

# PROPUESTA DE UN MÉTODO PARA EVALUAR RESISTENCIA GENÉTICA EN *Schizolobium parahybum* (VELL.) BLAKE (PACHACO) FRENTE A *Ceratocystis* spp: EVIDENCIAS PRELIMINARES DE RESISTENCIA EN ECUADOR

Proposal for a method to evaluate genetic resistance in *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (pachaco) against *Ceratocystis* spp: Preliminary evidence of resistance in Ecuador

Carlos Belezaca Pinargote<sup>1</sup>, Carmita Suárez Capello<sup>2</sup>,  
Pedro Cedeño Loja<sup>1</sup>, Washington Mora Silva<sup>1</sup>,  
Gorki Díaz Coronel<sup>1</sup>, Felipe Garcés Fiallos<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Investigación Científica y Tecnológica, Facultad de Ciencias Ambientales, Escuela de Ingeniería Forestal, Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

<sup>2</sup> Estación Experimental Tropical Pichilingue, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador, Departamento Nacional de Sanidad Vegetal.

<sup>3</sup> Unidad de Investigación Científica y Tecnológica, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica Estatal de Quevedo.  
Correo electrónico: cbelezaca@yahoo.com,  
Tel: 56 63 215815

**Palabras claves:** Ascosporas, conidias, corteza fustal, incubación, micelio, unidades de infección.

**Key Words:** Ascophore, conidia, fustal cortex, incubation, mycelium, infection units.

## RESÚMEN

Se condujo una investigación en el Trópico Húmedo Ecuatoriano (THE), dirigida a encontrar un método eficiente para evaluar la resistencia genética en árboles de *Schizolobium parahybum* (pachaco) frente al complejo *Ceratocystis*: *C. paradoxa*, *C. moniliformis*, y *C. fimbriata*.

Se estudiaron dos métodos basados en el empleo de dos tipos de tejidos vegetales: a) tejidos de ramas laterales, y 2) tejidos de corteza fustal. Se emplearon cinco rodales de pachaco, tres de los cuales son considerados de introducción original de la especie forestal al THE desde la amazonía, y dos que son descendientes de los primeros.

Los resultados permitieron definir que el método basado en tejidos de corteza fustal, fue el más eficiente y logísticamente viable. La metodología final aplicada, consistió en extraer corteza desde árboles adultos, reducirla a secciones pequeñas de 1,5 cm x 4 cm (6 cm<sup>2</sup>) y mantenerlas

en una cámara húmeda durante 96 horas. Una vez distribuidas las secciones de corteza, se inocularon con 0,45 mL<sup>-1</sup> de una suspensión calibrada a razón de 30.000 unidades de infección (ascosporas, conidias y micelio). Para la evaluación, se empleó una escala arbitraria de 0 a 4 que permitió estimar el crecimiento de micelio y número de peritecios para cada uno de los hongos. Esta metodología permitió discriminar entre árboles: resistentes (0,0 a 1,0), moderadamente resistentes (1,1 a 2,0), susceptibles (2,1 a 3,0), y muy susceptibles (3,1 a 4,0), lo cual la hace viable para futuros trabajos de selección de individuos y mejoramiento genético de la especie.

## ABSTRACT

A research was conducted in the Humid Tropics of Ecuador (THE), aimed at finding an efficient method to evaluate genetic resistance in *Schizolobium parahybum*

(Pachaco) trees against *Ceratocystis* complex: *C. paradoxa*, *C. moniliformis* and *C. fimbriata*. We studied two methods based on the use of two types of plant tissues: a) tissue of lateral branches, and 2) stem bark tissues. Five forest of pachaco were used, three of which are considered original introduction of forestry specie to THE from the Amazon, and two who are descendants of the former. The results allowed to define the method based on stem bark tissue was the most efficient and logistically feasible. The final methodology applied, consisted in to remove bark from mature trees, reducing it to small sections of 1.5 cm x 4 cm (6 cm<sup>2</sup>) and maintained in a moist chamber for 96 hours. Once distributed the sections of bark, were inoculated with 0.45 mL<sup>-1</sup> of a suspension calibrated at a rate of 30.000 units of infection (ascospores, conidia and mycelium). For evaluation, we used an arbitrary scale from 0 to 4, which allowed to estimate the growth of mycelium and perithecia number for each of the fungi. This methodology allows us to discriminate between trees: resistant (0.0 to 1.0), moderately resistant (1.1 to 2.0), susceptible (2.1 to 3.0), and very susceptible (3.1 to 4 , 0), which makes it viable for future selection of individuals and breeding of the forest species.

## INTRODUCCIÓN

La demanda de materias primas originadas del bosque, ha estimulado el incremento de plantaciones forestales, especialmente con especies de rápido crecimiento (Estrada, 1997; Belezaca *et al.*, 2009). En la década de 1970, se introdujo al occidente Ecuatoriano la especie *Schizolobium parahybum* (pachaco) procedente de la amazonía, y debido a su capacidad de adaptación, se convirtió en una especie promisoría para programas de forestación y reforestación del país (Torres, 1995; Estrada, 1997). Hasta mediados de la década de 1990, en el Trópico Húmedo Ecuatoriano se establecieron plantaciones con esta especie forestal, pero posterior a ello, su incorporación en los sistemas de producción declinó. La razón principal se debió que a finales de la década de 1980, emergió una compleja enfermedad que mata los árboles en pie, eliminando hasta el presente a miles de árboles en la región. Estudios etiológicos previos, permitieron identificar tres especies de hongos pertenecientes al género *Ceratocystis*, asociados a la enfermedad: *C. paradoxa*, *C. moniliformis* (Belezaca y Suárez 2001; Belezaca, 2002; Belezaca y Suárez, 2003; Martínez, 2004) y *C. fimbriata* (Cannon, 1990; Ramírez, 1990, Roux *et al.*, 2000; Geldenhuis *et al.*, 2002).

Debido a la importancia económica y ambiental de la especie forestal para el Trópico Húmedo Ecuatoriano, fue necesario buscar alternativas tendientes a reducir el impacto de la enfermedad. En este sentido, considerando que la resistencia genética es la medida de control por excelencia, y aprovechando la experiencia previa con el sistema *Theobroma cacao* (cacao) – *Ceratocystis* (Delgado y Echandy, 1965; Delgado y Suárez, 2003), se diseñó una estrategia para enfrentar su problemática fitosanitaria, que se basó en identificar resistencia genética de *S. parahybum* al complejo *Ceratocystis*.

Consecuentemente, la idea de encontrar árboles de pachaco con «posible» resistencia genética a la enfermedad, nació como resultado de dos observaciones importantes: 1) En investigaciones realizadas por Belezaca (2001 y 2002), Belezaca y Suárez (2001 y 2003) y Martínez (2004) se encontró que los volúmenes de necrosis provocados por especies de *Ceratocystis* inoculadas en plántulas de pachaco procedentes de semillas de libre polinización, no eran uniformes, con rangos observados muy amplios, evidenciándose una «posible» resistencia y susceptibilidad a los patógenos. 2) En un recorrido efectuado por Belezaca en el año 2000, a plantaciones de pachaco ubicadas en el noroccidente del Ecuador, observó la presencia de árboles vivos aparentemente saludables y sanos en medio de rodales con árboles enfermos y muertos, haciendo sospechar que los vivos eran resistentes a la enfermedad. No obstante, estas observaciones debían investigarse y demostrarse científicamente.

Los objetivos que se plantearon en la investigación fueron los siguientes: a) Aislar cepas de *Ceratocystis* spp. desde árboles de pachaco enfermos, b) Probar dos métodos para evaluar la resistencia de árboles de *S. parahybum* a los hongos fitopatógenos causantes de la enfermedad, c) Determinar y seleccionar árboles de pachaco con resistencia a *Ceratocystis* spp., y d) Evaluar la resistencia en progenies de árboles seleccionados como resistentes a *Ceratocystis* spp.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Antecedentes generales.

La investigación se realizó entre los años 2006 y 2008. Los estudios a nivel de campo comprendieron 5 rodales de pachaco pertenecientes a dos instituciones estatales distintas. Tres rodales con una edad >30 años (Salvatierra, Lomalong, y La Isla) estuvieron ubicados en la Estación Experimental Tropical Pihilingue (EETP) del Instituto

Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP), y son considerados como los primeros de *S. parahybum* establecidos en el Trópico Húmedo Ecuatoriano (01°04'26"S y 79°24'14"W), y por ende los sitios de introducción original, desde su hábitat natural en la Amazonía. Además, se consideró dos rodales segregantes (Fincas: La María y La Represa) con una edad de 12 y 15 años respectivamente (01°06'11"S y 79°27'45"W; 01°03'18"S y 79°25'24"W), pertenecientes a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), y cuyos árboles fueron obtenidos por semillas de libre polinización desde los rodales originales. Los experimentos a nivel de laboratorio, se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la UTEQ.

#### Aislamiento de cepas de *Ceratocystis* spp.

Con el propósito de obtener colonias de los microorganismos causantes de la enfermedad, se realizaron recorridos por plantaciones de pachaco próximas a los lugares de estudio. Se localizaron árboles con síntomas de enfermedad, a partir de los cuales se extrajeron secciones de tejidos, depositaron en bolsas plásticas, etiquetaron y llevaron al laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la UTEQ. Los tejidos vegetales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10%, posteriormente se sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) más ácido láctico, e incubaron a  $24 \pm 2$  °C, hasta el apareamiento de colonias fúngicas (CMI, 1983). Tejidos adicionales se incubaron en cámara húmeda y otros se emplearon en sándwiches con rodajas de zanahoria, hasta la presencia de peritecios. La identificación de los microorganismos se realizó con la asistencia de claves taxonómicas (Hunt, 1956; Hanlin, 1992). Colonias puras de los hongos aislados se etiquetaron y guardaron para estudios posteriores.

#### Métodos para evaluar la resistencia en árboles de pachaco.

Se plantearon dos métodos de evaluación para testar resistencia/susceptibilidad: 1) empleando tejidos de ramas laterales, y 2) empleando tejidos de corteza fustal. Se hicieron pruebas preliminares para los dos métodos, con el propósito de familiarizarse y determinar si estos eran o no viables.

#### Método empleando tejidos de ramas laterales.

Originalmente propuesto por Delgado y Ehandi (1965), para testar resistencia en varias especies y clones de cacao frente a *C. fimbriata*, posteriormente empleado por Espinosa y Delgado (1971) y Miño (1994) con exitosos resultados.

En este método se utilizaron ramas laterales de aproximadamente 1,5 cm de diámetro. Para la obtención de las ramas fue necesario que un hombre subiera hacia la copa de los árboles, con ayuda de equipos especiales, poleas, sogas, arneses, espolones, etc. y con un machete las cortara (Figura 1). En el laboratorio, las ramas se seccionaron a pedazos más pequeños de 4 cm de longitud y dividieron longitudinalmente por la medula, obteniéndose dos mitades, sin despegar la corteza de la madera, y estos segmentos se colocaron sobre una malla plástica, suspendida dentro de una caja de madera de 1,50 m de largo x 0,75 m de ancho y 0,25 m de altura, recubierta internamente con láminas de polietileno color negro. Además, dentro de la caja se depositaron láminas de papel toalla humedecida con suficiente agua destilada estéril, para asegurar que la caja cumpla la función de cámara húmeda, durante el periodo de infección que fue de 96 horas. Sobre el área interna de las secciones de corteza se aplicó una suspensión calibrada de 30.000 unidades de infección (ascosporas, conidias y micelio), a razón de 0,075 ml/cm<sup>2</sup> (0,45 ml/sección). Las muestras se dejaron incubar dentro de la caja de madera a temperatura ambiental de laboratorio ( $25 \pm 2$  °C).



Figura 1. A, B y C describen el complicado y riesgoso proceso de trepar árboles, con el objetivo de recolectar ramas laterales de *S. parahybum*.

Por cada árbol evaluado, se emplearon 72 secciones de ramas (6 cm<sup>2</sup> c/u) en las que se inocularon tres (3) hongos: *Ceratocystis paradoxa*, *C. fimbriata*, *C. moniliformis*, y agua destilada estéril, como control. Por cada microorganismo se utilizó 18 secciones de ramas, distribuidas en tres repeticiones (6 secciones por repetición).

#### Método empleando tejidos de corteza fustal.

Como una modificación del método original, se emplearon secciones de corteza del fuste, obtenidas mediante cortes limpios a 1,5 m sobre el nivel del suelo (Figura 2), que posteriormente en el laboratorio se cortaron en secciones más pequeñas de 4 x 1,5 cm (6 cm<sup>2</sup> de área). Las heridas provocadas después de la extracción de las

secciones de corteza, se cubrieron con pasta cúprica (cobre + cal + agua) para evitar que sean colonizadas por patógenos invasores y deprecien la salud de los árboles. Los procedimientos de inoculación, incubación y evaluación que continuaron fueron similares a los aplicados en el método que emplea tejidos de ramas laterales. Por cada árbol evaluado, se emplearon 72 secciones pequeñas de corteza (6 cm<sup>2</sup> c/u) en las que se inocularon tres (3) hongos: *Ceratocystis paradoxa*, *C. fimbriata*, *C. moniliformis*, y agua destilada estéril, como control. Por cada microorganismo se utilizó 18 secciones de ramas, distribuidas en tres repeticiones (6 secciones por repetición).

**Método empleando tejidos de corteza fustal.**

Como una modificación del método original, se emplearon secciones de corteza del fuste, obtenidas mediante cortes limpios a 1,5 m sobre el nivel del suelo (Figura 2), que posteriormente en el laboratorio se cortaron en secciones

más pequeñas de 4 x 1,5 cm (6 cm<sup>2</sup> de área). Las heridas provocadas después de la extracción de las secciones de corteza, se cubrieron con pasta cúprica (cobre + cal + agua) para evitar que sean colonizadas por patógenos invasores y deprecien la salud de los árboles.

Los procedimientos de inoculación, incubación y evaluación que continuaron fueron similares a los aplicados en el método que emplea tejidos de ramas laterales. Por cada árbol evaluado, se emplearon 72 secciones pequeñas de corteza (6 cm<sup>2</sup> c/u) en las que se inocularon tres (3) hongos: *Ceratocystis paradoxa*, *C. fimbriata*, *C. moniliformis*, y agua destilada estéril, como control. Por cada microorganismo se utilizó 18 secciones de ramas, distribuidas en tres repeticiones (6 secciones por repetición).

Para los dos métodos evaluados se empleó una escala arbitraria de 0 a 4, que midió el desarrollo de micelio y densidad de peritecios de los hongos, en secciones de tejidos (Delgado y Echandi, 1965), como se muestra en el cuadro 1.



Figura 2. A, B y C describen el proceso de extracción de corteza y posterior protección de la herida con pasta cúprica, en árboles de *S. parahybum*.

Cuadro 1. Escala arbitraria utilizada para testar resistencia en árboles de *S. parahybum* (pachaco) frente a *Ceratocystis* spp., propuesta por Delgado y Echandi (1965).

| Valores de la escala | Para micelio               | Para peritecios                                     |
|----------------------|----------------------------|---|
| 0                    | Ningún crecimiento         | Nada (ningún peritecio)                             |
| 1                    | Muy poco crecimiento       | Muy poco (1 – 5 peritecios)                         |
| 2                    | Escaso crecimiento         | Poco (6 – 15 peritecios)                            |
| 3                    | Bastante                   | Bastante (mas de 16 peritecios)                     |
| 4                    | Tejido cubierto totalmente | Todo el tejido cubierto de peritecios (incontables) |

Cuadro 2. Clasificación de árboles de *S. parahybum* (pachaco) en base a la escala de 0 a 4 y al porcentaje de desarrollo de micelio y peritecios de *Ceratocystis* spp.

| CATEGORIA                | Crecimiento de micelio y desarrollo de peritecios |            |
|--------------------------|---|------------|
|                          | Escala (0 a 4)                                    | Porcentaje |
| Resistentes              | 0,0 a 1,0   | 00 – 25    |
| Moderadamente resistente | 1,1 a 2,0   | 26 – 50    |
| Susceptibles             | 2,1 a 3,0   | 51 – 75    |
| Muy susceptibles         | 3,1 a 4,0   | 76 – 100   |



### Selección de árboles de pachaco con resistencia a *Ceratocystis* spp.

Inicialmente se realizó un censo poblacional en los rodales estudiados, asignándose un número a cada árbol, marcándose con pintura en un lugar visible del mismo. Se evaluó el 5% de la población de árboles en cada sitio. En total se evaluaron 215 árboles: 160 en la EETP – INIAP (32 en el sector «Salvatierra», 21 en el sector «Lomalong», y 107 en el sector «La Isla»), 55 árboles en la UTEQ (32 en la finca «La Represa», y 23 en la finca «La María»).

Para la evaluación general de resistencia, se usó el método de corteza fustal descrito en párrafos anteriores. Los árboles evaluados se clasificaron siguiendo la escala propuesta por Delgado y Echandi (1965) que establece las siguientes cuatro categorías (Cuadro 2).

Para efecto de esta investigación, se consideró como resistentes aquellos individuos con grados de infección comprendidos entre 0 y 2 (0 y 50 %) en cuanto a micelio y peritecios.

### Evaluación de resistencia en la descendencia de árboles resistentes.

Considerando la variabilidad en la fenología de los árboles seleccionados, únicamente se recolectó semilla en 4 de ellos, considerándose 1 susceptible (árbol 98), 1 resistente (árbol 90), y 2 moderadamente resistentes (árboles 38 y 50).

Luego de la recolección de semillas, estas se desinfectaron y sometieron a tratamientos pregerminativos, llevándose a fase de invernadero 400 semillas de cada árbol, que fueron sembradas en bolsas de polietileno color negro, conteniendo sustrato desinfectado. Sin embargo, las condiciones ambientales atípicas de la época lluviosa del año 2008, desencadenaron ataques masivos e intensos de hongos fitoparásitos (*Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia solani*, etc), que diezmaron las plantas en aproximadamente el 75 % para la descendencia de cada árbol. Al tener 1 mes de edad, las plantas sobrevivientes se llevaron a campo definitivo y mantuvieron allí durante 180 días (seis meses).

Pasado este tiempo y culminada la época lluviosa, solo sobrevivieron entre 30 y 35 plantas de cada árbol (figura 3).

Las plantas sobrevivientes se inocularon con 1 mL de una suspensión calibrada a razón de 30.000 unidades de infección (ascosporas, conidias, micelio) de *C. paradoxa*, *C. moniliformis*, *C. fimbriata* por separado, y H<sub>2</sub>O estéril (control) según correspondiera a cada tratamiento. Para cuyo proceso, con un cuchillo desinfectado se efectuó un corte inclinado en el tallo a 10 cm de altura, que comprometió

corteza y xilema y luego cerrado mediante el empleo de cinta de parafilm (Figura 4). En total se inocularon 120 plantas; 30 de cada árbol madre (10 plantas con cada microorganismo).

Transcurridos 30 días después de las inoculaciones, las plantas se cortaron y diseccionaron, y con una regla graduada se midió el largo y ancho de la necrosis provocada en la madera, para determinar el área aproximada de necrosis.



Figura 3. Plantas de *S. parahybum* transplantadas en el campo. A) Plantas a los 60, y B) 180 días después del trasplante, listas para ser inoculadas con los hongos fitopatógenos.

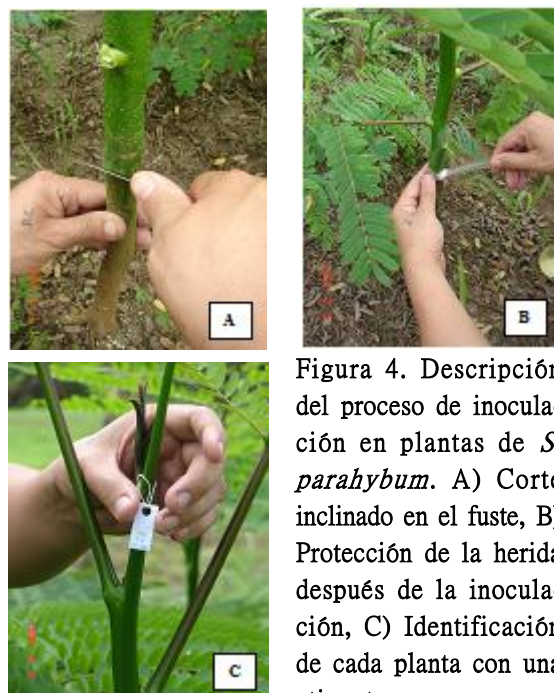


Figura 4. Descripción del proceso de inoculación en plantas de *S. parahybum*. A) Corte inclinado en el fuste, B) Protección de la herida después de la inoculación, C) Identificación de cada planta con una etiqueta.

### Diseño experimental y análisis estadístico.

Para los experimentos de selección del método de resistencia y discriminación de árboles resistentes a los patógenos causantes de la enfermedad, se utilizó herramientas de estadística descriptiva.

Para evaluar la resistencia a nivel de campo en la progenie de árboles seleccionados como resistentes, se utilizaron cuatro tratamientos (tres patógenos y H<sub>2</sub>O destilada estéril, como control). Similar al caso anterior, los datos se analizaron empleando herramientas de estadística descriptiva proporcionadas por el paquete estadístico SYSTAT 11 versión para Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cepas aisladas de *Ceratocystis* spp.

Se aislaron e identificaron 11 cepas de *Ceratocystis* spp., de las cuales, 5 pertenecieron a *C. moniliformis*, 2 a *C. paradoxa*, y 4 a *C. fimbriata*, las mismas que fueron codificadas y permanecen en la colección micológica del laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la UTEQ (figura 5).

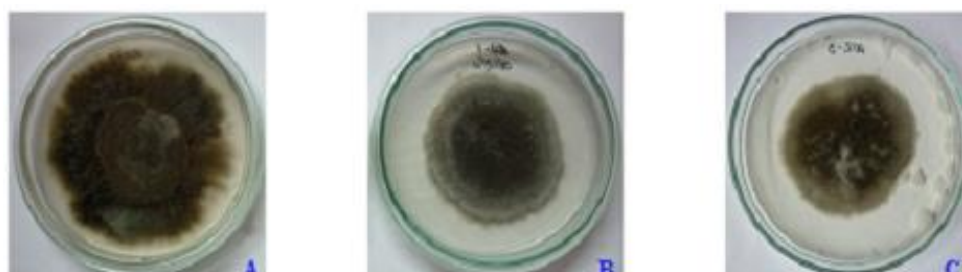


Figura 5. Colonias de *Ceratocystis* spp. aisladas desde árboles enfermos de *S. parahybum*, creciendo en medio de cultivo papa-dextrosa-agar. A) *C. fimbriata*, B) *C. paradoxa* y C) *C. moniliformis*.

### Selección del método para evaluar resistencia en árboles de pachaco.

Se realizó un ensayo previo, utilizando cuatro (4) árboles de *S. parahybum*, donde se confrontó al método que empleó tejidos de ramas laterales, con el método que empleó tejidos de corteza fustal (Cuadro 3). No obstante, como controles y referencia, se empleó dos (2) clones de *Theobroma cacao* (cacao), utilizados internacionalmente como testigos estándar en estudios de resistencia de esta especie agronómica, frente a *C. fimbriata*: ICS - 1 (susceptible), y IMC - 67 (resistente).

Los resultados demostraron una similitud en la capacidad de respuesta de los dos tejidos (métodos) en *S. parahybum* y *T. cacao*, tanto para el desarrollo de micelio y número de peritecios para cada uno de los microorganismos. Esto indica que los dos métodos son eficientes y cualquiera de ellos puede ser utilizado para testar resistencia en pachaco. Paralelamente, la capacidad de respuesta de los tejidos de corteza y ramas laterales de cacao frente a *C. fimbriata*, fue similar a la reportada en otras investigaciones (Delgado y Echandi, 1965; Espinoza y Delgado, 1971; Delgado y Suárez, 2003) y como se esperaba, los resultados

Cuadro 3. Respuesta de tejidos de ramas laterales y corteza fustal de *S. parahybum* y *T. cacao* a inoculaciones con *Ceratocystis* spp., utilizando la escala arbitraria de 0 a 4 propuesta por Delgado y Echandi (1965).

| Árbol                                    | <i>C. paradoxa</i> |         |            |         | <i>C. fimbriata</i> |         |            |         | <i>C. moniliformis</i> |         |            |         |
|--|--------------------|---------|------------|---------|---------------------|---------|------------|---------|------------------------|---------|------------|---------|
|  | Micelio            |         | Peritecios |         | Micelio             |         | Peritecios |         | Micelio                |         | Peritecios |         |
|  | Ramas              | Corteza | Ramas      | Corteza | Ramas               | Corteza | Ramas      | Corteza | Ramas                  | Corteza | Ramas      | Corteza |
| 1  | 1,00               | 1,00    | 0,50       | 0,89    | 2,00                | 1,00    | 1,40       | 1,00    | 1,10                   | 1,00    | 1,00       | 1,00    |
| 2  | 1,00               | 1,00    | 0,40       | 0,50    | 1,40                | 1,00    | 1,00       | 1,00    | 1,00                   | 1,00    | 1,60       | 1,06    |
| 3  | 1,40               | 1,22    | 0,50       | 1,00    | 1,20                | 1,00    | 1,00       | 1,06    | 1,61                   | 1,11    | 1,82       | 1,17    |
| 4  | 1,00               | 1,00    | 0,60       | 0,89    | 2,90                | 1,00    | 3,10       | 1,00    | 1,60                   | 1,11    | 1,50       | 1,33    |
| Clones de <i>Theobroma cacao</i> (cacao) |                    |         |            |         |                     |         |            |         |                        |         |            |         |
| ICS-1                                    | 1,00               | 0,97    | 0,80       | 0,80    | 2,30                | 2,50    | 3,20       | 3,25    | 0,50                   | 0,50    | 1,00       | 0,95    |
| IMC-67                                   | 0,70               | 0,65    | 0,30       | 0,32    | 2,00                | 2,00    | 3,00       | 3,10    | 0,80                   | 0,77    | 0,80       | 0,82    |

obtenidos mostraron que el agente patológico más importante de la enfermedad de marchitez vascular en *T. cacao* es *C. fimbriata*.

No obstante, el método que empleó tejidos de ramas laterales resultó ser poco práctico para la realidad del Trópico Húmedo Ecuatoriano, debido a la lentitud con que se logró recolectar los tejidos vegetales, y la escasez de personas (trepadores) calificadas y dispuestas a trepar árboles que sobrepasan los 30 m de altura, ya que ello representó un alto riesgo para el «trepador» y los propósitos de la investigación. Considerando la limitante logística que constituyó este método, se optó por dejarlo de lado y no utilizarlo para los posteriores objetivos del trabajo.

Por otra parte, el método que empleó tejidos de corteza fustal, demostró ser más rápido y seguro para los investigadores, por lo que fue el método elegido para testar resistencia en los árboles de pachaco.

#### Selección de árboles con resistencia a *Ceratocystis* spp.

La mayor parte de los árboles evaluados se ubicaron en las categorías susceptibles y muy susceptibles (93,02 %),

debido que los tejidos de corteza fustal inoculados con los patógenos, mostraron abundante desarrollo de micelio y peritecios. No obstante, se destacaron algunos árboles con bajo desarrollo de estructuras fúngicas, lo que se consideró signo de resistencia. Si bien, la evidencia de árboles con resistencia genética fue baja (6,98 %), es muy significativa y de gran importancia, ya que puede ser aprovechada para mejorar genéticamente a la especie forestal (cuadro 4).

Además, los resultados revelan que en la EETP – INIAP se encontró el mayor número de árboles de pachaco con resistencia genética hacia los patógenos causantes de la enfermedad, lo cual puede estar relacionado con el hecho que en este sitio se encuentren los rodales de introducción original de la especie forestal (Canchignia *et al.*, 2007), convirtiéndolos en los más antiguos y donde se consideraría más probable encontrar resistencia por la mayor heterogeneidad genética existente. En el cuadro 5 se presentan los valores obtenidos (de acuerdo a la escala 0 a 4) de individuos más destacados en los rodales evaluados de la finca «La María», finca «La Represa», y EETP – INIAP, donde se encontraron 1, 7 y 7 árboles de pachaco

Cuadro 4.

Número de árboles de *S. parahybum* con diferentes niveles de resistencia y/o susceptibilidad frente al complejo *Ceratocystis* spp. en cinco rodales ubicados en el Trópico Húmedo Ecuatoriano.

| CATEGORIA                 | UTEQ       |          | EETP – INIAP |          |         | Σ   |
|---------------------------|------------|----------|--------------|----------|---------|-----|
|                           | La Represa | La Maria | Sabatierra   | Lomaloug | La Isla |     |
| Resistentes               | 1          | 0        | 0            | 0        | 2       | 3   |
| Moderadamente Resistentes | 6          | 1        | 0            | 0        | 5       | 12  |
| Susceptibles              | 11         | 12       | 4            | 1        | 17      | 45  |
| Muy Susceptibles          | 14         | 10       | 28           | 20       | 83      | 155 |
| Σ                         | 32         | 23       | 32           | 21       | 107     | 215 |

Cuadro 5.

Árboles de pachaco con aceptables niveles de resistencia genética frente a *Ceratocystis* spp. en rodales de introducción original y segregantes de *S. parahybum*, empleando el método de tejidos de corteza fustal. Escala de 0 a 4 propuesta por Delgado y Echandi (1965).

| Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP (Introducción original) |                    |            |                     |            |                      |            |
|--|--------------------|------------|---------------------|------------|----------------------|------------|
| Arbol Nro.   | <i>C. paradoxa</i> |            | <i>C. fimbriata</i> |            | <i>C. moniformis</i> |            |
|  | Micelio            | Peritecios | Micelio             | Peritecios | Micelio              | Peritecios |
| 38   | 1,06               | 0,50       | 1,00                | 1,00       | 0,94                 | 0,33       |
| 50   | 1,56               | 1,33       | 1,00                | 1,06       | 1,33                 | 1,50       |
| 54   | 1,33               | 0,89       | 1,00                | 1,11       | 1,00                 | 1,17       |
| 55   | 0,94               | 0,11       | 0,89                | 0,89       | 0,61                 | 0,22       |
| 90   | 1,00               | 0,17       | 1,00                | 1,00       | 0,78                 | 0,28       |
| 101  | 0,94               | 0,33       | 1,00                | 1,00       | 1,06                 | 1,00       |
| 104  | 1,17               | 1,00       | 1,22                | 1,00       | 1,11                 | 1,11       |
| Finca «La Represa» UTEQ (Segregante)   |                    |            |                     |            |                      |            |
| 15   | 1,22               | 1,00       | 1,00                | 1,06       | 1,11                 | 1,17       |
| 23   | 1,00               | 0,50       | 1,00                | 1,00       | 1,00                 | 1,06       |
| 25   | 1,17               | 1,00       | 1,00                | 1,00       | 1,22                 | 1,22       |
| 27   | 1,28               | 1,33       | 1,00                | 1,00       | 1,00                 | 1,44       |
| 28   | 1,00               | 0,89       | 1,00                | 1,00       | 1,00                 | 1,00       |
| 30   | 1,17               | 1,50       | 1,00                | 1,61       | 1,00                 | 1,78       |
| 32   | 1,00               | 0,89       | 1,00                | 1,00       | 1,11                 | 1,33       |
| Finca «La María» UTEQ (Segregante)   |                    |            |                     |            |                      |            |
| 6  | 1,17               | 1,00       | 1,00                | 1,06       | 1,00                 | 1,11       |



respectivamente, con niveles aceptables de resistencia frente a *Ceratocystis* spp. Los resultados obtenidos con el método que emplea tejidos de corteza fustal, revelaron la existencia de resistencia genética frente a la enfermedad de *S. parahybum* y brinda la oportunidad de contar con un método eficiente y confiable para incorporarlo en programas de

mejoramiento de la especie forestal. No obstante, pese que originalmente este método fue creado para evaluar resistencia genética en varias especies y clones de cacao frente a *C. fimbriata* (Delgado y Ehandi, 1965) ha demostrado que puede ser eficientemente aplicado en pachaco (figura 6).

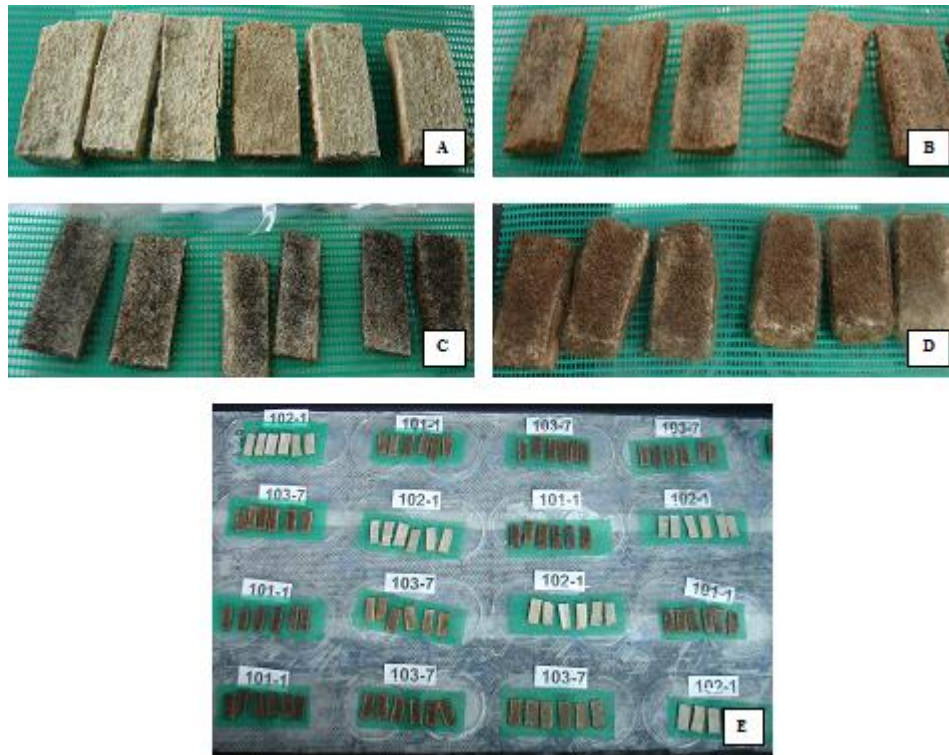


Figura 6. Respuesta de tejido fustal de árboles de *S. parahybum* a inoculaciones con *Ceratocystis* spp. A) Resistente, B) Moderadamente resistente, C) Susceptible, D) Muy susceptible, y E) Visualización de tejidos fustales de árboles inoculados, mostrando diferentes grados de infección (resistencia), empleando una escala de 0 a 4.

#### Evaluación de resistencia en la progenie de árboles seleccionados

De manera similar que se encontró variabilidad genética aprovechable, ésta variabilidad también estuvo presente en la fenología de los árboles seleccionados. La floración, fructificación y maduración de las semillas varió ampliamente entre un árbol y otro. Por tal razón, únicamente se recolectó semilla de 4 árboles: 1 resistente, 1 susceptible, y 2 moderadamente resistentes.

A pesar del relativamente escaso número de plántulas (10) inoculadas, estas presentaron un comportamiento variable frente a los microorganismos inoculados, indistintamente del árbol madre del cual procedían. El área de necrosis causada por los hongos, no llegó a superar los 2,38 y 2,48 cm<sup>2</sup> en todas las plantas inoculadas con

*C. moniliformis* y *C. paradoxa*, respectivamente, independiente que fueran descendientes de árboles susceptibles o resistentes. Cabe destacar que la descendencia del árbol 50 (moderadamente resistente) presentó la menor área de necrosis, asociada a dos hongos inoculados, con 1,04 y 1,36 cm<sup>2</sup> provocados por *C. fimbriata* y *C. paradoxa*, correspondientemente (figura 7).

El periodo de incubación de 30 días posteriores a la inoculación de las plantas, aparentemente fue muy corto, como para obtener resultados concluyentes que permitan diferenciar el efecto de los microorganismos y la capacidad de respuesta de las plantas descendientes de árboles con diferentes niveles de resistencia y/o susceptibilidad.

Debido a la naturaleza sistémica de la enfermedad de *S. parahybum*, esta patogénesis es progresiva y tardaría



largos periodos de tiempo desde la infección inicial, decaimiento de los árboles hasta su muerte definitiva. Queda demostrado que *C. moniliformis*, *C. paradoxa*, y *C. fimbriata*, son capaces de causar infección en plantas de *S. parahybum*, indistintamente que procedan de semillas originarias de árboles seleccionados como resistentes o susceptibles. No obstante, aun es prematuro asegurar que la descendencia (semillas) de árboles resistentes a la

enfermedad, sería una solución sostenible para enfrentar el problema fitosanitario de *S. parahybum* en el Trópico Húmedo Ecuatoriano, pero brinda una posibilidad que requiere ser investigada a más profundidad.

Considerando que este trabajo de investigación es pionero en Ecuador, aun faltan muchas inquietudes y posibilidades que dilucidar al respecto.

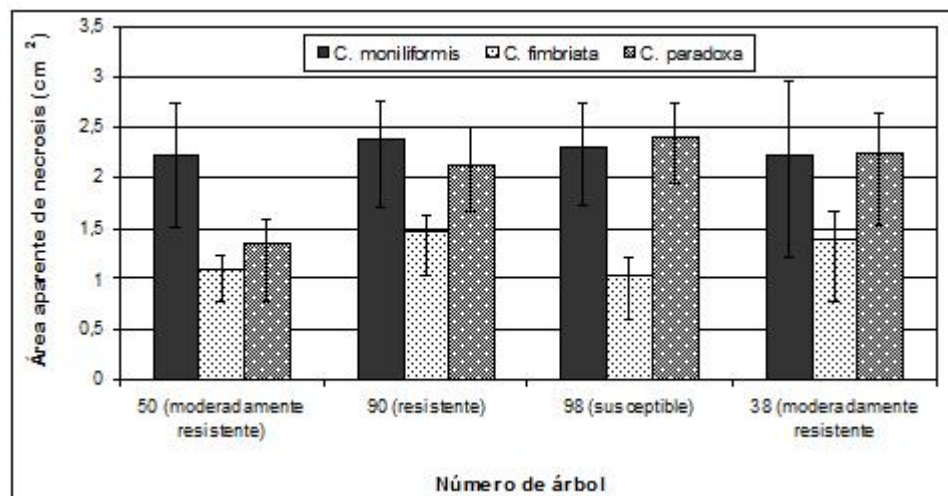


Figura 7. Área aparente de necrosis en plantas de *S. parahybum* de 7 meses de edad, inoculadas con *Ceratocystis* spp. Los valores representan la media de 10 plantas evaluadas, con barras de error estándar y coeficiente de variación.

## CONCLUSIONES

1. Los resultados demostraron la existencia de variabilidad genética en los rodales de introducción original y segregantes de *S. parahybum* en el Trópico Húmedo Ecuatoriano.
2. La mayor parte de la población evaluada (93,02 %) fue susceptible a la enfermedad ocasionada por el complejo *Ceratocystis* spp.
3. La presencia de resistencia genética, si bien, baja (6,98 %), es muy significativa y de gran importancia, ya que puede ser aprovechada en programas de mejoramiento genético de la especie forestal.
4. Es necesario desarrollar protocolos de multiplicación vegetativa para *S. parahybum*, con el objetivo de obtener clones de árboles seleccionados con probada resistencia genética frente al complejo *Ceratocystis* spp.

## REFERENCIAS

- Belezaca, C., y Suárez C.** 2001. Agentes Bióticos que causan la muerte de *Schizolobium parahybum* (pachaco) en la zona central del Litoral Ecuatoriano. **In** Memorias de XI Seminario Nacional de Sanidad Vegetal. Universidad Técnica de Babahoyo. Babahoyo, Ecuador. p 212-221.
- Belezaca, C.** 2002. Etiología y Manejo de la Pudrición del fuste de *Schizolobium parahybum* (pachaco) en la zona Central del Litoral Ecuatoriano. Tesis de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Ambientales (FF.CC.AA). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 64 p.
- Belezaca, C., y C. Suárez.** 2003. Muerte regresiva de *Schizolobium parahybum* (pachaco) en el Trópico Ecuatoriano. **In** Memories XII World Forestry Congress, Québec – Canada. 0294-B3.
- Belezaca, C., Cedeño, P., Mora, M., Díaz, G. y C. Suárez.** 2009. Evidencia de *Ceratocystis* spp. atacando árboles de

- Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (pachaco) en Ecuador. **In** Memorias del XV Congreso Latinoamericano de Fitopatología, y XVIII Congreso Chileno de Fitopatología. ALF, ACF. Santiago de Chile. p 168.
- Canchignia-Martínez, H.F., Hernández-Delgado, S., González-Paz, M., Motte, E., and Mayek-Pérez, N.** 2007. Genetic Relationships among *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (Leguminosae) Ecotypes from Ecuador and other Countries. *Silvae Genetica*, 56(5): 214-221.
- Cannon, P.** 1990. Patología Forestal en el Ecuador. Unidad de protección forestal DINAF/MAG-USAID. Centro de investigaciones y capacitación Conocoto. Quito, Ecuador.
- Commonwealth Mycological Institute (CMI).** 1983. Plant pathologist's Pocketbook. Eds. Johnston, A, Booth, C. and Austwick P.K.C. London, [Great Britain](#). 439 p.
- Delgado J. y Echandy, E.** 1965. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal de machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. *Turrialba*, 15 (4), 286-289.
- Delgado, R. y Suárez, C.** 2003. Evaluación de la resistencia al mal del machete en clones internacionales de cacao en Ecuador. **In** International Cocoa Research Conference. Accra, Ghana. Proceedings.
- Espinoza, A., y Delgado, J.** 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 (1), 13-17.
- Estrada, A.W.** 1997. Manual para la producción de pachaco (*Schizolobium parahybum* (Vellozo) Blake. Corporación de Desarrollo Forestal y Maderero. Serie: Manual para la Producción – CORMADERA, No.6. Quito – Ecuador. 51 p.
- Geldenhuis, M., Roux, J., Wingfield, B., De Beer, Z., and Wingfield, M.** 2002. Ophiostomatoid fungi associated with diseased *Schizolobium parahybum*. **In** Summary: Back. 2001 APS/MSA/SON Joint Meeting APS abstracts.
- Hanlin, R.** 1992. Illustrated genera of Ascomycetes. APS. PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. p 18-20 ; 48-49.
- Hunt, J.** 1956. Taxonomy of the Genus *Ceratocystis*. *Lloydia*. Vol. 19. (N° 1). EE.UU. 58 p.
- Martínez, M.** 2004. Patogenicidad de varias especies de *Ceratocystis* en *Schizolobium parahybum* (pachaco), *Ochroma lagopus* (balsa), y *Theobroma cacao* (caco). Tesis de Ing. Forestal. Facultad de Ciencia Ambientales. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 86 p.
- Miño, C.** 1994. Determinación de resistencia de 250 clones de cacao de origen nacional al ataque de mal del machete (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted). Tesis de Ing. Agrónomo, Universidad Agraria del Ecuador. 78 p.
- Ramírez, W.** 1990. Determinación e identificación de los agentes causales de la pudrición del fuste del pachaco en la zona central del litoral Ecuatoriano. Tesis de Ing. Forestal. Universidad Nacional de Loja. 60 p.
- Roux, J., Geldenhuis, M., Wingfield, M., Montenegro, F. and Wingfield, B.** 2000. *Ceratocystis* Diseases of *Schizolobium parahybum* in Ecuador. **In** Proceedings of the 38<sup>th</sup> congress of the Southern African Society for Plant Pathology, Grahamstown, 26-28.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de esta investigación al Consejo Nacional de Educación Superior del Ecuador (CONESUP), quien contribuyó económicamente al proyecto **CICYTPP0359JAICON**.