

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL HONGO *Moniliophthora roreri*
(MONILIA) EN FRUTOS DE *Theobroma cacao* L. (CACAO) DEL CULTIVAR
SAN JOSE DEL REAL DE LA CARRERA, USULUTAN.**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:
ADRIANA BEATRIZ GONZALEZ FIGUEROA
ALBA DIANA ROBLE ORELLANA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

ABRIL, 2014

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ.

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

COORDINADORA DE AREA ANALISIS MICROBIOLOGICO.

MSc. Coralia de Los Ángeles González de Díaz

COORDINADORA DE AREA QUIMICA AGRICOLA.

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

DOCENTES DIRECTORES

Dra. Vianney Castañeda De Abrego

MSc. Amy Elieth Moran Rodríguez

Lic. Ana Ingrid Morazán Chávez

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios todopoderoso por haberme guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en tiempos difíciles, por darme fuerzas en momentos de debilidad por estar ahí siempre que necesitaba ayuda.

Le doy gracias a mis padres Roque González y Consuelo Figueroa por brindarme su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera, por ser mi ejemplo a seguir en la vida por estar ahí siempre cuando los he necesitado.

A mis hermanos Roque González, Eduardo González y Kevin por su apoyo y paciencia a lo largo de mi carrera, por volverse mi impulso para seguir adelante.

A la familia Fuentes Mejía por ser un puente para que lograra avanzar en mis estudios por brindarme su ayuda cuando más lo necesitaba. Gracias.

A mi compañera Diana Roble por haber estado ahí luchando contra todo juntas hasta el final, mil gracias.

A todos mis amigos que están ahí siempre apoyándome, dándome ánimo para seguir adelante.

A mis docentes directores Msc Amy Moran, Dra. Vianney y Lic. Ingrid Morazán por su ayuda a lo largo de la investigación. Gracias

Gracias a todas aquellas personas que contribuyeron para que lograra mi meta.

Adriana Beatriz González Figueroa

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios todopoderoso por todas las bendiciones, la fortaleza y amor incondicional, el cual estuvo con migo cada día y sin el cual nada sería posible.

A la persona más amada para mi Mario Roble mi amado papa por todo su apoyo, y amor incondicional al cual dedico este triunfo porque sé que desde el cielo celebra con migo.

Agradezco grandemente a Marlon Avelar por toda su ayuda y apoyo, por cada palabra de ánimo que me brindo, gracias Mar.

A mi mama Rosa Alba de Roble y hermanos (Jessica, Abigail, Carlos y Henry) por sus consejos, ayuda, y sin los cuales no hubiese podido emprender este viaje.

A mi amiga Adriana González, juntas podemos decir que a pesar de todo logramos cumplir este sueño.

A todos mis amigos y amigas los cuales han estado para mí cuando más los necesito.

A mi Grupo ABT (Aurely, Cecy, Bea, Juan Carlos, Any, Ana,) por su amistad, aprecio y comprensión, Gracias por permitirme ser miembro de esta familia.

A mis docentes directores Msc. Amy Moran, Dra. Vianney Abrego y Lic. Ingrid Morazán por su ayuda a lo largo del trabajo. Gracias.

Ahora puedo decir Gracias Diosito!!! Gracias a ti lo logramos.

Alba Diana Roble Orellana

INDICE

RESUMEN

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCIÓN	XXI
------------------	-----

CAPITULO II	23
--------------------	-----------

2.0 OBJETIVOS	24
---------------	----

2.1 OBJETIVO GENERAL	24
----------------------	----

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
---------------------------	----

CAPITULO III	25
---------------------	-----------

3.0 MARCO TEORICO	26
--------------------------	-----------

3.1 El Cacao (Theobroma cacao L.)	26
-----------------------------------	----

3.1.1 Origen e Historia	26
-------------------------	----

3.1.2 Características de la Planta	26
------------------------------------	----

3.1.2.1 Raíz	26
--------------	----

3.1.2.2 Tallo	27
---------------	----

3.1.2.3 Hojas	28
---------------	----

3.1.2.4 Flores	28
----------------	----

3.1.2.5 Frutos	29
----------------	----

3.1.2.6 Las semillas	30
----------------------	----

3.1.3 Variedades o Tipos Principales de Cacao	30
---	----

3.1.3.1 Cacao Criollo	31
-----------------------	----

3.1.3.2 Cacao Forastero	31
-------------------------	----

3.1.3.3 Cacao Variedad Trinitaria	32
-----------------------------------	----

3.1.4 Condiciones Adecuadas para el Cultivo de Cacao	33
--	----

3.1.5 Cosecha	33
---------------	----

3.1.6 Aspectos de mercado	34
---------------------------	----

3.1.6.1 Demanda	34
-----------------	----

3.1.6.2 Oferta	35
3.1.7 cultivo de cacao en el salvador	36
3.1.7.1 Historia del cacao en El Salvador	36
3.1.8 Hacienda San José del Real La Carrera	37
3.2 enfermedades del cacao (Theobroma cacao L)	38
3.2.1 La Moniliasis	40
3.2.2 Importancia Económica	40
3.2.3 Origen de la enfermedad y distribución geográfica	41
3.2.4 Condiciones para que se desarrolle la Monilia	42
3.2.5 Transmisión de Monilia	43
3.2.6 Agente causal	43
3.2.6.1 Etiología	44
3.2.6.2 Taxonomía	44
3.2.6.3 Morfología	44
3.2.6.4 Ciclo de vida del patógeno	45
3.2.6.5. Aislamiento	47
3.2.6.6 Caracterización	47
3.2.7 Sintomatología	47
3.2.8 Epidemiología	52
3.2.9 Rango de hospederos	53
3.2.10 Control de la Moniliasis (Manejo Integrado)	53
3.2.11 Recomendaciones para el control de Monilia	54
3.2.11.1 Control cultural (podas, remoción de frutos)	54
3.2.11.2 Control químico	56
3.2.11.3 Combate por medio de resistencia genética	57
3.2.12 La poda: la práctica maestra en el control de la Moniliasis	58
CAPITULO 4	59
4.0. DISEÑO METODOLOGICO	60
4.1 Tipo de estudio	60

4.2 Parte Experimental	61
4.2.1 Aislamiento del hongo <i>Moniliophthora roreri</i> en frutos de cacao sospechosos de enfermedad.	61
4.2.1.1 Colección de muestras	61
4.2.1.2 Manipulación de las muestras (anexo N°7)	61
4.2.1.2.1 Desinfección de muestras	61
4.2.1.2.2 Siembra de la muestra	62
4.2.1.2.3 Identificación de aislamientos mediante el microscopio óptico.	62
4.2.1.2.4 Procedimiento tinción Gram	63
4.2.1.2.5 Procedimiento tinción de azul de lactofenol:	63
4.2.1.2.6 Prueba de crecimiento en Agar V8 y Agar V8 extracto cacao.	63
4.2.1.2.7 Crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> a diferentes concentraciones de Solución de Gentamicina Sulfato 80 mg/ 2 mL	64
4.2.2 Caracterización morfológica de los aislamientos de <i>Moniliophthora roreri</i>	64
4.2.2.1 Evaluación Morfológica a partir de los aislamientos obtenidos de <i>Moniliophthora roreri</i> .	64
4.2.2.1.1 Características Macroscópicas.	64
4.2.2.1.2 Características Microscópicas	65
4.2.2.2 Caracterización con microcultivo	65
4.2.2.3 Observación por Microscopia Electrónica de Barrido	66
4.2.3 Protocolo de aislamiento y caracterización de <i>M. roreri</i>	68
4.2.4 Almacenamiento de cepas de <i>Moniliophthora roreri</i>	68
CAPITULO V	69
5.0 Resultados y discusión de resultados	70
5.1 Colección de muestras	70

5.2 Aislamiento del hongo <i>Moniliophthora roreri</i> en frutos de cacao sospechosos de enfermedad.	72
5.3 Prueba Preliminar (M1)	73
5.3.1 Morfología Macroscópica	73
5.3.2 Aislamiento de flora acompañante	75
5.4 MUESTRO 1	77
5.4.1 Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i> a partir de Mx1-1	81
5.4.1.1 Prueba de crecimiento en Agar V8 y Agar V8 extracto cacao.	83
5.4.1.2 Crecimiento de M. roreri a diferentes concentraciones de solución de Gentamicina Sulfato 80 mg/ 2mL.	84
5.4.1.3 Identificación mediante el microscopio óptico	85
5.4.2 Caracterización de <i>Moniliophthora roreri</i>	86
5.4.2.1 Evaluación Morfológica macroscópica Mx1-1	86
5.4.2.2 Evaluación morfológica microscópica Mx1-1	87
5.4.2.3 Micro cultivos	89
5.4.2.4 Microscopia Electrónica de Barrido	90
5.4.2.4.1 Esporas Globosas	90
5.4.2.4.2 Esporas subglobosas	91
5.4.2.4.3 Esporas Elípticas	92
5.5 MUESTRO 2	93
5.5.1 Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i> a partir de muestras Mx2-14, Mx2-16, Mx2-18, Mx2-19, Mx2-21, Mx2-22	97
5.5.2 Caracterización de <i>Moniliophthora roreri</i>	99
5.5.2.1 Evaluación Morfológica Macroscópica MX2-14	99
5.5.2.2 Evaluación Morfológica Macroscópica MX2-16	101
5.5.2.3 Evaluación Morfológica Macroscópica MX2-18	103
5.5.2.4 Evaluación Morfológica Macroscópica MX2-19	105
5.5.2.5 Evaluación Morfológica Macroscópica MX2-21	107

5.5.2.6 Evaluación Morfológica Macroscópica MX2-22	109
5.5.2.7 Evaluación Morfológica Microscópica de Muestreo 2 (Representativa para las 6 colonias)	111
5.5.2.8 Realización de Microcultivos	112
5.5.2.9 Microscopia Electrónica de Barrido	113
5.5.2.9.1 Esporas Globosas	113
5.5.2.9.2 Espora Subglobosas	114
5.5.2.9.3 Esporas Elípticas	115
5.6 MUESTREO 3	116
5. 6.1 Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i> a partir de muestras Mx3-1, Mx3-2, Mx3-3, Mx3-7, Mx3-8, Mx3-9 y Mx3-18	120
5.6.2 Caracterización de <i>Moniliophthora roreri</i>	121
5.6.2.1 Evaluación Morfológica Mx3-1	121
5.6.2.2 Evaluación Morfológica Mx3-2	123
5.6.2.3 Evaluación Morfológica Mx3-3	125
5.6.2.4 Evaluación Morfológica Mx3-7	127
5.6.2.5 Evaluación Morfológica Mx3-8	129
5.6.2.6 Evaluación Morfológica Mx3-9	131
5.6.2.7 Evaluación Morfológica Mx3-18	133
5.6.2.8 Evaluación morfológica Microscópica de Muestreo 3 (Representativa para las 7 colonias)	135
5.6.2.9 Realización de micro cultivos	136
5.6.2.10 Microscopia Electrónica de Barrido	137
5.6.2.10.1 Esporas Globosas	137
5.6.2.10.2 Esporas subglobosas	138
5.6.2.10.3 Esporas elípticas	139
5.7 Protocolo de aislamiento y caracterización de <i>M. roreri</i>	140
5.12 Almacenamiento de cepas de <i>Moniliophthora roreri</i>	140
CAPITULO VI	142

6.0 Conclusiones	143
CAPITULO VII	145
7.0 Recomendaciones	146
CAPITULO VIII	148
Bibliografía	149
Glosario	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Protocolo de Aislamiento y Caracterización de *M. roreri*
2. Ubicación del cultivar San José del Real La Carrera en Usulután
3. Ficha de identificación de Muestras
4. Reconocimiento de síntomas según la edad del fruto de los cuales se aisló *M. roreri*
5. Preparación de microcultivos de *M. roreri* para la identificación.
6. Procesamiento de las muestras para aislar *M. roreri*
7. Esquema de desinfección y siembra de muestras para el aislamiento de *M. roreri*
8. Rango de colores para evaluar los aislamientos morfológicamente con respecto al color de las colonias
9. Esquema de preparación de Tinción Gram
10. Esquema para preparación de Tinción con azul de lactofenol
11. Forma de las esporas en los diferentes aislamientos de *M. roreri*
12. Procedimiento de Microscopia Electrónica de Barrido
13. Constancia de entrega Cepas de *M. roreri*
14. Preparación de Medios de cultivo
15. Materiales, equipos y reactivos.

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Pág.
1	Distribución del área total del cultivar de cacao	38
2	Muestreos y códigos de muestras analizadas	71
3	Características Macroscópicas y Microscópicas de <i>M. roreri</i>	72
4	Aislamiento de muestras del muestreo 1	78
5	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx1-1	88
6	Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i> de Muestreo 2	93
7	Aislamiento de <i>M. roreri</i> a partir de muestras positivas	97
8	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx2-14	100
9	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx2-16	102
10	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx2-18	104
11	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx2-19	106
12	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx2-21	108
13	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx2-22	110
14	Muestras de Muestreo 3	116
15	Aislamiento de <i>M. roreri</i> a partir de muestras positivas	120
16	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx3-1	122
17	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx3-2	124
18	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx3-3	126
19	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx3-7	128
20	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx3-8	130
21	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx3-9	132
22	Evaluación morfológica de <i>M. roreri</i> Mx3-18	134

INDICE DE FIGURAS

Fig. N°		Pág.
1	Raíz principal de una planta de cacao.	27
2	Morfología de tallo de <i>Theobroma cacao</i> L, y frutos	27
3	Morfología de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L	28
4	Morfología de botón floral de <i>Theobroma cacao</i> L	29
5	Fruto maduro de <i>Theobroma cacao</i> L	29
6	Semillas de <i>Theobroma cacao</i> L	30
7	Tipos principales de <i>Theobroma cacao</i> L	30
8	Fruto de <i>Theobroma cacao</i> L I del tipo criollo	31
9	Fruto de <i>Theobroma cacao</i> L de variedad forastero	32
10	Fruto de <i>Theobroma cacao</i> L de variedad trinitario	32
11	Cacaotales en El Salvador	37
12	Ruta de avance moniliasis de cacao	41
13	Estructuras microscópicas de <i>Moniliophthora roreri</i> (A) micelio con septo doliporo; (B) micelio dicariótico con septo doliporo; (C) meiosporas.	44
14	Ciclo de vida de <i>Moniliophthora roreri</i>	46
15	Fruto infectado menor a un mes con <i>Moniliophthora roreri</i>	48
16	Fruto (1-3 meses) infectado con <i>M. roreri</i>	49
17	Fruto (3-4 meses) infectado <i>M. roreri</i>	50
18	Fruto (mayor a 4 meses) infectado <i>M. roreri</i>	50
19	Síntomas internos y externos de moniliasis	51
20	Colección de muestras de cacao en el cultivar San José del Real de La Carrera en el departamento de Usulután	70
21	Crecimiento del raspado de la superficie de muestra momificada de <i>Theobroma cacao</i> en agar Papa Dextrosa. A y C parte frontal, B y D parte dorsal.	73

22	Crecimiento del raspado de la superficie de muestra momificada de Theobroma cacao en agar Papa Dextrosa. A y C parte frontal, B y D parte dorsal.	74
23	Aislamiento Aspergillus spp. (Hongo color verde). A y B morfología macroscópica. C morfología microscópica.	75
24	Aislamiento de Penicillium spp. (Hongo color gris). A y B morfología macroscópica. C morfología microscópica.	76
25	Aislamiento de Fusarium spp. (Hongo color blanco). A y B morfología macroscópica, C morfología microscópica.	76
26	Muestra de cacao Mx1-1 con signos y síntomas de moniliasis. A y B morfología macroscópica (b1, b2, b3) morfología microscópica de flora acompañante, (b4) morfología microscópica de Moniliophthora roreri	81
27	Aislamiento de Moniliophthora roreri de Mx1-1. (A) morfología macroscópica B y C morfología microscópica en tinción de Gram y tinción de Azul de lactofenol respectivamente.	82
28	Crecimiento de Moniliophthora roreri . A crecimiento en agar V8. B, crecimiento en agar V8 extracto cacao.	83
29	Crecimiento de Moniliophthora roreri sin gentamicina (A y B) y con diferentes concentraciones de gentamicina (C-H)	84
30	Tipos de esporas e hifas de Moniliophthora roreri vistas al microscopio óptico. (A) tinción Gram, (B) tinción Azul de lactofenol	85
31	Características macroscópicas (De la A a la H) de colonias de diferentes días de crecimiento de M. roreri de MX1-1	86
32	Microscopia óptica de secuencia de crecimiento de M. roreri . De la A a la H morfología microscópica de colonias de diferentes edades de Moniliophthora roreri	87

33	Caracterización con microcultivos de muestra de muestreo	89
	Características macroscópicas y microscópicas de <i>M. roreri</i>	
34	Esporas Globosas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> aisladas	
	Mx1-1 vistas en microscopio electrónico de barrido A	
	(1,900X), B (2,500X), C (6,000X) y D (7,000X).	90
35	Esporas Subglobosas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i>	
	aisladas Mx1-1 vistas en microscopio electrónico de barrido	
	A (800X), B (3,000X), C (4,000X) Y D (10,000X).	91
36	Esporas Elípticas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> aisladas	
	Mx1-1 vistas en microscopio electrónico de barrido A	
	(1,000X), B (3,000X), C (5,000X) Y D (10,000X).	92
37	Secuencia de Crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de	99
	Mx2-14.	
38	Secuencia de Crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de	101
	Mx2-16	
39	Secuencia de Crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de	103
	Mx2-18.	
40	Secuencia de Crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de	105
	Mx2-19.	
41	Secuencia de Crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de	107
	Mx2-21.	
42	Secuencia de Crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de	109
	Mx2-22	
43	Secuencia de Crecimiento microscópico de <i>M. roreri</i> del	
	muestreo 2	111
44	Caracterización con microcultivos de muestra de muestreo 2.	
	(A) microcultivos, (B) morfología Microscópica de las	
	colonias aisladas.	112

45	Esporas Globosas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> vistas en microscopio electrónico de barrido de muestro 2. A (1,500X), B (3,000X), C (3,000X) y D (10,000X)	113
46	Esporas Subglobosas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> vistas en microscopio electrónico de barrido de muestro 2. A (3,000X), B (3,000X), C (3,000X) y D (3,000X)	114
47	Esporas Elípticas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> vistas en microscopio electrónico de barrido de muestro 1A (3,000X), B (3,000X), C (3,000X) y D (3,000X).	115
48	Secuencia de crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de Mx3-1.	121
49	Secuencia de crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de Mx3-2.	123
50	Secuencia de crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de Mx3-3.	125
51	Secuencia de crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de Mx3-7	127
52	Secuencia de crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de Mx3-8	129
53	Secuencia de crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de Mx3-9	131
54	Secuencia de crecimiento macroscópico de <i>M. roreri</i> de Mx3-10.	133
55	Secuencia de crecimiento microscópico de <i>M. roreri</i> del muestreo 3.	135
56	Caracterización con microcultivos de muestra de muestreo 3. Características macroscópicas y microscópicas de <i>M. roreri</i>	136
57	Esporas Globosas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> vistas en microscopio electrónico de barrido de muestro 3. A	137

	(500X), B (1,500X), C (1,900X) Y D (7,000X)	
58	Esporas Subglobosas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> vistas en microscopio electrónico de barrido de muestra 3.A (1,500X), B (3,000X), C (5,000X) y D (10,000X)	138
59	Esporas Elípticas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> vistas en microscopio electrónico de barrido de muestra 3. A (1,500X), B (2,700X), C (3,000X) y D (10,000X)	139
60	Conservación de cepas de <i>Moniliophthora roreri</i> en caldo V8 y caldo BHI	141

Resumen

El presente estudio contiene los procedimientos que se llevaron a cabo para aislar y caracterizar el hongo *Moniliophthora roreri* (monilia) en frutos de *Theobroma cacao* L. (cacao) del cultivar proveniente de San José del Real de La Carrera en Usulután, hongo fitopatógeno que provoca grandes pérdidas económicas al propagarse a otros cultivos de cacao no infectados; Para el aislamiento del hongo *Moniliophthora roreri* se colectaron 62 muestras de cacao de edades entre 1 a 3 meses, sospechosos que presentaban síntomas de moniliasis, se caracterizó macroscópicamente mediante observación visual, haciendo las mediciones de sus dimensiones; así como las esporas al observar al microscopio, se realizó una caracterización ultra estructural con microscopia electrónica de barrido, a su vez se diseñó un protocolo con los pasos detallados para su aislamiento y caracterización.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico y en el laboratorio de Microscopia Electrónica de Barrido del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el periodo de mayo-septiembre de 2013.

Se logró aislar y caracterizar la cepa de *Moniliophthora roreri* teniendo 14 aislamientos positivos de los cuales se dejaron almacenadas cepas constituido por 10 crioviales con esporas de *Moniliophthora roreri* que pueden ser utilizarlo en investigaciones posteriores.

El aislamiento es más factible en frutos menores de 4 meses debido a que la moniliasis no ha infectado fruto de manera que este se vuelva susceptible al ataque de otros hongos que pueden intervenir en el aislamiento. De esta manera se logra tener un procedimiento estandarizado para el aislamiento y caracterización del hongo y así evitar la proliferación a otros cultivos de cacao.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La semilla del fruto que se obtiene de *Theobroma cacao* L. es el principal constituyente para la elaboración de chocolate y otros derivados, que son de importancia económica, sobre todo en países que se dedican al cultivo y exportación de éste. El Salvador, a pesar de ser el único país de Centroamérica que no exporta cacao en semillas, está desarrollando un plan de siembra de este cultivo para desarrollo económico, aprovechando la calidad de las variedades de cacao que posee, entre ellas la variedad “criollo” (de la cual existen dos tipos el antiguo originario de Sonsonate, Ízalco y el moderno originario de Usulután) la cual se caracteriza por ser materia prima en la elaboración de chocolate fino. ⁽²⁰⁾

Sin embargo el cultivo de cacao es amenazado por diversas enfermedades que afectan tanto su raíz, botón floral, hojas y fruto; destacándose entre las que afectan el fruto, la Moniliasis, cuyo agente causal el hongo *Moniliophthora roreri*, infecta a los frutos de cacao de diferentes edades, siendo capaz de afectar hasta el 95% de la producción total en un cacaotal, lo cual trae pérdidas económicas. ⁽¹²⁾

Debido a que en El Salvador no se cuenta con un protocolo estandarizado para el aislamiento y caracterización del hongo, el cual ayudaría a una pronta detección de la enfermedad y un pronto actuar de parte de los cacaocultores, se elaboró uno en donde se detallan los pasos y procedimientos a seguir para el aislamiento y caracterización de hongo *Moniliophthora roreri*, a partir de los frutos de cacao con síntomas de la enfermedad en cualquier edad del fruto; de un mes hasta cuatro meses de edad. Para esto, se colectaron muestras en San José del Real La Carrera en Usulután en el periodo de julio-septiembre de 2013, de las cuales se tomaron fragmentos de epicarpio de frutos con señales de la enfermedad.

Para el aislamiento del hongo ***Moniliophthora roreri*** se utilizaron medios agar V8, papa dextrosa y dextrosa sabouraud, reforzados con solución de Gentamicina sulfato 80mg/2ml para inhibir el crecimiento de los hongos contaminantes más comunes como ***Fusarium spp***, ***Phytophthora*** y ***Aspergillus spp***.

La caracterización se realizó haciendo uso de microcultivos en los cuales se identificaron las esporas e hifas de ***Moniliophthora roreri***, de acuerdo a su morfología microscópica. Además se observó en el microscopio electrónico de barrido (MEB) el micelio vegetativo y aéreo del hongo.

Estos procedimientos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico y en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de Barrido ambos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), y las muestras fueron colectadas en el cultivar San José del Real de La Carrera, Usulután. En el período de mayo-septiembre 2013.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar el hongo *Moniliophthora roreri* (Monilia) en frutos de *Theobroma Cacao* L. (Cacao) del Cultivar San José Del Real de La Carrera, Usulután.

2.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1. Realizar el aislamiento del hongo *Moniliophthora roreri* en frutos de cacaos colectados sospechosos de enfermedad.
- 5.2.2. Caracterizar morfológicamente los aislamientos de *Moniliophthora roreri* mediante caracterización microbiológica y ultraestructural.
- 5.2.3. Diseñar un protocolo estandarizado de los procesos de aislamiento y caracterización de *Moniliophthora roreri* en muestras de cacao.
- 5.2.4. Conservar cepas de *Moniliophthora roreri* para formar un banco de cepas en el Centro de Investigación Desarrollo en Salud (CENSALUD) II nivel para estudios posteriores.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 El Cacao (*Theobroma cacao* L.)

3.1.1 Origen e historia

El cacao es una planta originaria de América del Sur, del área que comprende la Amazonía (Perú, Ecuador, Colombia, Brasil, Venezuela). Antiguamente en México, los Aztecas lo consideraban "La bebida de los dioses", de allí deriva su nombre científico (*Theobroma*, que significa bebida de dios). Fue llevado por los españoles a Europa, para luego convertirse en materia prima para la elaboración de uno de los productos más populares del mundo: el chocolate.

Costa de Marfil y Ghana, son los máximos productores de cacao convencional. Mientras que Perú, es uno de los países que produce más cacao orgánico en el mundo. ⁽¹⁾

3.1.2 Características Morfológicas de la planta

3.1.2.1 Raíz. El cacao posee raíz principal y secundaria profunda, por consiguiente, como primer criterio para la instalación de una plantación comercial, se requiere suelos profundos. Además, posee una infinidad de raicillas o pelos absorbentes, que por lo general están entre 0-5 cm del suelo. ⁽¹⁾

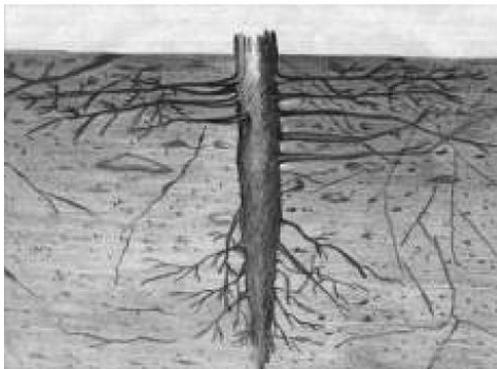


Fig. N° 1 Raíz principal de una planta de cacao ⁽¹⁵⁾

3.1.2.2 Tallo. El cacao tiene dos tipos de tallos; el primero *ortotrópico* (de crecimiento recto, vertical), son las plantas que provienen de semillas o plantas francas (híbridos y segregantes de híbridos) y el segundo *plagiotrópico* (de crecimiento horizontal o lateral), son las plantas producidas por injerto. ⁽¹⁾



Fig. N° 2 Morfología de tallo de *Theobroma cacao* L. y frutos ⁽¹⁾

3.1.2.3 Hojas. Las hojas de cacao, poseen una estructura especial, llamada "pulvínulos" que son abultamientos entre la base de la hoja y la base del pecíolo y sirven para seguir la dirección del sol. ⁽¹⁾



Fig. N° 3 Morfología de las hojas de *Theobroma cacao* L. ⁽¹⁵⁾

3.1.2.4 Flores. Nacen en grupos pequeños llamados cojines florales y se desarrollan en el tronco y ramas principales. ⁽¹⁵⁾

Cada cojín puede tener entre 1 – 40 flores. Las flores de cacao una vez abiertas, solo tiene 48 horas de viabilidad o receptividad del polen. ⁽¹⁾

Las flores salen donde antes hubieron hojas y siempre nacen en el mismo lugar; por eso, es importante no dañar la base del cojín floral para mantener una buena producción. ⁽¹⁵⁾

De las flores se desarrollan los frutos o mazorcas con ayuda de algunos insectos pequeños. ⁽¹⁵⁾



Fig. N° 4 Morfología de botón floral de *Theobroma cacao* L. ⁽¹⁵⁾

3.1.2.5 Frutos. El fruto del cacao es una baya, llamada mazorca y puede ser de tres tipos: criollo, forastero y trinitario.

Los frutos de cacao maduran entre los 5 – 6 meses si son del tipo trinitario y de 6 -7 meses si son del tipo criollo y forastero o amazónico. ⁽¹⁾

Tienen diferentes tamaños, colores y formas según las variedades. Generalmente tienen un tamaño de 12 pulgadas de largo y 4 pulgadas de ancho y contienen entre 20 a 40 semillas. La pulpa puede ser blanca, rosada o café, olorosa y con sabor variado entre ácido y dulce. ⁽¹⁵⁾



Fig. N° 5 Fruto maduro de *Theobroma cacao* L. ⁽¹⁵⁾

3.1.2.6 Las semillas están dentro de las mazorcas y son planas o redondeadas, de color blanco, café o morado. Están ubicadas en cinco hileras dentro del fruto. ⁽¹⁵⁾



Fig. N° 6 Semillas de *Theobroma cacao* L. ⁽¹⁵⁾

3.1.3 Variedades o tipos principales de cacao

En el mundo existen diferentes variedades de cacao, originalmente eran sólo dos tipos; el criollo y el forastero, pero el cruce de estas dos variedades de origen al trinitario, y del cruce repetido entre ellos, se originaron los diferentes tipos de cacao que conocemos y utilizamos. ⁽¹⁵⁾



Fig. N° 7 Tipos principales de *Theobroma cacao* L. ⁽¹⁵⁾

3.1.3.1 Cacao criollo

Es originario de Centroamérica, Colombia y Venezuela. Se distingue por tener frutos de cáscara suave, con 10 surcos, combinando un surco profundo con otro de menor profundidad. Los lomos son brotados y borroñosos y terminan en una punta delgada. Las semillas son dulces y de color blanco a violeta. ⁽¹⁵⁾



Fig. N° 8 Fruto de *Theobroma cacao* L. del tipo criollo ⁽¹⁵⁾

De esta variedad se produce el chocolate fino o de mejor calidad. Actualmente no existe cacao criollo puro, sino lo que llamamos variedades acriolladas debido a que han tenido varios cruces con otras variedades. ⁽¹⁵⁾

3.1.3.2 Cacao forastero

Es originario de América del sur y es el más cultivado en las regiones cacaoteras de África y Brasil. Se distingue porque tiene frutos de cáscara dura y más o menos lisa. Sus semillas son aplanadas de color morado y sabor amargo. ⁽¹⁵⁾



Fig. N° 9 Fruto de *Theobroma cacao* L. de la variedad forastero ⁽¹⁵⁾

3.1.3.3 Cacao trinitario

Surge del cruce del cacao criollo y forastero. Las mazorcas pueden ser de muchas formas y colores; las semillas son más grandes que las del cacao criollo y forastero; las plantas son fuertes, de tronco grueso y hojas grandes. En la actualidad la mayoría de los cacaotales que existen en el mundo son trinitarios. ⁽¹⁵⁾



Fig. N° 10 Fruto de *Theobroma cacao* L. de la variedad trinitario ⁽¹⁵⁾

3.1.4 Condiciones adecuadas para el cultivo de cacao ⁽¹⁵⁾

El clima favorable para el crecimiento normal del cultivo de cacao es el trópico húmedo, que se caracteriza por tener lluvias, calor y humedad durante todo el año.

El cacao no soporta climas fríos ni secos. Estos dos factores afectan el crecimiento y la producción por eso, cuando el clima es muy caliente, el cultivo debe estar bajo sombra para evitar los daños que le pueda ocasionar el sol y mantener el cultivo a una temperatura adecuada.

Las plantaciones también deben estar libres de vientos, para evitar la caída de las hojas y las plantas. Para enfrentar este problema, es recomendable sembrar árboles en hileras que funcionen como cortinas rompe vientos. También utilizar árboles frutales y forestales.

3.1.5 Cosecha ⁽³⁾

Los árboles de cacao florecen dos veces al año, siendo el principal periodo de floración en junio y julio. En los meses de septiembre y octubre tiene lugar una segunda floración pero más pequeña. El período de maduración de los frutos oscila entre los cuatro y los seis meses, según altitud y la temperatura del lugar de cultivo.

Así la primera cosecha se concentra en los meses de octubre, noviembre y diciembre, y la segunda durante marzo y abril.

La recolección es una de las fases más importantes, se debe hacer la identificación de las mazorcas maduras. Este estado se conoce por los cambios de coloración externa, que varía dependiendo del tipo o variedad. Este cambio

de color puede ser muy ligero y se corre el riesgo de no cosechar a tiempo mazorcas que han alcanzado su plena madurez. Ante este importante detalle, muchos recolectores cosechan las mazorcas que se encuentran en las partes bajas del árbol, basados en el sonido que emiten estas cuando son golpeadas con los dedos. El punto óptimo de recolección se produce cuando las variedades de fruto rojo han tomado un color anaranjado-bermellón y los de fruto amarillo un color amarillo-verdoso.

La recolección puede ser semanal o menos frecuente según la disponibilidad de mano de obra. La colecta de los frutos se realiza manualmente mediante un cuchillo curvado unido a un palo que permite al operario recolectar los frutos de las ramas superiores.

Los frutos defectuosos, o enfermos se destruyen directamente en el campo y se entierran. Las mazorcas sanas se abren en el campo para extraer las semillas y trasladarlas al centro de procesado.

3.1.6 Aspectos de mercado

3.1.6.1 Demanda ⁽³⁾

En el mercado internacional se suelen clasificar los granos de cacao en dos categorías: la primera es la de los granos utilizados en la fabricación de chocolate corriente y otros derivados como el polvo, el licor y la manteca de cacao; la segunda, es la de los granos que dan ciertas características específicas (bien sea de aroma o de sabor) en chocolates finos, en capas de cobertura o en otras preparaciones especiales. Los granos de la primera categoría se denominan granos ordinarios y los de la segunda, finos o de aroma. La distinción entre estas dos categorías carece de importancia y la clasificación se efectúa de acuerdo con los propios criterios y necesidades del comprador.

Más del 90% de la producción mundial es de granos ordinarios, es decir de cacao forastero o de sus híbridos con otras variedades, se estima que dos tercios de la producción mundial de granos de cacao se emplean para hacer chocolate, mientras que, el tercio restante corresponde a cacao en polvo y manteca de cacao. Aunque el cacao en polvo y la manteca pueden utilizarse, a su vez, para elaborar chocolates, también son materias primas demandadas por industrias diferentes, pero en menores cantidades, como ocurre en las industrias de cosméticos, de alimentación animal, de bebidas alcohólicas, entre otras.

3.1.6.2 Oferta⁽³⁾

La producción mundial de granos de cacao ha aumentado considerablemente durante las últimas dos décadas, pasando de 1,67 millones de toneladas en 1980 a 2,81 millones de toneladas en el 2002. Cabe destacar que, entre 1995 y 2001, la producción alcanzó volúmenes sin precedentes, ubicándose por encima de los 2,81 millones de toneladas anualmente, con un pico en el 2000, de 3,84 millones de toneladas.

A pesar de que los dos últimos años muestran un marcado descenso en las cosechas mundiales (cerca del 17%), se puede decir que en el período 1980-2002 la tasa de crecimiento fue de 3,4% anual. El descenso del 17% en la producción mundial de granos de cacao entre el 2000 y el 2002 obedeció fundamentalmente a bajas en la oferta proveniente de Costa de Marfil (-28,4%), Indonesia (-25,3%) y Ghana (-13%).

3.1.7 Cultivo de cacao en El Salvador

3.1.7.1 Historia del cacao en El Salvador ⁽²⁰⁾

El cultivo del cacao en El Salvador casi desapareció, a excepción de unas 200 manzanas sembradas en el cultivar San José del Real de La Carrera en Usulután; 100 manzanas en distintas fincas pequeñas en el departamento de Sonsonate, como también algunos pocos árboles dispersos en distintas zonas del país remanentes de plantaciones antiguas. Todas estas plantaciones han sido manejadas en su gran mayoría con una tecnología no adecuada y obsoleta, casi en un total abandono.

Debido esto al poco o nulo interés de investigación y fomento del cultivo del cacao por parte del ministerio de agricultura de los gobiernos de esas épocas, los cuales se enfocaron más en otros cultivos tales como café; caña de azúcar y algodón.

Por todo esto, El Salvador se ha convertido en el mayor importador de semilla de cacao de Centro América, principalmente de nuestros países vecinos Nicaragua, Honduras y Guatemala con una importación de 800 TM por año. Siendo el único país de Centro América que no exporta cacao en semilla solo lo importa. ⁽²⁰⁾



A. Cacaotal antiguo en Ízalco

B. Cacaotal antiguo en Usulután

Fig. N° 11 Cacaotales en El Salvador ⁽²⁰⁾

3.1.8 Hacienda San José del Real La Carrera. ⁽¹⁰⁾

La Hacienda San José del Real La Carrera, está ubicada en el departamento de Usulután, cantón San José, Municipio de Jiquilisco (Latitud norte: 13°20', Longitud oeste e: 88° 29', Elevación 75 msnm).

El área total de terreno de cultivos varios comprende 2715 manzanas; de estas 227 manzanas cultivadas de cacao, 1700 manzanas caña de azúcar, 120 manzanas patios de salineras, 300 manzanas en infraestructura, 80 manzanas de bosque (Teca, Eucalipto) y 515 manzanas de otros cultivos.

La plantación de cacao más joven oscila entre 4 y 18 años y ocupa un área estimada de 71 manzanas. En el área restante que es de 156 manzanas, el rango de edad se encuentra entre 35 y 60 años, pudiendo ser superior en algunos casos. El distanciamiento utilizado para la siembra del cacao es 4 x 4 metros, habiendo una población estimada de 437 plantas/manzana.

El área de estudio donde se ubica la Hacienda San José de La Carrera, se encuentra en la planicie costera, al norte de la bahía de Jiquilisco y al sur del

volcán de Usulután, esta región es plana con suelos andisoles y aluviales con cultivos anuales en los alrededores de Usulután.

La región donde se ubica La Hacienda San Jose del Real la Carrera se zonifica climáticamente según Koppen, Sapper y Laurer como Sabana tropical Caliente o Tierra Caliente (0- 800 msnm.) la elevación es determinante (75 msnm).⁽¹⁶⁾

Cuadro N°1. Distribución del área total del cultivar de cacao ⁽¹⁶⁾

LOTE	AREA (MZ)	EDAD PROMEDIO DE LA PLANTACION
1	28	60 Años
2	22	>50 Años
3	16	>50 Años
4	22	>50 Años
5	5	60 Años
6	10	45 Años
7	13	45 Años
8	37	40 Años
9	3	35 Años
10	35	18 Años
11	26	8-10 Años
12	10	4 Años

3.2 Enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.)⁽⁴⁾

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en Centro América es atacado por varias enfermedades producidas por hongos que generan reducciones significativas en el rendimiento del cultivo, las cuales, se traducen en disminuciones drásticas en los ingresos de las familias productoras de cacao en la región. Las enfermedades que se presentan en el cultivo ejercen su efecto en diferentes partes del árbol como las mazorcas (frutos), hojas, tronco y ramas; y las raíces del árbol.

Las enfermedades que ejercen su efecto sobre las mazorcas son las que representan mayor problema en los cultivos de cacao en la región, primero porque el cacao se produce en regiones húmedas de Centroamérica caracterizada por presentar altas temperaturas, precipitación bien distribuida durante el año y alta humedad relativa, lo cual, favorece que los árboles de cacao produzcan frutos durante la mayor parte del año y segundo porque las condiciones de temperatura y humedad presentes en las áreas cultivadas son ideales para el desarrollo de las hongos que producen daño al cultivo.

Las enfermedades que afectan las hojas son la Antracnosis (*Colletotrichum ggloesporides*) y *Phytophthora* (*P. palmivora*); ramas y tronco *Phytophthora* o también conocida como el cáncer del tronco, la bubal floral (*Albonectria rigidiuscula*) y el mal de machete (*Ceratocistis cacaofunesta*). Daños de menor efecto en la producción y a la vez son menos intensas respecto a las enfermedades que afectan la mazorca, así como, es posible manejar las condiciones de cultivo para propiciar condiciones desfavorables para el desarrollo de las enfermedades.

La enfermedad que afecta las raíces de cacao es poco frecuente que se presente en las áreas de cultivo en Centroamérica, sin embargo, una vez que se presenta en los campos de cultivo es difícil ejercer un control efectivo de la enfermedad.

Las enfermedades que afectan la mazorca de cacao en Centroamérica son la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y la Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*)

3.2.1 La Moniliasis ⁽⁷⁾

La Moniliasis del cacao es una enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri* que ataca únicamente las mazorcas o frutos de cacao en cualquier edad, causando pudrición de los granos.

A esta enfermedad también se le conoce como: Moniliasis del cacao, pudrición acuosa, mano de piedra, helada, mancha ceniza o enfermedad de Quevedo.

Cuando aparecen los primeros síntomas externos de la enfermedad en forma de mancha color chocolate ya todos los granos y tejidos están afectados. Es una de las enfermedades más graves de este cultivo y puede causar la pérdida de toda la producción.

3.2.2 Importancia económica

En una plantación de cacao desatendida técnicamente la Moniliasis puede destruir hasta 95 de cada 100 frutos, produciendo pérdidas económicas aun en épocas de buenos precios en el mercado. Por el contrario, cuando se realizan prácticas de manejo en el cacaotal como control de malezas, podas, regulación de sombra (mediante poda y raleo cuando hay exceso de sombra o cuando esta es deficiente), remoción frecuente de frutos enfermos y mejora de

los drenajes, entre otras prácticas, las pérdidas en la producción pueden reducirse a menos del 8 %, resultando rentable la explotación del cultivo. Para tener estos bajos niveles de incidencia de la enfermedad, es necesario no desatender las otras labores agrícolas como deshijes (eliminación de abultaciones), la chapia, el despunte de ramas y eliminación de aquellas ramas entrecruzadas, cosechas frecuentes de frutos sanos y enfermos y finalmente la fertilización, ya sea con abonos orgánicos o químicos, teniendo como base los resultados del análisis químico del suelo.⁽¹²⁾

3.2.3 Origen de la enfermedad y distribución geográfica

La Moniliasis del cacao fue descrita por primera vez en Ecuador en el año 1916, por J. B. Rorer. La región de Quevedo en Ecuador, Sur América, fue considerada por casi cien años como el centro de origen de esta enfermedad, pero estudios recientes realizados por Phillips (2006) demuestran que la enfermedad se originó en la zona de Sopetrán (Antioquia), Colombia; a finales del siglo 18. La enfermedad se encuentra en todos los países cacaoteros de Suramérica, como son Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Surinam; hasta el 2012 sólo Brasil no reporta la presencia de este patógeno afectando sus plantaciones. También se encuentra en Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala, Belice y desde el 2008 se ha reportado afectando plantaciones de cacao de México, a donde llegó introducida posiblemente desde Honduras.⁽¹²⁾



Fig. N°12 Ruta de avance de la Moniliasis de cacao. ⁽¹²⁾

3.2.4 Condiciones para que se desarrolle la Monilia ⁽⁷⁾

Para que la Monilia se desarrolle necesita un ambiente húmedo, oscuro y con poca circulación del aire que se presenta cuando no se da un buen manejo al cacaotal, por ejemplo:

- Cuando no hay poda se desarrollan árboles grandes, con dos o más pisos, con varios troncos por el crecimiento de los chupones y copas cerradas que favorecen la alta humedad.
- Cuando existen demasiados árboles de sombra se dificulta la entrada de la luz del sol y la circulación del aire dentro de la plantación, lo que crea condiciones oscuras y húmedas.
- Cuando no se realiza el control de malezas se favorecen las condiciones de alta humedad.

- Cuando hay encharcamientos dentro de la plantación de cacao se crea un ambiente húmedo.
- Cuando no se realiza el manejo agronómico adecuado a una plantación de cacao, el ambiente que se desarrolla favorece el establecimiento y multiplicación del hongo.

3.2.5 Transmisión de Monilia. ⁽⁷⁾

La Monilia se transmite de una planta a otra y de una plantación a otra por el viento, la lluvia, los animales, las personas y por el traslado de frutos o mazorcas con el hongo de una plantación a otra.

La Monilia que se produce dentro de las plantaciones abandonadas podría pasar a otros cacaotales que tienen manejo y están en producción.

Los frutos enfermos que permanecen pegados al árbol producen esporas durante 7 meses y son una fuente de infección de frutos sanos, para otra plantación dentro de la finca y otras parcelas vecinas o lejanas.

El ser humano es la vía más efectiva de la propagación de las esporas (semillas) del hongo a largas distancias, inclusive de un país a otro.

3.2.6 Agente causal. ⁽²⁾

El agente causal de la moniliasis fue inicialmente llamado *Monilia roreri* por Ciferri, y Parodi en 1933 y clasificado dentro del filum Ascomicota, describiéndolo como un hongo anamórfico debido a la aparente ausencia de un estado meiótico o de estructuras sexuales y sus similitudes morfológicas con otros Fitopatógenos del género (Evans *et al.* En el 2003). Sin embargo, Evans *et al.* en 1978, mediante estudios de microscopía electrónica, encontraron la presencia de septo doliporo (característico de hongos homobasidiomicetos) y un evento único de esporogénesis basipetal, resultado que motivó la creación del nuevo género *Moniliophthora*.⁽²⁾

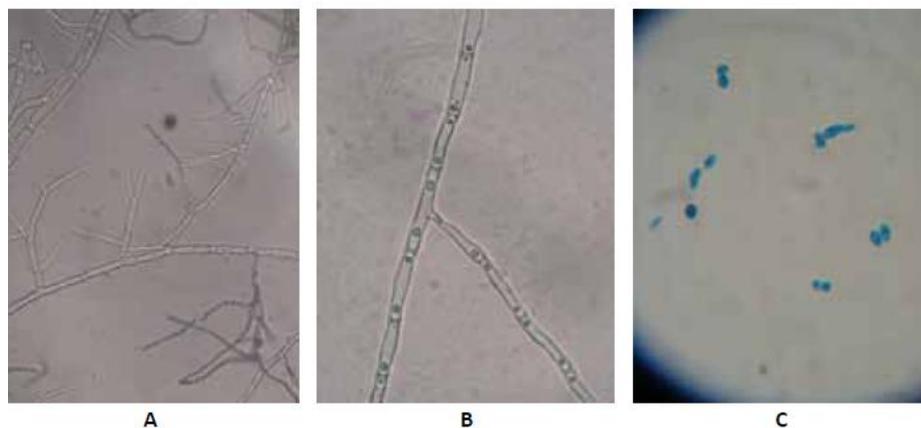


Fig. N° 13 Estructuras microscópicas de *Moniliophthora roreri* (A) micelio con septo doliporo; (B) micelio dicariótico con septo doliporo; (C) meiosporas.⁽²⁾

3.2.6.1 Etiología

Se sabe que el centro de origen de este patógeno capaz de afectar especies de los géneros de cultivos de *Herrania* y *Theobroma*, está en la región noroeste de Colombia.⁽²⁾

3.2.6.2 Taxonomía

Moniliophthora roreri es un organismo del dominio Eukaryota, reino Fungí, filum Basidiomycota, clase Basidiomycetes, subclase Agaricomycetidae, orden Agaricales, familia Tricholomataceae, género *Moniliophthora* y especie *roreri*.⁽²⁾

3.2.6.3 Morfología ⁽²⁾

M. roreri posee micelio septado con doliporos típicos, las esporas provienen de un basidio modificado y se producen en cadenas con maduración basipétala y se desprenden fácilmente del micelio, con un pseudoestroma denso y carnoso sobre el cual el hongo produce los vestigios del píleo. Las esporas son multifuncionales, sirven no sólo para el intercambio genético, sino también para la dispersión, la infección y la supervivencia. Éstas pueden ser globosas (60%), elípticas (30%) y subglobosas (10%) con un diámetro promedio de $7\mu\text{m} \times 10.5\mu\text{m}$, $7.5\mu\text{m} \times 11.6\mu\text{m}$ y de $6.3\mu\text{m} \times 9.3\mu\text{m}$ respectivamente, tienen dos formas de germinación a través del poro germinativo o directamente a través de su pared.

Las esporas viejas desarrollan paredes gruesas y se tornan oscuras, las cuales pueden marcar el inicio de la fase de dormancia. El tubo germinativo presenta en el extremo distal una estructura similar a un apresorio y la hifa infectiva. Este es único y en raras ocasiones dobles.

3.2.6.4 Ciclo de vida del patógeno ⁽²⁾

Las condiciones climáticas y la cantidad de esporas libres son factores determinantes en el ciclo de vida de *M. roreri*. El ciclo comienza con la estación seca, época en la que se encuentran la mayor cantidad de esporas disponibles

en el ambiente, sin embargo, para que inicie la infección es necesario que existan condiciones de humedad ya que las esporas solo germinan en presencia de una película de agua, con mayor germinación cerca de los 24° C. la germinación de las esporas ocurre aproximadamente entre 6 y 8 h. La hifa infectiva del hongo penetra la epidermis del fruto, desde la cual se propaga inter e intracelularmente a los tejidos subepidermales y el exocarpo.

La infección continúa a los tejidos centrales, incluyendo las semillas, e inicia el desarrollo de la necrosis desde la parte interna hacia la epidermis.

Externamente, la infección aparece como puntos aceitosos muy pequeños y circulares los cuales se convierten en lesiones (manchas) irregulares de color amarillo y marrón.

El proceso desde la infección a la aparición de mancha tiene una duración aproximada de 60 ± 10 días, dependiendo de la susceptibilidad del clon de cacao.

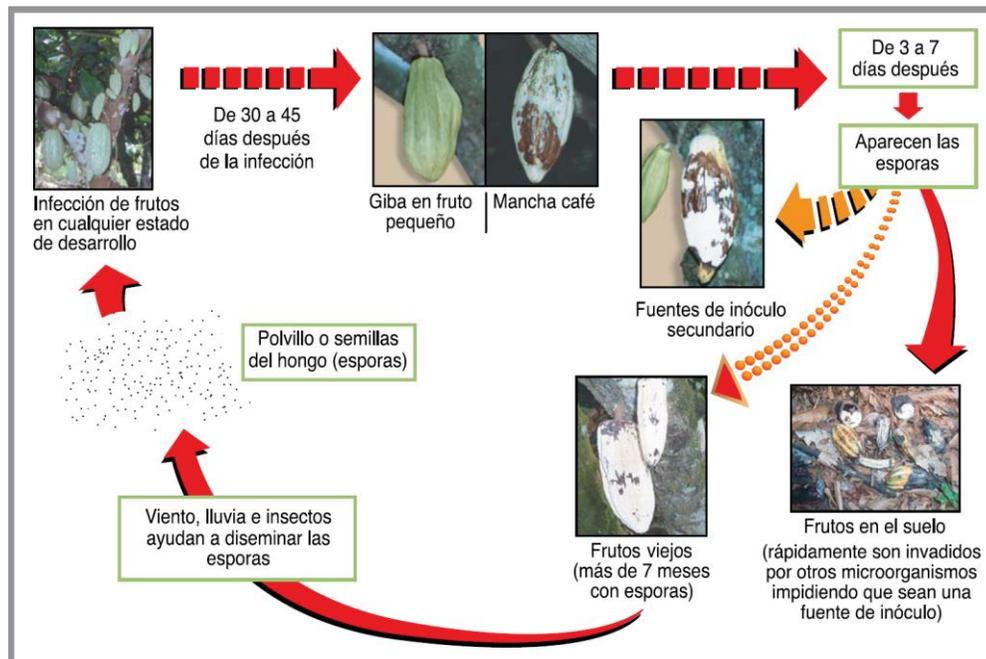


Fig. N° 14 Ciclo de vida de *Moniliophthora roreri*. ⁽¹²⁾

3.2.6.5. Aislamiento ⁽¹⁴⁾

Para llevar a cabo el aislamiento de *Moniliophthora roreri* se deben recolectar muestras de cacao sospechosas de estar infectadas por el hongo, luego se desinfectan y se siembran en medios de cultivo reforzados con sulfato de gentamicina 80mg/2mL (agar dextrosa sabouraud, agar papa dextrosa, y agar V8) posteriormente se colocan en una incubadora a 27°C.

3.2.6.6 Caracterización

Las colonias del hongo que se obtienen se evalúan periódicamente en base a características morfológicas como color y borde de las colonias, tipo de micelio (textura) y su crecimiento.

La evaluación de la forma y tamaño de las esporas se realiza a partir de microcultivos sobre láminas porta-objeto.

La microultraestructura de las esporas se realiza en el microscopio electrónico de barrido.

3.2.7 Sintomatología

La penetración e infección puede ocurrir en cualquier fase de desarrollo del fruto, pero son más susceptibles durante los primeros estados. La susceptibilidad de los frutos es inversamente proporcional a su edad, es decir que a mayor edad menor susceptibilidad. ⁽²⁾

Después de penetrar el fruto, el hongo se desarrolla intercelularmente en las células del parénquima cortical, presentándose normalmente un largo periodo de incubación. ⁽²⁾

Los síntomas de *Monilia* varían con la edad del fruto y con la severidad del ataque del patógeno como se describe a continuación. ⁽¹⁰⁾

1. Mazorcas menor a un mes infectadas presentan maduración prematura, marchitez y secamiento. ⁽¹⁰⁾



Fig. N° 15 Fruto infectado (menor a un mes) con *Moniliophthora roreri*. ⁽¹⁰⁾

2. En los frutos de 1-3 meses la infección aparece primero como pequeños abultamientos o gibas en la superficie de la mazorca, los cuales se decoloran y presentan un aspecto más brillante que el resto de la superficie del fruto. Después de la giba, aparece una mancha café que se va extendiendo con mayor o menor rapidez según la susceptibilidad del material y sobre esta mancha empieza a aparecer una felpa blanca o micelio del hongo (filamentos vegetativos); luego de tres a siete días y allí mismo sobre el micelio blanquecino empiezan a emerger las esporas del tipo conidio de color crema, que son liberadas y dispersadas en el aire por la acción del viento, principalmente. ⁽¹²⁾



Fig. N° 16 Fruto infectado (1-3 meses) con *M. royeri* ⁽¹²⁾

3. En frutos infectados a mitad de su desarrollo (3 a 4 meses), la enfermedad aparece primero en forma de unos pequeños puntos aceitosos (translúcidos), agrupados en mayor o menor cantidad según la cantidad de esporas (conidios) que hayan llegado e infectado el fruto. ⁽¹²⁾

Los puntos grasientos son difíciles de ver, pero si se hace una buena revisión de la mazorca, pueden observarse. En mazorcas de color verde, los puntos son

de color amarillo. En los frutos de color rojo, los puntos son de color anaranjado.

(12)

En muy corto tiempo (días), esos puntos se unen formando una mancha café. El borde de la mancha es irregular y a veces produce un color amarillento por donde va avanzando la enfermedad. A los pocos días (3 a 6 generalmente), sobre la mancha café aparece el micelio y luego las esporas que forman una masa polvosa abundante de color crema, que son las esporas o "semillas" que reproducen el hongo en otros frutos del mismo árbol o de árboles vecinos. Estas esporas son tan abundantes que sólo en un centímetro cuadrado se cuentan desde 7 a 43 millones, bastando sólo una para iniciar la enfermedad en otro fruto sano siempre que las condiciones ambientales (humedad principalmente) favorezcan el establecimiento y desarrollo del hongo. (12)



Fig. Nº 17 Fruto (3-4 meses) infectado con *M. royeri* (10)

4. En los frutos adultos (mayores de 4 meses) el síntoma más común de la Moniliasis es una mancha de color café (sin la presencia aparente de los puntos aceitosos), que puede extenderse hasta cubrir todo el fruto. Esa mancha se caracteriza, y a su vez se diferencia, por presentar el borde de avance de la lesión en forma irregular y no bien definido. (12)

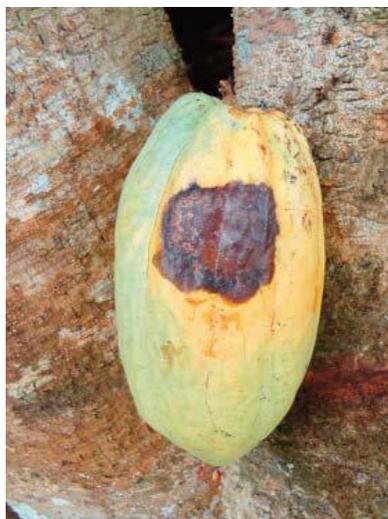


Fig. N° 18 Fruto (mayor de 4 meses) infectado con *M. roleri* ⁽¹²⁾

El daño interno causado por la Moniliasis es más grave que el daño externo, pues se pierden casi todas las semillas, sin importar la edad del fruto. ⁽²⁾



Fig. N° 19. Síntomas internos y externos de la moniliasis

Podemos observar en la Fig. N° 19 a) tejidos centrales, pulpa, almendras y cáscara formando una sola masa producto de la pudrición; b) fruto mostrando una mancha café con borde irregular donde va avanzando la enfermedad; c) fruto donde se observa el micelio del hongo; d) mazorca con infecciones ocultas

(internas), presentando hinchazones como pequeños abultamientos o gibas (protuberancias).

Los síntomas externos pueden estar completamente ausentes hasta la formación de lesiones entre 45 y 90 días después de la penetración del hongo. Esta fase se podría considerar como la fase biográfica del hongo, en cuanto a que la necrótica puede ser precedida por la maduración irregular o prematura, la aparición de lesiones irregulares de color chocolate o castaño oscuro, que van creciendo gradualmente hasta cubrir con rapidez toda la superficie del fruto. Los tejidos internos de la mazorca pueden ser sustituidos por sustancias acuosas o gelatinosas razón por la cual esta enfermedad también es conocida y denominada de forma inadecuada como pudrición acuosa de los frutos. Con frecuencia, las almendras se presentan pegadas unas con otras de manera desorganizada, haciendo difícil su remoción, los frutos enfermos son normalmente más pesados que los frutos sanos. ⁽²⁾

3.2.8 Epidemiología

La esporulación del hongo sobre la superficie del fruto es tan intensa que las nubes de esporas son liberadas y transportadas por el viento, la lluvia y en menor proporción por insectos. Se estima que las densidades de esporulación del hongo sobre un fruto pueden alcanzar los 44 millones de esporas por cm² de área. ⁽²⁾

Una mazorca esporulada ubicada a una altura aproximada de dos metros tiene un gradiente de dispersión, con capacidad de infección de 40%, de hasta una distancia de 20 m. Existe una correlación significativa y positiva entre la población de esporas en el aire y la temperatura, y negativa con respecto a la humedad relativa. ⁽²⁾

En tanto que tal nivel de esporulación sólo se observa durante pocas semanas después de su inicio, reduciéndose la cantidad de esporas producidas hasta aproximadamente diez semanas, cuando se torna casi insignificante. Las esporas pueden ser aisladas de los mismos frutos momificados, incluso después de un año de la infección, lo que es garantía de la oferta de inóculo durante ese tiempo. Al menos 90% de las esporas pueden germinar sobre medios artificiales, pero sólo 10% lo puede hacer sobre agua. (2)

Los frutos momificados y esporulados en la copa del árbol son considerados la principal fuente de inóculo para iniciar la epidemia, diseminando las esporas en sentido descendente. La presencia de agua libre no sólo permite la germinación de las esporas, sino que remueve el inóculo desde estos frutos.

Se ha encontrado que la eliminación y disposición de los frutos con síntoma de mancha sobre el suelo no sólo permite la descomposición por parte de los microorganismos presentes en éste, sino que dejan de ser importantes en la diseminación de *M. roreri*. (2)

3.2.9 Rango de hospederos (2)

Moniliophthora roreri ha sido reportado solamente en especies de los géneros *Theobroma* y *Herrania*. Roreri en 1918 reportó el ataque de frutos de *T. bicolor* y *H. balaensis* en Ecuador. Baker en 1954 reportó infecciones en *T. gireli*.

Además, Evans en 1981 reportó infecciones de *M. roreri* en *T. mammosum*, *T. simiarum*, *T. sylvestre*, *T. angustifolium*, *H. nítida*, *H. pulcherrima*. Posteriormente, Enríquez y Soria en 1981 identificaron el patógeno en *T. grandiflora* y *H. purpurea* por Cuhn, en 2006.

3.2.10 Control de la Moniliasis (Manejo Integrado) ⁽¹²⁾

El control de la Moniliasis del cacao es relativamente fácil, pues se sabe que le benefician las condiciones húmedas de las plantaciones, la oscuridad del cacaotal, el exceso de entrecruzamiento de las ramas dentro del mismo árbol, entre árboles vecinos y entre árboles de cacao y los árboles que suministran sombra.

También cuando no se cortan los frutos enfermos, la formación y permanencia de charcos dentro del cacaotal después de que llueve, el agua estancada en los canales de drenaje, la incidencia de malezas e incluso productores descuidados o empleados que hacen mal las labores de cultivo, todo eso favorece la presencia de la moniliasis dentro de la plantación.

De modo que para el buen control necesitamos atender la plantación con mayor eficiencia de lo que se hacía antes de llegar la enfermedad.

3.2.11 Recomendaciones para el control de Monilia

3.2.11.1 Control cultural (podas, remoción de frutos y otros). ⁽¹²⁾

La incidencia de la moniliasis se favorece por la aplicación inadecuada de prácticas de cultivo. Es necesaria la ejecución oportuna de labores que favorecen un microclima cambiante a la plantación, lo que impide la proliferación de fuentes de inóculo. En resumen, el control se basa en la creación de un ambiente favorable al cacao y desfavorable a la vez al patógeno, permitiendo una menor pérdida de frutos pero en convivencia con la enfermedad.

Entre las prácticas de cultivo que conducen a una modificación del ambiente, tornándolo inapropiado para el desarrollo de la enfermedad, se destacan las siguientes:

a. Podas suaves y frecuentes, que ayuden a mantener los troncos y ramas principales libres de brotes, chupones o hijos y de ramillas perjudiciales. Esto contribuye a una buena cosecha y a conservar el ambiente seco y fresco.

b. Regulación del sombrío permanente, así se obtiene una apropiada entrada de luz en la plantación y una buena cantidad de aire en circulación, favoreciendo un rápido escape del vapor de agua. Además, es indispensable regular el sombrío para un mejor aprovechamiento de los fertilizantes.

c. Adecuado sistema de drenaje, para evitar el encharcamiento del agua de las lluvias y reducir la alta humedad relativa dentro del ambiente de la plantación.

d. Deshierbas frecuentes y oportunas, para facilitar la libre circulación del aire y hacer que el ambiente se mantenga más seco, evitando la condensación del rocío durante las noches.

e. Remover dos veces por semana en los meses de lluvia los frutos afectados por la moniliasis que se encuentren en la plantación.

Debe revisarse cada árbol en conjunto para detectar frutos posiblemente infectados. Esta labor tiene como finalidad evitar que el hongo tenga tiempo de formar las estructuras reproductivas (esporas), que son las "semillas" que afectarán otros frutos sanos del mismo árbol o de árboles vecinos.

Los frutos enfermos por la moniliasis que se corten o remuevan de los árboles, deben dejarse donde cayeron recogerlos y movilizarlos fuera de la plantación

incrementa los costos de mano de obra y la experiencia ha mostrado que no son una fuente importante de inóculo, para nuevas infecciones, en plantaciones donde ya se ha establecido plenamente la enfermedad.

Dentro del suelo o piso de los cacaotales abundan otros microorganismos que van descomponiendo los frutos dejados en el suelo con ayuda de las lluvias y las altas temperaturas (calor).

3.2.11.2 Control químico. ⁽¹²⁾

El combate de la moniliasis del cacao por medio de fungicidas es una práctica poco efectiva y sobre todo poco económica, por lo cual no es una práctica indispensable para poder convivir con la enfermedad.

Para que se justifique el uso de los fungicidas contra la moniliasis se requieren varias condiciones básicas en la plantación:

- a. Que sean plantaciones de regular a buena producción (más de 15 quintales por manzana).

- b. Que la mayor cantidad de frutos se encuentre concentrada en el tronco y ramas bajas del árbol, de modo que se pueda asegurar una buena cobertura de los frutos, dado que las aplicaciones deben ser dirigidas a éstos.

- c. Que las plantaciones tengan ritmos de floración y fructificación muy bien definidos, de modo que sea posible proteger la mayor parte de la producción con pocas aplicaciones en los períodos de máxima susceptibilidad (de floración hasta tres meses de edad del fruto).

Una vez considerado lo anterior, se recomienda realizar seis aplicaciones, una cada 14 días, empezando cuando los frutos tengan 15 días de edad. Las

atomizaciones deben ser efectuadas directamente sobre el fruto. En caso de justificarse el uso de fungicidas, puede utilizarse uno a base de cobre, un hidróxido como el Kocide- 77 o Kocide-2000, o un óxido de cobre como el Cobre Sandoz, mezclado a razón de 5 a 6 gramos de producto comercial por litro de agua.

También pueden utilizarse fungicidas como el Bravo-500, Branadil o Daconil, Phyton (orgánico), que en pruebas tanto en Costa Rica (Bravo) como en Honduras (Bravo y Phyton) han dado resultados aceptables como complemento a las prácticas culturales.

3.2.11.3 Combate por medio de resistencia genética. ⁽¹²⁾

Entre los cultivares de la especie *Theobroma cacao* hay diferencias en la susceptibilidad a *M. royeri*, lo cual muestra que en esta especie existen fuentes de resistencia al hongo. Aún no se ha descubierto un material inmune a *M. royeri*, pero de las pruebas en Ecuador, Colombia, Costa Rica, y ahora en Honduras, se conoce que hay cultivares (clones o híbridos) que, consistentemente muestran menor número de mazorcas infectadas. Ejemplo de esos materiales son: UF-273, EET-75, EET- 233, UF-296, CC-210, IMC-67 y el CC-266. En Honduras, en el Centro Experimental Demostrativo de Cacao (CEDEC), de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), ubicado en La Másica, Departamento de Atlántida, se están evaluando 1,066 cruces provenientes de un padre con alguna tolerancia al patógeno con otro u otros materiales de buenas características de producción. De estos cruces en evaluación por más de dos años consecutivos se han detectado unos pocos que han presentado buena producción de frutos sanos y pocos o ningún fruto enfermo por la moniliasis.

3.2.12 La poda: la práctica maestra en el control de la Moniliasis. ⁽¹²⁾

Las experiencias en el manejo de la moniliasis muestran que la poda en cacao amerita una revisión, pues ha sido costumbre darle a los árboles podas suaves, en algunos, y la mayoría, prácticamente no se podan o se hace ocasionalmente. Pero al llegar y establecerse la Moniliasis dentro de la plantación, es indispensable de inmediato podar los árboles de cacao. Esta primera poda será fuerte en la mayoría de los casos, pues requiere la eliminación de ramas y brotes de mayor diámetro con el propósito principal de bajar altura del árbol.

La poda oportuna permite que la luz solar penetre al interior de la plantación y que circule mejor el aire. También es fundamental para estimular la floración y poder observar más fácilmente los frutos enfermos para su eliminación y a la vez facilitar la labor de cosecha de los frutos sanos. Para el control de la moniliasis, el árbol de cacao no debe ser alto, la altura máxima estará definida por el largo de la herramienta utilizada para cortar los frutos. Esta herramienta de trabajo denominada comúnmente “pica”, consta de una hoja de metal con filo, encabada en una vara de madera liviana o aluminio. Estando dentro de una plantación de cacao bien podada, se debe observar al fondo por la entrecalle, hasta el final de la línea de árboles de cacao, si esto no se cumple indica que hay necesidad de poda, ya que muchas ramas están orientadas hacia el suelo, impidiendo una visualización normal hasta el final de la plantación o de un lote determinado.

Una vez realizada la primera poda fuerte, se deberán seguir haciendo podas suaves cada tres meses como máximo, así como deshijes mensuales. Prácticamente toma de uno a dos años llegar a formar la nueva arquitectura del árbol de cacao, que permita un manejo de la moniliasis bajo el enfoque de convivencia con este hongo.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

- **Experimental:** se basa en el análisis de muestras realizado en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico y en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).
- **Exploratorio:** se conoció acerca del aislamiento y caracterización de un hongo fitopatógeno (*Moniliophthora roreri*) y éste servirá de base para futuras investigaciones.

- **Investigación Bibliográfica**

Se consultaron las siguientes bibliotecas:

- Biblioteca Doctor Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia. Universidad de el Salvador
- Biblioteca de la Universidad José Matías Delgado.
- Internet

- **Investigación de Campo**

Universo

Frutos de cacao de diferentes edades con síntomas de la enfermedad (anexo N°4) del cacaotal de San José del Real de la Carrera en Usulután, la cual está constituida por 12 lotes de cultivo de cacao distribuidos en un área de 227 manzanas. (Anexo N°2)

Muestra

62 frutos de cacao criollo de diferentes edades que presentaban síntomas de la infección fúngica como lo es maduración prematura, marchitez, secamiento, abultamientos, mancha café, felpa blanca, puntos aceitosos, puntos verdes, puntos anaranjados, mancha café con borde irregular, síntomas que varían según la edad del fruto (anexo N°4); de la cantidad de muestras colectadas se obtuvieron 14 aislamientos.

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Aislamiento del hongo *Moniliophthora roreri* en frutos de cacaos sospechosos de enfermedad.

4.2.1.1 Colección de muestras

Se colectaron las muestras en bolsas plásticas estériles, identificadas con fecha, lugar, número de muestra. Número de lote, (anexo N°3). Se identificaron y clasificaron según características morfológicas (anexo N°4) que presentaba el fruto.

4.2.1.2 Manipulación de las muestras (anexo N°7)

4.2.1.2.1 Desinfección de muestras ⁽¹⁹⁾

Procedimiento

- Colocar los frutos de cacao en una solución de hipoclorito de sodio 2.5% durante 5 min.
- Partir las muestras por la mitad con un cuchillo estéril, evitando el contacto del cuchillo con el interior del cacao.

- Tomar con una pinza estéril tres porciones del endocarpio del fruto de cacao de 0.5 cm que se encuentre enferma.
- Desinfectarla con hipoclorito de sodio 2.5% sumergiéndola durante 3 min.
- Lavar las porciones sumergiéndolas en agua estéril durante 2 minutos para eliminar los restos del hipoclorito de sodio.

4.2.1.2.2 Siembra de la muestra ⁽¹⁹⁾

Procedimiento:

- Colocar la primera porción de endocarpio ya desinfectada en placas de Agar Papa Dextrosa; la segunda porción en Agar Sabouraud por ser medios de aislamiento de hongos; y la tercera porción en Agar V8 con el que se lograra su esporulación, cada uno reforzado con 800 μ L de solución de Gentamicina Sulfato 80 mg/ 2mL.
- Incubar a 27°C en la oscuridad durante 15 días.

A los 15 días del crecimiento

- Repicar en Agar V8 por duplicado para obtener colonias puras completamente aisladas sin flora acompañante.
- Incubar a 27°C durante 15 días en oscuridad.

4.2.1.2.3 Identificación de aislamientos mediante el microscopio óptico

Se realizaron dos tipos de tinciones Tinción de Gram (anexo N°9) y tinción con Azul de lactofenol (anexo N°10) a los aislamientos obtenidos y se observaron e identificaron al microscopio esporas e hifas del hongo *Moniliophthora roreri*.

4.2.1.2.4 Procedimiento tinción Gram:

- Colocar una gota de solución salina en el portaobjeto
- Con un asa esteril tomar del aislamiento obtenido una fracción o colonia del microorganismo y extender
- Fijar con calor flameando
- Dejar secar
- Agregar cristal violeta al frotis y esperar un minuto
- Agregar lugol o solución de yodo y esperar por un minuto
- Lavar con alcohol-cetona
- Agregar safranina y esperar un minuto
- Lavar con agua destilada

4.2.1.2.5 Procedimiento tinción de azul de lactofenol:

- Colocar una gota de solución salina en el portaobjeto
- Con un asa estéril tomar de la colonia aislada una fracción o colonia del microorganismo y extender
- Fijar con calor flameando
- Dejar secar
- Agregar una gota de azul de lactofenol
- Cubrir con el cubre objetos

4.2.1.2.6 Prueba de crecimiento en Agar V8 y Agar V8 extracto cacao.

Con un asa estéril se tomar una fracción de la colonia de *Moniliophthora roreri* e inocular en 2 placas petri conteniendo una Agar V8 y la otra Agar V8 extracto, incubar a 25°C en la oscuridad, por 7 días.

4.2.1.2.7 Crecimiento de *Moniliophthora roreri* a diferentes concentraciones de Gentamicina Sulfato 80 mg/2mL

- Preparar agar V8 agregando 800 μ L(3.2mg/mL), 900 μ L(3.6mg/mL), 1000 μ L(4.0mg/mL), 1100 μ L(4.4mg/mL), 1200 μ L(4.8mg/mL), 1300 μ L(5.2mg/mL) de solución de Gentamicina Sulfato 80 mg/2 mL.
- Sembrar una colonia o fracción del hongo
- incubar a 25°C en la oscuridad, por 7 días

4.2.2 Caracterización morfológica de los aislamientos de *Moniliophthora roreri*

En donde se realizó evaluación macroscópica y microscópica de los aislamientos obtenidos

4.2.2.1 Evaluación Morfológica a partir de los aislamientos obtenidos de *M. roreri* en los días a los 3, 5,7,9,12,15,18 y 21 de crecimiento se observaron los parámetros siguientes:

4.2.2.1.1 Características Macroscópicas.

– Tasa de crecimiento.

Se realizó la medición del diámetro de las colonias *Moniliophthora roreri* haciendo uso de pie de rey

– Características de las colonias.

Colonias de 3 a 7 días centro puntiforme, radiales formación de 2 a 4 anillos, colonias de 9 a 18 días colonias puntiformes, radiales formación de 5 a 7 anillos

- Borde: Irregular, regular
- Textura: Algodonosa, pulverulenta
- Coloración: Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja

- Presencia/ausencia de sectores: Presencia/ausencia de sectores los cuales indican la edad de la colonia.
- Crecimiento/tamaño de las colonias: se realizará la medición del diámetro de las colonias, durante los días de crecimiento.

4.2.2.1.2 Características microscópicas ⁽¹⁹⁾

- Días de esporulación.

En donde se observó si la esporulación era abundante o escasa madurez o inmadurez de esporas conforme los días de crecimiento.

- Forma de esporas.

Globosas, subglobosas, elípticas.

4.2.2.2 Caracterización con microcultivos

Procedimiento (anexo N°5)

- Introducir la barra de vidrio en la placa de Petri.
- Colocar el portaobjetos sobre la barra de vidrio
- Recortar un cuadro de 5 mm de agar V8 y colocarlo sobre el portaobjetos.
- Tomar con un asa estéril un fragmento de micelio del hongo aislado y purificado
- Inocular en los cuatro extremos de agar V8.
- Colocar el cubreobjetos sobre el medio de cultivo inoculado.
- Añadir 1 mL de agua destilada estéril en la placa, para crear un ambiente húmedo.
- Cerrar la placa y sellar con parafilm e incubar 7 días a 25°C en la oscuridad.

A los 7 días de crecimiento:

- Retirar el cubreobjetos con crecimiento
- Colocar una gota de lactofenol sobre un portaobjetos limpio
- Flamear las pinzas
- Colocar el cubreobjetos con crecimiento sobre el portaobjetos y esperar unos instantes para que actúe el Lactofenol
- Observar al microscopio con el objetivo “seco fuerte” (40x)
- Observar e identificar visualmente las conidios e hifas de *Moniliophthora roreri*, observar la forma y el tipo de las esporas de las muestras de cacao que se aislaron en los diferentes medios. (anexo 5).

4.2.2.3 Observación por Microscopia Electrónica de Barrido ⁽¹⁶⁾

Procesamiento para Muestras de Monilia.

- Cortar segmentos de 5 x 5 mm de medio con el espécimen a observar y colocar en frascos de 10 mL de vidrio con boca ancha que permitan la entrada de micro pipetas y pinzas. Rotular los frascos debidamente.
- Adicionar solución de fijador karnovsky en cantidad suficiente que cubra la muestra y guardar en refrigeración.

Partiendo de Muestras en Solucion Karnovsky en Refrigeración durante 24 horas.

- Realizar dos lavados en Buffer Cacodilato 0.1 M pH 7.4 de 10 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar la post fijación en tetroxido de osmio 1% durante 3 horas a temperatura ambiente. Realizar dos lavados en Buffer Cacodilato 0.1 M pH 7.4 de 10 minutos a temperatura ambiente.

- Realizar deshidratación en soluciones de etanol durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 - a. Alcohol 30%
 - b. Alcohol 50%
 - c. Alcohol 70%
- Guardar las muestras en refrigeración para seguir al siguiente día.
- Realizar deshidratación en soluciones de etanol durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 - a. Alcohol 90%
 - b. Alcohol 100%
 - c. Alcohol 100%
- Realizar deshidratación en soluciones de etanol-HMDS (Hexametildisilazano) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 - a. Alcohol-HMDS 3:1
 - b. Alcohol-HMDS 2:2
 - c. Alcohol-HMDS 1:3
 - d. HMDS puro
 - e. Sin HMDS
- Guardar las muestras en desecador y dejar secar.

Partiendo de Muestras secadas en HMDS.

- Montar las muestras en porta muestras cilíndricas de cobre que estén limpios y rotulados. No tocar los cilindros con las manos.
- Colocar cinta adhesiva doble de carbón en un porta muestra cilíndrico.
- Con una pinza tomar la muestra y pegar partes de ella en la cinta adhesiva.
- Colocar las muestras en el recubridor catódico y encender el equipo y esperar a que se alcance una presión de vacío no menor a 10^{-2} mbar.

- Realizar el recubrimiento con una película de oro usando argón en estado plasmático.

Observar en el Microscopio Electrónico partiendo de muestras recubiertas en oro.

4.2.3 Protocolo de aislamiento y caracterización de *M. roreri*

Obtenido el aislamiento y la caracterización de *M. roreri* se procedió a realizar un protocolo denominado “Protocolo de Aislamiento y Caracterización de *Moniliophthora roreri*” en donde se incluyen los pasos estandarizados a seguir para el aislamiento y caracterización de *M. roreri* de esta forma facilitar su estudio.(anexo N°1)

4.2.4 Conservación de cepas de *Moniliophthora roreri*

Se almacenaron cepas partiendo de los aislamientos de *Moniliophthora roreri*, obtenidos durante el procesamiento de las muestras, las cuales se almacenaron en congelación para ser utilizados en estudios posteriores.

Procedimiento.

- Realizar una suspensión de esporas en caldo V8 con 5% glicerol y caldo BHI con 5% glicerol.
- Colocar 1 mL de esta suspensión en tubos estériles.
- Almacenarlos a temperatura de -30°C

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Colección de muestras

Las muestras fueron colectadas en el cultivar San José del Real de La Carrera en el departamento de Usulután en el periodo de mayo-septiembre del 2013.



Fig. N°20 Colección de muestras de cacao en el cultivar San José del Real de La Carrera en el departamento de Usulután

Las muestra se colectaron de acuerdo a síntomas y signos de moniliasis tales como: maduración prematura, marchitez, formación de gibas, puntos aceitosos, mancha café etc., para así realizar el aislamiento de *Monilophthora roreri*.

Se realizaron tres muestreos, de los cuales se obtuvieron un total de 62 muestras las cuales se colectaron en bolsas plásticas estériles, identificadas con fecha, lugar, número de muestra. Número de lote.

Cuadro N°2 Muestreos y códigos de muestras analizadas

Muestreos	Numero de muestras	Códigos
Prueba preliminar	1	M1
Muestreo 1	19	MX1-1, MX1-2, MX1-3, MX1-4, MX1-5, MX1-6, MX1-7, MX1-8, MX1-9, MX1-10, MX1-11, MX1-12, MX1-13, MX1-14, MX1-15, MX1-16, MX1-17, MX1-18, MX1-19
Muestreo 2	22	MX2-1, MX2-2, MX2-3, MX2-4, MX2-5, MX2-6, MX2-7, MX2-8, MX2-9, MX2-10, MX2-11, MX2-12, MX2-13, MX2-14, MX2-15, MX2-16, MX2-17, MX2-18, MX2-19, MX2-20, MX2-21, MX2-22
Muestreo 3	20	MX3-1, MX3-2, MX3-3, MX3-4, MX3-5, MX3-6, MX3-7, MX3-8, MX3-9, MX3-10, MX3-11, MX3-12, MX3-13, MX3-14, MX3-15, MX3-16, MX3-17, MX3-18, MX3-19, MX3-20.

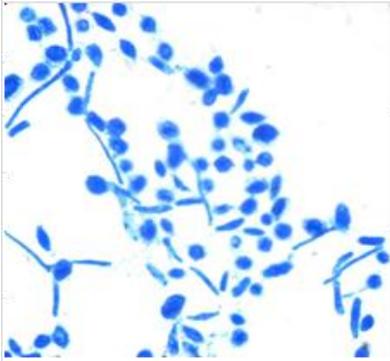
En el Cuadro N°2 se observan los muestreos realizados y la codificación de cada una de las muestras se puede observar que principalmente se realizó una prueba preliminar con un cacao proporcionado por el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud CENSALUD, luego se realizaron tres muestreos

colectándose un total de 62 muestras de diferentes edades que presentaban síntomas de moniliasis las cuales se procedieron a analizar.

5.2 Aislamiento del hongo *Moniliophthora roreri* en frutos de cacao sospechosos de enfermedad.

De las muestras procesadas y analizadas de acuerdo al procedimiento de desinfección y siembra de las muestras lo que se espera observar en los aislamientos, son características específicas para *Moniliophthora roreri*, los cuales se describen en el Cuadro N°. 3

Cuadro N°3 Características Macroscópicas y Microscópicas de *Moniliophthora roreri*

Colonia típica de <i>M. roreri</i>	Características macroscópicas	
	Centro	Puntiforme
	Formación de anillos	si
	Borde	Regular/ Irregular
	Textura	Pulverulenta/ Algodonosa
	Coloración	De Blanco a Beige
	Sectores	Presencia/ Ausencia
Esporas de <i>M. roreri</i>	Características microscópicas	
		Tamaño aproximado
	Esporas globosas	4-5 μ
	Esporas subglobosas	7-8μ
Esporas Elípticas	9-11μ	

5.3 Prueba Preliminar (M1)

La muestra analizada fue un cacao recolectado con anterioridad, ya en estado momificado, al cual se le raspó la superficie, colocando ese polvillo (raspado) sobre agar papa dextrosa y agar dextrosa saboraud, los cuales no estaban reforzados con solución de Gentamicina Sulfato los cuales se incubaron a 25°C en oscuridad, durante 7 días con el fin de verificar el crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

Al término de 7 días de incubación se obtuvieron colonias con las características presentadas en las Fig. N° 21 y 22

5.3.1 Morfología Macroscópica

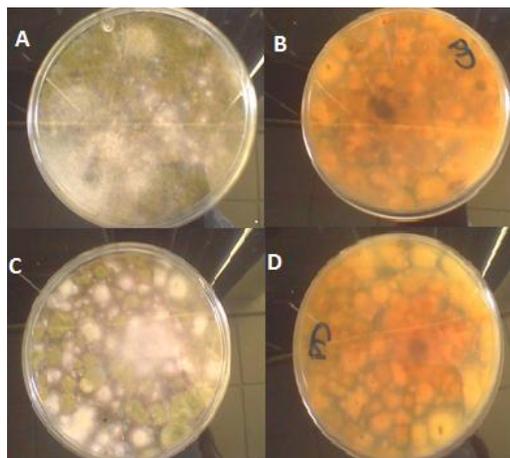


Fig. N°21 Crecimiento del raspado de la superficie de muestra momificada de *Theobroma cacao* en agar Papa Dextrosa. A y C parte frontal, B y D parte dorsal.

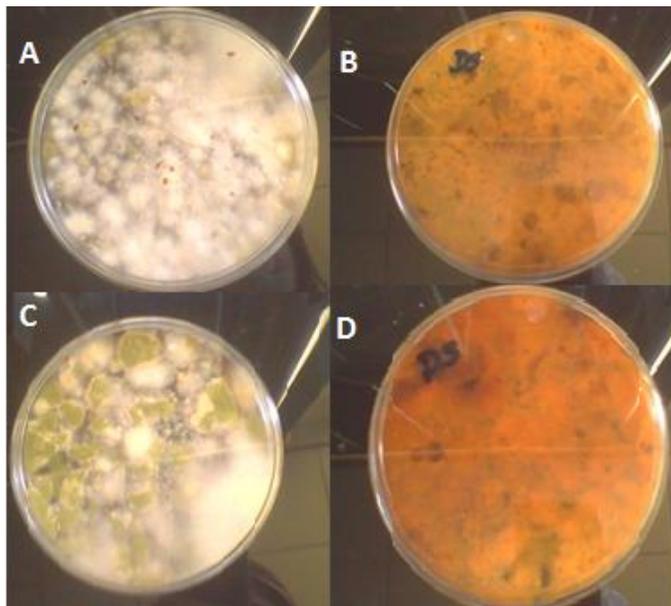


Fig. N°22 Crecimiento del raspado de la superficie de muestra momificada de *Theobroma cacao* en agar Papa Dextrosa. A y C parte frontal, B y D parte dorsal.

En las Fig. N°21 y N°22, se pudo observar crecimiento abundante en el medio de cultivo, el cual no coincidió con las características macroscópicas típicas de *Moniliophthora roreri*, por lo que el crecimiento obtenido era parte de la flora acompañante del cacao.

5.3.2 Aislamiento de flora acompañante

Luego de obtener la flora acompañante se procedió a aislar los diferentes tipos de hongos e identificarlos microscópicamente para verificar o descartar el crecimiento de *Moniliophthora roreri*. Se aislaron los hongos presentes de acuerdo a su coloración y textura, a 25°C por siete días en la oscuridad, luego del tiempo de incubación se obtuvo crecimiento de *Aspergillus spp*, *Penicillium spp* y *Fusarium spp*.

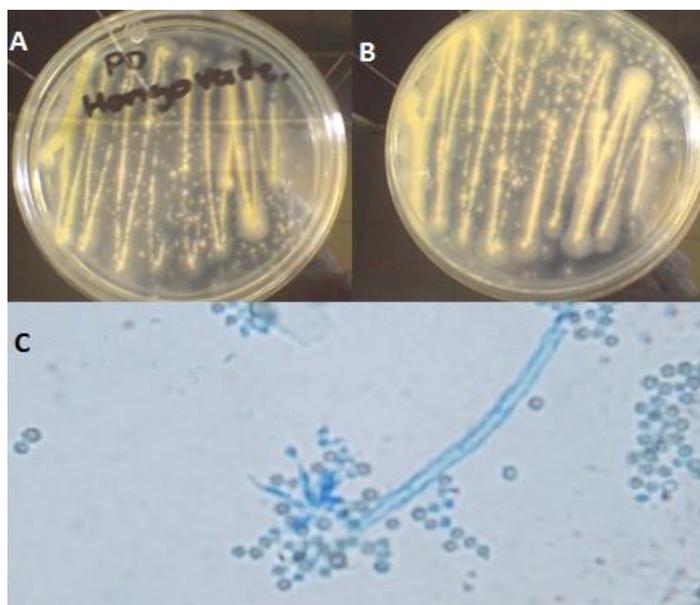


Fig. N°23. Aislamiento *Aspergillus spp*. (Hongo color verde). A y B morfología macroscópica. C morfología microscópica.

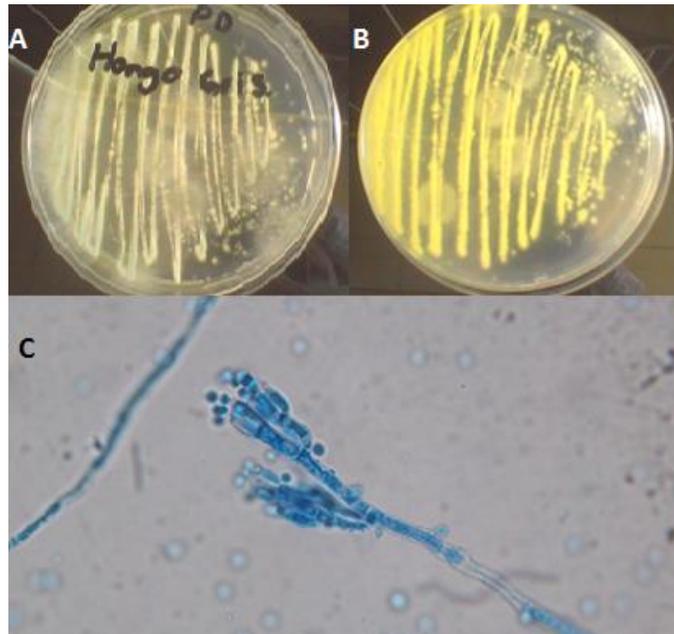


Fig. N°24. Aislamiento de *Penicillium spp.* (Hongo color gris). A y B morfología macroscópica. C morfología microscópica.

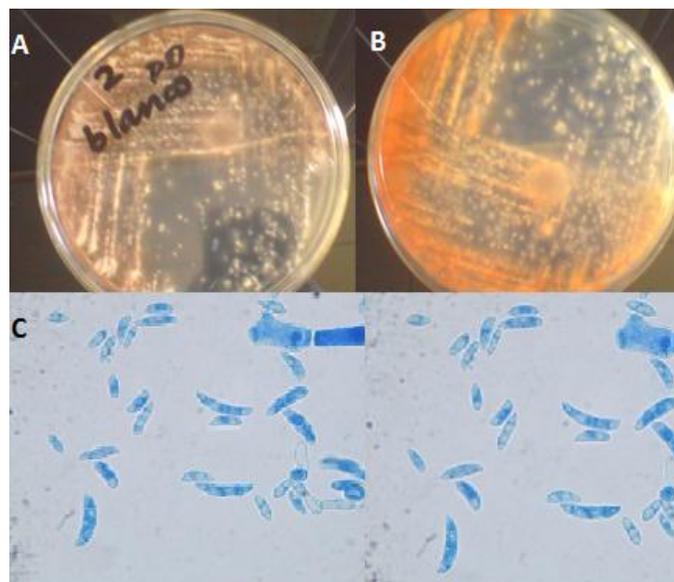


Fig. N°25 Aislamiento de *Fusarium spp.* (Hongo color blanco). A y B morfología macroscópica, C morfología microscópica.

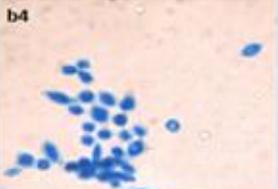
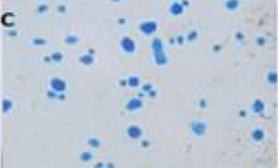
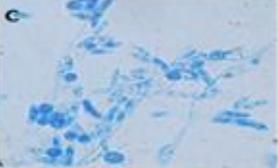
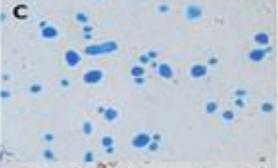
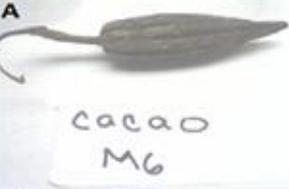
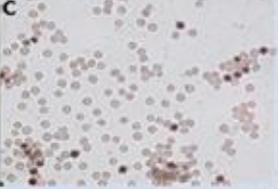
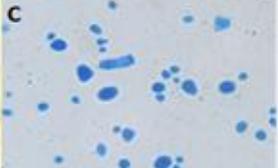
El aislamiento de *Moniliophthora roreri* no fue posible debido al crecimiento de flora acompañante perteneciente a hongos saprófitos, como puede apreciarse en la morfología macroscópicas y microscópicas se identificaron como cepas de *Aspergillus spp.* (Fig. N°24) *Penicillium spp.* (Fig. N°25) y *Fusarium spp.* (Fig. N°26), los cuales antagonizan posiblemente el consumo de nutrientes y espacio evitando así que no sea posible aislarlo.

En la muestra de cacao en estado momificado hay muchos hongos pertenecientes a la flora acompañante, los cuales podrían antagonizar el crecimiento de *Moniliophthora roreri*, por lo que no se puede aislar. Además por el estado momificado de la muestra no se puede realizar una adecuada desinfección.

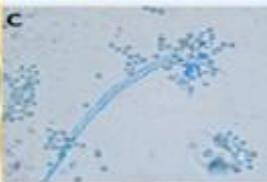
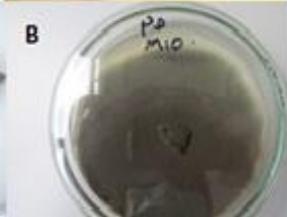
5.4 MUESTREO 1

Se colectaron 19 muestras en el cultivar de cacao San José del Real la Carrera en Usulután con signos y síntomas de moniliasis (Anexo N°4), las cuales se identificaron, desinfectaron y procesaron. Se inocularon en Agar V8, Papa dextrosa, Dextrosa saboraud reforzados con 800 µL de Solución de Gentamicina 80mg/2mL por litro de agar a 25°C por 15 días en la oscuridad.

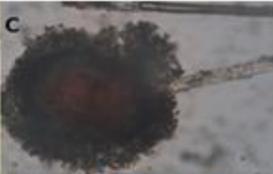
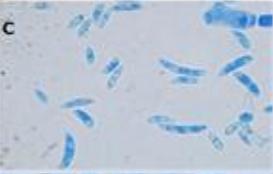
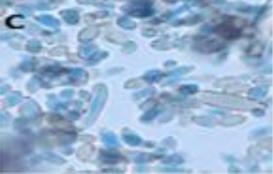
Cuadro N°4 Aislamiento de muestras del muestreo 1

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
Mx1-1	 A cacao M1	 B M1 b1 b2 b3 b4	 C b4
Mx1-2	 A cacao M2	 B	 C
Mx1-3	 A cacao M3	 B	 C
Mx1-4	 A cacao M4	 B	 C
Mx1-5	 A cacao M5	 B	 C
Mx1-6	 A cacao M6	 B	 C
Mx1-7	 A cacao M7	 B	 C

Cuadro N°4 . Continuacion.

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
Mx1-8	 A cacao M8	 B	 C
Mx1-9	 A cacao M9	 B	 C
Mx1-10	 A cacao M10	 B p2 M10	 C
Mx1-11	 A cacao M11	 B p2 M11	 C
Mx1-12	 A Cacao M12	 B p2 M12	 C
Mx1-13	 A cacao M13	 B	 C
Mx1-14	 A cacao M14	 B p2 M14	 C

Cuadro N°4. Continuación.

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
Mx1-15	 A Cacao M15	 B	 C
Mx1-16	 A Cacao M16	 B	 C
Mx1-17	 A Cacao M17	 B	 C
Mx1-18	 A Cacao M18.	 B M18	 C
Mx1-19	 A Cacao M19.	 B	 C

Como se puede observar en el Muestreo 1, el aislamiento de *Moniliophthora roreri* fue bastante dificultoso debido al crecimiento de varios hongos pertenecientes a la flora acompañante, aun cuando el fruto de *Theobroma cacao* presente signos y síntomas de moniliasis, es así como de 19 muestras analizadas solamente la muestra Mx1-1 presenta una colonia sospechosa de *Moniliophthora roreri* en cuanto a las características macroscópicas de coloración y textura y microscópicas de forma y tipo de esporas.

En las 18 muestras restantes se observó tanto macroscópica y microscópicamente la flora acompañante del cacao que pudo haber antagonizado el crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas de la muestra Mx1-1 la cual es sospechosa de *M. roreri*, dichas características son propias de una colonia típica de *M. roreri* por lo que se procedió a su aislamiento

5.4.1 Aislamiento de *Moniliophthora roreri* a partir de Mx1-1

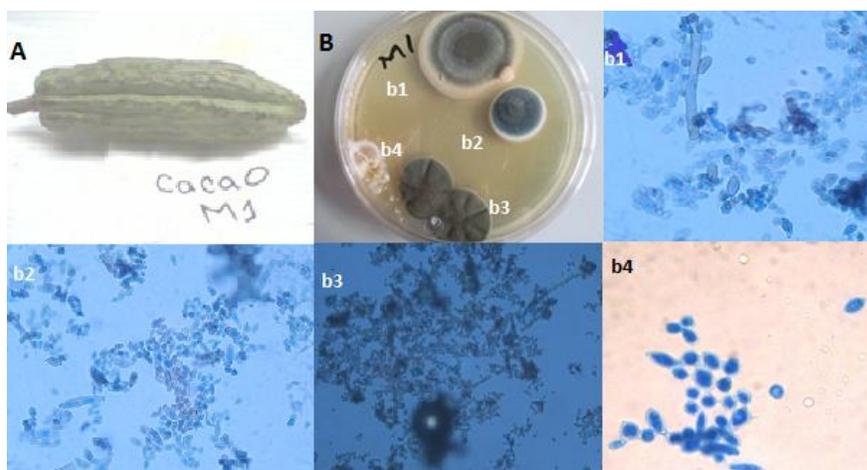


Fig. N°26. Muestra de cacao Mx1-1 con signos y síntomas de moniliasis. A y B morfología macroscópica (b1, b2, b3) morfología microscópica de flora acompañante, (b4) morfología microscópica de *Moniliophthora roreri*

Como se puede apreciar en la figura N°26, el hongo aislado presenta, tanto macroscópica como microscópicamente, características propias de *Moniliophthora roreri*, como la coloración blanca y textura algodonosa/pulverulenta de la colonia, por lo que se sometió al análisis resembrando una fracción de la colonia en medio agar V8 sin solución de Gentamicina Sulfato, y se incubo a 25°C por 7 días en la oscuridad.

La muestra Mx1-1 presentó características macroscópicas y microscópicas típicas a las de una colonia de *Moniliophthora roreri*.(cuadro N°3), demostrando así que las edades y estados de los frutos son características importantes que deben de tomarse en cuenta en el momento de la colección; la muestra Mx1-1 es un fruto de cacao menor a tres meses, presentaba maduración prematura, secamiento, presencia de gibas, aun no se había exteriorizado la moniliasis por lo que frutos menores a 3 meses sin síntomas externos avanzados de la enfermedad (anexo N°4) son los más indicados para llevar a cabo el aislamiento, debido a que la moniliasis afecta internamente al fruto en su fase inicial, por lo que frutos menores de 3 meses con síntomas externos pueden ser causados por otro hongo fitopatógeno perteneciente a la flora acompañante.

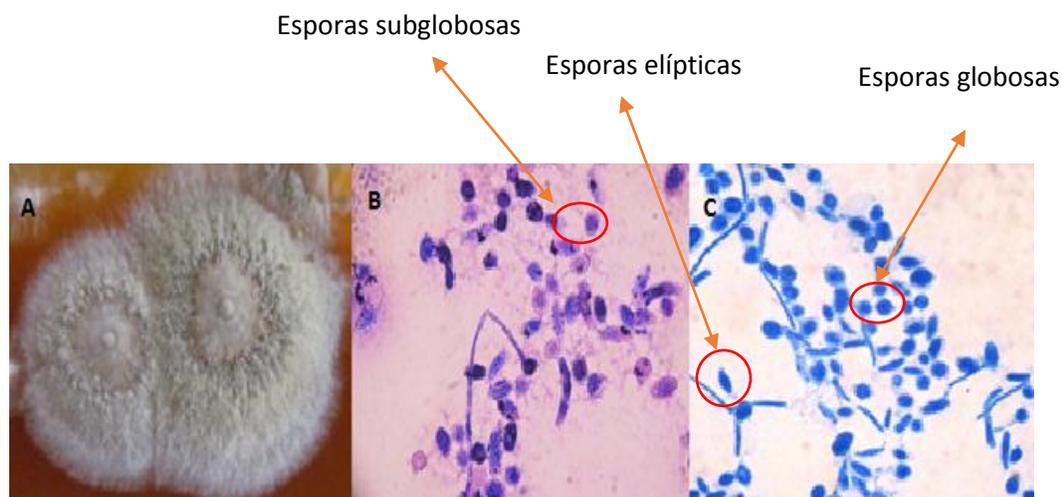


Fig. N°27 Aislamiento de *Moniliophthora roreri* de Mx1-1. (A) morfología macroscópica B y C morfología microscópica en tinción de Gram y tinción de Azul de lactofenol respectivamente.

El aislamiento de *Moniliophthora roreri* se realizó satisfactoriamente en agar V8, ya que se puede observar la esporulación del hongo (ver Fig. N° 28) y un mejor desarrollo de la colonia presentando textura pulverulenta (A). En B y C se puede apreciar microscópicamente la esporulación del hongo observándose esporas globosas, subglobosas y elípticas e hifas de *Moniliophthora roreri*, tanto en tinción de Gram como en tinción de azul de lactofenol.

Luego de aislar la colonia de *Moniliophthora roreri* fue sometida a diferentes pruebas:

- Pruebas de crecimiento en agar V8 y agar V8 extracto cacao.
- Crecimiento del hongo a diferentes concentraciones de Gentamicina.

5.4.1.1 Prueba de crecimiento en Agar V8 y Agar V8 extracto cacao.

Con un asa estéril se tomó una fracción de la colonia de *Moniliophthora roreri* y se inoculó en 2 placas petri conteniendo una Agar V8 y la otra Agar V8 extracto cacao y se incubaron a 25°C en la oscuridad, por 7 días.

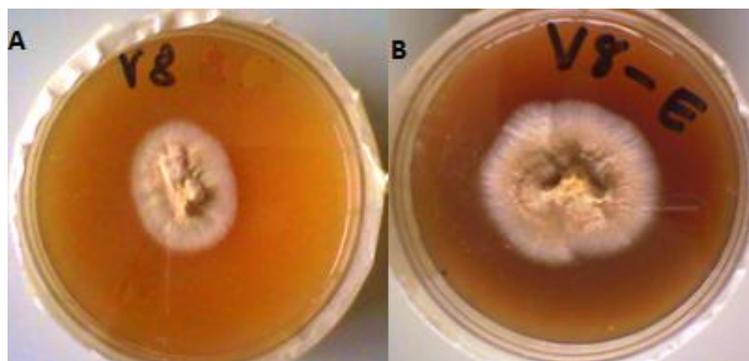


Fig. N°28 Crecimiento de *Moniliophthora roreri*. A crecimiento en agar V8. B, crecimiento en agar V8 extracto cacao.

El crecimiento de *Moniliophthora roreri* es mayor en agar V8 extracto debido a nutrientes pertenecientes propios del cacao, los cuales estimulan el crecimiento del hongo, mientras que en agar V8 el crecimiento fue menor. Pero en ambos crecimientos se observa las mismas características macroscópicas de la colonia, el agar V8 extracto cacao presenta mayor índice de contaminación y susceptibilidad al crecimiento de hongos ambientales, por ende para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* se utilizó agar V8 extracto cacao y para la purificación agar V8.

5.4.1.2 Crecimiento de *Moniliophthora roreri* a diferentes concentraciones de Gentamicina Sulfato 80 mg/ 2mL

Se evaluó el crecimiento de *Moniliophthora roreri* en agar V8 con diferentes concentraciones de solución de Gentamicina Sulfato 800 μ L(3.2mg/mL), 900 μ L(3.6mg/mL), 1000 μ L(4.0mg/mL), 1100 μ L(4.4mg/mL), 1200 μ L(4.8mg/mL), 1300 μ L (5.2mg/mL) ; se incubo a 25°C en la oscuridad por 7 días.

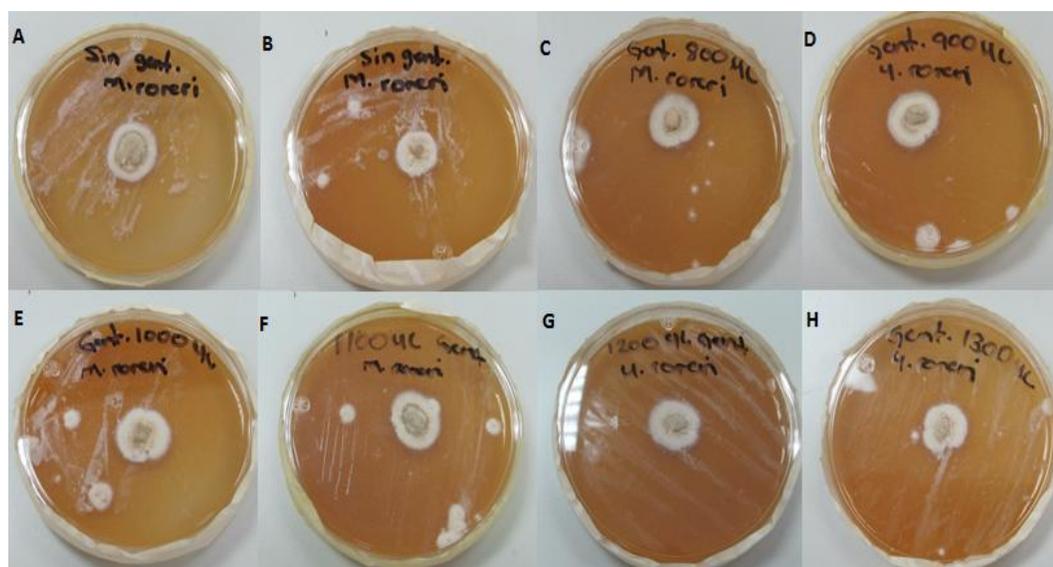


Fig. N°29 Crecimiento de *Moniliophthora roreri* sin gentamicina (A y B) y con diferentes concentraciones de gentamicina (C-H)

El crecimiento de *M. roreri* no se afectado por diferentes concentraciones de Sulfato de Gentamicina 80mg/2ml, por lo cual en análisis posteriores se podrá hacer uso de mayores concentraciones para disminuir el crecimiento de la flora acompañante y favorecer el crecimiento de *M. roreri*. En B de Fig. N°19 se muestra el aislamiento de *M. roreri* sin Gentamicina en el cual se ve crecimiento del hongo, pero así a medida que se va aumentando la concentración el crecimiento se ve poco afectado, por lo que nos permitirá usar mayores concentraciones de Gentamicina 80mg/2ml para inhibir la flora acompañante e interferencias de otros hongos sin verse afectado el crecimiento de *M. roreri*.

5.4.1.3 Identificación mediante el microscopio óptico

Se realizaron dos tipos de tinciones Tinción de Gram y tinción con Azul de lactofenol y se observaron e identificaron al microscopio esporas e hifas del hongo *Moniliophthora roreri* en donde S: esporas subglobosas, G: esporas globosas, E: esporas elípticas

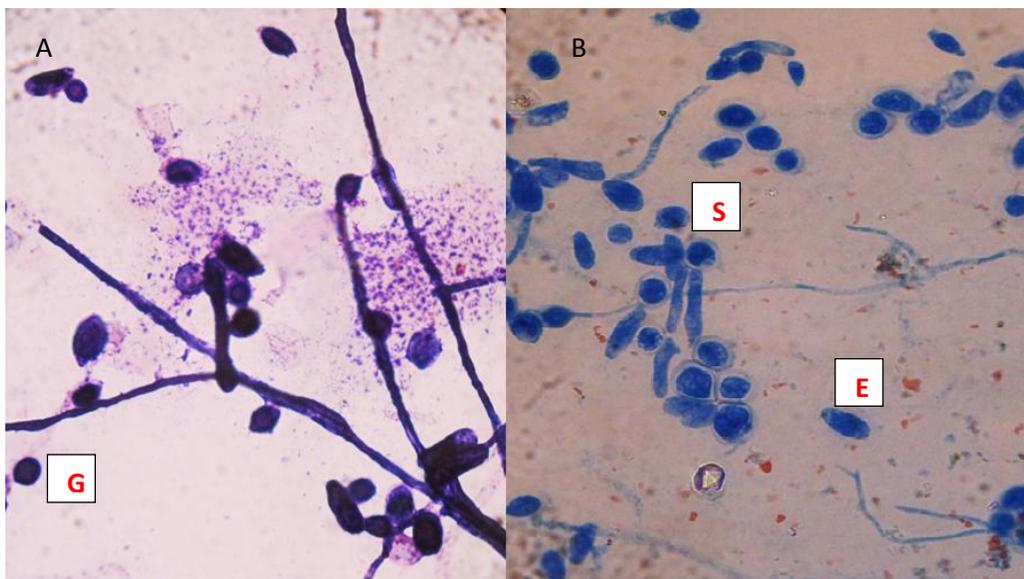


Fig. N°30 Tipos de esporas e hifas de *Moniliophthora roreri* vistas al microscopio óptico. (A) Tinción Gram, (B) tinción Azul de lactofenol

La identificación mediante del microscopio óptico es de gran utilidad ya que se puede apreciarse la morfología de las esporas e hifas de *M. roreri* tanto tinción de Gram como la de Azul de lactofenol, en donde se observa la disposición de las esporas en las hifas y los 3 tipos de esporas: globosas (G), subglobosas(S), elípticas (E) que son características propias del hongo en estudio.

5.4.2 Caracterización de *Moniliophthora roreri*

5.4.2.1 Evaluación Morfológica Macroscópica MX1-1

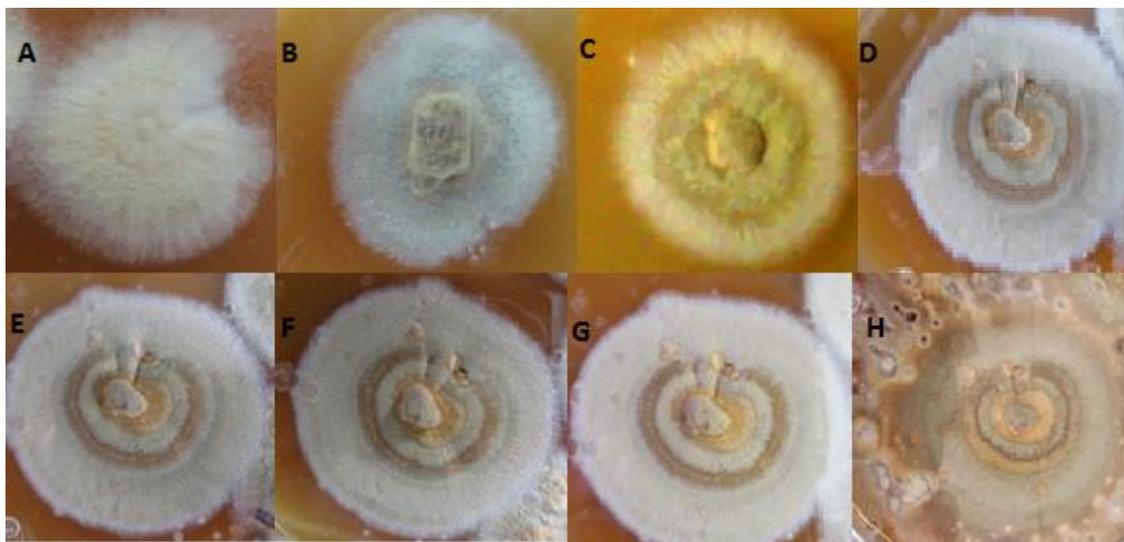
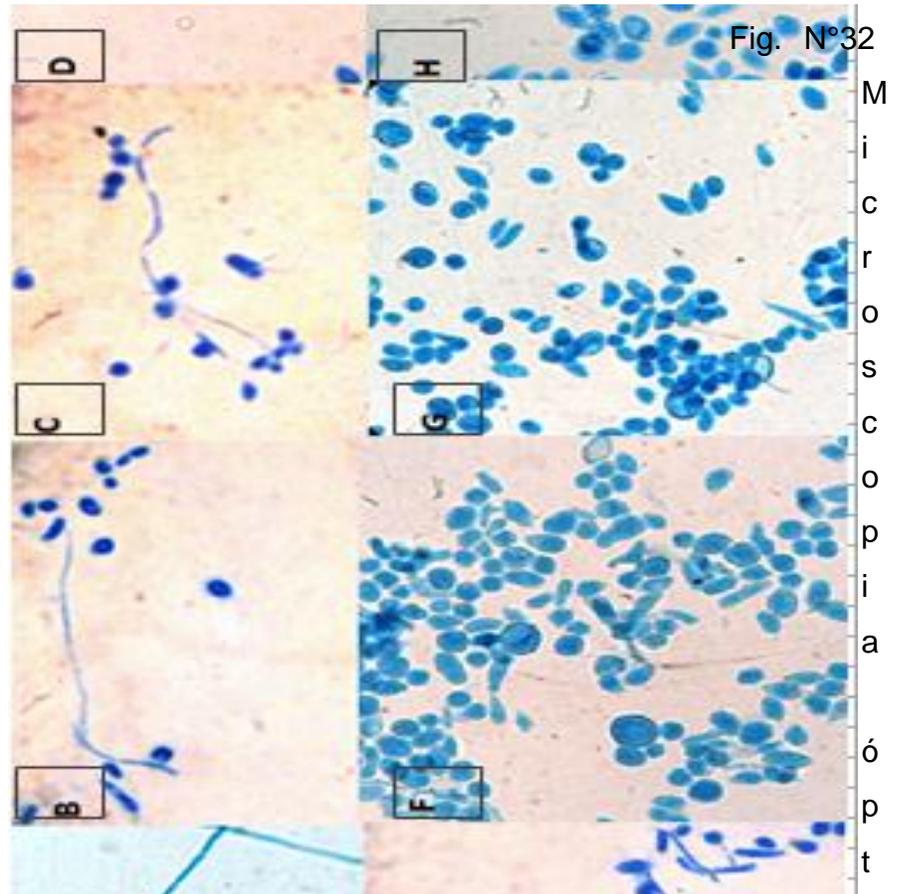


Fig. N°31 Características macroscópicas (De la A a la H) de colonias de diferentes días de crecimiento de *M. roreri* de MX1-1

En la Fig. N°31 muestra las características macroscópicas de *M. roreri* en los diferentes días de crecimiento en donde A (3 días), B (5 días), C (7 días), D (9 días), E (12 días), F (15 días), G (18 días), H (21 días) representan los días a los cuales se observó el crecimiento.

5.4.2.
2
Evaluación
Morfológica
Microscópica
MX1-
1



Evaluación morfológica Mx1-1

Cuadro N°5 Evaluación morfológica de *M. royeri* Mx1-1

Día	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
Determinación	Fig. 31 A	Fig. 31 B	Fig. 31 C	Fig. 31 D	Fig. 31 E	Fig. 31 F	Fig. 31 G	Fig. 31 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	1.5 cm	1.9 cm	2.1 cm	3.5 cm	4.1 cm	4.9 cm	5.7 cm	6.5 cm

Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales formación de 2 a 4 anillos.		Colonias puntiformes, radiales formación de 5 a 7 anillos.					
Borde	Irregular		Regular					
Textura	Algodonosa		Pulverulenta					
Coloración	Blanco cremoso, beige claro, verde		Blanco cremoso, beige claro, verde,			Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja.		
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia			Presencia				
Características Microscópicas								
Evaluación morfológica	Día 3 Fig. 32 A	Día 5 Fig. 32 B	Día 7 Fig. 32 C	Día 9 Fig. 32 D	Día 12 Fig. 32 E	Día 15 Fig. 32 F	Día 18 Fig. 32 G	Día 21 Fig. 32 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
	Subglobosas							
	Elípticas							

La caracterización morfológica (Microscópica y macroscópica) de *Moniliophthora roreri* evidenció como las colonias del hongo, con el transcurso del tiempo cambian tanto en coloración como en textura, tamaño etc. En cuanto a la esporulación, esta aumenta conforme a los días, en el día 3 prácticamente solo pueden observarse hifas, y algunas esporas globosas en los siguientes días el número de esporas globosas aumentan y pueden observarse esporas subglobosas, a partir del día 7 se pueden observar las esporas elípticas.

5.4.2.3 Microcultivos

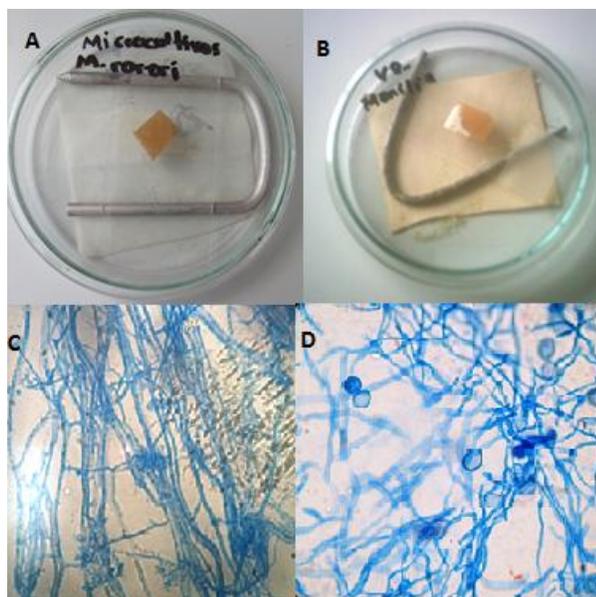


Fig. N° 33 Caracterización con microcultivos de muestra de muestreo 1.
Características macroscópicas y microscópicas de *M. roreri*

El propósito de realizar los microcultivos es; que debido al diámetro pequeño del la fracción de agar la colonia de *Moniliophthora roreri*, crece de manera uniforme y compactada; pudiéndose visualizar de mejor forma en el microscopio óptico, las estructuras microscópicas (esporas e hifas) del hongo.

5.4.2.4 Microscopia Electrónica de Barrido

5.4.2.4.1 Esporas Globosas

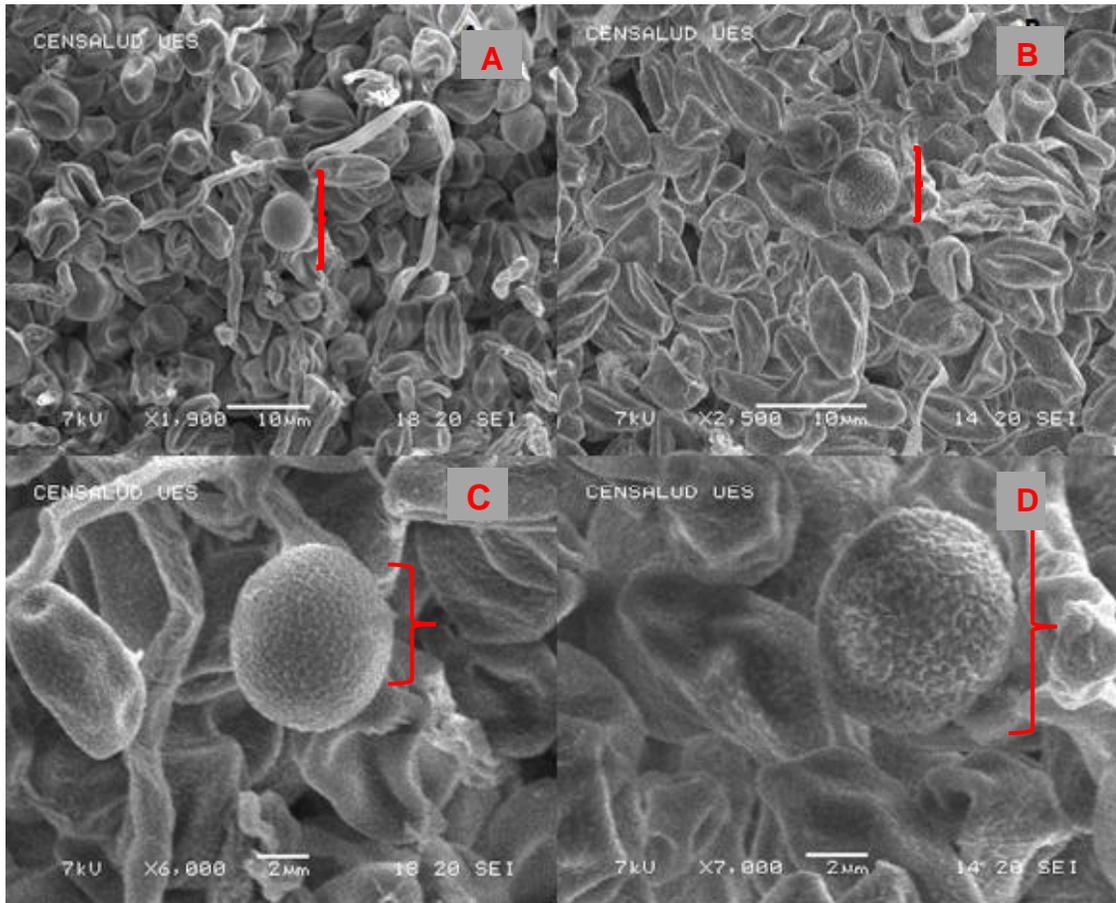


Fig. N° 34 Esporas Globosas e hifas de *Moniliophthora roreri* aisladas Mx1-1 vistas en microscopio electrónico de barrido A (1,900X), B (2,500X), C (6,000X) y D (7,000X).

Las esporas Globosas presentan un tamaño aproximado de 4-5 µm .

5.4.2.4.2 Esporas subglobosas

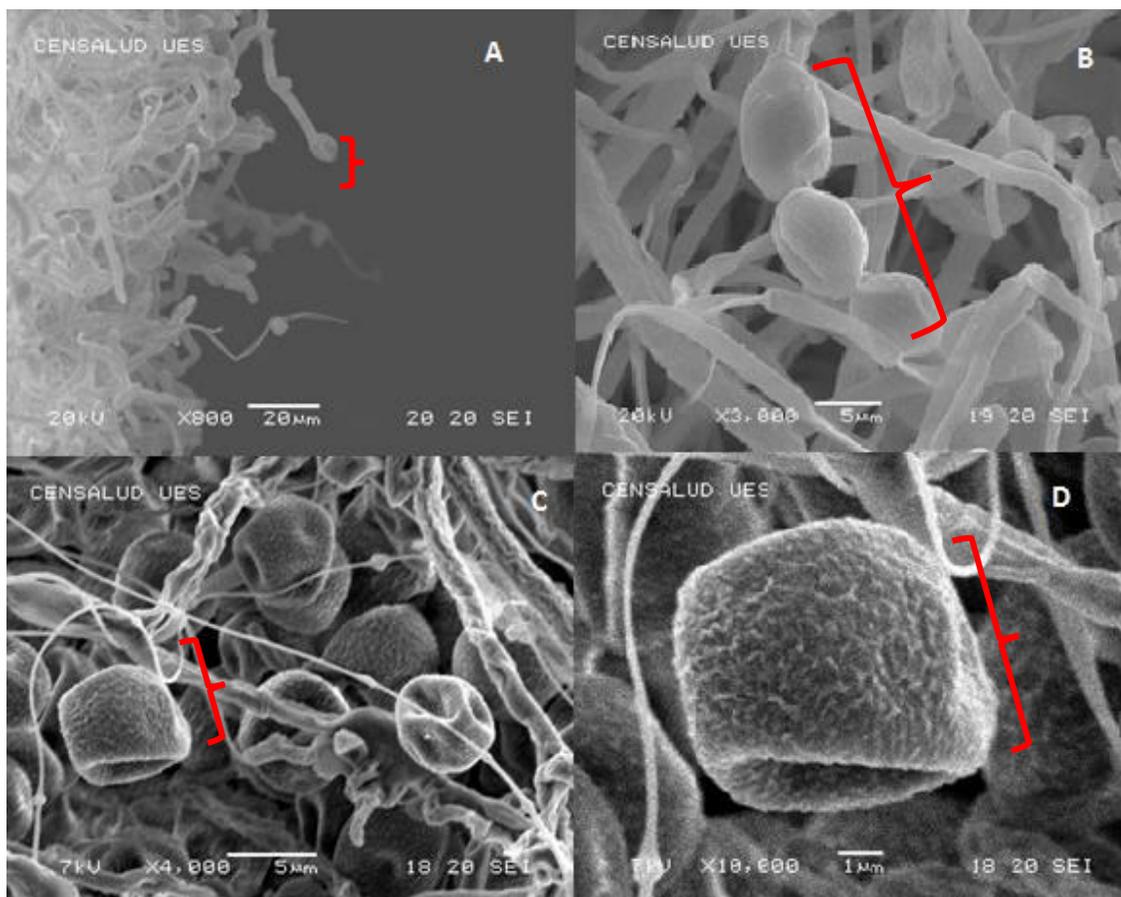


Fig. N° 35 Esporas Subglobosas e hifas de *Moniliophthora roreri* aisladas Mx1-1 vistas en microscopio electrónico de barrido A (800X), B (3,000X), C (4,000X) Y D (10,000X).

Las esporas subglobosas presentan un tamaño aproximado de 7-8 μm .

5.4.2.4.3 Esporas Elípticas

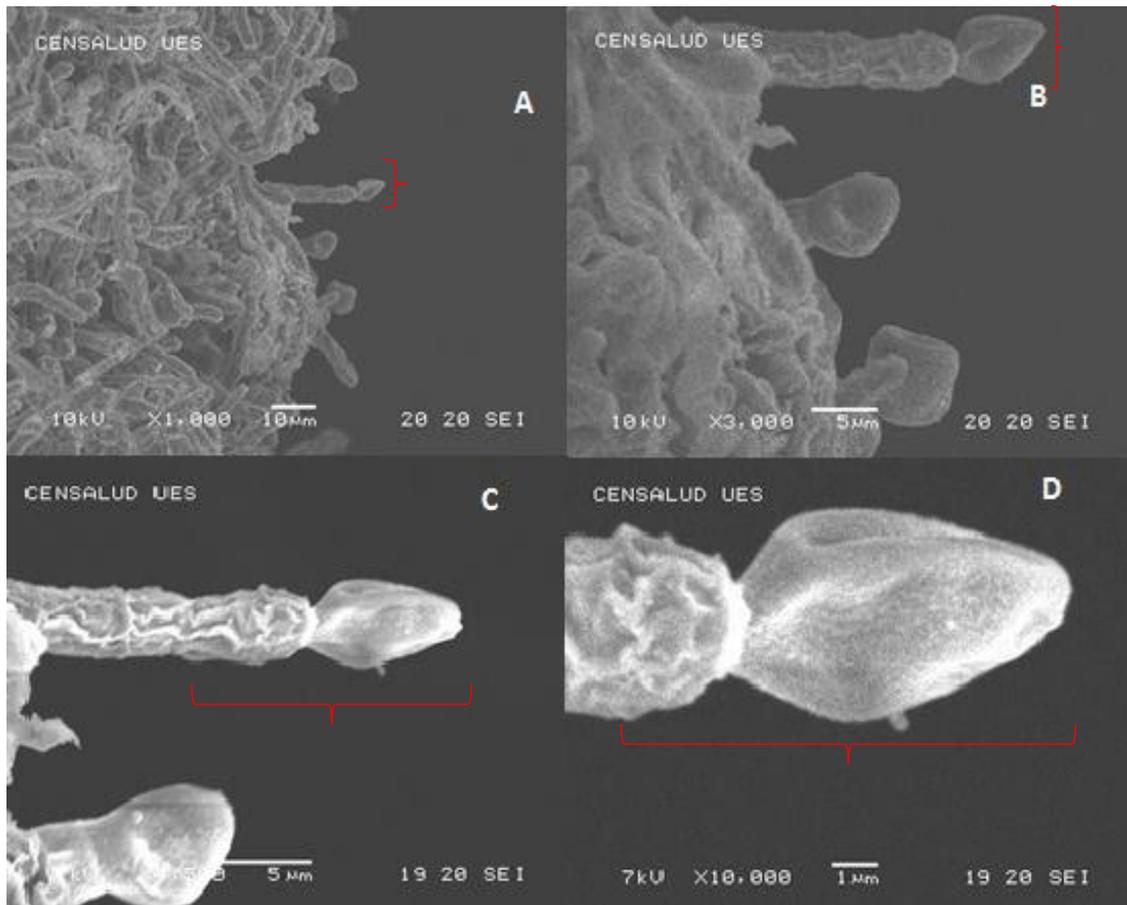


Fig. N° 36 Esporas Elípticas e hifas de *Moniliophthora roreri* aisladas Mx1-1 vistas en microscopio electrónico de barrido A (1,000X), B (3,000X), C (5,000X) Y D (10,000X).

Las esporas elípticas presentan un tamaño aproximado de 9-11 µm

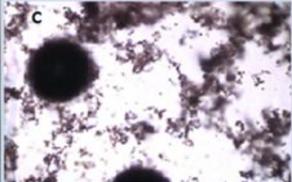
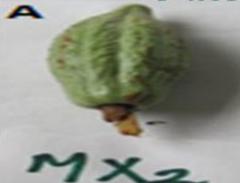
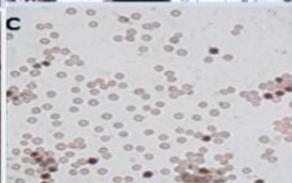
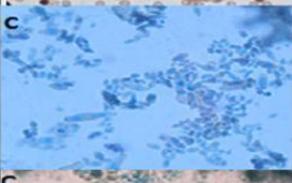
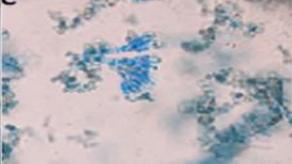
En el microscopio electrónico de barrido se aprecia la forma y disposición de las esporas, pudiendo observarse características ultraestructurales de las esporas

de *Moniliophthora roreri* de forma magnificada, como la disposición, agrupamiento, borde, tamaño y superficie, diferenciándose los diferentes tipos de esporas.

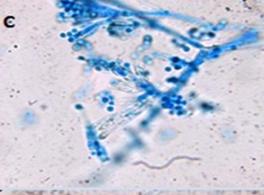
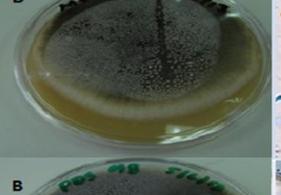
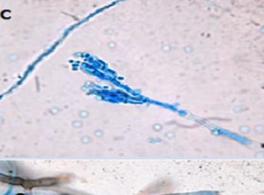
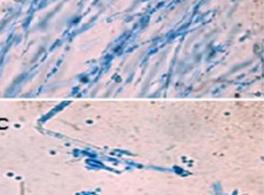
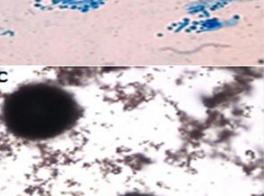
5.5 MUESTREO 2.

Se colectaron 22 muestras en la Hacienda San José del Real de la Carrera en Usulután con signos y síntomas de moniliasis, las cuales se identificaron, desinfectaron y procesaron (de acuerdo al procedimiento descrito en diseño metodológico) se inocularon en agar V8, Papa dextrosa, Dextrosa saboraud reforzados con 800 μ L de solución de Gentamicina Sulfato 80 mg/2mL por litro de agar y se incubaron a 25°C por 15 días en la oscuridad.

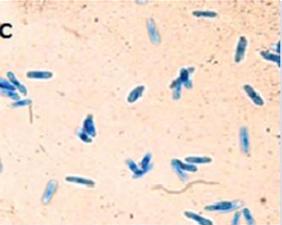
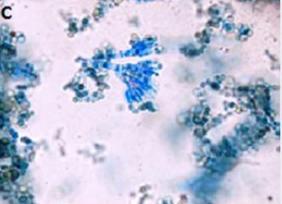
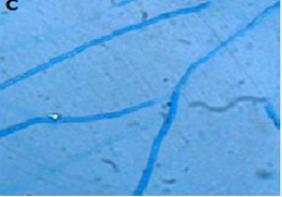
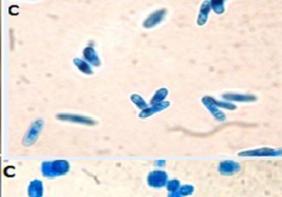
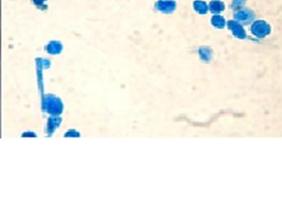
Cuadro N°6 Aislamiento de *Moniliophthora roreri* de Muestreo 2.

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
Mx2-1			
Mx2-2			
Mx2-3			
Mx2-4			

Cuadro N°6. Continuación

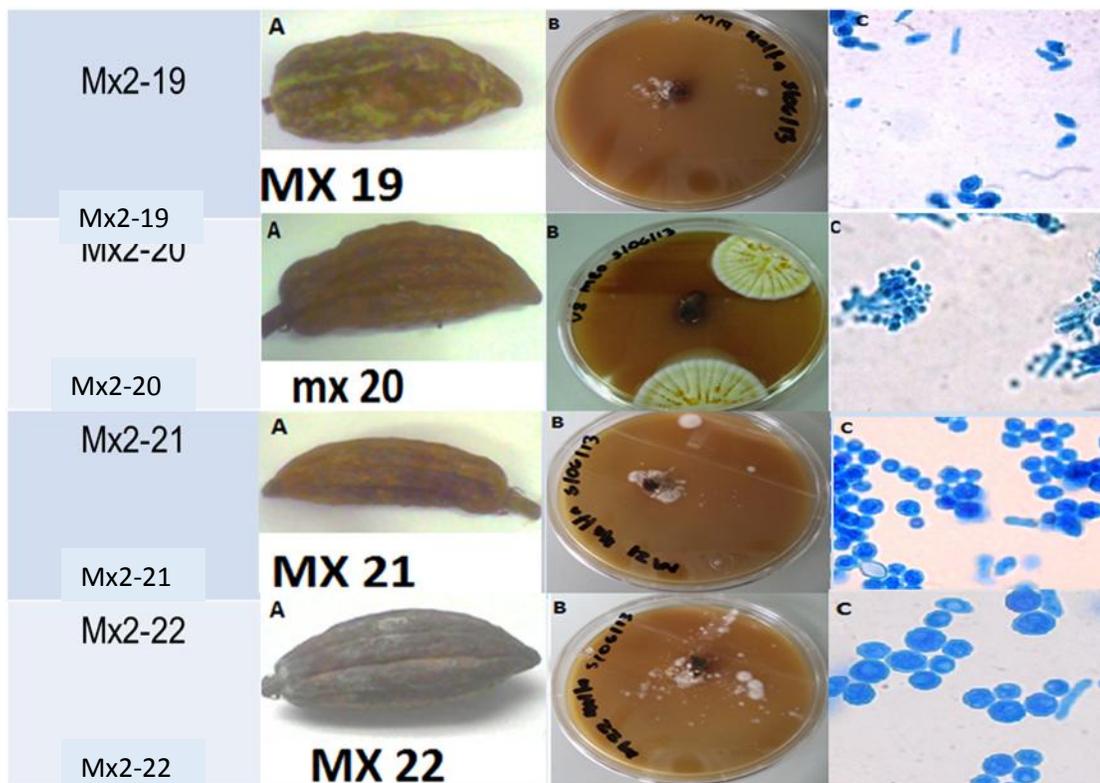
Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
MX2-5			
MX2-6			
MX2-7			
MX2-8			
MX2-9			
MX2-10			
MX2-11			

Cuadro N°6. Continuación

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
MX2-12	 MX 12		
MX2-13	 Mx 13		
MX2-14	 MX 14		
MX2-15	 MX 15		
MX2-16	 MX 16		
MX2-17	 MX 17		
MX2-18	 MX 18		

Cuadro 14. C. Continuación

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
-------------------	---------	-------------------------	-------------------------



Como se puede observar; se obtuvo crecimiento de *Moniliophthora roreri* en 6 diferentes muestras de las cuales al realizar tinciones tanto de Gram como de azul de lactofenol pudieron observarse las esporas e hifas características de este hongo; de las muestras Mx2-14, Mx2-16, Mx2-18, Mx2-19, Mx2-21, y Mx2-22 se logró aislar.

La dificultad del aislamiento de *Moniliophthora roreri*, se sigue evidenciando ya que de 22 muestras con signos y síntomas de moniliasis solamente de 6 se aisló este.

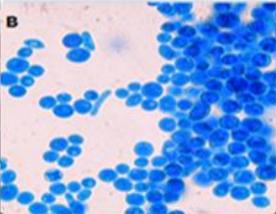
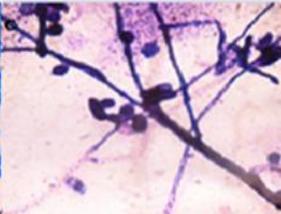
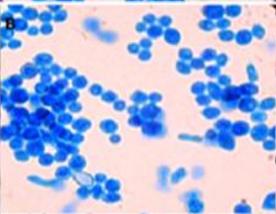
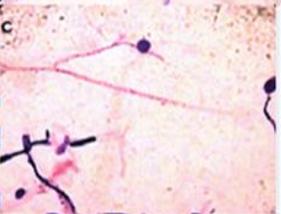
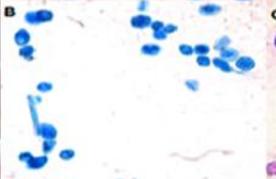
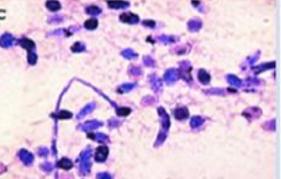
Pero evidenciándose con claridad las colonia de *Moniliophthora roreri*, ya que presenta características propias de la colonia, como se puede ver en la Fig. N°37 se puede observar el crecimiento de la colonia, y en Fig. N°43 se pueden observar las esporas globosas, características del hongo, las muestras más indicadas para el aislamiento de *Moniliophthora roreri*, son aquellos frutos de

cacao menores a 3 meses en donde la enfermedad no se ha exteriorizado pro presentan síntomas característicos como marchites, maduración prematura y abultamientos,

5.5.1 Aislamiento de *Moniliophthora roreri* a partir de muestras Mx2-14, Mx2-16, Mx2-18, Mx2-19, Mx2-21, Mx2-22

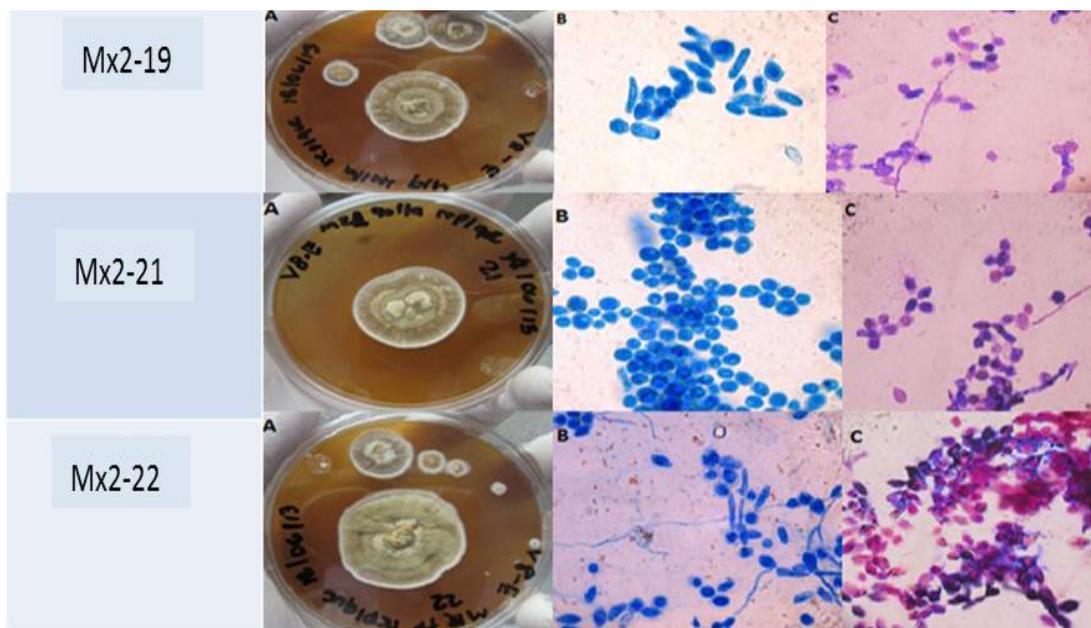
De las colonias de las cuales se aisló *Moniliophthora roreri*, se repico en agar V8 y se realizó tinción de Gram y azul de lactofenol.

Cuadro N°7 Aislamiento de *Moniliophthora roreri* a partir de muestras positivas

Código de la muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica	
		Tinción de Azul de Lactofenol	Tinción de Gram
Mx2-14			
Mx2-16			
Mx2-18			

Cuadro N°7. Continuación.

Código de la muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica	
		Tinción de Azul de Lacto fenol	Tinción de Gram



El aislamiento de *Moniliophthora roreri* se realizó satisfactoriamente en agar V8. En el cuadro N° 7 se puede apreciar características macroscópicas propias del hongo y microscópicamente la esporulación del hongo *Moniliophthora roreri* en ambas tinciones.

Por lo que se procedió a realizar la evaluación morfológica del hongo a los diferentes días de crecimiento.

5.5.2 Caracterización de *Moniliophthora roreri*

5.5.2.1 Evaluación Morfológica Macroscópica MX2-14

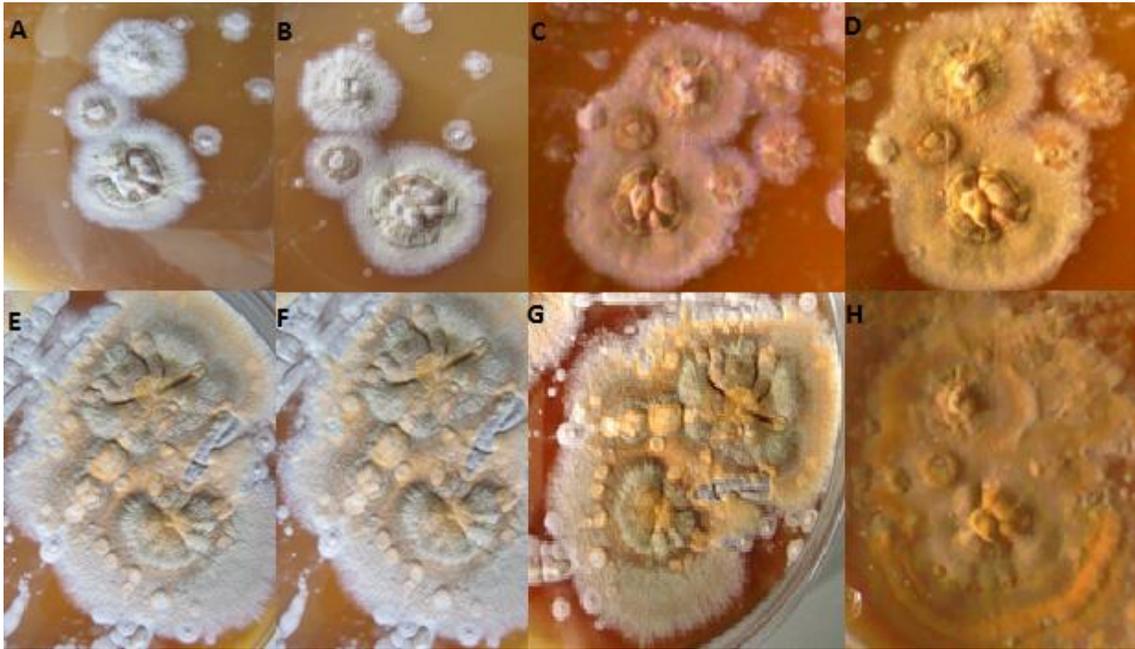


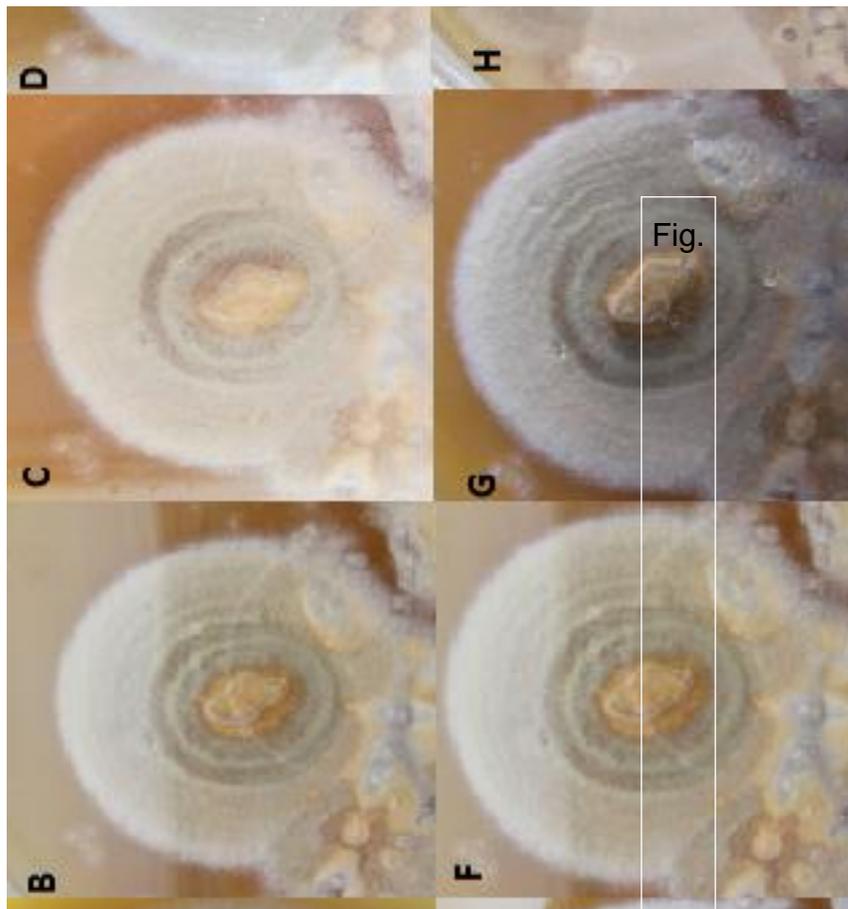
Fig. N°37 Secuencia de Crecimiento macroscópico de *M. royeri* de Mx2-14.

Evaluación morfológica Mx2-14

Cuadro N°8 Evaluación morfológica de *M. royeri* Mx2-14

Día Determinación	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
	Fig. 37 A	Fig. 37 B	Fig. 37 C	Fig. 37 D	Fig. 37 E	Fig. 37 F	Fig. 37 G	Fig. 37 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	1.9 cm	2.3 cm	2.5 cm	2.9 cm	3.6 cm	4.8 cm	5.9 cm	6.8 cm
Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales formación de 2 a 4 anillos.			Colonias puntiformes, radiales formación de 5 a 7 anillos.				
Borde	Regular		Irregular					
Textura	Algodonosa		Pulverulenta					
Coloración	Blanco cremoso, beige claro, verde			Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja			Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja.	
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia				Presencia			
	Características Microscópicas							
Evaluación morfológica	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
	Fig. 43 A	Fig. 43 B	Fig. 43 C	Fig. 43 D	Fig. 43 E	Fig. 43 F	Fig. 43 G	Fig. 43 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
	Subglobosas							
	Elípticas							

5.
5.
2.
2
Ev
al
ua
ci
ón
M
orf
ol
óg
ic
a
M
ac
ro



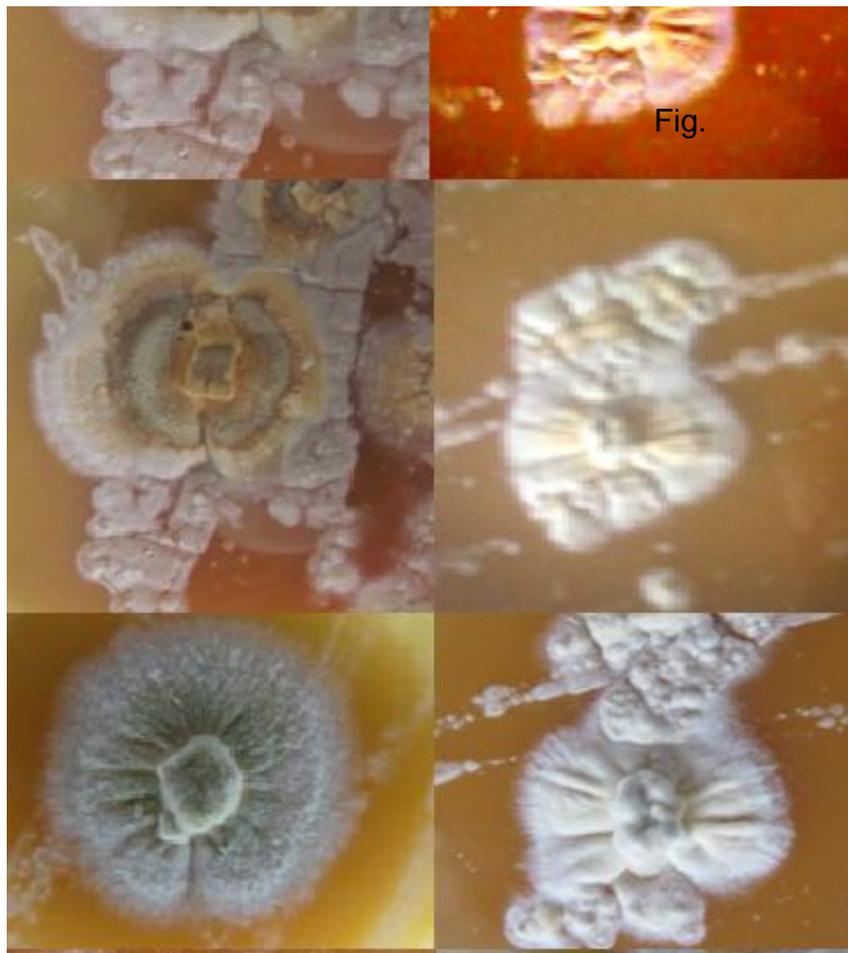
**E sc ac ión morfológica Mx2-16
óp**

C ic o N°9 Evaluación morfológica de *M. royeri* Mx2-16

a	Día	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
	Determinación	Fig. 38 A	Fig. 38 B	Fig. 38 C	Fig. 38 D	Fig. 38 E	Fig. 38 F	Fig. 38 G	Fig. 38 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas								
	Tasa de crecimiento	1.8 cm	2.1 cm	2.9 cm	3.1 cm	3.6 cm	4.5 cm	5.7 cm	6.4 cm
Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales formación de 4 a 8 anillos.				Colonias puntiformes, radiales formación de 8 a 12 anillos				

Borde	Regular							
Textura	Algodonosa		Pulverulenta					
Coloración	Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja.							
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia		Presencia					
	Características Microscópicas							
Evaluación morfológica	Día 3 Fig. 43 A	Día 5 Fig. 43 B	Día 7 Fig. 43 C	Día 9 Fig. 43 D	Día 12 Fig. 43 E	Día 15 Fig. 43 F	Día 18 Fig. 43 G	Día 21 Fig. 43 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
	Subglobosas							
	Elípticas							

**5.5.2.3
Evaluación
Morfológica
Macroscópica
a
MX2-
18**



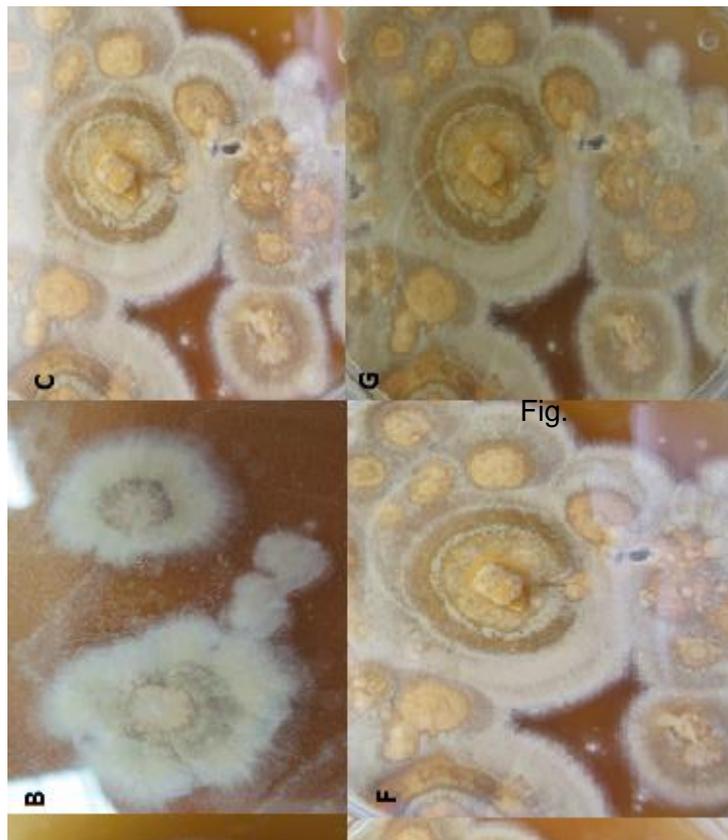
Evaluación morfológica Mx2-18

Cuadro N°10 Evaluación morfológica de *M. roleri* Mx2-18

Día Determinación	Día 3 Fig. 39 A	Día 5 Fig. 39 B	Día 7 Fig. 39 C	Día 9 Fig. 39 D	Día 12 Fig. 39 E	Día 15 Fig. 39 F	Día 18 Fig. 39 G	Día 21 Fig. 39 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	1.5 cm	1.8 cm	2.1 cm	2.3 cm	2.6 cm	3.5 cm	3.9 cm	4.1 cm
Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales			Colonias puntiformes, radiales formación de 4 a 6 anillos.				

	formación de 2 a 4 anillos.							
Borde	Irregular							
Textura	Algodonosa		Pulverulenta					
Coloración	Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja.			Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja.				
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia		Presencia					
	Características Microscópicas							
Evaluación morfológica	Día 3 Fig. 43 A	Día 5 Fig. 43 B	Día 7 Fig. 43 C	Día 9 Fig. 43 D	Día 12 Fig. 43 E	Día 15 Fig. 43 F	Día 18 Fig. 43 G	Día 21 Fig. 43 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
		Subglobosas						
		Elípticas						

5.5
 .2.
 4
 Ev
 alu
 aci
 ón
 Mo
 rfo
 ló
 gic



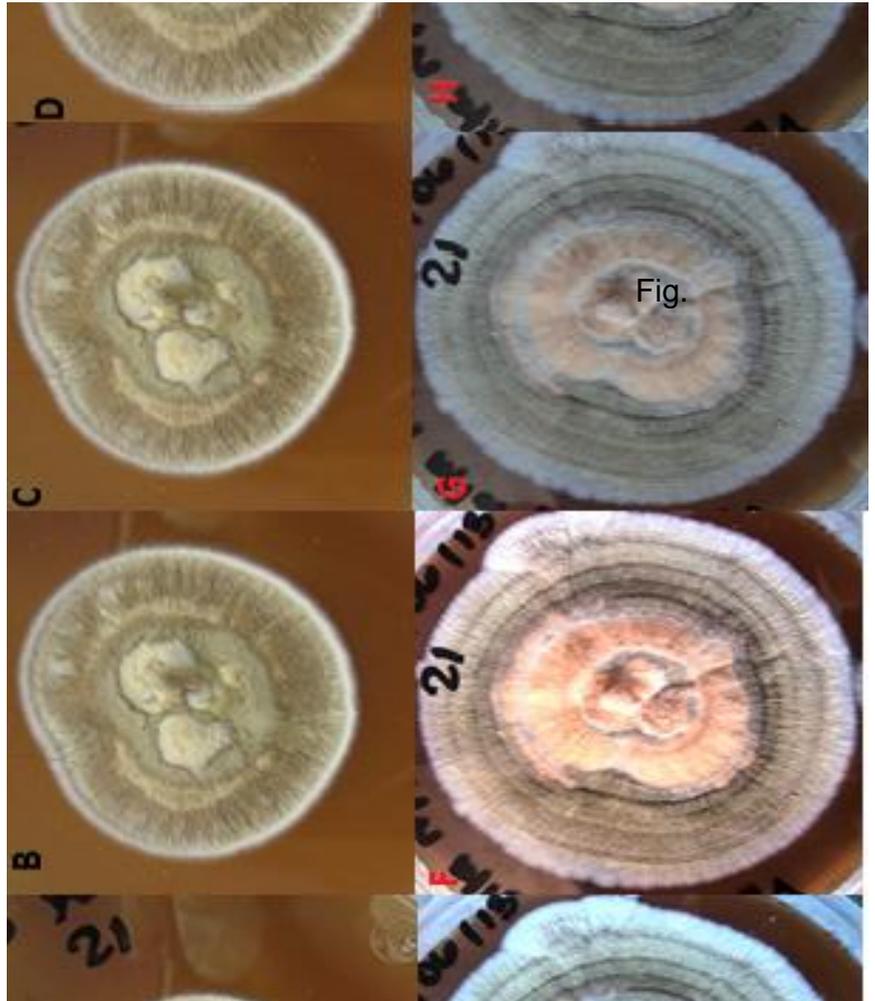
Evaluación morfológica Mx2-19

Cuadro N°11 Evaluación morfológica de *M. royeri* Mx2-19

Ma Día Determinación	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
	Fig. 40 A	Fig. 40 B	Fig. 40 C	Fig. 40 D	Fig. 40 E	Fig. 40 F	Fig. 40 G	Fig. 40 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	1.8 cm	2.3 cm	2.7 cm	3.5 cm	3.9 cm	4.5 cm	5.9 cm	7.7 cm
Característica s de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales formación de 2 a 4 anillos.			Colonias puntiformes, radiales formación de 5 a 7 anillos				
Borde	Irregular							

Textura	Algodonosa	Pulverulenta						
Coloración	Blanco cremoso, beige claro, verde.	Verde claro, café claro, café oscuro, verde, naranja.						
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia	Presencia						
Evaluación morfológica	Características Microscópicas							
	Día 3 Fig. 43 A	Día 5 Fig. 43 B	Día 7 Fig. 43 C	Día 9 Fig. 43 D	Día 12 Fig. 43 E	Día 15 Fig. 43 F	Día 18 Fig. 43 G	Día 21 Fig. 43 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
	Subglobosas							
	Elípticas							

5.5
 .2.
 5
 Ev
 alu
 aci
 ón
 Mo
 rfo
 lóg
 ica
 Ma



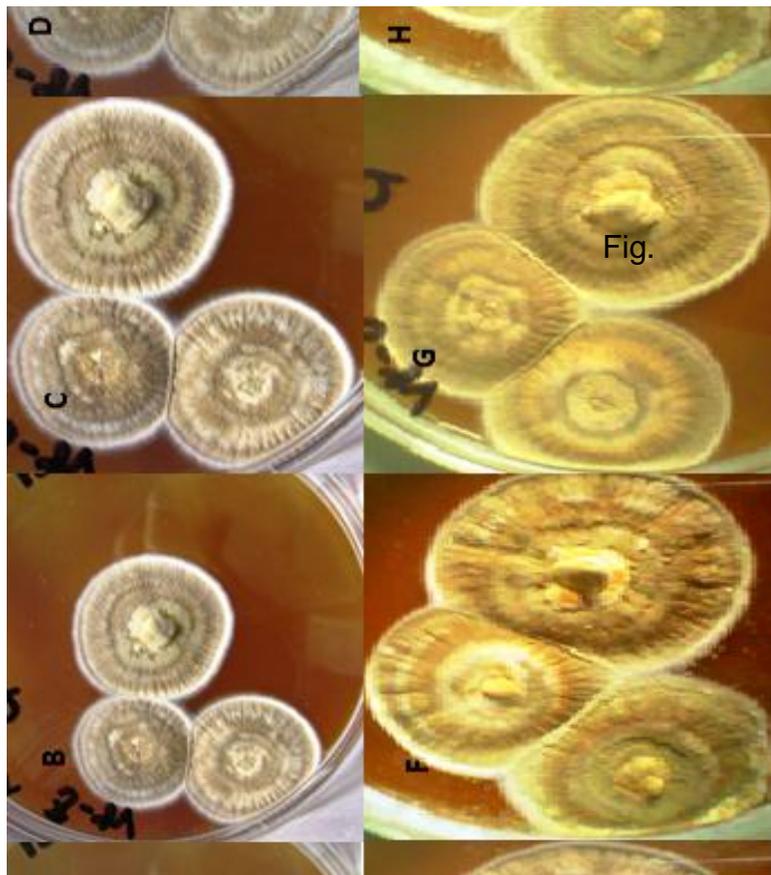
Evaluación morfológica Mx2-21

Cuadro N°12 Evaluación morfológica de *M. royeri* Mx2-21

Día	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
Determinación	Fig. 41 A	Fig. 41 B	Fig. 41 C	Fig. 41 D	Fig. 41 E	Fig. 41 F	Fig. 41 G	Fig. 41 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	1.9 cm	2.5 cm	2.7 cm	3.5 cm	3.9cm	4.7 cm	5.9 cm	7.1cm

Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales formación de 4 a 5 anillos.	Colonias puntiformes, radiales formación de 5 a 7 anillos						
Borde	Regular							
Textura	Pulverulenta							
Coloración	Blanco cremoso, verde, café, blanco cremoso.	Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja.						
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia							
Evaluación morfológica	Características Microscópicas							
	Día 3 Fig. 43 A	Día 5 Fig. 43 B	Día 7 Fig. 43 C	Día 9 Fig. 43 D	Día 12 Fig. 43 E	Día 15 Fig. 43 F	Día 18 Fig. 43 G	Día 21 Fig. 43 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
	Subglobosas							
	Elípticas							

5.5.
2.6
Evaluación
Morfológica
Macroscópica
Mx2-22



Evaluación morfológica Mx2-22

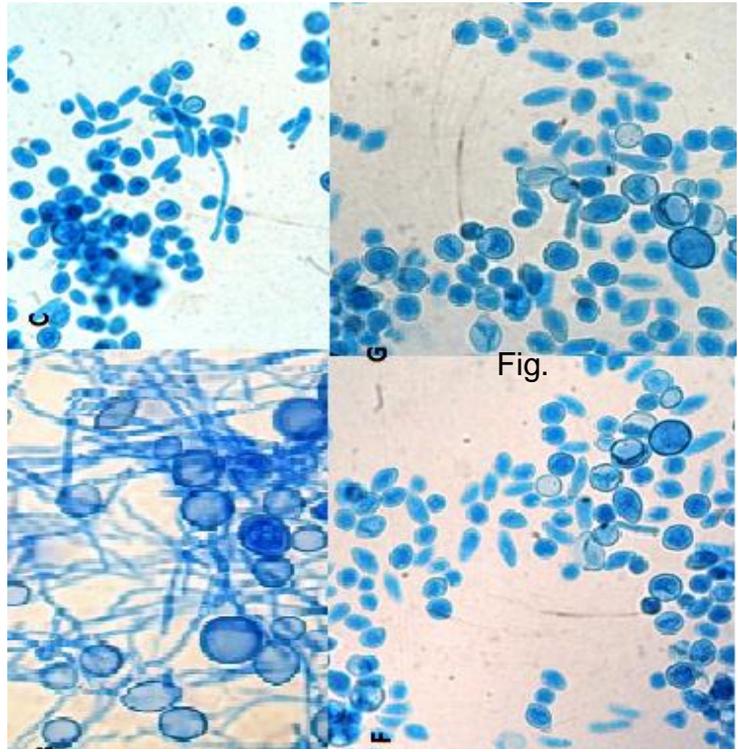
Cuadro N°13 Evaluación morfológica de *M. roreri* Mx2-22

Día Determinación	Día 3 Fig. 42 A	Día 5 Fig. 42 B	Día 7 Fig. 42 C	Día 9 Fig. 42 D	Día 12 Fig. 42 E	Día 15 Fig. 42 F	Día 18 Fig. 42 G	Día 21 Fig. 42 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	2.3 cm	2.9 cm	3.3 cm	3.7 cm	4.9 cm	5.5 cm	6.7 cm	7.3 cm

Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales formación de 2 a 4 anillos.	Colonias puntiformes, radiales formación de 5 a 7 anillos.						
Borde	Regular							
Textura	Pulverulenta							
Coloración	Blanco cremoso, beige claro, verde, café,				Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja			
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia				Presencia			
	Características Microscópicas							
Evaluación morfológica	Día 3 Fig. 43 A	Día 5 Fig. 43 B	Día 7 Fig. 43 C	Día 9 Fig. 43 D	Día 12 Fig. 43 E	Día 15 Fig. 43 F	Día 18 Fig. 43 G	Día 21 Fig. 43 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
	Subglobosas							
	Elípticas							

5.5.2.7

Evaluación Morfológica Microscópica



La caracterización morfológica (Microscópica y macroscópica) de *Moniliophthora roreri* evidenció como las colonias del hongo, con el transcurso del tiempo cambian tanto en coloración como en textura, tamaño etc.

En cuanto a la esporulación, esta aumenta conforme a los días, en el día 3 prácticamente solo pueden observarse hifas, y algunas esporas globosas en los siguientes días el número de esporas globosas aumentan y pueden observarse esporas subglobosas, a partir del día 7 se pueden observar las esporas

elípticas

s)

5.5.2.8 Realización de microcultivos

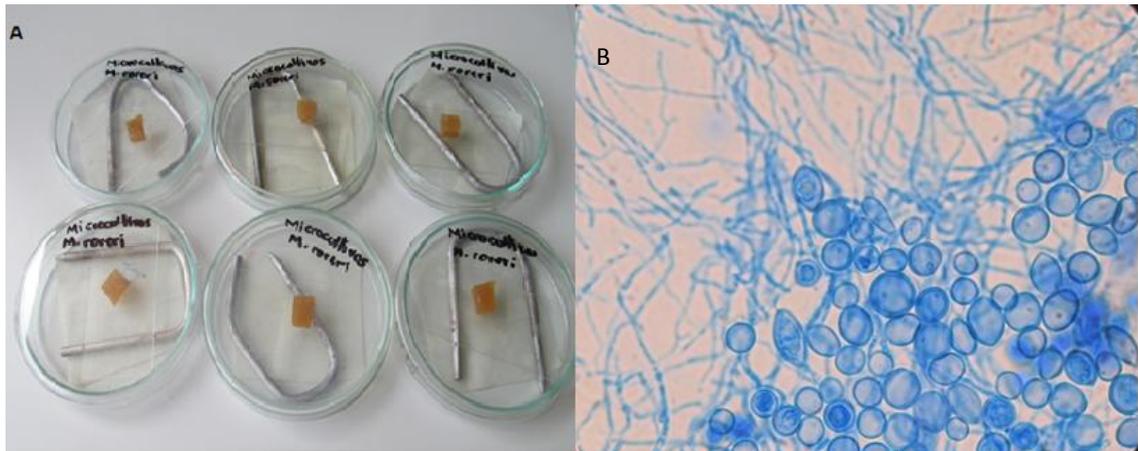


Fig. N°44. Caracterización con microcultivos de muestra de muestreo 2. (A) microcultivos, (B) morfología Microscópica de las colonias aisladas.

La Fig. N°44 es una muestra representativa para los aislamientos obtenidos en donde se puede observar mejor la disposición de las esporas.

5.5.2.9 Microscopia Electrónica de Barrido representativas de muestreo 2

5.5.2.9.1 Esporas Globosas

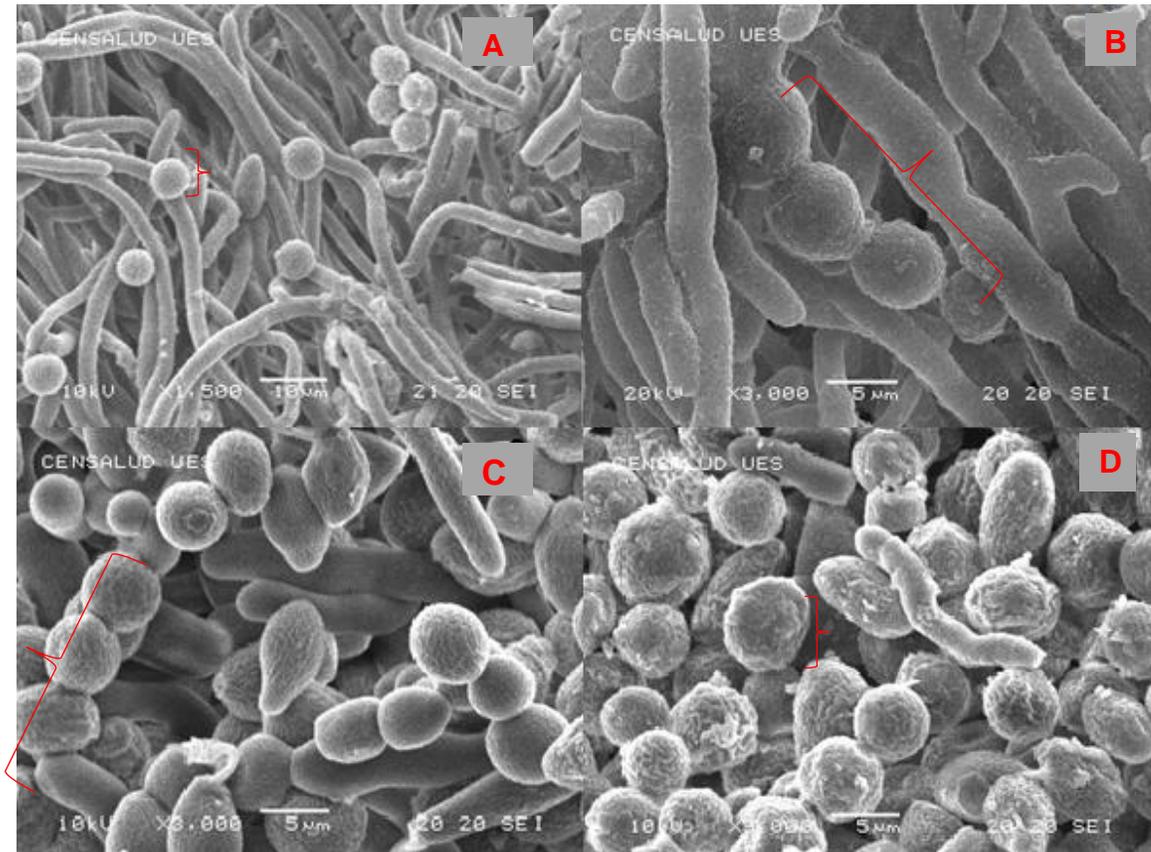


Fig. N°45 Esporas Globosas e hifas de *Moniliophthora roreri* vistas en microscopio electrónico de barrido de muestra 2. A (1,500X), B (3,000X), C (3,000X) y D (10,000X)

Las esporas globosas presentan un tamaño aproximado de 4-5 µm

5.5.2.9.2 Espora Subglobosas

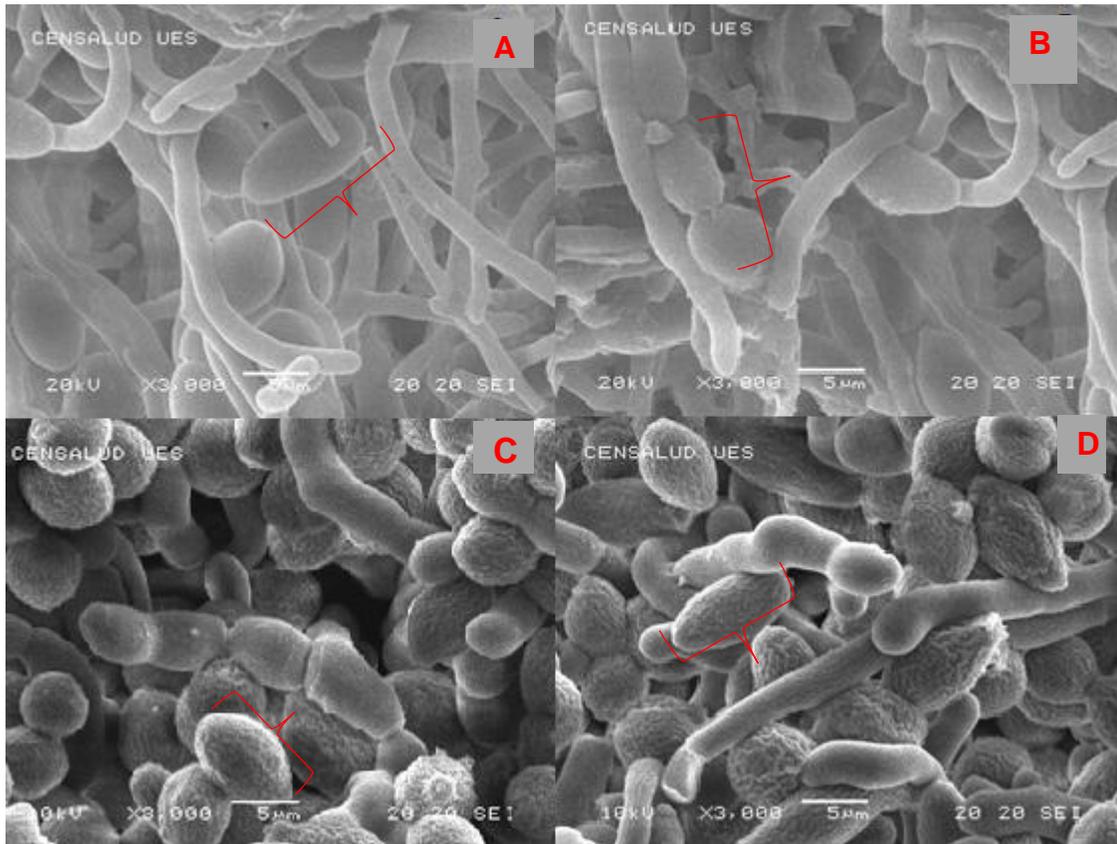


Fig. N°46 Esporas Subglobosas e hifas de *Moniliophthora roreri* vistas en microscopio electrónico de barrido de muestra 2. A (3,000X), B (3,000X), C (3,000X) y D (3,000X)

Las esporas subglobosas presentan un tamaño aproximado de 7-8 μm

5.5.2.9.3 Esporas Elípticas

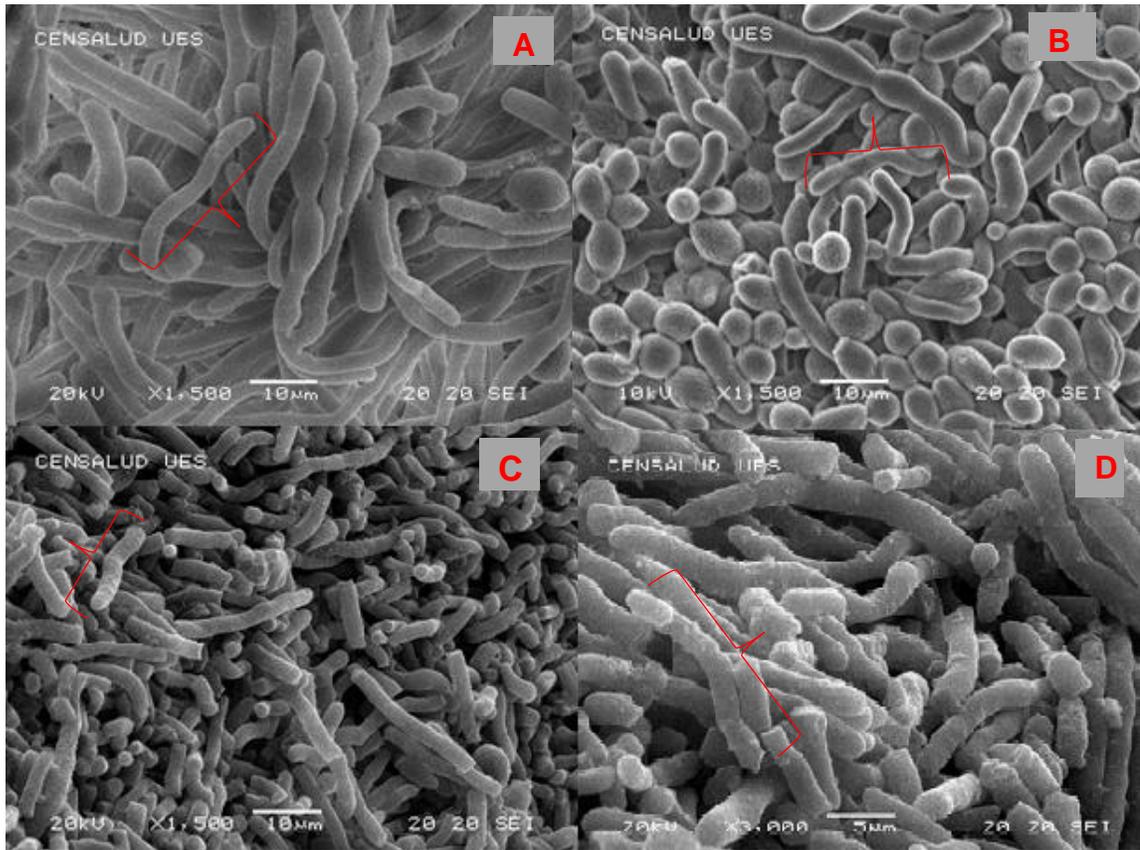


Fig. N°47 Esporas Elípticas e hifas de *Moniliophthora roreri* vistas en microscopio electrónico de barrido de muestra 1A (3,000X), B (3,000X), C (3,000X) y D (3,000X)

Las esporas Elípticas presentan un tamaño aproximado de 9-11 µm

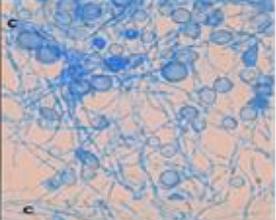
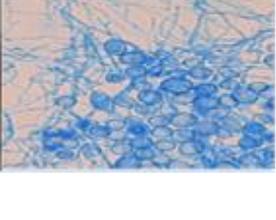
En el microscopio electrónico de barrido se aprecia la forma y disposición de las esporas, pudiendo observarse características ultraestructurales de

Moniliophthora roreri de forma magnificada; observándose así características de las esporas como lo son borde, tamaño y superficie de estas; que con el microscopio óptico no es posible visualizar, haciendo así diferenciación entre los diferentes tipos de esporas.

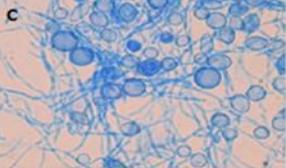
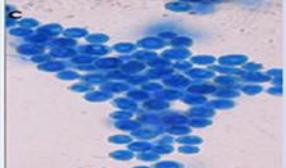
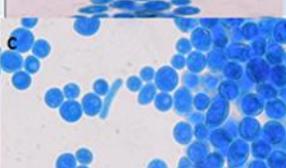
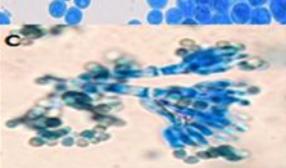
5.6 MUESTREO 3

Se colectaron 20 muestras en san José del Real la Carrera en Usulután con signos y síntomas de moniliasis, las cuales se identificaron, desinfectaron y procesaron (de acuerdo al procedimiento descrito en diseño metodológico) se inocularon en agar V8, Papa dextrosa, Dextrosa saboraud reforzados con 800 μ L de gentamicina 80mg/2 mL por litro de agar a 25°C por 15 días en la oscuridad.

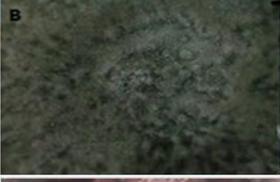
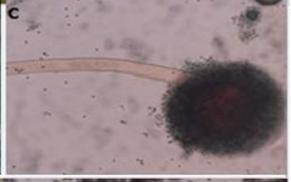
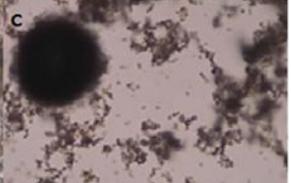
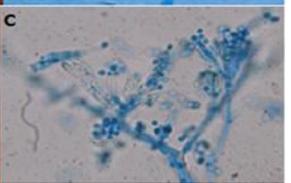
Cuadro N°14 Muestras de Muestreo 3

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
Mx3-1			
Mx3-2			
Mx3-3			

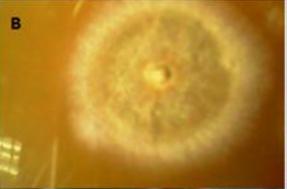
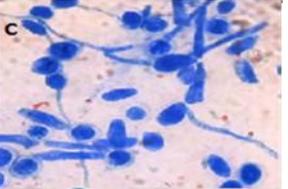
Cuadro N°4. Continuación.

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
Mx3-4			
Mx3-5			
Mx3-6			
Mx3-7			
Mx3-8			
Mx3-9			
Mx3-10			

Cuadro N°14 Continuación.

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
Mx3-11			
Mx3-12			
Mx3-13			
Mx3-14			
Mx3-15			
Mx3-16			
Mx3-17			

Cuadro N°14 Continuación.

Código de Muestra	Muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica
Mx3-18			
Mx3-19			
Mx3-20			

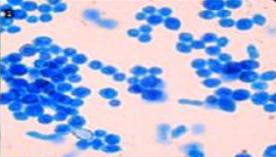
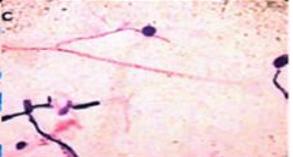
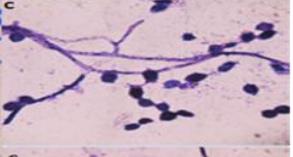
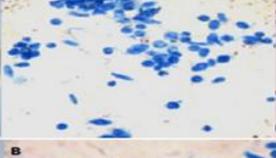
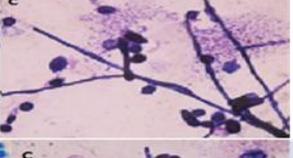
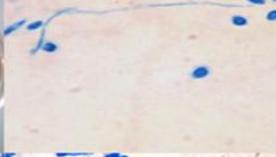
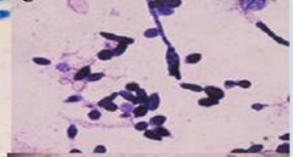
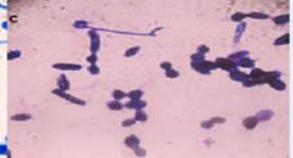
Se obtuvo crecimiento de *Moniliophthora roreri* en 7 diferentes muestras de las cuales al realizar tinciones tanto de Gram como de azul de lactofenol pudieron observarse las esporas e hifas características de este.

La dificultad del aislamiento de *Moniliophthora roreri*, se evidencia ya que de 20 muestras con signos y síntomas de moniliasis solamente de 7 se aisló este, tomando las medidas adecuadas de esterilidad para lograr el crecimiento específico de *M. roreri* ya que el crecimiento de otros microorganismos inhibe su crecimiento, las muestras más indicadas para el aislamiento de *Moniliophthora roreri*, son aquellas que presentan síntomas de marchitez, maduración prematura y abultamientos.

5.6.1 Aislamiento de *Moniliophthora roreri* a partir de muestras Mx3-1, Mx3-2, Mx3-3, Mx3-7, Mx3-8, Mx3-9 y Mx3-18

De las colonias de las cuales se aisló *Moniliophthora roreri*, se repico en agar V8 y se realizó tinción de Gram y azul de lactofenol.

Cuadro N°15 Aislamiento de *Moniliophthora roreri* a partir de muestras positivas

Código de la muestra	Apariencia Macroscópica	Apariencia Microscópica	
		Tinción de Azul de Lactofenol	Tinción de Gram
Mx3-1			
Mx3-2			
Mx3-3			
Mx3-7			
Mx3-8			
Mx3-9			
Mx3-18			

5.6.2 Caracterización de *Moniliophthora roreri*

5.6.2.1 Evaluación Morfológica Macroscópica Mx3-1

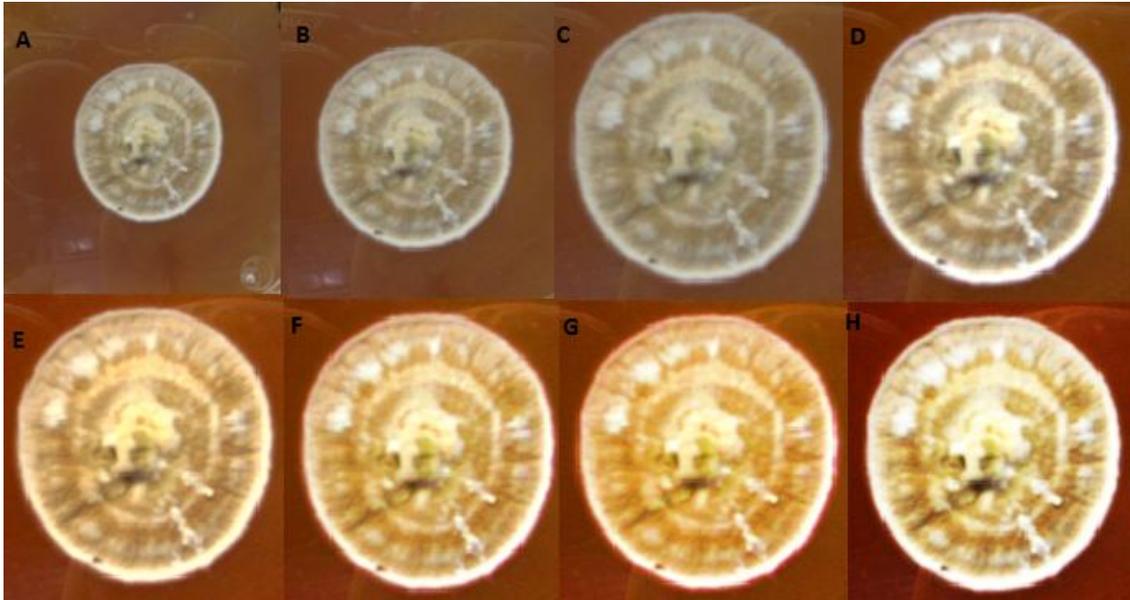


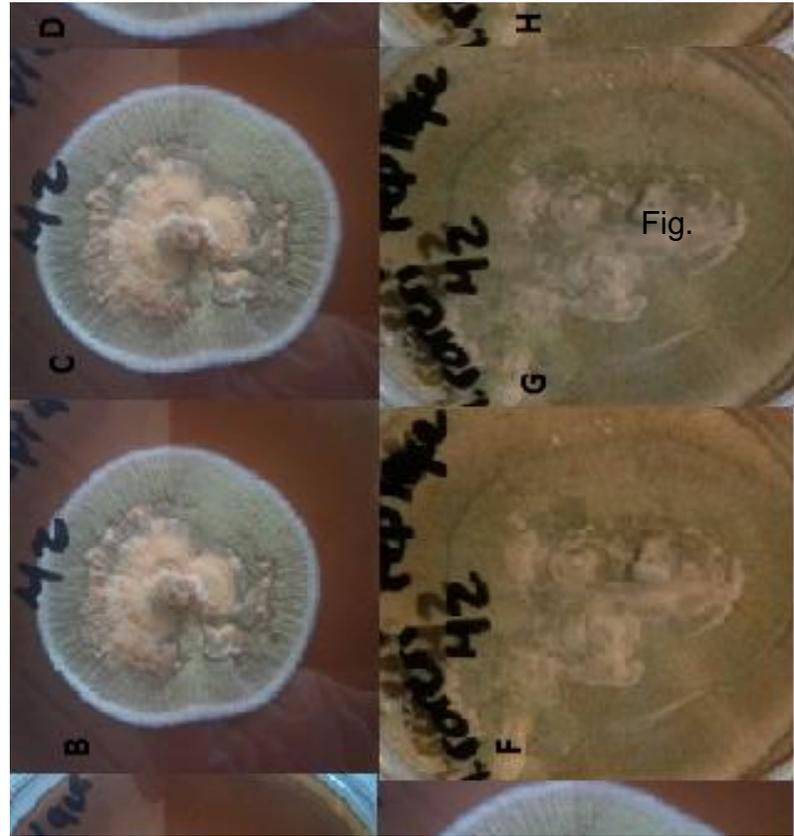
Fig. N°48 Secuencia de crecimiento macroscópico de *M. royeri* de Mx3-1.

Evaluación morfológica Mx3-1

Cuadro N°16 Evaluación morfológica de *M. roleri* Mx3-1

Día Determinación	Día 3 Fig. 48 A	Día 5 Fig. 48 B	Día 7 Fig. 48 C	Día 9 Fig. 48 D	Día 12 Fig. 48 E	Día 15 Fig. 48 F	Día 18 Fig. 48 G	Día 21 Fig. 48 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	1.8 cm	2.1 cm	2.4 cm	3.5 cm	3.9 cm	4.5 cm	5.3 cm	6.0 cm
Características de las colonias	centro puntiforme, radiales formación de 2 a 4 anillos,			colonias puntiformes, radiales formación de 5 a 7 anillos				
Borde	Regular							
Textura	Pulverulenta							
Coloración	Blanco cremoso, beige claro		Blanco cremoso, beige claro, verde, café,		Verde claro, café claro, café oscuro, verde, naranja			
Presencia/ ausencia de sectores	Presencia							
Evaluación morfológica	Características Microscópicas							
	Día 3 Fig. 55 A	Día 5 Fig. 55 B	Día 7 Fig. 55 C	Día 9 Fig. 55 D	Día 12 Fig. 55 E	Día 15 Fig. 55 F	Día 18 Fig. 55 G	Día 21 Fig. 55 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante. esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
	Subglobosas							
	Elípticas							

5.6.2.
2
Evaluación
Morfología
Macroscópica
Mx3-2



Evaluación morfológica Mx3-2

Cuadro N°17 Evaluación morfológica de *M. roleri* Mx3-2

Día Determinación	Día 3 Fig. 49 A	Día 5 Fig. 49 B	Día 7 Fig. 49 C	Día 9 Fig. 49 D	Día 12 Fig. 49 E	Día 15 Fig. 49 F	Día 18 Fig. 49 G	Día 21 Fig. 49 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	1.9 cm	2.3 cm	2.8 cm	3.3 cm	3.9 cm	5.5 cm	5.7 cm	6.1 cm
Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, formación de 4 a 6 anillos.			Colonias puntiformes, radiales formación de 6 a 7 anillos				

Borde	Regular							
Textura	Pulverulenta							
Coloración	Blanco cremoso, naranja, verde claro.				Beige, verde, café.			
Presencia/ ausencia de sectores	Presencia							
Evaluación morfológica	Características Microscópicas							
	Día 3 Fig. 55 A	Día 5 Fig. 55 B	Día 7 Fig. 55 C	Día 9 Fig. 55 D	Día 12 Fig. 55 E	Día 15 Fig. 55 F	Día 18 Fig. 55 G	Día 21 Fig. 55 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
	Subglobosas							
	Elípticas							

5.6.2.

3

Eval

uaci

ón

Morf

ológi

ca

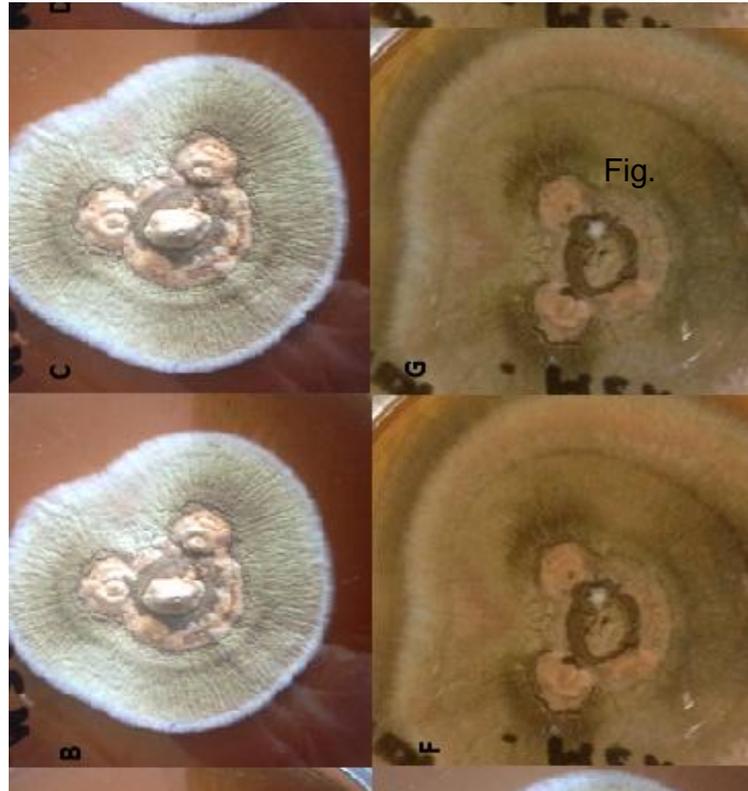
Macr

oscó

pica

Mx3-

3



Evaluación morfológica Mx3-3

Cuadro N°18 Evaluación morfológica de *M. royeri* Mx3-3

Día Determinación	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
	Fig. 50 A	Fig. 50 B	Fig. 50 C	Fig. 50 D	Fig. 50 E	Fig. 50 F	Fig. 50 G	Fig. 50 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	2.1 cm	2.3 cm	2.7 cm	3.5 cm	3.9 cm	4.5 cm	5.6 cm	6.7 cm
Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales formación de 6 a 7 anillos.			Colonias puntiformes, radiales formación de 8 a 9 anillos.				
Borde	Regular							

Textura	Pulverulenta							
Coloración	Blanco cremoso, beige claro, verde claro, naranja.							
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia							
Evaluación morfológica	Características Microscópicas							
	Día 3 Fig. 55 A	Día 5 Fig. 55 B	Día 7 Fig. 55 C	Día 9 Fig. 55 D	Día 12 Fig. 55 E	Día 15 Fig. 56 F	Día 18 Fig. 55 G	Día 21 Fig. 55 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras.			
Forma de esporas	Globosas							
		Subglobosas						
			Elípticas					

**5.6.
2.4
Evaluación
Morfología
Macroscópica
Mx3**



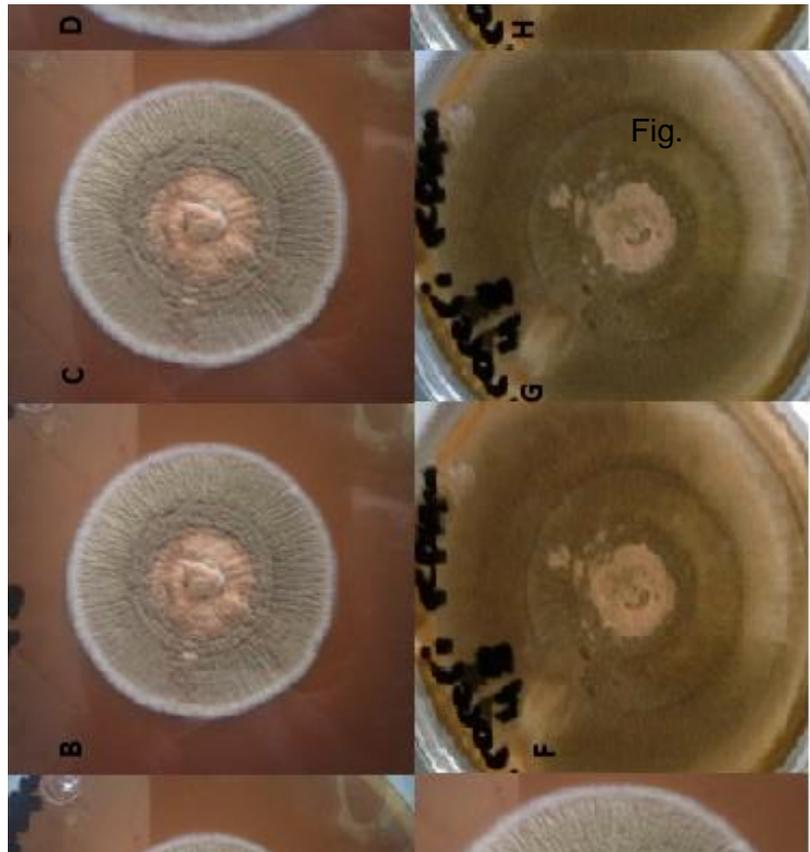
Evaluación morfológica Mx3-7

C N°19 Evaluación morfológica de *M. royeri* Mx3-7

Día Determinación	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
Evaluación Morfológica	Fig. 51 A	Fig. 51 B	Fig. 51 C	Fig. 51 D	Fig. 51 E	Fig. 51 F	Fig. 51 G	Fig. 51 H
Características Macroscópicas								
Tasa de crecimiento	1.9 cm	3.4 cm	4.5 cm	4.9 cm	5.2 cm	5.5 cm	5.7 cm	5.9 cm
Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales formación de 6 a 7 anillos,			Colonias de 9 a 18 días colonias puntiformes, radiales formación de 7 a 8 anillos.				

Borde	Regular							
Textura	Pulverulenta							
Coloración	Blanco cremoso, beige claro, verde, café, naranja.							
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia				Presencia			
Evaluación morfológica	Características Microscópicas							
	Día 3 Fig. 55 A	Día 5 Fig. 55 B	Día 7 Fig. 55 C	Día 9 Fig. 55 D	Día 12 Fig. 55 E	Día 15 Fig. 55 F	Día 18 Fig. 55 G	Día 21 Fig. 55 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
		Subglobosas						
		Elípticas						

5.6.
2.5
Evaluación
Morfología
Macroscópica
Mx3-8



Evaluación morfológica Mx3-8

Cuadro 20 Evaluación morfológica de *M. roleri* Mx3-8

Día Determinación	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
Evaluación Morfológica	Fig. 52 A	Fig. 52 B	Fig. 52 C	Fig. 52 D	Fig. 52 E	Fig. 52 F	Fig. 52 G	Fig. 52 H
Características Macroscópicas								
Tasa de crecimiento	1.6 cm	2.3 cm	2.9 cm	3.8 cm	4.5 cm	5.5 cm	5.7 cm	6.3 cm
Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales			Colonias puntiformes, radiales formación de 7 a 8 anillos				

	formación de 4 a 6 anillos,							
Borde	Regular							
Textura	Pulverulenta							
Coloración	Blanco cremoso, beige, verde musgo, café, naranja					Café claro, beige, café oscuro, café naranja.		
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia							
Evaluación morfológica	Características Microscópicas							
	Día 3 Fig. 55 A	Día 5 Fig. 55 B	Día 7 Fig. 55 C	Día 9 Fig. 55 D	Día 12 Fig. 55 E	Día 15 Fig. 55 F	Día 18 Fig. 55 G	Día 21 Fig. 55 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.				Abundante, esporas maduras			
Forma de esporas	Globosas							
		Subglobosas						
		Elípticas						

5.6.
2.6
Eval
uaci
ón
Morf
ológ
ica
Mac
rosc
ópica
Mx3



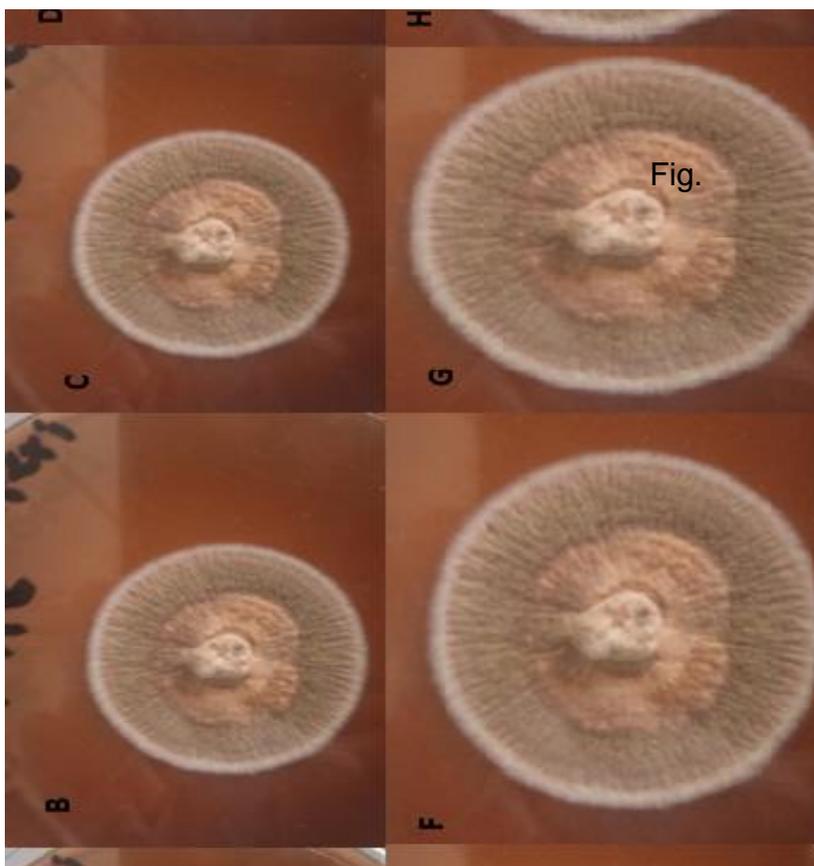
E -9 ción morfológica Mx3-9

C N°21 Evaluación morfológica de *M. roreri* Mx3-9

Día	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
Determinación	Fig. 53 A	Fig. 53 B	Fig. 53 C	Fig. 53 D	Fig. 53 E	Fig. 53 F	Fig. 53 G	Fig. 53 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	2.3 cm	2.9 cm	3.7 cm	4.5 cm	5.9 cm	6.5 cm	6.7 cm	6.9 cm
Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales			colonias puntiformes, radiales formación de 7 a 9 anillos				

	formación de 6 a 7 anillos,							
Borde	Regular			Irregular				
Textura	Pulverulenta							
Coloración	Blanco cremoso, café claro, verde claro, beige.			Beige claro, naranja, verde musgo, café, café claro.				
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia			Presencia				
Evaluación morfológica	Características Microscópicas							
	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
	Fig. 55 A	Fig. 55 B	Fig. 55 C	Fig. 55 D	Fig. 55 E	Fig. 55 F	Fig. 55 G	Fig. 55 H
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras.			Abundante. esporas maduras				
Forma de esporas	Globosas							
	Subglobosas							
	Elípticas							

5.6.
2.7
Evaluación
Morfología
Macroscópica



Evaluación morfológica Mx3-18

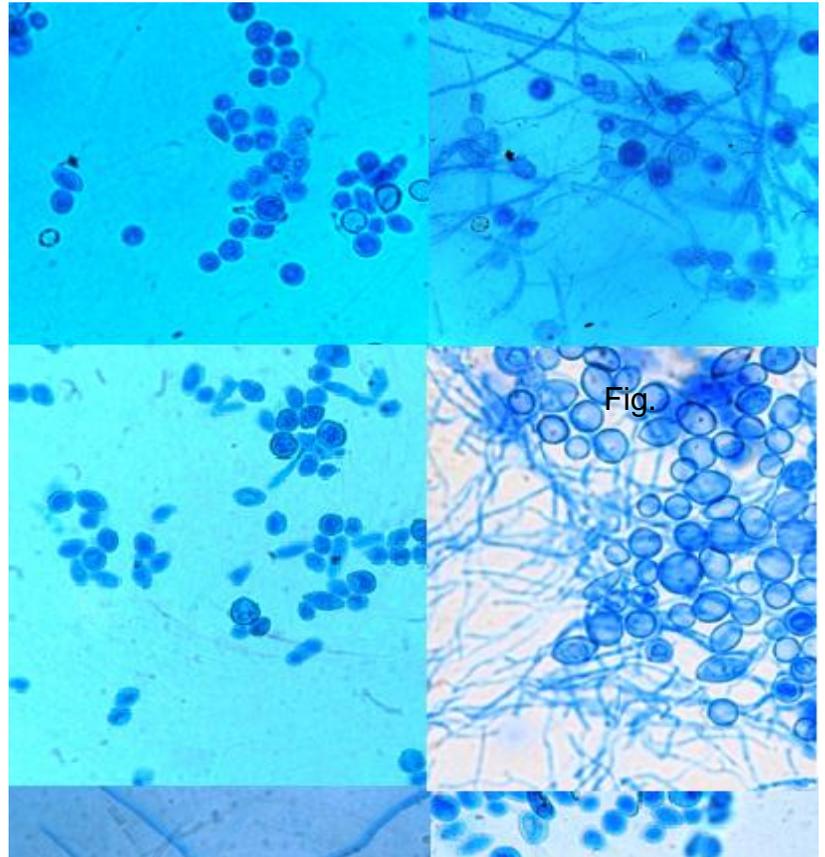
a

Cuadro N°22 Evaluación morfológica de *M. royeri* Mx3-18

-18 Día Determinación	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
	Fig. 54 A	Fig. 54 B	Fig. 54 C	Fig. 54 D	Fig. 54 E	Fig. 54 F	Fig. 54 G	Fig. 54 H
Evaluación Morfológica	Características Macroscópicas							
Tasa de crecimiento	1.9 cm	2.5 cm	2.7 cm	3.1 cm	3.9 cm	4.5 cm	5.8 cm	6.5 cm
Características de las colonias	Colonias con centro puntiforme, radiales formación de 5 a 6 anillos,			colonias con centro puntiformes, radiales formación de 7 a 8 anillos				

Borde	Regular								
Textura	Pulverulenta								
Coloración	Beige claro, café naranja, café claro.				Beige claro, café naranja, café oscuro, café claro, beige.				
Presencia/ ausencia de sectores	Ausencia								
Evaluación morfológica	Características Microscópicas								
	Día 3 Fig. 55 A	Día 5 Fig. 55 B	Día 7 Fig. 55 C	Día 9 Fig. 55 D	Día 12 Fig. 55 E	Día 15 Fig. 55 F	Día 18 Fig. 55 G	Día 21 Fig. 55 H	
Días de esporulación	Escasa, esporas inmaduras				Abundante, esporas maduras				
Forma de esporas	Globosas								
		Subglobosas							
		Elípticas							

5.6.2.9
Evaluación
morfológica
Microscópica de
Muestra
o 3
(Representativa
para las
7colonias



La caracterización morfológica (Microscópica y macroscópica) de *Moniliophthora roreri* evidencio como las colonias del hongo, con el transcurso del tiempo cambian tanto en coloración, textura, tamaño etc. En cuanto a la esporulación, esta aumenta conforme a los días, en el día 1 prácticamente solo pueden observarse hifas, y algunas esporas globosas en los siguientes días las esporas globosas aumentan y pueden observarse las subglobosas, a partir del día 9 se pueden observar las esporas elípticas.

5.6.2.10 Realización de micro cultivos

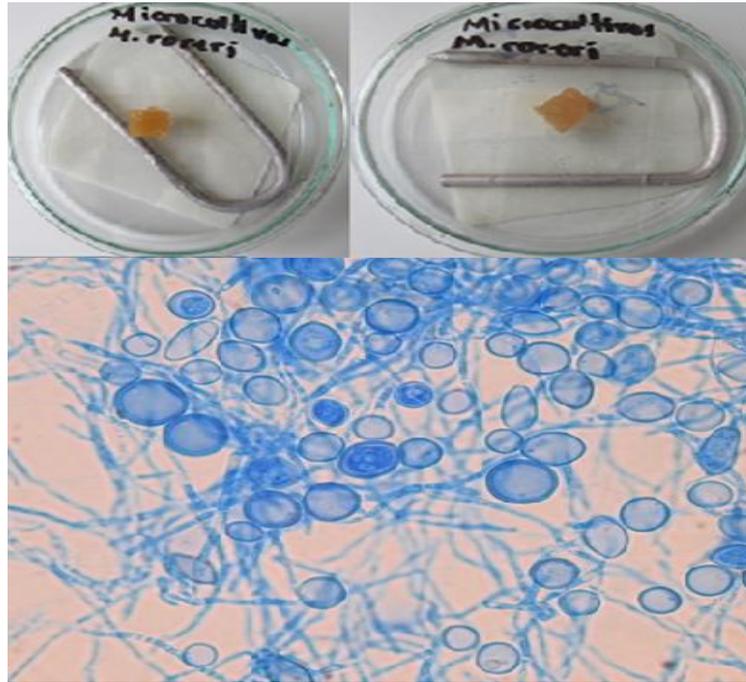


Fig. N°56 Caracterización con microcultivos de muestra de muestreo 3. Características macroscópicas y microscópicas de *M. roreri*.

El propósito de realizar los microcultivos es; que debido al espacio reducido que tiene la colonia de *Moniliophthora roreri*, crece de manera uniforme y compactada; pudiéndose visualizar de mejor forma en el microscopio óptico, las estructuras microscópicas (esporas e hifas) del hongo.

5.6.2.11 Microscopia Electrónica de Barrido

5.6.2.11.1 Esporas Globosas

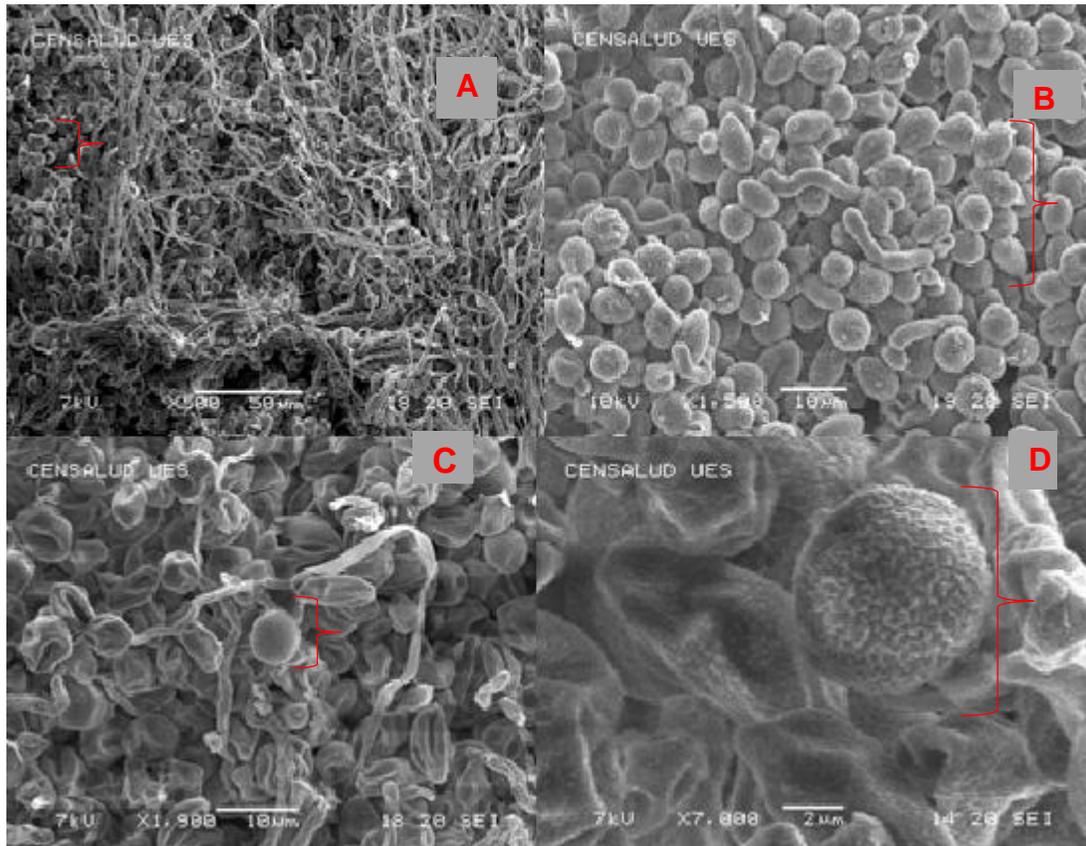


Fig. N° 57 Esporas Globosas e hifas de *Moniliophthora roreri* vistas en microscopio electrónico de barrido de muestra 3. A (500X), B (1,500X), C (1,900X) Y D (7,000X)

Las esporas globosas presentan un tamaño aproximado de 4-5 μm

5.6.2.11.2 Esporas subglobosas

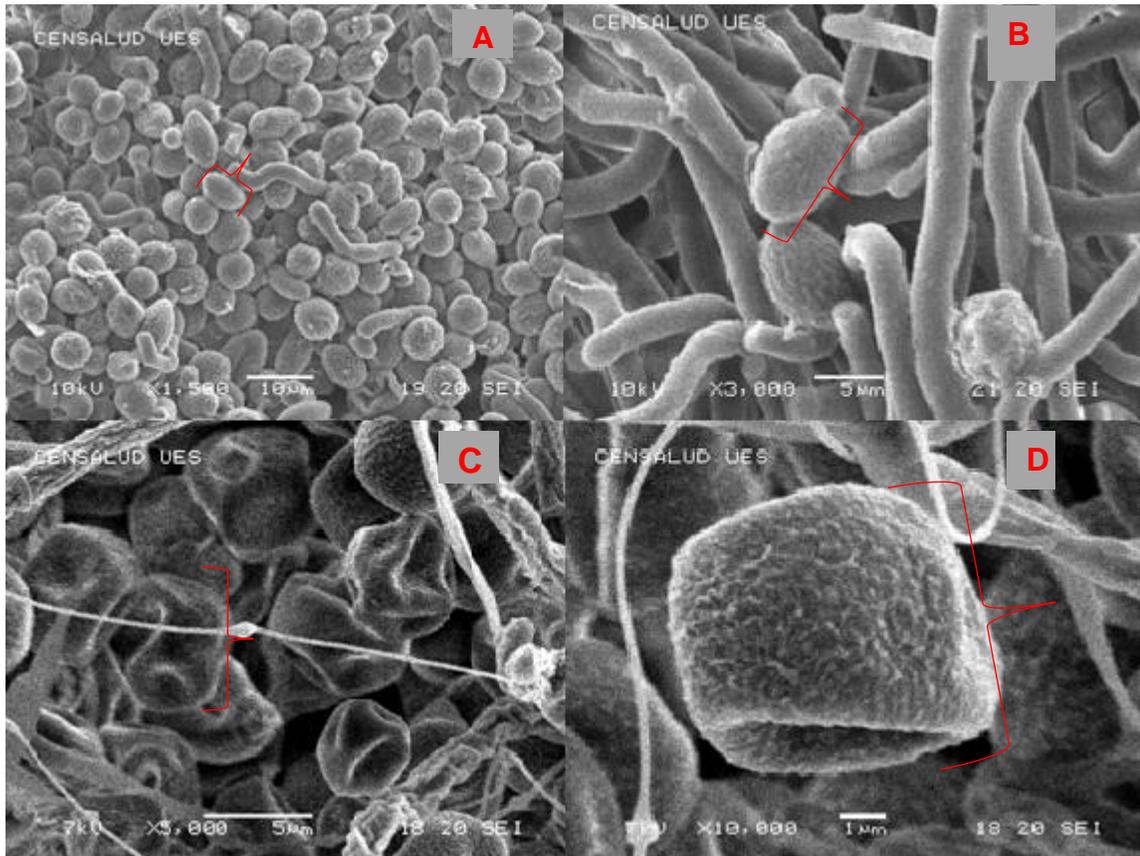


Fig. N° 58 Esporas Subglobosas e hifas de *Moniliophthora roreri* vistas en microscopio electrónico de barrido de muestro 3.A (1,500X), B (3,000X), C (5,000X) y D (10,000X)

Las esporas subglobosas presentan un tamaño aproximado de 7-8 μm

5.6.2.11.3 Esporas elípticas

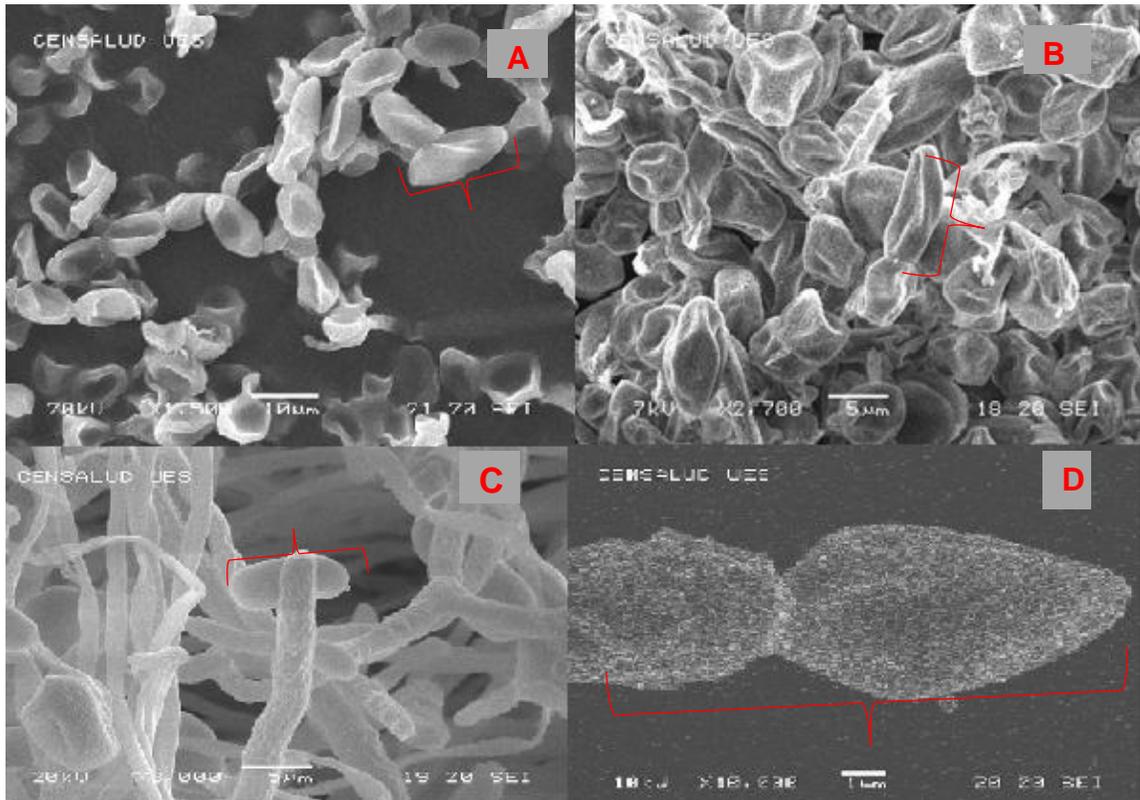


Fig. N° 59 Esporas Elípticas e hifas de *Moniliophthora roreri* vistas en microscopio electrónico de barrido de muestra 3. A (1,500X), B (2,700X), C (3,000X) y D (10,000X)

Las esporas elípticas presentan un tamaño aproximado de 9-11 µm

En el microscopio electrónico de barrido se aprecia la forma y disposición de las esporas, pudiendo observarse características ultraestructurales de

Moniliophthora roreri de forma magnificada; observándose así características de las esporas como lo son borde, tamaño y superficie de estas; que con el microscopio óptico no es posible visualizar, haciendo así diferenciación entre los diferentes tipos de esporas.

5.7 Protocolo de aislamiento y caracterización de *M. roreri*

Se realizó un protocolo denominado “Protocolo de Aislamiento y Caracterización de ***Moniliophthora roreri***. (Anexo N°1) en donde se incluyen los pasos estandarizados a seguir para el aislamiento y caracterización de ***M. roreri*** de esta forma facilitar su estudio.

5.8 Almacenamiento de cepas de *Moniliophthora roreri*

Se almacenaron cepas partiendo de los aislamientos de ***Moniliophthora roreri***, obtenidos durante el procesamiento de las muestras, las cuales se almacenaron en congelación para ser utilizados en estudios posteriores.

Para el almacenamiento de cepas de ***Moniliophthora roreri*** se realizó una suspensión de esporas en caldo V8 (5% glicerol) y caldo BHI (5% glicerol) de la cual se trasladó un mL a tubos estériles los cuales se almacenaron a temperaturas de -2°C.

Se realizó un total de 14 aislamientos y se dejaron 10 crioviales con suspensión de esporas de ***M. roreri*** correspondiente a los 10 aislamientos, los aislamientos restantes se perdieron debido a la contaminación de hongos ambientales.



Fig. N°60 Conservación de cepas de *Moniliophthora roreri* en caldo V8 y caldo BHI

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 Conclusiones

1. En las muestras de cacao que presentan síntomas característicos y propios de la enfermedad como lo son marchitez, maduración prematura y desarrollo de gibas hay mayor posibilidad de aislar ***M. roreri*** debido a que existen otras enfermedades del cacao que pueden fácilmente confundirse con síntomas de monilia causando un aislamiento erróneo.
2. El uso de solución de Gentamicina sulfato permitió inhibir la flora acompañante del fruto de cacao y realizar el aislamiento de monilia, debido que esta inhibe los hongos que pueden antagonizar el crecimiento de ***Moniliophthora roreri***, el aumento en la concentraciones de solución de Gentamicina sulfato no inhibe el crecimiento de monilia y si la de otros hongos acompañantes.
3. Las colonias de ***Moniliophthora roreri*** aisladas presentan características macroscópicas uniformes en todas la cepas y es conforme con las características esperadas de ***M. roreri***
4. Las colonias de ***Moniliophthora roreri*** aisladas presentan características microscópicas uniformes en todas la cepas y es conforme con las características esperadas de ***M. roreri***
5. La elaboración del protocolo el cual incluye los pasos para el aislamiento y la caracterización de ***M. roreri*** permitirá realizar una identificación con mayor rapidez, disminuyendo gasto en medios de cultivos tratando de aislarlo y caracterizarlo, así se pueden tomar medidas preventivas para evitar la proliferación del hongo.

6. El uso de microcultivos sirven para observar la disposición de las hifas y esporas de ***Moniliophthora roreri***
7. El uso de Solución de Gentamicina Sulfato permitió la inhibición de hongos acompañantes del fruto de cacao que interfieren en el aislamiento de ***M. roreri***.
8. En frutos de cacao menores de tres meses y con gibas como síntomas de moniliasis el aislamiento es más factible debido a que el fruto de cacao no ha sido infectado por hongos que antagonizan el crecimiento de ***M. roreri***
9. La microscopía electrónica de barrido permite ver la ultraestructura de las esporas e hifas características de ***Moniliophthora roreri***.
10. La edad de los frutos es un factor determinante en el aislamiento y caracterización de *M. roreri*
11. La conservación de ***Moniliophthora roreri*** en crioviales permitirá la preservación de la cepa para utilizarla en estudios posteriores.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 Recomendaciones

1. El tratamiento de las muestras debe realizarse en condiciones asépticas controladas para evitar la contaminación de las muestras, y el crecimiento de hongos ambientales interferentes.
2. Utilizar solución de Gentamicina Sulfato en concentraciones de 3.2mg/mL a 5.6 mg/mL dependiendo del estado inicial o avanzado de los síntomas de la enfermedad de la muestra a analizar.
3. Realizar microcultivos de una colonia purificada de *M. roreri* para obtener un crecimiento específico y representativo del hongo.
4. Utilizar la microscopia electrónica de barrido para la caracterización de nuevas cepas de hongo.
5. Utilizar en futuras investigaciones técnicas de identificación molecular para realizar una caracterización profunda y determinar si es una la cepa o cepas de *M. roreri* aislado en esta investigación.
6. Identificar los focos de infección de Moniliasis y realizar destrucción del cacao que se encuentren infectados con la enfermedad para evitar la proliferación a cultivos o parcelas de otras especies vegetales.
7. Hacer uso de Protocolo de aislamiento y caracterización para futuras investigaciones.
8. Incentivar al personal del cultivar San José del Real de La carrera para reforzar acciones de mantenimiento del cacaotal y así evitar la

propagación de enfermedades del cacao con el fin de disminuir pérdidas económicas.

9. Resembrar cepas aisladas para mantener la viabilidad y así utilizarla en futuras investigaciones.

CAPITULO VIII
BIBLIOGRAFIA

8.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade A. Ramírez I. Propuesta para el manejo de cacao orgánico. Primera edición. Lima. Noviembre de 2009, Disponible en: http://www.conservation.org/global/peru/publicaciones/Documents/Propuesta_de_manejo_de_cafe_organico.pdf. [Consultado el 28.1.2013]
2. Aranzazu J. Suárez F. Manejo de las Enfermedades del Cacao (Theobroma Cacao L) en Colombia, con Énfasis en Monilia (Moniliophthora roreri). Colombia. Producmédicos. 2010. 90 P disponible en: <http://www.fedecacao.com.co/cw/ca/doctecnicos/fedecacao-dt-manejo-enfermedades-enfasis-cacao-monilia.pdf>. [Consultado el 13.1.2013]
3. Asociación Nacional del Café, programa de diversificación de ingresos en la empresa cafetalera. EL Salvador. Julio de 2004, disponible en: www.o.unctad.org/infocomm/espagnol/cacao/precio.htm. [Consultado el 3.2.2013]
4. Astorga C. Proyecto Cacao Centro América, Enfermedades del Cacao y su Control (Monilia, Mazorca Negra, Mal de Machete, Roselinia y Otros). Disponible en: <http://intranet.catie.ac.cr/pcc/Manuales/Enfermedades%20de%20cacao%20y%20su%20controlPara%20promotores%20y%20familias.Carlos%20Astorga-17-10-08.pdf> [Consultado el 28.2.2013]
5. Bonilla Henríquez. Castañeda V. Gómez J. Pérez G. . “Manual de Aplicación de Descriptores Agromorfológicos para la Identificación y registro de cultivadores salvadoreños de Theobroma cacao” El Salvador 2011.

6. Borja. E. Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Monilia* spp. Aislada en duraznos de diferentes localidades de la sierra en Ecuador [Tesis Doctoral]. Quito, Mayo. Universidad de San Francisco de Quito; 2011.
7. Brenes J. Godoy R. Prado M. Conozca y combata la *Monilia* del Cacao. Nicaragua Componente Agroforestal, Disponible en: <http://201.234.78.28:8080/jspui/bitstream/123456789/1857/1/CartillaMoniliasis.pdf>. [Consultado el 16.2.2013]
8. Burchet J. Tendencias Mundiales Cacao Fino Foro II: El Cacao Fino o de Aroma en la Estrategia Cacaotera de Nicaragua. Managua. 9 de junio de 2009.
9. Díaz A. Fortalecimiento de la Cadena Productiva de Cacao (*Theobroma Cacao* L.) con Énfasis en la Determinación de la Presencia de la Enfermedad Moniliasis (*Moniliophthora roreri* Evans et. al.) en Santa María Cahabón, Alta Verapaz. Guatemala, agosto de 2009.
10. Fedecacao, reconocimiento y control de la *Monilia* en el cacao, disponible en: <http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/46367/Opcionesbiologicasparacontrol.pdf>. [Consultado el 16.2.2013]
11. Federación Nacional de Cacaoteros Fondo Nacional del Cacao, Campaña Contra La Moniliasis del cacao Año 2011, Bogotá, Enero De 2011.

12. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, Proyecto Promoción de Sistemas Agroforestales de Alto Valor con Cacao en Honduras La Moniliasis del Cacao: El Enemigo a Vencer, La Lima, Cortés, Honduras, C.A. Octubre de 2012.
13. González J."Identificación de Hongos Fitopatógenos que Afectan El Cultivo de Cacao (Theobroma Cacao L.) en la Finca Bulbuxya, San Miguel Panan Suchitepéquez" [Tesis Doctoral]. Guatemala, Octubre. Universidad De San Carlos De Guatemala; 2007
14. Jiménez, M. Villavicencio, "Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de Moniliophthora roreri aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana" Guayaquil, Ecuador.
15. Mendoza A. Navarro M. Guía Técnica para Promotores, Cultivo del Cacao en Sistemas Agroforestal, Municipio El Castillo, Río San Juan, Nicaragua. Septiembre del 2006, "Programa para el Desarrollo Rural Sostenible en el Municipio El Castillo, Río San Juan, Nicaragua. ProDeSoc" disponible en: <http://www.rediaf.net.do/publicaciones/guias/download/cacao.pdf>.
16. Morazán A. Evaluación de las características Microultraestructurales para el control de calidad de la Fermentación de ocho Genotipos Diferentes de Semillas Fermentadas De Theobroma cacao L., San Salvador, El Salvador, Centro América, Julio, 2012.
17. Muñoz M. "Efecto de los factores macro y micro climáticas y las características productivas del cacao sobre la epidemiología de la moniliasis", Turrialba, Costa Rica, 2011.

18. Quevedo D. "Evaluación de fungicidas sistémicos y de contacto en el control de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*)", Cardenas, Tabasco, Mexico 2012.
19. Sánchez F. Garcés F. "Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao" *Scientia Agropecuaria* 3(2012) 249 – 258. 02 febrero 2012; [Acceso 9 abril 2013] Disponible en: www.sci-agropecu.unitru.edu.pe.
20. Torres A. En busca del cacao perdido. *El Diario de hoy*. Sábado 1 de Octubre de 2011. País.
21. Villavicencio M. "Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana", GUAYAQUIL – ECUADOR Año: 2010
22. http://personales.ya.com/geopal/biologia_2b/unidades/ejercicios/act5bactema7.htm
23. http://www.pomif.com/pages/practicas/eucariotas/micologia/hongos/img/img_5474-copy1/
24. <http://www.thefreedictionary.com/>

GLOSARIO ⁽²⁶⁾

Aislar: Quím. Separar un elemento o un cuerpo de una combinación o del medio en que se halla, generalmente para identificarlo o analizarlo.

Algodonoso: Adj. que tiene el aspecto del algodón o características propias de él.

Aluviales: Son suelos de origen fluvial, poco evolucionados aunque profundos.

Andisoles: Son los suelos que se caracterizan porque han derivado de materiales volcánicos vítreos y de texturas gruesas.

Antagonista: Adj. Que pugna contra la acción de algo o se opone a ella.

Brote: Es una clasificación usada en la epidemiología para referirse a la aparición repentina de una enfermedad debida a una infección en un lugar específico.

Cacaotal: M. Plantación de cacao

Clase: Es una categoría taxonómica situada entre el filo o división y el orden.

Colectar: Tr. Recaudar

Cultivo: M. Acción y resultado de cultivar.

Caracterizar: Determinar los rasgos distintivos de manera que se distinga claramente de las demás.

Dominio: Es la categoría taxonómica más alta que se da en los sistemas de clasificación biológica.

Doliporo: Tipo de septo en el micelio de los basidiomicetos, con forma de barril y con dos estructuras de retículo endoplásmico denominadas parentosomas.

Endocarpio: Es la capa más interior del pericarpio, es decir, la parte del fruto que rodea a las semillas.

Epidermis: Es la capa más superficial de la piel que recubre la dermis.

Especie: Es la unidad básica de la clasificación biológica. Para su denominación se utiliza la nomenclatura binomial, es decir, cada especie queda inequívocamente definida con dos palabras.

Espora: Designa una célula reproductora generalmente haploide

Exocarpio: Es la parte del pericarpio que suele proteger al resto del fruto del exterior.

Familia: Es una unidad sistemática y una categoría taxonómica situada entre el orden y el género

Fitopatógeno: Organismo, en general microorganismo, que causa enfermedades en las plantas por medio de disturbios en el metabolismo celular causado por la secreción de enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias y, además, por la absorción de nutrientes de la célula para su propio crecimiento.

Floración: Es el periodo de florecencia de las plantas con flores; estrictamente, es el tiempo de expansión de una flor hasta que está completamente desarrollada y en estado funcional, durante el cual ocurre el proceso de polinización.

Fructificación: Intr. Dar fruto los árboles y otras plantas.

Género: Es una categoría taxonómica que se ubica entre la familia y la especie; así, un género es un grupo de organismos que a su vez puede dividirse en varias especies.

Germinación: Es el proceso mediante el cual una semilla se desarrolla estimuladamente hasta convertirse en una planta.

Giba: f. joroba.

Hifa: son elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos que conforman su estructura vegetativa.

Infeción: Es un término clínico que indica la contaminación, con respuesta inmunológica y daño estructural de un hospedero, causada por un microorganismo patógeno.

Inóculo: Suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación.

Intracelular: adj. Que está situado u ocurre dentro de una célula o células.

Latitud: Distancia angular que hay desde un punto de la superficie de la Tierra hasta el paralelo del ecuador; se mide en grados, minutos y segundos sobre los meridianos.

Longitud: Dimensión máxima de un cuerpo o figura plana.

Meioespora: Son esporas dan lugar a una forma haploide (gametofito) en la que se forman gametos haploides.

Micelio: Es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

Microscopía: Es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos de estudio que por su pequeñez están fuera del rango de resolución del ojo normal.

Microscopio: Es un instrumento que permite observar objetos que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista

Moniliasis: Enfermedad del cacao conocida con los nombres de Monilia, Pudrición acuosa, Helada, Mancha Ceniza o Enfermedad de Quevedo, es causada por el hongo Monilia (*Moniliophthora*) roreri E. (C. y P.).

Muestreo: Técnica para la selección de una muestra a partir de una población.

Necrosis: Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido, provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar.

Ortotrópico: De crecimiento vertical.

Parenquima: Es un término histológico que tiene diferente significado según los tejidos estudiados sean animales o vegetales:

Pecíolo: Forma diminutiva de pes pedis, pie, tronco de una planta, es el rabillo que une la lámina de una hoja a su base foliar o al tallo.

Plagiotrópico: De crecimiento lateral.

Poda: Es el proceso de recortar un árbol o arbusto.

Proliferación: f. Multiplicación abundante de alguna cosa.

Pudrición: f. Putrefacción.

Pulpa: Es un tejido celular vegetal cuyo objeto es mejorar la dispersión de las semillas.

Pulverulento: adj. En estado de polvo. Sustancia pulverulenta.

Pulvínulo: Son engrosamiento o ensanchamiento en forma de cojinete de la base de la hoja o del pecíolo de las hojas o folíolos de ciertas especies y que, por variaciones en la turgencia de sus tejidos, puede provocar cambios de posición o movimientos de las hojas.

Poro: En botánica, puede referirse a los estomas de las plantas

Reino: Es cada una de las grandes subdivisiones en que se consideran distribuidos los seres vivos.

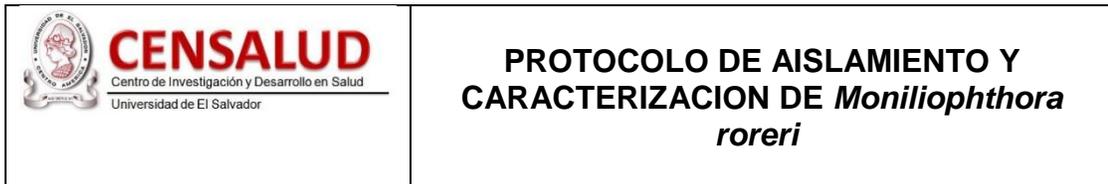
Septo: Es una pared que divide de un modo completo o incompleto una cavidad o estructura en otras más pequeñas.

Susceptible: adj. Capaz de recibir el efecto o acción que se indica.

Tinción: Es una técnica auxiliar utilizada en microscopía para mejorar el contraste en la imagen vista al microscopio. Los colorantes y tinturas son sustancias que usualmente se utilizan en biología y medicina para resaltar estructuras en tejidos biológicos que van a ser observados con la ayuda de diferentes tipos de microscopios. Los diferentes colorantes pueden ser utilizados para aumentar la definición y examinar.

Ultraestructura: Estructura de los organismos que solamente puede ser observada con un microscopio. Son caracteres ultraestructurales por ejemplo, los caracteres relacionados con las organelas del interior de la célula o las diferencias entre flagelos.

ANEXO N° 1
PROTOCOLO DE AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE *Moniliophthora*
roreri



1. Aislamiento del hongo *Moniliophthora roreri* en frutos de cacao sospechosos de enfermedad.

1.1 Colección de las muestras

Procedimiento:

- Colectar las muestras en bolsas plásticas estériles.
- Identificarlas con fecha, lugar, número de muestras, número de lote, persona que colecto la muestra.
- Tomar fotografías de las muestras.
- Si las muestras no se utilizan en el momento, conservarlas en refrigeración a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2 Desinfección de muestra

Materiales y Equipo

Mechero bunsen

Pinzas estériles

Cuchillo estéril

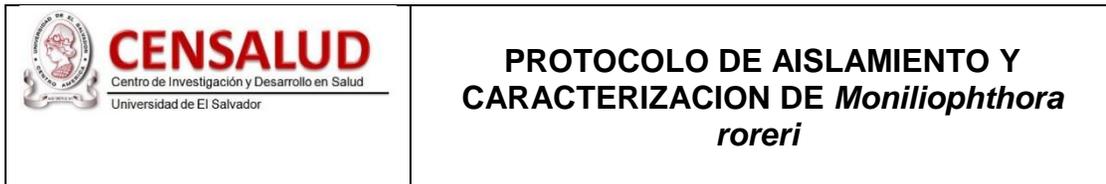
Reactivos

Hipoclorito de sodio

Agua estéril

Procedimiento

- En condiciones estériles
-



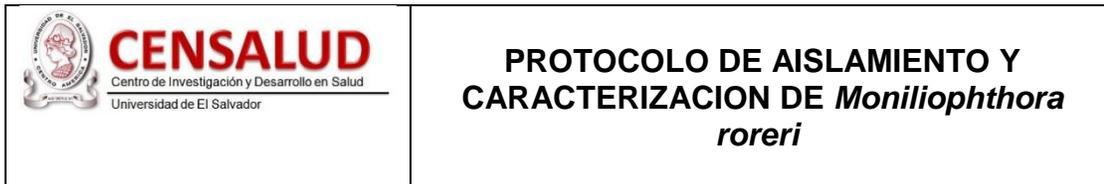
- colocar los frutos de cacao en una solución de hipoclorito de sodio 2.5% durante 5 min.
- partir las muestras por la mitad con un cuchillo estéril, evitando el contacto del cuchillo con el interior del cacao.
- tomar con una pinza estéril tres porciones del fruto del cacao de 0.5 cm que se encuentre enferma.
- desinfectarla con hipoclorito de sodio 2.5% sumergiéndola durante 3 min.
- lavar las porciones sumergiéndolas en agua estéril durante 2 minutos para eliminar los restos del hipoclorito de sodio.

1.3 Siembra de la muestra

Materiales y Equipo	Reactivos
Pinza estéril	Agar sabouraud dextrosa
Mechero bunsen	Agar papa dextrosa
Asa microbiológicas	Agar V8
Incubadora	Gentamicina sulfato

Procedimiento:

-Tomar con un pinza el endocarpio ya desinfectado y colocarlo en placas de Agar Papa Dextrosa; la segunda porción en Agar Sabouraud por ser medios de



aislamiento de hongos; y la tercera porción en Agar V8 con el que se lograra su esporulación, cada uno reforzado con 800 µL de Gentamicina Sulfato (80mg/2mL).

- incubar a 27°C en la oscuridad durante 15 días.

Luego a los 15 días del crecimiento obtenido

-repicar en Agar V8 por duplicado para obtener colonias más puras.

-Incubar a 27°C durante 15 días en oscuridad.

1.4 Identificación mediante el microscopio óptico

Materiales y Equipo

Asa de siembra

Mechero de Bunsen

Cubeta de Tinción

Portaobjetos

Cubreobjetos

Microscopio óptico

Reactivos

Azul de lactofenol

Solución salina

Lugol

Alcohol -acetona

Cristal violeta

Agua

Realizar dos tipos de tinciones:

- **Tinción de Gram** ya que los hongos se tiñen Gram positivos color azul-violeta, observar al microscopio e identificarlas hifas del hongo, la forma de las esporas que pueden ser globosas, subglobosas y elípticas, donde

	<p>PROCOLO DE AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE <i>Moniliophthora roreri</i></p>
---	--

- también se observara las formas de las esporas es la de mayor aparición.

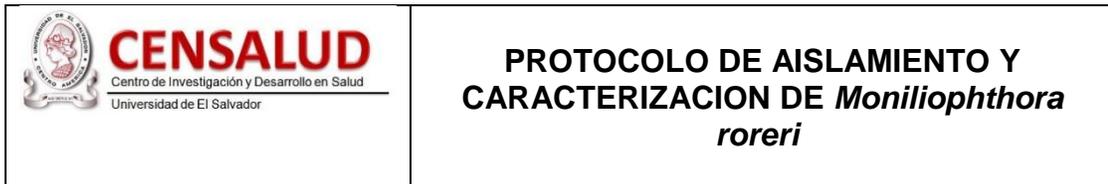
Procedimiento

- Colocar una gota de solución salina
- Tomar con un asa estéril una fracción de la colonia de microorganismo y extender
- Fijar con calor flameando
- Dejar secar
- Agregar cristal violeta al frotis y esperar por un minuto
- Agregar lugol y esperar por un minuto
- Lavar con alcohol cetona
- Agregar safranina, esperar un minuto
- Lavar con agua

Tinción con Azul de Lactofenol para observar al microscopio esporas e hifas color azul, del hongo *Moniliophthora spp.* De las muestras de cacao que se aislaran en los diferentes medios.

Procedimiento

- Colocar una gota de solución salina
- Con un asa estéril tomar una fracción o colonia del microorganismo y extender
- Fijar con calor y flamear
- Dejar secar
- Agregar un a gota de azul de lactofenol
- Cubrir con un cubreobjetos



- Observar al microscopio

2. Caracterización morfológica de los aislamientos de *Moniliophthora roreri* ⁽¹⁶⁾

Materiales y Equipo

Pie de rey
 Portaobjetos
 Cubreobjetos
 V de vidrio
 Placas Petri de vidrio
 Asa bacteriológica en punta
 Microscopio óptico
 Papel Parafilm

Reactivos

Agar V8
 Agua estéril
 Azul de lactofenol

2.1 Evaluación Morfológica

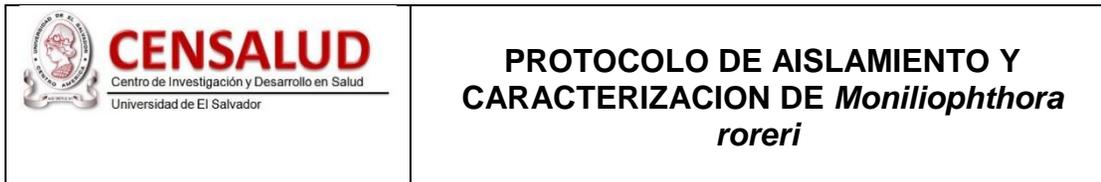
Evaluación Morfológica a partir de los aislamientos obtenidos de *Moniliophthora roreri* observar los parámetros siguientes:

Características Microscópicas.

- Características de las colonias como:

Mediante observación visual anotar los siguientes parámetros:

- **Borde:** Irregular, regular
- **Textura:** Algodonosa, pulverulenta



- **Coloración** anotar las coloraciones presentadas por las colonias
- **Presencia/ausencia de sectores** ausencia, presencia, los cuales indican la edad de la colonia.
- **Crecimiento/tamaño de las colonias**, realizar la medición de la colonia del hongo haciendo uso de un pie de rey y anotar diámetro.

Características Microscópicas

Realizar tinciones de los aislamientos obtenidos, observar al microscopio y anotar características de las esporas presentes:

- **Esporulación** observar al microscopio si es Escasa o abundante, y si son esporas maduras o inmaduras
- **Forma de esporas** observar al microscopio si las colonias son Globosas, subglobosas, elípticas

2.2 Caracterización con micro cultivos

Materiales y Equipo

Porta objeto

Cubre objeto

Placa de Petri de vidrio

Varillas de vidrio en v

Parafilm

Reactivos

Agar v8

Agua estéril

Azul de lactofenol

Tetróxido de osmio

Acetona

	PROTOCOLO DE AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE <i>Moniliophthora roreri</i>
---	---

Microscopio

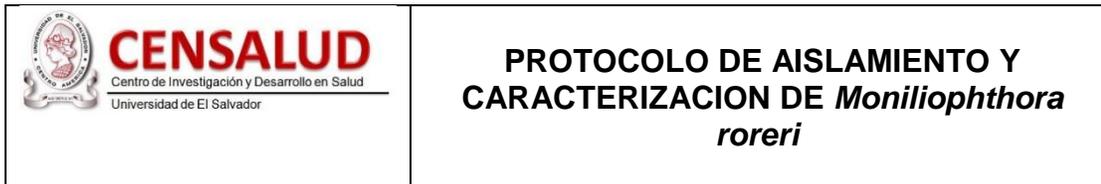
Agua desmineralizada

Asa microbiológica

Pinzas

Procedimiento

- Esterilizar en autoclave el material (portaobjetos, cubreobjetos, V de vidrio, agua destilada y medio de cultivo)
- Introducir la barra de vidrio en la placa de vidrio
- Colocar el portaobjetos sobre la barra de vidrio
- Cortar un cuadro de 5 mm de agar V8 y colocarlo sobre el portaobjetos.
- Tomar con un asa estéril un fragmento de micelio del hongo aislado y purificado e inocular en los cuatro extremos de agar V8.
- Colocar el cubreobjetos sobre el medio de cultivo inoculado.
- Añadir 1 ml de agua destilada estéril en la placa, para crear un ambiente húmedo.
- Cerrar la placa y sellar con parafilm e incubar 7 días a 25°C en la oscuridad.
- A los 15 días de crecimiento:
- Retirar el cubreobjetos con crecimiento
- Colocar una gota de lactofenol sobre un portaobjetos limpio
- Flamear las pinzas
- Colocar el cubreobjetos con crecimiento sobre el portaobjetos y esperar unos instantes para que actúe el Lactofenol
- Observar al microscopio con el objetivo “seco fuerte” (x40)



Observar e identificar visualmente las conidios e hifas de *Moniliophthora roreri*, observar la forma y el tipo de las esporas de las muestras de cacao que se aislaron.

2.3 Determinaciones por Microscopía Electrónica de Barrido ⁽¹⁶⁾

Materiales y Equipo

Vasos de precipitado de 100 mL
 Goteros
 Probetas
 Varillas de vidrio
 Cuchillas
 Estufa
 Microscopio electrónico de barrido

Reactivos

Etanol puro.
 Solución de buffer fosfato.
 Fijador Karnovsky.
 Tetróxido de osmio
 Acetona
 Agua desmineralizada.
 Soluciones de hidroalcohólicas al 90%,
 70%, 50% y 30%.
 Soluciones de etanol-acetona (3:1),
 (1:1) y (1:3)

Procedimiento:

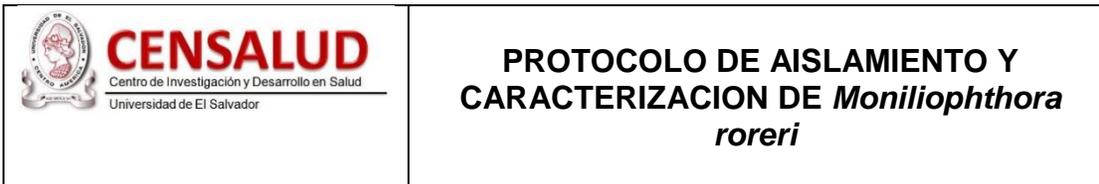
Procesamiento para Muestras de Monilia.

- Cortar segmentos de 5 x 5 mm de medio con el espécimen a observar y colocar en frascos de vidrio con boca ancha que permitan la entrada de micro pipetas y pinzas. Rotular los frascos debidamente.
- Adicionar solución de fijador karnovsky en cantidad suficiente que cubra la muestra y guardar en refrigeración.



Partiendo de Muestras en Solucion Karnovsky en Refrigeracion durante 24 horas.

- Realizar dos lavados en Buffer Cacodilato 0.1 M pH 7.4 de 10 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar la post fijación en tetroxido de osmio 1% durante 3 horas a temperatura ambiente. En una hora no se había infiltrado toda la muestra.
- Realizar dos lavados en Buffer Cacodilato 0.1 M pH 7.4 de 10 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar deshidratación en soluciones de etanol durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 - a. Alcohol 30%
 - b. Alcohol 50%
 - c. Alcohol 70%
- Guardar las muestras en refrigeración para seguir al siguiente día.
- Realizar deshidratación en soluciones de etanol durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 - a. Alcohol 90%
 - b. Alcohol 100%
 - c. Alcohol 100%
- Realizar deshidratación en soluciones de etanol-HMDS (Hexametildisilazano) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 - a. Alcohol-HMDS 3:1



- b. Alcohol-HMDS 2:2
- c. Alcohol-HMDS 1:3
- d. HMDS puro

- Guardar las muestras en desecador y dejar secar.

Partiendo de Muestras secadas en HMDS.

- Montar las muestras en porta muestras cilíndricas de cobre que estén limpios y rotulados. No tocar los cilindros con las manos.
-
- Colocar cinta adhesiva doble de carbón en un porta muestra cilíndrico.
- Con una pinza tomar la muestra y pegar partes de ella en la cinta adhesiva.
- Colocar las muestras en el recubridor catódico y encender el equipo y esperar a que se alcance una presión de vacío no menor a 10^{-2} mbar.
- Realizar el recubrimiento usando argón en estado plasmático para recubrir las muestras con una película de oro.

Observación en el Microscopio Electrónico partiendo de muestras recubiertas en oro.

3.3 Conservación de Cepas de *M. roreri*

Proporcionado para el centro de investigación y desarrollo en salud CENSALUD, segundo nivel.

Materiales y Equipo

Reactivos

	PROTOCOLO DE AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE <i>Moniliophthora roreri</i>
---	---

Tubos de rosca

Glicerol 2%

crio viales

BHI

Pipeta graduada

Caldo V8.

Asa microbiológica

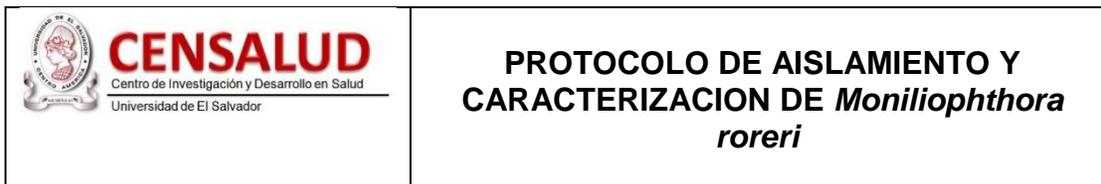
Procedimiento:

Para la conservacion de cepas de *Moniliophthora roreri*

-Realizar una suspensión de esporas en tubos de caldo V8 con 5% glicerol y caldo BHI con 5% glicerol.

-Colocar 1 ml de la suspensión crio viales.

-Almacenarlos a temperaturas de -30



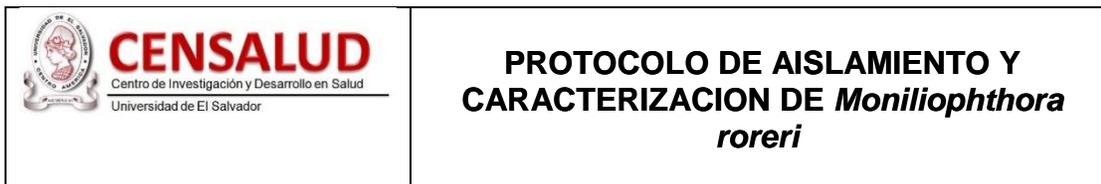
Esquemas de Procedimientos

1. Aislamiento del hongo *Moniliophthora roreri* en frutos de cacao sospechosos de enfermedad.

1.1 Colección de las muestras



Fig. N°107 Esquema de colección de muestras



1.2 Desinfección de las muestras

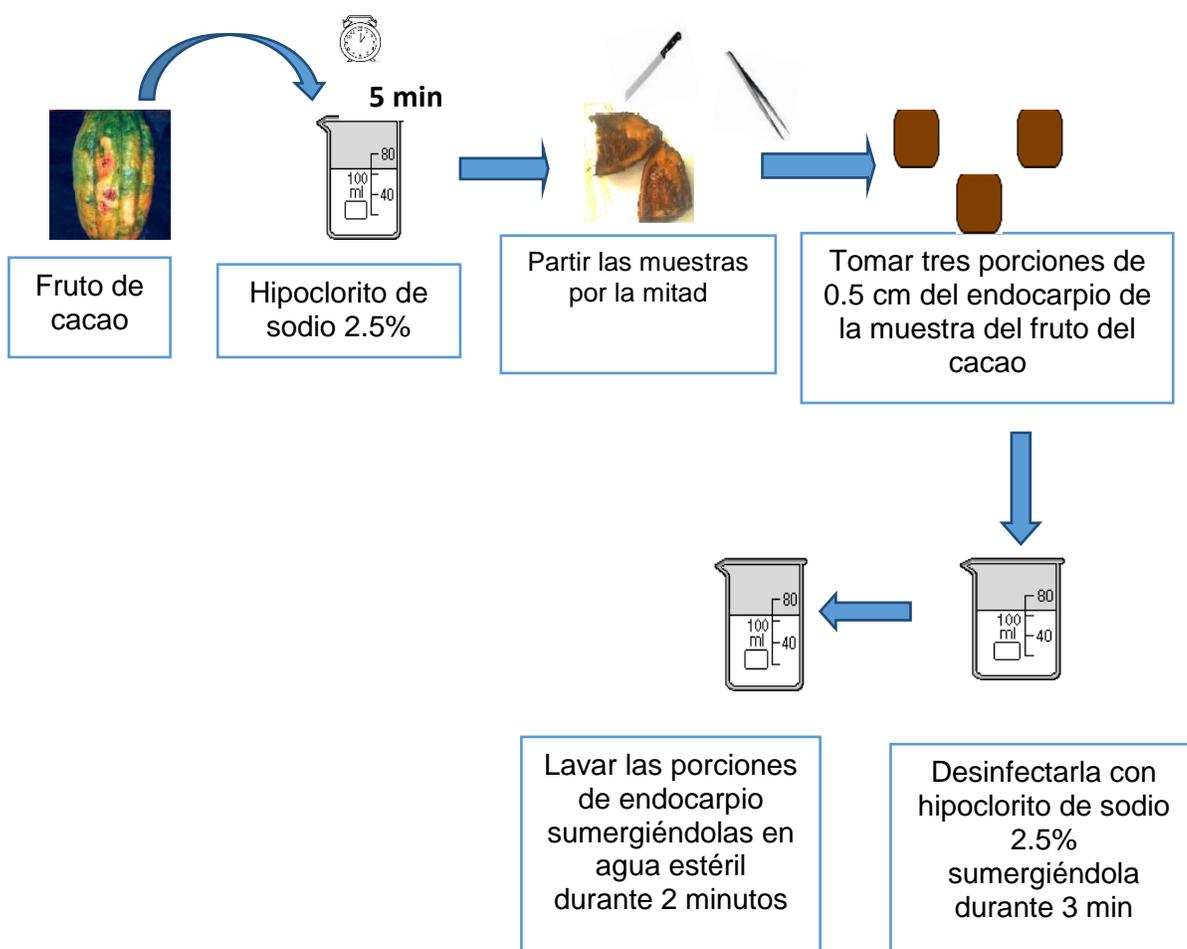


Fig. N°108 Esquema desinfección de muestra

 <p>CENSALUD Centro de Investigación y Desarrollo en Salud Universidad de El Salvador</p>	<p>PROTOCOLO DE AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE <i>Moniliophthora roreri</i></p>
---	--

1.3 Siembra de la muestra

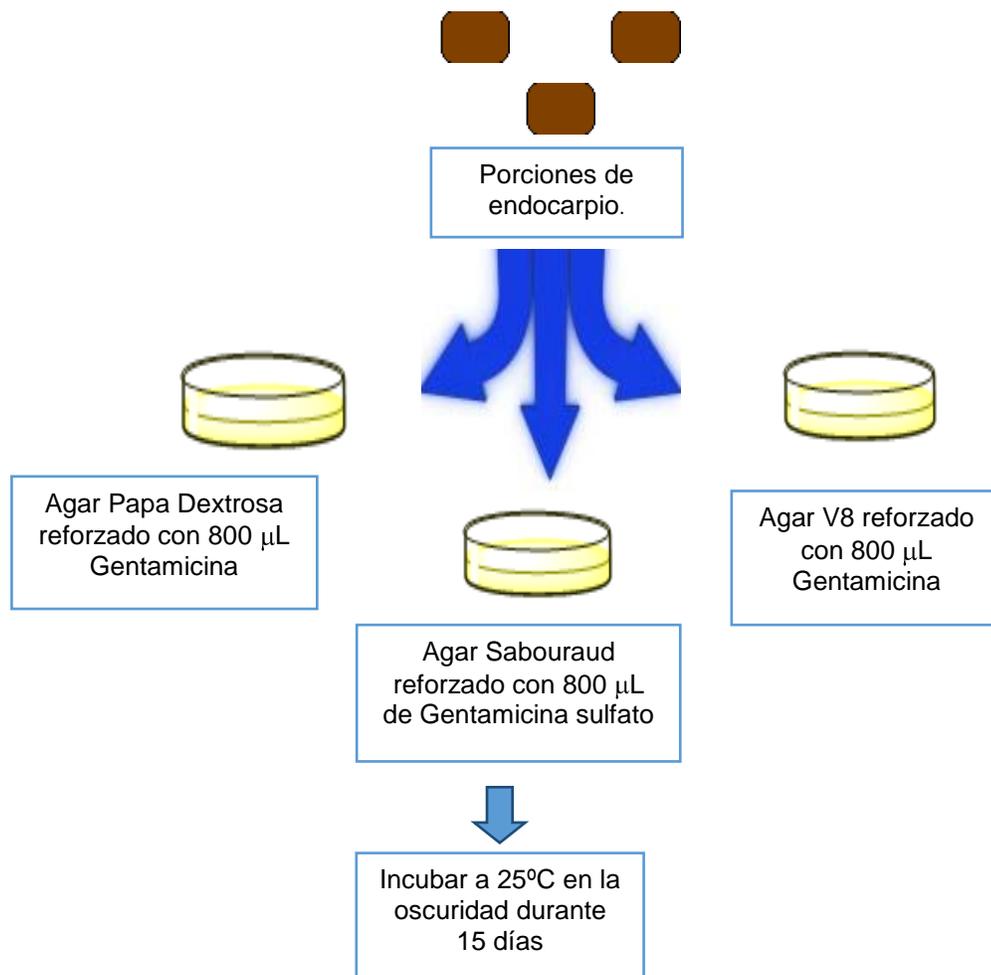


Fig. N°109 Esquema siembra de muestra

 <p>CENSALUD Centro de Investigación y Desarrollo en Salud Universidad de El Salvador</p>	<p>PROTOCOLO DE AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE <i>Moniliophthora roreri</i></p>
---	--

Identificación por microscopio óptico

Tinción Gram

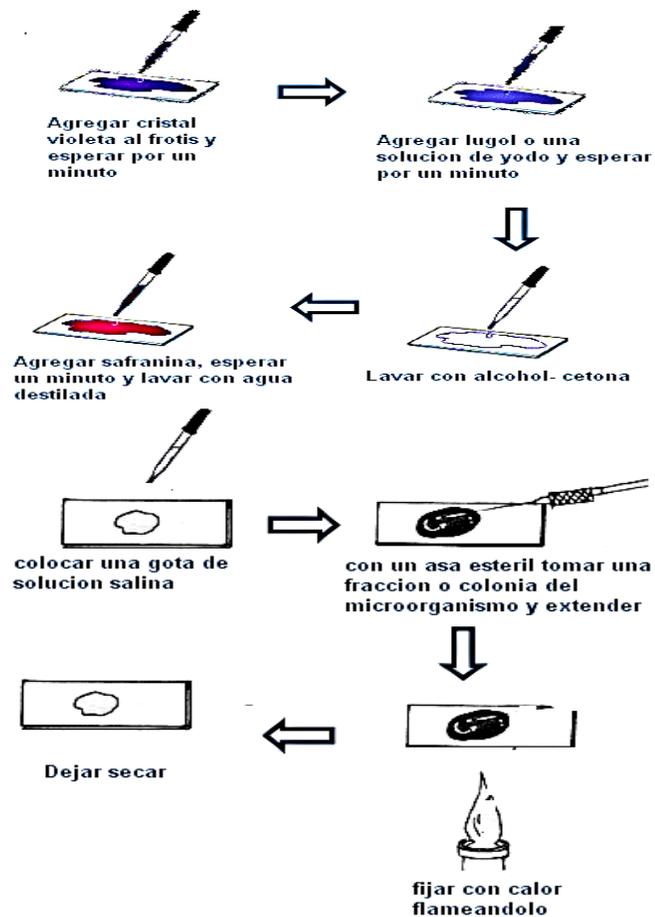


Fig. N°110 Esquema de Tinción de Gram



Tinción azul lactofenol

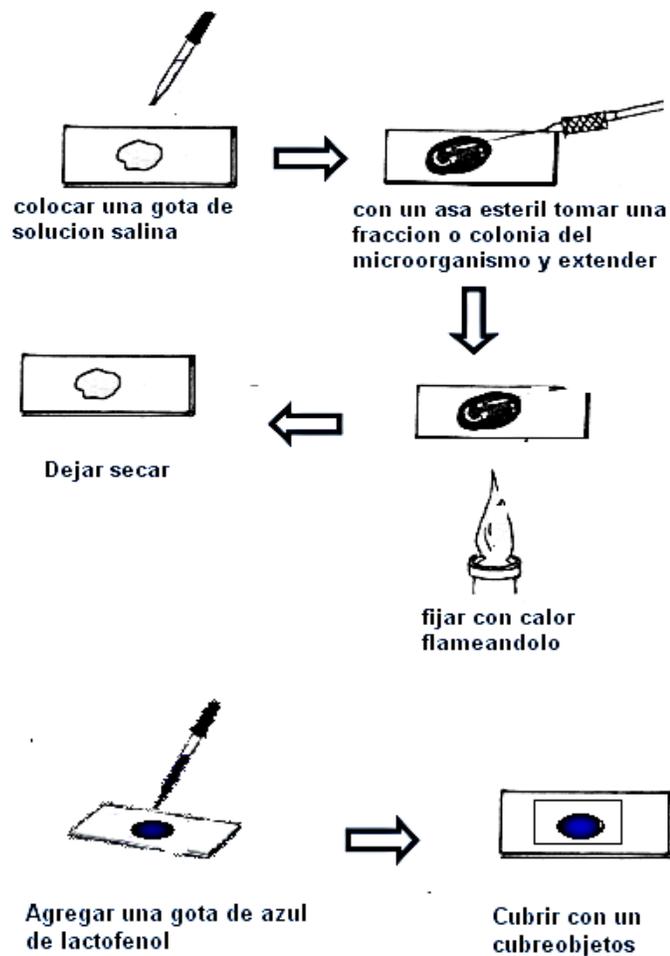
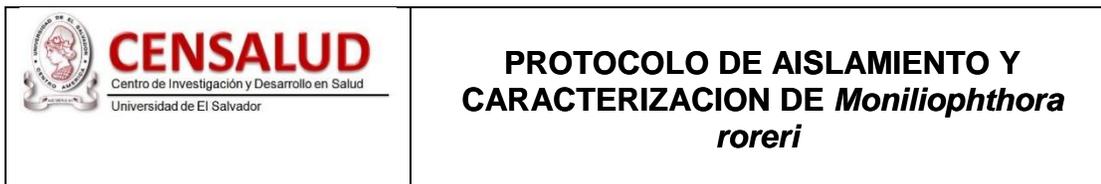


Fig. N°111 Esquema Tinción de Azul de Lactofenol



2.0 Caracterización morfológica de los aislamientos de *Moniliophthora roreri*

2.1 Evaluación Morfológica

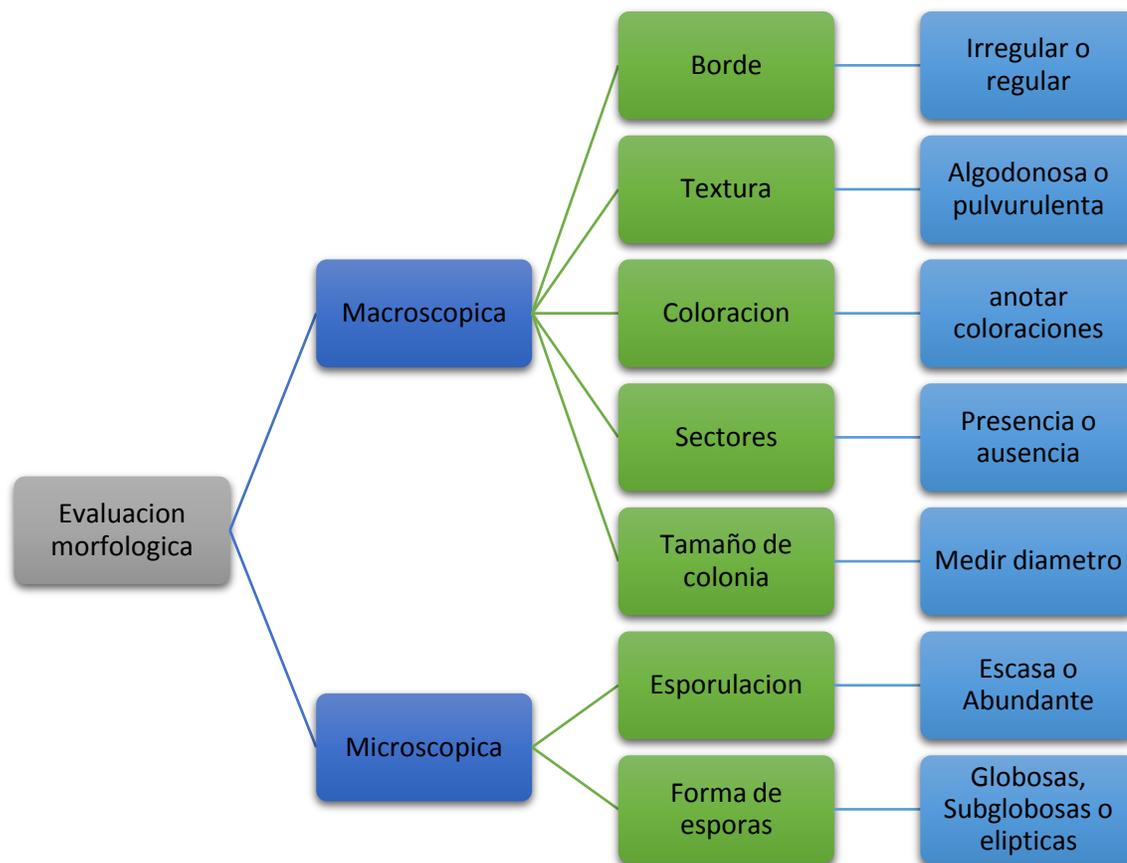


Fig. N°112 Esquema de Evaluación Morfológica

 <p>CENSALUD Centro de Investigación y Desarrollo en Salud Universidad de El Salvador</p>	<p>PROTOCOLO DE AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE <i>Moniliophthora roreri</i></p>
---	--

2.2 Caracterización con micro cultivos

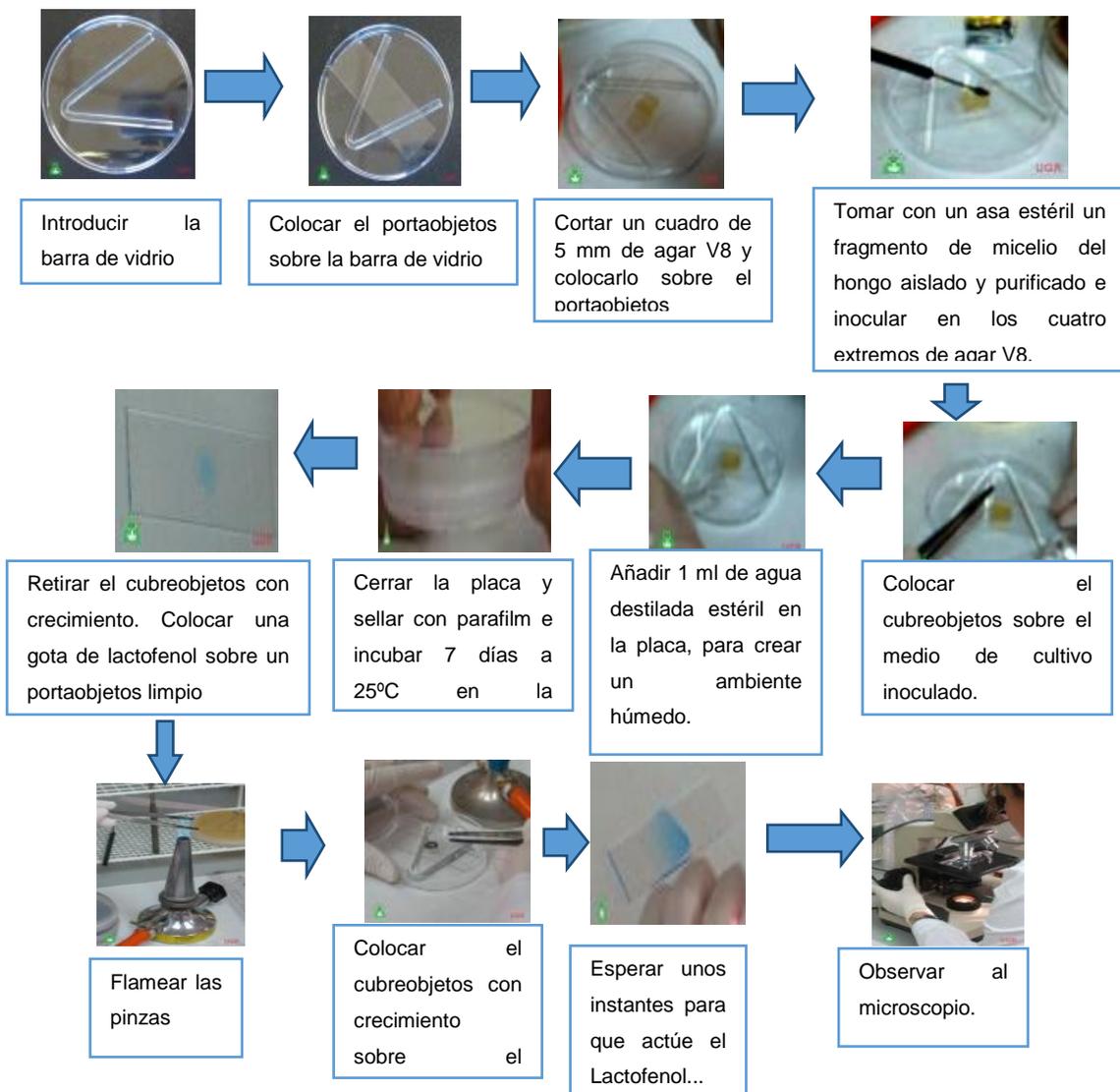
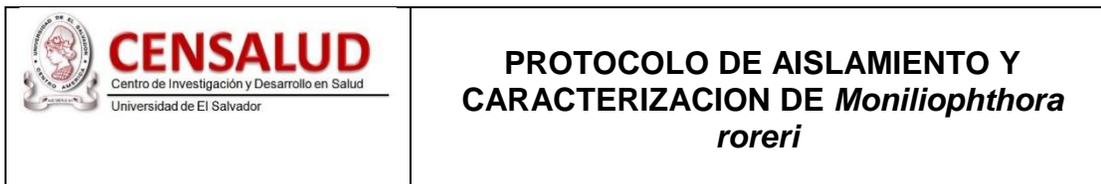


Fig. N°113 Esquema Preparación de microcultivos



Almacenamiento de cepas de *M. roreri*

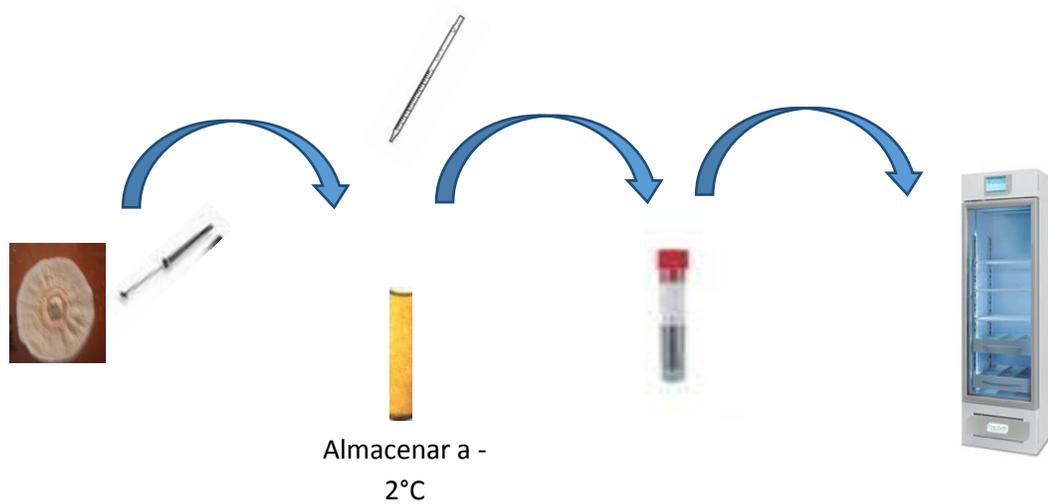


Fig. N°114 Esquema de conservación de cepa

ANEXO N° 2
UBICACIÓN DE LA HACIENDA SAN JOSÉ DE LA CARRERA EN
USULUTÁN

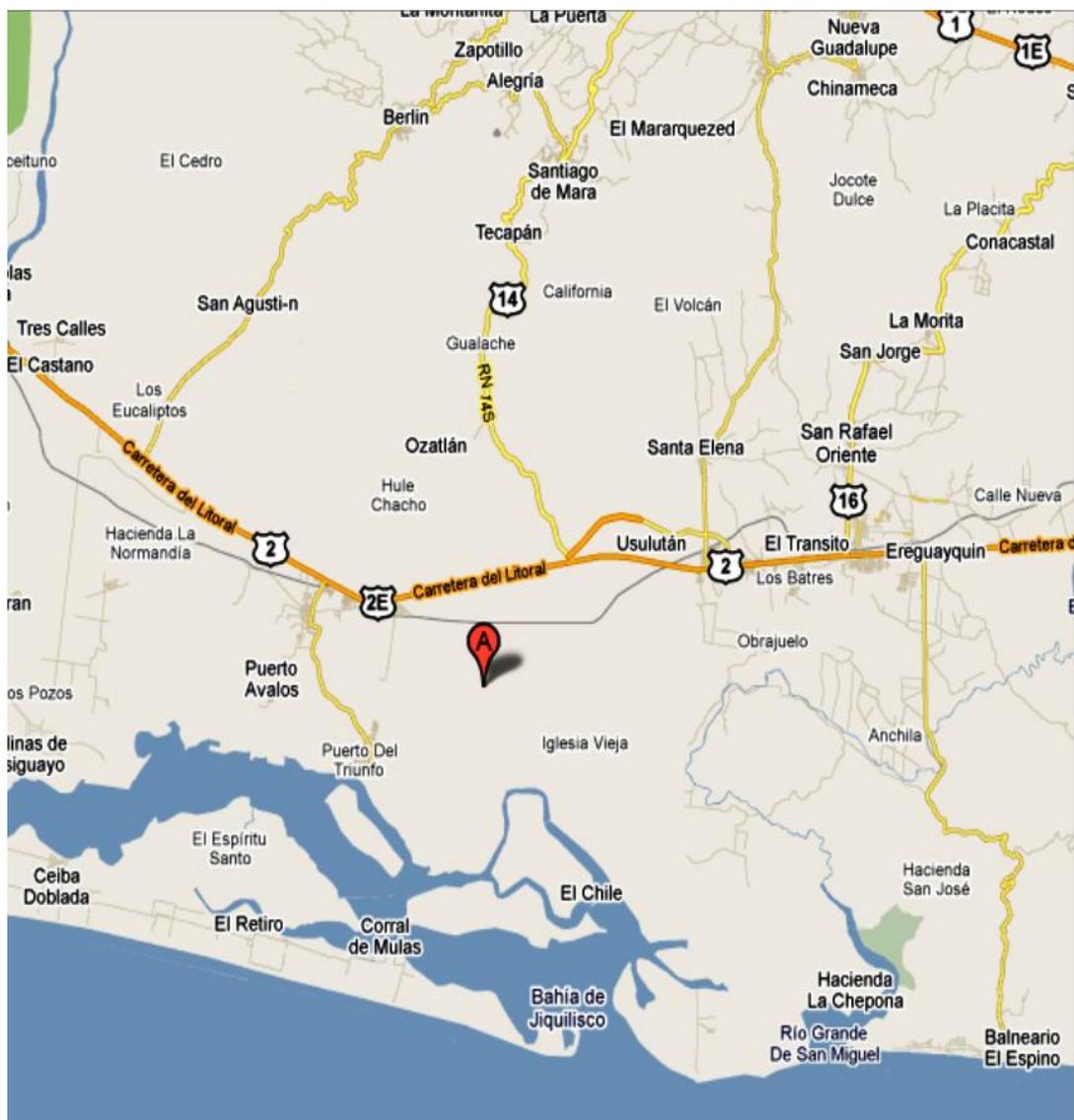


Fig. N° 10 Ubicación de La Hacienda San José del Real La Carrera en Usulután.

ANEXO N° 3
FICHA DE IDENTIFICACION DE MUESTRAS

Identificación de la Muestra_____		
Localización_____		
GPS.	N_____	W_____
Fecha de Recolección_____		
Persona que colecto la muestra_____		

Fig. N° 11 Ficha de identificacion de muestra.

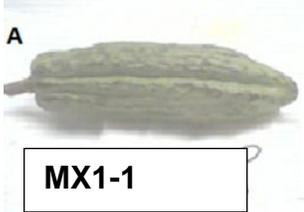
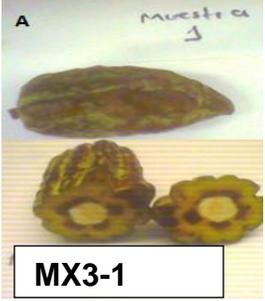
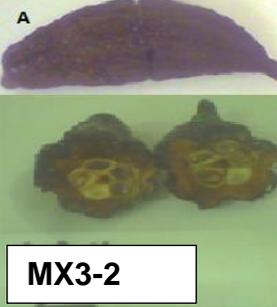
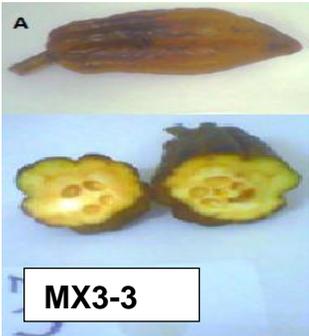
ANEXO N°4

Reconocimiento de síntomas según la edad del fruto de los cuales se aisló

M. royeri

Cuadro N° 23 Reconocimiento de síntomas según la edad del fruto de los cuales se aisló

M. royeri

Menor de un mes	Síntomas
	<p>Maduración prematura Marchitez secamiento</p>
	<p>Maduración prematura Marchitez secamiento Pudrición acuosa en el interior</p>
	<p>Maduración prematura Marchitez secamiento Pudrición acuosa en el interior</p>
	<p>Maduración prematura Marchitez secamiento Pudrición acuosa en el interior</p>

Cuadro N° 23 Continuación

Reconocimiento de síntomas según la edad del fruto de los cuales se aisló <i>M. royeri</i>	
Menor de un mes	Síntomas
 <p style="text-align: center;">MX3-7</p>	Maduración prematura Marchitez secamiento
 <p style="text-align: center;">MX3-9</p>	Maduración prematura Marchitez secamiento Pudrición acuosa en el interior
 <p style="text-align: center;">MX2-21</p>	Maduración prematura Marchitez secamiento Pudrición acuosa en el interior
 <p style="text-align: center;">MX2-22</p>	Maduración prematura Marchitez secamiento Felpa blanca

Cuadro N° 23 Continuación

Reconocimiento de síntomas según la edad del fruto de los cuales se aisló <i>M. royeri</i>	
1-3 MESES	Síntomas
 <p>A</p> <p>MX2-14</p>	<p>Abultamientos</p> <p>Mancha café</p>
 <p>A</p> <p>MX2-16</p>	<p>Abultamientos</p> <p>Mancha café</p>
 <p>A</p> <p>MX2-19</p>	<p>Abultamientos</p> <p>Mancha café</p>
3-4 MESES	Síntomas
 <p>A</p> <p>MX3-8</p>	<p>Puntos aceitosos</p> <p>Puntos aceitosos verdes</p> <p>Puntos aceitosos anaranjados</p> <p>Mancha café</p>
mayor a 4 meses	síntomas
 <p>A</p> <p>MX3-18</p>	<p>Mancha café con borde irregular</p> <p>Felpa blanca con desprendimiento de esporas.</p>

ANEXO N°5 PREPARACIÓN DE MICROCULTIVOS DE *M. royeri* PARA LA IDENTIFICACIÓN.

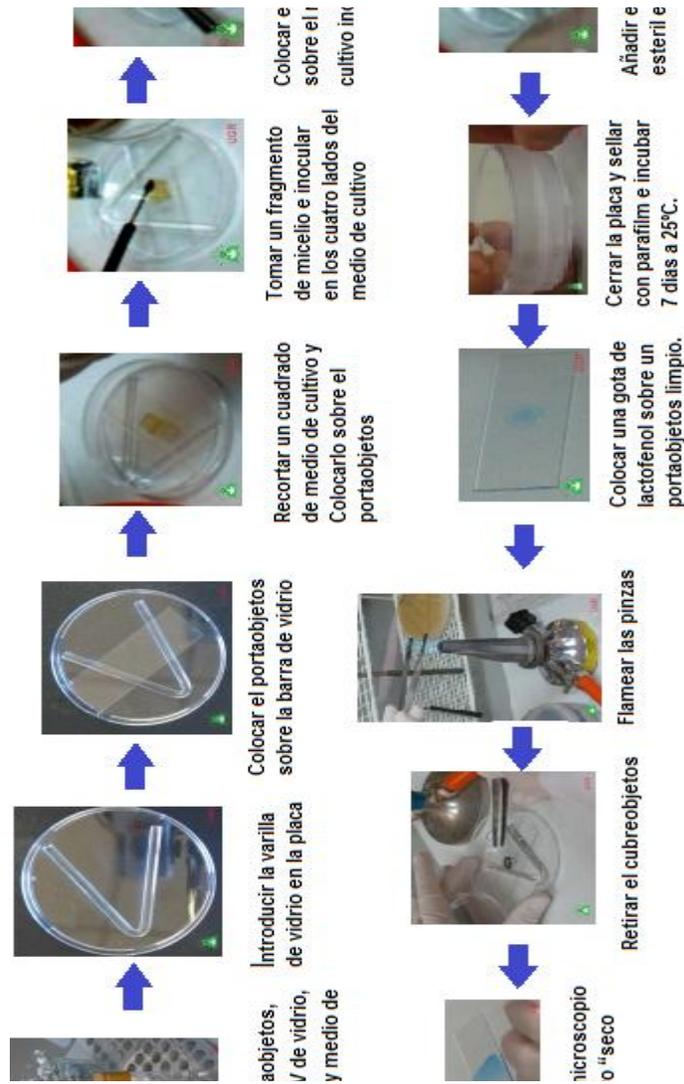


Fig. N° 12 Esquema de preparación de microcultivos de *Monilophthora royeri* de las muestras de cacao

ANEXO N° 6 Procesamiento de las muestras para aislar *M. royeri*



Fig. N° 13 Procesamiento de las muestras para aislar *M. roreri*. (14)

ANEXO N° 7
ESQUEMA DE DESINFECCION Y SIEMBRA DE MUESTRAS PARA EL
AISLAMIENTO DE *Moniliophthora roreri*

DESINFECCION DE LA MUESTRA



SIEMBRA DE LA MUESTRA

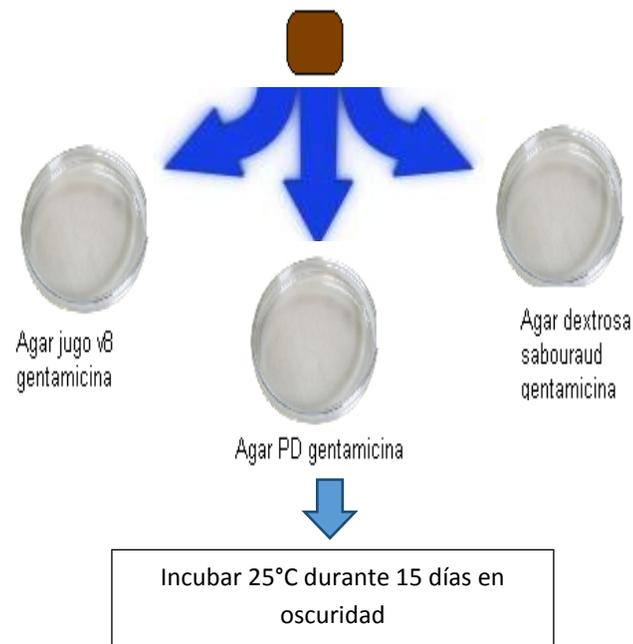


Fig. N° 14 Esquema de desinfección y siembra de muestras para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* ⁽¹⁴⁾

ANEXO N°8

RANGO DE COLORES PARA EVALUAR A LOS AISLAMIENTOS MORFOLÓGICAMENTE CON RESPECTO AL COLOR DE LAS COLONIAS ⁽¹⁴⁾

Cuadro N° Rango de colores que pueden presentar colonias características a

Moniliophthora roreri

NUMERO DE COLONIA	COLOR
1	café claro
2	café claro – blanco
3	café oscuro - café claro – blanco
4	crema- café oscuro - café claro – blanco
5	café oscuro – blanco
6	café oscuro - crema – blanco
7	crema- café claro- blanco

ANEXO N° 9

ESQUEMA PARA PREPARACION DE TINCION DE GRAM

PREPARACION DE FROTIS

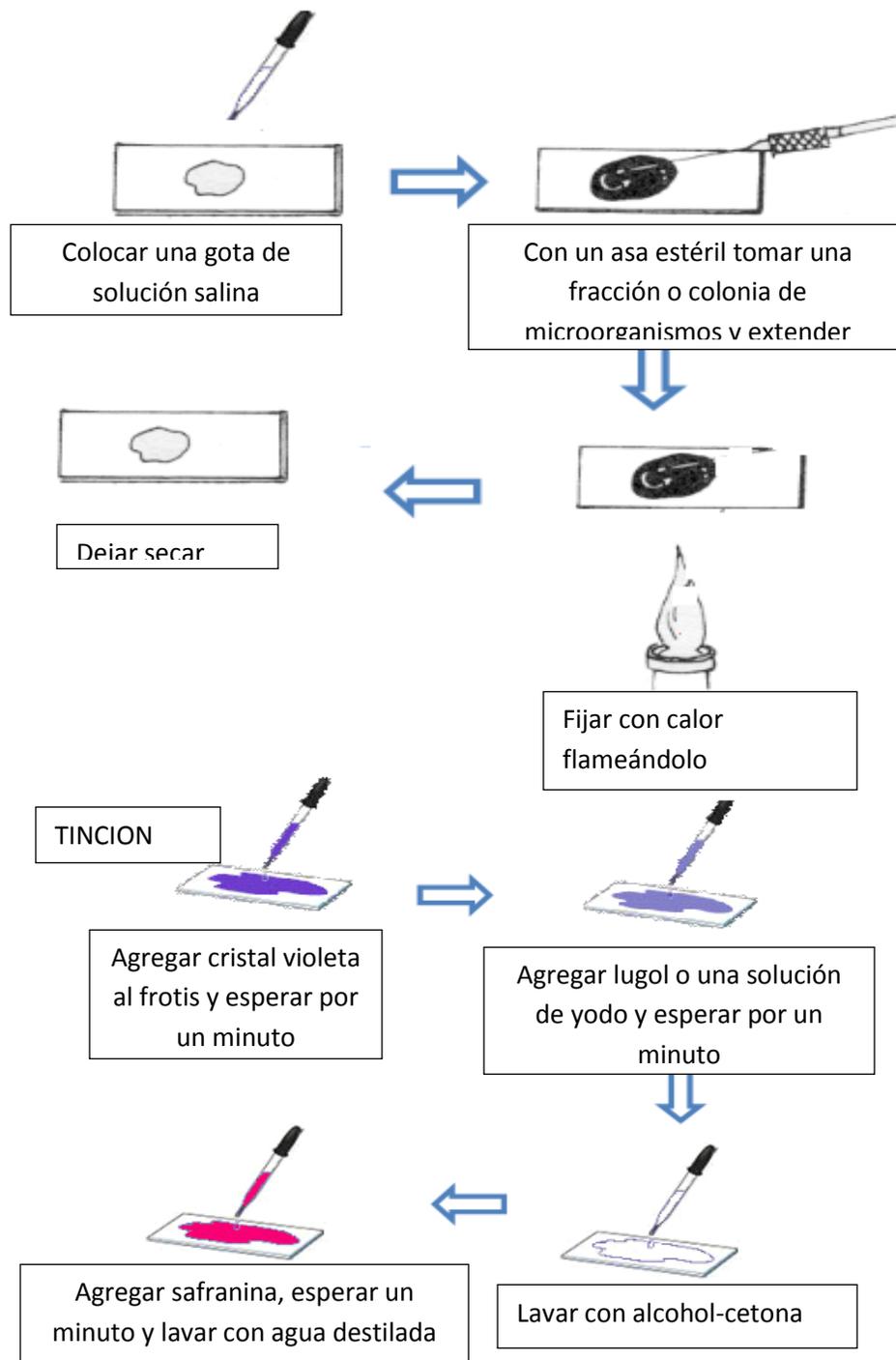
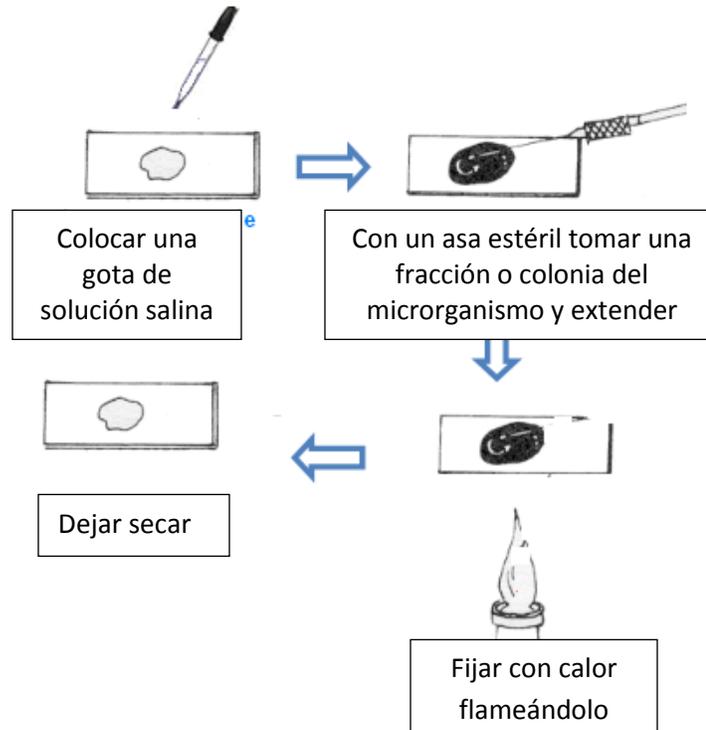


Fig. N° 14 Esquema de preparación de tinción de Gram. ⁽²²⁾

ANEXO N° 10

ESQUEMA PARA PREPARACION DE TINCION CON AZUL DE LACTOFENOL

PREPARACION DEL FROTIS



TINCION

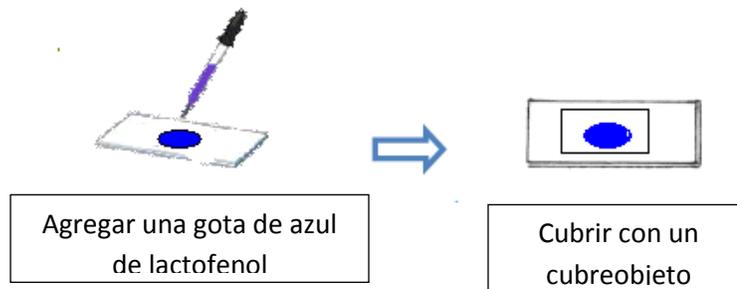


Fig. N° 15 Esquema de preparación de tinción con azul de lactofenol. ⁽²²⁾

ANEXO N°11

FORMA DE LAS ESPORAS EN LOS DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *M. roreri*.

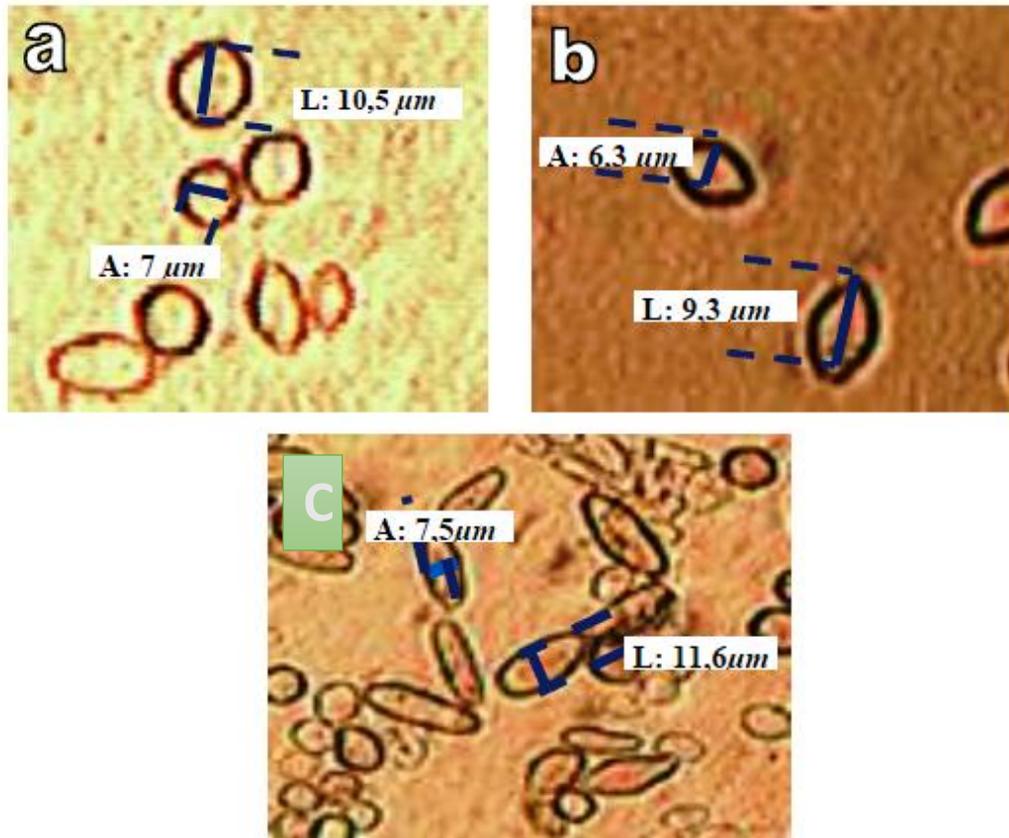
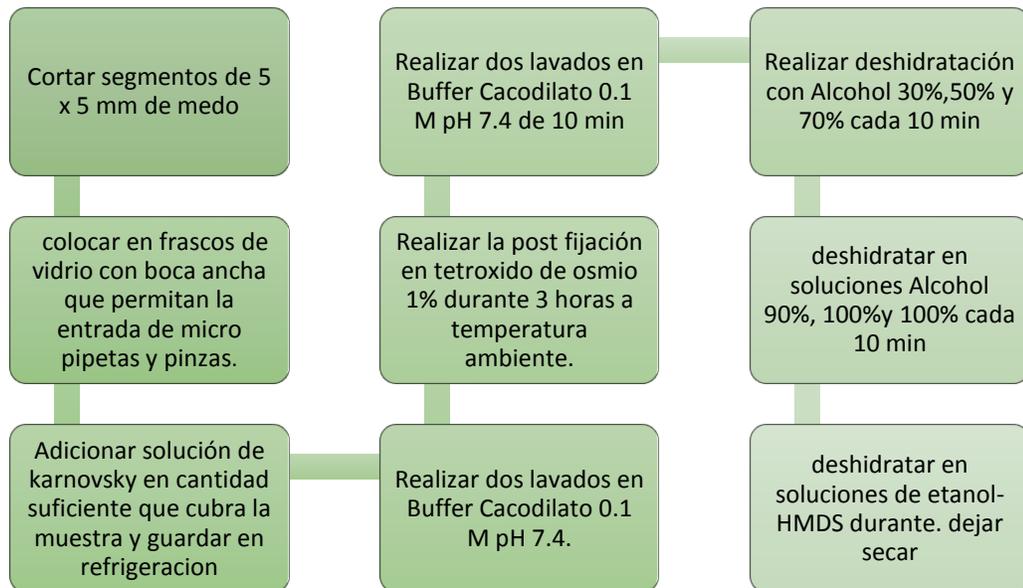


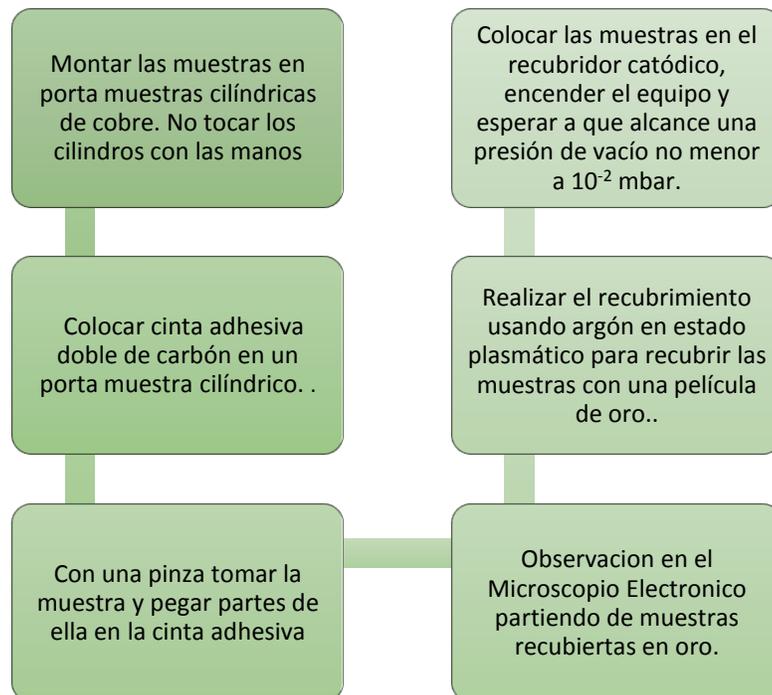
Fig. N° 16 Forma de las esporas en los diferentes aislamientos de *M. roreri*.
 (A) Aislamiento, esporas globosas; (B) Aislamiento, esporas subglobosas; (C)
 Aislamiento, esporas elípticas. (14)

ANEXO N°12

PROCEDIMIENTO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO



Partiendo de Muestras secadas en HMDS.



ANEXO N°13

CONSTANCIA DE ENTREGA CEPAS DE *M. roreri*

San Salvador 05 de Marzo de 2014

Msc. Amy Elieth Moran Rodríguez

Investigadora en Microbiología y Biomedicina

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

ANEXO N°14
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO ⁽⁶⁾

– **Preparación de medio Agar Dextrosa Sabouraud, reforzado con Gentamicina 80mg/2mL**

Pesar 65 g de medio Agar Dextrosa Sabouraud y disolver en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. , ajustar el pH 5.6 ± 0.2 . Dejar enfriar y agregar 800 μ L de Gentamicina Sulfato (80mg/2mL), mezclar bien y colocar aproximadamente 20 mL en cada una de las placas de Petri.

– **Preparación de medio Agar Papa Dextrosa, reforzado con Gentamicina**

Pesar 39.0 g de agar Papa Dextrosa en polvo, colocarlos en un Erlenmeyer y agregar 1000 mL de agua mezclar bien hasta homogenización luego calentar a ebullición en un hotplate homogenizando a la vez. Esterilizar 121°C durante 20 minutos. , ajustar con papel PH, el pH a 5.6 ± 0.2 Dejar enfriar cuando este frio agregar 800 μ L de Gentamicina Sulfato mezclar bien, y colocar aproximadamente 20 mL en cada una de las placas de Petri.

– **Preparación de medio Agar V8 MAA, reforzado con Gentamicina**

Colocar en un Erlenmeyer 200 mL de Jugo V8 MAA. Agregar 20 g de Maltosa, 1.0 g de asparigina, 10g de extracto de malta, 3 g de carbonato de calcio y 15 g de agar. Completar 1L con agua destilada, mezclar bien hasta homogenización, calentar a ebullición en un hotplate. Homogenizar toda la muestra. Esterilizar 121°C durante 20 minutos y dejar enfriar. Luego agregar 800 μ L de Gentamicina Sulfato 80 mg/2mL, mezclando bien y colocar aproximadamente 20 mL en cada una de las placas de Petri.

ANEXO N°15

MATERIALES, EQUIPOS y REACTIVOS

MATERIALES Y EQUIPO	REACTIVOS	
Erlenmeyer de 600mL	Agar sabouraud dextrosa	
Erlenmeyer de 150 mL	Agar papa dextrosa	
Probeta de 100 mL	Agar V8	
Probeta de 10 mL	Jugo V8	
Espátula	Maltosa	
Balanza semianalitica	Aspargina	
Agitadores	Extracto de malta	
Hot plate	Carbonato de Calcio	
Auto clave	Agar	
Placas de Petri	Agua	
	Gentamicina	Sulfato
	80mg/ml	

Tinciones

Materiales y Equipo

Asa de siembra
 Mechero de Bunsen
 Cubeta de Tinción
 Portaobjetos
 Cubreobjetos
 Microscopio óptico

Reactivos

Azul de lactofenol
 Solución salina
 Lugol
 Alcohol -acetona
 Cristal violeta
 agua

Microscopia Electrónica de Barrido ⁽¹⁶⁾**Materiales y Equipo**

Vasos de precipitado de 100 mL
 Goteros
 Probetas
 Varillas de vidrio
 Cuchillas
 Estufa
 Microscopio electrónico de barrido

Reactivos

Etanol puro.
 Solución de buffer fosfato.
 Fijador Karnovsky.
 Tetróxido de osmio
 Acetona
 Agua desmineralizada.
 Soluciones de hidroalcohólicas al 90%, 70%, 50% y 30%.
 Soluciones de etanol-acetona (3:1), (1:1) y (1:3)