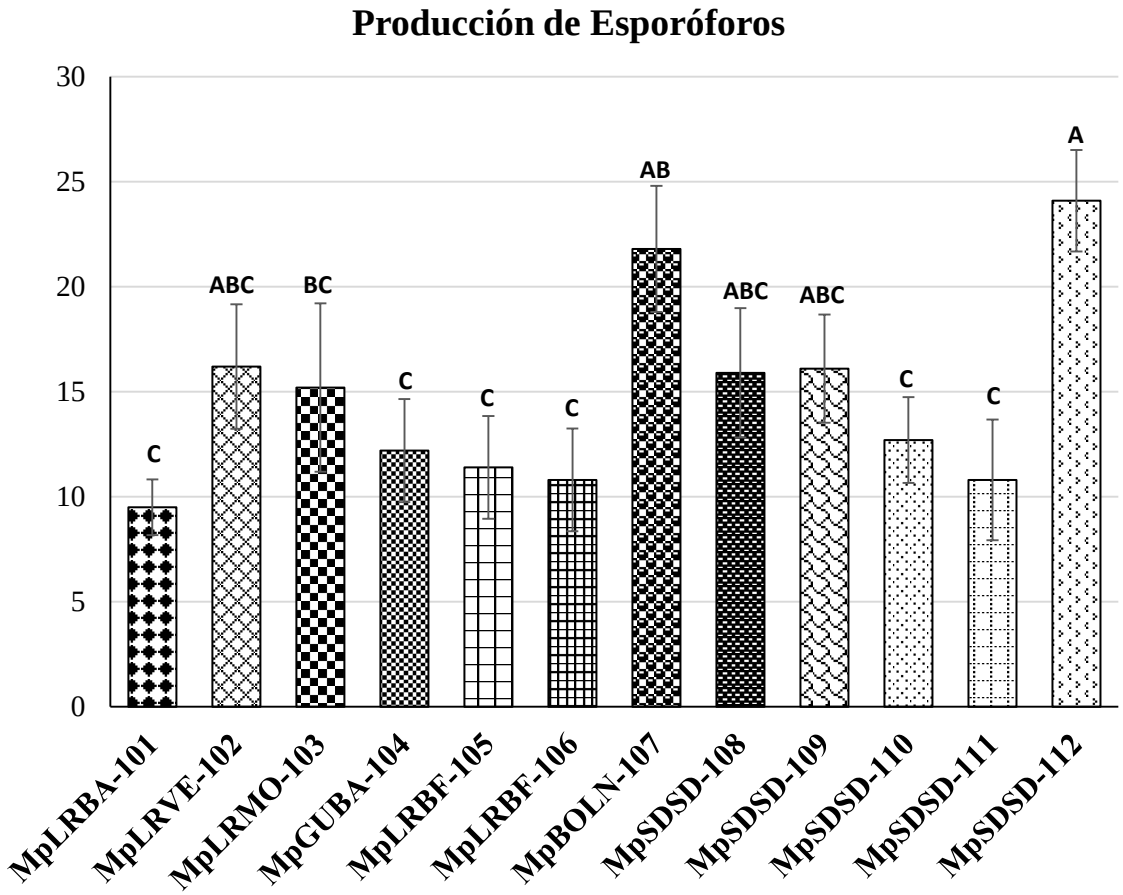



**Figura 9.- Producción de esporóforos en "escobas secas",** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Duncan).

### 4.1.2.4. Producción de Basidiosporas por mL de *M. perniciosa*

La producción de basidiosporas producidas por los basidiocarpos de los 12 ecotipos de *M. perniciosa*. La cepa MpLRBF-105 presento la mayor concentración con 6.75 Basidiosporas/mL, seguido por las cepas MpBOLN-107 y MpLRBA-101, con una concentración de 6.51 y 6.38 Basidiosporas/mL. Las cepas que presentaron menor concentración de Basidiosporas/mL fueron MpSDSD-110 y MpSDSD-109, con 5.99 y 5.94 Basidiosporas/mL (Figura 10). En la Figura 11, conteo de basidiosporas en Cámara Neubauer de los doce ecotipos de *M. perniciosa.*

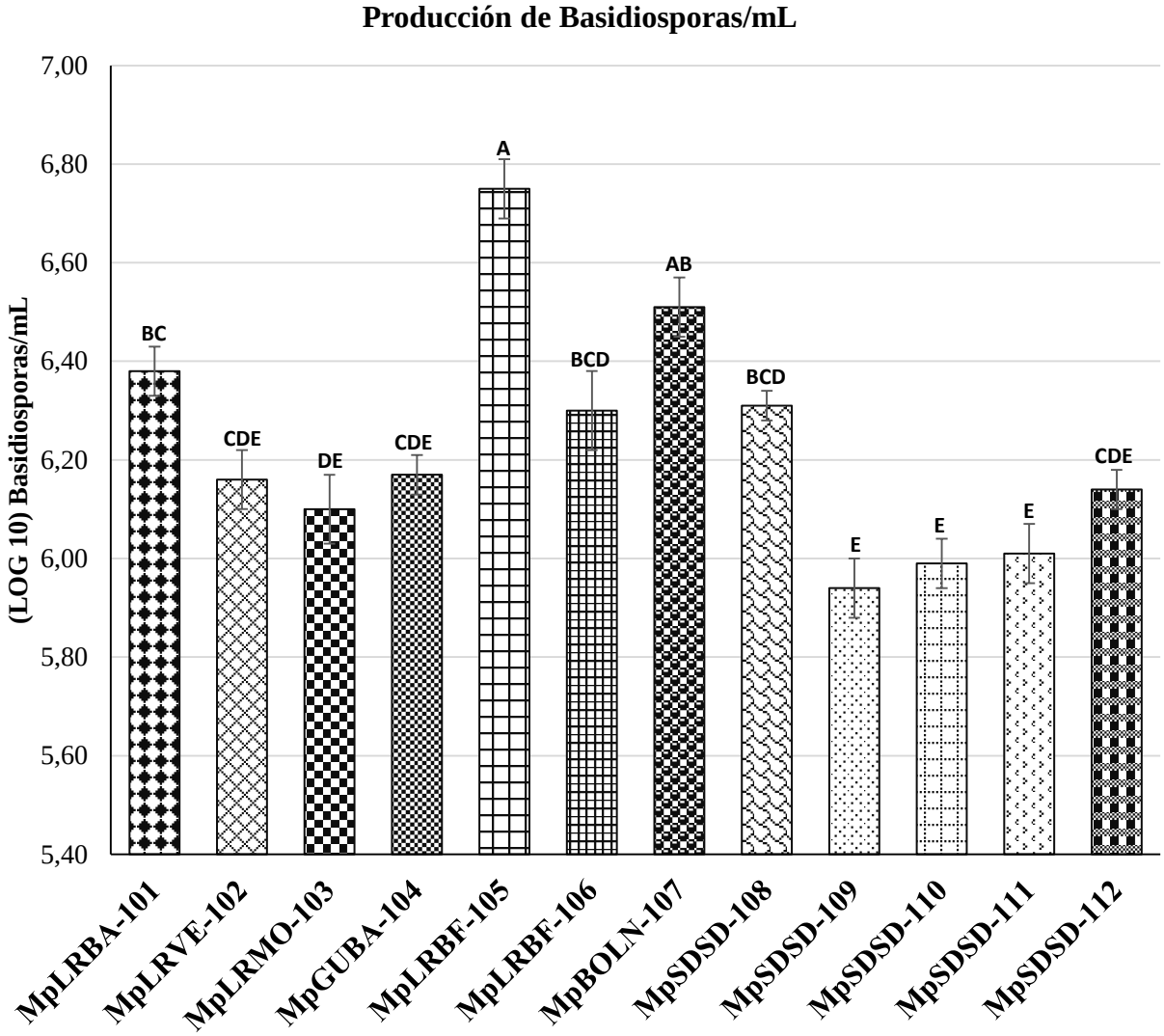



**Figura 10.- Producción de Basidiosporas/mL de los ecotipos de *M. perniciosa***, Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Tukey).

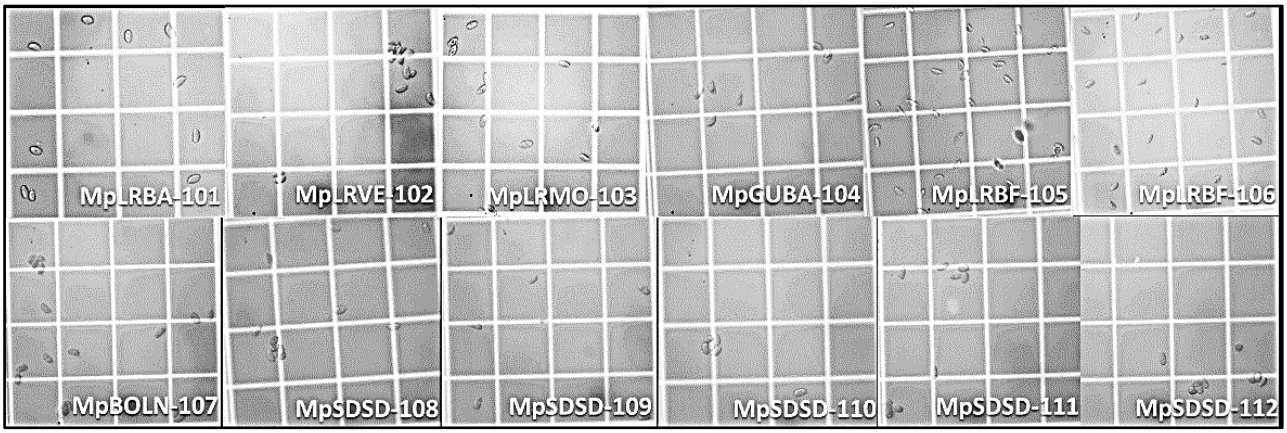



**Figura 11.- Ilustración de la concentración de Basidiosporas/mL en cámara neubauer,** de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador.

### 4.1.2.5. Diámetro de los esporóforos de *M. perniciosa*

El diámetro de los basidiocarpos de los doce ecotipos revela variabilidad en el tamaño (Figura 13). Se verificó la cepa MpLRBF-105 presenta los esporóforos de mayor diámetro con Ø 1.75 cm. Seguida de las cepas MpSDSD-108 y MpBOLN-107, con Ø 1.60 y 1.50 cm. Los ecotipos que mostraron el menor diámetro en los esporóforos, son las cepas MpSDSD-111 y MpSDSD-109, con Ø 1.29 y 1.28 cm de diámetro (Figura 12).

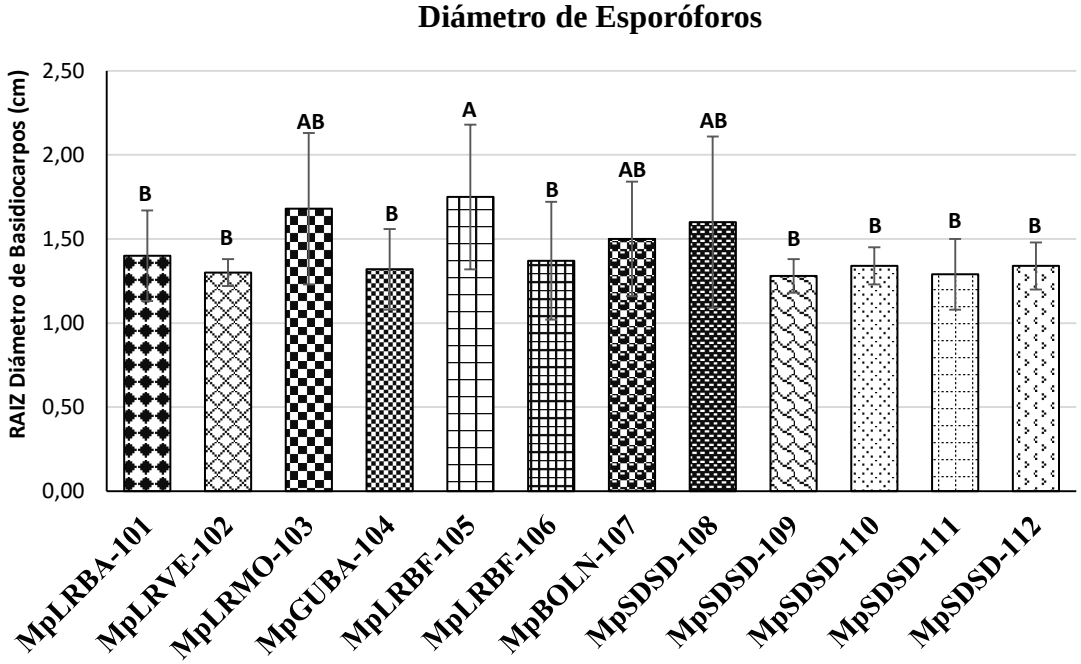



**Figura 12.- Diámetro de los esporóforos de *M. perniciosa***, Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a p<0.05 (test de Duncan).

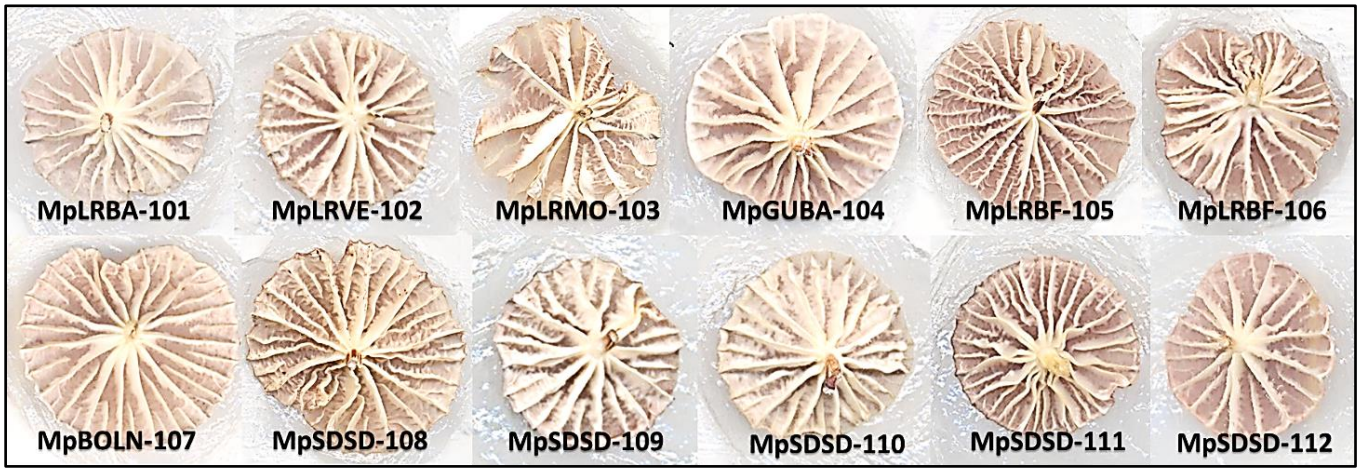



**Figura 13.- Ilustración de los esporóforos donde se verifico el diámetro (cm),** de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador.

### 4.1.2.6. Longitud de Basidiosporas (µm) de *M. perniciosa*

En longitud de basidiosporas se aprecia que la cepa MpGUBA-104, presento el mayor promedio de longitud en las basidiosporas con 12.09 µm. Seguida de las cepas MpBOLN-107 y MpLRBA-101, con una longitud de 11.80 y 11.79 µm. Las basidiosporas con menor longitud son de las cepas MpSDSD-108 y MpLRBF-106, con 11.11 y 10.94 µm (Figura 14).

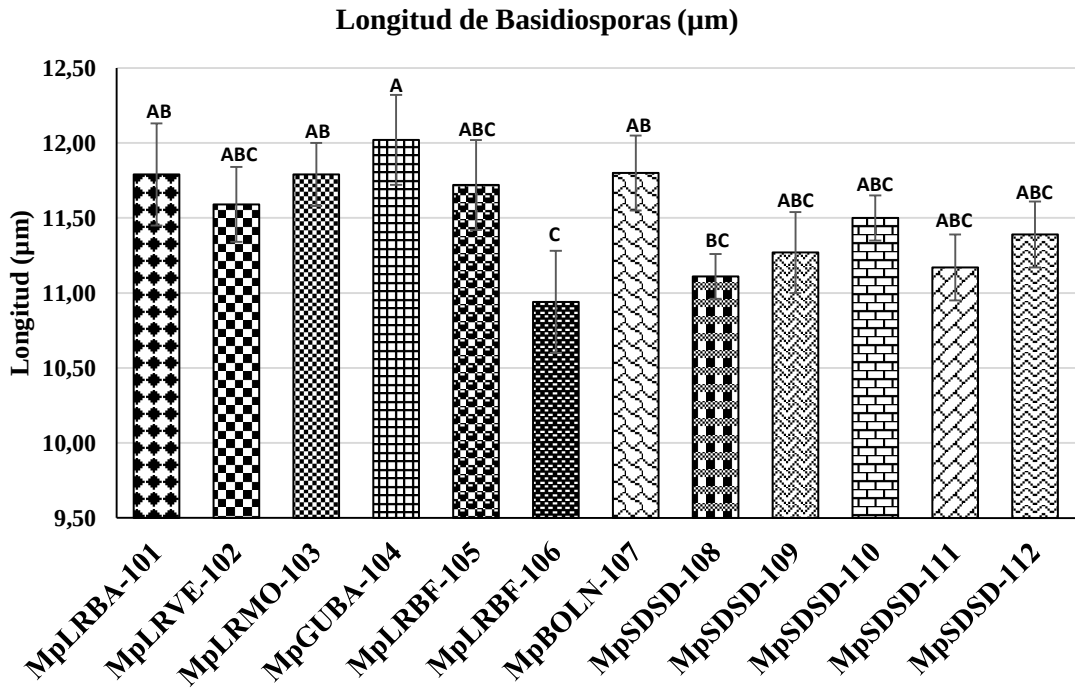



**Figura 14.- Longitud µm de las basidiosporas de los diferentes ecotipos de *M. perniciosa***, Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Duncan).

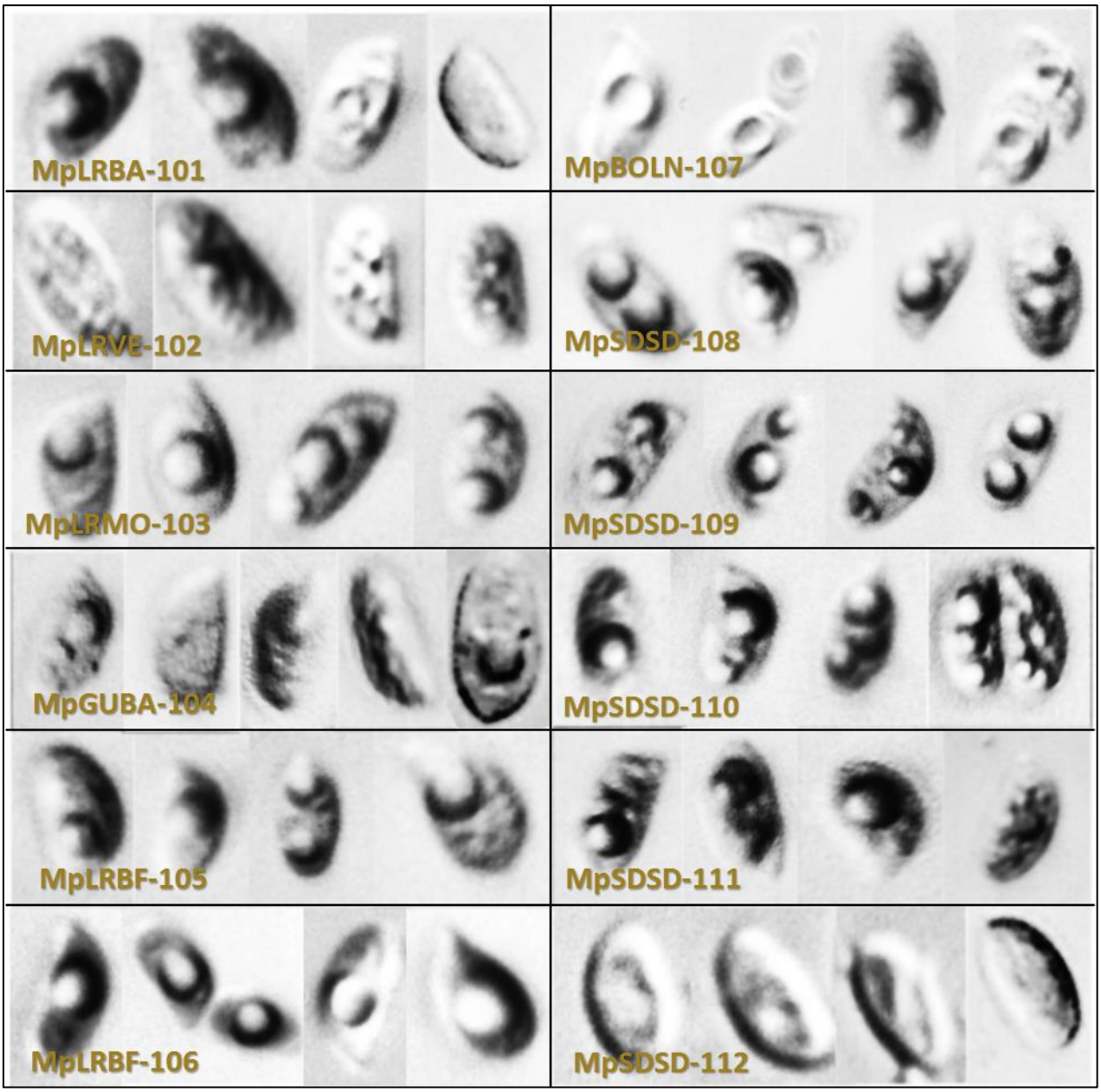



**Figura 15.- Ilustración de basidiosporas BX100 de los ecotipos de *M. perniciosa*,** las basidiosporas son estructuras hialinas y ovales, se aprecia variabilidad en la longitud, ancho y forma de las basidiosporas de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador.

### 4.1.2.7. Ancho de Basidiosporas (µm) de *M. perniciosa*

Se observó una estrecha variabilidad en el ancho de las basidiosporas de los doce ecotipos de *M. perniciosa*, la cepa MpLRBA-101 presento basidiosporas con el mayor ancho 6.24 µm, seguida por las cepas MpLRBF-105 y MpSDSD-109, con un promedio 6.10 y 6.05 µm. La cepa que presento el menor promedio del ancho de las basidiosporas MpLRBF-106 con 5.51 µm.

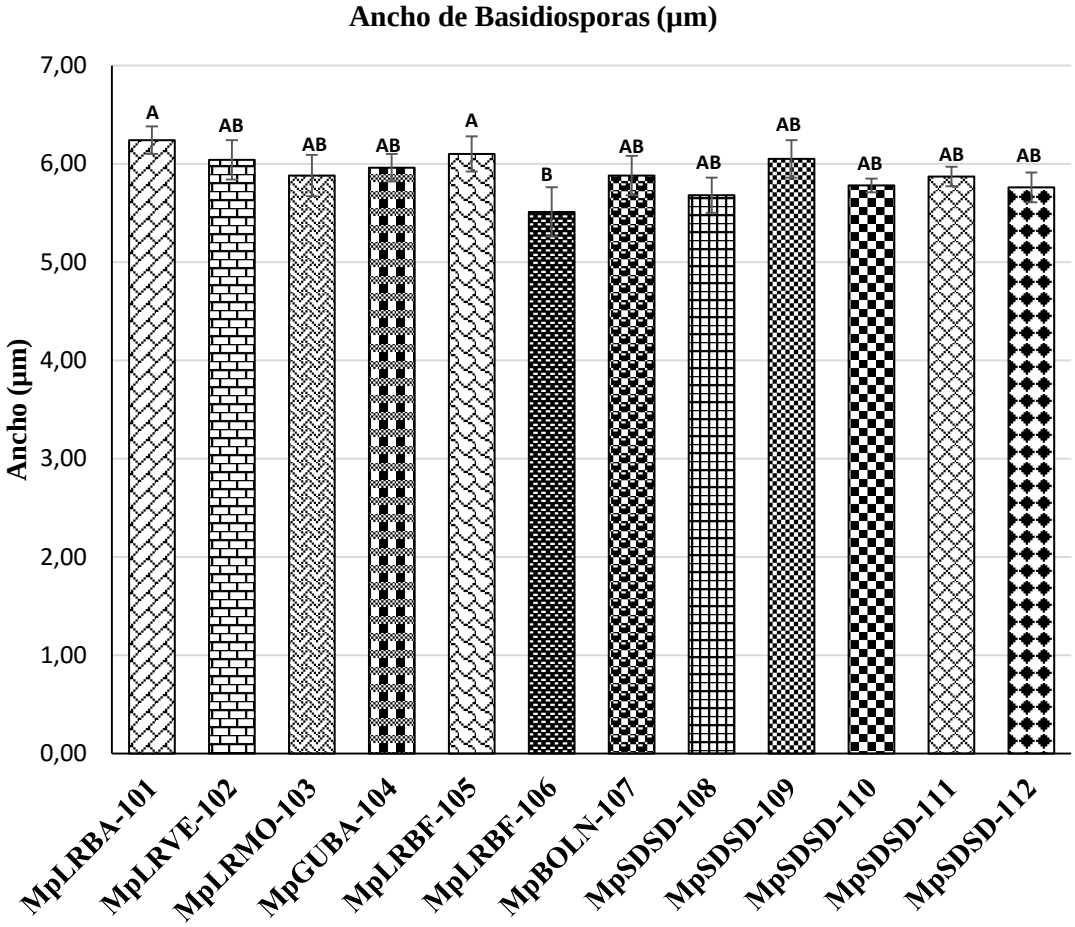



**Figura 16.- Ancho µm de las basidiosporas de ecotipos de *M. perniciosa***, Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a p<0.05 (test de Duncan).

## 4.1.3. Caracterización molecular de los ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador

### 4.1.3.1. Extracción de ADN de los diferentes Ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal y la amplificación y recuperación de fragmentos ITS

De los doce ecotipos de *M. perniciosa* de cultivares endémicos de *T. cacao*, amplificando la región ITS que contiene las secuencias (ITS1, ITS2 y 5.8S). El perfil electroforético muestra el bandeo obtenido después de la amplificación del fragmento ITS que demostró diversidad en los ecotipos a su distribución altitudinal del Ecuador. Se apreció que siete aislados tienen una variación de pesos moleculares entre 802 a 872 pb y cinco aislados tienen una variación de pesos moleculares entre 701 a 797 pb (Figura 17).

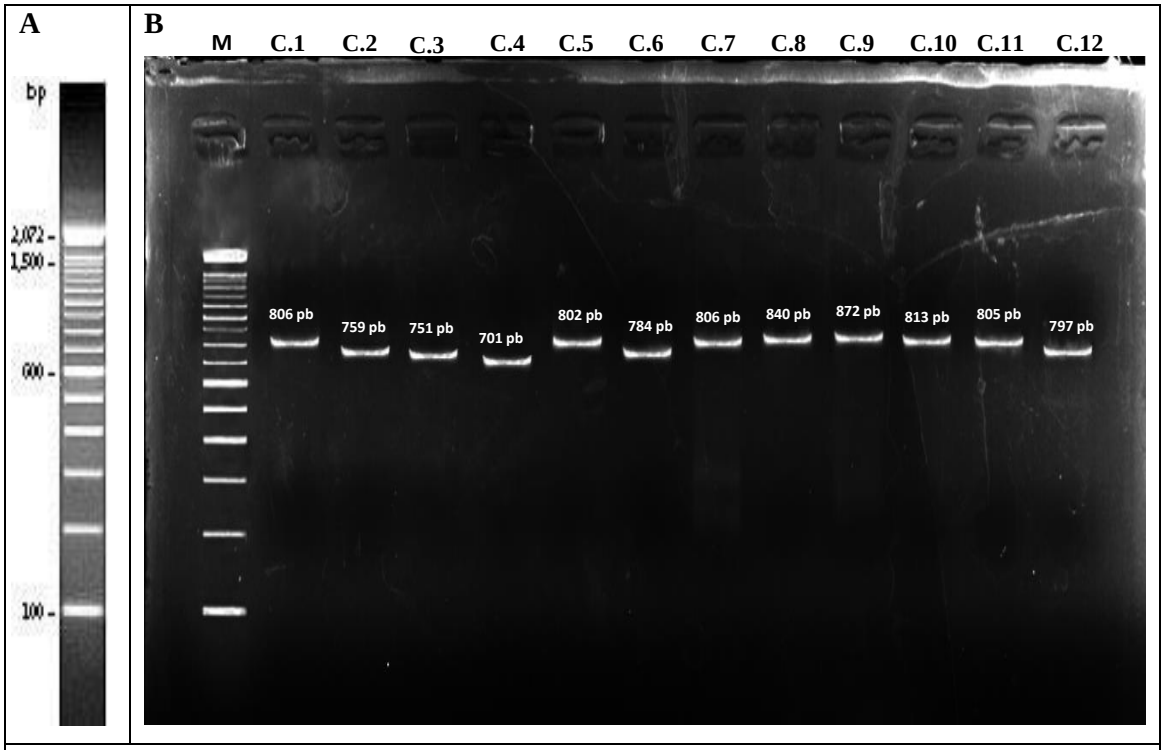



**Figura 17.- Amplificación del ARN ribosomal 8.5S en *M. perniciosa***. A, Lader 100pb. B, Carril M, marcadores de masa molecular; Carril C.1 cepa MpLRBA-101, Carril C.2 cepa MpLRVE-102, Carril C.3 cepa MpLRMO-103, Carril C.4 cepa MpGUBA-104, Carril C.5 cepa MpLRBF-105, Carril C.6 cepa MpLRBF-106, Carril C.7 cepa MpBOLN-107, Carril C.8 cepa MpSDSD-108, Carril C.9 cepa MpSDSD-109, Carril C.10 cepa MpSDSD-110, Carril C.11 cepa MpSDSD-111 y Carril C.12 cepa MpSDSD-112.

#### 4.1.3.1.1. Relación filogénica de los ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador, determinado en base a la secuencia del ITS

La amplificación con los primers ITS1 e ITS4 define dos grandes grupos. El **Grupo I,** reúne al sub-grupo (**A**) a la cepa MpGUBA-104 del cantón Balao-Guayas presentó la mayor longitud (µm) en las basidiosporas, mayor hipertrofia en las escobas secas y vegetativas, y mayor atrofia en el sistema radicular.

El **Grupo II,** reúne al sub-grupo (**B**) a la cepa MpLRVE-102 del cantón Ventanas-Los Ríos presentó el mayor número de escobas vegetativas por plántula y mayor hipertrofia en escobas vegetativas. El sub-grupo (**C**), reúne a las cepas MpLRMO-103, MpSDSD-108, MpBOLN-107 y MpSDSD-109. El sub-grupo (**D**), reúne a las cepas MpLRBF-106, MpSDSD-112, MpLRBA-101, MpSDSD-111, MpLRBF-105 y MpSDSD-110 (Figura 18).

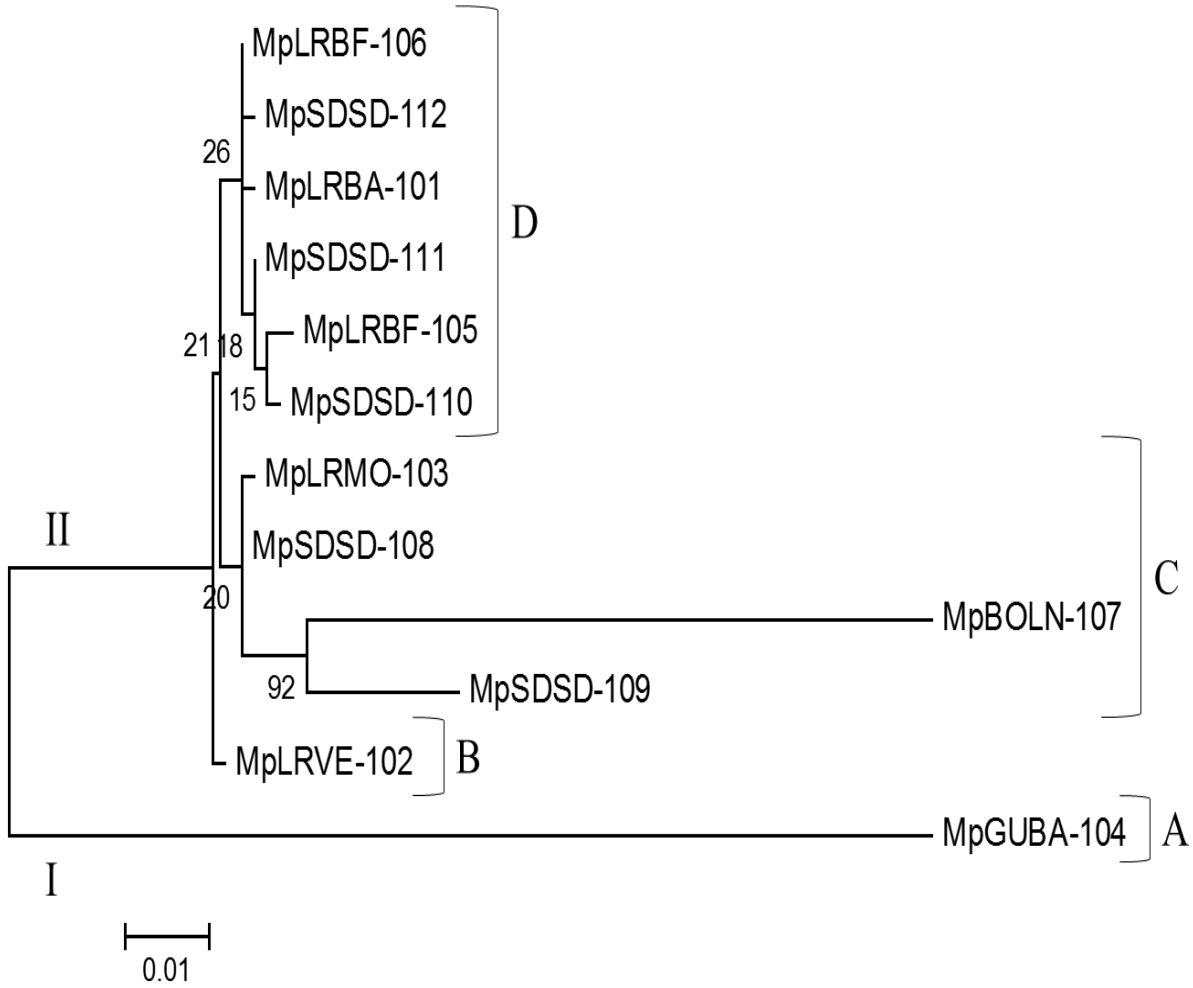



**Figura 18. Relación filogenético de aislados de *M. perniciosa* basadas en la región ITS.** Dendrograma construido al gen del ARNr 5.8S de 12 ecotipos de *M. perniciosa* de cultivares de Cacao a su distribución altitudinal del Ecuador, la distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap de (1000).

La caracterización molecular al gen del ARNr 5.8S se sintetiza en el Cuadro 7, donde se destaca que todas las cepas pertenecen a *M. perniciosa.* Identidad genética del 97 % para la cepa de GenBank Cibe-MP-G-Balao2C (MpGUBA-104). La identidad genética del 97 a 99 % para la cepa MCA2520 (MpLRVE-102, MpLRBF-105, MpBOLN-107, MpSDSD-108 y MpSDSD-109). La identidad genética del 98 % para la cepa Cibe-MP-GT10A (MpLRBA-101). La identidad genética del 99 % para la cepa TCP3-2 (MpLRMO-103). Identidad genética del 100 % para la cepa 31 (MpLRBF-106). Identidad del 99 % cepa TCP90 (MpSDSD-110). Identidad genética del 100% cepa 4 (MpSDSD-111). Identidad genética del 99 % cepa TCP3-2 (MpSDSD-112).

**Cuadro 7. Identidad de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador a la Base de datos de NCBI de GenBank.**

| # | Fuente | Origen de los aislados a los cultivares | Identidad a la Base de datos de NCBI de GenBank. | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Organismo | Cepa | Query coverage | Identidad | Número de Accesión |
| 1 | MpLRBA-101 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | Cibe-MP-GT10A | 88% | 98% | EU047935.1 |
| 2 | MpLRVE-102 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | MCA2520 | 94% | 99% | AY916743.1 |
| 3 | MpLRMO-103 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | TCP3-2 | 93% | 99% | GQ919139.1 |
| 4 | MpGUBA-104 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | Cibe-MP-G-Balao2C | 80% | 97% | KX913250.1 |
| 5 | MpLRBF-105 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | MCA2520 | 89% | 99% | AY916743.1 |
| 6 | MpLRBF-106 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | 31 | 87% | 100% | GQ919120.1 |
| 7 | MpBOLN-107 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | MCA2520 | 78% | 97% | AY916743.1 |
| 8 | MpSDSD-108 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | MCA2520 | 85% | 99% | AY916743.1 |
| 9 | MpSDSD-109 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | MCA2520 | 81% | 97% | AY916743.1 |
| 10 | MpSDSD-110 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | TCP90 | 86% | 99% | GQ919142.1 |
| 11 | MpSDSD-111 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | 4 | 84% | 100% | GQ919116.1 |
| 12 | MpSDSD-112 | *Theobroma cacao* L. | *Moniliophthora perniciosa* | TCP3-2 | 88% | 99% | GQ919139.1 |
| **Espaciador Interno Transcrito 1, secuencia parcial; Gen de ARN ribosómico 5.8S, secuencia completa; y espaciador interno transcrito 2, secuencia parcial.** | | | | | | | |

### 4.1.3.2. Árbol filogenético ERIC-PCR

Se generaron perfiles de bandas de ADN mediante la amplificación de secuencias Repetitivas de Consenso Intergénico de Enterobacterias (ERIC-PCR) de los doce ecotipos de *M. perniciosa*, generó un total de 34 bandas distintas, que varían en tamaño desde 100 a 2500 pb (Figura 19). Comparación visual de bandas patrones revelaron 2 grandes grupos, de huellas dactilares para aislamientos que difieren en región geográfica y en función de las condiciones agroclimáticas.

El perfil electroforético muestra variabilidad genética en el bandeo obtenido de la amplificación de secuencias palindrómicas (no codificantes) de ADNg de *M. perniciosa* (Figura 19), Los resultados sugieren que la técnica de ERIC-PCR provee un método alternativo válido para la diferenciación de cepas de *M. perniciosa*. Esta variabilidad es un proceso biológico común, ya que 30% de la secuencia de ADN es altamente repetitivo, lo que permite establecer patrones genéticos específicos para identificar individuos, es decir, para establecer una huella genética o huella de ADN (*ADN fingerprinting*) de cada ecotipo de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal.

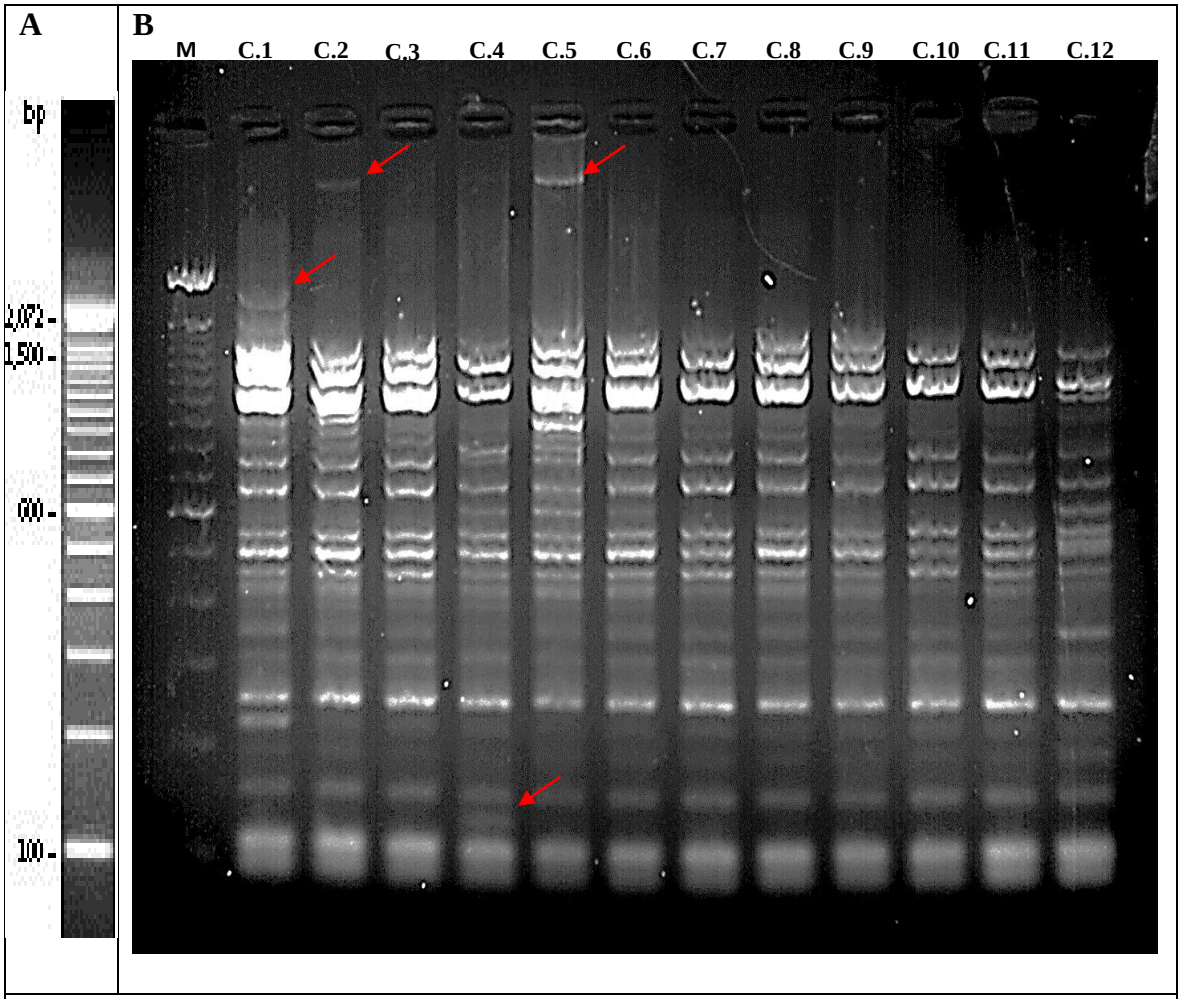



**Figura 19.- ERIC-PCR de *Moniliophthora perniciosa* aislados de *Theobroma cacao*.** A, Lader 100pb. B, Carril M, marcadores de masa molecular; Carril C.1 cepa MpLRBA-101, Carril C.2 cepa MpLRVE-102, Carril C.3 cepa MpLRMO-103, Carril C.4 cepa MpGUBA-104, Carril C.5 cepa MpLRBF-105, Carril C.6 cepa MpLRBF-106, Carril C.7 cepa MpBOLN-107, Carril C.8 cepa MpSDSD-108, Carril C.9 cepa MpSDSD-109, Carril C.10 cepa MpSDSD-110, Carril C.11 cepa MpSDSD-111 y Carril C.12 cepa MpSDSD-112.

El análisis filogenético generó dos grandes grupos (Figura 20). El **Grupo I,** reúne cinco aislados de *M. perniciosa*, sub-grupo (**A**) compuesto por las cepas del cantón Balao MpGUBA-104 y Buena Fe MpLRBF-105 que obtuvo mayor producción de basidiosporas/mL y mayor diámetro en esporóforos, sub-grupo (**B**) compuesto por las cepas MpLRBA-101, MpLRVE-102 y MpLRMO-103. El **Grupo II**, reúne siete aislados de *M. perniciosa*, sub-grupo (**C**) compuesto por la cepa MpLRBF-106 presento menor longitud de basidiosporas, sub-grupo (**D**) compuesto por las cepas MpSDSD-111, MpSDSD-112, MpBOLN-107, MpSDSD-110, MpSDSD-108, MpSDSD-109.

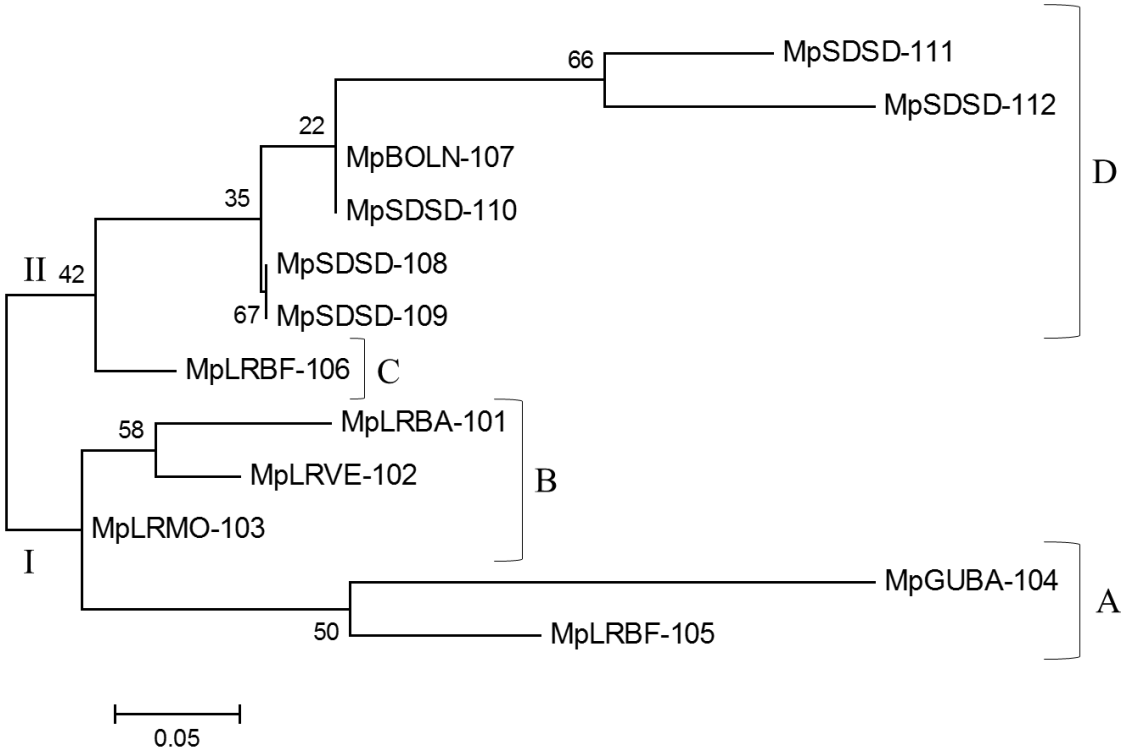



**Figura 20. Relación filogenético de aislados de *M. perniciosa* basadas en la amplificación de *Secuencias Repetitivas de Consenso Intergénico de Enterobacterias* (ERIC-PCR).** Dendrograma construido con los códigos binarios producidos con los primers ERIC1R y ERIC2 de 12 ecotipos de *M. perniciosa* de cultivares de Cacao a su distribución altitudinal del Ecuador, la distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap de (1000).

## 4.2. Análisis del grado de severidad de infección de *M. perniciosa* al estado fisiológico de cacao nacional EET-19

### 4.2.1. Estado fisiológico en EET-19 al grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa*

#### 4.2.1.1. Evaluación de la severidad de infección de *M. perniciosa* en semillas de EET-19 a 30 días

Se registró diariamente a partir de los 8 días después de la incubación y se determinó como el tiempo promedio transcurrido entre la inoculación y el aparecimiento del primer síntoma de la enfermedad. El cual se expresó en días después de la inoculación. Los síntomas de la

enfermedad ocasionados por *M. perniciosa* en plántulas de EET-19 se manifiestan entre los 12 y 13 días por las cepas MpLRVE-102, MpGUBA-104 y MpLRBA-101. Los ecotipos que presentaron síntomas de la enfermedad en un tiempo más prolongado son por la inoculación de las cepas MpSDSD-110 y MpBOLN-107, con 27 y 29 días de incubación (Figura 21).

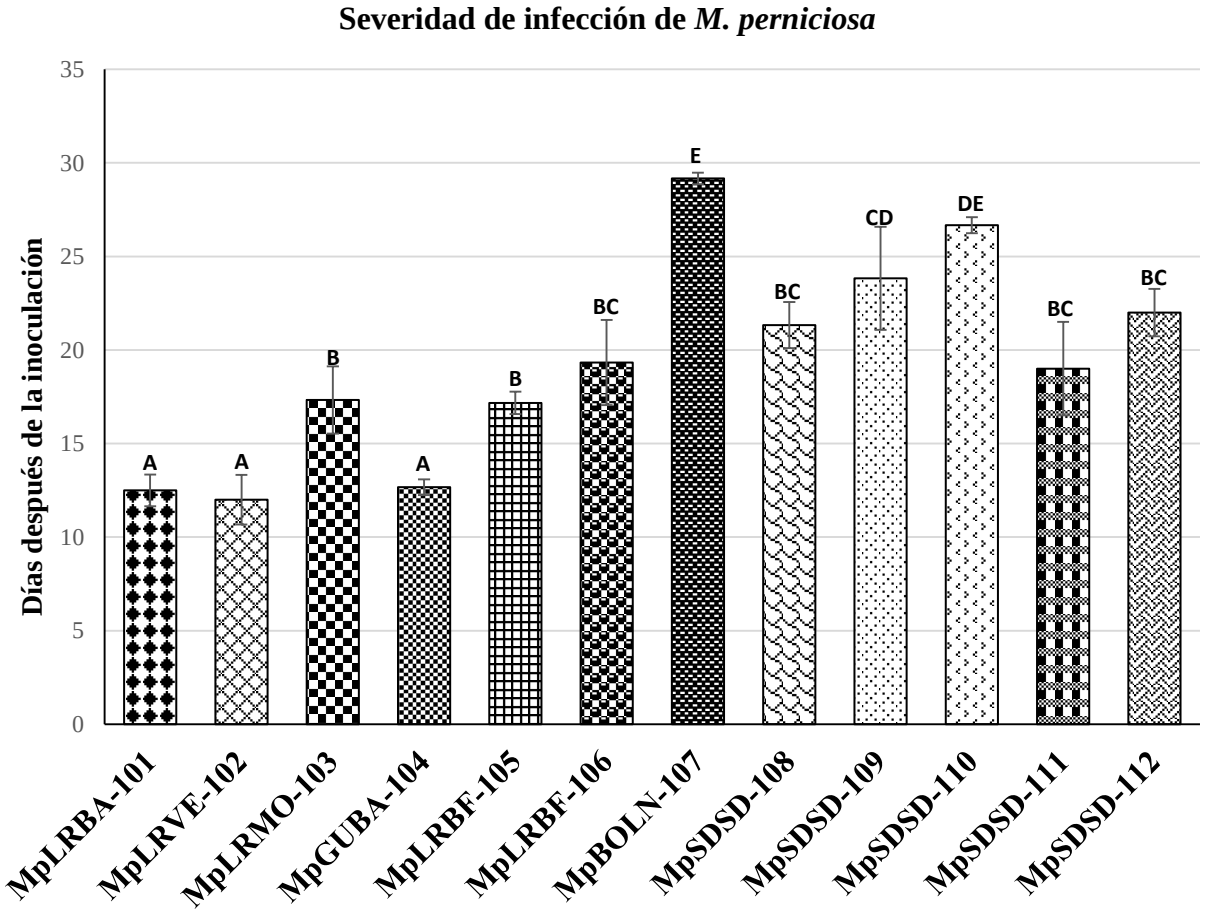



**Figura 21.- Severidad de infección de ecotipos de *M. perniciosa*.** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Duncan).

Se observó los síntomas de Escoba de bruja en plántulas de cacao, días después de la inoculación de semillas pregerminadas, las cepas MpLRVE-102, MpGUBA-104, MpLRBA-101, MpLRMO-103, MpLRBF-106, MpSDSD-111, MpSDSD-108, MpSDSD-109 y MpSDSD-110, presentaron entumecimiento del hipocótilo, atrofia del epicótilo, hipertrofia del nudo cotiledonal y formación de escobas cotiledonales; y las cepas MpLRBF-105, MpSDSD-112, y MpBOLN-107 a partir de las axilas de las hojas presentaron proliferación de brotes, dando origen a escobas axilares de diferentes tamaños, que continúan proliferando lateralmente. Las hojas de estas escobas, se presentan generalmente cloróticas (Figura 22 y 23).

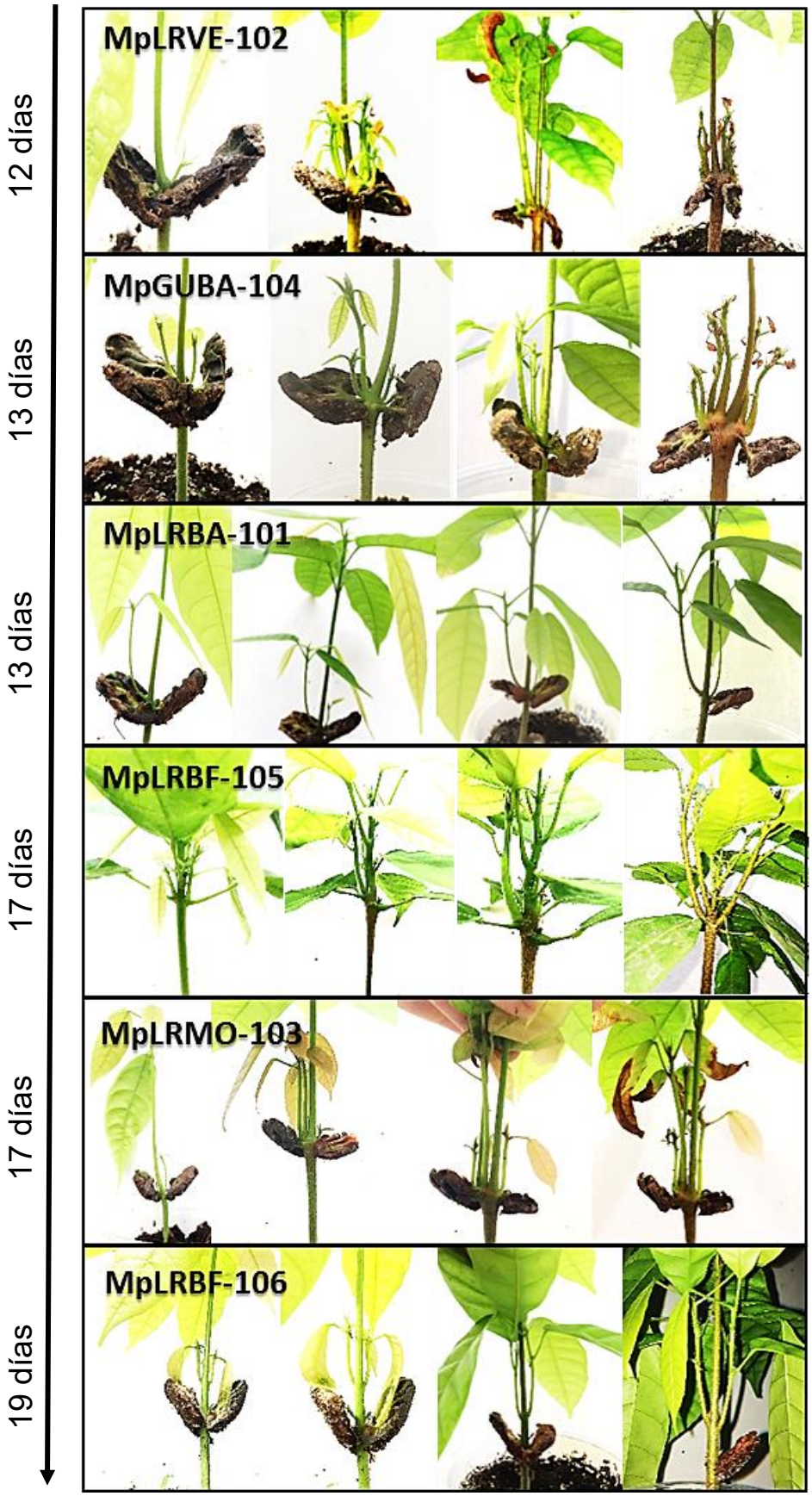



**Figura 22.- Ilustración de los síntomas provocados por los ecotipos del hongo *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador inoculadas en plántulas de cacao (ETT-19),** se puede apreciar en orden descendente los días después de la inoculación de las cepas.

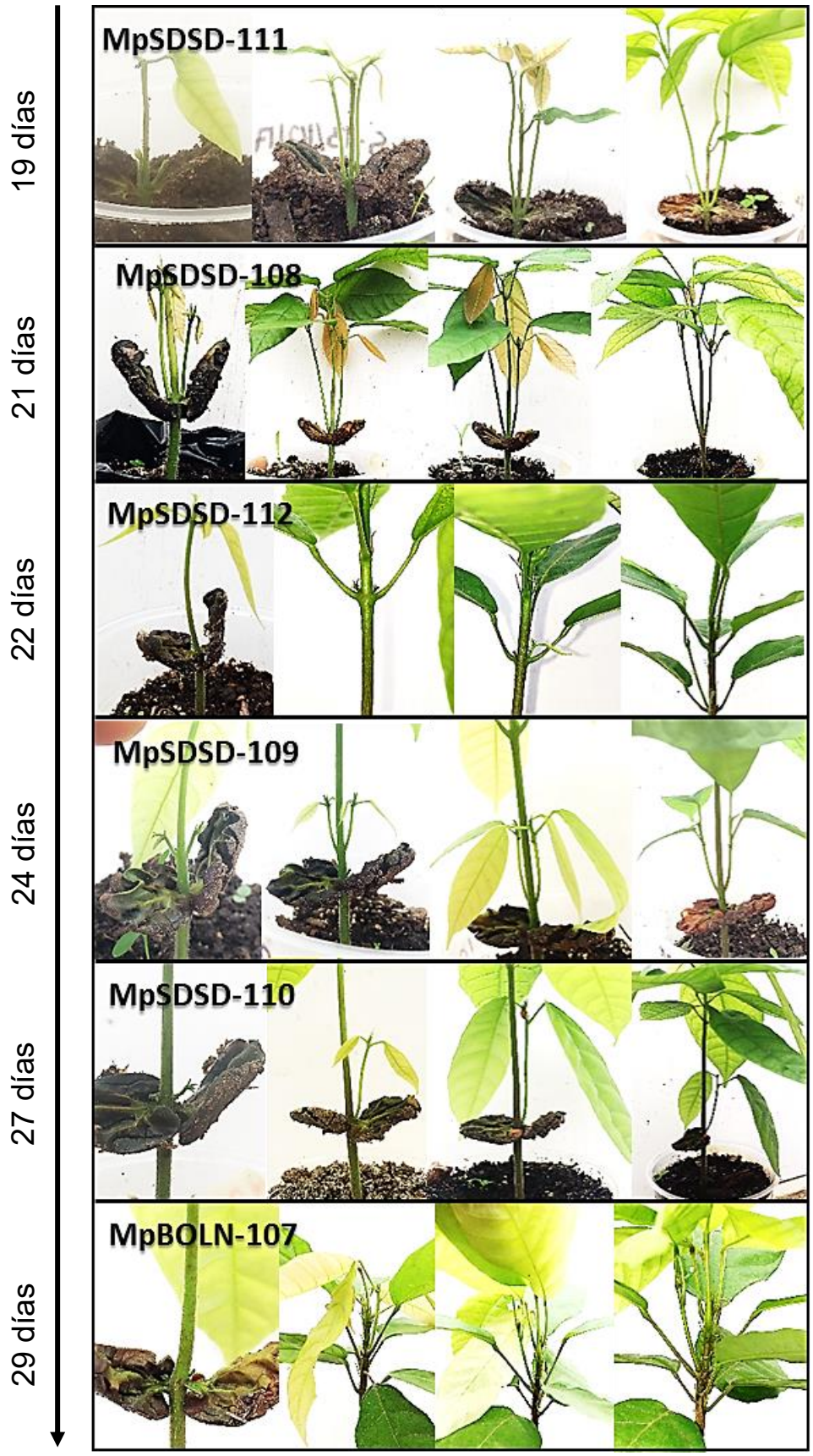



**Figura 23.- Ilustración de los síntomas provocados por los ecotipos del hongo *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador inoculadas en plántulas de cacao (ETT-19),** se puede apreciar en orden descendente los días después de la inoculación de las cepas.

### 4.2.1.2. Evaluación del aspecto fisiológico al diámetro basal del Hipocótilo por inoculación de *M. perniciosa*

La evaluación a los cambios de la fisiología del hipocotilo de EET-19 por 30 días, se aprecia la cepa MpGUBA-104 presentó el mayor diámetro de hipertrofia en el hipocotilo de las plántulas inoculadas con Ø 0.97 cm, con respecto al control que presento Ø 0.67 cm; seguida por las cepas MpLRVE-102 con Ø 0.91 cm y MpLRBF-105 con Ø 0.85 cm. Las cepas MpLRBF-106 y MpSDSD-110 presentaron el menor diámetro del hipocotilo, con Ø 0.79 y 0.75 cm (Figura 24).

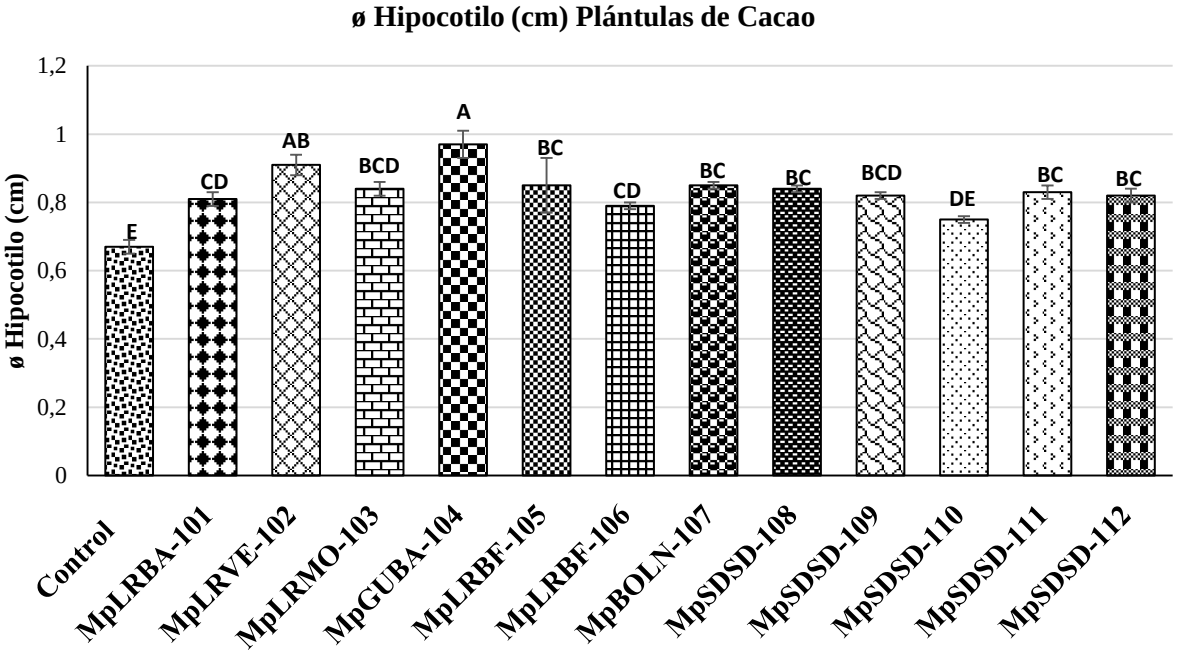



**Figura 24.- Evaluación del aspecto fisiológico al diámetro basal del hipocótilo por inoculación de *M. perniciosa* en plántulas de cacao EET-19.** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Duncan).

### 4.2.1.3. Evaluación del aspecto fisiológico al diámetro del Epicótilo

La evaluación a los cambios de la fisiología del epicótilo de EET-19 por 30 días, La cepa MpLRBF-105 presento el mayor diámetro de hipertrofia en el epicótilo de las plántulas inoculadas con Ø 0.65 cm, con respecto al control que presento Ø 0.44 cm, seguida de las cepas MpSDSD-109 y MpSDSD-112, con Ø 0.52 y 0.51 cm. Las cepas MpGUBA-104 y MpLRVE-102 presentaron el menor diámetro del epicótilo, ambas con Ø 0.33 cm, atrofia en el epicótilo (Figura 25).

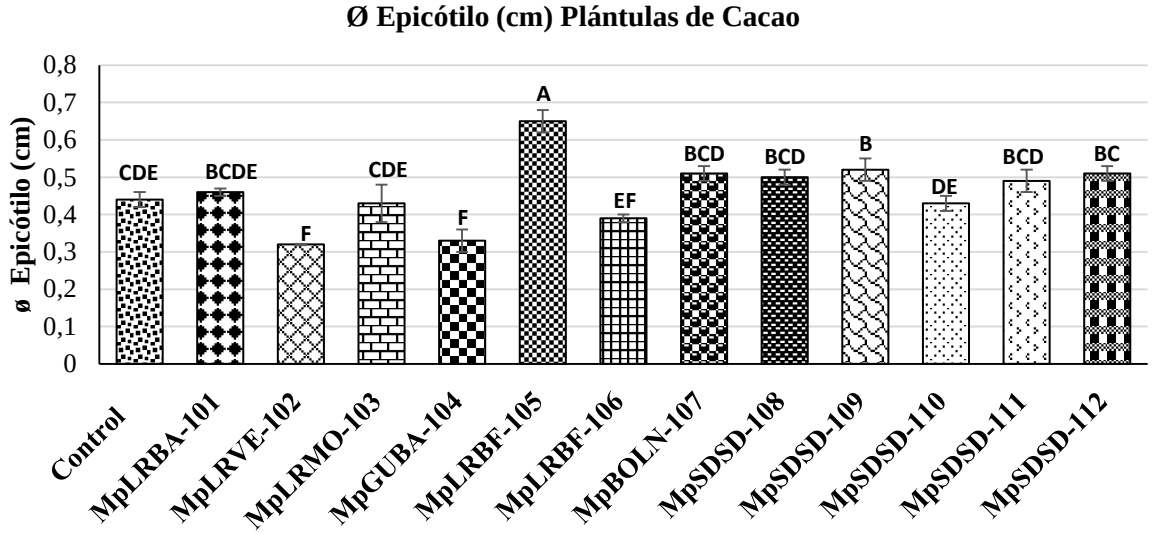



**Figura 25.- Evaluación del aspecto fisiológico al diámetro basal del epicótilo por inoculación de *M. perniciosa* en plántulas de cacao EET-19.** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a p<0.05 (test de Duncan).

### 4.2.1.4. Diámetro basal de escobas vegetativas en plántulas de EET-19

La cepa MpGUBA-104 obtuvo el mayor promedio en el diámetro basal de las escobas vegetativas en comparación a los demás ecotipos con Ø 0.95 cm, seguida de las cepas MpLRVE-102 y MpLRMO-103 con Ø 0.91 y 0.70 cm (Figura 26).

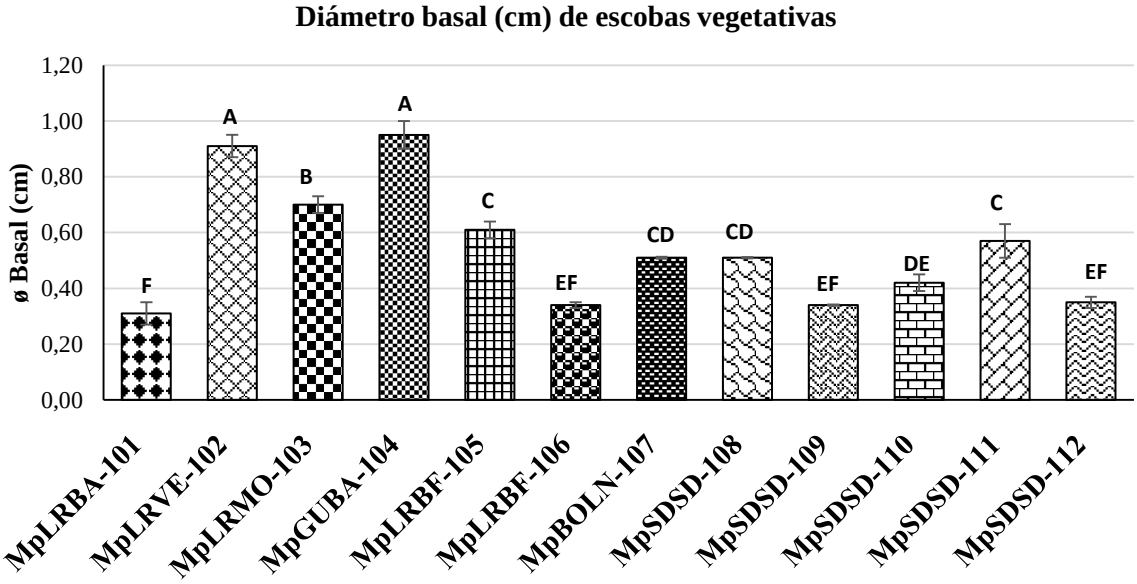



**Figura 26.- Diámetro basal (cm) de Escobas Vegetativas en plántulas de cacao ETT-19 inoculadas con ecotipos de *M. perniciosa.*** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a p<0.05 (test de Duncan).

Las cepas MpLRBF-106 y MpLRBA-101 presentaron el menor promedio en el diámetro de las escobas vegetativas con ∅ 0.34 y 0.31 cm (Figura 26).

### 4.2.1.5. Longitud de escobas vegetativas en plántulas de EET-19

La cepa MpSDSD-111 presento una longitud de 12.26 cm, superior a los demás ecotipos. Seguida por las cepas MpLRBF-105 y MpSDSD-110 con 10.19 y 9.16 cm de longitud. Las cepas que presentaron el menor promedio de longitud son MpGUBA-104 y MpBOLN-107, con 4.86 cm y 4.52 cm (Figura 27).

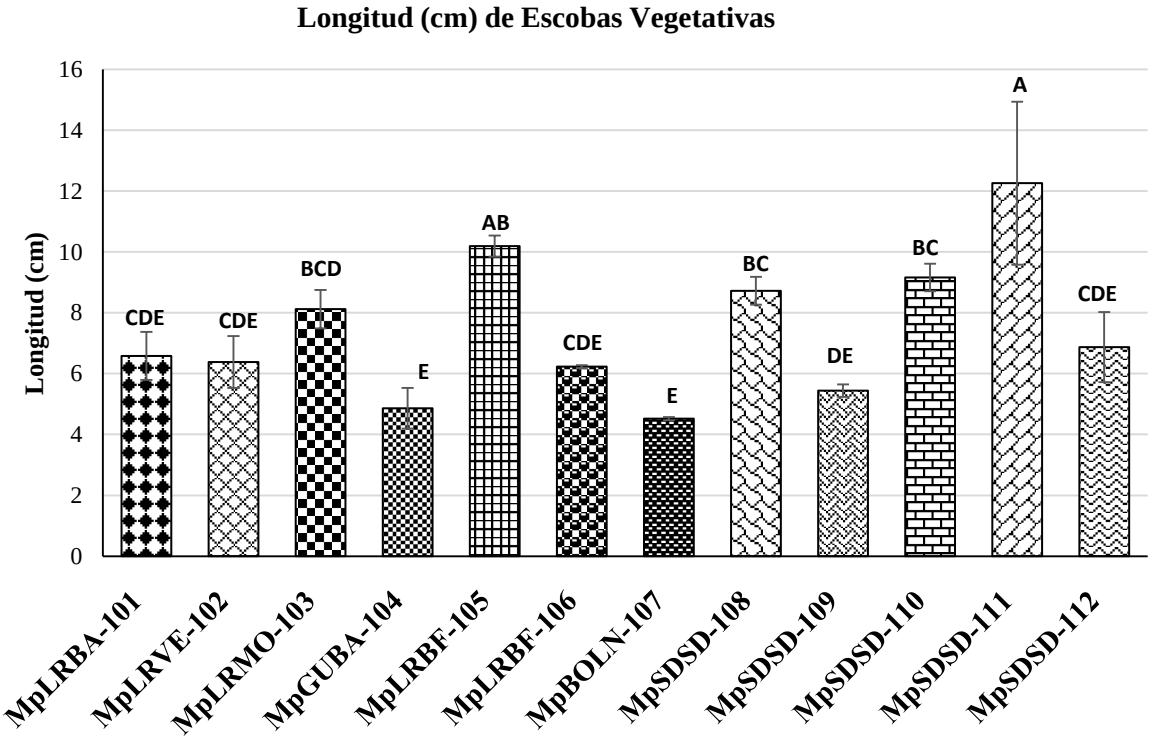



**Figura 27.- Longitud (cm) de las Escobas Vegetativas presentes en las plántulas de cacao inoculadas con ecotipos de *M. perniciosa*.** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Duncan).

### 4.2.1.6. Número de brotes en tejidos afectados (Escobas Vegetativas)

El número de escobas vegetativas en plántulas de cacao, por la inoculación de los ecotipos de *M. perniciosa*. Se aprecia que la cepa MpLRVE-102 presentó el mayor promedio de escobas vegetativas, con un promedio de 3.31 brotes/plántula; seguida por las cepas MpGUBA-104 y MpLRMO-103, con 2.51 y 2.21 brotes/plántula (Figura 28). Las cepas que

presentaron el menor número de brotes por plántula fueron MpSDSD-111 y MpSDSD-110, ambas con 1.00 brote/plántula.

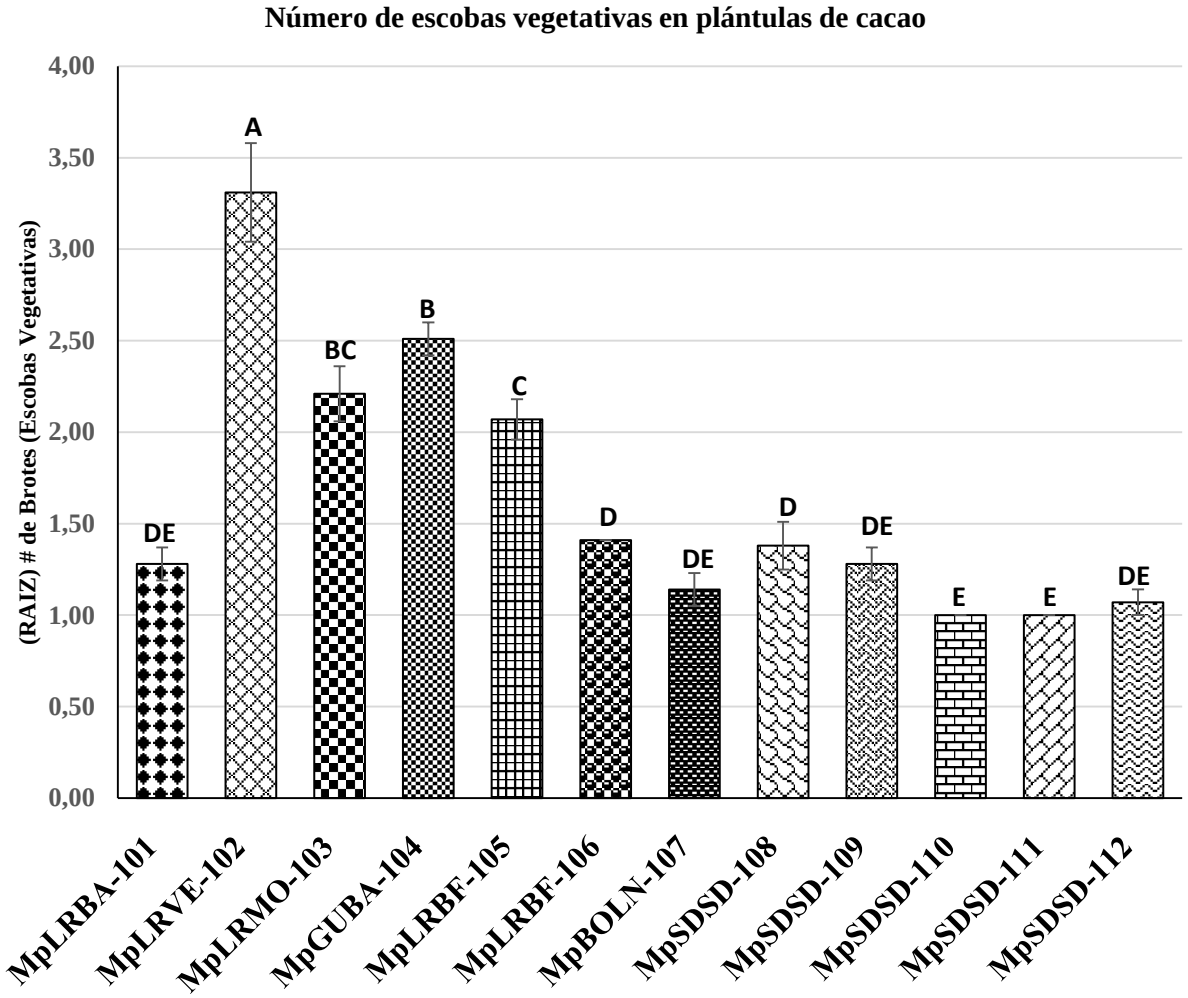



**Figura 28.- Número de brotes (Escobas Vegetativas) presentes en las plántulas de cacao inoculadas con ecotipos de *M. perniciosa*.** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Duncan).

### 4.2.1.7. Evaluación de atrofia del sistema radicular por efecto de *M. perniciosa*

Se verifico la atrofia en el sistema radicular producida por efecto de la aplicación de ecotipos de *M. perniciosa* en semillas de *T. cacao* (EET-19), el porcentaje de inhibición del peso fresco radicular de las plantas inoculas con las cepas. Se observó que la cepa MpGUBA-104 presento el mayor porcentaje de inhibición radicular en plántulas, con el 72.5% de inhibición; seguida de las cepas MpSDSD-111 y MpLRMO-103, ambas con el 47.0% de inhibición (Figura 29).

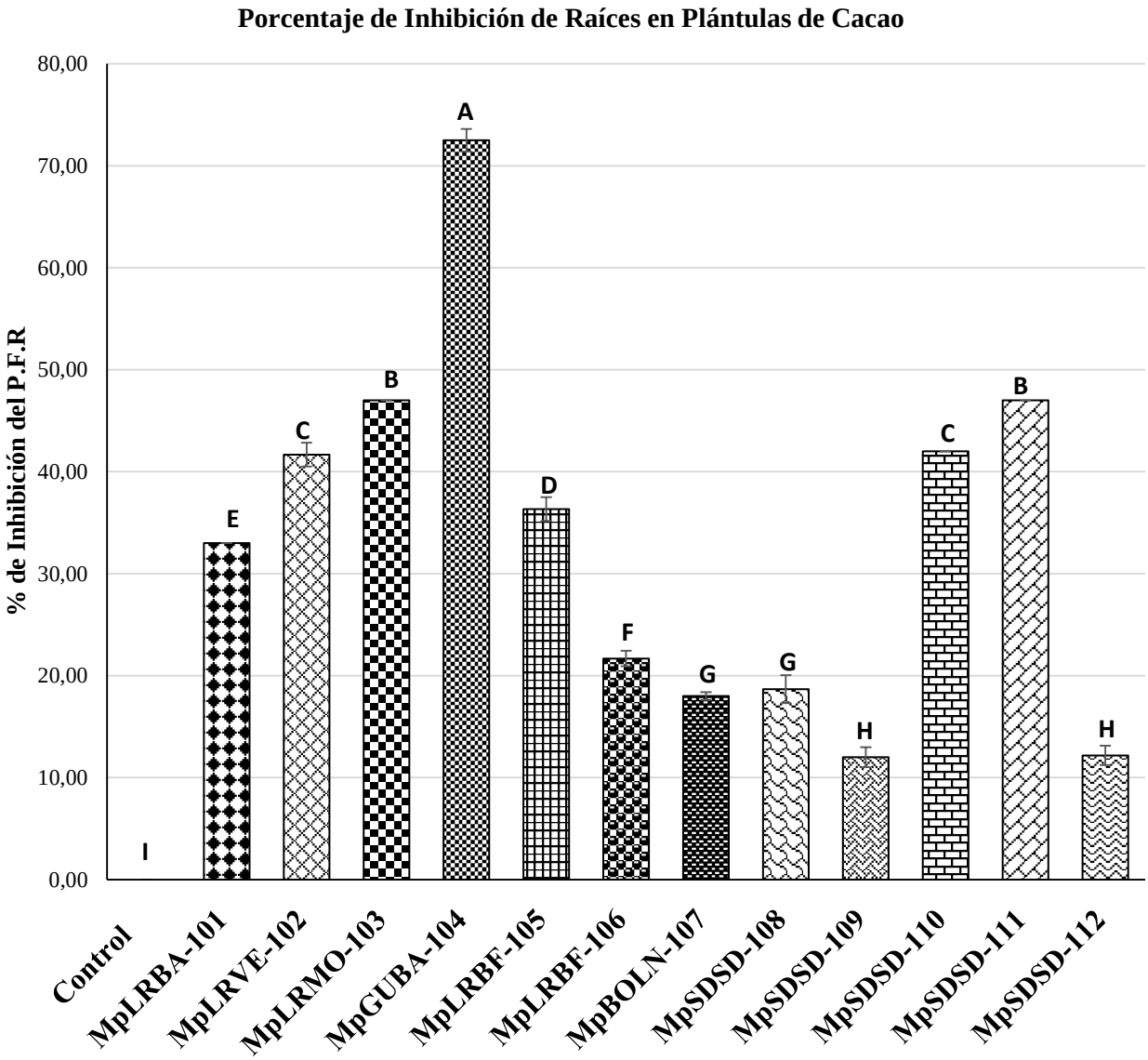



**Figura 29.- Porcentaje de inhibición de raíces en plántulas de cacao inoculadas con ecotipos de *M. perniciosa*.** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Duncan).

Las cepas que presentaron el menor porcentaje de inhibición fueron MpSDSD-112 y MpSDSD-109 con el 12.2% y 12.0%. El micelio del patógeno fue observado en el espacio intercelular, cuando se realizaron cortes transversales en las raíces.

En la figura 30 y 31 se aprecia el sistema radicular de las plántulas de cacao (EET-19), luego de haber sido previamente inoculadas con doce cepas de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal, con síntomas del sistema radicular atrofiado con respecto al control, el hipocótilo se presenta hipertrofiado y la presencia de escobas vegetativas a partir de yemas situadas en nudo cotiledonal. Los cotiledones permanecen adheridos por un periodo más prolongado.

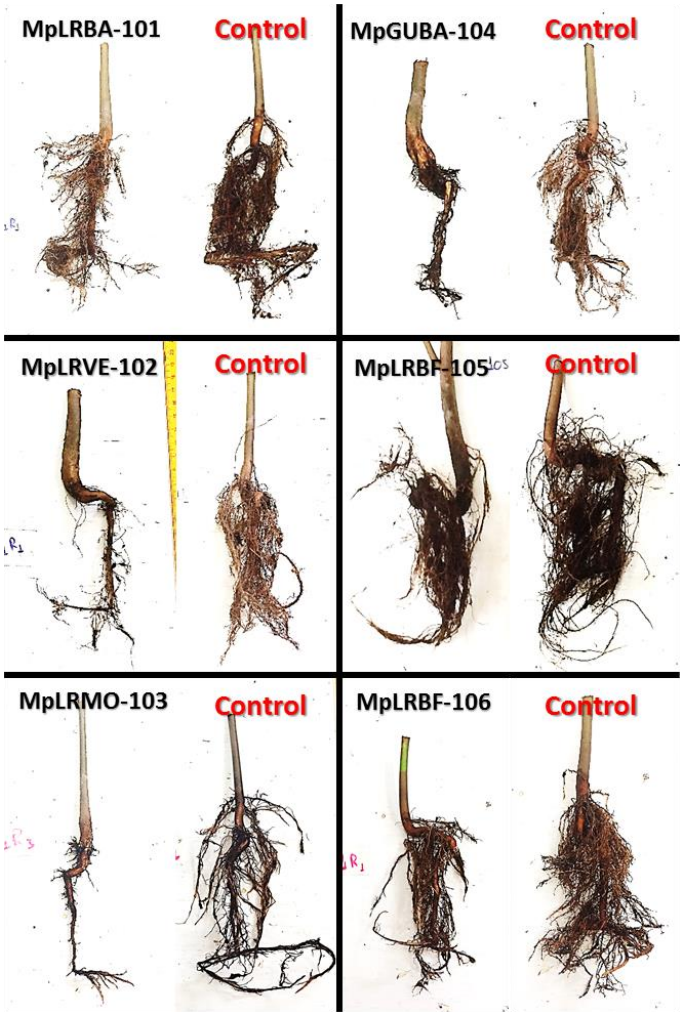
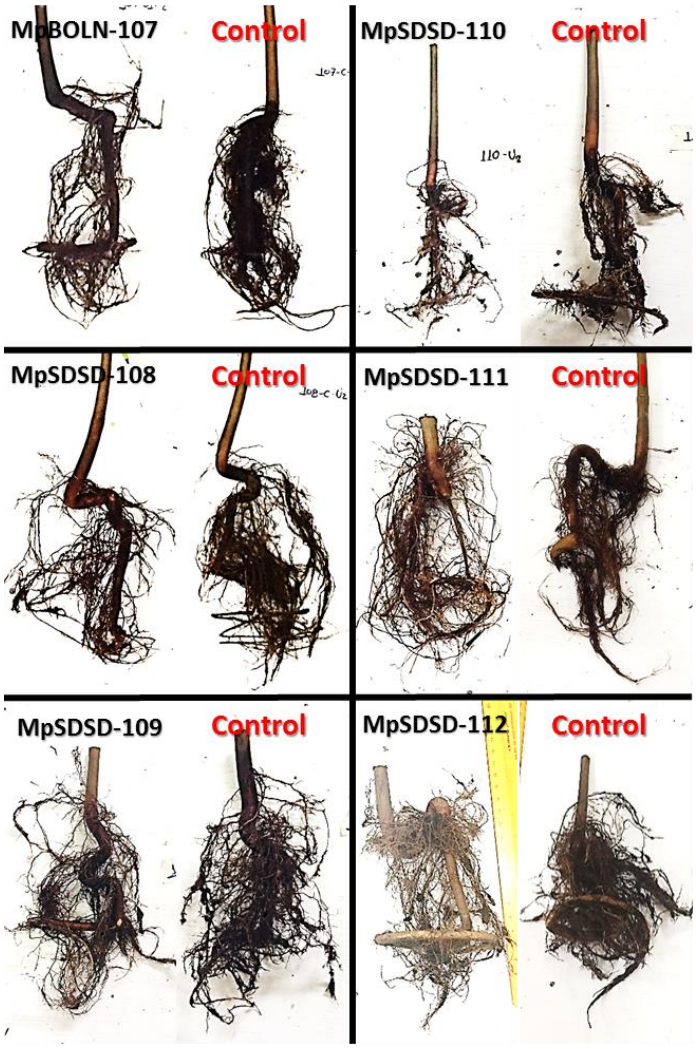



**Figura 30.- Ilustración de la inhibición del crecimiento radicular provocado por los ecotipos del hongo *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador inoculadas en plántulas de cacao (EET-19).**

**Figura 31.- Ilustración de la inhibición del crecimiento radicular provocado por los ecotipos del hongo *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador inoculadas en plántulas de cacao (EET-19).**



### 4.2.2. Agrupamiento por caracteres morfológicos y caracteres fisiológicos con respecto al grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa*

En el análisis de componentes principales (Figura 32), los ecotipos se agrupan por los datos obtenidos de las variables morfológicas y los caracteres fisiológicos con respecto al grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa* en plántulas de cacao; se incluyeron los datos climáticos (Temperatura Min y Max), % Humedad relativa y Altura (m.s.n.m) de las doce cepas recolectadas de los ecotipos a su distribución en el Ecuador.

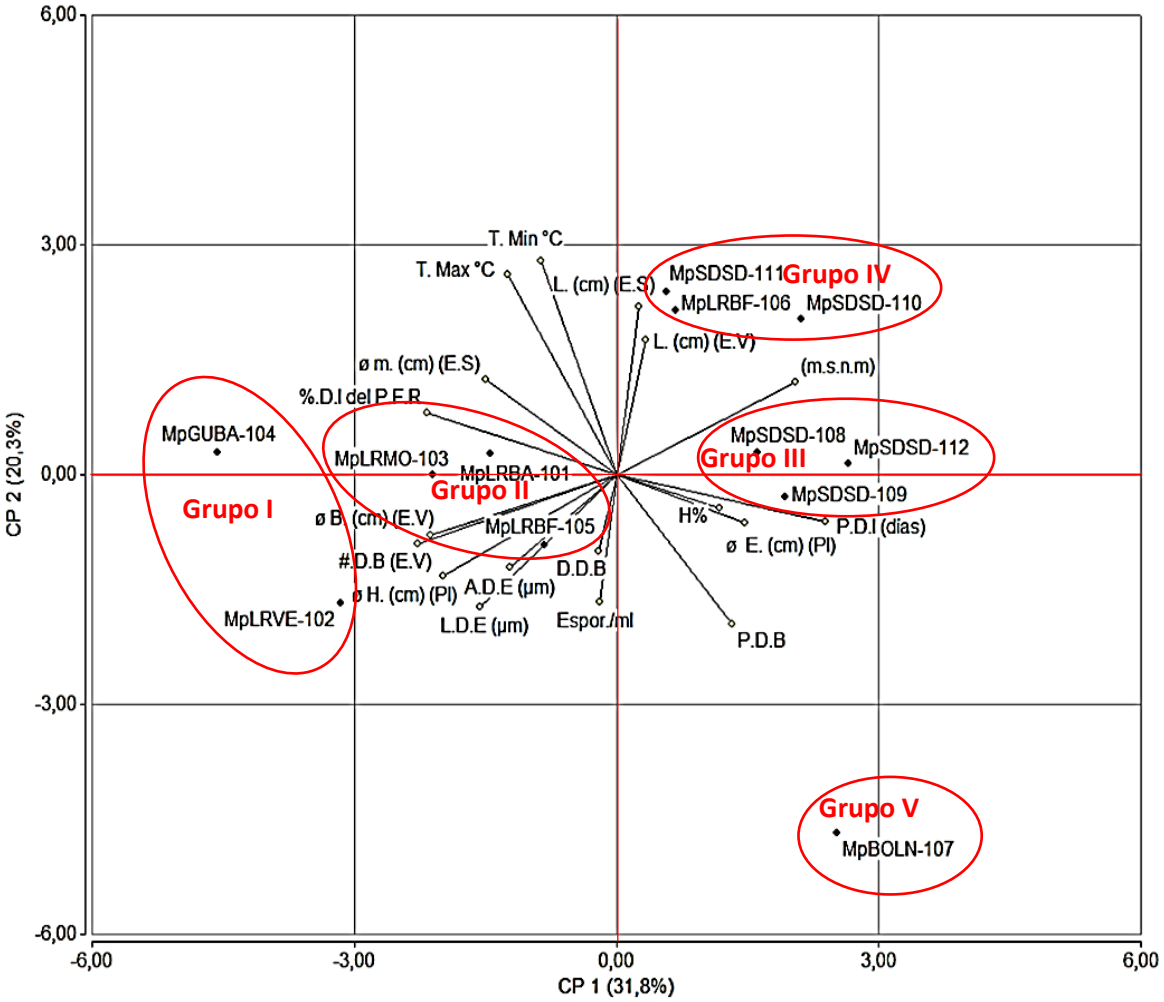



**Figura 32.- Análisis de componentes principales (Biplot) del grado de severidad de los ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador.**

El **Grupo I** está compuesto de las cepas con mayor grado de severidad MpGUBA-104 y MpLRVE-102, cercanas a CP2 (20,3%), características en el mayor diámetro en escobas secas y vegetativas, mayor longitud de basidiosporas, hipertrofia en hipocótilo y atrofia en el sistema radicular de las plántulas de cacao, mayor producción de brotes (escobas

vegetativas) y síntomas de la enfermedad en el menor tiempo después de la inoculación en plántulas de cacao. El **Grupo II** está compuesto de las cepas MpLRBF-105, MpLRBA-101 y MpLRMO-103. El **Grupo III** está compuesto de las cepas MpSDSD-109, MpSDSD-108 y MpSDSD-112. El **Grupo IV** está compuesto de las cepas MpLRBF-106, MpSDSD-110 y MpSDSD-111, presentaron escobas secas y vegetativas de mayor longitud. El **Grupo V** está compuesto por la cepa MpBOLN-107, similitud de CP1 (31.8%), la cepa menos agresivas junto a la cepas del Grupo III, presentaron alta concentración de esporóforos por escoba.

### 4.2.3. Triángulo de la Enfermedad

Se analizó la virulencia de las cepas recolectas de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador, el triángulo de la enfermedad, que está compuesto de un hospedero susceptible (Plántulas de caca ETT-19), el patógeno virulento y las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo son temperatura de 24-28 °C y >90% de Humedad relativa.

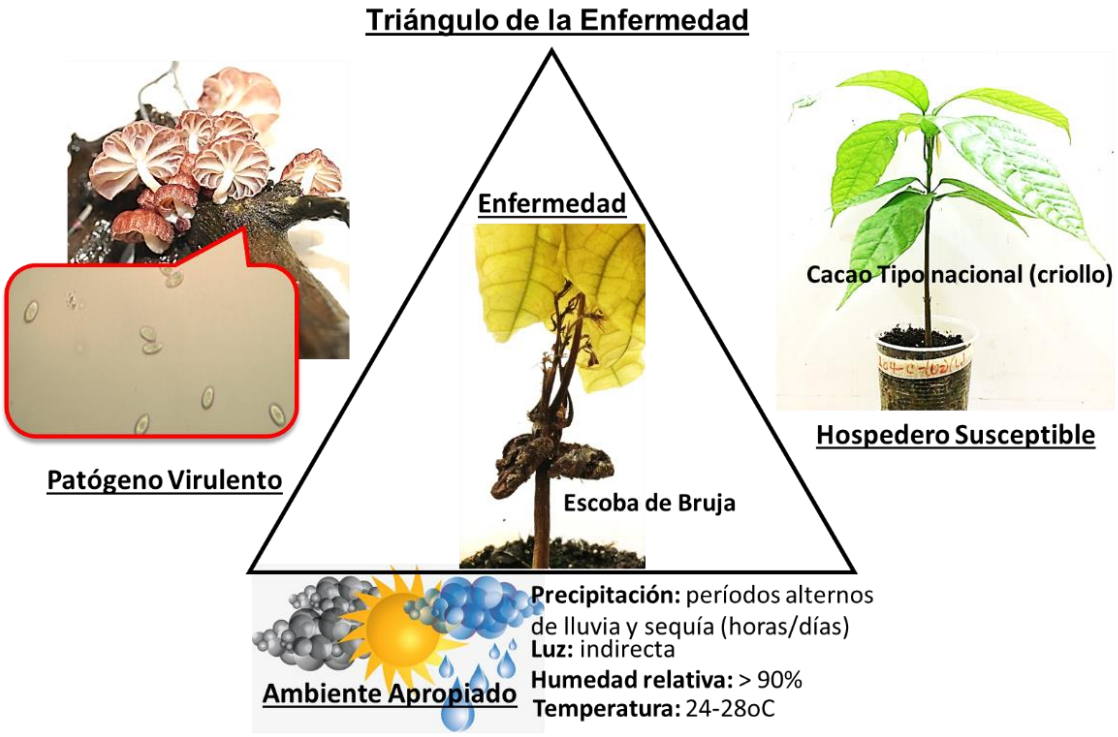



**Figura 33.- Ilustración del Triángulo de la Enfermedad "Escoba de Bruja".**

*Para lo cual se aplicó la siguiente formula:*

$$\textbf{Fenotipo} = \text{Genotipo} + \text{Ambiente}$$

Los doce ecotipos se evaluaron en condición similares, el factor ambiente equivaldrá a cero. En los estudios realizados, la cepa MpGUBA-104 con un promedio de temperatura de 26.20 °C y Humedad relativa >84.02% del sitio de recolección, y la cepa MpLRVE-102 con un promedio de temperatura >23.71 °C y Humedad relativa >80.48% del sitio de recolección; presentaron el menor tiempo transcurrido en días después de la inoculación presentaron los primeros síntomas, mayor números de escobas vegetativas, mayor diámetro de hipertrofia y atrofia en el sistema radicular de las plántulas. Los dos ecotipos al desarrollarse en un ambiente óptimo con el transcurso de los años han desarrollado una alta patogenicidad con respecto a los demás ecotipos recolectados.

Las cepas MpBOLN-107 con un promedio de temperatura <16.40 °C y Humedad relativa <83.25% del sitio de recolección y MpSDSD-112 con un promedio de temperatura <24.09 °C y Humedad relativa <85.79%, Estos ecotipos se desarrollan en un ambiente hostil para el hongo, presentaron un desarrollo más lento y los primeros síntomas de la enfermedad en un periodo más extenso en comparación a las demás cepas. Si no se le dan las condiciones apropiadas al hongo, este entra en un período de inactividad, pero el patógeno continúa potencialmente vivo.

## 4.3. Evaluación del efecto de la aplicación de PGPR como antagonista en condiciones *in vitro*

### 4.3.1. Evaluación del efecto antagonista de los sobrenadantes en la germinación de basidiosporas de *M. perniciosa*

En condiciones *in vitro* se desarrolló un escrutinio para analizar el efecto de los sobrenadantes de las bacterias que presentaron actividad proteolítica: cepas nativas (*Enterobacter asburiae* PM3-14, *Serratia marcescens* PM3-8, *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12) y cepas control (*Bacillus subtilis* ATCC 55405, *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4) sobre la germinación de basidiosporas. Los ensayos antagónicos se realizaron al 15 % y evaluados a las 24 h después de la inoculación de una concentración de 100000 basidiosporas/mL del ecotipo de *M. perniciosa* cepa MpGUBA-104. El menor porcentaje de germinación de basidiosporas se verificó en el sobrenadante de las cepa nativa *S. marcescens* (PM3-8) con un 40 % de germinación, con respecto al testigo sin la aplicación de

sobrenadantes se verificó 95 % de germinación. Las cepas control *P. protegens* (CHA0) y *B. subtilis* (ATCC 55405) con 46.11 % y 68.89 % de germinación. La cepa control *P. veronii* (R4) ejerció el menor efecto antagonista, con 82.22 % de germinación de basidiosporas, para su evaluación a 24 h (Figura 34 y 35). Estos resultados permitieron definir a los aislados bacterianos que tienen mayor actividad antagonista, las cepas *S. marcescens* (PM3-8), *P. protegens* (CHA0) ejercen una germinación menor al 50 %.

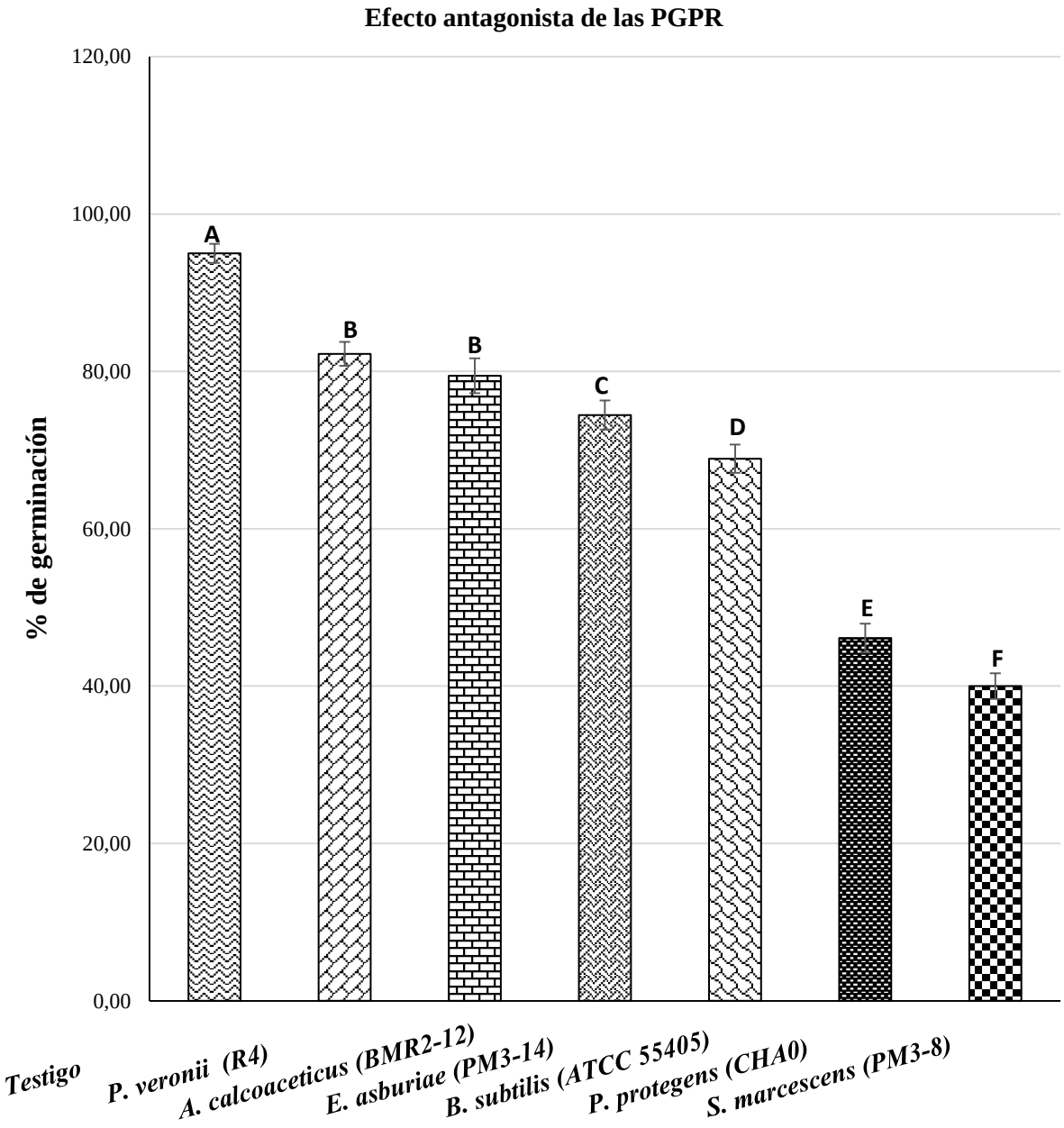



**Figura 34.- Efecto de los sobrenadantes de las PGPR en el % de inhibición de la germinación de las Basidiosporas del hongo *M. perniciosa.*** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Duncan).

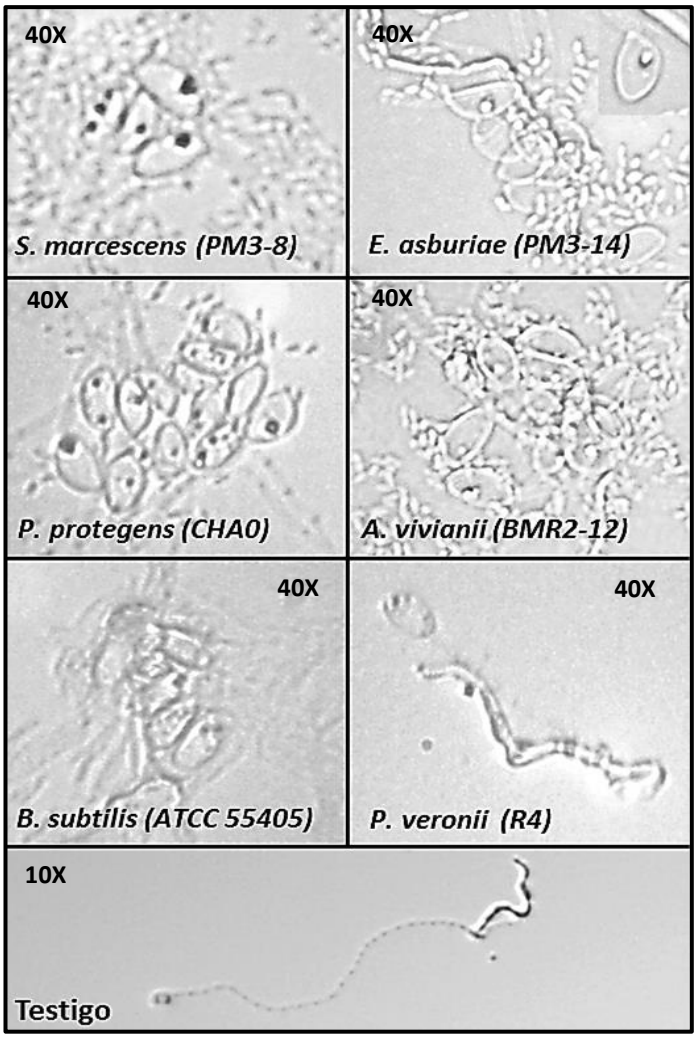



**Figura 35. Ilustración del efecto de los sobrenadantes de las PGPR en la inhibición de la germinación de basidiosporas de *Moniliophthora perniciosa* a las 24 horas.**

### 4.3.2. Evaluación del efecto antagonista de los sobrenadantes en la inhibición del tubo germinal de *M. perniciosa*

Los ensayos antagónicos se realizaron al 15 %. Se midió la longitud en µm del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de las basidiosporas a las 24 y 48 h.

La evaluación a 24 h después de la incubación (Figura 36), se observó que el tratamiento con sobrenadante producido por la cepa nativa *S. marcescens* (PM3-8), obtuvo menor longitud del tubo germinal con un promedio de 75.8 µm, inhibición en el micelio biotrófico monocariótico, con respecto al testigo que sin la aplicación de sobrenadantes se verificó un desarrollo normal con 517.57 µm. Las cepas control *P. protegens* (CHA0) y *B. subtilis* (ATCC 55405) con 86.31 y 136.83 µm. La cepa *P. veronii* (R4) presento la menor inhibición con un crecimiento del tubo germinal de 267.45 µm de longitud (Figura 37).

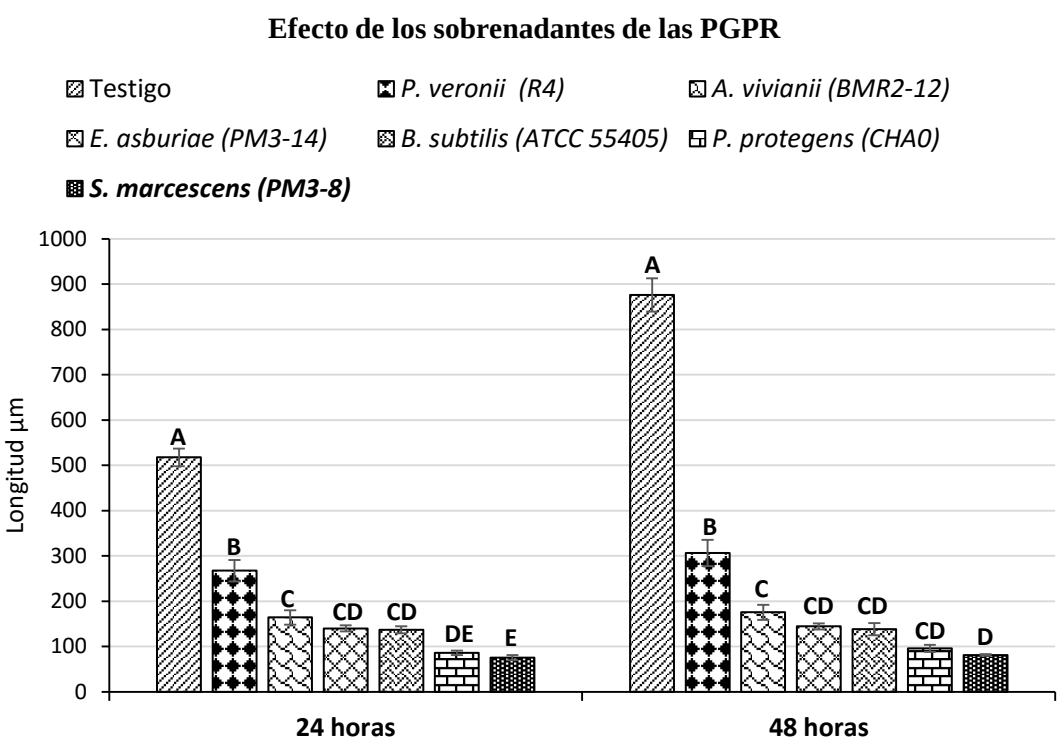



**Figura 36.- Efecto de los sobrenadantes de las PGPR en la inhibición del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 24 y 48 horas.** Las barras de error indican ±ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p<0.05$ (test de Tukey).

La evaluación a 48 h después de la incubación (Figura 36), el tratamiento con el sobrenadante producido por la cepa nativa *S. marcescens* (PM3-8) obtuvo el menor promedio de longitud del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* con 81.5 µm, con respecto al testigo que sin la aplicación de sobrenadantes se verificó un desarrollo normal con 876.05 µm de longitud. Las cepas control *P. protegens* (CHA0) y *B. subtilis* (ATCC 55405) con 96.09 y 138.63 µm. La cepa *P. veronii* (R4) presento menor inhibición del crecimiento del tubo germinal con 306.74 µm de longitud (Figura 38). En la germinación de basidiosporas se observó anomalías en la morfología de las basidiosporas, Las cepas *E. asburiae* (PM3-14) y *B. subtilis* (ATCC 55405) presentaron basidiosporas sin germinar e hinchazón en el micelio biotrófico monocariótico. Las cepas *S. marcescens* (PM3-8) *y P. protegens* (CHA0) mostraron una elongación anormal, basidiosporas sin germinar y el micelio biotrófico monocariótico hinchado. Las cepas *P. veronii* (R4) y *A. calcoaceticus* (BMR2-12) presentaron un desarrollo más lento en el micelio biotrófico monocariótico, pero con mal formación en ellos, mientras sin aplicación de sobrenadantes hubo un desarrollo normal y sin inhibición del crecimiento del micelio biotrófico monocariótico de *M. perniciosa* (Figura 39-40).

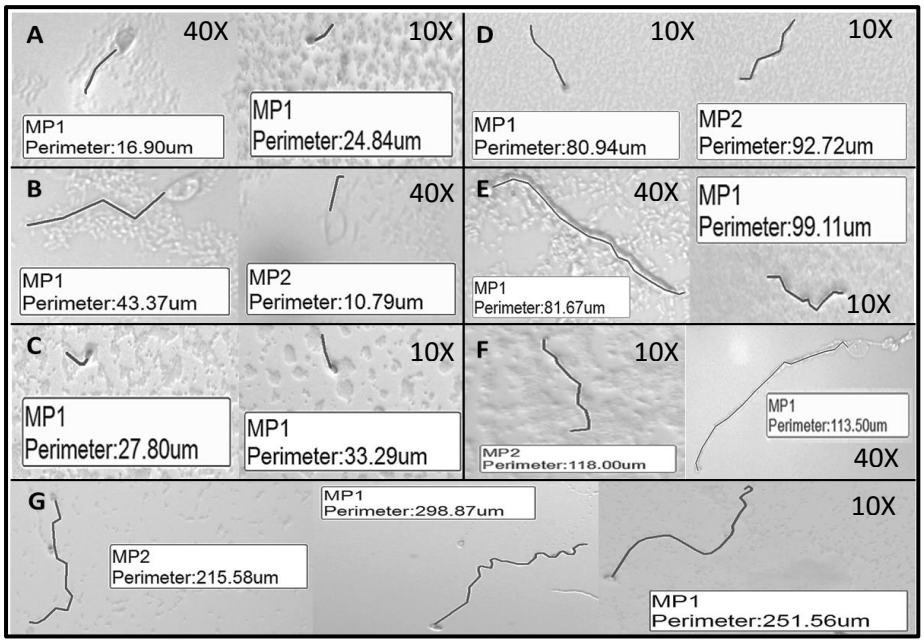



**Figura 37. Efecto de los sobrenadantes de las PGPR en la inhibición del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 24 horas. (A)** *Serratia marcescens* PM3-8, **(B)** *Pseudomona protegens* CHA0, **(C)** *Bacillus subtilis* ATCC 55405, **(D)** *Enterobacter asburiae* PM3-14, **(E)** *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, **(F)** *Pseudomona veronii* R4 y **(G)** Control.

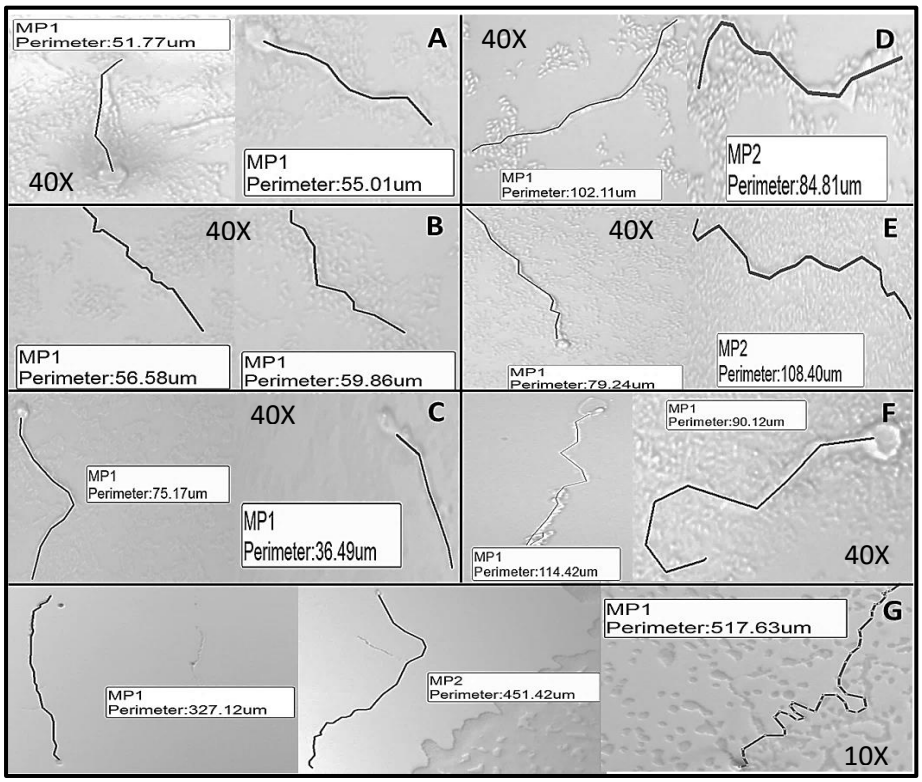



**Figura 38. Efecto de los sobrenadantes de las PGPR en la inhibición del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 48 horas. (A)** *Serratia marcescens* PM3-8, **(B)** *Pseudomona protegens* CHA0, **(C)** *Bacillus subtilis* ATCC 55405, **(D)** *Enterobacter asburiae* PM3-14, **(E)** *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, **(F)** *Pseudomona veronii* R4 y **(G)** Control.

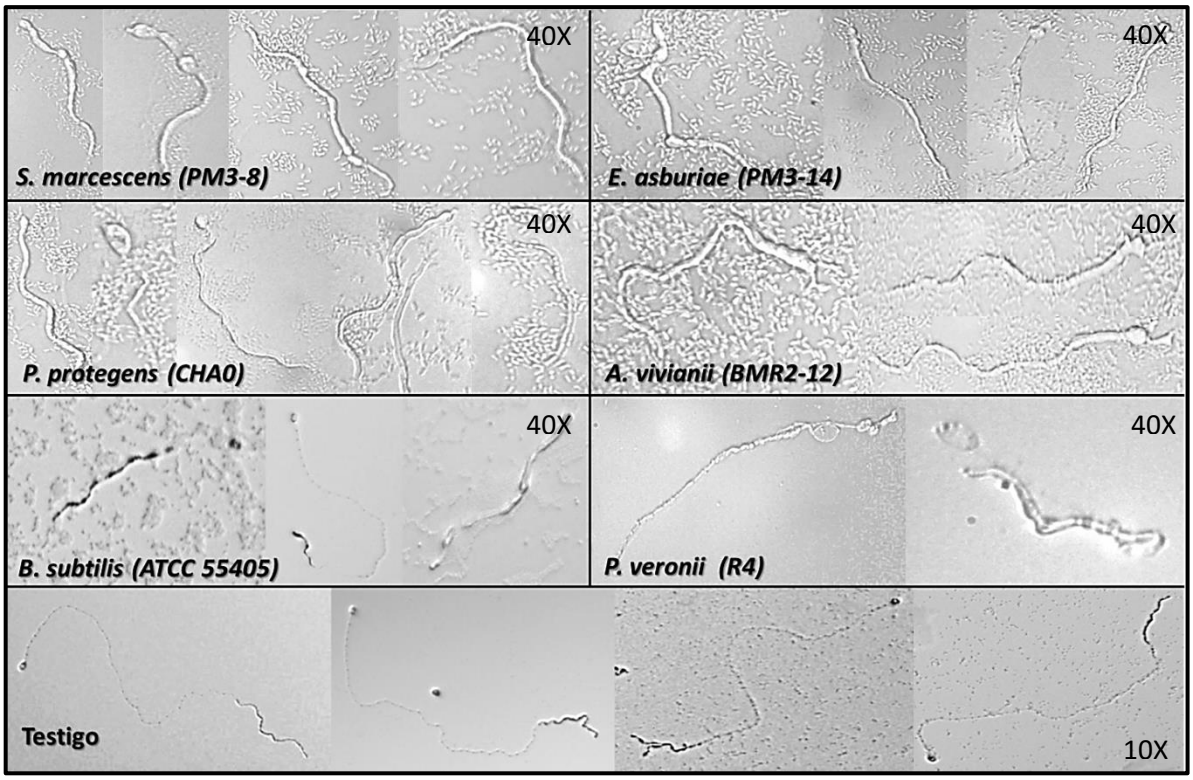



**Figura 39. Ilustración del efecto de los sobrenadantes de las PGPR en el tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 24 horas.**

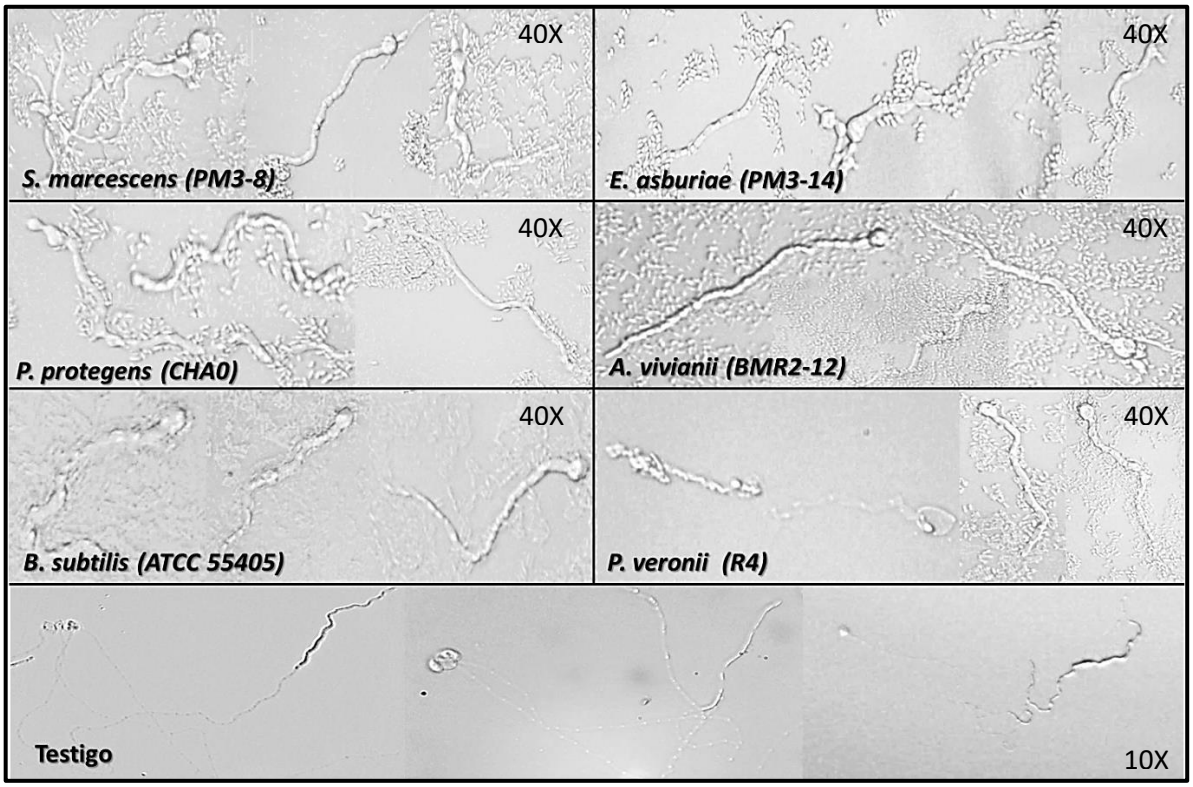



**Figura 40. Ilustración del efecto de los sobrenadantes de las PGPR en el tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa* a las 48 horas.**

## 4.4. Discusión

### 4.4.1. Caracterización genética y filogenética de ecotipos de *M. perniciosa*

La amplificación de secuencias repetidas del rRNA, específicamente de la región ITS, permitió encontrar biodiversidad en los 12 aislados de los ecotipos de *M. perniciosa*, resultados que son similares a los encontrado por Arruda *et al.* (2003a) quienes destacan este marcador molecular para la diferenciación a nivel de especies en Basidiomicetos. La extracción de ADN genómico desde cuerpos fructíferos resulto ser eficiente y de buena calidad, se pueden adoptar las fructificaciones como fuente directa de ADN, evita la selección artificial en los medios de cultivo y garantiza un diagnóstico más real de la diversidad del patógeno en plantaciones (Orozco *et al.* 2012). Los productos de PCR obtenidos de la amplificación con los primers ITS1 – ITS4, para *M. perniciosa* aislados de *T. cacao* (biotipo C), presentaron dos grupos, Grupo I compuesto de siete ecotipos con una variación de pesos moleculares entre 802 a 872 pb y Grupo II compuesto de cinco ecotipos con una variación de pesos moleculares entre 701 a 797 pb.

Esta variación en el peso molecular se presenta por su ecología, cuando ocurre alguna modificación de las condiciones ambientales crean un nicho vacío, activando la selección natural hasta que la población alcanza un nuevo pico de adaptabilidad y generando una nueva subespecie o raza (Monroy G. & Martínez R., 2014). En estudios realizados en Brasilia por De Arruda et al. (2003a), amplificando la región comprendida ITS1 – ITS4 con 750 pb, en 120 aislados monospóricos de *M. perniciosa* de diferentes localidades y hospederos de cacao, y los trabajos de Lana (2004) muestran variabilidad genética reducida para esta especie. Las secuencias evaluadas presentaron alta homología entre 97 y 100 % de similitud con *M. perniciosa*, aislados muestreados son de la especie de interés y se comprobó biodiversidad de cepas o razas de *M. perniciosa* en el Ecuador.

Los resultados obtenidos a través de la amplificación de Secuencias Intergénicas de Consenso Repetitivas de Enterobacterias (ERIC-PCR), representa el primer uso documentado de este tipo de PCR en estudios de biodiversidad genética en *M. perniciosa* en el Ecuador. Representa una técnica rápida de caracterización y aplicable a gran escala sobre el impacto de los ecotipos en la evolución del patógeno. Donde se detectó dos Grupos

específicos en los aislamientos de las cepas de *M. perniciosa*. La variabilidad detectada utilizando ERIC-PCR puede deberse a la naturaleza ubicua y distribución cromosómica aparentemente al azar, secuencias denominadas palindrómicas (se leen iguales de izquierda a derecha que de derecha a izquierda) que se repiten en el genoma de procariotas y eucariotas, dando lugar a la amplificación por PCR de estas múltiple regiones. Por el contrario, la región rDNA ITS, es una secuencia multicopia que representa solo una pequeña fracción del genoma fúngico, las múltiples copias son todas teóricamente idénticas, conservadas por evolución concertada (G. Dover, 1982; Gabby Dover, 1994).

En este trabajo el producto evolutivo de las interacciones vitales entre el hongo *M. perniciosa* y *T. cacao* L, especies no emparentadas, dependen de su adaptabilidad para evolucionar. Todas estas definiciones podrían resumirse en un solo concepto: *adaptación*. Estos resultados también concuerdan con los de De Arruda *et al.* (2003b), quienes en la evaluación molecular mediante la técnica ERIC-PCR de 50 aislados de *M. perniciosa* provenientes de *T. cacao* (biotipo C), *H. acutifoliae* (biotipo H) y *S. lycocarpum* (biotipo S) encontraron agrupación de aislados de acuerdo con el hospedero de infección del hongo, mostrando una considerable variabilidad intraespecífica dentro de los aislados provenientes de *T. cacao*, además la existencia de correlación entre el origen geográfico de *M. perniciosa* con el polimorfismo de los Grupos.

Se defiende la hipótesis que la cepa del cantón Balao MpGUBA-104 sea el origen de la especie, y que a partir de ahí, junto con el movimiento de material de siembra se haya diseminado *M. perniciosa*. En algunas regiones geográficas se presume que *M. perniciosa* ha coevolucionado con su hospederos de *Theobroma cacao* (De Arruda *et al.,* 2003b; Evans H.C., 2002; Purdy & Schmidt, 1996). Lo que es congruente con el desarrollo histórico, La enfermedad "Escoba de Bruja" fue reportada en el Ecuador por primera vez en el cantón Balao provincia del Guayas en 1918 y en 1922 ya se había extendido por todo el cantón. En junio de 1923 abundaba en la provincia de "Los Ríos", la principal zona productora del cacao llamado de "arriba", esto provocó la gran debacle del cacao Ecuatoriano (Garces, 1946 & Suarez C., 1977).

### 4.4.2. Análisis de Patogenicidad

Aislados de los ecotipos MpLRBA-101, MpLRVE-102, MpLRMO-103, MpGUBA-104, MpLRBF-105, MpLRBF-106, MpBOLN-107, MpSDSD-108, MpSDSD-109, MpSDSD-110, MpSDSD-111 y MpSDSD-112 de *M. perniciosa* fueron evaluados por la capacidad de inducir el aparecimiento de síntomas de escoba de bruja en plántulas de caco susceptibles de tipo Nacional Criollo (EET-19). Se observó que todos los aislados evaluados fueron capaces de inducir síntomas típicos de la escoba de bruja en plantas evaluadas, evidenciando la infección por el *M. perniciosa* en el superbrotamiento de regiones terminales y engrosamiento del tallo. El análisis estadístico que hubo diferencia significativa entre los ecotipos evaluados. Se observó la severidad de infección en días después de la inoculación, mayor números de brotes (escobas vegetativas) y porcentaje de inhibición del sistema radicular, se verificó que las cepas del cantón Ventanas (MpLRVE-102) y Balao (MpGUBA-104) fueron más agresivas en relación a los demás ecotipos.

La cepa del cantón Las Naves (MpBOLN-107) y las cepas del cantón Santo Domingo (MpSDSD-109 y MpSDSD-112) de *M. perniciosa*. Se mostraron menos agresivas en plántulas de EET-19. Según Neto *et al.* (2004) linajes avirulentos de los microorganismos patógenos también se han utilizado para otorgar resistencia sistémica adquirida (SAR), ya que éstos pueden colonizar la planta sin causar enfermedades, pero son reconocidas por la planta que activa su sistema de defensa, impidiendo el establecimiento del patógeno.

La cepa MpGUBA-104 presento la mayor longitud 12.09 µm de basidiosporas en comparación a las demás cepas y una de las más agresivas. Los cambios en los aspectos morfológicos de las basidiosporas se consideran por los cambios en las condiciones climáticas de cada ecotipo. Andebrhan & Furtek, (1994) observaron en condiciones de campo hay variabilidad en el tamaño y forma de las basidiosporas provenientes de diferentes basidiocarpos. De esta forma, puede ser afirmado que el micelio dentro de las escobas son genéticamente polimórficas. En el artículo publicado por Duke News and Communications, (2011) & Kauserud *et al.* (2008), descubrieron que las esporas más grandes de hongos tendrán mayor suministro de nutrientes que llevaran a su punto de impacto, pueden ser más letales, dándole más tiempo y capacidad para superar un ambiente hostil.

Las cepas del cantón Buena Fe (MpLRBF-106) y cantón Santo Domingo (MpSDSD-108) ambas presentaron menor longitud en basidiosporas con 10.94 y 11.11 µm, tienden a tener un mecanismo de mayor dispersión de la enfermedad. Se puede especular que esa evolución

favorece a un compromiso: esporas de un tamaño pequeño para la dispersión expansiva a larga distancia y las esporas de gran tamaño para reservas de nutrientes a corta distancia (Stearns & Stephen, 1992). El potencial de diversidad especialmente dentro de una región productora de cacao es importante en la planificación de programas de manejo de la enfermedad que incluyen el uso de resistencia del huésped.

### 4.4.3. Efecto Antagonista a nivel *in vitro* de los sobrenadantes de las PGPR en basidiosporas de *M. perniciosa*

En este ensayo fueron probadas seis cepas de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) *Pseudomona fluorescens, Pseudomona veronii, Bacillus subtilis, Acinetobacter calcoaceticus, Serratia marcescens* y *Enterobacter asburiae* para determinar la actividad inhibitoria de los sobrenadantes bacterianos a nivel *in vitro* hacia la germinación de basidiosporas y el tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) de *M. perniciosa*. Obteniendo como resultado que los sobrenadantes producido por la cepa nativa *S. marcescens* (PM3-8), presentaron significancia estadística en la germinación de las basidiosporas, con un 40 % germinación, con respecto al testigo sin la aplicación de sobrenadantes se verifico 95 % de germinación. Las cepas comerciales *P. protegens* (CHA0) y *B. subtilis* (ATCC 55405) con 46.11 % y 68.89 % de germinación. Se verifico el efecto antagonista a las 24 y 48 h de los sobrenadantes producidos por *S. marcescens* (PM3-8), obteniendo menor desarrollo en longitud del tubo germinal con respecto a los demás tratamientos, con un promedio de 75.8 (24 h) y 81.5 (48 h) µm, presento inhibición del micelio biotrófico monocariótico, con respecto al testigo que sin la aplicación de sobrenadantes se verificó un desarrollo normal con un promedio de 517.57 (24 h) y 876.05 (48 h) µm.

Los datos obtenidos de la medición del tubo germinal de las basidiosporas de la cepa MpGUBA-104 control, agar agua, se obtuvo un rango mayor de hasta 200-500 µm de longitud a las 24 horas y 300-800 µm de longitud a las 48 horas, con un poder de germinación de basidiosporas del 95%, esto pudo ocurrir ya que el ecotipo utilizado para los ensayos antagonistas, fue una de las cepas de mayor agresividad en estudios previos. En estudios realizados por Evans (1980) en Belem-Brasil, midió la germinación de basidiosporas de

*M. perniciosa* en agua y en medios de agar estándar, obtuvo una germinación rápida, produciendo tubos germinales de hasta 150-250 µm de longitud a las 24 horas (Figura 41).

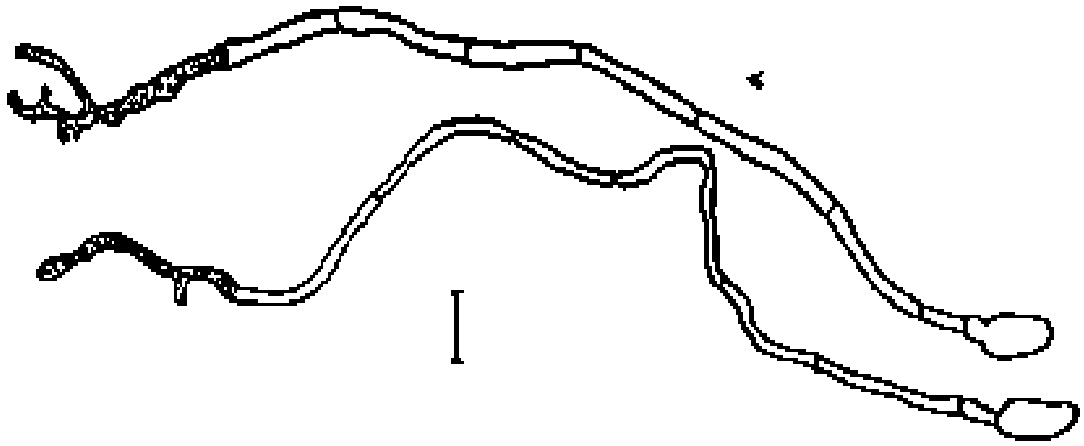


**Figura 41**. Basidiosporas después de 24 h en agua destilada estéril. Imagen obtenida de Evans (1980).

En estudios previos cepas de *S. marcescens* resultó ser el organismo más activo de 100 probados para la producción de enzima quitinasa, esta enzima degrada la quitina que es un componente estructural de la pared celular presente en los hongos excepto los oomicetos, afectando la germinación de esporas y el tubo germinal del patógeno (Gutiérrez R. et *al.* 2015; Monreal & Rees, 1969; Silva O, 2010). El sistema enzimático de *S. marcescens* es extracelular y es compuesto de endoquitinasa, quitobiosa, y un factor (CHI) requerido para la hidrólisis de la quitina y la quitosana. Como tal, se parece mucho al sistema de la enzima *celulasa* de *Trichoderma viride.* Ahmadzadeh & Sharifi Tehrani, (2009) observaron que la mayoría de *Pseudomonas fluorescens* produjeron diferentes metabolitos antifúngicos entre ellos, proteasas, sideróforos, cianuro de hidrógeno (HCN) y DAPG, inhibiendo el crecimiento micelial de *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*.

El efecto inhibitorio a la reducción de germinación y en el desarrollo del tubo germinal de basidiosporas de *M. perniciosa* estaría regulado por la presencia de glucanasas mecanismo de inhibición de fitopatógenos, que al igual que las quitinasas, se caracterizan por ser enzimas hidrolíticas relacionadas con la defensa de las plantas, que al unirse a la pared celular de los hongos, degradan el β-1,3 glucano y la quitina, respectivamente (Compant *et al.* 2005), reduciendo así, el crecimiento y la germinación de esporas, y degradando las hifas del patógeno en estados tardíos de la enfermedad (Castro S. *et al.* 2007).

En estudios realizados por Melnick *et al.* (2011), ellos aislaron bacterias endofíticas del cultivo de cacao *Theobroma cacao* L como potenciales agentes biológicos de control, para enfermedades del cacao. Las aplicaciones de comunidades bacterianas nativas como *Bacillus subtilis* (HQ262955) aislada de hojas de cacao, tuvo un porcentaje de inhibición hacía *M. perniciosa* del 67.5% *y* mientras que *Bacillus subtilis* (HQ262957) aislada de ramas del árbol de cacao tuvo un porcentaje de inhibición hacía *M. perniciosa* del 81.8%, estas dos cepas de *B. subtilis* probaron ser eficientes para la inhibición de patógenos del cultivo de cacao.

Al final del trabajo se puede comprobar la existencia de variabilidad intraespecífica de *M. perniciosa*, verificando el mayor grado de severidad del patógeno por las cepas del cantón Ventanas (MpLRVE-102) y Balao (MpGUBA-104). Donde la secuenciación al ITS determino una similitud del 97-100 % de identidad a *M. perniciosa*. El efecto patogénico se verifico en una de las cepas más agresivas donde se observó la reducción en germinación y en el desarrollo del tubo germinal de basidiosporas por la cepa nativa *S. marcescens* (PM3-8).

# CAPÍTULO V

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

# 5. Conclusiones y Recomendaciones

## 5.1. Conclusiones

Una vez culminado este proyecto de investigación se llevó a las siguientes conclusiones:

- Se logró el aislamiento de 12 ecotipos de *M. perniciosa* a su distribución altitudinal del Ecuador, se encontró biodiversidad intraespecífica en los doce ecotipos de *M. perniciosa* utilizando la *región* ribosomal de ADN conocido como espaciador interno transcrito (***ITS***) y basado en *Secuencias Intergénicas* de *Consenso Repetitivas de Enterobacterias* (**ERIC-PCR**).
- Los ecotipos con mayor agresividad fueron las cepas MpGUBA-104 a 80msnm y MpLRVE-102 a 32msnm y los ecotipos recolectados a mayor altura (msnm) de *M. perniciosa* tuvieron un desarrollo *más lento* que los ecotipos a nivel del mar.
- La cepa MpGUBA-104 se utilizó para los experimentos antagonistas con Las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR), las PGPR presentaron actividad antagónica *in vitro* contra *M. perniciosa*, gracias a la producción de metabolitos secundarios, que alteran la germinación de basidiosporas y el desarrollo del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico). Los sobrenadantes de las cepas *S. marcescens* (PM3-8) y *P. protegens* CHAO ejercieron mayor actividad antagónica hacia la germinación de basidiosporas a las 24 h con valores de 40 y 46.11 %. Se observó que la cepa *S. marcescens* (PM3-8) obtuvo mayor actividad antagónica a las 48 h contra *M. perniciosa*, con respecto a los demás tratamientos, hacia el desarrollo del tubo germinal (micelio biotrófico monocariótico) con valores de 81.5 µm.

## 5.2. Recomendaciones

- Realizar el estudio de rangos de agresividad entre 190-580 msnm, para verificar el comportamiento de los ecotipos de *M. perniciosa* a estas condiciones.

- La aplicación inundativa de una sola especie bacteriana no autóctona, no causaría antagonismo a un largo plazo por su falta de adaptabilidad, mientras que las aplicaciones de comunidades bacterianas nativas, tendría un mejor resultado.

- Probar diversas concentraciones de los sobrenadantes bacterianos.

- Probar las bacterias que mejor antagonismo *in vitro* tuvieron en este estudio e inocularlas en semillas y plántulas de cacao, con el fin de establecer si estas presentan un amplio espectro antagónico.

# CAPÍTULO VI

# BIBLIOGRAFÍA

## 6.1 Bibliografía


Ahmadzadeh, M., & Sharifi Tehrani, A. (2009). Evaluation of *Pseudomonads fluorescent* for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. Biological Control, 48(2), 101–107. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2008.10.012

Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. Mycologia, 97(5), 1012–1022. https://doi.org/10.3852/mycologia.97.5.1012

Almeida, O. C. de; Chiacchio, F. P. B.; Rocha, H. M. (1997). Survival of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer on dried brooms of cacao (*Theobroma cacao* L.) in the State of Bahia. Revista Theobroma - Agrotrópica, 9(1), 23–28. Retrieved from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19981006016

Andebrhan, T., & Furtek, D. B. (1994). Random amplified polymorphic DNA ( RAPD ) analysis of *Crinipellis pemiciosa* isolates from different hosts. Ptant Pathology, 43, 1020–1027.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(4), 1563–1589. https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1563

Baker, R. E. D., & Crowdy, S. H. (1943). Studies in the Witches' Broom Disease of Cacao Caused by *Marasmius Perniciosus* Stahel. Part II. Field Studies and Control Methods. Retrieved from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19471600999

Baker R.E.D. & Holliday P. (1956). Phytopathological papers. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). Phytopathological Papers (1958030085th ed.). Kew, Surrey - UK: Commonwealth Mycological Institute. Retrieved from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19580300857

Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting, 1–6.

Bastos, C. N., & Evans, H. C. (1985). A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. Plant Pathology, 34(2), 306–312.

https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1985.tb01366.x

Calle, H., Cook, A. A., & Fernando, S. Y. (1982). Histology of witches´- broom caused in cacao by *Crinipellis perniciosa*. Cytology and Histology.

Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y., & Jurkevitch, E. (2007). Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 276(1), 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00878.x

Celeromics. (2008). Fórmula y Concentración de la Cámara de Neubauer. Retrieved March 26, 2018, from http://www.celeromics.com/es/resources/Technical Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion.php

Cerritos Flores, R. (2008). La especie como unidad evolutiva : uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación , con especial énfasis en microorganismos. Ecología Molecular, 325–350.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology, 71(9), 4951–4959. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005

Cronshaw, D. K., & Evans, H. C. (1977). Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. Pichilingue Research Station, Quevedo, Ecuador, 89, 193–200.

De Arruda, M. C. C., Ferreira, M. A. S. V., Miller, R. N. G., Resende, M. L. V., & Felipe, M. S. S. (2003a). Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosa* from different geographic origins and hosts. Mycological Research, 107(1), 25–37. https://doi.org/10.1017/S0953756202006895

De Arruda, M. C. C., Miller, R. N. G., Ferreira, M. A. S. V., & Felipe, M. S. S. (2003b). Comparison of *Crinipellis perniciosa* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. Plant Pathology, 52(2), 236–244. https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00819.x

Dover, G. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature, 299(5879), 111–117. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7110332

Dover, G. (1994). Concerted evolution, molecular drive and natural selection. Current

Biology, 4(12), 1165–1166. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00265-7

Duke News and Communications. (2011). Size Matters–in Virulent Fungal Spores–and Suggests Ways to Stop a Killer. Retrieved April 11, 2018, from https://mgm.duke.edu/home/2011-news-archives/size-matters-in-virulent-fungal-spores-and-suggests-ways-to-stop-a-killer/

Eder, J., & Cosio, E. G. (1994). Elicitors of Plant Defense Responses. International Review of Cytology, 148, 1–36. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62404-3

Elela, S. A., Nazar, R. N., & Abou, E. S. (1997). Role of the 5.8 S rRNA in ribosome translocation. Nucleic Acids Research, 25(9), 1788. Retrieved from http://nar.oxfordjournals.org/content/25/9/1788.short

Evans, H.C. & Bastos, C. N. (1980). Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) in cocoa cultivars. Transactions of the British Mycological Society, 74(3), 525–536. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80052-0

Evans, H. C. (1980). Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. Transactions of the British Mycological Society, 74(3), 515–523. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80051-9

Evans, H. C., Bezerra, J. L., & Barretob, R. W. (2013). Of mushrooms and chocolate trees: Aetiology and phylogeny of witches' broom and frosty pod diseases of cacao. Plant Pathology, 62(4), 728–740. https://doi.org/10.1111/ppa.12010

Evans, H. C., Edwards, D. F., & Rodríguez, M. (1977). Research on cocoa diseases in ecuador: Past and present. Pans, 23(1), 68–80. https://doi.org/10.1080/09670877709412399

Evans, H. C., Holmes, K. A., Phillips, W., & Wilkinson, M. J. (2002). What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? Mycologist, 16(4), 148–152. https://doi.org/10.1017/S0269915X02004093

Frias, G. ., Purdy, L. ., & Schmidt, R. . (1991). Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. Plant Disease. https://doi.org/10.1094/PD-75-0552

Frias, G. A. (1987). An Inoculation Method to Evaluate Resistance to Witches' Broom Disease of Cacao. UNIVERSITY OF FLORIDA. Retrieved from

https://ia801206.us.archive.org/16/items/inoculationmetho00fria/inoculationmetho00fria.pdf

Fukui, R., Poinar, E., Bauer, P., Schroth, M., Hendson, M., Wang, X., & Hancock, J. (1994). Spatial colonization patterns and interactions of bacteria on inoculated sugar beet seed.pdf. Ecology and Epidemiology, 84(11), 1338–1345. Retrieved from https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1994Articles/Phyto84n11_1338.pdf

Garces, C. O. (1946). La Escoba de Bruja del Cacao. Revista Facultad Nacional de Agronomia, 6(24), 339–369.

Gillings, M., & Holley, M. (1997). Repetitive element PCR fingerprinting ( rep-PCR ) using enterobacterial repetitive intergenic consensus ( ERIC ) primers is not necessarily directed at ERIC elements. Letters in Applied Microbiology, 25, 17–21.

González Monroy, R. M., & Rojas Martínez, A. E. (2014). La relevancia evolutiva de los ecotipos. Elementos, 21(95), 49–54. Retrieved from http://www.elementos.buap.mx/num95/htm/49.htm

Griffith, G. W., & Hedger, J. N. (1994). Dual culture of *Crinipellis perniciosa* and potato callus. European Journal of Plant Pathology, 100(6), 371–379. https://doi.org/10.1007/BF01874805

Griffith, G. W., Nicholson, J., Nenninger, A., Richard, N. B., & Hedger, J. N. (2003). Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. New Zealand Journal of Botany, 41(3), 423–435. https://doi.org/10.1080/0028825X.2003.9512860

Griffith G. W. & Hedger J.N. (1994). The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa.* Heredity, 72(3), 278–289. https://doi.org/10.1038/hdy.1994.38

Gutiérrez-Román, M. I., Holguín-Meléndez, F., Dunn, M. F., Guillén-Navarro, K., & Huerta-Palacios, G. (2015). Antifungal activity of *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 purified chitinolytic enzymes and prodigiosin against *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka in banana (*Musa spp.*). BioControl, 60(4), 565–572. https://doi.org/10.1007/s10526-015-9655-6

Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G. (1996). Resistance Gene-Dependent Plant

Defense Responses. The Plant Cell, 8(10), 1773. https://doi.org/10.2307/3870229

Hedger, J. N., Pickering, V., & Aragundi, J. (1987). Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*). Transactions of the British Mycological Society, 88(4), 533–546. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(87)80037-2

Hidalgo, Z. K. S. (2005). Determinación de la diversidad genética de *C. perniciosa*, causante de la escoba de bruja del cacao usando marcadores moleculares de RAPD. UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL.

Holliday, P. (1970). *M. perniciosa* (witches' broom disease of cacao). Retrieved March 21, 2018, from https://www.cabi.org/isc/datasheet/16054

Holliday, P. (1980). Fungus diseases of tropical crops. (T. U. K. by C. and Company, Ed.). Egham - England: Dover Publications. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=FhLxn8WPCS8C&oi=fnd&pg=PR9&dq=Fungus+Diseases+of+Tropical+Crops&ots=VFKqvqUVG5&sig=Han7ZX43X3FHkUmdsir6cZFm3Uw#v=onepage&q=Fungus Diseases of Tropical Crops&f=false

Holliday P. (1998). Crinipellis perniciosa. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute (Great Britain) C.A.B. International. Mycological Institute., 223. Retrieved from https://www.cabi.org/isc/abstract/20056400223

Hulton, C. S. J., Higgins, C. F., & Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria. Molecular Microbiology, 5(4), 825–834. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x

Jackson, A. O., & Taylor, C. B. (1996). Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the Interface. The Plant Cell, 8(10), 1651–1668. https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1651

Jones, J. D., Grady, K. L., Suslow, T. V, & Bedbrook, J. R. (1986). Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens.* The EMBO Journal, 5(3), 467–473. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04235.x

Kauserud, H., Colman, J. E., & Ryvarden, L. (2008). Relationship between basidiospore

size, shape and life history characteristics: a comparison of polypores. Fungal Ecology, 1(1), 19–23. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2007.12.001

Lana, T. G. (2004). Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis perniciosa*. Microbiologia (Madrid). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

Landry, B. S., Hubert, N., Etoh, T., Harada, J. J., & Lincoln, S. E. (1991). A genetic map for Brassica napus based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. Genome, 34(4), 543–552. https://doi.org/10.1139/g91-084

Lewis, M. A. H. and L. A. (1996). Deep-Level Diagnostic Value of the rDNA-ITS Region.

López, M. S. V. H. P. U. y M. S. J. A. S. (1991). Enfermedades del Cacao. In IICA-CIDIA (Ed.), Enfermedades del Cacao (5th ed., pp. 14–17). La Lima - Cortés: Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=hGgqAAAAYAAJ&oi=fnd&pg=PA7&dq=Enfermedades+del+Cacao.+&ots=ibdNeyPmPr&sig=5M7T-Ze9VHnrWhabd9b2Lg27NfA#v=onepage&q=Enfermedades del Cacao.&f=false

Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., & de Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60(7), 2286–2295. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8074510

Maddison, A. C., Macias, G., Moreira, C., Arias, R., & Neira, R. (1995). Cocoa production in Ecuador in relation to dry-season escape from pod rot caused by *Crinipellis perniciosa* and *Moniliophthora roreri*. Plant Pathology, 44(6), 982–998. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02657.x

Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., … Sabatier, U. P. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of Streptococcus pneumoniae. Nucleic Acids Research, 20(13), 3479–3483. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC312505/pdf/nar00087-0197.pdf

Mauch-Mani, B., & Slusarenko, A. J. (1993). Arabidopsis as a model host for studying plant-pathogen interactions. Trends in Microbiology, 1(7), 265–270. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8162407

Meinhardt, L. W., Rincones, J., Bailey, B. A., Aime, M. C., Griffith, G. W., Zhang, D., & Pereira, G. A. G. (2008). *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? Molecular Plant Pathology, 9(5), 577–588. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00496.x

Melnick, R. L., Suárez, C., Bailey, B. A., & Backman, P. A. (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from Theobroma cacao as potential biological control agents of cacao diseases. Biological Control, 57(3), 236–245. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.03.005

Monreal, J., & Rees, E. T. (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. Can. J. Microbiol., 15, 689–696.

Nemec, A., Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., Vrestiakova, E., Jezek, P., & Sedo, O. (2016). Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus Acinetobacter with the proposal of Acinetobacter courvalinii sp. Nov. (genomic species 14 sensu Bouvet and jeanjean), Acinetobacter dispersus sp. nov. (genomic species 17), Acinetobacter modes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(4), 1673–1685. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000932

Neto, P. A. S. P., Azevedo, J. L. De, & Caetano, L. C. (2004). Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas, 3(4), 69–72. Retrieved from http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85630404%5CnComo

Ohno, S. (1990). Intrinsic evolution of proteins. The role of peptidic palindromes. Rivista Di Biologia, 83(2–3), 287–291, 405–410. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2128128

Orozco, C. A., S, C. O., & Rivera, F. A. (2012). Evaluación microbiológica y molecular de *Moniliophthora perniciosa* (Agaricales: Marasmiaceae). Boletín Científico Centro de Museos "Museo de Historia Natural," 15(1), 41–47. Retrieved from http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/35490/36142

Osorio S., C., Orozco C., C. A., López G., G. A., & Rivera P., F. A. (2012). Genetic variability of *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, comb. nov. (Agaricales – Marasmiaceae) in varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.). Acta

Agronómica, 61(2), 85–93.

Park, K. S., & Kloepper, J. W. (2000). Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. Biological Control, 18(1), 2–9. https://doi.org/10.1006/BCON.2000.0815

Pegler, D. . N. . (1978). *Crinipellis perniciosa* (Agaricales). Springer on Behalf of Royal Botanic Gardens, 32(4), 731–736. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/4120341

Penman, D., Britton, G., Hardwick, K., Collin, H. A., & Isaac, S. (2000). Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao.* Mycological Research, 104(6), 671–675. https://doi.org/10.1017/S0953756299001689

Pickering, V., & Hedger, J. N. (1987). Production of basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* in in vitro culture. Transactions of the British Mycological Society, 88(3), 404–406. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(87)80015-3

Purdy, L., & Schmidt, R. (1996). STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: Biology, Epidemiology, and Management. Annual Review of Phytopathology, 34(1), 573–594. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.573

Raaijmakers, J. M., Weller, D. M., & Thomashow, L. S. (1997). Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas spp.* in Natural Environments. Applied and Environmental Microbiology, 63(3), 881–887. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535555

Ramamoorthy, V., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2002). Induction of Defense Related Proteins in Tomato Roots Treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici. Plant Soil, 239: 55-68, 55–68.

Rocha, H. M., & Wheeler, B. E. J. (1985). Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). Plant Pathology, 34(3), 319–328. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1985.tb01368.x

Rudgard, S. A. (1986). Witches' broom disease on cocoa in Rondonia, Brazil: basidiocarp production on detached brooms in the field. Plant Pathology, 35(4), 434–442. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1986.tb02040.x

Silva, S. D. V. M., Luz, E. D. M. N., Almeida, O. C. de, Gramacho, K. P., & Bezerra, J. L. (2002). Redescripción de la sintomatología causada por *C. perniciosa* en cacaueiro. Agotrópica, 7–28.

Silva O, F. (2010). *Serratia marcescens*. Revista Chilena de Infectología, 27(3), 1–5. https://doi.org/10.4067/S0716-10182010000300005

Sinagap. (2016). Boletines Agroeconómicos. Retrieved March 20, 2018, from http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/situacionales-de-cultivo-2014

Somers, E., Vanderleyden, J., & Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. Critical Reviews in Microbiology, 30(4), 205–240. https://doi.org/10.1080/10408410490468786

Sreenivasan, T. N. (1989). Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by *Crinipellis perniciosa.* Plant Disease. https://doi.org/10.1094/PD-73-0478

Stahel, G. (1915). *Marasmius perniciosus* nov.spec.: the cause of the krulloten-disease of cacao in Suriname. Bulletin Departement van den Landbouw in Suriname. 33:1-78. Bulletin Departement van Den Landbouw in Suriname, 33(1), 78. Retrieved from http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=7965&Fields=All

Stearns, S. C., & Stephen, C. (1992). The evolution of life histories. Oxford University Press. Retrieved from https://books.google.com.ec/books/about/The_Evolution_of_Life_Histories.html?id=-NcNAZ06nNoC&redir_esc=y

Suarez-Capello, C., Delgado, R., Pozo, P. del, Vasco, A., Zambrano, J., Eskes, A. ., & Amores, F. M. (2006). Witches broom resistance screening of seedlings and clones in Ecuador: somo comparisons between natural infection in the field and artificial inoculations. Global approaches to cocoa germplasm utilization and conservation : final report of the CFC/ICCO/IPGRI project on " Cocoa Germplasm Utilization and Conservation : a global approach" (1998-2004) (pp. 151–157). Quevedo - Ecuador: Common Fund for Commodities. Retrieved from https://books.google.com.ec/books

Suarez Capello, C. (1977). Growth of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in-vivo AND in-vitro. Thesis presented in part fulfilment of the requirements for the Degree of

Doctor of Philosophy in the Faculty of Science of the University of London. University of London.

Surujdeo-Maharaj, S., Umaharan, P., Butler, D. R., & Sreenivasan, T. N. (2003). An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis perniciosa* in cocoa (*Theobroma cacao*). Plant Pathology, 52(4), 464–475. https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00865.x

Tovar, G. (1991). La escoba de bruja del cacao *Crinipellis perniciosa* (stahel singer): descripción de síntomas de la enfermedad. Facultad de Agronomia. Universidad Nacional de Colombia. AA 14490. Santa Fe de Bogotá, D.C, 8(1), 227–239.

Valen, L. Van. (2011). Ecological Species , Multispecies, and Oaks. Plant Taxonomy ( IAPT ), 25(2), 233–239.

Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 19(24), 6823–6831. https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823

Weising, K. (1995). DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press.

Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18(24), 6531–6535. https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213

Wheeler, B. E. J., & Mepsted, R. (1988). Pathogenic Variability Amongst Isolates of *Crinipellis perniciosa* from Cocoa (*Theobroma cacao*). Plant Pathology, 37(4), 475–488. https://doi.org/DOI 10.1111/j.1365-3059.1988.tb02105.x

White , Taylor John, T. D. B. S. B. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Research Gate, (January).

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefil as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18(22), 6531–6535. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332606/pdf/nar00206-0065.pdf

Wu, C.-Y., Chen, C.-L., Lee, Y.-H., Cheng, Y.-C., Wu, Y.-C., Shu, H.-Y., … Liu, S.-T. (2007). Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases. The Journal of Biological Chemistry, 282(8), 5608–5616. https://doi.org/10.1074/jbc.M609726200

# Financiamiento

El financiamiento para el desarrollo del proyecto de investigación "Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de *Moniliophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L., y el efecto antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs')", fue con el FONDO COMPETITIVO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA "FOCICYT" (UTEQ-AGRICOLA-2-FCA-IAGR-2017-18), otorgado por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, de la investigación: Actividad nematicida a *Radopholus similis* por rizobacterias nativas y comerciales del género *Pseudomonas spp*. *CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA #4.*

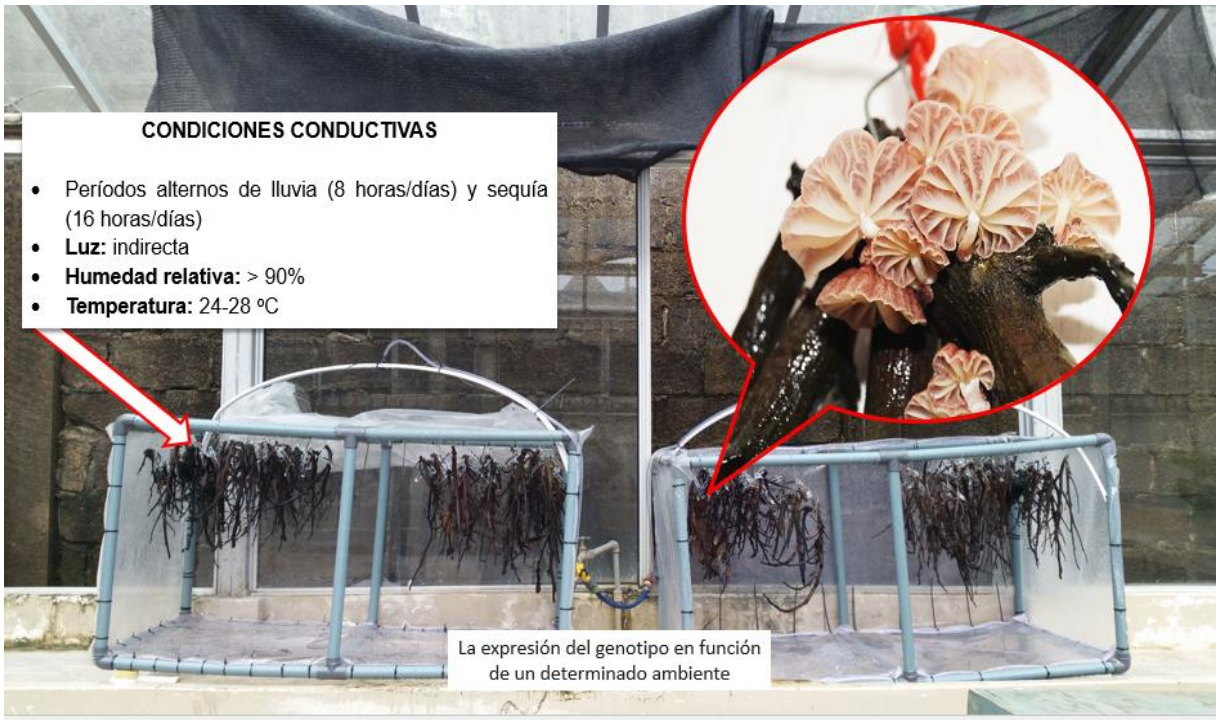
# CAPITULO VII

# ANEXOS

## 7.1 Anexos

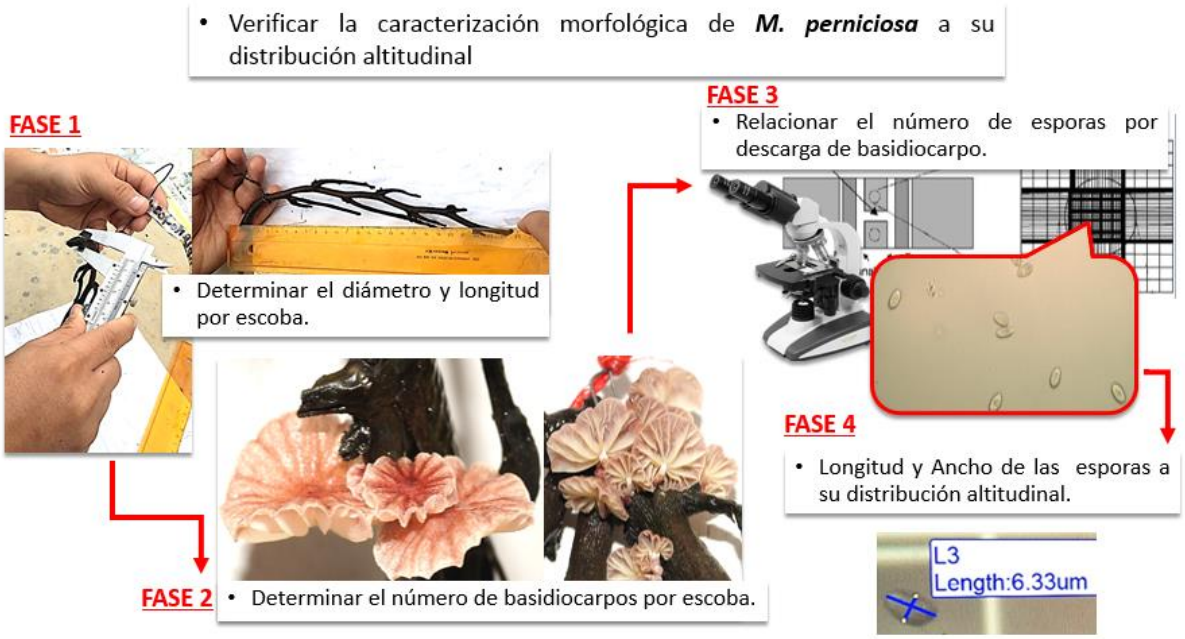
**Anexo1.** - Obtención de un banco de cepas de *M. perniciosa*

**Anexo 2.** – Construcción del Escobero

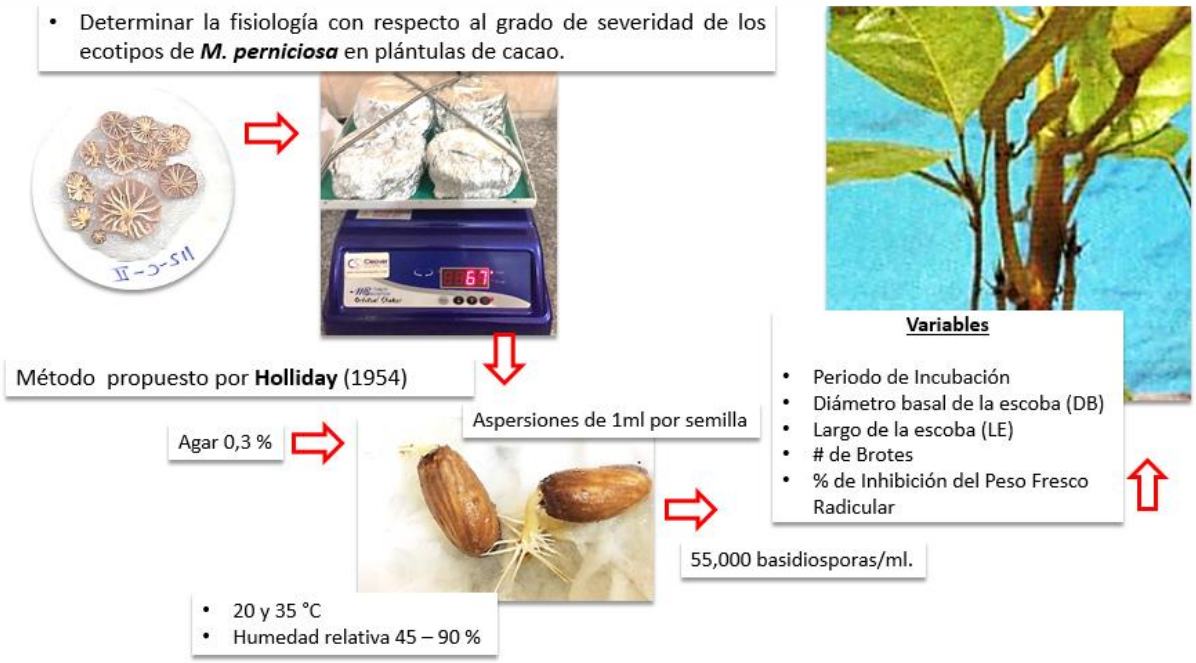


**Anexo3.-** Preparación de la Soluciones A (Contenedora de Basidiosporas)

**Anexo4. –** Verificación de los caracteres Morfológicos de *M. perniciosa*



## **Anexo5.-** Determinación de la Fisiología



**Diámetro del Epicótilo y Hipocotilo**

## **Anexo 6.** Protocolo del **DNeasy® Plant Mini Kit**

The DNeasy Plant Mini Kit can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year. For more information, please refer to the DNeasy Plant Handbook, which can be found at www.qiagen.com/handbooks. For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at www.qiagen.com/contact.

Notes before starting „

Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).

If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AP3/E concentrates.

Add ethanol to Buffer AW and Buffer AP3/E concentrates. „ Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples (≤100 mg wet weight or ≤20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser, or a mortar and pestle.

2. Add 400 µl Buffer AP1 and 4 µl RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation. Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

3. Add 130 µl Buffer AP2. Mix and incubate for 5 min on ice.

4. Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).

5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.

6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E, and mix by pipetting.

7. Transfer 650 µl of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at ≥6000 x g (≥8000 rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.

8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 µl Buffer AW, and centrifuge for 1 min at ≥6000 x g. Discard the flowthrough.

9. Add another 500 µl Buffer AW. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g. Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.

10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.

11. Add 100 µl Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at ≥6000 x g. 12. Repeat step 11.

## Anexo7. - PureLink® Quick Gel Extraction Kit Catalog

Intended Use for research use only. Not intended for any animal or human therapeuticor diagnostic use. Excising and Dissolving the Gel

1. Equilibrate a water bath or heat block to 50°C.

2. Excise a minimal area of gel containing the DNA fragment of interest.

3. Weigh the gel slice containing the DNA fragment using a scale sensitive to 0.001 g.

4. Add Gel Solubilization Buffer (L3) to the excised gel in the tube size indicated in the following table: Gel Tube Buffer L3 Volume ≤2% agarose 1.7-mL polypropylene 3:1 (i.e., 1.2 mL Buffer L3: 400 mg gel piece) >2% agarose 5-mL polypropylene 6:1 (i.e., 2.4 mL Buffer L3: 400 mg gel piece)

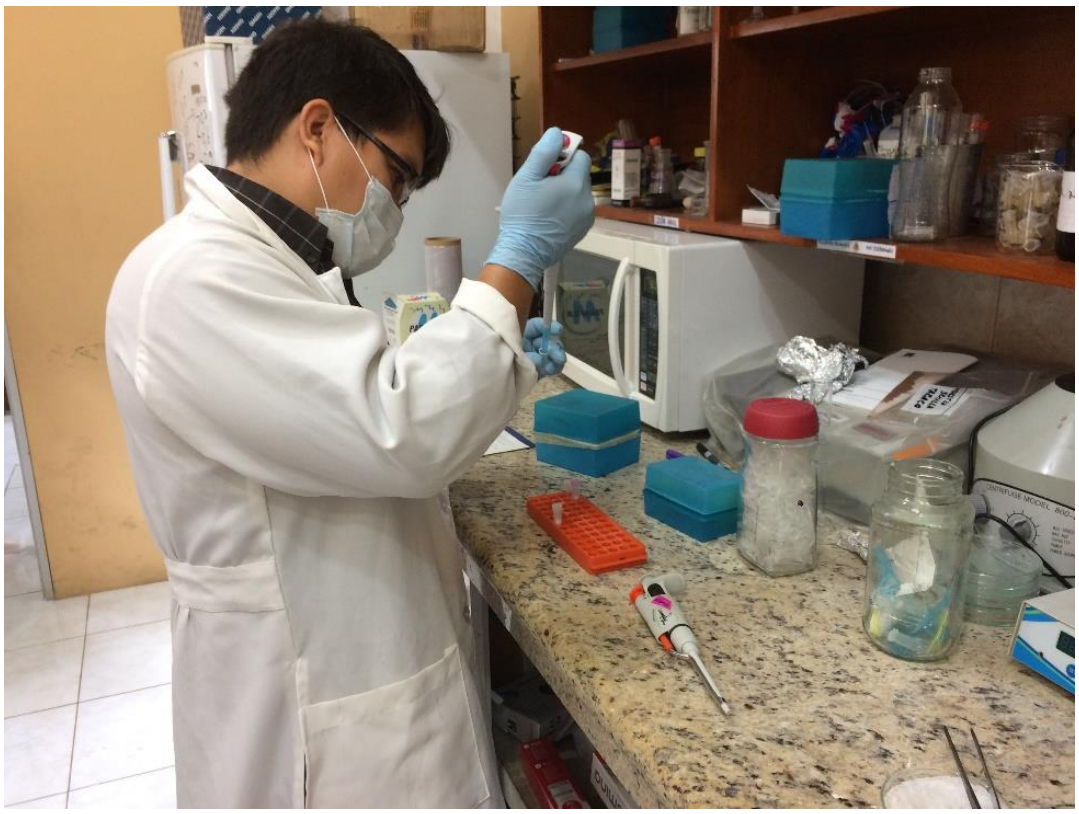
5. Place the tube with the gel slice and Buffer L3 into a 50°C water bath or heat block. Incubate the tube at 50°C for 10 minutes. Invert the tube every 3 minutes to mix and ensure gel dissolution. Note: High concentration gels (>2% agarose) or large gel slices may take longer than 10 minutes to dissolve.

6. After the gel slice appears dissolved, incubate the tube for an additional 5 minutes.

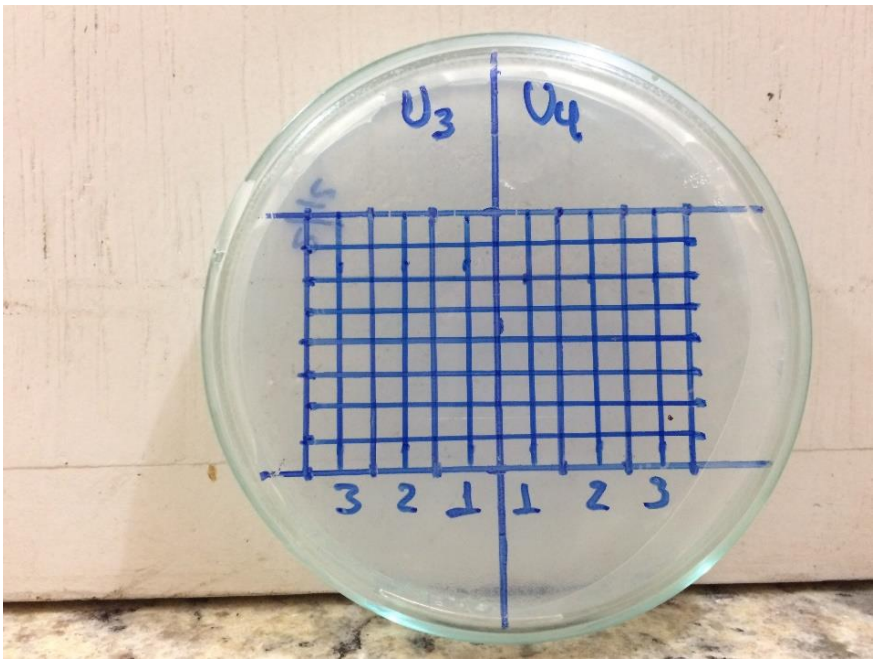
7. Optional: For optimal DNA yields, add 1 gel volume of isopropanol to the dissolved gel slice. Mix well.

8. Purify the DNA using a Centrifuge or Vacuum Manifold (see the following pages).

**Anexo 8.** Extracción de ADN



**Anexo9.-** Conteo de germinación de basidiosporas



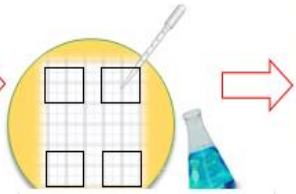
# Anexo10.- Evaluación del efecto antagonista de las PGPR in vitro

- Evaluar el efecto antagonista en condiciones in vitro por la aplicación de metabolitos secundarios de PGPR hacia ***M. perniciosa***.

Las bacterias crecerán en 50 ml del medio King B líquido a 150 rpm por 48 h

Sobrenadantes (50ml)

- 15 min a 90ºC
- 15 min a -40ºC



100,000 basidiosporas/ml.

**Variables Dependientes**

- Germinación
- Longitud del crecimiento de las basidiosporas