



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

INGENIERÍA AGRONÓMICA



Título del Proyecto de Investigación:

“Biodiversidad de ecotipos de *Moniliophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L., y el efecto antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs’).”

AUTOR:

Javier Andrés Auhing Arcos

javier.auhing@uteq.edu.ec

Director del Proyecto de Investigación:

Hayron Fabricio Canchignia Martínez *PhD.*

hcanchignia@uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2018

Único en el Mundo

Cacao "Nacional"

Clasificación Fino O De Aroma

Con un área de siembra de **354,000 ha** (SINAGAP, 2016)

Theobroma cacao L.



ESCOBA DE BRUJA: UN VIEJO PROBLEMA EN EL ECUADOR



(Aragundi, et al. 1987 & Suarez C., 1993)

1879-1920: Ecuador era el principal productor mundial de cacao.

1915: Stahel describió la enfermedad y la ubicó dentro de la especie *Marasmius perniciosus* en Surinam – América del Sur.

1918: Una enfermedad desconocida y muy destructiva apareció en la provincia del Guayas catón Balao.

1923: Abundaba en la provincia de "Los Ríos"

1924: Todas las plantaciones estaban infectadas.

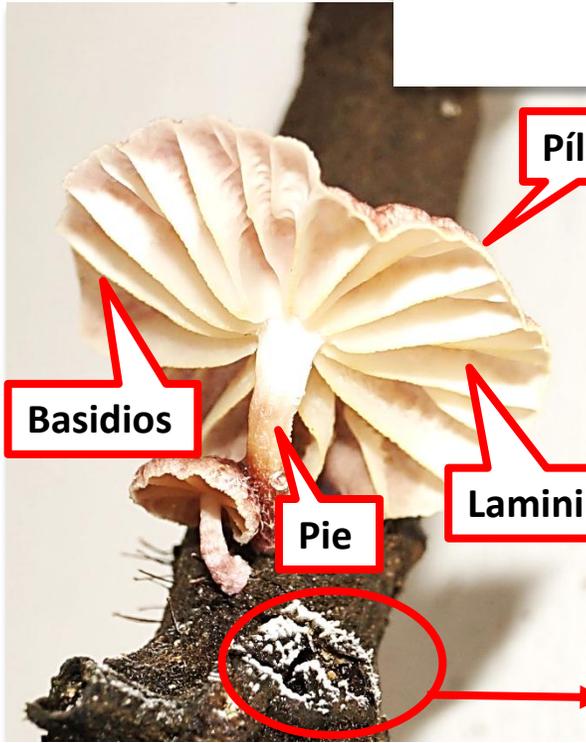
1930-1955: La gran debacle del cacao ecuatoriano.

1942: Singer la reubicó dentro de la especie *Crinipellis perniciosus* (Stahel).

2005: Aime & Phillips-Mora mediante herramientas moleculares la ubicaron dentro de la especie *Moniliophthora perniciosus* (Stahel).

Actualmente: Puede causar pérdida en la producción hasta un 75%

Moniliophthora perniciosa



Píleo

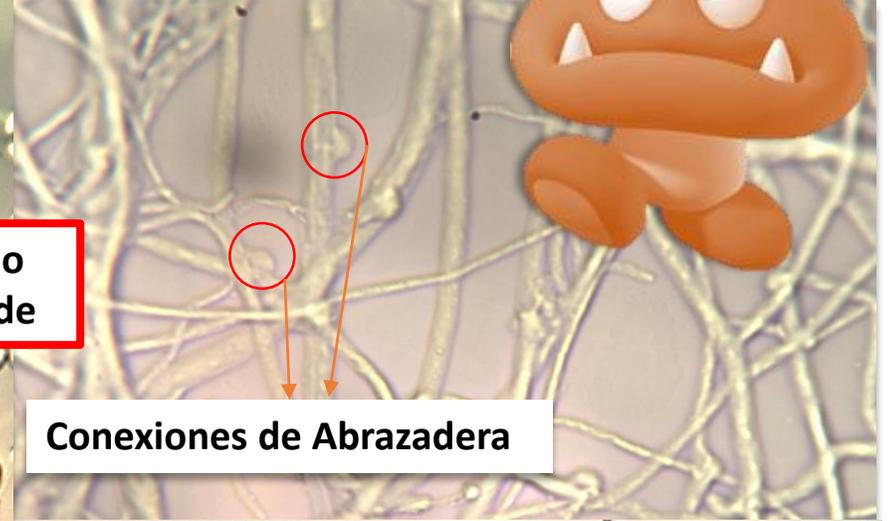
Basidios

Pie

Laminillas

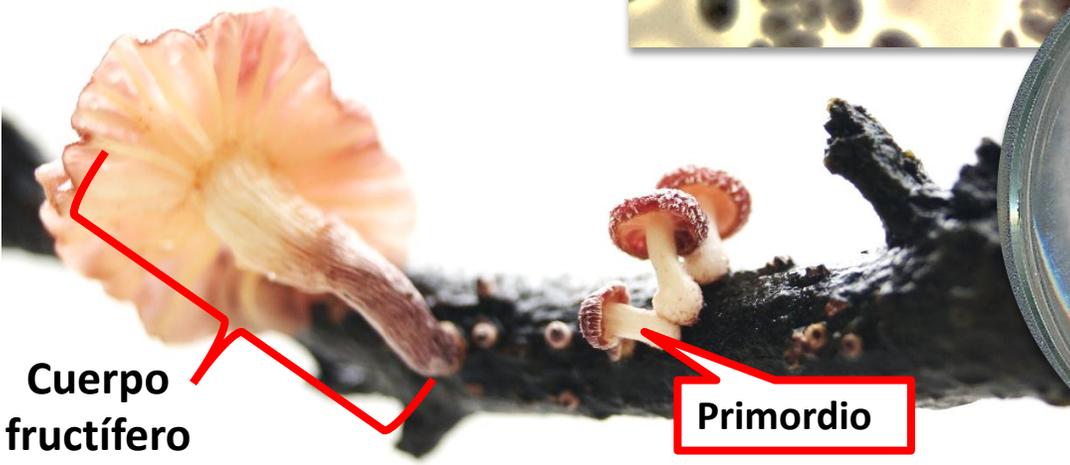


Basidiosporas



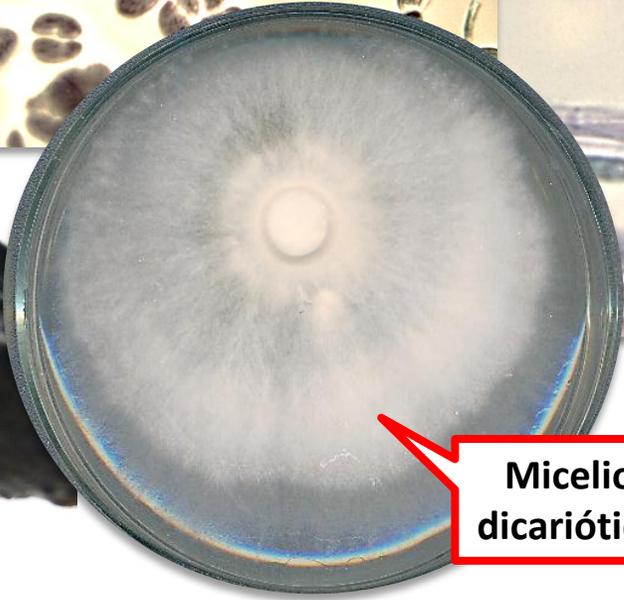
Micelio haploide

Conexiones de Abrazadera

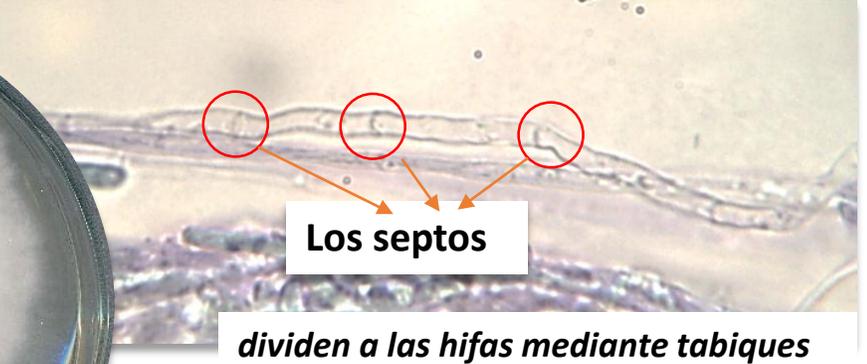


Cuerpo fructífero

Primordio



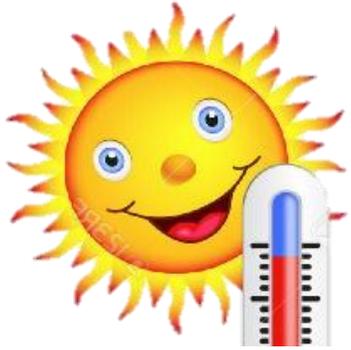
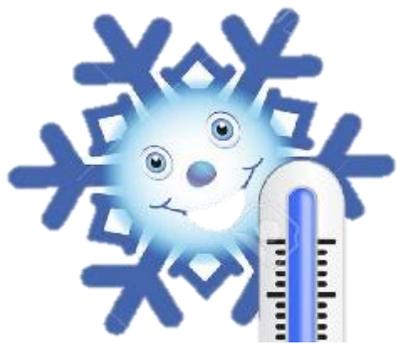
Micelio dicariótico



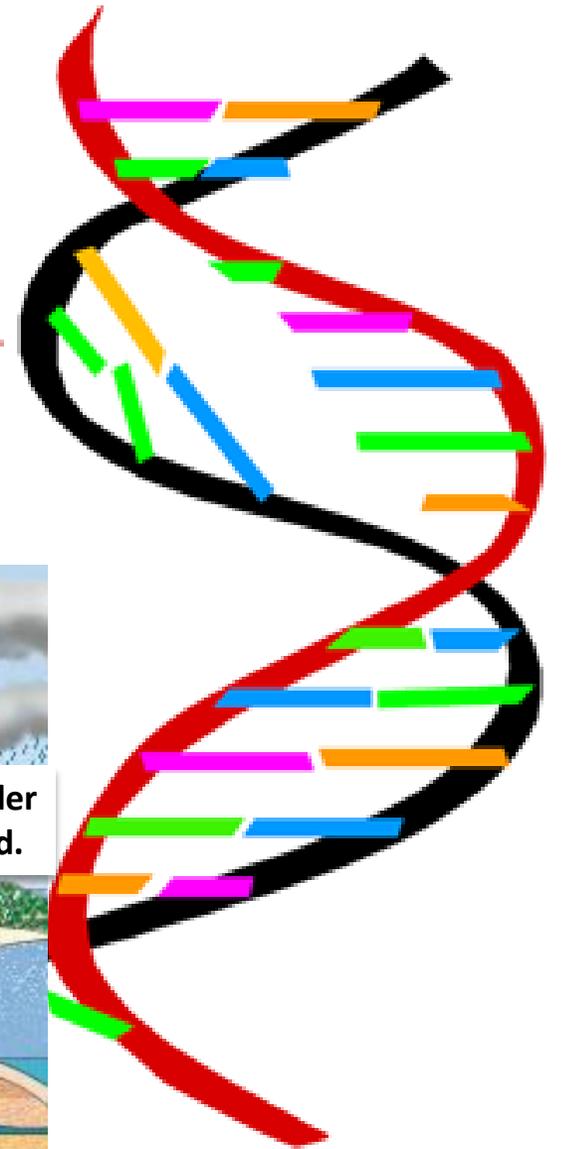
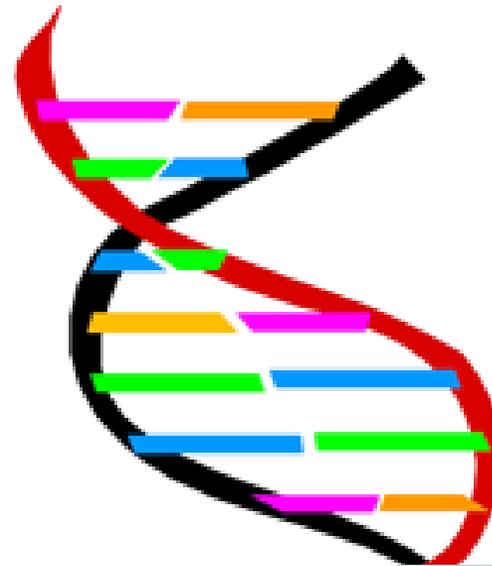
Los septos

dividen a las hifas mediante tabiques

Biodiversidad de Ecotipos de *M. perniciosus*



Subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico



Se establecen de acuerdo con los límites de tolerancia de las especies, a los factores ambientales locales.

De suma importancia para comprender mejor la epidemiología de esta enfermedad.



REDUCIR EL USO DE PLAGUICIDAS

Fungicidas



Impacto Ecológico



Toxicidad en Humanos



Exposiciones de largo periodo al cobre



Una toma grande de cobre puede causar daño al hígado y los riñones e incluso la muerte.



Podas Fitosanitarias

De 2 a 3 al año



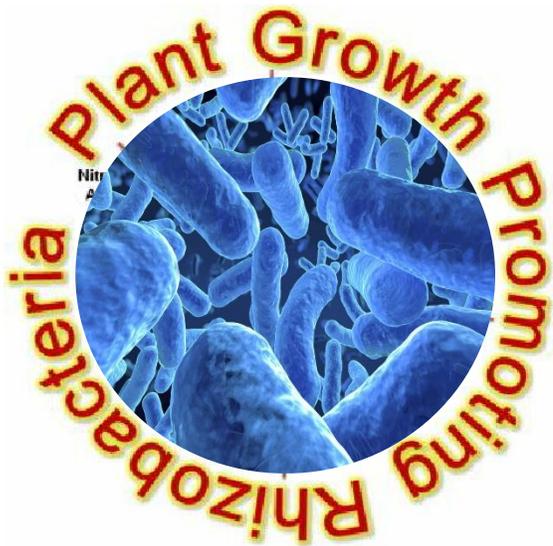
Deficiente remoción de escobas en la copa =
saneamiento ineficaz



JUSTIFICACIÓN

La necesidad de buscar alternativas que sean viables para productores

PROMOVER EL USO



Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

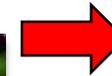
Soberanía de los recursos naturales



Amigable con el medio ambiente, asegurar la biodiversidad y salud humana



CONSERVAR EL SUELO Y EL AGUA = ASEGURAR NUESTRO FUTURO COMÚN



Reducción del uso de agroquímicos



Bajos costos en la producción del cultivo

¿Qué son las PGPR?



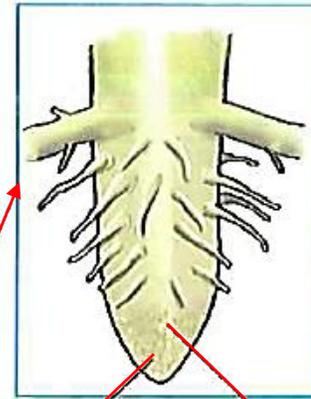
RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA



RIZOBACTERIAS



AUXINAS



ÁCIDO ABSCÍSICO

CITOCININA

CRECIMIENTO VEGETAL

Caracterización molecular de los ecotipos de *M. pernicioso* a su distribución altitudinal del Ecuador



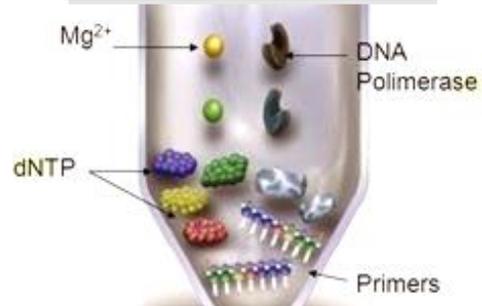
MUESTRAS

Extracción de ADN



Por medio del Kit Quick-Start Protocol.

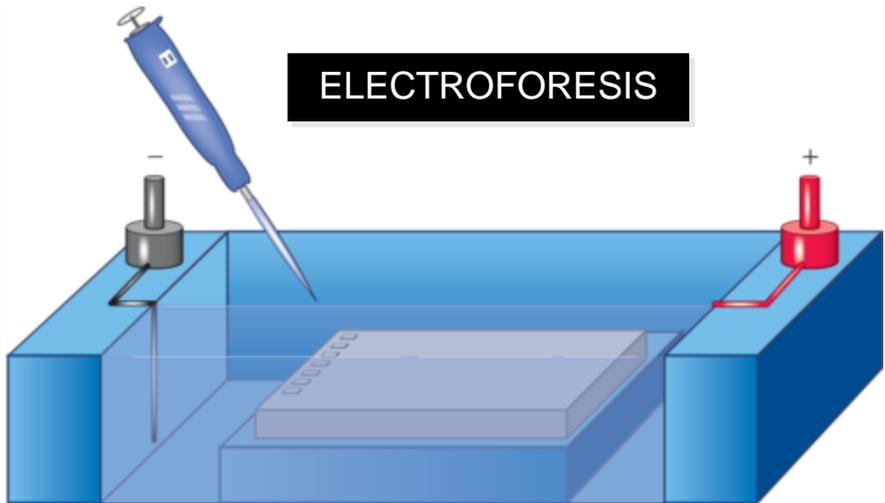
REACCIONES ENZIMATICAS



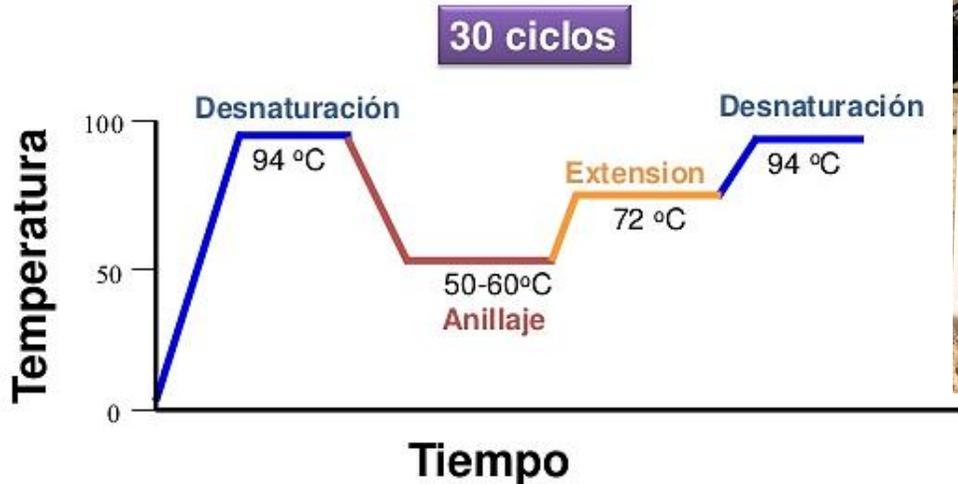
Primer	Primer sequence 5' - 3'	Source
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Sartorato <i>et al.</i> , 2006;
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> , 1990

TERMOCICLADO

ELECTROFORESIS

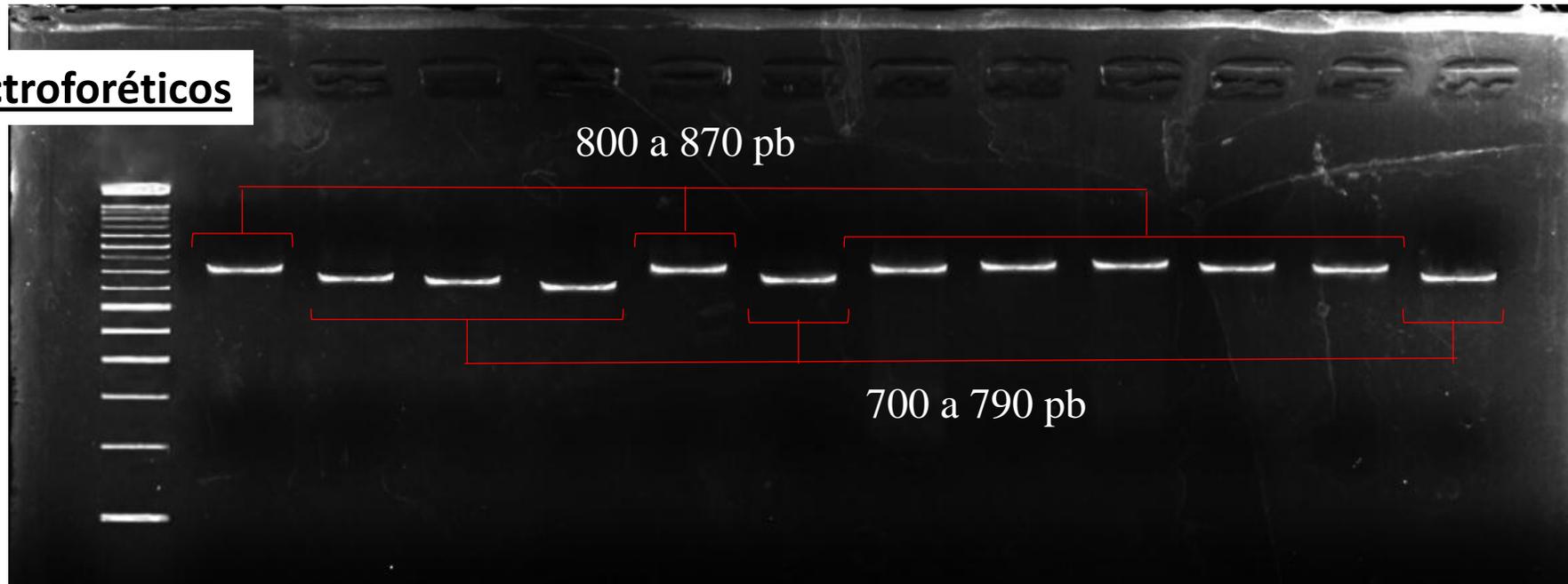


Migración de la muestra

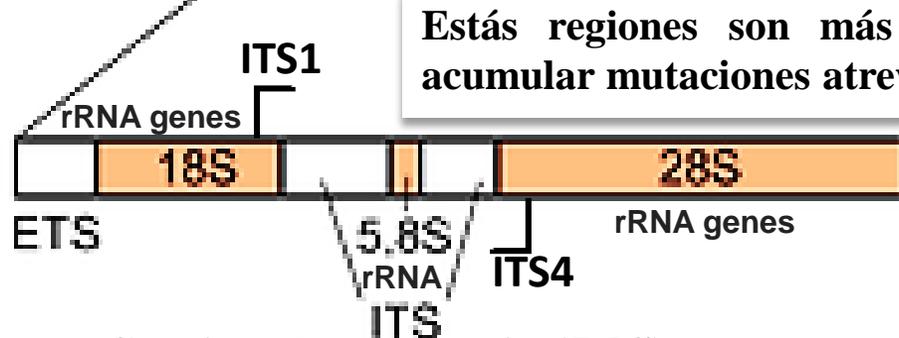


Amplificación y recuperación de secuencias ITS (Espacio Transcripto Interno)

Perfiles electroforéticos



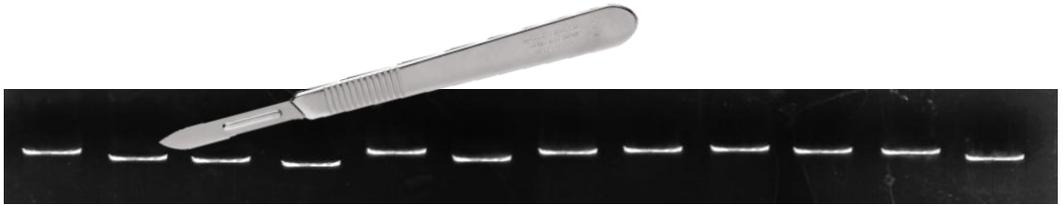
Útil para distinguir entre especies fúngicas



Contiene la secuencia (5.8S)

Estás regiones son más susceptibles de acumular mutaciones a través de los años

Esta variación en el peso molecular puede estar emparentado a las condiciones climatológicas donde se desarrolla cada ecotipo.



PureLink® Quick Gel
Extraction Kit Catalog



Humanizing Genomics
macrogen

```
>180326-007_G03_101_ITS1.ab1 806
GTGGCCGTAGGAACCTGTAAGGAGGTTGAGCTGGCTCTTGTAGGGCATGT
GCTCGCCGACTTTCAATATTCATCCACCTGTGAACCTTTTGTAGCAGATT
CTGGAATAGGGAGGCGCTTGCCTTCTTAGTACGGAGTCTACTATGTT
TGTTTTTAAACACACTTAATGTATGTTTAGAATGATTTTTATTGGGACTT
AATTGACCCTTTAAACTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTCTTGGTATTC
CGAGAGGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATTAATTAACAACCTTGAATGACT
TGTCATTTGAGGATTGGATGTGAGGGGCTGCCGGCTTTGAACAAGAGTCGG
CTCTCTTGAATGCATTAGTGGAAACCGCTATAGTGGACCACATTTGGTGT
GATAATTATCTACGCCATTGGGTTTATCTACGCTTTCGAATGTTGGTGGC
TCTTTAATTAGGTCTCAACACTTCGGTTTGGAGGGTTGCAAGTTGTAATG
ACCTGCTCTCTGCGGATCTGCTTTCGAACCGTCCAAAGTTACTGGACA
ATGAACCTAGATCATTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCATAAACC CGGAAGAAGCTGGAACAGATTTACAAAACCG
AAGAAAAGGGGAAATTTTTCGAATAAAGGGAAAGAAAAGTTGGAGAATG
TCTGAG
```



Relación filogenética



omic Biology ▶ BLAST
[Search Box] [Go] [Clear]

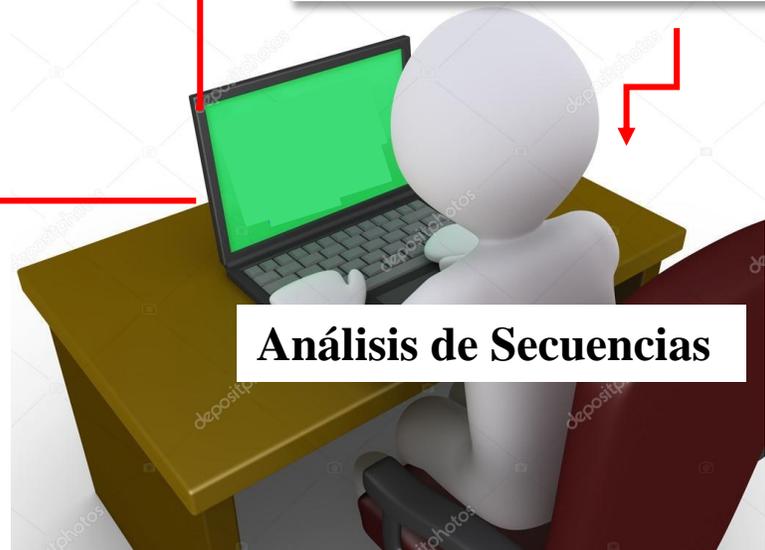
BLAST Rat Sequences.

Blast your sequence against rat-specific sequences

Enter an accession, gi, or a sequence in FASTA format:
NM_000477
"National Center for Biotechnology
Information"

Or, choose a file to upload
[Browse...]

GenBank



Análisis de Secuencias

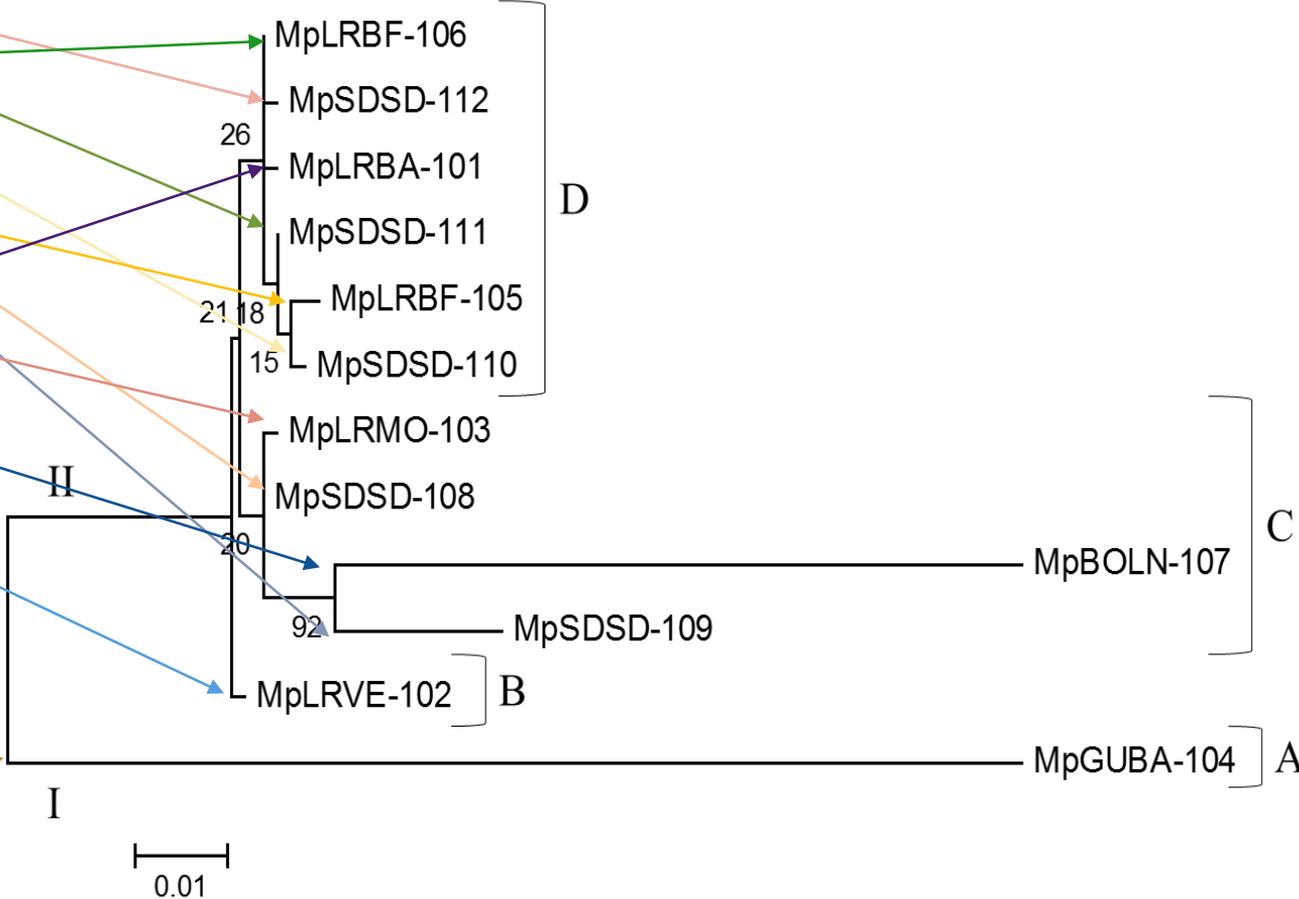
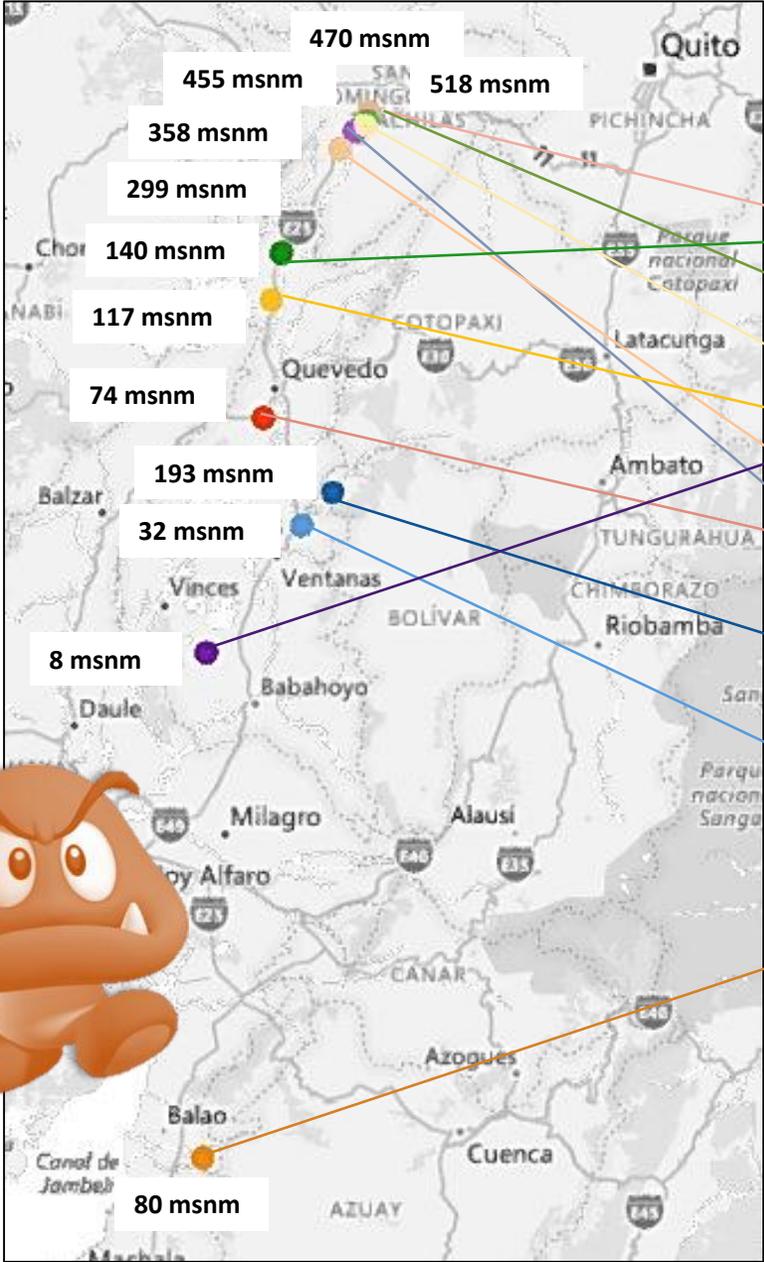
Identidad de los doce ecotipos de *M. perniciosa* a la Base de datos de NCBI de GenBank

Las secuencias evaluadas presentaron alta similitud con *M. perniciosa* y se comprobó biodiversidad en los ecotipos.

#	Fuente	Origen de los aislados a los cultivares	Identidad a la Base de datos de NCBI de GenBank.				
			Organismo	Cepa	Query coverage	Identidad	Número de Acceso
1	MpLRBA-101	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Cibe-MP-GT10A	88%	98%	EU047935.1
2	MpLRVE-102	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	MCA2520	94%	99%	AY916743.1
3	MpLRMO-103	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	TCP3-2	93%	99%	GQ919139.1
4	MpGUBA-104	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Cibe-MP-G-Balao2C	80%	97%	KX913250.1
5	MpLRBF-105	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	MCA2520	89%	99%	AY916743.1
6	MpLRBF-106	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	31	87%	100%	GQ919120.1
7	MpBOLN-107	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	MCA2520	78%	97%	AY916743.1
8	MpSDSD-108	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	MCA2520	85%	99%	AY916743.1
9	MpSDSD-109	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	MCA2520	81%	97%	AY916743.1
10	MpSDSD-110	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	TCP90	86%	99%	GQ919142.1
11	MpSDSD-111	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	4	84%	100%	GQ919116.1
12	MpSDSD-112	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	TCP3-2	88%	99%	GQ919139.1

Espaciador Interno Transcrito 1, secuencia parcial; Gen de ARN ribosómico 5.8S, secuencia completa; y espaciador interno transcrito 2, secuencia parcial.

Relación filogenético de aislados de *M. pernicioso* basadas en la región ITS



La distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap de (1000).

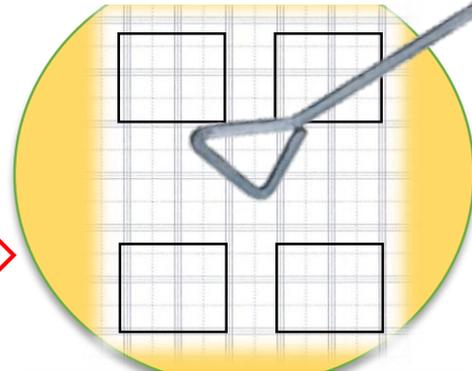


Efecto antagonista en condiciones *in vitro* por la aplicación de metabolitos secundarios de PGPR hacia *M. pernicioso*

50 mL de King B líquido a 150 rpm por 48 h

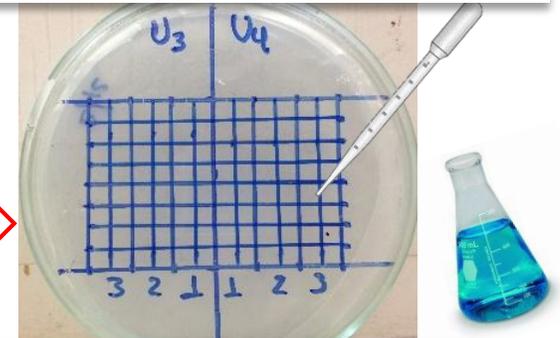


Sobrenadantes al 15 %



200 µL del sobrenadante

20 µL de solución con esporas



100,000 basidiosporas/ml.

- 15 min a 90°C
- 15 min a -40°C

Variables Dependientes

- Germinación
- Longitud (µm) del tubo germinal

Cepas Control

- *Bacillus subtilis* ATCC 55405
- *P. protegens* CHA0
- *P. veronii* R4

Cepas Nativas

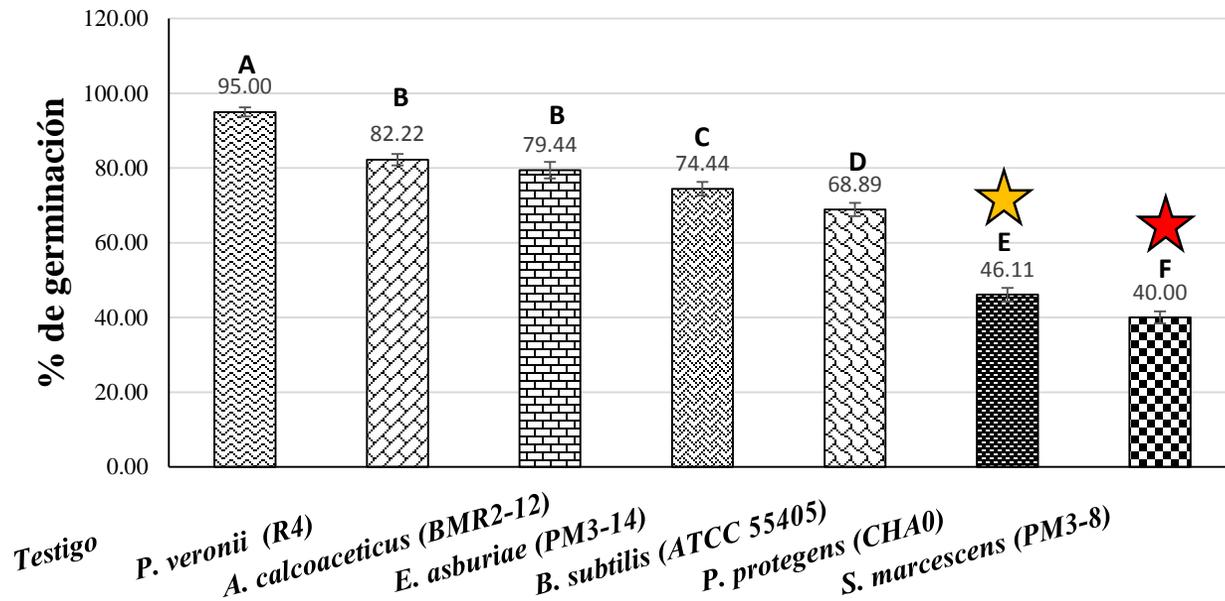
- *Enterobacter asburiae* PM3-14
- *Serratia marcescens* PM3-8
- *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12

Basidiosporas

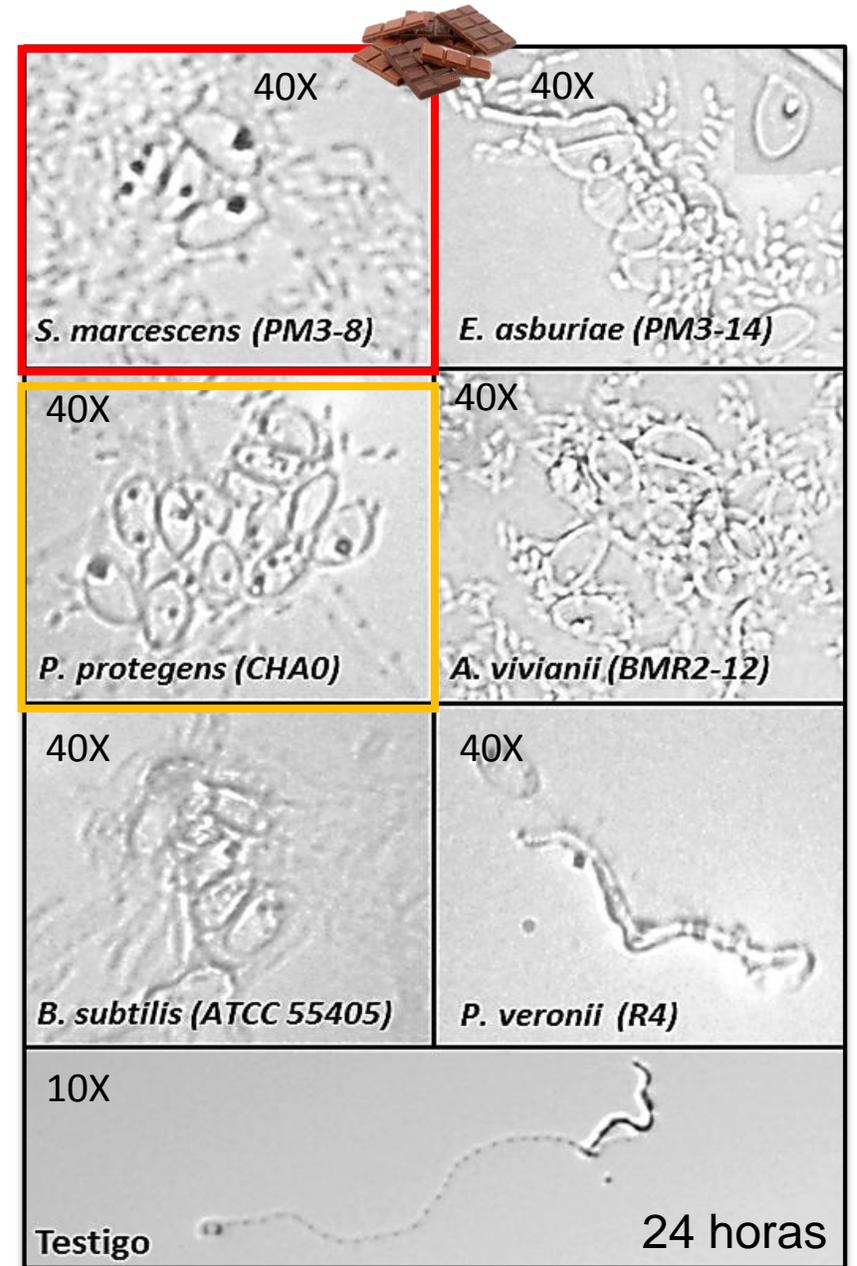


Programa ISCapture Professional Imaging

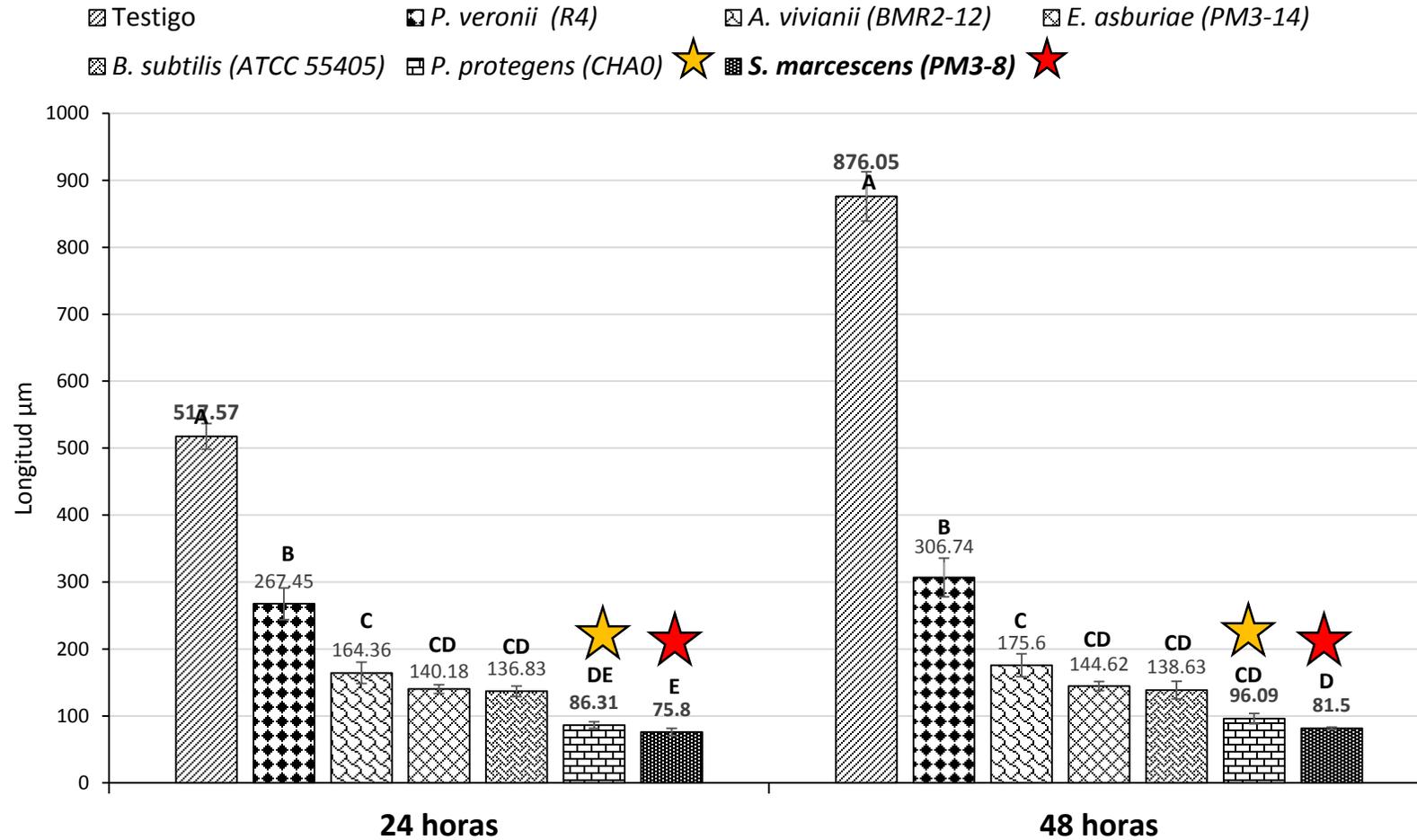
Efecto antagonista de las PGPR en la germinación de basidiosporas



Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).



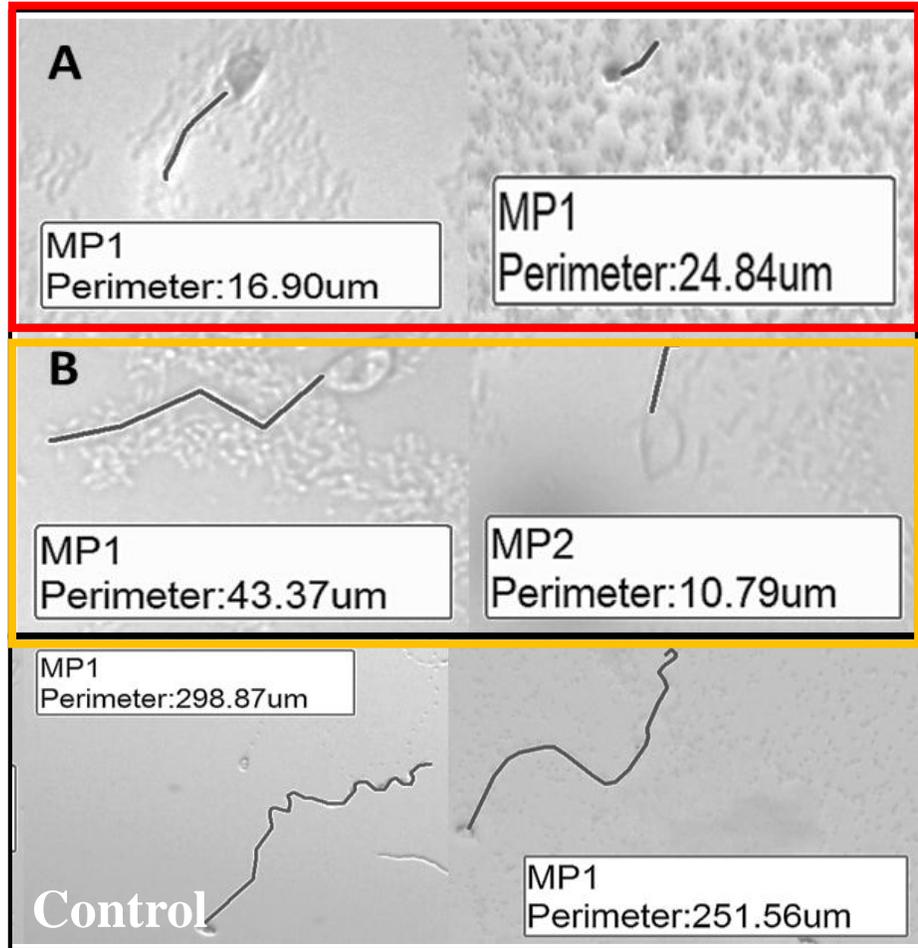
Efecto de los sobrenadantes de las PGPR en el tubo germinal de las basidiosporas



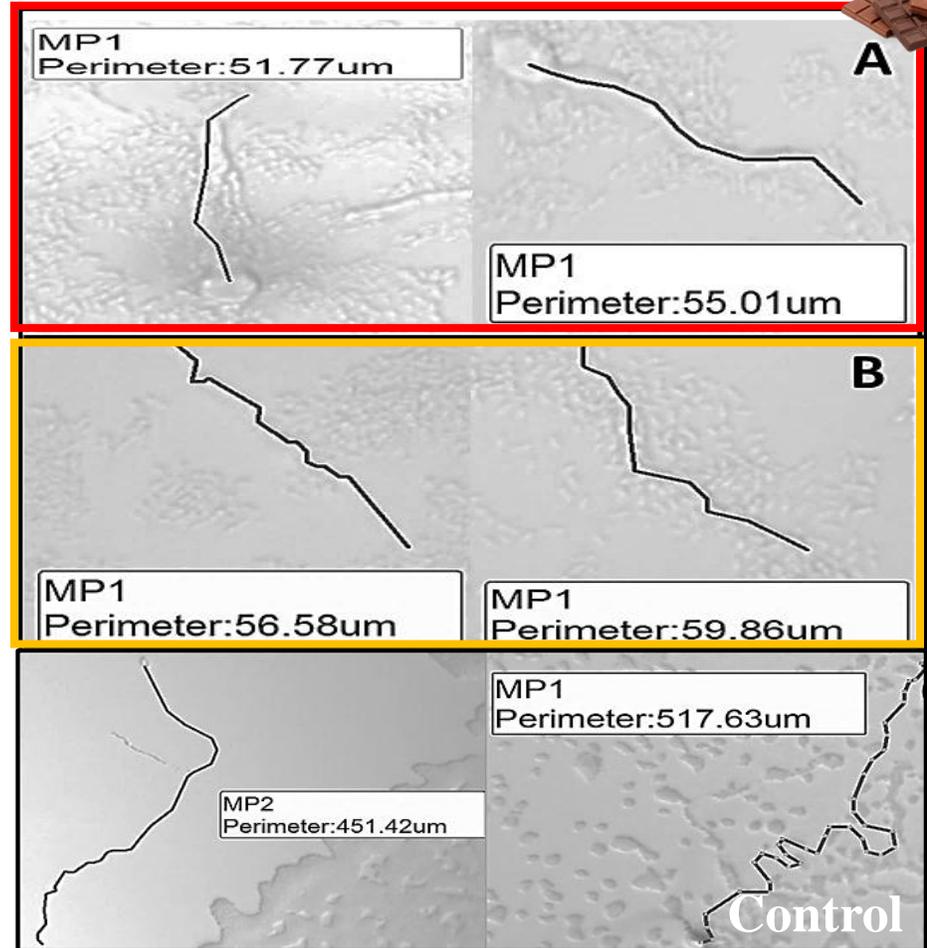
Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test de Tukey ($p > 0,05$).

★ (A) *Serratia marcescens* PM3-8

★ (B) *Pseudomona protegens* CHA0



24 horas



48 horas

Producen quitinasas y glucanasa, que al unirse a la pared celular de los hongos, degradan la quitina y el glucano (Compant *et al.* 2005), reduciendo así, el crecimiento y la germinación de esporas, degradando el tubo germinal (Castro S. *et al.* 2007)



Gracias a
todos
Por su atención

BASTA DE AGROTÓXICOS



EN NUESTRAS MESAS

Paren de fumigar las frutas, verduras y hortalizas
Los agrotóxicos son venenos, contaminan y matan

NATURALEZA DE DERECHOS
PARA NUESTRAS GENERACIONES FUTURAS

