

## Factores influyentes en la respuesta de *Schizolobium parahybum* (Vell) Blake a *Ceratocystis paradoxa* y *C. moniliformis*

Factors influencing in the response of *Schizolobium parahybum* (Vell) Blake to *Ceratocystis paradoxa* and *C. moniliformis*

Mora-Silva W<sup>1,3</sup>, FR Garcés-Fiallos<sup>1,2</sup>, C Suarez-Capello<sup>1,2</sup>, CE Belezaca-Pinargote<sup>1,3</sup>, P Cedeño-Loja<sup>1</sup>, E Vallejo<sup>3</sup>

**Resumen.** En la costa ecuatoriana una de las enfermedades más destructivas del pachaco es la marchitez vascular o pudrición del fuste provocada por el complejo *Ceratocystis*, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar los factores que inciden en la eficiencia de la reacción de corteza de árboles de pachaco a esta enfermedad. La presente investigación se realizó en condiciones de laboratorio, utilizando los árboles de pachaco S38, S41, S98, AE-1, AE-2 y AE-3, y las especies patogénicas *Ceratocystis paradoxa* y *C. moniliformis*. Se empleó el método de tejidos de corteza del fuste, con secciones de corteza de 4,5 cm<sup>2</sup>, y una suspensión de 3x10<sup>4</sup> unidades de infección/mL, permaneciendo en cámara húmeda durante 96 horas a 25 ± 5 °C. Se determinó los grados de resistencia/susceptibilidad mediante una escala de notas de 0 a 4, en función de la cantidad de micelio y peritecio en cada muestra vegetal. Se utilizaron tres factores de estudio: cuatro repiques para cada especie fúngica, cuatro edades de las colonias de cada especie fúngica y cuatro volúmenes de inóculo aplicado (unidades de infección), empleándose para cada experimento por separado un Diseño Completamente al Azar, con 4 repeticiones, con arreglo factorial. Para la comparación entre las medias de los tratamientos se empleó la prueba de Tukey al 5% de probabilidad del error. Para próximos ensayos utilizando esta técnica, se podría emplear colonias de 30 días para *C. paradoxa* y 40 días para *C. moniliformis*, y un volumen de aplicación de 100 µL/cm<sup>2</sup>, ya que mejoraría el nivel de respuesta para la formación de peritecios y micelio en las muestras de corteza.

**Palabras clave:** Pachaco; Marchitez vascular; Pudrición del fuste; Resistencia genética; Componentes patogénicos.

**Abstract.** In the Ecuadorian coast one of the most destructive diseases of the pachaco is vascular wilt or stem rot caused by *Ceratocystis* complex, so the aim of this study was to determine the factors that affect the efficiency of the reaction of bark pachaco to this disease. This research was conducted under laboratory conditions, using trees pachaco S38, S41, S98, AE-1, AE-2 and AE-3, and pathogenic species *Ceratocystis paradoxa* and *C. moniliformis*. The method utilized was tissue stem bark, with bark sections with 4.5 cm<sup>2</sup>, and a suspension of 3x10<sup>4</sup> units infection and remained in a humid chamber for 96 hours at 25 ± 5 °C. Were determined grades of resistance/susceptibility using a scale from 0 to 4, depending on the amount of mycelia and peritecio in each plant sample. Three factors were used: four colonies obtained by several transfers from each fungal specie, four ages of colonies of each fungal specie and four volumes of inoculum applied (units of infection), using for each experiment separately Completely Randomized Design with 4 replications factorial arrangement. For comparison between treatment means was used Tukey test at 5% probability of error. For future trials using this technique, you could use 30-day colonies for *C. paradoxa* and 40 days for *C. moniliformis*, and an application volume of 100 µL/cm<sup>2</sup>, it would improve the level of response for the formation of perithecium and mycelia in samples cortex.

**Keywords:** Guapuruvu; Vascular wilt; Stem rot; Genetic resistance; Pathogenic components.

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal, Dirección de Investigación Científica y Tecnológica-DICYT, Universidad Técnica Estatal de Quevedo-UTEQ

<sup>2</sup>Escuela de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agrarias, UTEQ.

<sup>3</sup>Escuela de Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Ambientales, UTEQ. Avenida Walter Andrade, Km 1½ vía a Santo Domingo. Casilla Postal: 73. Quevedo, Los Ríos, Ecuador. Address Correspondence to: Felipe R. Garcés-Fiallos, Escuela de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agrarias, UTEQ. Avenida Walter Andrade, Km 1½ vía a Santo Domingo. Casilla Postal: 73. Quevedo, Los Ríos, Ecuador, e-mail: felipegarces23@yahoo.com; fern2010libra\_ata@hotmail.com; suarezcapello@yahoo.com; cbelezaca@yahoo.com; emililoja@hotmail.com; eliasvallejo@hotmail.com

Recibido / Received 24.III.2014. Aceptado / Accepted 07.VII.2014.

## INTRODUCCIÓN

El pachaco [*Schizolobium parahybum* (Vell) Blake] es una especie maderable que tiene una demanda significativa en los mercados externos, además de ser una especie de rápido crecimiento, aumentando entre 2 y 3 m de altura por año (Leopold et al., 2001). Como resultado, esta especie forestal es explotada a gran escala. Canchignia-Martínez et al. (2007) relatan que posiblemente los rodales más antiguos del Ecuador provendrían de Costa Rica.

Hasta mediados de la década de 1990, se establecieron plantaciones con esta especie forestal en el Trópico Húmedo Ecuatoriano. Sin embargo, su incorporación en los sistemas de producción declinó posteriormente (Belezaca-Pinargote et al., 2012). Esta merma se debió a la aparición de problemas fitosanitarios, siendo la pudrición del fuste o marchitez vascular uno de los problemas más graves que enfrentan los productores de pachaco en la actualidad, ya que se reduce la calidad de la madera. Los primeros trabajos realizados investigando esta problemática indicaron que el problema es de carácter complejo, involucrando especies fúngicas tales como *Ceratocystis paradoxa*, *C. moniliformis* y *C. fimbriata*, pertenecientes a la familia Ophiostomataceae (Belezaca-Pinargote, 2002; Gelendhuis, 2005; Wyk et al., 2011).

El género *Ceratocystis* sensu stricto incluye un alto número de especies de hongos fitopatógenos de plantas angiospermas y gimnospermas en diversas regiones del mundo. Algunas enfermedades causadas por dicho género incluyen marchitamientos vasculares, manchado de maderas, chancros y pudriciones radicales, de tallos y frutos (Marín-Montoya y Wingfield, 2006). La especie *C. fimbriata* puede causar marchitez también en acacia negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) (Santos y Ferreira, 2003), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Ferreira et al., 2006; Tumura et al., 2012; Chen et al., 2013), anona (un híbrido entre *Annona cherimola* Mill. y *A. squamosa* L.) (Firmino et al., 2012), lechuga (*Lactuca sativa*) en sistema hidropónico (Halfeld-Vieira y Nechet, 2005), cacao (*Theobroma cacao*), papa dulce (*Ipomoea batatas*) y plátano (*Platanus* spp.) (Engelbrecht y Harrington, 2005). Esta sintomatología es también causada por *C. moniliformis* en acacia (*Acacia mangium* y *A. crassicaarpa*) (Tarigan et al., 2010) y *C. paradoxa* en palma africana (*Elaeis guineensis*) (Álvarez et al., 2012).

Es probable que la disminución en el número de hectáreas plantadas con *S. parahybum* debido a la enfermedad esté incrementando la presión sobre los bosques naturales por la demanda de madera, y consecuentemente aumentando la tasa de deforestación nacional (Belezaca-Pinargote et al., 2011). Existen resultados preliminares de la presencia de árboles con diferentes niveles de resistencia y/o susceptibilidad en cinco rodales ubicados en el Trópico Húmedo Ecuatoriano con respecto al complejo *Ceratocystis* spp. (Belezaca-Pinargote et al., 2012). Esto hace necesario

identificarlos para beneficio de (1) la industria, y (2) los productores agroforestales de la región y el país. Algunas metodologías relacionadas con la evaluación de este patosistema son aún escasas, por lo que inclusive en este tipo de trabajos se utilizan técnicas pioneras y rápidas de otros cultivos como cacao (Delgado y Echanday, 1965; Espinoza y Delgado, 1971). Por lo tanto, falta estudiar los parámetros relacionados a dicha evaluación para adaptarlos a las condiciones actuales que plantea esta especie.

El objetivo de este trabajo fue determinar los factores que inciden en la eficiencia de la respuesta de la corteza de árboles de pachaco, a la marchitez vascular o pudrición del fuste provocada por *Ceratocystis paradoxa* y *C. moniliformis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal, ubicado en los predios centrales de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo - UTEQ (01° 02' 30" S, 79° 25' 26" O), entre los meses de febrero y junio del año 2008. El material vegetal fue recolectado en los rodales originales establecidos en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del Instituto Nacional de Investigación Autónomo Agropecuario-INIAP (01° 05' 24" S, 79° 28' 06" O), y en un rodal segregante localizado en la Finca La María de la UTEQ (01° 00' 35" S, 79° 30' 08" O) (Tabla 1).

Se utilizaron colonias de *Ceratocystis paradoxa* y *C. moniliformis* aislados de árboles de pachaco enfermos, durante recorridos realizadas en rodales segregantes de pachaco próximos al lugar de estudio, extrayendo secciones de tejidos con sintomatología de marchitez (*C. paradoxa*: 17671029 E y 9879423 N; *C. moniliformis*: 17666868 E y 9879686 N). Posteriormente, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal, estas muestras se desinfectaron con hipoclorito de sodio (10%), inmediatamente se sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) más ácido láctico, e incubaron a 25 ± 2 °C. La identificación de los microorganismos se realizó con la asistencia de claves taxonómicas (Hunt, 1956; Hanlin, 1998).

Para evaluar la resistencia en los árboles, se utilizó el método de tejidos de corteza del fuste. Dicho método consistió en la extracción de cortes limpios, de aproximadamente 576 cm<sup>2</sup> (32 x 18 cm) de corteza, desde el fuste de árboles adultos a una altura de 1,30 m sobre el nivel del suelo. En el laboratorio, la sección de corteza se redujo a secciones pequeñas de 1,5 x 3 cm (4,5 cm<sup>2</sup>) e introdujeron en una caja de madera de 1,50 m x 0,75 m x 0,25 m (largo, ancho y profundidad) recubierta internamente con plástico negro. En su interior se colocó papel toalla humedecido con suficiente agua destilada estéril para asegurar que la caja cumpla el rol de cámara húmeda. Posteriormente, las secciones de corteza se distribuyeron de forma ordenada y uniforme sobre soportes plásticos,

**Tabla 1.** Información completa del material vegetal utilizado en todos los experimentos. Quevedo, Ecuador. Año 2008.**Table 1.** Full details of the plant material used in all experiments. Quevedo, Ecuador. Year 2008.

Material vegetal	Coordenadas geográficas	Rodal	Categoría*	Características
S38	17671424 E y 9880306 N		Resistente	Diámetro: 0,81 m. Altura total: 23 m. Altura comercial: 19 m.
S41	17671341 E y 9880274 N	Original	Moderadamente resistente	Diámetro: 0,80 m. Altura total: 29 m. Altura comercial: 24 m.
S98	17672163 E y 9879951 N		Muy susceptible	Diámetro: 0,70 m. Altura total: 21 m. Altura comercial: 18 m.
AE-1	17666905 E y 9879111 N			Diámetro 0,30 m. Altura total: 24 m. Altura comercial: 17 m.
AE-2	17666912 E y 9879657 N	Segregante	Desconocida	Diámetro: 0,40 m. Altura total: 22 m. Altura comercial: 16 m.
AE-3	17666882 E y 9879637 N			Diámetro: 0,30 m. Altura total: 23 m. Altura comercial: 21 m.

\* Categoría realizada por Belezaca-Pinargote et al. (2012) para los tres primeros árboles.

\* Category performed by Belezaca-Pinargote et al. (2012) for the first three trees.

siendo finalmente inoculadas con una suspensión de  $3 \times 10^4$  unidades de infección (ascosporas, conidias y micelio) por mL, e incubaron durante 96 horas a  $25 \pm 5$  °C. Después de este tiempo, se determinaron los grados de resistencia/susceptibilidad empleándose una escala arbitraria de notas de 0 a 4, representada en cuatro categorías: resistente (0,0 a 1,0; 0 a 25% de crecimiento micelial o peritecial), moderadamente resistente (1,1 a 2,0; 26 a 50% de crecimiento micelial o peritecial), susceptibles (2,1 a 3,0; 51 a 75% de crecimiento micelial o peritecial) y muy susceptibles (3,1 a 4,0; 76 a 100% de crecimiento micelial o peritecial) (Delgado y Echandi, 1965; Belezaca-Pinargote et al., 2012).

Cuatro experimentos se realizaron por separado, siendo cada uno repetido. En los primeros tres experimentos se utilizaron los árboles S38, S41 Y S98, mientras que en el último experimento se estudiaron los árboles S38, S98, AE-1, AE-2 y AE-3.

**Primer experimento.** Se utilizaron cuatro repiques para cada especie fúngica, partiendo de una cepa madre del primer aislamiento. El primer repique fue realizado desde la cepa madre hacia 15 tubos con PDA sólido, del cual se tomó un tubo al azar para realizar un segundo repique. A su vez, el tercer repique fue efectuado a partir del segundo, y el cuarto repique a partir del tercero, utilizando la misma cantidad de tubos empleados en el primer repique. Finalmente, con la obtención de cada uno de los cuatro repiques por separado, se sembraron los patógenos en 3 frascos de vidrio (botellas de 500 mL) conteniendo medio PDA semisólido, por un lapso de 21 días, utilizando posteriormente en la inoculación una alícuota de  $75 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ .

**Segundo experimento.** Se evaluaron cuatro edades para cada especie fúngica. A partir del segundo repique, se sembraron cada individuo patogénico en frascos de vidrio (botellas

de  $500 \text{ mL}/\text{cm}^2$ ) conteniendo medio PDA semisólido para las edades de 15, 30, 45 y 60 días. En el momento que todas las colonias tuvieron las edades establecidas, se realizaron las inoculaciones utilizando una alícuota de  $75 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ .

**Tercer experimento.** El último factor en estudio fue el volumen de inóculo aplicado (suspensión calibrada de unidades de infección), en secciones de corteza de cada genotipo. Se utilizaron alícuotas de 25, 50, 75 y  $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ , del segundo repique para las dos especies fúngicas, y aislados de 30 y 45 días de edad para *C. paradoxa* y *C. moniliformis*, respectivamente.

**Cuarto experimento.** En función de los resultados obtenidos en los anteriores experimentos, se utilizó el segundo repique de 30 y 40 días de edad para *C. paradoxa* y *C. moniliformis*, respectivamente, empleándose en la inoculación una alícuota de  $75 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ .

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 4 repeticiones, con arreglo factorial en función de cada experimento independiente: 1:  $2 \times 3 \times 4$  (dos patógenos x tres árboles x cuatro repiques), 2:  $2 \times 3 \times 4$  (dos patógenos x tres árboles x cuatro edades de la colonia), 3:  $2 \times 3 \times 4$  (dos patógenos x tres árboles x cuatro volúmenes de aplicación), y 4:  $2 \times 5$  (dos patógenos x cinco árboles). En cada caso se usaron cuatro secciones pequeñas de corteza como unidad de observación. Fueron realizados las pruebas de Bartlett y de Shapiro-Wilks, para verificar la homocedasticidad (variancias) y normalidad (residuos) de los datos, respectivamente. Para la comparación entre las medias de los tratamientos se empleó la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Se utilizó el programa estadístico ASSISTAT 7,6 beta 2012 (Silva y Azevedo, 2002).

## RESULTADOS

**Primer experimento.** Se observó diferencia altamente significativa en todas las variables estudiadas en los factores A (patógenos) y B (árboles) (Tabla 2).

El patógeno *C. paradoxa* mostró mayor cantidad de micelio y peritecio con valores de 1,40 y 1,62, respectivamente, en comparación con *C. moniliformis*. A su vez, el árbol S41 mostró una menor cantidad de micelio (1,16) y peritecio (1,15) en comparación con los demás. No se observó diferencia entre los repiques.

En el desdoblamiento de las interacciones significativas encontradas únicamente entre el factor A y B, para la variable micelio (Tabla 3), se observó una mayor cantidad de micelio en cortezas de árboles inoculados con *C. paradoxa*, y para los dos patógenos en el árbol S98 para el caso de micelio, y en el árbol S38 Y S98 para peritecio.

**Segundo experimento.** Se encontró solamente diferencia estadística significativa para las variables micelio en el factor B (árboles) y peritecio en todos los factores (Tabla 2).

Se evidenció mayor agresividad de *C. paradoxa* en comparación con *C. moniliformis*, mostrando mayor cantidad de peritecios (1,40). El árbol S38 presentó la menor cantidad de micelio (1,00), observándose un comportamiento diferenciado para cada variable sanitaria evaluada. Finalmente, se encontró una mayor área cubierta con peritecios (1,35), cuando se utilizaron colonias de 30 y 45 días.

En la separación de las interacciones significativas encontradas únicamente entre el factor A y C, para la variable peritecio (Tabla 4), se observó diferencia entre las dos especies fúngicas a los 30 y 60 días, mostrando agresividad de *C. paradoxa*. Existió también diferencia entre edades de las colonias en las dos especies, mostrando mayor cantidad de peritecios a los 30 días para *C. paradoxa*, y a los 45 días para *C. moniliformis*.

**Tabla 2.** Notas de micelio y peritecio en corteza de tres árboles de *Schizolobium parahybum*, inoculados con los patógenos *Ceratocystis paradoxa* y *C. moniliformis*, utilizándose cuatro repiques (primer experimento), cuatro edades (segundo experimento) y cuatro volúmenes de aplicación (tercer experimento) para cada especie fúngica. Quevedo, Ecuador. Año 2008.

**Table 2.** Notes of mycelium and perithecium in bark of three trees of *Schizolobium parahybum* inoculated with pathogens *Ceratocystis paradoxa* and *C. moniliformis*, used four peal (first experiment), four ages (second experiment) and four volumes of application (third experiment) for each fungal species Quevedo, Ecuador. Year 2008.

Primer experimento				Segundo experimento				Tercer experimento						
Tratamientos	Micelio <sup>1</sup>	Peritecio <sup>2</sup>		Tratamientos	Micelio	Peritecio		Tratamientos	Micelio	Peritecio				
p para factor A (patógenos)				p para factor A (patógenos)				p para factor A (patógenos)						
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	1,40	a*	1,62	a	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	1,02	ns	1,40	a	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	1,10	ns	1,87	a
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	1,13	b	1,10	b	<i>Ceratocystis moniliformis</i>	1,04		1,23	b	<i>Ceratocystis moniliformis</i>	1,07		0,75	b
p para factor B (árboles)				p para factor B (árboles)				p para factor B (árboles)						
S38	1,31	a	1,47	a	S38	1,00	b	1,44	a	S38	1,08	ab*	0,59	c
S41	1,16	b	1,15	b	S41	1,07	a	1,33	b	S41	1,00	b	1,44	b
S98	1,37	a	1,45	a	S98	1,02	ab	1,18	c	S98	1,17	a	1,89	a
p para factor C (repiques)				p para factor C (edades)				p para factor C (volúmenes)						
Primero	1,31	ns	1,40	ns	15 días	1,00	ns	1,24	b	25 µL/cm <sup>2</sup>	1,18	ns	1,37	ns
Segundo	1,33		1,36		30 días	1,06		1,35	a	50 µL/cm <sup>2</sup>	1,05		1,10	
Tercero	1,18		1,35		45 días	1,04		1,35	a	75 µL/cm <sup>2</sup>	1,05		1,36	
Cuarto	1,24		1,33		60 días	1,01		1,31	ab	100 µL/cm <sup>2</sup>	1,05		1,41	
CV (%)	24,22	13,75	CV (%)	8,98	11,30	CV (%)	19,01	12,11						

\* Medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren estadísticamente por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

ns: Carencia de diferencia estadísticas por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

1,2 Notas de 0 a 4, representada en cuatro categorías: resistente (0,0 a 1,0 equivaliendo entre 0 y 25% de crecimiento micelial o peritecial), moderadamente resistente (1,1 a 2,0 equivaliendo entre 26 y 50% de crecimiento micelial o peritecial), susceptibles (2,1 a 3,0 equivaliendo entre 51 y 75% de crecimiento micelial o peritecial) y muy susceptibles (3,1 a 4,0 equivaliendo entre 76 y 100% de crecimiento micelial o peritecial) (Delgado y Echandi, 1965; Belezaca-Pinargote et al., 2012).

\* Averages followed by the same lower case letter in columns and capital letters in the lines do not differ statistically by the Tukey test at 5% probability.

ns: Lack of statistical difference by Tukey test at 5% probability.

1,2 Notes from 0 to 4, represented in four categories: resistant (0.0 to 1.0 equaling between 0 and 25% of mycelial or perithecial growth), moderately resistant (1.1 to 2.0 equaling between 26 and 50% of mycelial or perithecial growth), susceptible (2.1 to 3.0 equaling between 51 and 75% of mycelial or perithecial growth) and very susceptible (3.1 to 4.0 equaling between 76 and 100% of mycelial or perithecial growth) (Delgado y Echandi, 1965; Belezaca-Pinargote et al., 2012).

**Tabla 3.** Valores de micelio de las interacciones significativas entre el factor A (patógenos) y B (árboles) del primer experimento (repiques). Quevedo, Ecuador. Año 2008.

**Table 3.** Significant interactions of mycelium values between factor A (pathogens) and B (trees) of the first experiment (peals). Quevedo, Ecuador. Year 2008.

Factores	<i>Ceratocystis paradoxa</i>		<i>Ceratocystis moniliformis</i>	
S38	1,41	aA*	1,21	aA
S41	1,14	bA	1,09	aA
S98	1,64	aA	1,09	aB

Medias seguidas por la misma letra minúscula en las columnas, y mayúscula en las líneas no difieren estadísticamente (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Averages followed by the same lower case letter in columns, and capital letter on lines do not differ statistically (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

**Tercer experimento.** En este ensayo se evidenció solamente diferencia significativa para peritecio y micelio en el factor A (patógenos), y para todas las variables analizadas en el factor B (árboles) (Tabla 2). Nuevamente se encontró mayor agresividad de la especie *C. paradoxa*, mostrando valores de 1,49 y 1,87, para micelio y peritecio, respectivamente. Por otro lado, el árbol S41 expresó una menor cantidad de micelio (1,00); contrariamente, el árbol S38 obtuvo menores valores de peritecio (0,59). No se observó diferencia estadística entre los volúmenes de aplicación en todas las variables.

En el desdoblamiento de las interacciones significativas encontradas únicamente entre el factor A y B (Tabla 5) y entre B y C (Tabla 6) para la variable peritecio, se encontró diferencia en la cantidad de peritecios en cada especie patogénica, y también mayor agresividad de *C. paradoxa* en los árboles S41 y S98 (Tabla 5). Así también, se observó diferencia en la cantidad de

**Tabla 4.** Valores de peritecios de las interacciones significativas entre el factor A (patógenos) y C (edades) del segundo experimento (edades: 15, 30, 45 y 70 días). Quevedo, Ecuador. Año 2008.

**Table 4.** Significant interactions of perithecia values between factor A (pathogens) and C (ages) of the second experiment (ages: 15, 30, 45 and 70 days). Quevedo, Ecuador. Year 2008.

Factores	15 días		30 días		45 días		60 días	
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	1,27	aB	1,57	aA	1,41	aAB	1,38	aB
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	1,22	aAB	1,13	bB	1,30	aA	1,25	bAB

Medias seguidas por la misma letra minúscula en las columnas, y mayúscula en las líneas no difieren estadísticamente (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Averages followed by the same lower case letter in columns, and capital letter on lines do not differ statistically (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 5.** Valores de peritecios de las interacciones significativas entre el factor A (patógenos) y B (árboles) del tercer experimento (volúmenes de aplicación: 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). Quevedo, Ecuador. Año 2008.

**Table 5.** Significant interactions of perithecia values between factor A (pathogens) and B (trees) of the third experiment (volumes of application: 25, 50, 75 and 100  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). Quevedo, Ecuador. Year 2008.

Factores	<i>Ceratocystis paradoxa</i>		<i>Ceratocystis moniliformis</i>	
S38	0,78	cA	0,41	bA
S41	2,07	bA	0,82	abB
S98	2,76	aA	1,03	aB

Medias seguidas por la misma letra minúscula en las columnas, y mayúsculas en las líneas no difieren estadísticamente (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Averages followed by the same lower case letter in columns, and capital letter on lines do not differ statistically (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 6.** Valores de peritecios de las interacciones significativas entre el factor B (árboles) y C (volúmenes) del tercer experimento (volúmenes de aplicación: 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). Quevedo, Ecuador. Año 2008.

**Table 6.** Significant interactions of perithecia values between factor B (trees) and C (volumes) of the third experiment (volumes of application: 25, 50, 75 and 100  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). Quevedo, Ecuador. Year 2008.

Factores	25 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$		50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$		75 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$		100 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$	
S38	0,82	bA	0,34	bA	0,57	bA	0,66	bA
S41	1,06	bB	1,17	aAB	1,72	aAB	1,81	aA
S98	2,23	aA	1,79	aA	1,79	aA	1,75	aA

Medias seguidas por la misma letra minúscula en las columnas, y mayúsculas en las líneas no difieren estadísticamente (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Averages followed by the same lower case letter in columns, and capital letter on lines do not differ statistically (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

peritecios en cada volumen de aplicación utilizada, así como en el árbol S41, presentando una mayor cantidad de peritecios al emplearse 100  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  (1,81) (Tabla 6).

**Cuarto experimento.** En este experimento donde se estudiaron únicamente los factores A (patógenos) y B (árboles), se encontró diferencia significativa en la mayoría de variables estudiadas, exceptuando la variable micelio del factor A (Tabla 7). Se verificó una mayor agresividad de *C. paradoxa*, mostrando mayor cantidad de peritecios (3,65). En relación al factor B, el árbol S38 mostró una menor cantidad de micelio (1,25) y peritecios (2,09), comportándose como sanitariamente superior a los demás.

**Tabla 7.** Notas de micelio y peritecio en la corteza de cinco árboles de *Schizolobium parahybum* inoculados con los patógenos *Ceratocystis moniliformis* y *C. paradoxa* del cuarto experimento. Quevedo, Ecuador. Año 2008.

**Table 7.** Mycelium and perithecia notes in the bark of five trees of *Schizolobium parahybum* inoculated with the pathogens *Ceratocystis moniliformis* and *C. paradoxa* of fourth experiment. Quevedo, Ecuador. Year 2008.

Tratamientos	Micelio		Peritecio	
<b>p para factor A (patógenos)</b>				
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	1,98	ns	3,65	a
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	2,44		2,24	b
<b>p para factor B (árboles)</b>				
S38	1,25	b*	2,09	b
S98	2,50	a	2,94	a
AE-1	2,50	a	3,16	a
AE-2	2,72	a	3,44	a
AE-3	2,06	ab	3,09	a
CV (%)	24,66	14,48		

ns: Carencia de diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren estadísticamente (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

ns: No significant differences (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Means followed by the same letter in the column do not differ statistically (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

**Especies patógenas.** Se comprobó que *C. paradoxa* tuvo una mayor agresividad en corteza de pachaco, pudiendo ser la causa primaria de la marchitez y pudrición del fuste, siendo este hecho corroborado por Belezaca-Pinargote et al. (2011). Estos autores encontraron mayor volumen aparente de necrosis en árboles de pachaco con la especie *C. paradoxa* (5,40  $\text{cm}^3$ ), en comparación a *Macrophoma* sp. (3,55  $\text{cm}^3$ ), *C. moniliformis*

(3,48  $\text{cm}^3$ ), *Fusarium* sp. (2,44  $\text{cm}^3$ ) y *Graphium* sp. (1,49  $\text{cm}^3$ ). Así también, Chen et al. (2013) comparando la longitud promedio de lesión (mm) de *C. acaciivora* y *C. chinaeucensis* en varias especies de eucalipto, encontraron una mayor severidad de la primera especie. Más aún, aislados de una misma especie de *Ceratocystis* pueden tener comportamiento diferenciado en cuanto a su agresividad (Soares-Oliveira, 2010).

Por otro lado, se observó diferencia en las cantidades de micelio y peritecio en cada uno de los experimentos realizados, independientemente del factor en estudio, concordando con Delgado (2007). Utilizando la misma metodología de evaluación de la enfermedad en clones de cacao, obtuvo una menor cantidad de micelio y peritecio en el clon SNA 0106 (clasificado como resistente), y una menor cantidad de peritecio (también clasificado como resistente) en los clones SNA 0905, SNA 0430, SNA 0101, IMC 67, CCN 51 y SNA 0205.

**Árboles.** En forma general el árbol S38 caracterizado anteriormente por Belezaca-Pinargote et al. (2012) como resistente, mostró la menor cantidad de micelio y peritecio en casi todos los experimentos realizados. Las excepciones ocurrieron en el segundo y tercer experimento en la variable micelio, donde los árboles S98 y S41, respectivamente en cada experimento, mostraron menor crecimiento fúngico.

Las diferencias encontradas entre nuestros resultados y los obtenidos por Belezaca-Pinargote et al. (2012) podrían deberse a la variabilidad genética de los aislados patogénicos (Harrington, 2000; Baker et al., 2003; Ferreira et al., 2010) usados en el presente experimento. Esto se debe a que estos fueron diferentes a los usados por dichos autores. Inclusive, van Wyk et al. (2011) y Geldenhuis (2005) informaron la existencia de esta diversidad genética en el complejo *Ceratocystis* en el Ecuador. Por otro lado, para el caso de eucalipto, un mismo clon puede tener una respuesta diferenciada al ser expuesto a diferentes aislados de *C. fimbriata* (Soares-Oliveira, 2010), lo que también explicaría los resultados encontrados.

La variabilidad en la manifestación de esta enfermedad no podría ser explicada solamente por la variabilidad molecular, sino por otros factores que interfieren en la transmisión e infección como el árbol hospedero, insectos vectores y condiciones ambientales (Díaz et al., 2009). El último factor puede influenciar cambios fisiológicos en los árboles, influenciando la variación entre investigaciones (Soria y Salazar, 1965; Espinoza y Delgado, 1971). Sobre las condiciones ambientales, la temperatura puede influenciar directamente el desarrollo de la enfermedad (Soares-Oliveira, 2010), hecho comprobado al obtener un comportamiento diferenciado entre cada experimento en la presente investigación, e inclusive comparado con los resultados obtenidos por Belezaca-Pinargote et al. (2012) ( $25 \pm 2$  °C). Este factor es uno de los más importantes que interfieren en la interacción patógeno-hospedero en este tipo de patosistema (Gonçalves-Mafia et al., 2011), afectando inclusive algunas características morfológicas como el crecimiento

miceliar de especies como *Ophiostoma novo-ulmi* (Díaz et al., 2009) y *C. moniliformis* sensu stricto (van Wyk et al., 2006).

Finalmente, se encontró un efecto significativo entre el factor A (patógenos) y B (árboles) para micelio en el primer experimento, y para peritecio en el tercer experimento. Esta respuesta también fue encontrada por Soares-Oliveira (2010) en Brasil, encontrando interacción significativa entre clones de eucalipto y varios aislados de *C. fimbriata*.

**Factores en estudio.** Los repiques estudiados en el primer experimento, no disminuyeron la capacidad de *C. paradoxa* y *C. moniliformis* para crecer sobre las secciones de corteza inoculadas, concordando con Espinoza y Delgado (1971), quienes trabajaron en el patosistema cacao - *C. fimbriata*.

Por otro lado, la edad de las colonias demostró tener un marcado efecto sobre el crecimiento de las dos especies fúngicas. Las edades ideales para este tipo de pruebas fueron de 30 días para *C. paradoxa* y 45 días para *C. moniliformis*. Aparentemente la viabilidad de las esporas de los hongos disminuye conforme aumenta la edad (75 días) de las mismas (Espinoza y Delgado, 1971). Este dato es importante, ya que para futuros trabajos habría que tomar en cuenta el envejecimiento de una colonia, ya que esta varía dependiendo de la especie patogénica.

Aunque no se observó diferencia estadística significativa en el volumen de aplicación, sí existió una interacción significativa entre la cantidad de peritecios en cada volumen de aplicación utilizada, así como en el árbol S41, presentando una mayor intensidad de la enfermedad cuando se emplearon 100  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  (1,81). Sobre esta interacción, Espinoza y Delgado (1971) encontraron un mayor desarrollo de micelio de *C. fimbriata* sobre secciones del árbol de cacao IMC 67 (resistente) utilizando un volumen de 25  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Usando la misma cantidad de inóculo, el desarrollo de la enfermedad fue menor en el clon ICS 95 (medianamente susceptible en condiciones de campo).

Sería conveniente realizar un estudio que incluya otros factores como la temperatura, diferentes aislados de una misma especie fúngica, y confirmar mediante pruebas de resistencia/susceptibilidad *in vivo* usando plántulas de pachaco de edades diferentes, ya que los vasos conductores de esta especie vegetal son anatómicamente diferentes (Marcati et al., 2008). Estas condiciones pueden influenciar la respuesta del hospedero al ser expuesto al complejo *Ceratocystis*.

## CONCLUSIONES

La especie *C. paradoxa* mostró mayor crecimiento peritecual en pedazos de corteza, pudiendo ser la causa primaria de la marchitez y pudrición del fuste en pachaco. Para próximos ensayos utilizando esta técnica, se podrían emplear colonias de 30 y 40 días para *C. paradoxa* y *C. moniliformis*, respectivamente, así como un volumen de aplicación de 100 mL/

$\text{cm}^2$ . Esto mejoraría el nivel de respuesta para la formación de peritecios y micelio en las muestras de corteza de pachaco.

## AGRADECIMIENTOS

Al antiguo CONESUP (actual SENESCYT) por el financiamiento del proyecto denominado CICYTPP0359JainCON, intitulado "Evaluación de la resistencia/susceptibilidad de árboles *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (pachaco) a la marchitez vascular y pudrición del fuste provocada por *Ceratocystis* spp. en el Litoral Ecuatoriano".

## REFERENCIAS

- Álvarez, E., G.A. Llano, J.B. Loke y M.I. Chacon (2012). Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* isolates from oil palms in Colombia, Ecuador and Brazil. *Journal of Phytopathology* 160: 690-700.
- Baker, C.J., T.C. Harrington, U. Krauss y A.C. Alfenas (2003). Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 93: 1274-1284.
- Belezaca-Pinargote, C. (2002). Etiología y manejo de la pudrición del fuste de *Schizolobium parahybum* (Pachaco), en la zona central del litoral ecuatoriano. Tesis de Ingeniería. Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad técnica Estatal de Quevedo, Quevedo. 79 p.
- Belezaca-Pinargote, C., C. Suárez-Capello y D. Vera-Coello (2011). Hongos fitopatógenos asociados a la enfermedad de muerte regresiva y pudrición del fuste de pachaco (*Schizolobium parahybum*) en el trópico húmedo ecuatoriano. *Boletín Micológico* 26: 15-22.
- Belezaca-Pinargote, C., C. Suárez-Capello, P. Cedeño-Loja, W. Mora-Silva, G. Díaz-Coronel y F.R. Garcés-Fiallos (2012). Propuesta de un método para evaluar resistencia genética en *Schizolobium parahybum* (Vell.) blake (pachaco) frente a *Ceratocystis* spp: evidencias preliminares de resistencia en Ecuador. *Boletín Micológico* 27: 8-17.
- Canchignia-Martínez, H.F., S. Hernández-Delgado, M. González-Paz, E. Motte y N. Mayek-Pérez (2007). Genetic relationships among *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (Leguminosae) ecotypes from Ecuador and other countries. *Silvae Genetica* 56: 214-221.
- Chen, S., M. van Wyk, J. Roux, M.J. Wingfield, Y. Xie y X. Zhou (2013). Taxonomy and pathogenicity of *Ceratocystis* species on *Eucalyptus* trees in South China, including *C. chinaeensis* sp. nov. *Fungal Diversity* 58: 267-279.
- Delgado, J. y E. Echandy (1965). Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal de machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. *Turrialba* 15: 286-289.
- Delgado, R. (2007). Assessment of resistance of national cocoa accessions to *Ceratocystis fimbriata* in Ecuador. *Ingenic* 11: 29-30.
- Díaz, G., D. Gallego, A. Gutiérrez, E. Musaly, E. Soriano y J. Galián (2009). Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de nuevos aislados de *Ophiostoma novo-ulmi*. *Boletín de Sanidad Vegetal* 35: 469-479.
- Engelbrecht, C.J.B. y T.C. Harrington (2005). Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia* 97: 57-69.

- Espinoza, A. y J. Delgado (1971). Factores intrínsecos que influyen en la eficacia de la prueba de laboratorio usada para evaluar la resistencia a *Ceratocystis fimbriata* en cacao. *Turrialba* 21: 13-17.
- Ferreira, E.M., T.C. Harrington, D.J. Thorpe y A.C. Alfenas (2010). Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathology* 59: 721-735.
- Ferreira, F.A., L.A. Maffia, R.W. Barreto, N.L. Demuner y S. Pigatto (2006). Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. *Revista Árvore* 30: 155-162.
- Firmino, A.C., H.J. Tozze-Júnior, P.N. Costa y E.L. Furtado (2012). *Ceratocystis fimbriata* causando murcha em atemóia na região de Botucatu-SP. *Summa Phytopathologica* 38: 171.
- Geldenhuis, M.M. (2005) Studies of fungi associated with dying *Schizolobium parahybum* in Ecuador. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pretoria, Pretoria. 98 p.
- Gonçalves-Mafia, R., A.C. Alfenas, E.M. Ferreira y D.H. Breda-Binoti (2011). Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Revista Árvore* 35: 817-824.
- Halfeld-Vieira, B.A. y K.L. Nechet (2005). Black rot in lettuce: a new disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in hydroponic culture in Brazil. *Plant Pathology* 55: 300.
- Hanlin, R. (1998). Illustrated genera of Ascomycetes. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 113 p.
- Harrington, T.C. (2000). Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasileira* 25: 262-263.
- Hunt, J. (1956). Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* 19: 1-58.
- Leopold, A.C., R. Andrus, A. Finkeldey y D. Knowles (2001). Attempting restoration of wet tropical forests in Costa Rica. *Forest Ecology and Management* 142: 243-249.
- Marcati, C.R., C.R. Dias-Milanez y S.R. Machado (2008) Seasonal development of secondary xylem and phloem in *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Trees* 22: 3-12.
- Marín-Montoya, M. y M.J. Wingfield (2006). A review of *Ceratocystis* sensu stricto with special reference to the species complexes *C. coerulescens* and *C. fimbriata*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 59: 3045-3075.
- Santos, A.F. dos y F.A. Ferreira (2003). Murcha-de-Ceratocystis em Acácia-Negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 28: 325.
- Soares-Oliveira, L.S. (2010). Agressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clones de *Eucalyptus* spp. Tesis de Maestría. Programa de Posgrado en Fitopatología. Universidad Federal de Viçosa, Viçosa. 18 p.
- Soria, J. y G. Salazar (1965). Pruebas preliminares de resistencia a *Ceratocystis fimbriata* en clones e híbridos de cacao. *Turrialba* 15: 290-295.
- Tarigan, M., M. van Wyk, J. Roux, B. Tjahjono y M.J. Wingfield (2010). Three new *Ceratocystis* spp. in the *Ceratocystis moniliformis* complex from wounds on *Acacia mangium* and *A. crassicarpa*. *Mycoscience* 51: 53-67.
- Tumura, K.G., C. de Pieri y E.L. Furtado (2012). Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. *Summa Phytopathologica* 38: 54-60.
- van Wyk, M., J. Roux, I. Barnes, B.D. Wingfield y M.J. Wingfield (2006). Molecular phylogeny of the *Ceratocystis moniliformis* complex and description of *C. tribiliformis* sp. nov. *Fungal Diversity* 21: 181-201.
- van Wyk, M., B.D. Wingfield y M.J. Wingfield (2011). Four new *Ceratocystis* spp. associated with wounds on *Eucalyptus*, *Schizolobium* and *Terminalia* trees in Ecuador. *Fungal Diversity* 46: 111-131.