



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



TEMA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“BIODIVERSIDAD DE ECOTIPOS DE *Moniliophthora roreri* en CACAO (*Theobroma cacao*) CLON CCN-51 Y LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE PGPR”

Autor: Ricardo Fernando Romero Meza

Cacao (*Theobroma cacao*)



Chocolate



Manteca, Pasta de Cacao

El cacao es un árbol originario de las selvas de América Central y del Sur, antes de su expansión y exportación mundial.

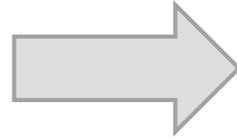
Sus frutos son de forma alargada y pueden ser hasta de 1kg
20 a 40 semillas

Demanda Global 4.2 millones de toneladas para el año

El Cacao en el Ecuador



“El Gran Cacao”
Vinces 1830
Hacienda de Cacao
Esperanza



500 mil Há (SINAGAP)



Cultivo tropical,
sembrado
Mayoritariamente en el
Litoral y Oriente del
Ecuador (260 mil
toneladas métricas)



Fino de Aroma

63% del mercado
mundial en el 2012



CCN-51
Alto rendimiento



Cacao CCN-51

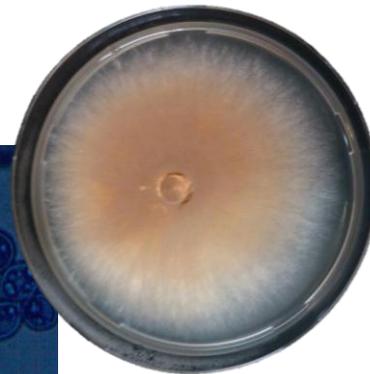
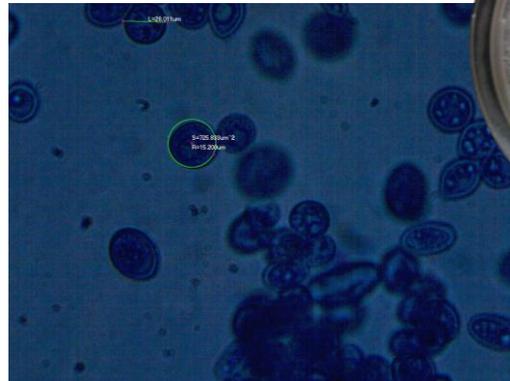
CCN-51 Colección Castro Naranjal



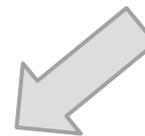
Cultivo con alta productividad
(40qq por Há)



Moniliophthora roreri
(*Monilla* o *Moniliasis*)



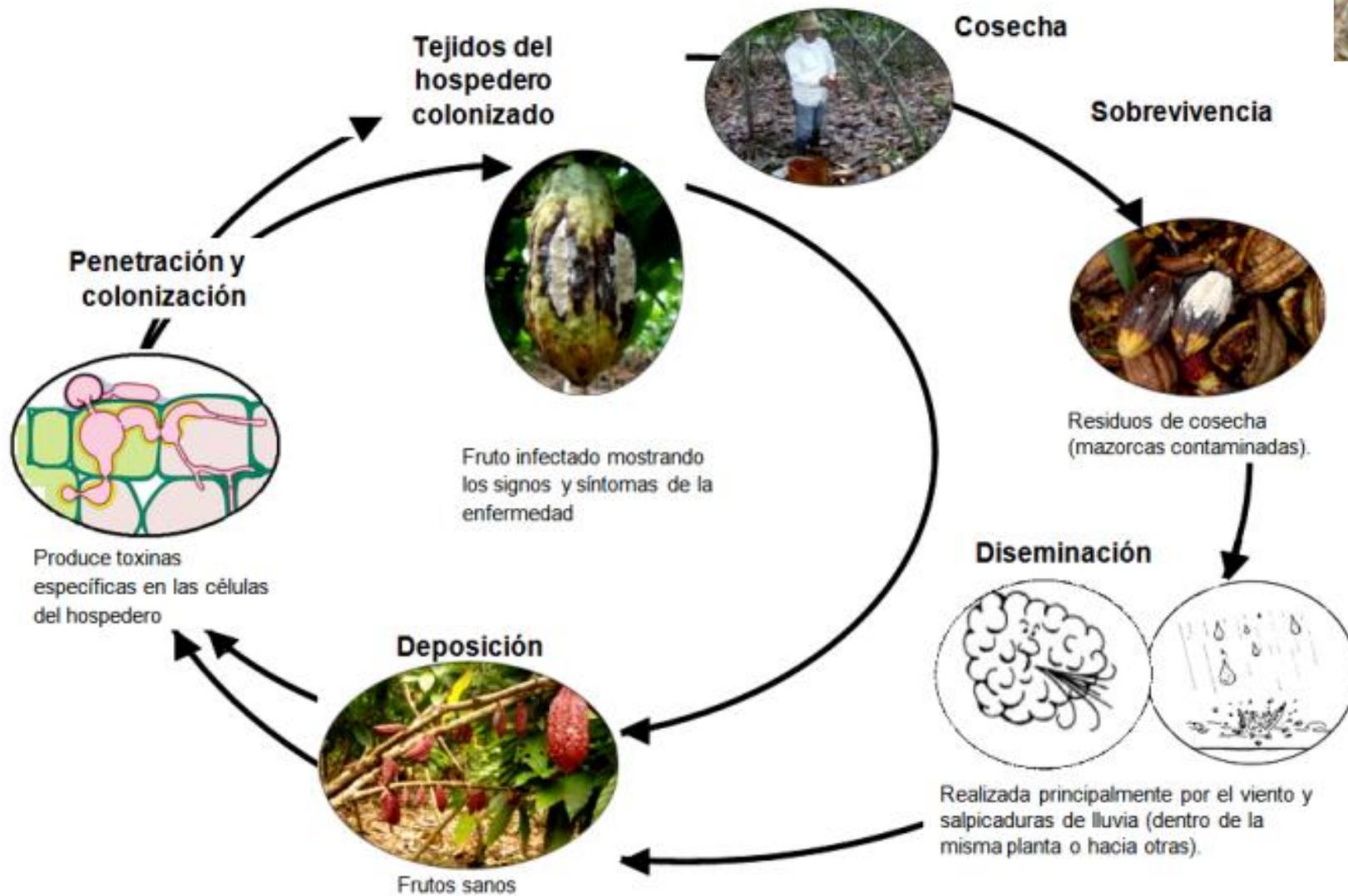
25% el daño total en la
producción



(1917) J.B Rorer

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans *et al.* en el cultivo de cacao



Sintomatología



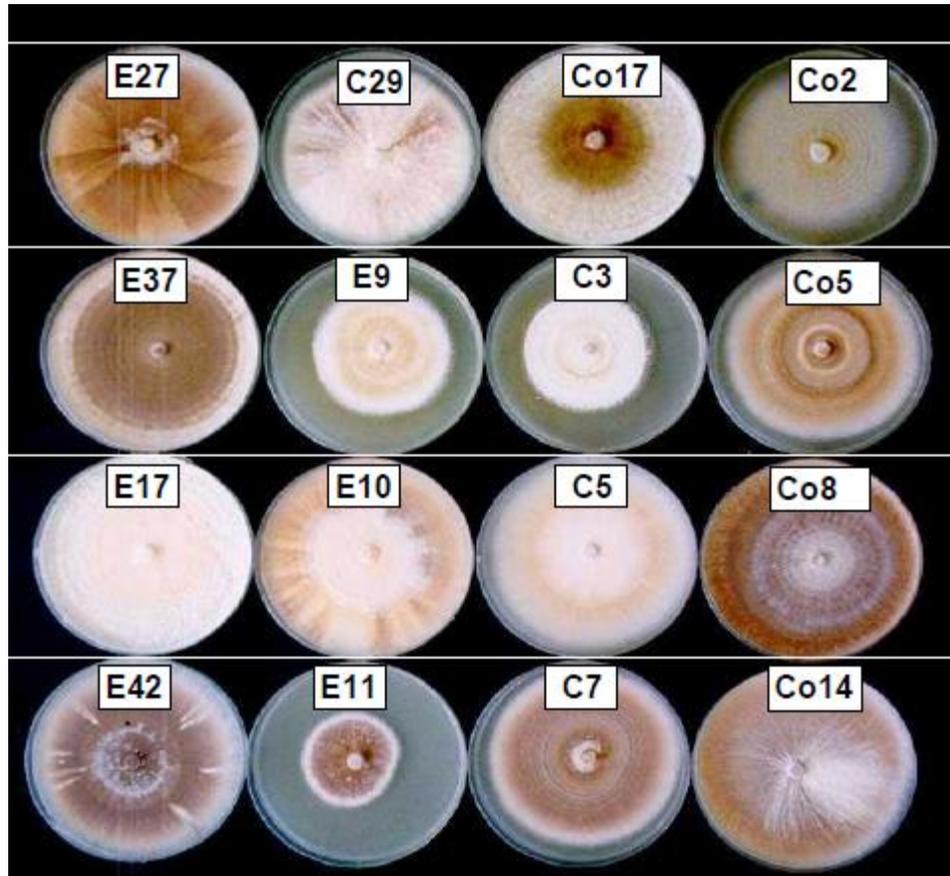
Aspecto Microscópico



Aspecto Macroscópico

Variabilidad Genética del Hongo *M. roreri*

Morfológico



Diferencia de color, halos, textura y crecimiento micelial (Phillips Mora 2002)

Molecular

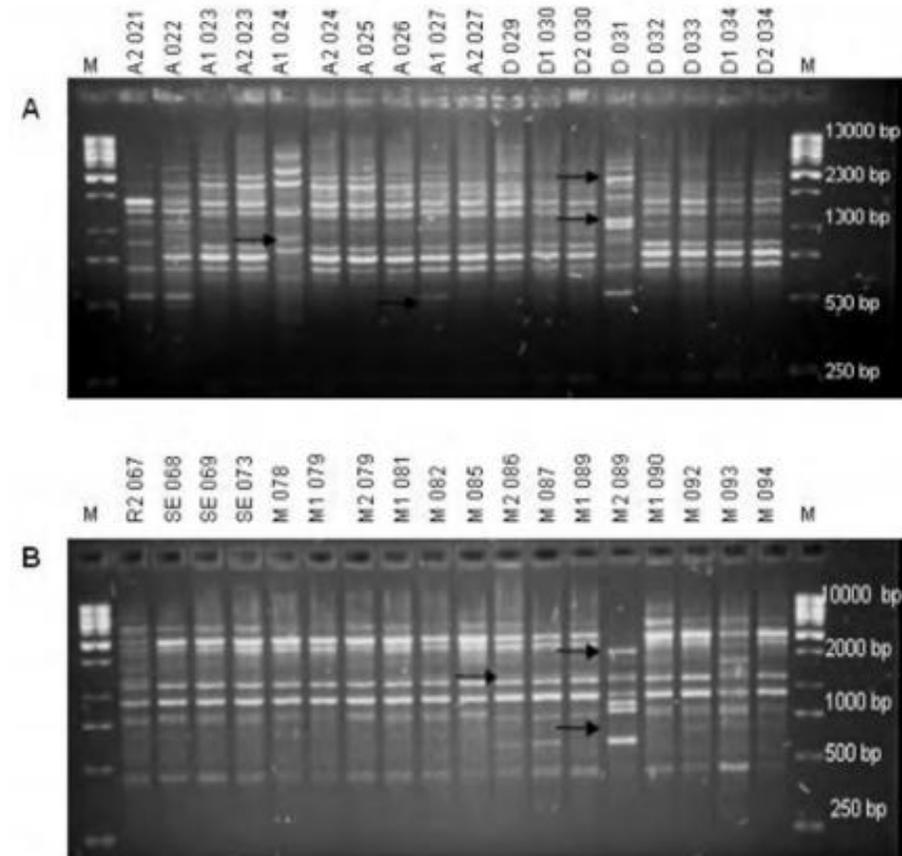


Figura 2. Patrones de bandas generados por los marcadores tipo RAPD a partir del ADN de 18 aislamientos. A. Oligo 8. B. Oligo 10. Líneas 1 y 20. M: marcador de peso molecular, Líneas 2 a 19 código de identificación de cada aislamiento, flechas: bandas polimórficas entre los aislamientos.

Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD. Grisales (2007)

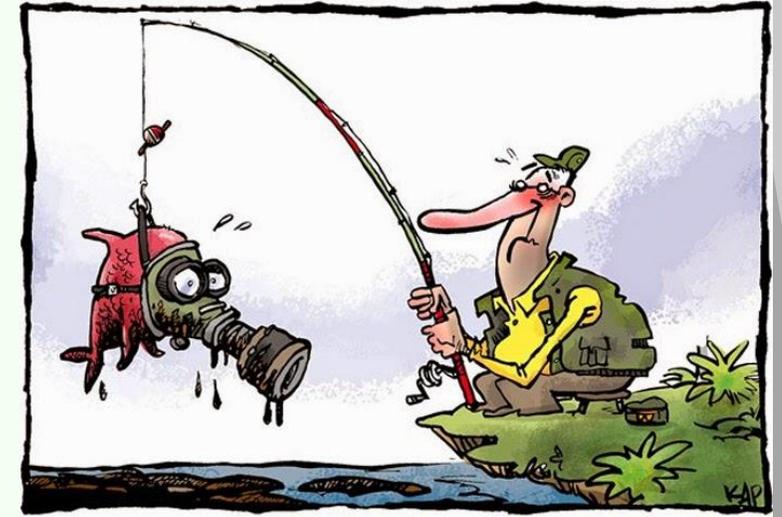
Medidas de control de *Moniliophthora roreri*

Químico



Productos a base de Cu

Contaminación - Resistencia



Gran Impacto Ambiental



Desequilibrio Natural

Medidas de control de *Moniliophthora roreri*

Biológico

Dos Hongos Antagónicos (*Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*)

G. Verde Bedoya, E. Sánchez

Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas.

Chemical and cultural control of moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) in cacao (*Theobroma cacao* L) in Barinas state

L. Sánchez F.¹, E. Gamboa² y J. Rincón²

Cultural



Altos costos de mano de obra

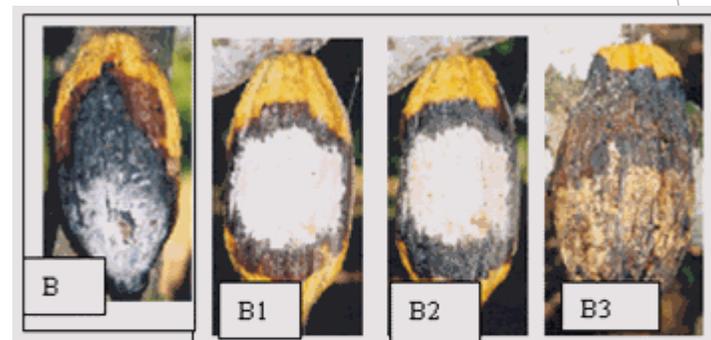


Figura 02. B: *T. harzianum* (Tha) parasitando a *M. roreri*. B: B1 inicio de la reducción del área de esporulación. B 2: 7 días después de haber iniciado la reducción del área. B 3: Área de esporulación completamente reducida y muerto el patógeno. Pucallpa, Perú, 2005.



Trichoderma harzianum

No contamina - No hay resistencia - Bajos costos

Utilización de las PGPR como alternativa de control biológico y descontaminación de los suelos

Promotoras del Crecimiento de las Plantas

Fitohormonas:

- Citoquininas
- Giberelinas
- ACC deaminasa
- AIA

} Promotoras del Crecimiento, Protegen a la planta a factores de estrés y patógenos.

- Actividad Fijadora de N
- Actividad Antifúngica
- Antioxidante

- Degradación de Metales Pesados
- Solubilización de Nutrientes (P, Zn, K)



Biocontroladores

Producción de Sideróforos

- Mejoran la absorción de Fe
- Impiden el crecimiento de patógenos (Shen y cols; 2013)

Quitinasa y Glucanasa

- Capacidad degradadora de pared celular de organismos patógenos fúngicos (Kobayashi et al; 2002)
- Proteasa y Celulasa

Antibióticos

- Pioluteorina, pirrolnitrina, fenazina, 2,4 DAPG)

PGPR

HCN

ISR

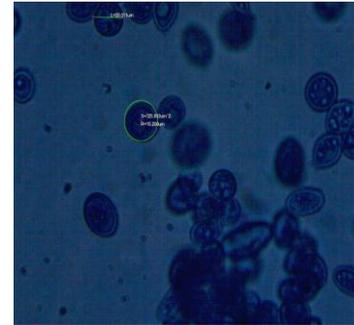
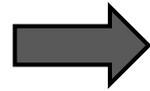
SAR

Caracterización Morfológica

2. Establecer y caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. roreri*.



M. roreri aislada pura



Caracterización Morfológica del hongo *M. roreri*



- Crecimiento micelial
- Actividad Metabólica
- Numero de esporas
- Tamaño de Esporas

Caracterización Morfológica

Cepa	Altura	# de Esporas	Crecimiento	Actividad M	Tamaño de esporas	Temperatura	Humedad	Borde	Textura	Color
RZ-a	19	37968750,00	29,11	2,65	63,95	27	61	2	2	4
RCU-b	63	38243750,00	32,89	2,7	76,87	29	61	2	2	6
RLC-c	84	33312500,00	27,50	2,85	73,10	29	82	2	2	5
RB-a	98	5456250,00	23,33	2,3	81,26	30	60	2	2	6
MLC-b	138	80625000,00	35,11	3,15	70,32	30	56	2	2	5
BLM-c	210	41625000,00	32,11	2,7	75,58	24	78	2	2	6
CPM-a	265	36706250,00	32,56	2,625	73,74	19	85	2	2	6
SLA-b	304	26937500,00	31,89	2,6	63,36	21	78	2	2	5
Sk23-c	326	34343750,00	25,78	2,5	61,28	22	75	2	2	6
Sk30-a	376	26656250,00	27,67	2,65	72,22	22	81	2	2	6
SLS-b	403	54625000,00	27,11	2,4	73,15	21	90	2	2	6
SD-c	518	29125000,00	32,94	2,65	77,02	20	88	2	2	5

Biplot (ejes D1 y D2: 59,10 %) tras rotación Varimax

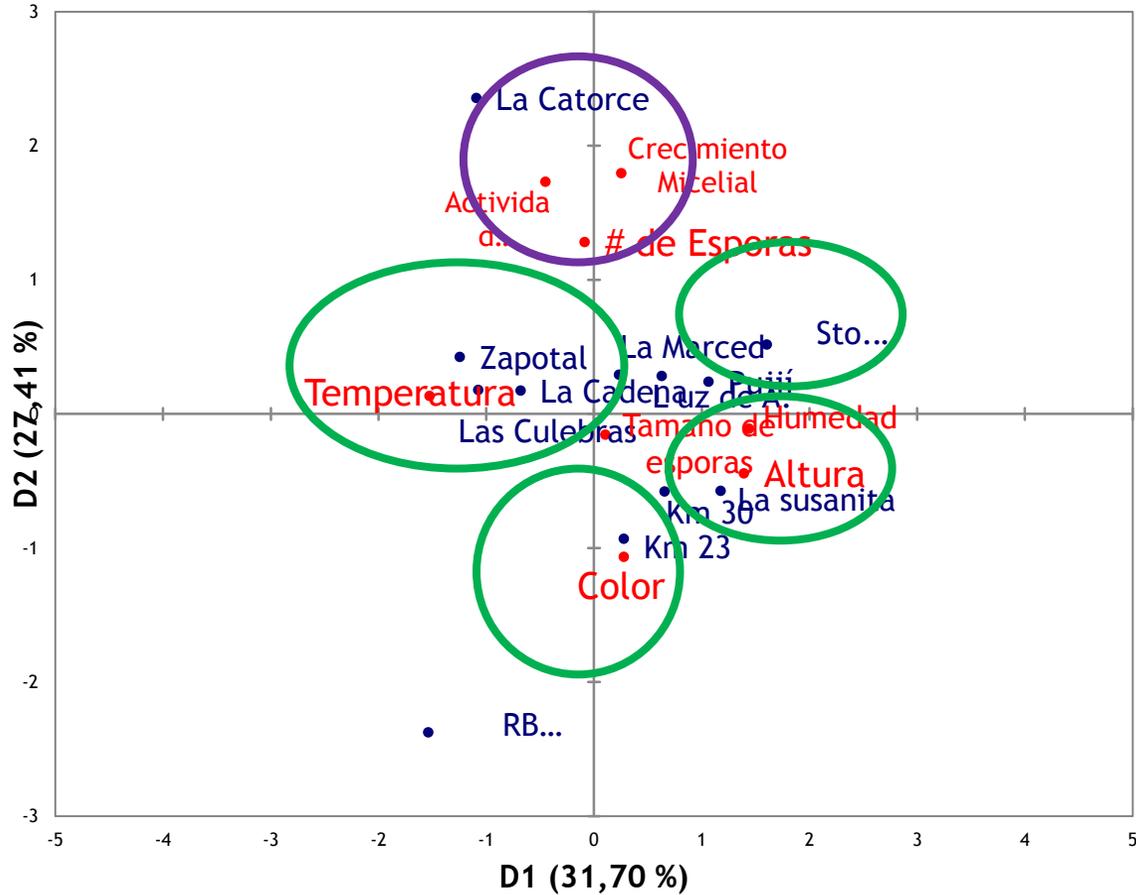


Figura 6. Análisis de componentes principales. Biplot obtenido del análisis de componentes principales para la caracterización morfológica y características agroclimáticas.

Presencia del Patógeno
(*Moniliophthora roreri*)

- Condiciones Favorables**
- Temperatura 32 °C
 - Humedad relativa 56 %
 - Altitud 138 msnm

Hospedero
Cacao CCN-51 (*Theobroma cacao*)

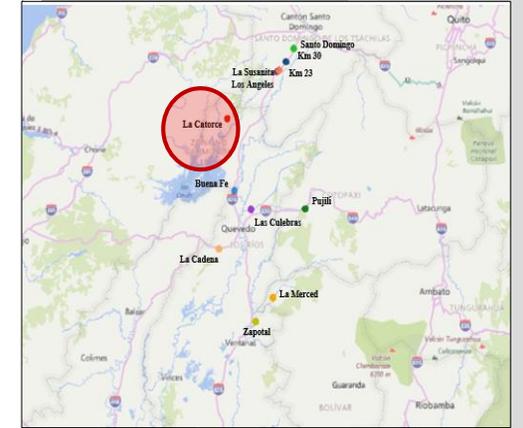
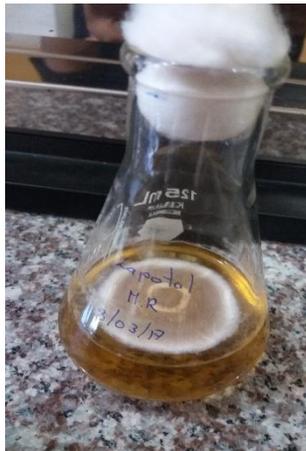
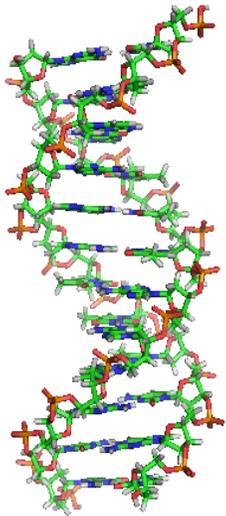


Figura 7. Triángulo de la enfermedad del hongo *M. roreri* proveniente de “La Catorce”

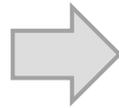
Caracterización Molecular

2. Establecer y caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. roleri*.

Extracción de ADN genómico



Medio Sabouraud líquido



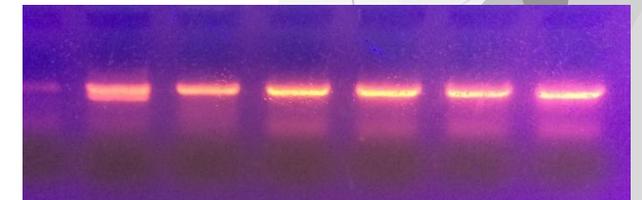
DNeasy Plant
Mini Kit
QIAGEN



Electroforesis



Gel de Agarosa 2%

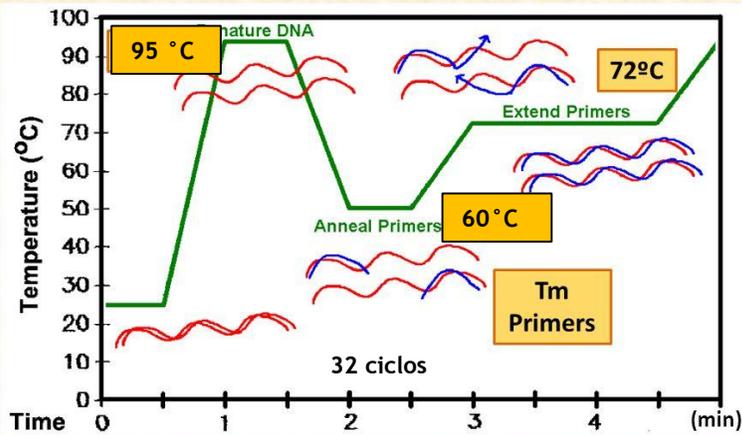


ADN genómico de
M. roleri

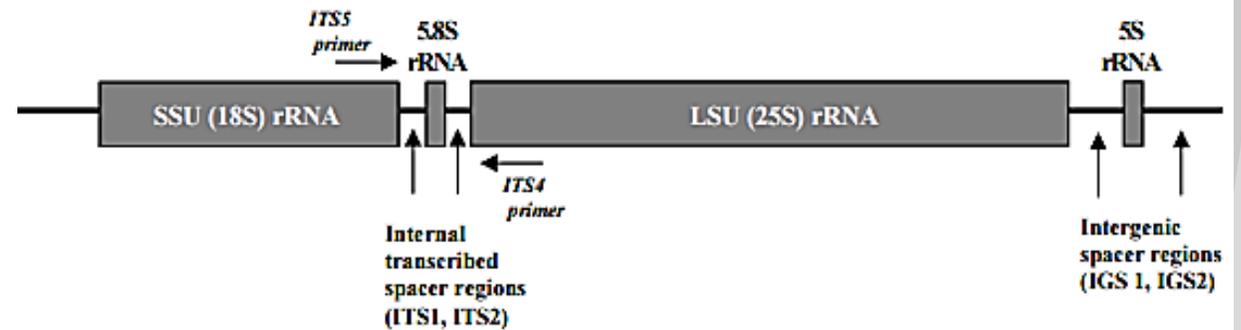
Metodología para efectuar la Investigación

2. Establecer y caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. royeri*.

■ Etapas de un ciclo de PCR.



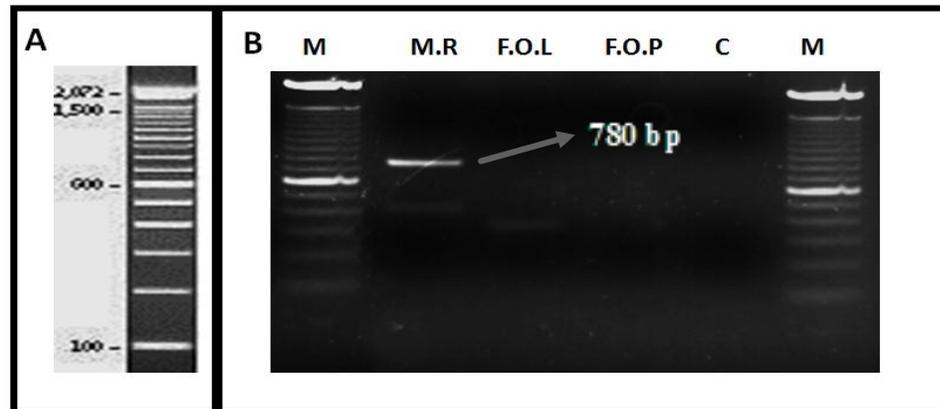
Mix PCR



ITS 4; ITS 5
600-750Bp

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')
(White, Bruns, & Taylor, 1990)

Identificación molecular mediante ITS (Espacios de transcripto interno).



Identificación de *Moniliophthora royeri* mediante PCR (Guato 2017)

Identificación molecular del hongo *Moniliophthora roreri* mediante ITS (Espacios de transcripto interno).

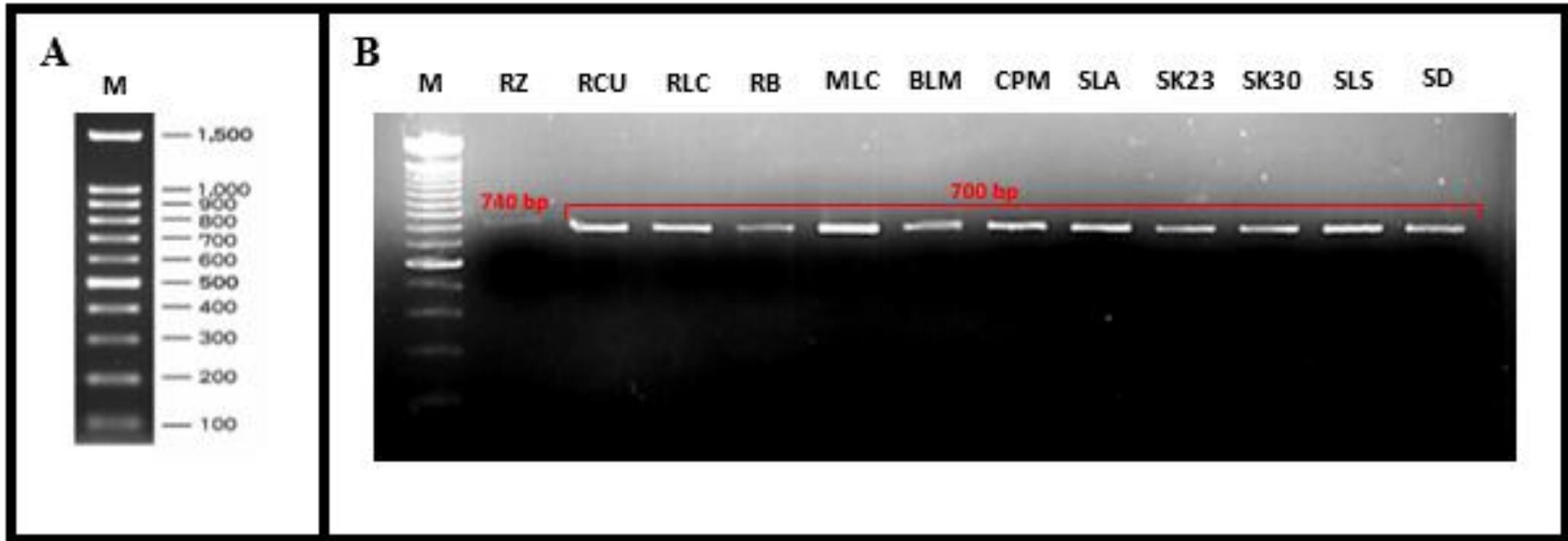
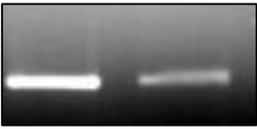


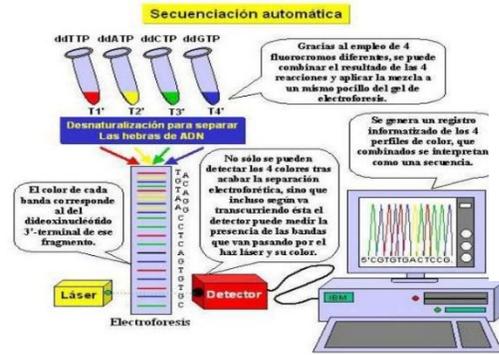
Figura 9. Identificación de Molecular de *Moniliophthora roreri* mediante PCR. A, Ladder 100pb. B, Identificación de Molecular de *Moniliophthora roreri*; Carril M, Marcador de peso molecular; **RZ** (Zapotal); **RCU** (Las Culebras); **RLC** (La Cadena); **RB** (Buena Fe); **MLC** (La Catorce); **BLM** (La Merced); **CPM** (Pujilí); **SLA** (Luz de América); **SK23** (Kilómetro 23); **K30** (Kilómetro 30); **SLS** (La Susanita); **SD** (Sto. Domingo).

Metodología para efectuar la Investigación

2. Establecer y caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. roreri*.

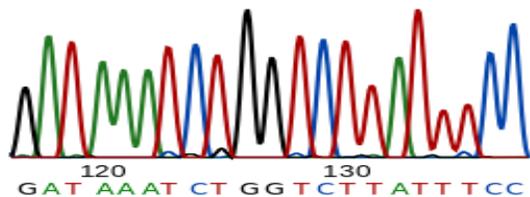


Purificación de Bandas
Kit Purelink gel clean



Corea del Sur

Secuenciación de los fragmentos ITS



Secuencias de los fragmentos de ADN de *M.roreri*



Base de Datos

Basic Local Alignment Search Tool (Blast)

Identidad a la Base de datos de NCBI en GenBank				
Código	Organismo	Cepa	Identidad	Número de Acceso
RZ	<i>Moniliophthora roreri</i>	57_1N24	83%	KY859404.1
RCU	<i>Moniliophthora roreri</i>	Mg_florum	99%	EU047937.1
RLC	<i>Moniliophthora roreri</i>	Mg_florum	99%	EU047937.2
RB	<i>Moniliophthora roreri</i>	HT-ITV20	96%	JN241966.1
MLC	<i>Moniliophthora roreri</i>	magdiel	99%	GU108605.1
BLM	<i>Moniliophthora roreri</i>	E18	100%	JX315286.1
CPM	<i>Moniliophthora roreri</i>	HT-ITV20	93%	JN241966.1
SLA	<i>Moniliophthora roreri</i>	MRO1	92%	JF769489.1
Sk23	<i>Moniliophthora roreri</i>	C5	100%	JX315274.1
Sk30	<i>Moniliophthora roreri</i>	E18	100%	JX315286.1
SLS	<i>Moniliophthora roreri</i>	HT-ITV20	100%	JN241966.1
SD	<i>Moniliophthora roreri</i>	GU4	100%	GU457437.1

Agrupamiento de *M. roreri* para la determinación de diversidad de ecotipos (Secuenciación ITS)

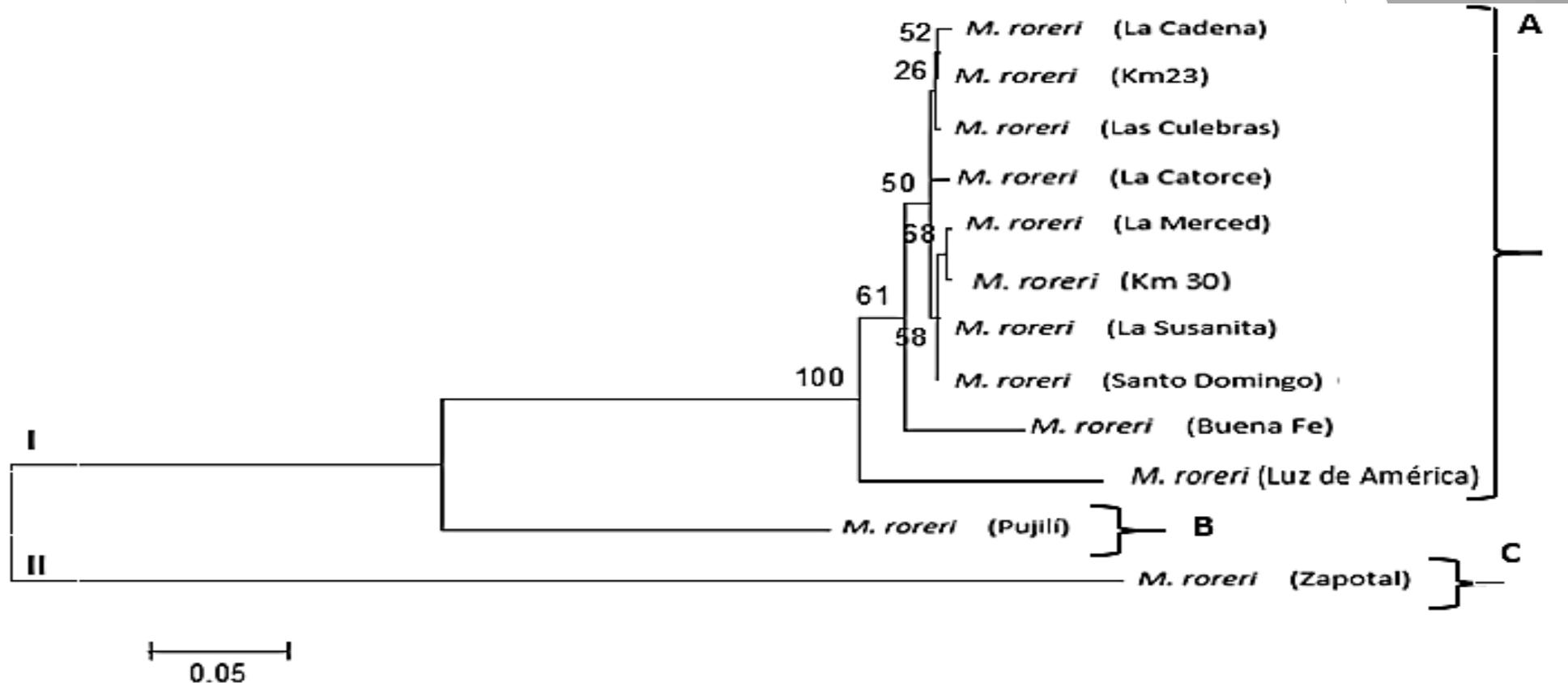
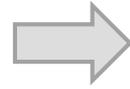
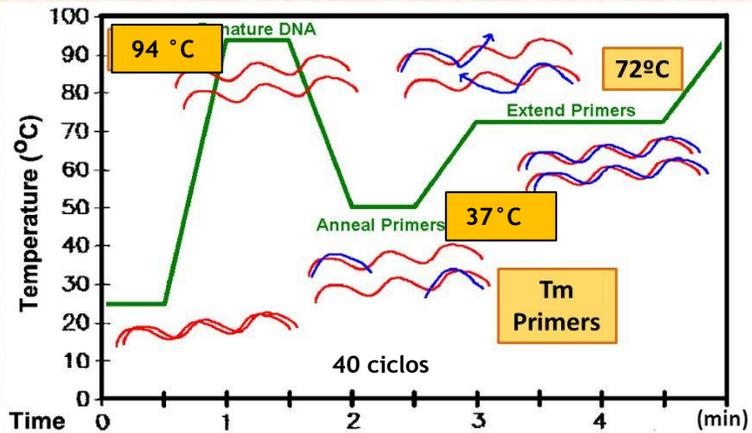


Figura 12. Árbol filogenético generado de los 12 aislados de *M. roreri*. Dendrograma basado en el análisis de la secuenciación de los ITS. Las distancias evolutivas se dedujeron empleando el método Kimura 2-parámetro.

Metodología para efectuar la Investigación

2. Establecer y caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. roreri*.

■ Etapas de un ciclo de PCR.



ERIC sequence

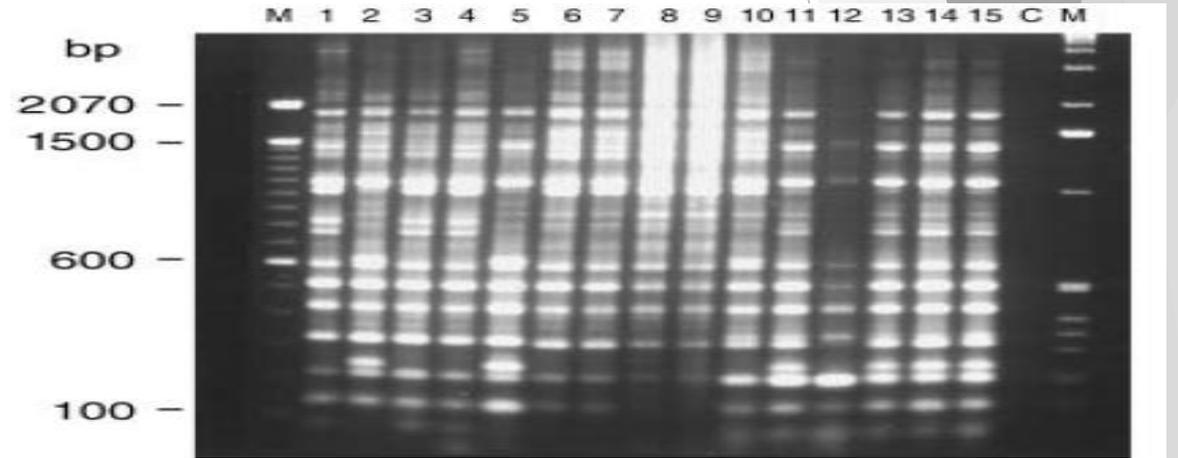
...GTGAATCCCCAGGAGCTTACATAAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG...



ERIC1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'); ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')
(Louws et al. 1994).

Transposones

Huella dactilar única para cada cepa



Comparison of *Crinipellis perniciosus* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting

M. C. C. de Arruda^{ab*†}, R. N. G. Miller^c, M. A. S. V. Ferreira^d and M. S. S. Felipe^a



Mix PCR

Caracterización molecular mediante marcadores ERIC – PCR

Caracterización molecular mediante marcadores ERIC – REP PCR

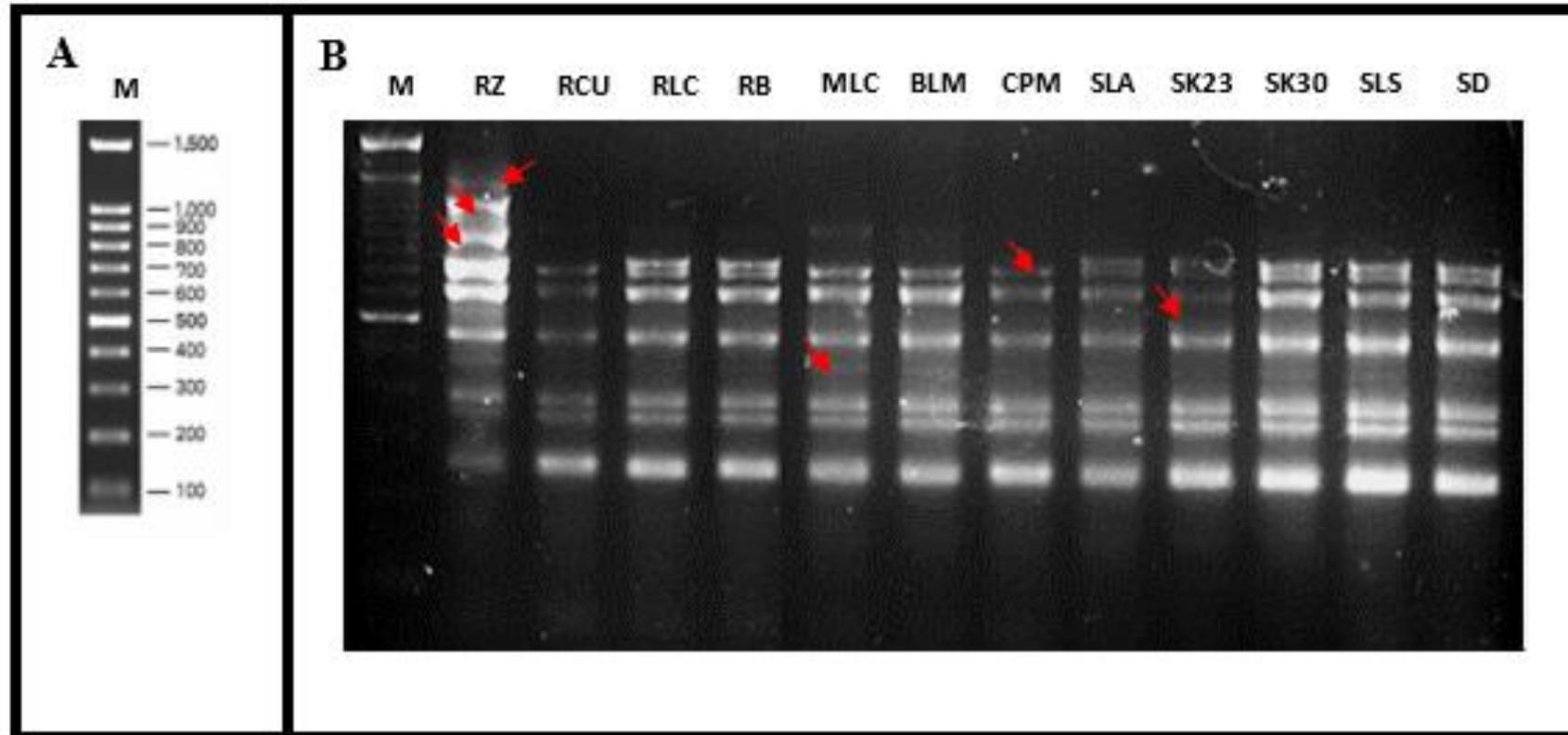
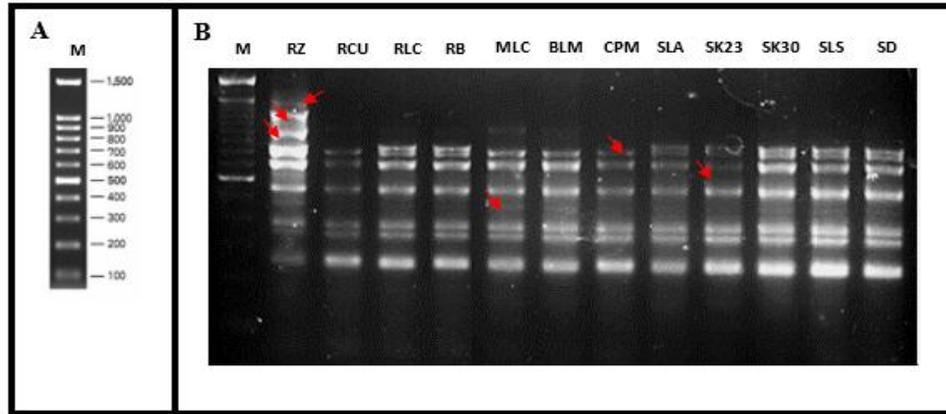


Figura 10. Caracterización molecular de *M. royeri* mediante ERIC-PCR. A, Ladder 100pb. B, Identificación de molecular de *M. royeri*; Carril M, Marcador de peso molecular; **RZ** (Zapotal); **RCU** (Las Culebras); **RLC** (La Cadena); **RB** (Buena Fe); **MLC** (La Catorce); **BLM** (La Merced); **CPM** (Pujilí); **SLA** (Luz de América); **SK23** (Kilometro 23); **K30** (Kilometro 30); **SLS** (La Susanita); **SD** (Sto. Domingo).

Metodología para efectuar la Investigación

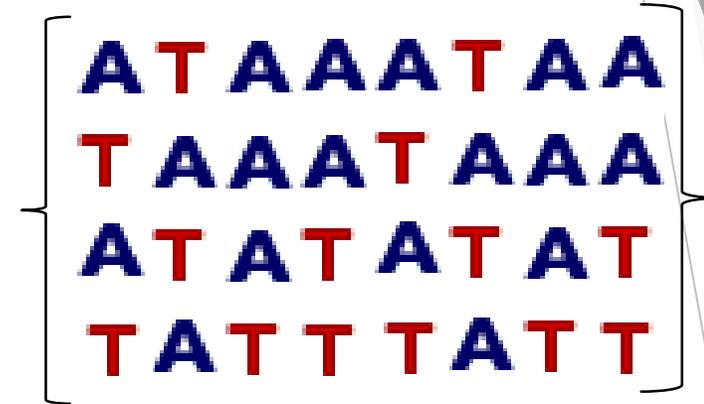
2. Establecer y caracterizar la diversidad a nivel morfológico y molecular de los diferentes ecotipos de *M. roreri*.



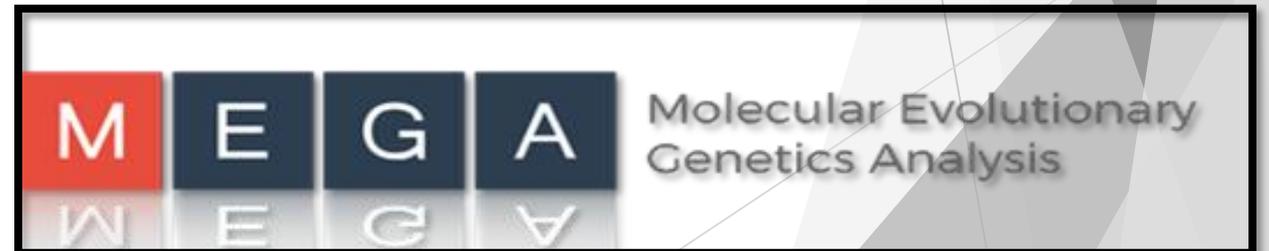
Comparación de los perfiles de amplificación

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Codificación binaria



Codificación binaria
Nucleotídica



Agrupamiento filogenético de *Moniliophthora roreri* para la determinación de la biodiversidad de ecotipos mediante ERIC-PCR.

Agrupamiento filogenético de *Moniliophthora roreri* para la determinación de la biodiversidad de ecotipos mediante ERIC-PCR.

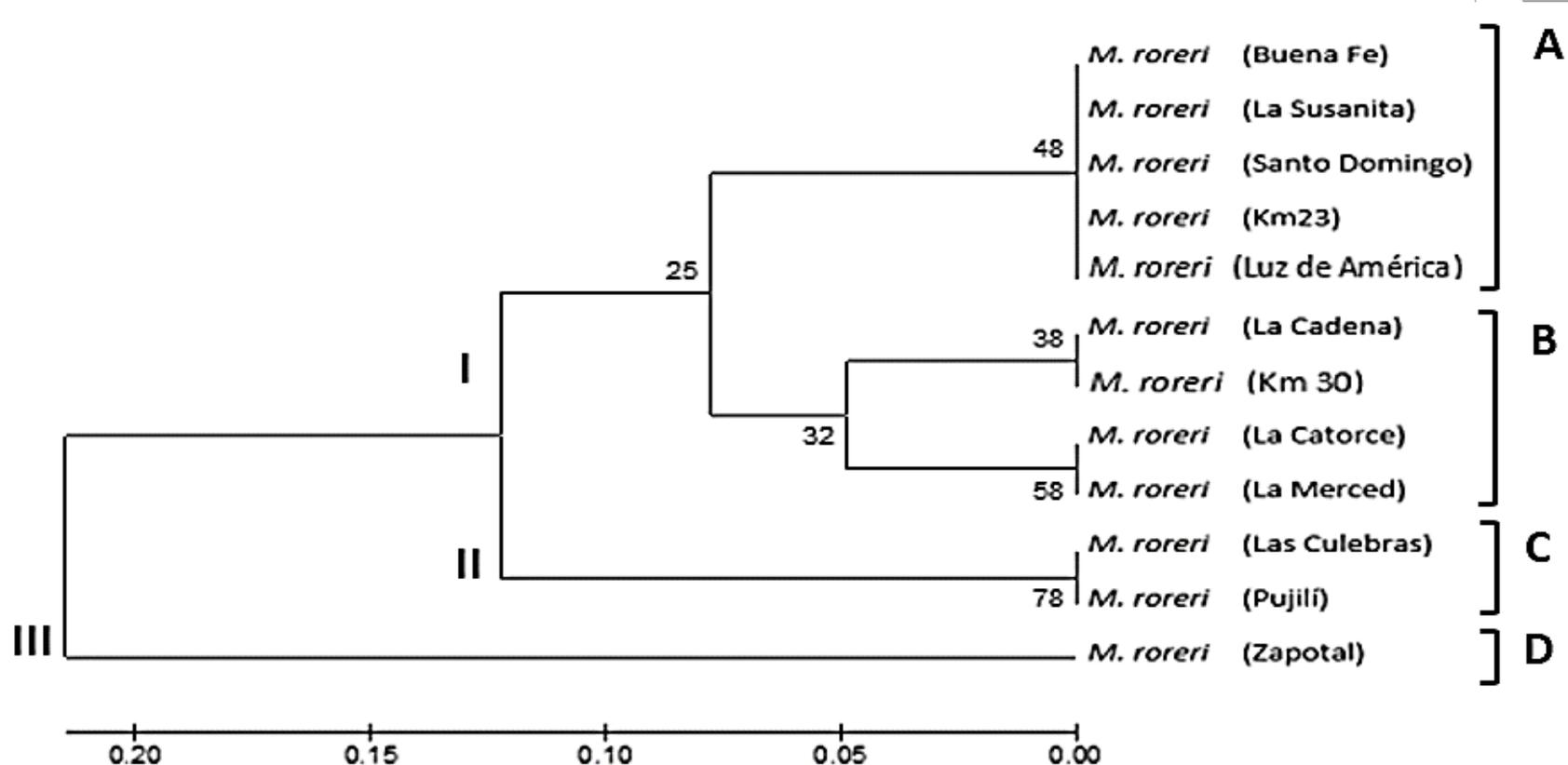


Figura 11. Árbol filogenético generado de los 12 aislados de *Moniliophthora roreri*. Dendrograma basado en el análisis ERIC-PCR. Las distancias evolutivas se dedujeron empleando el método Kimura 2-parámetro.

Actividad Antagonista de las PGPR hacia el control de *M. roreri*

3. Evaluar la actividad antagonista de las PGPR hacia la proliferación del hongo a nivel in-vitro

Nivel	Cepas	Fluorescente	Proteasa	HCN	Pirrolnitrina	Catalasa
	<i>A. viviani</i> BMR 2-12	+			+	+
	<i>S. marcescens</i> PM 3-8	++	+	+		+
	<i>E. asburiae</i> PM 3-14	++	+	+	+	+
	<i>P. protegens</i> , cepa CHA0	++		++		+
	<i>P. veronii</i> R4	++		+	+	+
	<i>B. subtilis</i> ATCC 55405					+

Cepas Bacterianas probadas en ensayos anteriores con un alto antagonismo hacia *M. roreri* (Guato 2017)



/ 15 min

CO

roreri

% de inhibición del crecimiento micelial

- Control
- B. subtilis*
- P. protegens* CHA0
- P. veronii* Re-4
- A. viviani* BMR 2/12
- S. marcescens* PM 3-8
- E. asburiae* PM 3-14

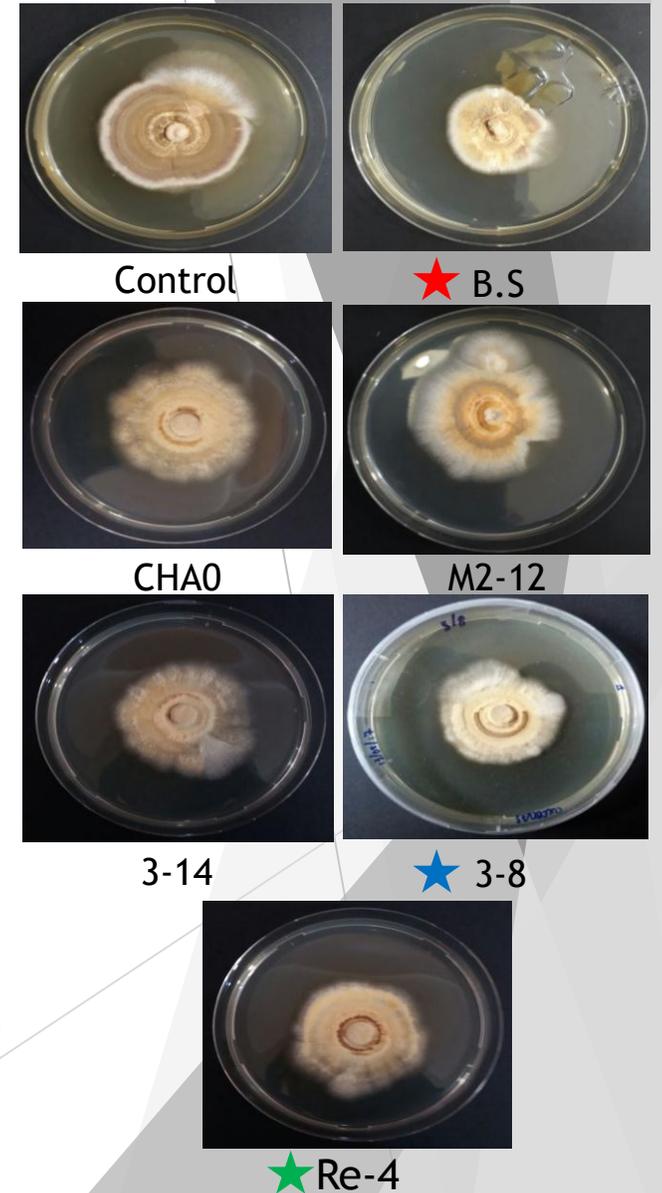
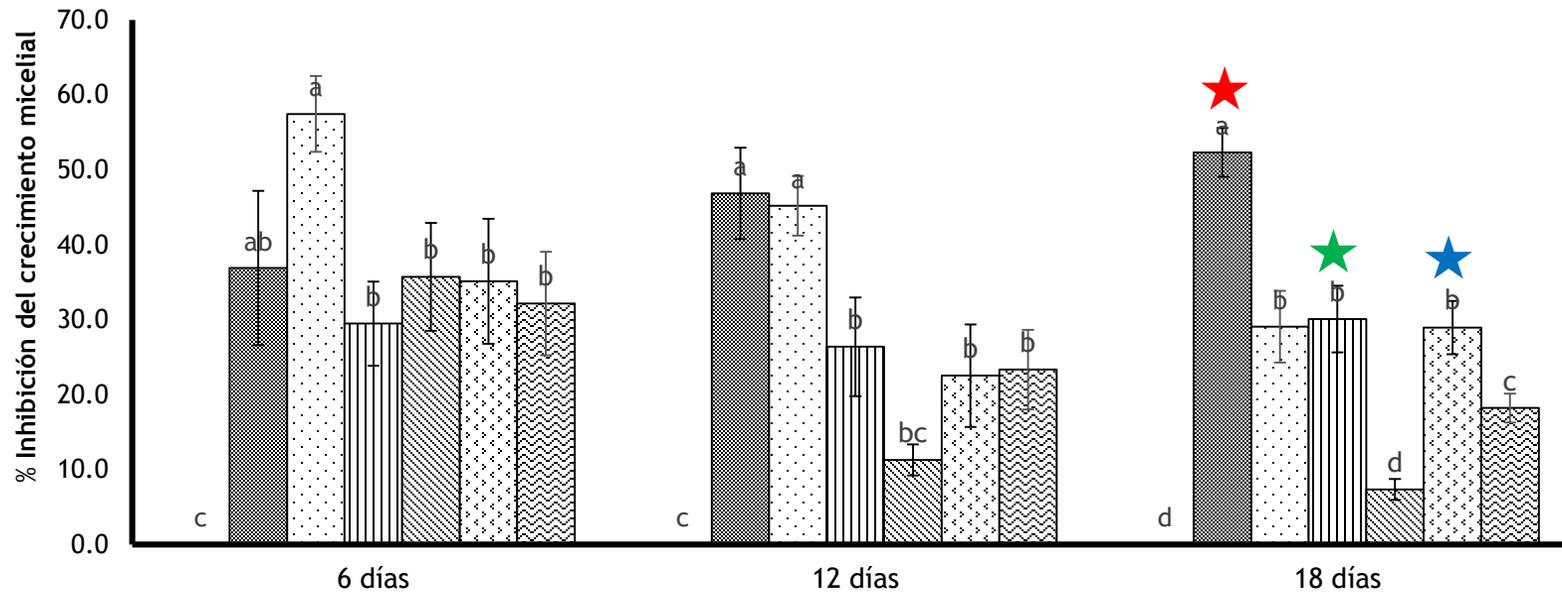


Figura 17. Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias al crecimiento micelial de *M. royeri*. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

Efecto antagónico del sobrenadante de las rizobacterias a la producción de esporas de *M. roreri*

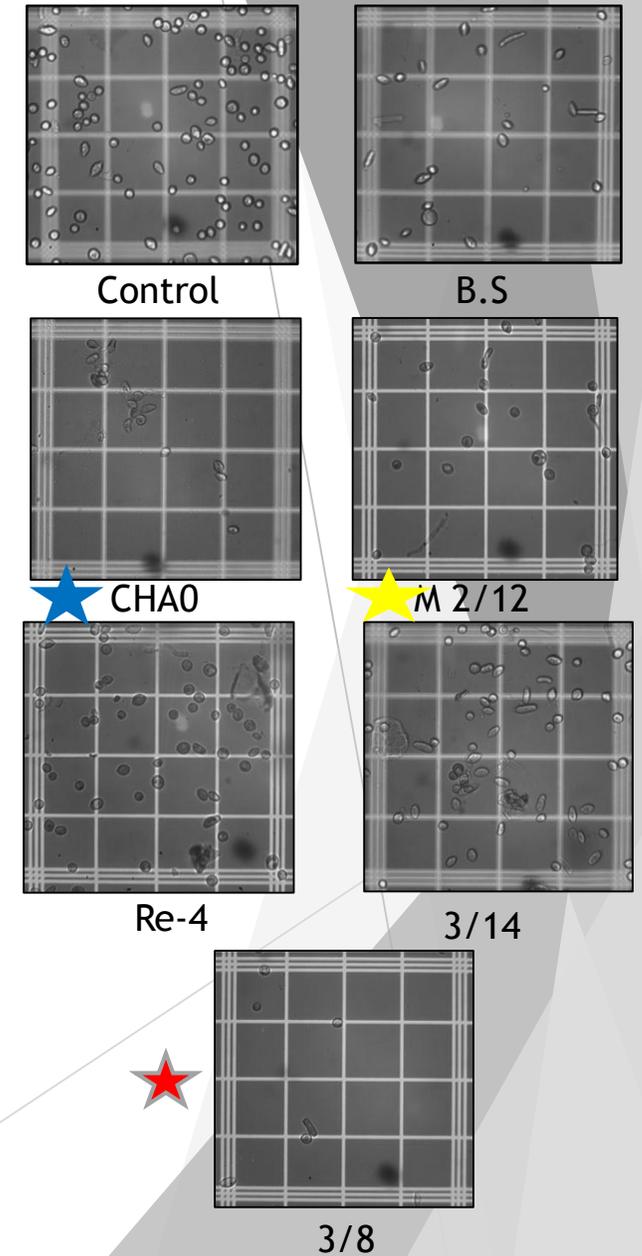
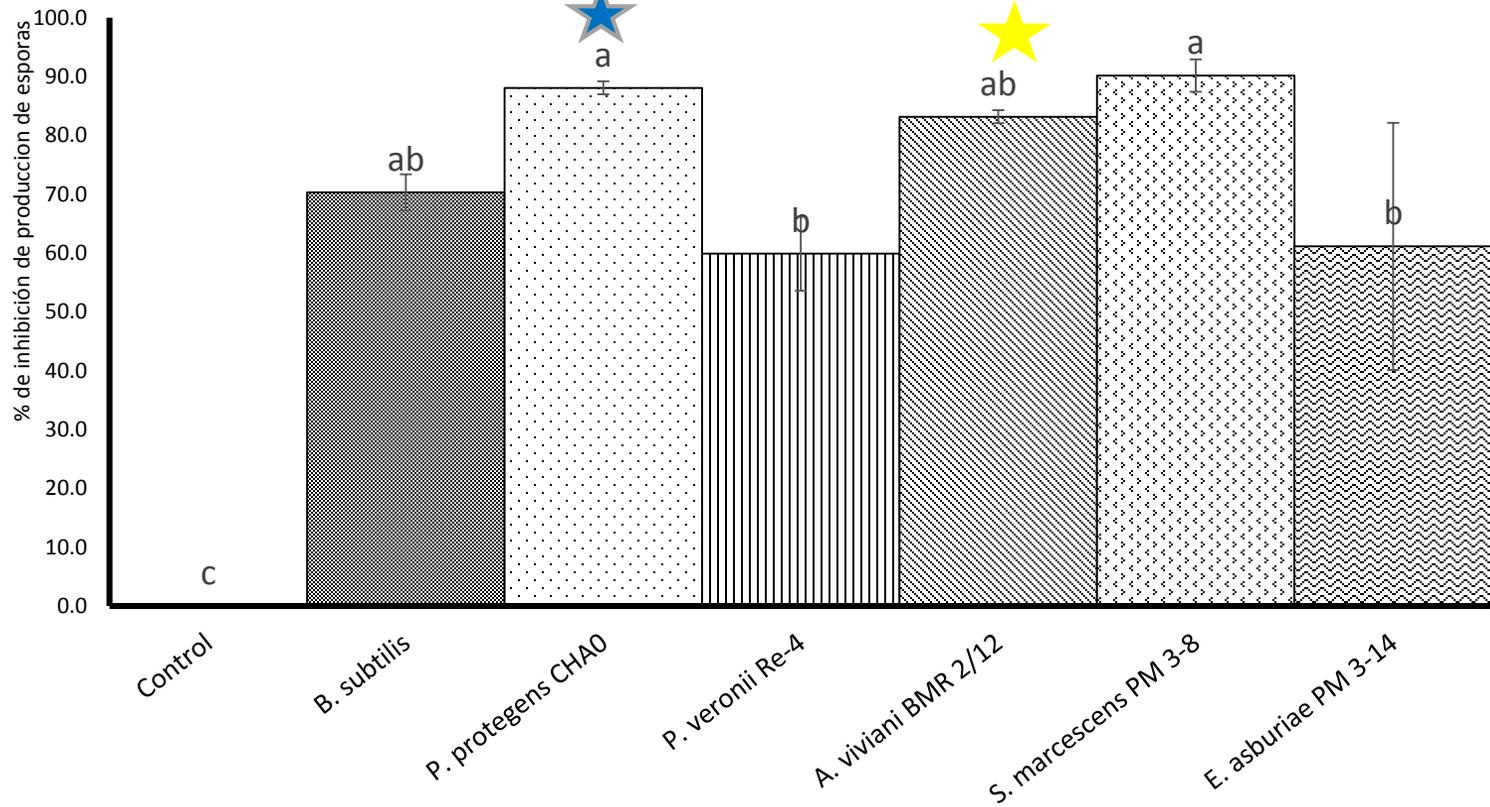


Figura 19. Efecto antagónico del sobrenadante a la producción de esporas de *M. roreri*. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

Biocontrolador amplia gama



Alimentos libres de
productos Químicos

***"La tierra no es una herencia de nuestros padres, sino
un préstamo de nuestros hijos"***

