

Protocolo para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.* en frutos de cacao cv. 'Nacional' de la Amazonía ecuatoriana

Karina Carrera-Sánchez¹, Laura Mosquera Paredes¹, Michel Leiva-Mora² *Autora para correspondencia

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

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830 e-mail: karycarrera_sebasemy@hotmail.com

RESUMEN

Moniliophthora roreri es un patógeno del cacao (*Theobroma cacao* L.) que causa elevadas pérdidas económicas en Ecuador. El presente trabajo, se propuso como objetivo presentar un protocolo para el aislamiento del patógeno a partir de frutos de cacao cv. 'Nacional', que mostraban síntomas y signos de moniliasis. Los frutos se colectaron en fincas de Napo (Ecuador). Mediante cámara húmeda, se logró inducir profusamente la esporulación en la superficie de las lesiones seleccionadas. Los aislamientos se realizaron directamente a partir de conidios localizados en la superficie de frutos con aspecto pulverulento y color pardo. Se presentan los procedimientos para el aislamiento y se sugieren posibles aplicaciones.

Palabras clave: Amazonía, basidiomicetes, hongos, moniliasis, *Theobroma cacao* L.

Protocol for isolation of *Moniliophthora roreri* (Cif and Par) Evans *et al.* from cacao fruits cv. 'National' in the Ecuadorian Amazonia

ABSTRACT

Moniliophthora roreri is a pathogen of cocoa (*Theobroma cacao* L.) that causes high economic losses in Ecuador. This paper is intended to present a protocol for the isolation of the pathogen from cocoa fruits cv. 'National', showing signs and symptoms of disease. The fruits were collected on farms of Napo (Ecuador). By wet chamber, it was able to induce profusely, sporulation on the surface of selected lesions. The isolations were performed from conidia directly located on the surface of fruits with brown powdery appearance. Isolation procedures and suggested of possible applications are presented.

Key words: Amazonia, basidiomycetes, fungi, moniliasis, *Theobroma cacao* L.

INTRODUCCION

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es de gran importancia económica y social en Ecuador, pues aproximadamente el 13% de la población económicamente activa agrícola de este país se relaciona de algún modo con dicho cultivo (PROEcuador, 2013). La provincia de Napo se localiza al noreste de la región amazónica y en ella se encuentra localizadas familias indígenas cacaoteras que manejan orgánicamente este cultivo.

En la amazonia ecuatoriana, este cultivo no está exento de enfermedades como moniliasis (*Moniliophthora roreri*), mazorca negra (*Phytophthora palmivora* Butler), escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa* Aime &

Phillips-Mora), cuyos efectos causan en la producción pérdidas superiores al 60% (INIAP, 2012).

M. roreri es un hongo hemibiótrofo que provoca pudrición de los frutos en cualquier estado de desarrollo. La fase biotrófica, tiene lugar desde la germinación de los conidios hasta la invasión intercelular de la epidermis de las mazorcas y la fase necrótica transcurre cuando el crecimiento de la mazorca disminuye, el hongo invade las células y provoca necrosis interna y externa (Evans *et al.*, 1978; Thévenin y Trocmé, 1996).

Para el aislamiento de *M. roreri*, se han utilizado fragmentos de mazorcas que presentan síntomas y signos de la enfermedad.

Sin embargo, debido a la presencia de infecciones mixtas en ocasiones se detectan microorganismos contaminantes que limitan la eficiencia del aislamiento. Evans (1981), describió un procedimiento para lograr el aislamiento directo de *M. royeri* a partir de conidios localizados en la superficie de las lesiones de frutos enfermos. De igual forma, otros autores como Evans *et al.* (2003) mencionan el aislamiento a partir de colocar fragmentos de frutos directamente en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. Sin embargo, estos autores no describen un protocolo detallado que defina las variedades de cacao, los síntomas y signos que deben seleccionarse, las condiciones necesarias para lograr el aislamiento monospórico, las condiciones de incubación para el crecimiento y conservación de los aislados ni definen las aplicaciones de su propuesta.

Considerando lo anterior, para disponer de una colección de aislados de *M. royeri* que permita realizar estudios de interacción planta-patógeno, desarrollar herramientas para el mejoramiento genético en la búsqueda de cultivares resistentes, así como apoyar la actividad docente se hace necesario contar con un protocolo que describa los procedimientos requeridos para lograr aislados monospóricos del agente causal de la moniliasis del cacao y que pueda aplicarse en las condiciones agroecológicas únicas de la amazonía.

En base a la problemática anterior, el presente trabajo se propuso como objetivo presentar un protocolo para el aislamiento de *M. royeri* a partir de frutos de cacao cv. 'Nacional' de la Amazonía ecuatoriana con síntomas y signos de moniliasis.

MATERIALES

Este trabajo se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en Puyo - Pastaza – Ecuador, en el periodo de Junio del 2013 a Julio del 2014. Mediante su aplicación se cuenta con una Colección de aislados del patógeno que permitirá el desarrollo de trabajos futuros.

Material biológico

Para efectuar los aislamientos se tomaron

frutos de cacao cv. 'Nacional', con síntomas y signos de moniliasis. Para identificar la presencia y tipo de síntoma externo en el fruto se empleó la escala descriptiva propuesta por Sánchez *et al.* (1987) que incluye seis grados: 0. Fruto sano, 1. Presencia de puntos aceitosos (hidrosis), 2. Presencia de tumefacción o madurez prematura, 3. Presencia de mancha chocolate, 4. Presencia de micelio que cubre hasta la cuarta parte de la mancha parda, 5. Presencia de micelio que cubre más de la cuarta parte de la mancha chocolate.

Equipos y materiales utilizados

Para el desarrollo del protocolo de aislamiento se usaron:

- sacabocados,
- escalpelos,
- microscopio estereoscopio binocular (modelo A.KRAÜSS Optic GmbH),
- microscopio clínico (Meiji Techno Co, modelo MT 4300H),
- cámara de flujo laminar (modelo LABCONCO),
- mechero de alcohol,
- cajas Petri de 96 mm de diámetro,
- frasco lavador,
- aguja de inoculación,
- balanza analítica (modelo ADAM®),
- vaso de precipitado (Glassco) de 500 ml de capacidad,
- espátula de acero inoxidable,
- Erlenmeyer (Citoglass) de 100 y 500 ml,
- plato agitador calentador (modelo WiseStir®),
- autoclave (modelo WiseClave®),
- incubadora (modelo, Memmert),
- porta objetos (ClearGlass, Cat.No 7105),
- cubre objetos (B&C) de 22x22 mm.

Otros insumos

- Agua destilada estéril,
- agua estéril, alcohol al 70% (v/v),
- Medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (Difco Ref.: 213400),
- papel filtro (*Whatman 903*®),
- Parafilm®,
- alcohol industrial,
- lacto-fenol (fenol 20 g, ácido láctico 20 g, glicerol 40 g, agua 20 ml),
- Sulfato de estreptomycin (NOVA BACTER 100), añadido al medio del cultivo PDA (Difco Ref.: 213400), a razón de 0.5 g l⁻¹ de ingrediente activo.

PROCEDIMIENTO

Para la recolección e identificación de las mazorcas con síntomas de moniliasis, el montaje de cámara húmeda y la preparación de medios de cultivo y soluciones se siguieron los siguientes procedimientos:

I-Recolección del material vegetal

1. Recolectar e identificar las mazorcas con síntomas de moniliasis en grado 3 (presencia de mancha chocolate), grado 4 (presencia de micelio que cubre hasta la cuarta parte de la mancha parda) y grado 5 (presencia de micelio que cubre hasta más de la cuarta parte de la mancha chocolate) acorde con los grados de la escala de evaluación confeccionada por Sánchez *et al.* (1987).

2. Realizar observación directa del crecimiento del hongo en las mazorcas de cacao mediante inspección visual.

3. Obtener segmentos de cacao con parte enferma y sana mediante la utilización de cuchillos y sacabocados.

II-Aislamiento y purificación

1. Lavar en agua corriente durante 15 minutos.

2. Tomar los fragmentos de tejido y colocarlos en un Erlenmeyer de 100 ml de capacidad con 80 ml de agua desionizada estéril y colocar un tapón de caucho. Agitar vigorosamente durante 5 minutos y decantar.

3. Volver a repetir el paso anterior tres veces sucesivas cambiando el agua en cada caso.

4. Desinfectar los fragmentos de tejido con alcohol al 70% durante 2 minutos.

5. Lavar nuevamente los fragmentos de tejido con agua desionizada estéril durante dos minutos.

6. Colocar los fragmentos de tejido en un papel de filtro estéril en cabina de flujo laminar, para eliminar el exceso de humedad.

7. Colocar los fragmentos de tejido en cámaras húmedas.

8. Identificar las cajas Petri con un código numérico según se corresponda con los datos de la muestra (finca, número de la muestra y la fecha de la recolección).

9. Colocar las cámaras húmedas en incubadora a 25°C durante 5 días y revisarlas diariamente hasta que aparezca crecimiento fúngico en las muestras.

10. Elaborar el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (Difco Ref.: 213400). Antes de ser vertido en placa, añadir Sulfato de Estreptomina a razón de 0.5 g l⁻¹ de ingrediente activo.

11. Verter el medio de cultivo en las cajas Petri en cámara de flujo laminar, dejar hasta que solidifique el medio de cultivo.

12. Identificar la presencia de crecimiento fúngico por medio del examen bajo el microscopio estereoscópico.

13. Aislar conidios con la ayuda de una aguja entomológica, bajo el microscopio estereoscópico y colocarlos en cajas Petri con medio de cultivo PDA para establecer cultivos monospóricos.

14. Colocar las cajas Petri en incubadora a 25°C durante 5-7 días de incubación. Observar la presencia de una colonia libre de contaminantes microbianos de cada aislamiento, purificar por transferencia a un nuevo medio de cultivo si se requiere.

III-Identificación y conservación

1. Establecer microcultivos acorde con la técnica sugerida por Riddel (1950), para proceder a la caracterización morfológica de las estructuras fúngicas e identificar la presencia del patógeno.

Nota: Las principales características morfológicas de *M. royeri* son: hifas hialinas de paredes delgadas, septadas, después se tornan color café, micelio vegetativo que posee tabiques con doliporos. Los conidios son fácilmente removibles, de pared gruesa, color amarillo pálido cuando están inmaduros o café oscuro en su madurez, pueden ser de forma globosa o elíptica, se forman basipetamente en cadenas simples o

ramificadas cada una con 4-10 conidios envueltos en la pared celular original (Evans *et al.*, 1978; Thévenin y Trocmé, 1996).

2. Colocar fragmentos de micelios de las colonias puras en tubos de ensayo que contengan 5 ml del medio de cultivo PDA e incubar a 25°C por 15 días.

3. Colocar los tubos de ensayo a 4°C para su conservación.

IV-Posibles aplicaciones del protocolo

1. Fomentar colecciones de cultivos de *M. royeri* del cacao asociados con frutos y con ello preservar la diversidad fúngica de la Amazonía ecuatoriana.

2. Apoyar programas de mejoramiento genético y selección en la búsqueda de cultivares de cacao resistentes o tolerantes a *M. royeri*.

3. Apoyar actividades prácticas con fines docentes en particular a las asignaturas de Microbiología agrícola y Fitopatología.

4. Aislar hongos asociados con frutos de cacao con potencial antagónico frente a los agentes causales de la pudrición de las mazorcas.

5. Determinar la susceptibilidad *in vitro* de las cepas frente a fungicidas (químicos y biológicos).

6. Realizar caracterización genética y definir origen evolutivo de las cepas de *M. royeri*.

7. Estudiar los determinantes de agresividad y avirulencia en las poblaciones *M. royeri* de la Amazonía ecuatoriana.

REFERENCIAS

Evans HC, Stalpers JA, Samson RA, Benny GL (1978) On the taxonomy of *Monilia royeri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Can J Bot 56: 2528-2532

Evans C (1981) Pod Rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) royeri*. Phytopathological 24: 44

Evans HC, KA Holmes, A P Reid (2003) Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa Plant Pathology (2003) 52: 476-485

INIAP (2012) Guía del manejo Integrado de enfermedades del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Amazonia. Orellana. Ecuador

PROEcuador (2013) Análisis del Sector cacao y elaborados. pp. 6. Quito, Ecuador

Riddel, R (1950) Permanent strained mycological preparations obtained by slide cultures. Micology 42: 265-270

Sánchez JA, Brenes O, Phillips W, Enríquez G (1987) Metodología para la inoculación de mazorcas de cacao con el hongo *Moniliophthora (Monilia) royeri*. En: Proceedings of the Tenth International Cocoa Research Conference, pp. 467-72, 1988. Cocoa Producers' Alliance, Santo Domingo

Thévenin JM, Trocmé O (1996) La moniliasis del cacao. Plantations, recherche, développement 3 (6): 403-406

Recibido: 04-07-14

Aceptado: 10-09-14