



INSTITUTO LATINOAMERICANO  
ECONOMÍA, SOCIEDAD Y POLÍTICA  
(ILAESP)

DESARROLLO RURAL Y SEGURIDAD  
ALIMENTARIA

HONGOS ASOCIADOS AL SIGNO DE *Moniliophthora roreri* EN CULTIVO DE  
CACAO (*Theobroma cacao* L.): MUNICIPIO DE HUIMANGUILLO-INIFAP,  
TABASCO- MÉXICO

ROXANA BORDA MAMANI

Trabajo de conclusión de curso presentado al Instituto Latinoamericano de Economía, Sociedad y Política de la Universidad Federal de la Integración Latino Americana, como requisito parcial a la obtención del título de Bachiller en Desarrollo Rural y Seguridad Alimentaria.

Orientador: Profa. Dra. Ana Alice Aguiar Eleuterio

Co-orientador: Biol. Marcos Espadas Reséndiz

Foz do Iguazu  
2023

ROXANA BORDA MAMANI

HONGOS ASOCIADOS AL SIGNO DE *Moniliophthora roreri* EN CULTIVO DE  
CACAO (*Theobroma cacao* L.): MUNICIPIO DE HUIMANGUILLO-INIFAP,  
TABASCO - MÉXICO

Trabajo de conclusión de curso presentado al Instituto Latinoamericano de Economía, Sociedad y Política de la Universidad Federal de la Integración Latino Americana, como requisito parcial a la obtención del título de Bachiller en Desarrollo Rural y Seguridad Alimentaria.

1. BANCA EXAMINADORA

---

Orientador: Profa. Dra. Ana Alice Aguiar Eleuterio  
UNILA

---

Coorientador: Prof. Biol. Marcos Espadas Reséndiz  
UNAM

---

Prof. Dra. Silvia Aparecida Zimmermann  
UNILA

---

Prof. Dr. Samuel Henrique Kamphorst  
UNILA

Foz do Iguaçu, 03 de novembro de 2023.

Dedico el presente trabajo a todas las personas, y pueda ser el inicio para fomentar la investigación en enfermedades fitopatológicas en productos agrícolas de importancia económica como el cacao, y de esta forma poder aportar hacia el avance del desarrollo rural.

## **AGRADECIMIENTOS**

Siento un eterno agradecimiento hacia nuestra Madre Tierra, a quien considero que siempre me ha cuidado, y justamente por ello, me incliné hacia esta rama de la ciencia, al cuidado de las plantas, como una semilla. Todos somos una semilla y como tal, estamos en diferentes procesos de desarrollo y tenemos que ser resilientes, más aún cuando nos encontramos ante los efectos del cambio climático.

Seguidamente, doy gracias a mi madre quien me trajo a este mundo, y desde sus diversas imposibilidades me brindó su abrigo y, siempre quiso que fuera más que ella, y como mujer marcar la diferencia, como una nueva generación.

También, un eterno agradecimiento a mis asesores de tesis el Biol. Marcos Espadas, quien me brindó todo su apoyo, dedicación y su valioso tiempo, para que pueda concluir con esta fase de mi formación. Asimismo, agradezco a la Biol. Ana Alice Eleuterio, quien desde mi primera casa de estudios de UNILA, me inculcó la disciplina, responsabilidad. De igual forma un reconocimiento especial a la Dra. Gloria Zita, quien compartió sus conocimientos los cuales los valoro y estimo.

Asimismo, una eterna gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM, la cual es mi segunda casa maravillosa de estudios y quien en todo momento me brindó todo el apoyo. Por consiguiente, a todos los estudiantes, que me dejaron grandes enseñanzas y se tejieron grandes lazos de amistad.

Termino agradeciendo infinitamente a todas las personas que colocaron su granito de arena y creyeron en mis sueños. Personas maravillosas que, sin conocerme bien, me estrecharon su corazón, algunas más que una familia, y les estaré eternamente agradecida.

*“Nosotros solo estamos de paso por esta Tierra, por ello debemos dejar buenas semillas para las próximas generaciones, también debemos vivir el hoy, llamado presente, porque hoy estamos, y mañana quien sabe...”*

*Rox Borda*

BORDA MAMANI, Roxana. Hongos asociados al signo de *Moniliophthora roreri* en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.): municipio de Huimanguillo-INIFAP, Tabasco - México. 2023. 91 p. Trabajo de conclusión de curso (Desarrollo Rural y Seguridad Alimentaria) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

## RESUMO

*Theobroma cacao* L., o cacau, é uma cultura perene dos trópicos da América. A principal limitação da produção é a doença conhecida como monília ou podridão congelada, causada por um fungo basidiomiceto parasita que afeta principalmente as vagens, causando danos internos e externos. O agente causador é o fitopatógeno da espécie *Moniliophthora roreri*. Está distribuído em toda a América do Norte, América Central e América do Sul, sendo encontrado em 14 países. Devido à agressividade do fitopatógeno, o impacto das perdas causadas pela monília varia de 5% a 100% da produção de cacau. No entanto, existe uma diversidade de microflora fúngica associada ao signo de *M. roreri*, formada por micoparasitas, antagonistas, que possuem potencial de controle biológico para *M. roreri*. O objetivo do estudo foi isolar e identificar os fungos associados ao signo de *M. roreri*, a partir da coleta do campo, mediante os dois primeiros postulados de Koch. Foram obtidos sete gêneros associados ao signo de *M. roreri*, que são: *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Clonostachys*, *Acremonium* e *Trichoderma*. Além disso, cinco dos gêneros associados ao signo, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, também foram encontrados no sinal e sintoma da doença. Esses gêneros são reportados como hiperparasitas, antagonistas com potencial de controle biológico para *M. roreri*.

**Palavras-chave:** Controle biológico, fungos hiperparasitários, podridão congelada.

BORDA MAMANI, Roxana. Hongos asociados al signo de *Moniliophthora roreri* en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.): municipio de Huimanguillo-INIFAP, Tabasco - México. 2023. 91 p. Trabajo de conclusión de curso (Desarrollo Rural y Seguridad Alimentaria) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

## RESUMEN

*Theobroma cacao* L., el cacao, es un cultivo perenne de los trópicos de América. La principal limitante de la producción es la enfermedad conocida como la monilia o podredumbre helada, un basidiomiceto parásito, fúngico que afecta principalmente a las mazorcas del cacao, causando daño interno y externo. El agente causal es el fitopatógeno de la especie *Moniliophthora roreri*. Se encuentra distribuida a nivel de Norteamérica, América Central y Sur, siendo reportado en 14 países. Debido a la agresividad del fitopatógeno, el impacto de las pérdidas causadas por monilia oscila entre el 5% hasta el 100% de la producción del cacao. Sin embargo, existe una diversidad de microflora de hongos asociada al signo de *M. roreri*, denominados como micoparásitos, antagonistas, que cuentan con el potencial de control biológico para *M. roreri*. El objetivo del estudio fue aislar e identificar los hongos asociados al signo de *M. roreri*, a partir de la colecta en campo mediante los dos primeros postulados de Koch. Se obtuvieron siete géneros asociados al signo de *M. roreri* los cuales son: *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Clonostachys*, *Acremonium* y *Trichoderma*. Sin embargo, los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Cladosporium* y *Penicillium* también se encontraron tanto en el signo como en el síntoma de la enfermedad. Estos géneros se encuentran reportados como hiperparásitos, antagonistas con potencial de control biológico para *M. roreri*.

**Palabras-clave:** Control biológico. Hongos hiperparásitos, Podredumbre helada.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principales países productores de cacao a nivel mundial (tn) por año.....	20
Figura 2 – Producción de cacao en grano a nivel de América Latina .....	21

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 – Variedad de cacao, resistentes a moniliasis del cacao.....	18
Tabla 2 – Distribución geográfica del patógeno a nivel de América Latina y las fechas en que fueron reportados por primera vez en cada país.....	24
Tabla 3 – Total de cepas puras obtenidas a partir de los aislamientos realizados a partir del signo de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	40
Tabla 4 – Géneros reportados como micoparásitos en cultivo de cacao.....	63
Tabla 5 – Géneros reportados como hongos epífitos en cultivo de cacao.....	63
Tabla 6 – Hongos reportados como endófitos en el cultivo de cacao.....	64

## LISTA DE IMAGENES

Imagen 1 – Localización de INIFAP, 17.848619,93.392940 Huimanguillo, Tabasco.	29
Imagen 2 – Variedad de cacao RIM 75, con síntomas y signos de la monilia...	30
Imagen 3 – Variedades de cacao colectados con signos de monilia...	31
Imagen 4 – Materiales y equipos para realizar la validación .....	32
Imagen 5 – Materiales y medios de cultivos específicos.....	33
Imagen 6 – Variedad de cacao ET48, con síntomas de monilia.....	34
Imagen 7 – Cacao var. criollo, con signo de monilia.....	35
Imagen 8 – Dilución en serie de partes vegetales.....	35
Imagen 9 – Cultivo monospórico.....	36
Imagen 10 – Mazorcas de cacao con signos y síntoma de monilia.....	38
Imagen 11 – Cacao criollo con presencia de controladores biológicos .....	39
Imagen 12 – Hiperparásitos creciendo sobre colonia de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	40
Imagen 13 – Cepa pura de <i>M. roreri</i> y su estructura a nivel micro.....	42
Imagen 14 – Colonia de <i>Penicillium</i> sp. en medio de cultivo PDA.....	42
Imagen 15 – Cepa pura de <i>Gliocladium</i> sp. en medio de cultivo PDA .....	43
Imagen 16 – Cepa pura de <i>Cladosporium</i> sp. en V8a.....	43
Imagen 17 – Cepa pura de <i>Fusarium</i> sp. en PDA.....	44
Imagen 18 – Cepa pura de <i>Colletotrichum</i> sp. en V8a .....	44
Imagen 19 – Cepa de <i>Trichoderma</i> sp. en medio de PDA.....	45
Imagen 20 – Microcultivos de 18 especies de hongos aislados de mazorcas de cacao.....	45
Imagen 21 – Cepa pura de <i>Moniliophthora roreri</i> en tres medios de cultivos.....	46
Imagen 22 – Micrografías de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	47
Imagen 23 – Cepa pura de <i>Colletotrichum</i> sp. – RIM 75.....	48
Imagen 24 – Micrografías del género <i>Colletotrichum</i> sp.....	49
Imagen 25 – Cepa RIM 75 <i>Fusarium</i> sp.....	50
Imagen 26 – Micrografías de <i>Fusarium</i> sp.....	51
Imagen 27 – Cepa <i>Acremonium</i> : cepa c-15 M2A .....	52
Imagen 28 – Cepa de <i>Cladosporium</i> (C-15) en medio de cultivo PDA.....	53
Imagen 29 – Micrografías del género <i>Cladosporium</i> .....	54
Imagen 30 – Cepa de <i>Clonostachys</i> sp. en V8a.....	55

Imagem 31 – Micrografias del género de <i>Clonostachys</i> sp.....	56
Imagem 32 – Micrografias del género de <i>Clonostachys</i> sp.....	57
Imagem 33 – Cepa de <i>Penicillium</i> sp.....	57
Imagem 34 – Micrografias del género <i>Penicillium</i> sp.....	59
Imagem 35 – Cepa pura de <i>Trichoderma</i> sp. en medio de PDA.....	60
Imagem 36 – Micrografias del género de <i>Trichoderma</i> sp .....	61

## Sumário

1. INTRODUCCIÓN .....	15
1.1 OBJETIVOS .....	19
2. MARCO TEÓRICO .....	20
2.1 PRODUCCIÓN DE CACAO A NIVEL MUNDIAL .....	20
2.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA .....	21
2.3 PRINCIPALES ENFERMEDADES FÚNGICAS DEL CACAO.....	22
2.3.1 Descripción de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	23
2.4 CONTEXTUALIZACIÓN HISTÓRICA DE <i>Moniliophthora roreri</i> .....	23
2.5 DISTRIBUCIÓN DEL FITOPATÓGENO .....	24
2.6 HONGOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE CACAO ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	25
2.6.1 Hongos endófitos .....	26
2.6.2 Hongos hiperparásitos .....	27
3 METODOLOGÍA.....	29
3.1 COLECTA DE MUESTRAS EN CAMPO .....	29
3.2 TRABAJO DE COLECTA EN LABORATORIO .....	30
3.3 VALIDACIÓN .....	31
3.4 MEDIOS DE CULTIVO .....	32
3.4.1 Preparación de medios de cultivo .....	32
3.5 TÉCNICAS DE AISLAMIENTO .....	33
3.5.1 Aislamiento por método directo (mazorca).....	33
3.5.2 Dilución en serie (mazorca de cacao).....	34
3.5.3 Unidades formadoras de colonias (UFC).....	35
3.5.4 Cultivo monospórico .....	35
3.6 Cultivo de cepas puras.....	36
3.7 Conservación de cepas puras en papel filtro y sílica gel.....	36
3.7.1 Identificación cultural .....	37
3.7.2 Microcultivo.....	37
4. RESULTADOS .....	38
4.1 RESULTADOS DE COLECTA .....	38
4.2 RESULTADOS DE VALIDACIÓN .....	38
4.3 RESULTADO DE CEPAS PURAS AISLADAS .....	40
4.3.1 Resultados de aislamiento por método directo .....	41

4.3.2 Resultado de aislamiento por método dilución en serie .....	44
4.6 RESULTADO DE MICROCULTIVO .....	45
4.7 Descripción cultural y morfométrica de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	46
.....	46
4.8 DESCRIPCIÓN CULTURAL Y MORFOMÉTRICA DE HONGOS AISLADOS .47	
4.8.1 Hongos asociados al signo de <i>Moniliophthora roreri</i> reportados con potencial de control biológico.....	47
5. DISCUSIÓN .....	62
6. CONCLUSIONES.....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
GLOSARIO.....	76
ANEXO A – Formato de colecta de ejemplares fitopatológicas (campo).....	77
ANEXO B – PROTOCOLOS .....	80
1. AISLAMIENTO DE <i>MONILIOPTHORA RORERI</i> POR MÉTODO DIRECTO .....	80
2. GUARDADO Y CONSERVACIÓN EN SÍLICA GEL .....	80
3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO .....	83
4. TÉCNICA DE VALIDACIÓN TEMPORAL EN CINTA ADHESIVA CON AZUL LACTOFENOL.....	87
5.1. Aislamiento por método directo.....	87
5.2. Dilución en serie de partes vegetales .....	88
5.3. Cultivo monospórico .....	89
6. CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA .....	90
7. MICROCULTIVO .....	91



## 1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo durante la movilidad académica del año 2019, en la Universidad Nacional Autónoma de México, FESC-4 Cuautitlán Izcalli, México. Durante mi estancia llevé materias como Fitopatología, Extensión Rural, Apicultura, entre otras. Mucho antes de llevar a cabo la movilidad lleve la materia de Agroecología y me interesó el tema de los controladores biológicos, los enemigos naturales para ciertas plagas que afectan a los cultivos, debates sobre el uso de agrotóxicos, la producción agroecológica y la producción intensiva que también se tocaba en otras materias. Así que empecé a ver que materias más podría llevar para complementar sobre los controladores y buscar alternativas, soluciones para el control de las plagas y enfermedades que afectan a los cultivos agrícolas. Por otra parte, también tenía curiosidad sobre la roya del café que de los años 90 a 2000 en mi localidad afectó al cultivo, y se perdieron hectáreas de producción. Mi familia y yo, por ejemplo, abandonamos el cultivo, y otras se quemaron. En esos tiempos era niña y no entendía la gravedad del problema.

Esos recuerdos, curiosidad y necesidad volví a encontrar en Brasil, cuando estudiaba y aún más preocupante sobre el uso de los agroquímicos y los daños que causan a los ecosistemas. Por ello, cuando busqué la movilidad académica, también tenía que cumplir ese detalle, que me puedan ayudar allá, por ello elegí las materias mencionadas. La UNAM y los profesores me apoyaron y por ello, viajé a la Práctica de Campo IV de la Carrera de Ingeniería Agrícola, al Sur la parte tropical, de donde visitamos el estado de Chiapas, Tabasco, donde se hizo las colectas de las parcelas de investigación del INIFAP. El Dr. Azpeitia, quien trabaja con mejoramiento genético de cacao, me apoyo en la colecta. Las muestras fueron trabajadas desde enero del 2020 hasta noviembre del mismo año, en plena pandemia del COVID-19. Tuve gran apoyo por parte de la UNAM y a disposición el Laboratorio de Fitopatología, porque cuando se trabaja con microorganismos no puede quedar paralizado y se tenía que continuar y alcanzar los objetivos, y solo así se logró concluir con el TCC.

El abordar el tema de sanidad vegetal es fundamental para hablar sobre el desarrollo rural y seguridad alimentaria, porque las pérdidas productivas y económicas sobre todo en los pequeños productores son altas, y es una de las limitantes para la agricultura familiar. Peor aún que no reciben asistencia técnica, ni transferencia de

tecnología, como fue el caso de mi familia, que perdimos todo el cultivo y así muchos agricultores. Otro detalle fundamental es la soberanía y seguridad alimentaria. Los fitopatógenos en especial los hongos son los principales que afectan en cada cadena productiva desde las semillas, plantación, cultivo y almacenamiento. Por ello, considero que es crucial, abordar el tema de sanidad vegetal como una prioridad que al momento de formular las políticas públicas de desarrollo rural y seguridad alimentaria puedan resaltar este tema, y que los estados deben proponer campañas de control y manejo, medidas fitosanitarias en todo el territorio y el fortalecimiento de capacidades de los productores, que al final son los que sufren más por el efecto que deja en sus cultivos agrícolas, debido a la pérdida en su producción y económicamente.

El cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) es afectado por enfermedades como la mazorca negra, antracnosis, escoba de bruja, monilia (Hebbar, 2007; Bailey *et al.*, 2008). Esta última es una de las principales limitantes para la producción, debido a la agresividad e impacto económico y social que causa a los productores. La monilia es una enfermedad fitopatógena principal (Ploetz, 2007), que afecta a los géneros de *Theobroma* y *Herrania*, también es conocida como: moniliasis, pudrición acuosa, podredumbre helada. Es un basidiomiceto parásito (Phillips *et al.*, 2007) de la familia Marasmiaceae, que invade sólo vainas de cacao, causa daño interno y externo en las mazorcas (Phillips; Wilkinson, 2007; Báez *et al.*, 2014; Freile *et al.*, 2018). La enfermedad es causada por la especie de *Moniliophthora roreri* (Evans *et al.*, 1978).

El centro de origen de la enfermedad es Ecuador y Colombia (Evans *et al.*, 2013). Actualmente, se encuentra reportada en 14 países de América Latina (Phillips, 2017). Las pérdidas causadas por la enfermedad en Costa Rica son del 100% (Krauss *et al.*, 2003), Ecuador entre 20% y 80% (Evans, 1981), Colombia de 40% a 100% (Jaimes; Aranzazu, 2010), Perú mayor al 50% (Organización Internacional del Cacao, 2017). A su vez, en México se ha reportado pérdidas del 5% hasta el 95% (Sagarpa, 2014), en el Estado de Tabasco afecta de 30% a 100%, afectando del rendimiento (Barrón *et al.*, 2014), y en el Estado de Chiapas que es el mayor productor del país, se ve afectado al 100% del cultivo y destruye el 76.98% de la producción (Senasica, 2018).

En los cultivos agrícolas de importancia económica como el cacao, las pérdidas económicas son afectadas principalmente por hongos. Por otro lado, en la agricultura

el uso de los agroquímicos es caro económicamente para los productores, y también no es favorable en aspectos ambientales, a comparación del control biológico. A nivel de control, se presentan cuatro tipos:

El Control cultural hace referencia a las actividades y acciones que los agricultores pueden llevar a cabo, para el cual se deben seguir los siguientes pasos: Disminuir los niveles de sombreado excesivos, buena distribución de los árboles, manejo de podas que disminuye la altura para un mejor manejo del cultivo, implementación del RE-SE, que significa tener las programaciones semanales de remoción de frutos enfermos, fertilización del cultivo de acuerdo a su plan de nutrición y finalmente en la cosecha se deja las cáscaras separadas de las mazorcas enfermas, para evitar la supervivencia del patógeno.

El segundo método es el control biológico, que según Baker y Cook (1974), se define como la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado vivo o durmiente lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar. Es así que, cuando observamos la mazorca de cacao con el signo (enfermedad visible) la monilia, existe una microflora de hongos denominados benéficos, antagonistas, hiperparásitos que se encuentran asociados y desarrollándose junto al fitopatógeno de *M. royeri*. Así, la diversidad microbiana presente en los cultivos como el cacao ofrece una gran variedad de hongos con potencial antagónico para controlar las enfermedades de *Theobroma cacao* (Bailey *et al.*, 2008), entre ellos tenemos a las especies de *Clonostachys rosea* y *Trichoderma* spp., reportados como micoparásitos (Krauss; Soberanis, 2001), *Verticillium* spp. (Krauss *et al.*, 2003, Aranzazu *et al.*, 2010), *Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea* (Mejía *et al.*, 2008), *T. harzianum*, reportado como antagonista (Bolaños *et al.*, 2016), *Trichoderma ovalisporum*, reportado como micoparásito (Holmes; Samuels, 2006), *Clonostachys rosea*, *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. también como micoparásitos por Hoopen y colaboradores (2003), *T. ovalisporum* y *T. koningiopsis* como epifito y endofítico (Yáñez *et al.*, 2017), *Clonostachys rossea*, (Krauss y Soberanis, 2001; Hidalgo *et al.*, 2003), *Trichoderma longipis* (Krauss y Soberanis., 2001), *Trichoderma stromaticum* (Krauss y Soberanis, 2002), *Trichoderma theobromicola* (Samuels *et al.*, 2006).

El tercer método es el control genético. En la actualidad existen genotipos reportados como resistentes a la “moniliasis” como: ICS 95 (Trinidad y Tobago), UF 273 (Costa Rica), PA 169 (Perú), EET 233 (Ecuador) y EET 183(Ecuador) (Phillis-Mora *et al.*, 2009). Estos materiales fueron introducidos por el INIFAP en el año 2006 a México (Azpeitia *et al.*, 2009).

**Tabla 01: Variedad de cacao, resistentes a moniliasis del cacao.**

N.º	Variedad	% resistencia a moniliasis del cacao
1	Cha	74
2	Olmecca	86
3	Tabascoob	99
4	Caehui	90
5	Canek	80

Fuente: Autoría propia, modificado a partir de (INIFAP, 2022).

El cuarto método es el Control químico, que de acuerdo al Modo y Mecanismo de acción (FRAC, 2022), se encuentran reportados los siguientes fungicidas: Azoxistrobin, (C3-Estrobirulinas) Trifloxystrobin, Oximinoacetatos, son fungicidas sistémicos actúan principalmente en la respiración; Propiconazol, Tebuconazol, triadimefon (G-1 triazoles) biosíntesis de esterol en las membranas, y clortalonil (M-cloronitrilos ftalonitrilos) tiene actividad de contacto multi-sitio. En frutos jóvenes (chilillos) con infección natural de campo, una aplicación de azoxystrobin, trifloxystrobin, (C-3 Estrobirulinas) tebuconazol o propiconazol (G1 triazoles) (0.8 l.a.g./L), complementada con aplicaciones mensuales de hidróxido de cobre (7.5 l.a.g/L) por tres meses, disminuyó significativamente la incidencia de la moniliasis del cacao, (Torres *et al.*, 2019).

En relación a los cuatro métodos de control presentados para la moniliasis, el presente trabajo busca sumar al control biológico, puesto que es más amigable con el medio ambiente a comparación del control químico. Además, al aplicar el control cultural y sumado a ello el control biológico es más eficiente poder manejar la enfermedad y también son alternativas que los agricultores podrían acceder y

finalmente contribuir ambientalmente. Además, los géneros reportados como controladores biológicos por la (FRAC,2022), cuentan con estudios comprobados.

Por consiguiente, la presente investigación objetiva aislar e identificar los hongos asociados al signo de *Moniliophthora roreri* en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), a partir de la colecta en campo. Para poder hacer una prospección de hongos hiperparásitos y que puedan servir para las próximas investigaciones de control biológico para la moniliasis del cacao.

## 1.1 OBJETIVOS

- Realizar prospección de los hongos asociados al signo de *Moniliophthora roreri* en (*Theobroma cacao* L.) a partir de la colecta en campo.

### Objetivos específicos

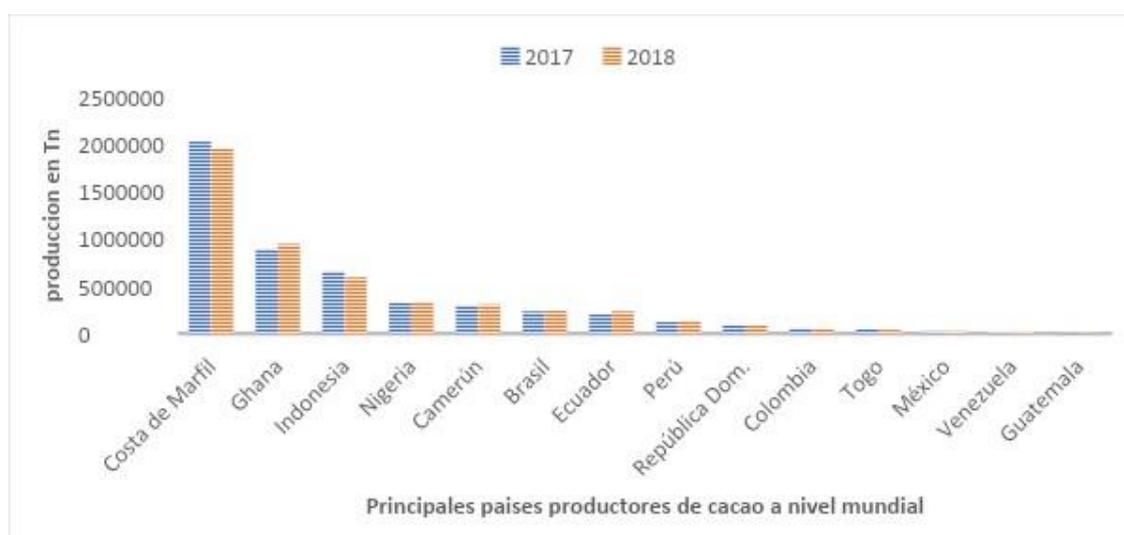
- Aislar los hongos asociados por diferentes métodos a partir del signo.
- Realizar fichas electrónicas del microbiota asociado a *Moniliophthora roreri*.
- Generar un cepario de hongos asociados a *M. roreri*, a partir del signo.
- Respaldar el cepario de hongos aislados por fichas electrónicas.
- Disponer de material biológico para posteriores investigaciones para control de *Moniliophthora roreri*.
- Generar protocolo para el aislamiento de *M. roreri*.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 PRODUCCIÓN DE CACAO A NIVEL MUNDIAL

La mayor producción de cacao se encuentra en África, principalmente en los países de Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún, que aportan el 66% de la oferta y como segundo lugar del continente asiático, tal como se muestra en la (Figura 1) se tiene a Indonesia que aporta el 17.5% (Sánchez *et al.*, 2019).

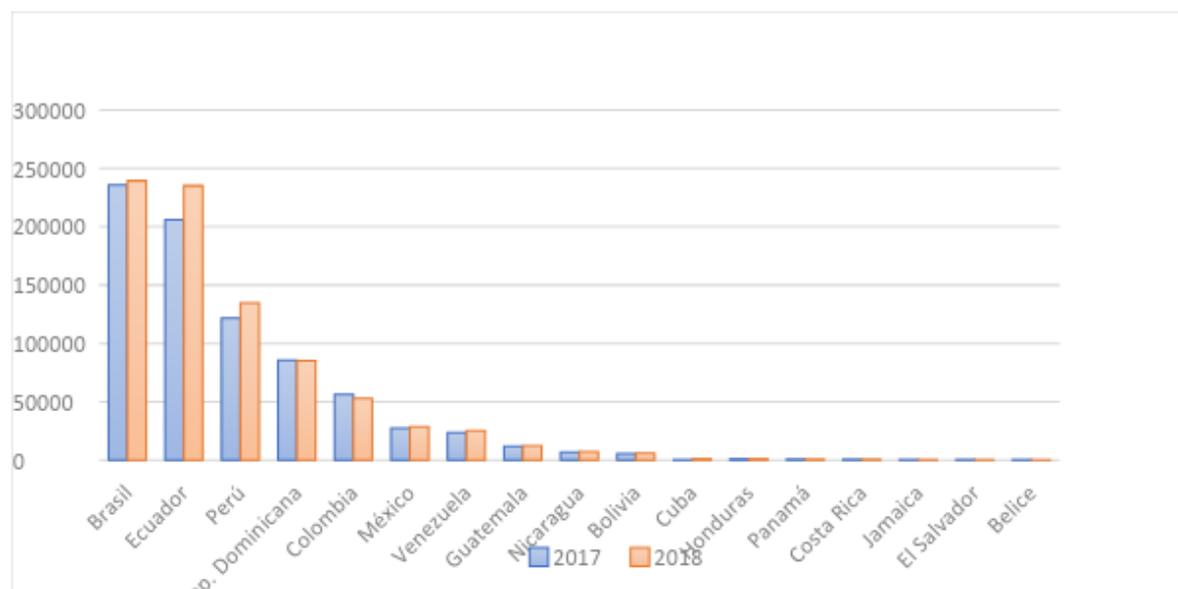
**Figura 1 – Principales países productores de cacao a nivel mundial (tn) por año**



Fuente: elaborado a partir de FAO (2019).

A nivel de América Latina y el Caribe, se encuentran Brasil, Ecuador, Perú, República Dominicana y Colombia como mayores productores de cacao (Figura 2), con una producción de 239384 y 52743 toneladas anuales (FAO, 2019).

**Figura 2 – Producción de cacao en grano a nivel de América Latina**



Fuente: elaborado a partir de FAO (2019).

## 2.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de zonas tropicales, que se encuentra presente en regiones de América central y sur. Es un árbol perenne, nativo de los trópicos, que fue domesticado por las antiguas culturas como los Olmecas, Mayas y Aztecas, ubicados en Mesoamérica. El impacto causado por *Moniliophthora roreri* puede provocar hasta el 100% de pérdidas de la cosecha, que se refleja en los aspectos socioeconómicos (Báez *et al.*, 2014), y a esto añaden Orea y colaboradores (2017) que las pérdidas económicas son del 16% a 90% y en algunos casos es el 100%, cuando se tiene abandono del cultivo.

El panorama a nivel mundial del cultivo de cacao presenta pérdidas superiores al 30% a causa de las enfermedades que afectan a la disminución constante de la productividad y reducción en calidad (Krauss *et al.*, 2013). Por esta razón, el diagnóstico de los hongos fitopatógenos asociados al cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) es relevante. A continuación, en los siguientes párrafos, se mencionan los porcentajes de pérdidas ocasionadas principalmente por la enfermedad denominada como la vaina o podredumbre heladas.

La enfermedad en Venezuela se reportó oficialmente por primera vez en la región del río Catatumbo, estado de Zulia, en 1941 (Phillips; Wilkinson, 2007). Para el

año de 1956, la presencia de *M. rozeri* en Panamá marcó una expansión significativa del hongo a través de Mesoamérica (Phillips; Wilkinson, 2007).

Costa Rica tuvo una reducción del 65% en su producción en un período de dos años posteriores a 1978 a causa de *M. rozeri*, (Murillo; Gonzáles, 1984). Según mencionan Krauss y colaboradores (2003), *M. rozeri* “es la enfermedad más severa del cacao en Costa Rica, desde su aparición en 1978. Las pérdidas reportadas por los agricultores son hasta el 100% y abandono de fincas”.

Las pérdidas causadas por el hongo datan de 1909 en el sur occidente de Ecuador (Evans, 1981). En los últimos años existen reportes de *Moniliophthora rozeri*, que oscilan desde el 20 a 80% en la producción, con relación a la vaina negra causada por *Phytophthora* (Freile *et al.*, 2018; Hebbbar, 2007). Adicionalmente, los cultivos son susceptibles a la vaina helada y escoba de bruja (Jaimes; Aranzazu, 2010). En consecuencia, la enfermedad en Colombia puede causar pérdidas entre el 40% y 100% de la producción (Jaimes; Aranzazu 2010). A su vez, en el Perú, la monilia causa daño en las mazorcas y almendras, causando pérdidas en más del 50%, lo que también pone en riesgo el mantenimiento de material genético nativo (Organización Internacional del Cacao, 2017).

Los primeros reportes sobre la podredumbre helada en Guatemala en 2002 (Phillips; Wilkinson, 2007), Belize en 2004 (Phillips *et al.*, 2006a), y en México, cuenta con el primer reporte sobre la monilia en el año 2005 (Phillips *et al.*, 2006b). La producción de cacao en México se concentra en tres estados, Tabasco, Chiapas y Guerrero, con 70%, 29% y 1% de la producción nacional, respectivamente.

Sin embargo, el cultivo presenta problemas de plagas y enfermedades, como la monilia, que puede causar pérdidas de 5% hasta el 95% de las cosechas (Sagarpa, 2014). No obstante, Chiapas reporta pérdidas de hasta el 100% de las cosechas de acuerdo con la región y condiciones climáticas. Para el año de 2018, en los estados de Chiapas y Tabasco, se identificaron enfermedades como la moniliasis, mancha negra, antracnosis, donde se destacó que *Moniliophthora rozeri*, es una limitante para la sobrevivencia del cacao criollo en Chiapas, ya que afecta al 100% del cultivo y destruye el 76.98% de la producción (Senasica, 2018).

### 2.3 PRINCIPALES ENFERMEDADES FÚNGICAS DEL CACAO

Las principales enfermedades asociadas al cultivo de cacao son la vaina negra causada por el género de *Phytophthora*, la escoba de bruja por *Crinipellis perniciosa* o *Moniliophthora perniciosa* y la vaina helada por *Moniliophthora roreri* (Bailey *et al.*, 2008; Hebbbar, 2007). Esta última cuenta con su centro de origen en América del Sur, específicamente en los países de Ecuador y Colombia (Evans *et al.*, 2013). Además, son las enfermedades más devastadoras del cacao (Aime; Phillips, 2005). Por esta razón, este patógeno es considerado a nivel mundial como el principal problema fitosanitario que enfrenta la producción de cacao (Ploetz, 2007), a nivel de hongos fitopatógenos.

### 2.3.1 Descripción de *Moniliophthora roreri*

La especie *M. roreri* es uno de los patógenos más importantes del cacao. El agente causador, que antes se conocía como *Monilia roreri* Cif., y sólo después se descubrió que era un basidiomiceto (Evans *et al.*, 1978). De acuerdo con la descripción de Halliday (1980), a nivel cultural el crecimiento en medio de cultivo con agar de malta es lento, colonia de 8-15 mm de diámetro después de dos semanas como lana o felpa; primero salmón ocráceo pálido o piel de gallina rosada, después como a piel de canela a color arcilla o marrón a piel de albaricoque.

## 2.4 CONTEXTUALIZACIÓN HISTÓRICA DE *Moniliophthora roreri*

El agente causal de la vaina helada, antes de 1917, era desconocido y severo, y dañaba el cultivo de cacao. En consecuencia, Ecuador realizó la invitación al micólogo James Birch Rorer, quien, en 1918, envió las muestras al Dr. Ralf E. Smith de la Universidad de California, y determinó que el hongo pertenecía al género de *Monilia* (Barros, 1980). Posteriormente, en el año 1933, Ciferri y Parodi confirmaron la identificación hecha por Smith y Rorer, y la caracterizaron y le asignaron el nombre de *Monilia roreri* Cif., clasificado como un hongo imperfecto (anamorfo o asexual) perteneciente al filo Ascomycota (Ciferri; Parodi, 1933 *apud* Barros, 1980).

En estudios posteriores, se observaron la formación de conidios concatenados, formados por brotes en el ápice (basipetales), y presencia de septos doliporo en el micelio, confirmando su afiliación a los basidiomicetos. Por esta razón, se clasificó para un nuevo género *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. (Evans *et al.*, 1978). De acuerdo

con estudios moleculares y citológicos, *Crinipellis perniciosa* (escoba de bruja) y *Moniliophthora roreri* comparten semejanzas (taxones). Con base a esta justificación, se propuso transferir *M. roreri* al género *Crinipellis*, generando la nueva combinación *Crinipellis roreri* (Cif.) (Evans *et al.*, 2002; Aime; Phillips, 2005), como la sinonimia de *Moniliophthora roreri*.

*M. roreri* es un “*Basidiomiceto* parásito, perteneciente a la familia *Marasmiaceae*, cuenta con un rango de hospederos limitados como las especies del género *Theobroma* y *Herrania*” (Phillips; Aime; Wilkinson, 2007), se reproduce por esporas, y el principal mecanismo de dispersión es a través del viento. El grado de severidad de su efecto sobre plantas cultivadas depende de las condiciones climáticas. El patógeno invade solo vainas de cacao y especies relacionadas de *Theobroma* y *Herrania*, causando daño interno y externo (Phillip; Wilkinson, 2007; Báez *et al.*, 2014; Freile *et al.*, 2018). Es la principal limitante para la producción de cacao en los países de Latino América (Jaimes; Aranzazu, 2010; Bolaños *et al.*, 2016).

## 2.5 DISTRIBUCIÓN DEL FITOPATÓGENO

Actualmente, el patógeno se encuentra presente en 14 países de América Latina (Tabla 1): Honduras, Guatemala, Nicaragua, Jamaica, Costa Rica, Ecuador, Panamá, Perú, El Salvador, Venezuela, Colombia, Bolivia, Belice y México (Phillips, 2017).

**Tabla 2 – Distribución geográfica del patógeno a nivel de América Latina y las fechas en que fueron reportados por primera vez en cada país.**

País	Primer reporte	Referencia
Belice		CABI / EPPO (2011); Fundación Mundial del Cacao (2005); Phillips-Mora y col. (2006); EPPO (2020)
Costa Rica	1978	Enríquez y Suárez (1978); CABI / EPPO (2011); EPPO (2020)
El Salvador	2012	Phillips-Mora y col. (2012)
Guatemala	2002	Phillips-Mora <i>et al.</i> (2007)
Honduras		Porras y Sánchez (1988); CABI / EPPO (2011); EPPO (2020)

Jamaica		Johnson y col. (2017); CIPF (2016); EPPO (2020)
México	2005	Phillips-Mora y col. (2006a); CABI / EPPO (2011); EPPO (2020)
Nicaragua	1980	López y Enríquez (1980); CABI / EPPO (2011); EPPO (2020)
Panamá	1956	CABI (sin fecha); Miranda (1986); CABI / EPPO (2011); EPPO (2020)
Bolivia		Phillips-Mora y col. (2012); Phillips-Mora y col. (2015); EPPO (2020)
Colombia	1817	Phillips-Mora (2003); Barros N. (1977); CABI / EPPO (2011); EPPO (2020)
Ecuador	1985	Phillips-Mora (2003); Suárez (1987); CABI / EPPO (2011); EPPO (2020)
Perú	1988	Phillips-Mora (2003); Hernández <i>et al.</i> (1990); CABI / EPPO (2011); EPPO (2020)
Venezuela	1941	Capriles de Reyes (1978); Phillips-Mora (2003); Parra y col. (2009); CABI / EPPO (2011); EPPO (2020)

Fuente: Autoría propia, modificado a partir de (CABI, 2020).

## 2.6 HONGOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)

El árbol de *Theobroma cacao* L., es un cultivo perenne de zonas tropicales, el cual se encuentra distribuido en América Latina. Al desarrollarse en dichas regiones, donde se encuentran una gran diversidad de microorganismos (microflora), algunos denominados benéficos, interactúan con el cultivo y otras denominadas como saprobios facultativos y parásitos que causan daño en el hospedero. Así, la diversidad microbiana presente en los cultivos como el cacao ofrece una gran variedad de hongos con potencial antagónico para controlar las enfermedades que los afectan. Estos microbios endofíticos y epifitos son únicos para el biocontrol, como son las especies de *Trichoderma*, que son considerados organismos de suelo, asociados a las raíces de las plantas (Bailey *et al.*, 2008).

Sin embargo, *Theobroma cacao* L. presenta pérdidas en el rendimiento en diversos países productores de cacao, debido a las principales enfermedades como la escoba de bruja, y la podredumbre helada, esta última catalogada como la principal limitante en el cultivo (Jaimes; Aranzazu, 2010). Estas enfermedades son inducidas

por hongos fitopatógenos como el caso de la monilia, por el basidiomiceto del género de *Moniliophthora roreri*, el cual afecta sólo las vainas y almendras del cacao.

Al realizar el diagnóstico de un cultivo, sobre todo en partes donde presenta síntomas y signos, podemos encontrar con una gama de microflora de hongos que están en proceso de competencia por nutrientes, colonizar y reproducción. La mayor diversidad de microorganismos se encuentra presente en el suelo (McSpadden; Fravel, 2002), y hay relativamente pocos agentes de biocontrol (BCA) de patógenos epífitos en comparación con los BCA que son transmitidos por el suelo.

Por consiguiente, el presente trabajo objetiva aislar e identificar los hongos asociados al signo de *Moniliophthora roreri* en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). A partir de esta investigación, pretende generar material biológico para posteriores investigaciones, que contribuyan en el manejo y control biológico de la monilia o podredumbre helada. A continuación, en los siguientes párrafos, se mencionan, con base a estudios científicos, aquellos hongos que están reportados como hongos antagonistas, hiperparásitos y micoparásitos con potencial de control biológicos para *Moniliophthora roreri* o *Crinipellis roreri*.

### 2.6.1 Hongos endófitos

Los hongos endófitos cumplen funciones importantes como la simbiosis, producción de compuestos, confieren resistencia a los fitopatógenos y producción de fitorreguladores, y actúan en el proceso de adaptación de la planta con su medio y desarrollo. Pueden ser encontrados en las hojas, ramas, raíces, semillas. Entre los hongos reportados como endófitos aislados de diversas partes del mundo está: *Acremonium* spp., reportado como antifúngico, *Gliocladium* spp., *Penicillium* spp., y *Streptomyces* spp., antimicrobianos, *Aspergillus clavatus*, citotóxico (Peixoto *et al.*, 2004). Difieren de los hongos denominados como micoparásitos, que se caracterizan por parasitar principalmente las hifas del patógeno.

En otros reportes, se identificaron a nivel morfológico y por secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN), los siguientes géneros: *Acremonium* spp., *Blastomyces* spp., *Botryosphaeria* spp., *Cladosporium* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cordyceps sobolifera*, *Diaporthe phaseolorum*, *D. helianthi*, *Fusarium* spp., *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *F. polyphialidicum*, *Geotrichum* spp., *Gibberella zeae*, *G. fujikuroi*, *G. moniliformis*, *Gliocladium* spp., *G. catenulatum*,

*Lasiodiplodia theobromae*, *Monilochaetes* spp., *Nectria haematococca*, *Pestalotiopsis microspora*, *Phomopsis* spp., *Pleurotus ostreatus*, *Pseudofusarium purpureum*, *Rhizopycnis vagum*, *Syncephalastrum* spp., *Trichoderma* spp., *Verticillium* spp., *V. luteo-album*, *Xylaria* spp. (Rubini et al., 2005).

A su vez, en Panamá los ensayos a nivel de campo se evaluaron con tres hongos endofíticos, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea* y *Botryosphaeria ribis*. Estos antagonistas fueron aislados de hojas y frutos del cacao. Para el caso de la pérdida de vainas causado por *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* spp. Se empleó tratamiento con *C. rosea*, el cual redujo en 10% la incidencia de vainas de cacao con lesiones esporulantes causadas por *Moniliophthora roreri*. Además, se observó un mico parasitismo por parte de *Trichoderma*, en los micelios de *Moniliophthora roreri* (Mejía et al., 2008).

Las investigaciones *in vitro* a partir de los aislamientos de hongos asociados al cultivo de cacao con potencial de control biológico evidencian la importancia de contar con hongos epífitos que se encuentran en el cultivo y tener material biológico para contrarrestar los efectos de la enfermedad de la podredumbre helada. Entre ellos tenemos a *Trichoderma ovalisporum* que, mediante el método de placa pre colonizada, se observó micoparasitismo en el tejido de *M. roreri* (Holmes et al., 2006), en Costa Rica.

En un estudio de metabolitos antimicrobianos y potencial de parasitar *M. roreri*, se aislaron hongos de troncos y vainas de diversas especies de *Theobroma*, de los cuales se emplearon nueve especies de *Trichoderma* y una de *Colletotrichum*: *T. harzianum*, *T. ovalisporum*, *T. cf. harzianum*, *T. tkon 21*, *T. cf. espirales*, *T. strigosum*, *T. stromaticum*, *T. hamatum*, *T. asperellum* y *C. gloeosporioides* (Bailey et al., 2008, p. 3). Las especies *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum* fueron más eficientes en colonizar. Sin embargo, *T. espirales*, *T. stromaticum* y *Colletotrichum gloeosporioides* fueron colonizadores ineficientes de cacao. La mayoría de los hongos estableció una relación endofítica con el hospedante (Bailey et al., 2008).

## 2.6.2 Hongos hiperparásitos

El género *Trichoderma* y *Cladosporium* están reportados como hongos de suelo y como hiperparásitos, antagonistas (Blakeman; Fokkema, 1982). En trabajos realizados con el objetivo de combatir la enfermedad de la monilia, se han ejecutado

aislamientos e identificaciones de hongos asociados al cultivo de cacao, empleando diversas partes de la planta como hojas, tallos, fruto y flores. Algunos hongos que fueron aislados ya cuentan con aplicaciones de control biológico *in vitro* y en campo.

La especie *Clonostachys rosea* y especies de *Trichoderma*, aislados de tejidos de cacao, son reportados como micoparásitos, agentes de biocontrol contra *Moniliophthora roreri*, *Crinepellis pernicioso* y *Phytophthora palmivora*. Estas fueron aisladas de basidiocarpos de *M. pernicioso*. Redujeron los síntomas causados por *M. roreri* en bioensayo de plántulas en un 10%, donde *M. roreri* es más resistente al micoparasitismo en comparación a los otros patógenos. A nivel de campo se redujo en 14.6 - 24.9% la moniliasis (Krauss *et al.*, 2001). Los hongos que fueron aislados de partes enfermas de las vainas del cacao en Costa Rica son reportados como micoparásitos, *Clonostachys* spp., *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp., en las tres variedades de cacao, Trinitario, Forastero y Criollo, (Hoopen *et al.*, 2003).

La aplicación de algunas especies de hongos como *Clonostachys byssicola*, *C. rosea*, antes (*Gliocladium* spp.), *Verticillium* spp. y *Trichoderma* (Krauss *et al.*, 2003) a nivel campo, ha tenido mejoras en la reducción de la severidad de moniliasis.

La utilización de *Trichoderma harzianum* como una alternativa en el manejo integrado de la moniliasis en Ecuador, donde actuó como un agente antagonista del hongo patógeno, estimulando diferencialmente la producción de cacao, mejorando la nutrición y fisiología de las plantas de cacao. A partir de esa utilización, se obtuvo como resultado mayores rendimientos que se ven reflejados en un incremento en la cosecha de mazorcas. Estos resultados demuestran que el uso de *T. harzianum* como mico parásito contra la pudrición causada por monilia, constituye una opción para el manejo de enfermedades del fruto de cacao (Bolaños *et al.*, 2016).

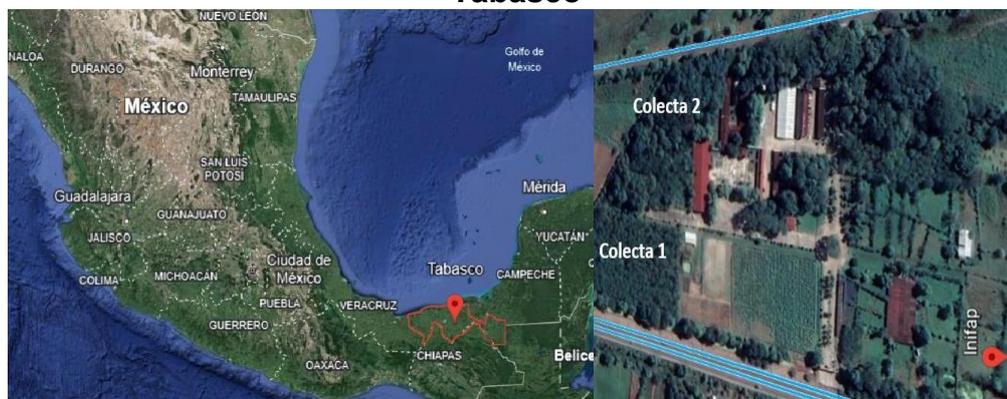
Las especies de hongos antagonistas como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea* y *Botryosphaeria ribis* tuvieron efecto del 40% contra *M. roreri* (Mejía *et al.*, 2008).

### 3 METODOLOGÍA

#### 3.1 COLECTA DE MUESTRAS EN CAMPO

La colecta de las muestras de cacao con signos y síntomas de *Moniliophthora roreri*, se realizó en el Municipio de Huimanguillo del Estado de Tabasco, México, en las parcelas de investigación del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Las parcelas son las áreas de estudios de investigación (mejoramiento genético de cacao) en campo que cuenta INIFAP, las cuales se encuentran sin intervención de productos agroquímicos, solo control cultural. Para el presente estudio se eligieron principalmente, las variedades de cacao más susceptibles a la podredumbre helada o monilia. Para el proceso de colecta se empleó un formato de colecta (Anexo A) de muestras fitopatológicas, que reúne todas las características necesarias de la muestra.

**Imagen 1 – Localización de INIFAP, 17.848619,93.394940 Huimanguillo, Tabasco**



Fuente: Google Earth.

A título de ejemplo, una de las colectas (Imagen 2) fue la variedad de cacao Rim75. Se obtuvo dos muestras de mazorcas se caracteriza por ser forma pentagonales, se obtuvo de dos áreas que representa a una de las variedades más susceptibles a *M. roreri* (A), las mazorcas a colectar fueron aquellas mazorcas con signos de la enfermedad (moniliasis). Estas presentaban necrosis de tipo plesionecrosis, con signos de *M. roreri* (B) en la parte inferior, con tejido muerto y presencia de signo o esporulación de la enfermedad.

## Imagen 2 – Variedad de cacao RIM 75, con síntomas y signos de la monilia



Fuente: Autoría propia.

### 3.2 TRABAJO DE COLECTA EN LABORATORIO

Consiste en realizar la ficha de colecta de campo o formato de colecta, (Anexo A), etiquetar cada muestra, identificar y caracterizar síntomas y signos, los cuales se realizaron con la clave de identificación de síntomas y signos (Anexo B), finalmente almacenar en lugar fresco.

A través de la Imagen 03, se muestra el trabajo en laboratorio, el cual se sigue de acuerdo con los protocolos de colecta. En la presente se muestran tres variedades de cacao: variedad de cacao Rim 75, mazorca con signo de *M. roreri* (A), var. Criollo 15, que presenta necrosis de tipo plecionecrosis, mancha de color chocolate (síntoma) típica de monilia (B), y la enfermedad en fase avanzada, momificación de la vaina de color crema a beige (C).

### Imagen 3 – Variedades de cacao colectados con signos de monilia



Leyenda: 3.A, variedad de cacao RIM75, 3.B. variedad criollo 15, 3.C, mazorca momificada con signo de la monilia.

Fuente: Autoría propia.

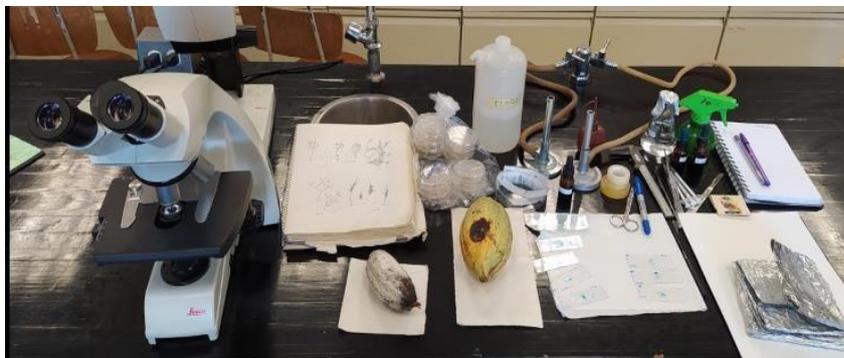
### 3.3 VALIDACIÓN

La validación temporal en tela adhesiva (Anexo 4) es una técnica para la cual se emplea un reactivo específico. Es fundamental porque ayuda a observar y caracterizar las estructuras microscópicas somáticas y reproductivas de fitopatógeno que se está trabajando. Para llevar a cabo la técnica, se empleó azul lactofenol. Este paso permite asegurar que el hongo que estamos trabajando sea aislado separadamente, sin contaminantes. Asimismo, permite identificar el patógeno asociado y también proporciona el medio de cultivo específico (Cuervo *et al.*, 2018).

Las observaciones de las mazorcas son realizadas con ayuda del microscopio estereoscópico, para observar mejor el signo. Después, se coloca en un portaobjetos una pequeña gota de azul lactofenol, y enseguida se corta un trozo de cinta adhesiva y, con ayuda de las yemas de los dedos, se realiza un ligero dobléz y se hace un pequeño toque sobre la colonia. Enseguida se estira la cinta y la parte que se impregnó con el hongo se coloca encima de la gota azul de lactofenol. Finalmente, las observaciones son realizadas a 4x, 10x, 40x y 100x para evidenciar las estructuras

del microorganismo. Después, se revisa la guía morfológica para identificar el género asociado al signo presente en la mazorca.

#### **Imagen 4 – Materiales y equipos para realizar la validación**



Fuente: Autoría propia.

### **3.4 MEDIOS DE CULTIVO**

Los medios de cultivo son sustancias nutritivas artificiales, los cuales se emplean en el laboratorio. Para cultivar los microorganismos de interés para este estudio, existen varios medios de cultivo. Por ello, es importante conocer el medio específico para cada fitopatógeno a trabajar, con el objetivo de promover un mejor desarrollo a nivel somático y reproductivo.

#### **3.4.1 Preparación de medios de cultivo**

En el transcurso del trabajo se emplearon cinco medios de cultivo (Anexo 3), debido a los diversos géneros de hongos filamentosos encontrados. Los medios de cultivos empleados fueron:

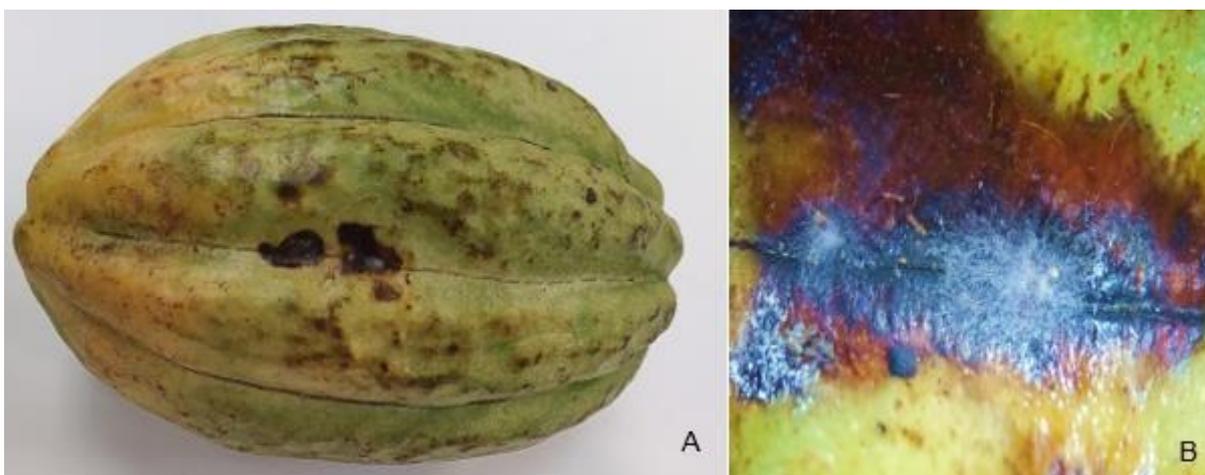
1. V8 (juego de ocho verduras agar)
2. PDA (papa dextrosa agar)
3. MEA (malta dextrosa agar)
4. Avena agar
5. Agar de Czapek Dox (Cz)

A todos los medios nutritivos se agregó el antibiótico de cloranfenicol (200 µg/mL), se esterilizaron en la autoclave a 121 °C por 20 minutos. Después se llenaron



microscopio estereoscópico y se pueden apreciar esporulación blanquecina algodonosa que se encuentra desarrollándose sobre de la mancha chocolate (síntoma de *Moniliophthora roreri*) (B).

### Imagen 6 – Variedad de cacao ET48, con síntomas de monilia



Leyenda: 6.A, mazorca de cacao ET48 que muestra síntomas de monilia, 6.B, colonias de *Fusarium* y *Colletotrichum*, se constataron a través de las preparaciones temporales.

Fuente: Autoría propia.

#### 3.5.2 Dilución en serie (mazorca de cacao)

Este método permite conocer la microflora de microorganismos asociados al signo de la podredumbre helada. Así mismo, faculta observar las diversas colonias que se encuentran desarrollándose en el medio de cultivo, ya sean saprobios facultativos o antagonistas (Cuervo *et al.*, 2018; Fernández, 2016). Para el presente método se empleó una mazorca de cacao que presenta el signo de la enfermedad (Imagen 07), la variedad Criollo, mazorca con signo de *M. roreri*. La masa de conidios cambió de color crema a beige, y también se observa el crecimiento de otros hongos sobre el signo.

### Imagen 7 – Cacao Var. Criollo, con signo de monilia



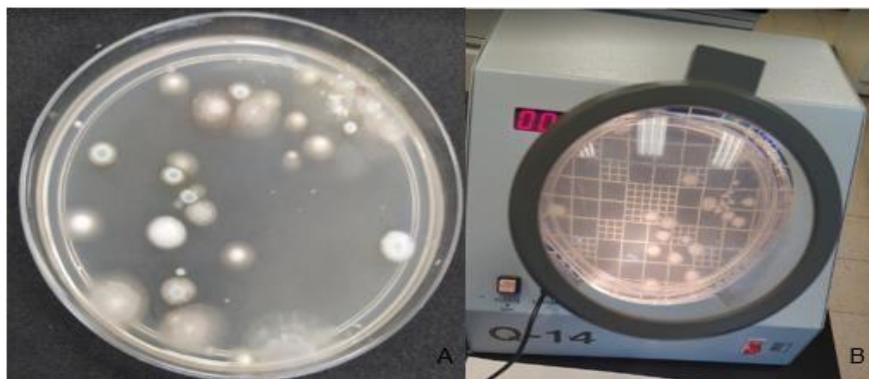
Leyenda: mazorca de cacao momificado, causado por la monilia.

Fuente: Autoría propia.

#### 3.5.3 Unidades formadoras de colonias (UFC)

Se realizaron el conteo de unidades formadoras de colonia, siguiendo el protocolo que se encuentra en el Anexo 6, utilizando el equipo contador de colonias Q-14, para determinar la cantidad de colonias y el número de colonias que surgieron en las cajas de Petri a diferentes concentraciones de la dilución en serie que se realizó anteriormente (Fernández, 2016). Para ejemplificar se muestra en la Imagen 08 una caja Petri con dilución de  $10^{-5}$ , donde se aprecian diversas cuatro colonias diferentes (A), y para realizar el conteo del número de colonias se emplea el equipo contador de colonias Q-14 (B).

### Imagen 8 – Dilución en serie de partes vegetales



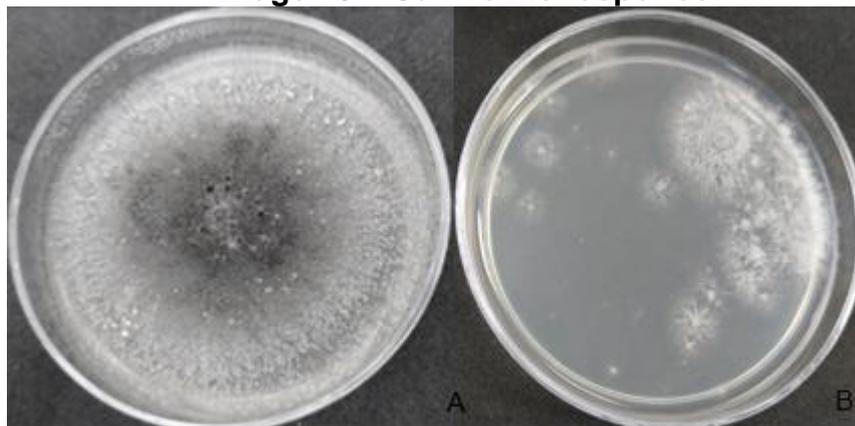
Leyenda: a) dilución en serie, b) equipo de contador de colonias Q-14.

Fuente: Autoría propia.

#### 3.5.4 Cultivo monospórico

El procedimiento (Anexo 5.3) de la obtención de cultivos monospóricos permite obtener cepas genéticamente homogéneas (Fernández, 2016), lo que asegura que la cepa obtenida se encuentre libre de otros contaminantes. Para llevar a cabo esta técnica se empleó la técnica de dilución en serie (Fernández, 2016). Para el cual, se empleó una cepa pura de *Colletotrichum* spp.

**Imagen 9 – Cultivo monospórico**



Leyenda: Para realizar dilución en serie se empleó el medio de cultivo V8a (imagen A), caja petri con dilución de serie, la cual muestra colonias homogéneas, son de 48 horas (imagen B).

Fuente: Autoría propia.

### 3.6 Cultivo de cepas puras

La presente técnica procura obtener un cultivo puro, o sea, el desarrollo de un único microorganismo y libre de otros contaminantes, que se obtiene a partir de la fuente de inóculo o medio de cultivo (Monzón, 2001). Estas cepas se obtuvieron a partir de los aislamientos de los diferentes métodos utilizados, que consiste en tomar una pequeña porción del inóculo con ayuda de aguja de bisturí, e inocular en el medio de cultivo específico para el hongo. El procedimiento es hecho bajo condiciones asépticas.

### 3.7 Conservación de cepas puras en papel filtro y sílica gel

Se emplearon ambos métodos de conservación con el objetivo de tener doble resguardo de las cepas. La conservación de cepas en sílica gel (Anexo 02) son para adicionar al cepario del Laboratorio de Fitopatología, para las futuras investigaciones. (Ayala, 2017). Además, las muestras se mantienen mejor en este método por mayor periodo de tiempo. Para la identificación de los hongos asociados al signo de *M. roreri*,

se emplearon dos metodologías: identificación cultural o macroscópica y morfométrica o microscópica (Evans *et al.*, 1978).

### 3.7.1 Identificación cultural

Se realizó a partir del cultivo de las cepas puras de cada fitopatógeno aislado. Se tomaron en cuenta las características cualitativas como color de colonia, crecimiento somático, textura, pigmentación del medio de cultivo, diámetro, topografía, período de incubación, aroma y velocidad de crecimiento. Estas características se evaluaron cada 24 horas, después de ser inoculado el medio de cultivo específico con el hongo respectivo. Para la identificación morfológica se emplearon las claves dicotómicas propuestas por (Watanabe, 2010).

### 3.7.2 Microcultivo

El uso del microcultivo como técnica de identificación (Anexo 07) permite examinar las estructuras de forma detallada del hongo a nivel microscópico. El resultado de este método permite obtener las preparaciones permanentes, para realizar las mediciones de las estructuras como son los conidios, micelios, fiálides, fructificaciones asexuales, etc., con el objetivo de seguir las claves morfométricas para el cual se siguió las claves de Watanabe (2010) y Barnett y Hunter (1987) para su posterior identificación de cada hongo. Para el cual, se empleó el microscopio compuesto que cuenta con cámara integrada y las mediciones de las imágenes se procesan mediante el Software LAS EZ (Cuervo *et al.*, 2018; Fernández, 2016). Para la medición y toma de imágenes fotográficas de las estructuras microscópicas de los hongos aislados, se empleó el microscopio compuesto Leica ICC50 HD, el cual cuenta con un Software Leica LAS EZ.

Se ocuparon varias referencias bibliográficas de investigaciones realizadas desde trabajos antiguos como las actuales publicaciones en referencia a cada hongo aislado de la mazorca de *Theobroma cacao* L., con el objetivo de identificar a nivel de género, secciones y especies de los hongos. Así mismo, sirvieron para realizar comparaciones respecto a la descripción a nivel cultural y morfométrico de cada hongo aislado.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS DE COLECTA

Se obtuvieron siete variedades de cacao, con síntomas y signos de *Moniliophthora roreri* como: Criollo 15, Sial 163, RIM 75, Carmelo, ISS75, ISS95, ET-48. En la Imagen 10 se presenta las mazorcas con manchas marrones de color chocolate, que es el síntoma característico de la enfermedad conocida como monilia, así mismo, la fase avanzada del fitopatógeno se aprecia en la Imagen 11, donde se puede observar la esporulación (masa de conidios), formando una felpa de color beige a salmón, la mazorca muerta en estado prematuro.

**Imagen 10 – Mazorcas de cacao con signos y síntoma de monilia**



Fuente: Autoría propia.

### 4.2 RESULTADOS DE VALIDACIÓN

Al realizar la validación temporal en azul lactofenol de la variedad de cacao Criollo se encontraron géneros de *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Cladosporium* spp. y *Penicillium* spp., éste último en varias validaciones temporales al igual que el género de *Fusarium* spp. Las colonias que se aprecian en la Imagen 11-B son pertenecientes a los géneros *Colletotrichum*, y *Acremonium*. En la Imagen 11-C se

puede observar una parte de color negro a plomo oscuro, correspondientes al género *Cladosporium*, y a su alrededor también existen colonias de color verde oscuro a olivo oscuro que corresponden a los géneros *Penicillium* y *Cladosporium*.

### Imagen 11 – Cacao Criollo con presencia de controladores biológicos

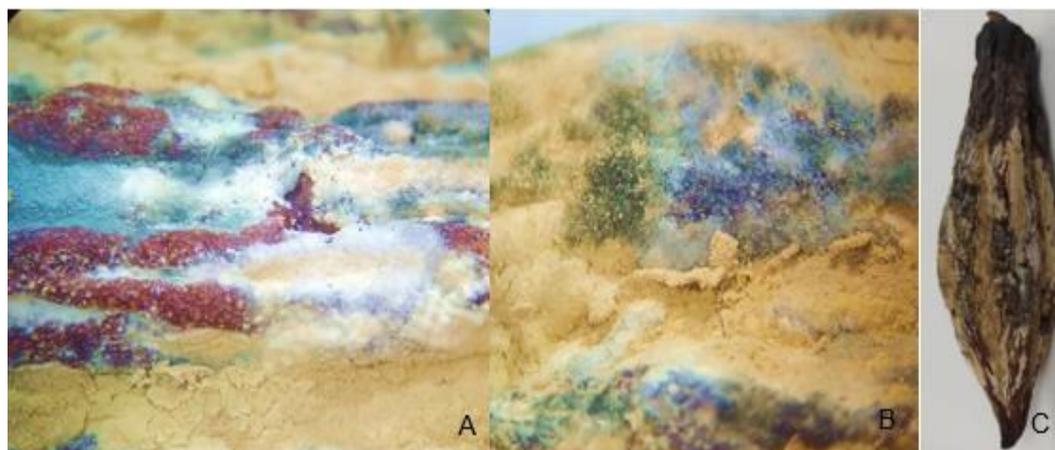


Leyenda: a) mazorca de cacao variedad Criollo con síntomas y signos de monilia, b) se encontraron colonias de *Ccolletotrichum* y *Acremonium*; c) se observan colonias de *Penicillium* y *Cladoporium* los cuales se constataron a través de las preparaciones temporales.

Fuente: Autoría propia.

En mazorcas momificadas, las cuales se encuentran en su fase avanzada de la enfermedad causada por *Moniliophthora roreri*, se observan una masa de conidios de color beige a color crema oscuro, el cual cubre como una felpa la mazorca de cacao. En la Imagen 12 se observa el signo de *M. roreri*, fase de inóculo primario, presentando crecimiento de hiperparásitos, como *Penicillium*, que se observa en la colonia de color verde olivo (A). En colonias de color blanquecina a crema con esporulación algodonosa se encontraron los géneros *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Cladosporium* en la colonia verde olivo con esporulación algodonosa (B). Las observaciones se realizaron empleando el microscopio estereoscópico (C), y se observó la mazorca de cacao con tejido muerto y con signo de *M. roreri* (D).

### Imagen 12 – Hiperparásitos creciendo sobre colonia de *Moniliophthora roreri*



Leyenda: a) se muestran colonias de *Penicillium* el cual se presenta un color verde azulino el cual se encuentra parasitando al igual que *Fusarium* sobre la colonia de monilia; b) se observa colonia de *Cladosporium* que tiene un color verde olivo; c) mazorca de cacao momificado.

Fuente: Autoría propia.

#### 4.3 RESULTADO DE CEPAS PURAS AISLADAS

Se obtuvieron 35 cepas distintas en todo el trabajo realizado, y estas fueron agrupadas en siete géneros que son: *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*. A continuación, en la Tabla 3, se muestran los géneros asociados al signo de *M. roreri*, y las variedades respectivas de cacao de las cuales fueron obtenidas cada cepa, y finalmente la cantidad de cepas obtenidas.

**Tabla 3 – Total de cepas puras obtenidas a partir de los aislamientos realizados a partir del signo de *Moniliophthora roreri***

Variedad de cacao	Género	Cantidad de cepas
Criollo 15	<i>Acremonium</i>	2
	<i>Colletotrichum</i>	2
	<i>Penicillium</i>	1
	<i>Cladosporium</i>	1

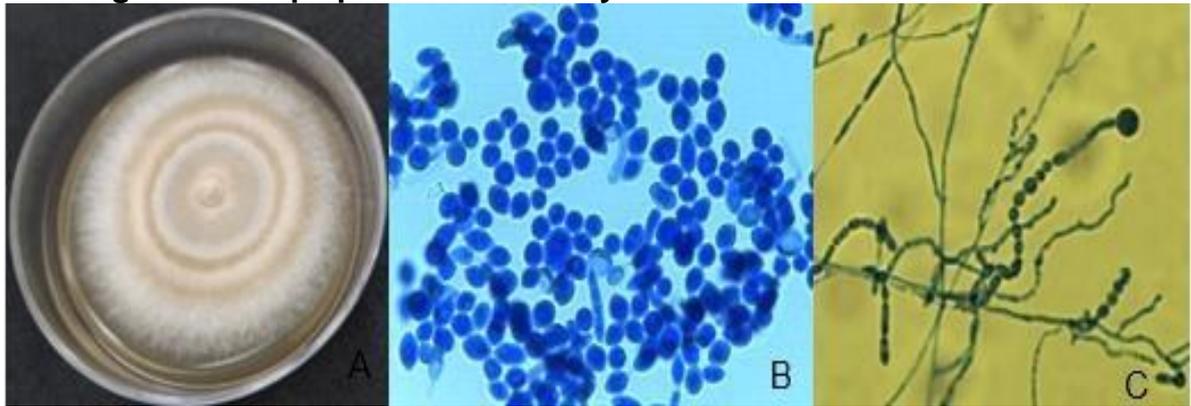
RIM 75	<i>Fusarium</i>	7
	<i>Colletotrichum</i>	6
	<i>Penicillium</i>	1
	<i>Cladosporium</i>	1
	<i>Trichoderma</i>	1
Carmelo	<i>Trichoderma</i>	1
ISS 75	<i>Colletotrichum</i>	2
ISS 95	<i>Fusarium</i>	1
Sial 163	<i>Trichoderma</i>	1
ET-48	<i>Fusarium</i>	2
	<i>Colletotrichum</i>	2
	<i>Gliocladium</i>	1
	<i>Fusarium</i>	2
	<i>Colletotrichum</i>	1

Fuente: Autoría propia.

#### 4.3.1 Resultados de aislamiento por método directo

Por el presente método se obtuvieron siete géneros, incluyendo *Moniliophthora roreri*, en las siguientes imágenes se muestran las cepas puras de los géneros aislados por método directo, los cuales presenta su identificación a nivel cultural (macro) y a nivel micro (esporas, conidios, etc.), las cuales son estructuras básicas que caracterizan a cada género. La colonia de *M. roreri* presenta una coloración color crema (Imagen 13).

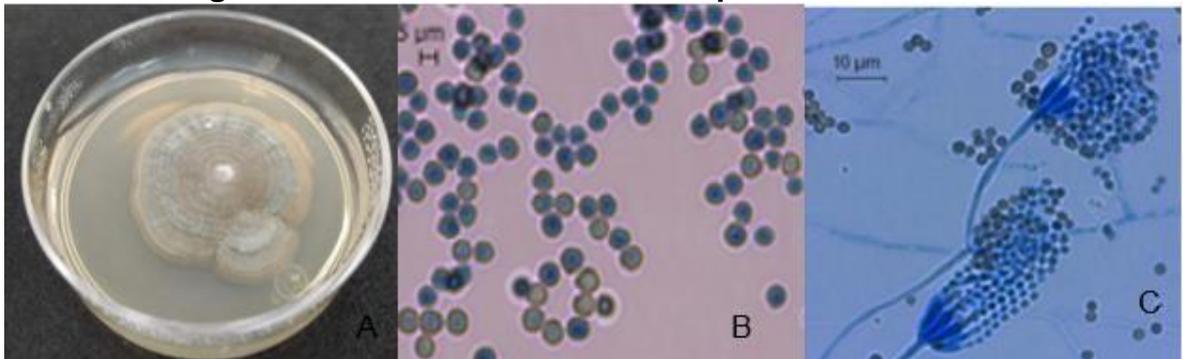
### Imagen 13 – Cepa pura de *M. royeri* y su estructura a nivel micro cultivo



Leyenda: En la imagen se ve la cepa pura de *M. royeri* en MEA (A), conidios lobulares, bicelulares, ovoides (B), y la formación de cadenas y aparente presencia de clamidosporas terminales (C).  
Fuente: Autoría propia.

La Imagen 14 muestra a nivel macro la cepa del género de *Penicillium* (A), y a nivel micro se observan los conidios y estructuras como son los conidióforos, fiálides y conidios (B, C).

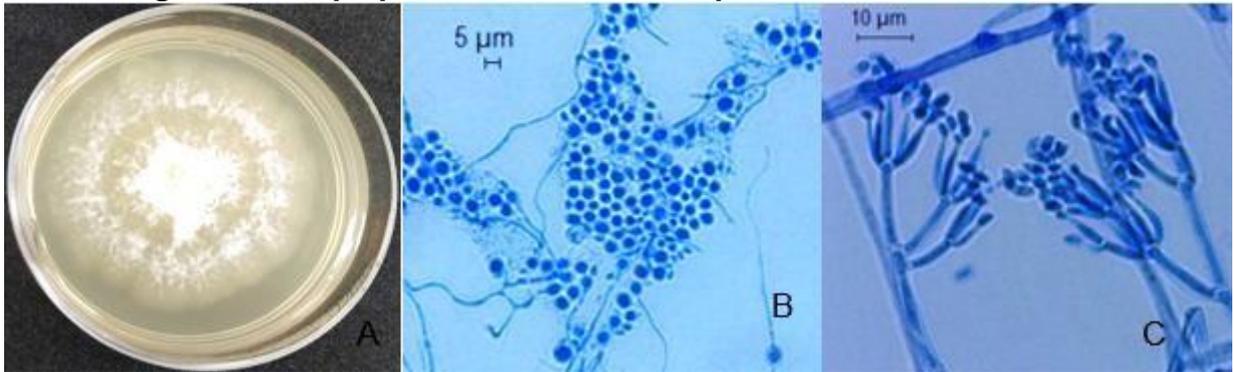
### Imagen 14 – Colonia de *Penicillium* sp. en medio de cultivo PDA



Leyenda: a) colonia de *Penicillium* en medio de cultivo PDA, b) esporas, c) estructura típica de *Penicillium* que presenta conidióforo y fiálides y formación de cadenas de conidios.  
Fuente: Autoría propia.

El segundo género es *Gliocladium* (Imagen 15), que presenta un crecimiento homogéneo, color crema, algodonosa, y sus conidios un poco ovoides, brillosas (B), conidióforos segmentados, con 3 a 5 fiálides y con conidios (a nivel micro).

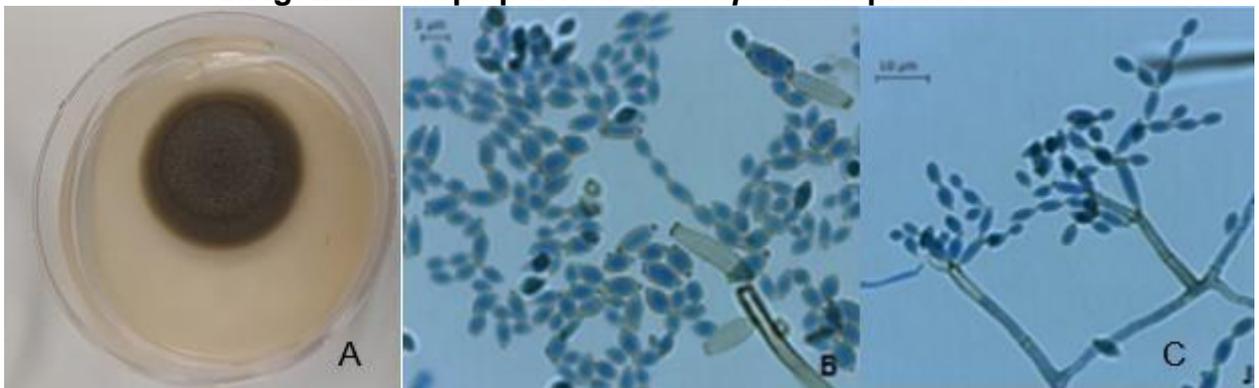
### Imagen 15 – Cepa pura de *Gliocladium* sp. en medio de cultivo PDA



Leyenda: a) cepa pura de *Gliocladium*, b) germinación de esporas, c) estructura típica de *Gliocladium*, presenta conidióforos segmentados, fiálides.  
Fuente: Autoría propia.

El siguiente hongo filamentososo es del género *Cladosporium*, el cual se caracteriza por ser cosmopolita. La cultura presenta un color verde olivo claro, oscuro, flocoso, algodonoso, crecimiento circular (Imagen 16), y dependiendo del medio de cultivo varía la velocidad de crecimiento y formación de anillos concéntricos. Sus conidios son alargados, conidióforos segmentados algunos son cortos, largos y presentan ramos conidios.

### Imagen 16 – Cepa pura de *Cladosporium* sp. en V8a

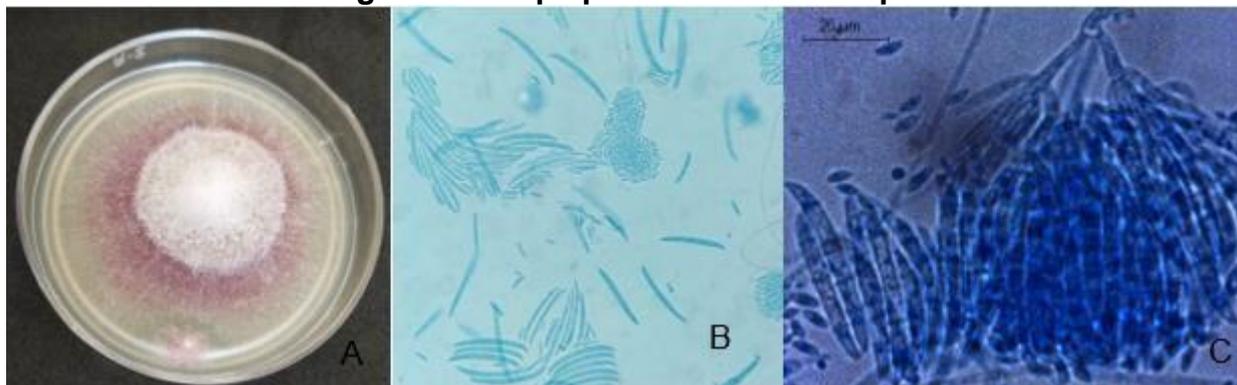


Leyenda: a) cepa pura de *Cladosporium*, b) germinación de esporas, c) se observa conidióforo segmentado y ramoconidios.  
Fuente: Autoría propia.

Seguidamente, se tiene a una colonia del género *Fusarium*, que es un género cosmopolita, para el presente trabajo se encontró en la parte aérea, desarrollándose sobre la colonia de monilia en condición de hiperparásito. La cultura presenta una coloración rosada, lo que depende del medio de cultivo empleado, a nivel micro, y presenta microconidias y macroconidios (B), que se caracterizan por ser en forma de

canoas, y en algunos casos se pueden observar estructuras de resistencia como esporodoquia (C), clamidosporas.

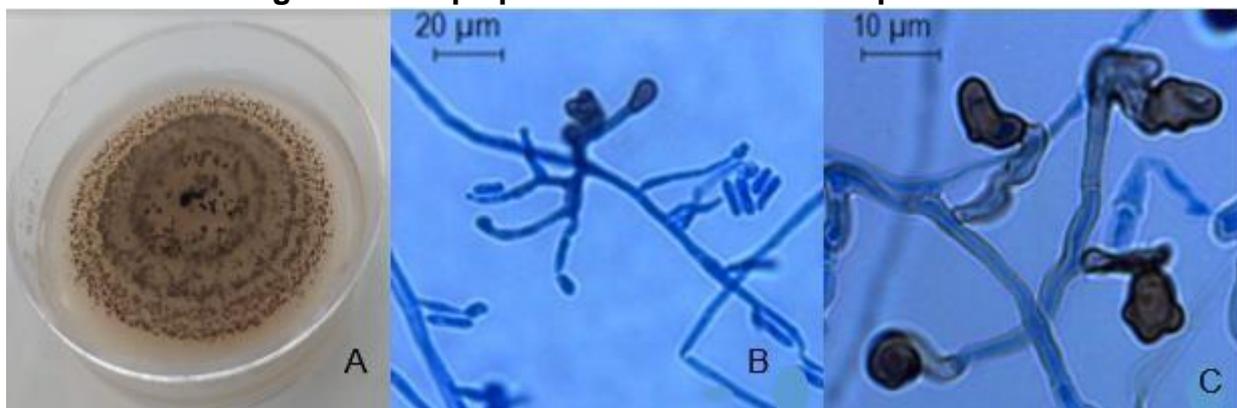
**Imagen 17 – Cepa pura de *Fusarium* sp. en PDA**



Leyenda: a) cepa pura de *Fusarium*, b) macro y Microconidios de *Fusarium*, c) se observa esporodoquio  
Fuente: Autoría propia.

Finalmente, tenemos el género *Colletotrichum*:

**Imagen 18 – Cepa pura de *Colletotrichum* sp. en V8a**



Leyenda: (A) a nivel cultural presenta anillos concéntricos definidos, color naranja, (B) a nivel micro presenta conidios en forma de bacilos, (C) conidióforos cortos, segmentados y sobre todo presencia de apesorios.

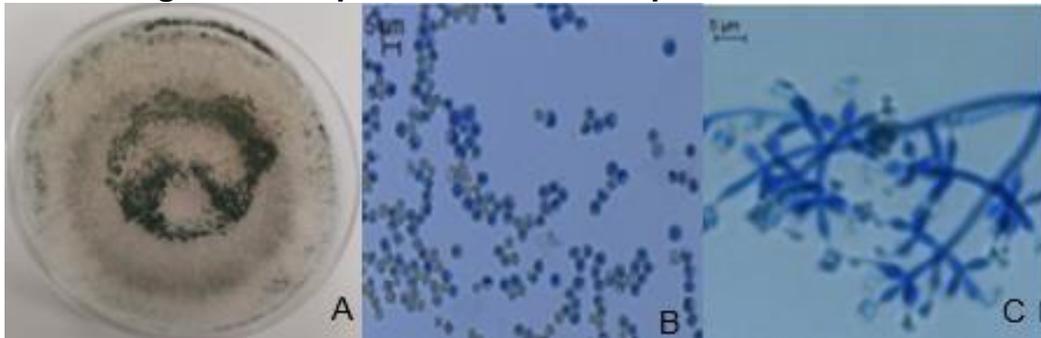
Fuente: Autoría propia.

#### 4.3.2 Resultado de aislamiento por método dilución en serie

Se obtuvieron cuatro géneros de hongos, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Colletotrichum* y *Fusarium*, de los cuales el género *Fusarium* y *Colletotrichum* tuvo mayor variabilidad de especies, y también estos mismos géneros también fueron

aislados por método directo. A continuación, se muestra el género *Trichoderma* (Imagen 19):

**Imagen 19 – Cepa de *Trichoderma* sp. en medio de PDA**

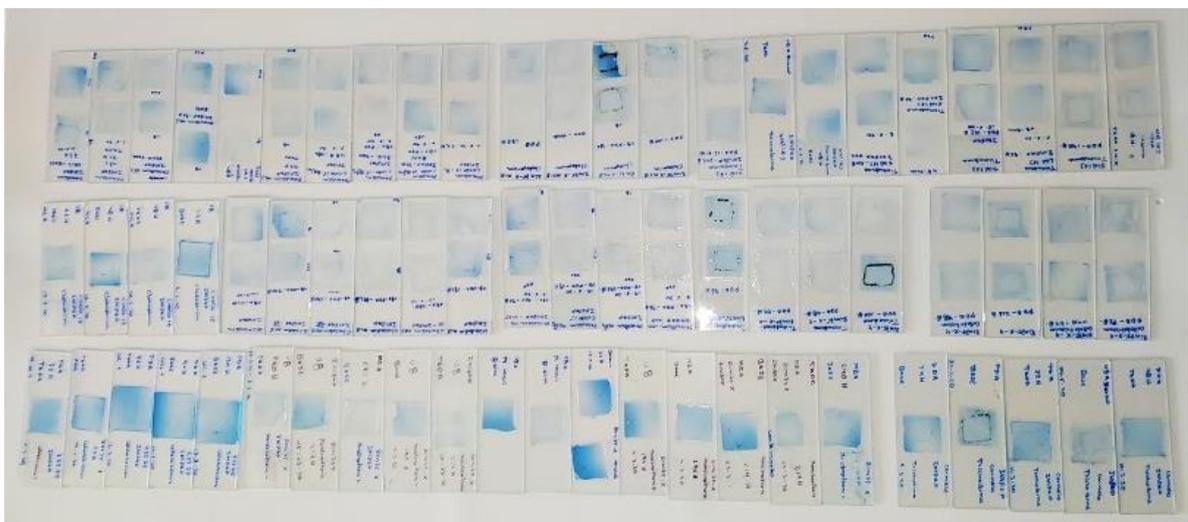


Leyenda: (A) la cepa pura de *Trichoderma* en medio de cultivo de PDA, (B) conidios, estructura característica del género que muestra el conidióforo y fiálides, (C) conidios en las partes terminales.  
Fuente: Autoría propia.

#### 4.6 RESULTADO DE MICROCULTIVO

Los microcultivos permiten observar las estructuras fúngicas, y fueron realizados para las especies de los géneros obtenidos. Los resultados se muestran en la Imagen 20. Finalmente, son las preparaciones permanentes, y estas permiten observar a nivel micro las estructuras de desarrollo (ciclo de vida) de cada género.

**Imagen 20 – Microcultivos de 18 especies de hongos aislados de mazorcas de cacao**



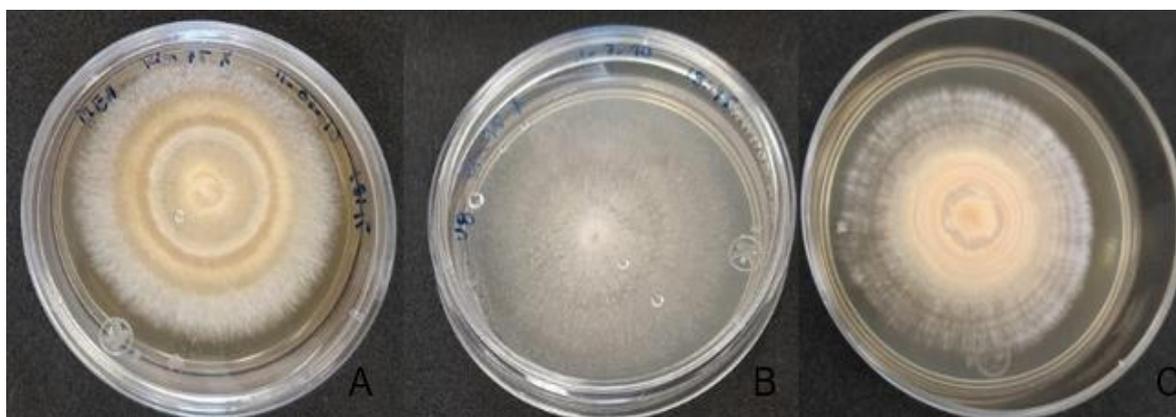
Fuente: Autoría propia.

#### 4.7 Descripción cultural y morfométrica de *Moniliophthora roreri*

En medio de cultivo de MEA (agar extracto de malta), la colonia de *M. roreri* presenta crecimiento muy filamentoso en los bordes de la colonia de color blanquecino (crecimiento somático) ligeramente flocoso, algodonoso, parte central de la colonia color crema a beige a cenizo claro forma anillos concéntricos ligeramente elevados; anverso, se observa un color un color beige amarillo; mientras que, en V8a, crecimiento plano de color blanquecino a crema, anverso, presenta dos anillos, la pigmentación de beige.

Finalmente, en medio de PDA, presenta crecimiento plano filamentoso convexo, ligeramente elevado en la parte central, color beige a crema, forma anillos concéntricos muy finos, anverso, se observa de color beige un poco oscuro. La velocidad de crecimiento en cultivo V8a fue 3.93 mm, en MEA 3.14 mm y en PDA 1.68 mm aproximadamente. Las colonias se expusieron al sol 2 horas diarias en promedio por 10 días.

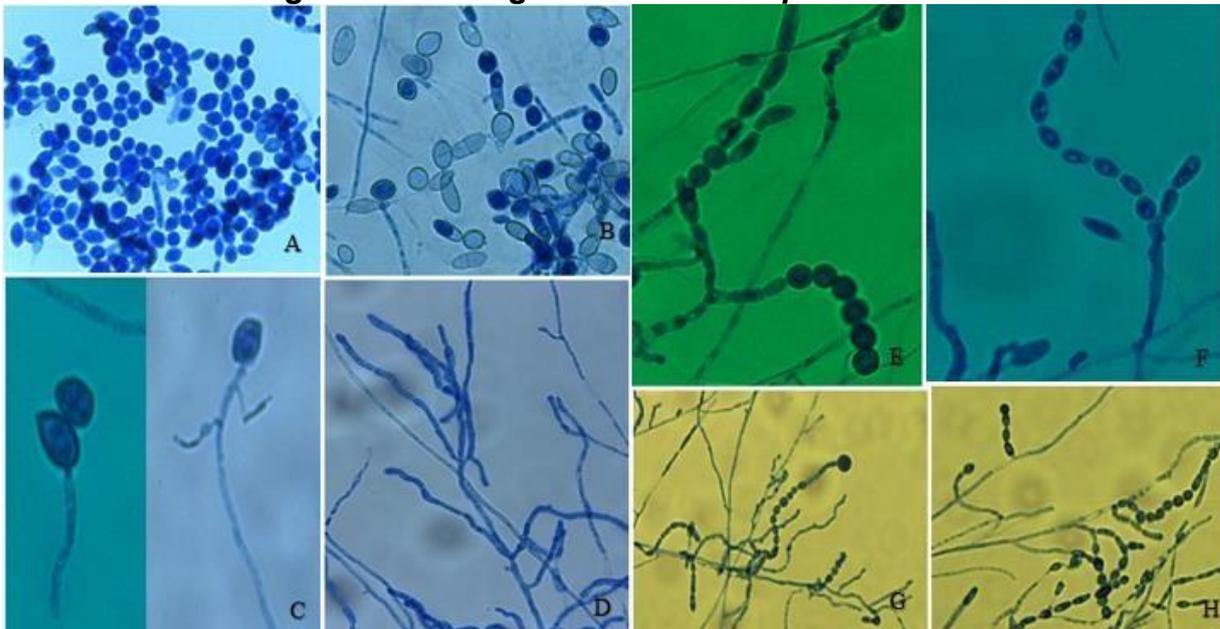
#### Imagen 21 – Cepa pura de *Moniliophthora roreri* en tres medios de cultivos



Fuente: Autoría propia.

La descripción morfométrica de *Moniliophthora roreri* se presenta en la Imagen 22. El conidióforo puede ser basípeta y formar cadenas de esporas, como también tener un solo conidióforo que da origen a una ramificación (tipo ramo conidios) y esporulación de conidios formando cadenas. Los conidióforos pueden ser cortos, medianos y largos, enseguida presentar ramificación y producción conidios o presentar ramificación o ramo conidios y esporulación.

**Imagen 22 – Micrografías de *Moniliophthora roreri***



Leyenda: (A) conidios de diversos tamaños y formas, en general redondas o globosas y brillantes, elípticas, (B) algunos conidios bicelulares, (C) la germinación de conidios, (D) micelio septado, (E) ramificados de paredes gruesas, hialinas, (F) conidióforo segmentado, conidios redondas y elipsoides formando cadenas de 6 a 8 cadenas, (G) formación de un conidióforo bifurcado, dando origen a la ramificación y esporulación de los conidios que forma cadenas, (H) formación de cadenas de conidios y se aprecia una espora terminal como una clamidospora.

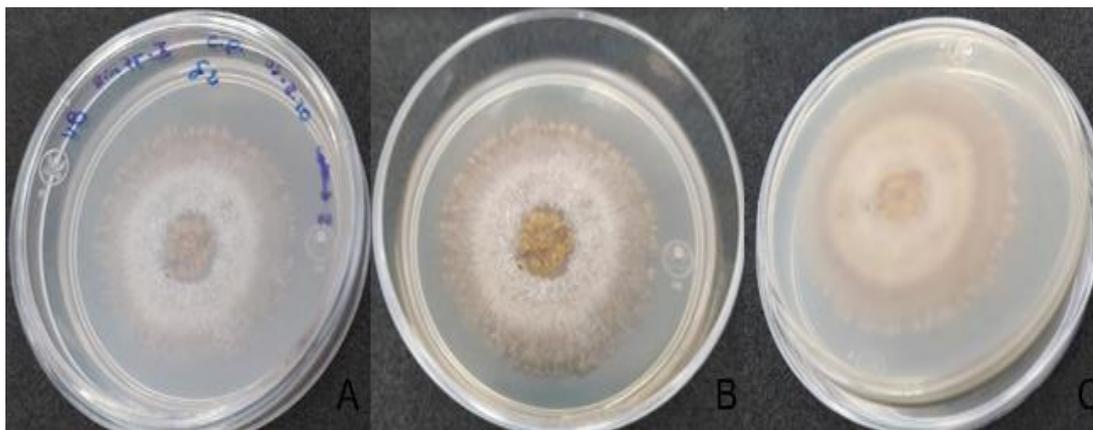
Fuente: Autoría propia.

## 4.8 DESCRIPCIÓN CULTURAL Y MORFOMÉTRICA DE HONGOS AISLADOS

4.8.1 Hongos asociados al signo de *Moniliophthora roreri* reportados con potencial de control biológico

4.8.1.1 Identificación morfológica de especies del género *Colletotrichum* sp. (Cepa RIM 75)

### Imagen 23 – Cepa pura de *Colletotrichum* sp. – RIM 75



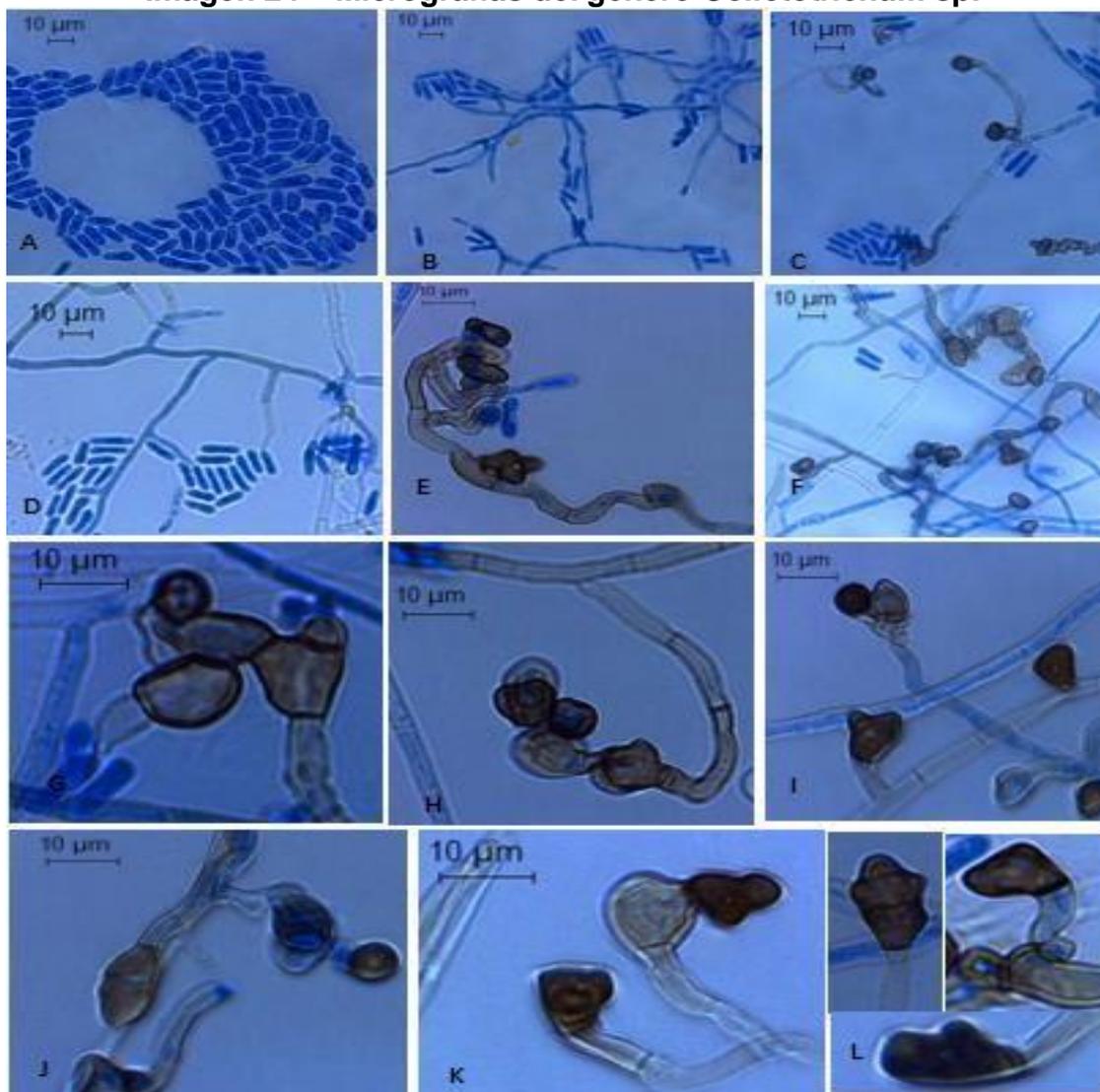
Leyenda: cepa pura de *Colletotrichum* en medio de cultivo V8a, b) en el anverso presenta agrietamientos, elevación la colonia, c) la parte reversa se observan algunos anillos concéntricos.

Fuente: Autoría propia.

La colonia de *Colletotrichum* sp. en medio de cultivo de V8a (Imagen 23), presenta una textura filamentosa con agrietamientos rugosos con pequeña elevación en toda la superficie de la colonia, el borde es de color anaranjado. En la parte central se observa una elevación convexa de forma irregular de color anaranjado claro y posteriormente forma un círculo algodonoso intermedio en la colonia de color blanco con tonos de anaranjado. El reverso de la colonia presenta anillos tipo concéntricos con bordes rugosos a filamentosos. La colonia en general es de color anaranjado pálido; la velocidad de crecimiento fue de 4.5mm por día.

Las micrografías permiten observar las estructuras de hongo y todo el proceso de desarrollo desde la germinación de los conidios (Imagen 24):

**Imagen 24 – Micrografías del género *Colletotrichum* sp.**



Leyenda: (A) Conidios a 40x; (B) Germinación unipolar de conidios, formación de conidióforos y esporulación (24 horas) 40x; (C) Apresorios a (24 horas) 40x; (D) conidióforo ramificado (48 horas) 40x; (E) apresorio maduro (96 horas) 100x. (F) desarrollo de apresorios (72 horas) 10x. (G-H-I-J-K-L) apresorios de diversos tamaños y formas (72 horas) 100x.

Fuente: Autoría propia.

El género de *Colletotrichum*, es uno de los grupos más amplios de la división Ascomycota, son cosmopolitas, cuenta con más de 800 especies, por ejemplo: *C. lineola* Corda, celomiceto, morfo sexual anteriormente conocido en *Glomerella* (Wijayawardene, 2017), también se les conoce como hongos filamentosos. El género *Colletotrichum*, son patógenos destructivos que causan daños económicos significativos a los cultivos en todo el mundo. Entre los géneros *C. gloeosporioides* (Penz), *C. fragariae* AN Brooks, *C. acutatum* JH Simmonds (Wang *et al.*, 2013).

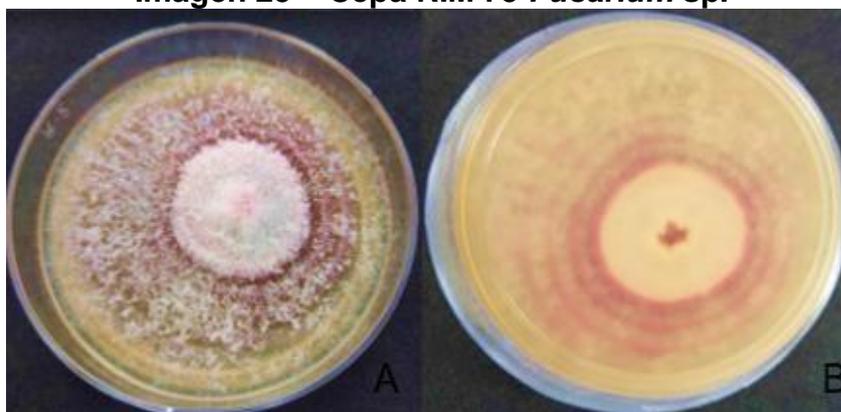
Sin embargo, algunas especies se comportan como fitopatógenos, endófitos en las plantas, por ejemplo, *Colletotrichum gloeosporioides*, reportado como

endofítico, que se encuentra presente de manera ubicua dentro de las células de la planta (Chithra *et al.*, 2014). Las especies de *Colletotrichum*, se caracterizan por la producción de acérvulos en forma de disco o en forma de cojín, ceroso, subepidérmico, típicamente con oscuras, espinas o setas en el borde o entre los conidióforos, conidióforos simples, alargados, conidios hialinos, 1-celulares, ovoides u oblongos.

También, en los acérvulos pueden producirse setas oscuras, las esporas germinadas producen apresorios antes de penetrar en el huésped (Barnett & Hunter, 1987). Presenta conidióforos simples, alargados, algunos ramificados, conidios hialinos, unicelulares, en forma de bacilos, ovoides u oblongos de (-19), 13.02 – 11 (-7.13) largo x (5.68-2.49)  $\mu\text{m}$  de ancho, micelio segmentado. Las esporas germinadas producen apresorios a cabo de 24 horas a una temperatura de  $\pm 24^\circ\text{C}$ , éstos también se desarrollan a partir del micelio y conidióforos, a medida que maduran se vuelven más robustas y forman tipos cadenas de apresorios, son de diversas formas y tamaños.

#### 4.8.1.2 Identificación morfológica de especies del género *Fusarium*

**Imagen 25 – Cepa RIM 75 *Fusarium* sp.**



Leyenda: a) presenta crecimiento uniforme con anillos concéntricos definidos y coloración fucsia (anverso), b) se observan anillos concéntricos (reverso de la colonia).

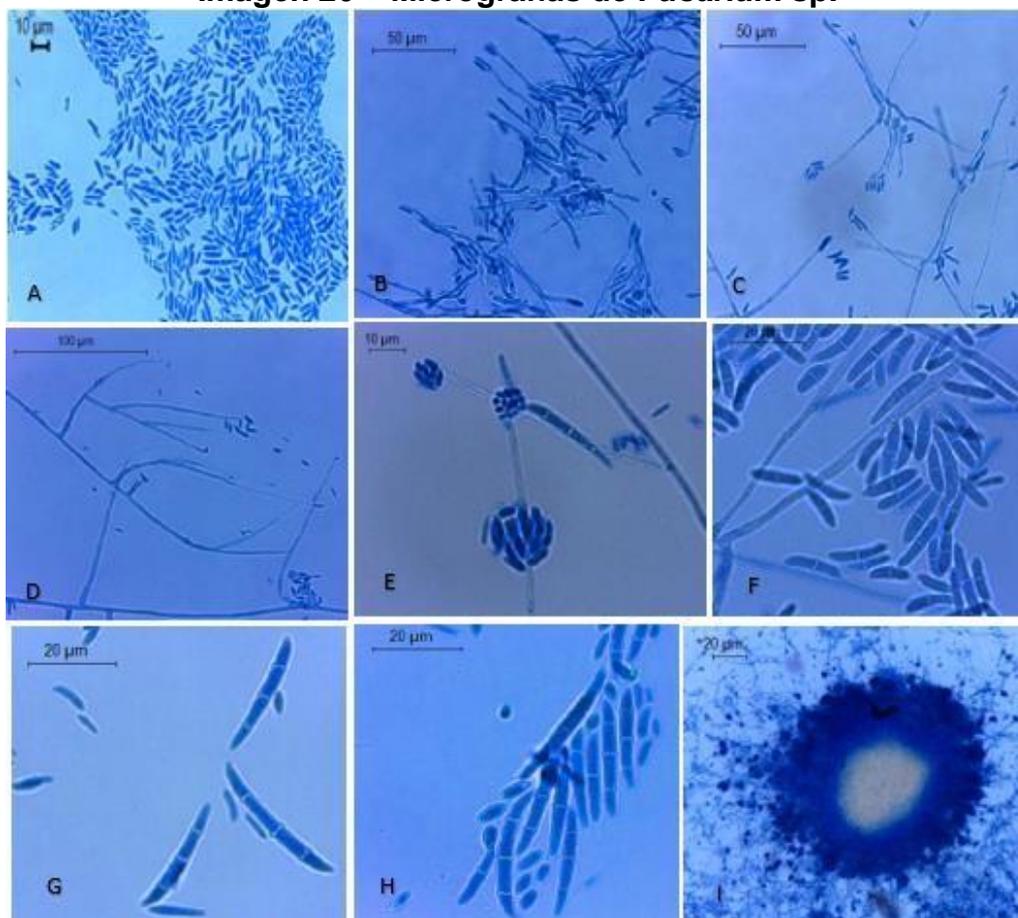
Fuente: Autoría propia.

Se hizo el aislamiento de una colonia desactivada (colonia que estuvo en refrigeración), razón por la cual probablemente demoró en desarrollarse la colonia. Estuvo cinco días en incubadora, y como no crecía la colonia se le retiró, y se dejó a temperatura ambiente en el laboratorio, en el cuál empezó a desarrollarse. La cepa aislada estuvo en condiciones ambiente en el laboratorio de  $\pm 18^\circ\text{C}$ , donde presentó

velocidad de crecimiento de 1.5 mm por día en Avena agar. En medio de cultivo de PDA, presenta un color anaranjado a salmón, con anillos bien definidos, relieve plano, velocidad de crecimiento de 4.2 mm por día. Se incubó a  $\pm 23$  °C, crecimiento concéntrico, filamentoso, algodonosa, color fucsia con tonalidades de blanco, ligeramente elevada en la parte central, anverso, formando anillos.

Las micrografías (Imagen 26) permitieron observar a detalle el proceso de desarrollo desde la germinación de los conidios, conidióforos y algunas estructuras de resistencia como clamidosporas:

**Imagen 26 – Micrografías de *Fusarium* sp.**



Leyenda: (A) conidios a 40x.; (B) germinación unipolar de conidios (24 horas) 40x.; (C) formación de conidióforos y fiálides (48 horas) 40x.; (D) ramificación de conidióforos (72 horas) 40x.; (E) detalle de esporulación de conidios (72 horas) 100x.; (F-G-H) Macroconidios (96-144 horas) 100x.; (I) se aprecia la esporulación del hongo (144 horas), 10x. Medio de cultivo ACD.

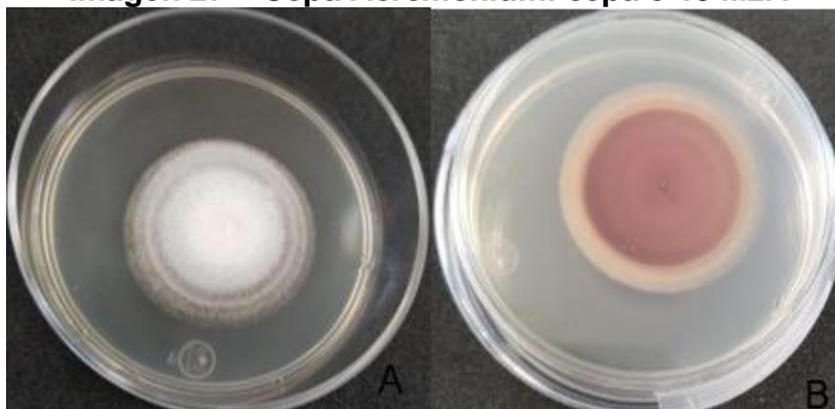
Fuente: Autoría propia.

En análisis morfométrico se observó macroconidios, con el número de septos predominantemente de tres septos, algunos se encuentran adheridos al conidióforo, son ligeramente curvos, brillantes, un poco rugosas, células apicales un

poco papiladas, células basales apenas muescas. La abundancia es moderadamente poca, se observaron a las 144 horas en medio de cultivo de ACD. Por otro lado, los microconidios son brillantes, presentan formas ovaladas, globosas, algunas un poco delgadas, presentan un septo, con menor frecuencia. Presenta células conidiógenas tipo polifialides, con más de dos vacantes (ramificaciones) por celda, éstas son un poco escasas, se observan mayoritariamente células conidiógenas tipo monofialides largos, donde se encuentran alojados los falsos cabezales con microconidios. A continuación, se detallan las dimensiones de los macroconidios y microconidios: Macroconidios (43-)37 – 27 (-21) largo x (2-3)  $\mu$  ancho; Microconidios (15-) 11-7 (-4.50) largo x (1.23 -2.50)  $\mu\text{m}$  de ancho.

#### 4.8.1.3 Identificación morfológica de especies del género *Acremonium*

**Imagen 27 – Cepa *Acremonium*: cepa c-15 M2A**

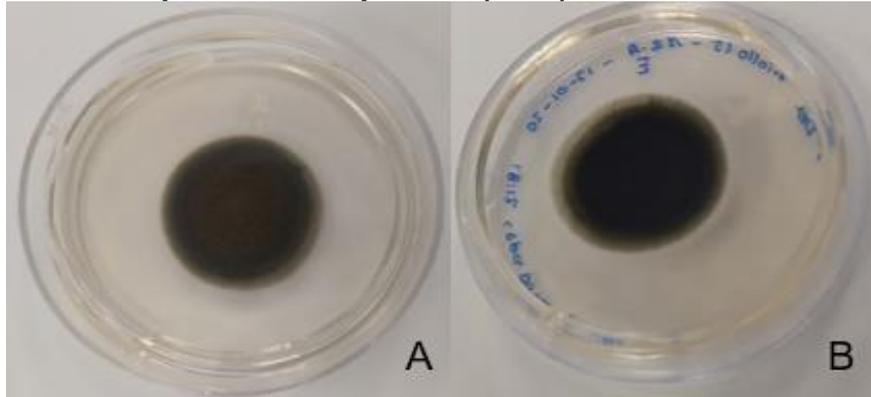


Leyenda: a) cepa pura de *Acremonium* (anverso), b) se observan anillos delgados y bien definidos, también presenta una coloración guinda claro (reverso)  
Fuente: Autoría propia.

La colonia de *Acremonium* en medio de cultivo de V8a, presenta una forma regular y uniforme, elevación plana a convexa en la parte central, con márgenes filamentosos formando anillos concéntricos muy finos. En el anverso presenta un color blanquecino brillante, un poco algodónoso en la parte central, el color anverso va de un color rosa oscuro a fucsia en la parte central.

#### 4.8.1.4 Identificación morfológica de especies del género *Cladosporium*

**Imagen 28 – Cepa de *Cladosporium* (C-15) en medio de cultivo PDA)**

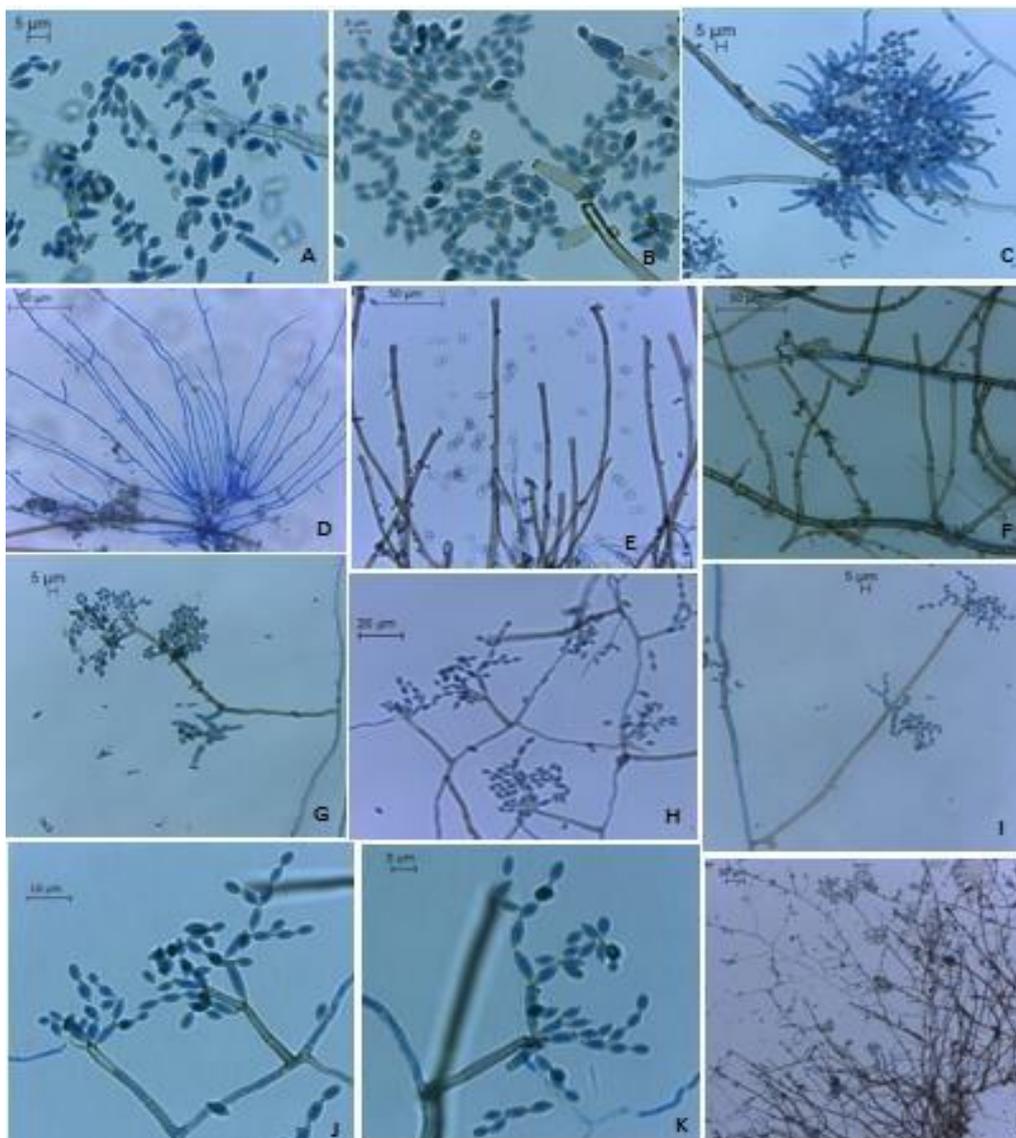


Leyenda: a) colonia de *Cladosporium*, presenta textura flocoso (anverso), b) presenta anillos, coloración verde olivo oscuro (anverso)  
Fuente: Autoría propia.

En medio de V8a (Imagen 28), la colonia de *Cladosporium* presenta forma filamentosa, ligeramente elevada con anillos concéntricos, margen filamentoso, color verde olivo oscuro, flocoso, esporulación algodonosa y abundante (anverso), pigmentación de color verde olivo oscuro y anillos concéntricos (reverso). La velocidad de crecimiento fue de 3.36 mm por día a una temperatura  $\pm 24^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo, en medio de cultivo de PDA, el desarrollo fue circular, de forma filamentosa, elevación convexa y margen erosionado. No forma anillos bien definidos, la colonia es algodonosa, flocosa, con esporulación abundante, velocidad de crecimiento 2.56mm por día a una temperatura  $\pm 24^{\circ}\text{C}$ .

A través de la Imagen 29 se observa el proceso de desarrollo del hongo:

## Imagen 29 – Micrografías del género *Cladosporium*

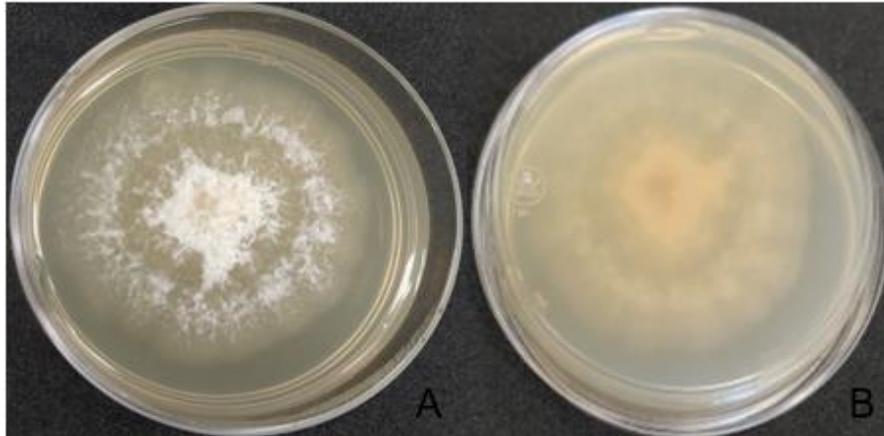


Leyenda: (A-B) Detalle de conidios 100x.; (C) Germinación unipolar de conidios (24 horas) 100x.; (D) Desarrollo de micelio (48 horas) 40x.; (E-F) Desarrollo de conidióforos (72 horas) 40x.; (G-H-I) Esporulación ramoconidio (96 horas) 40x.; (J-K) Detalle de ramoconidios (120 horas) 100x.; (L) Esporulación (96 horas) 10x.

Fuente: Autoría propia.

### 4.8.1.5 Identificación morfológica de especies del género *Clonostachys*

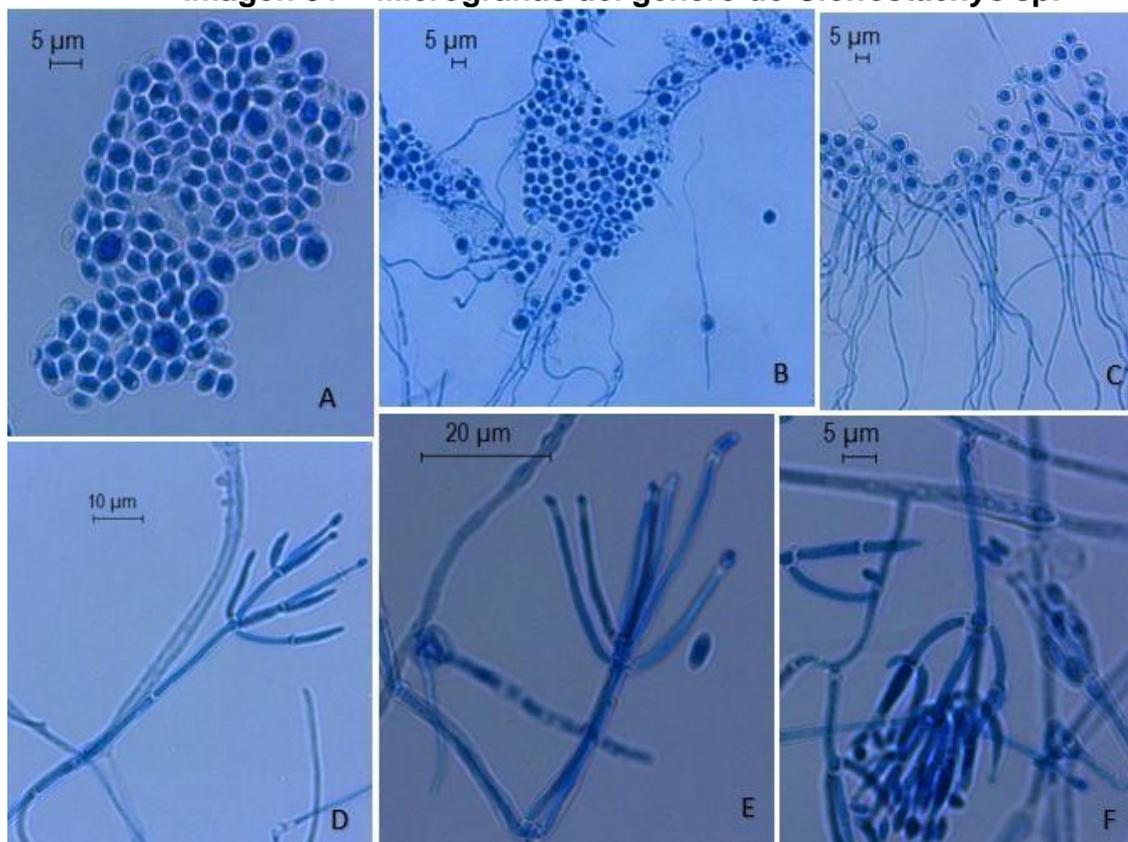
### Imagen 30 – Cepa de *Clonostachys* sp. en V8a



Leyenda: a) cepa pura de *Clonostachys*, color beige con relieves, b) reverso de la colonia.  
Fuente: Autoría propia.

En medio de cultivo de V8a (Imagen 30), *Clonostachys* presentó crecimiento filamentosos, ligeramente elevado en la parte central, color crema a salmón, anverso, color crema a amarillo opaco, forma anillo. La velocidad de crecimiento de la colonia fue de 4.5 a 5 mm por día, a una temperatura  $\pm 24^{\circ}\text{C}$ . A través de las micrografías (Imagen 31), se observan las estructuras y el proceso de desarrollo somático del hongo:

### Imagen 31 – Micrografías del género de *Clonostachys* sp.

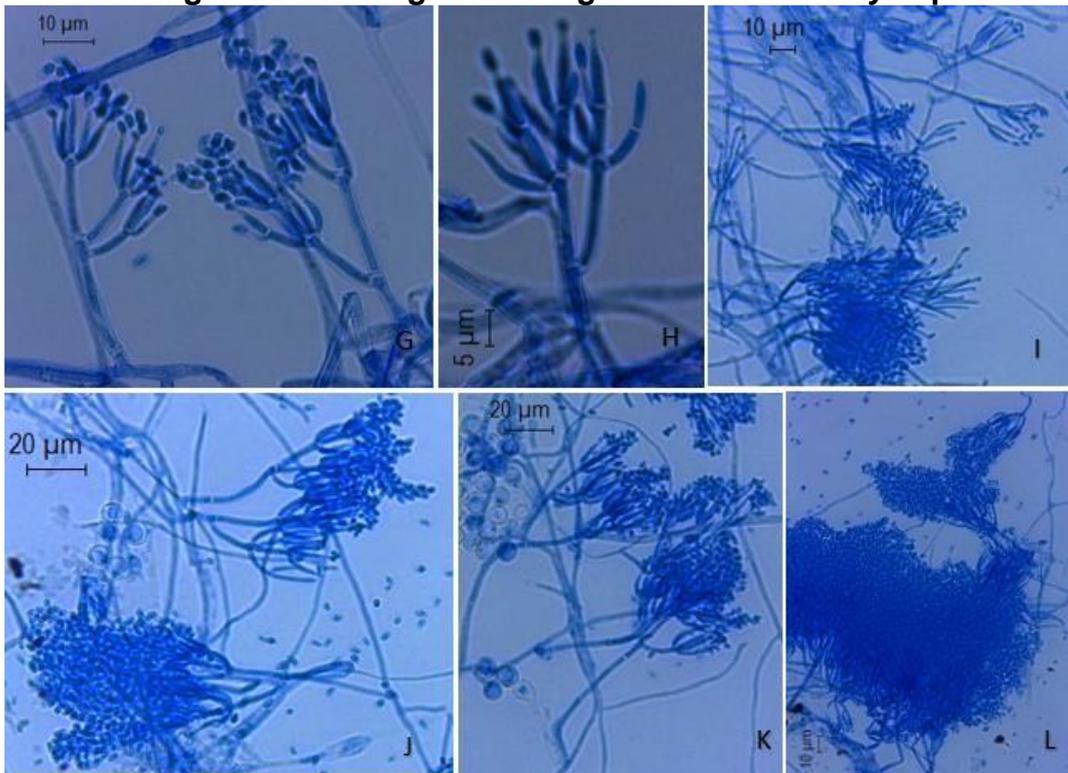


Leyenda: (A) Detalle de conidios observadas a 100x.; (B-C) se observa la germinación unipolar de fialosporas, desarrollo somático (micelios) (24-48 horas) 40x.; (D) Formación de conidióforos y fiálides (48- 72 horas) 40x.; (E) Detalle de fiálides (48-72 horas) 100x.; (F) Detalle conidióforo y fiálides (72- 96 horas) 100x.; (G) Ramificación de fiálides (96 - 120 horas) 100x.; (H) Detalle de fiálides (96 horas); (I -J-K) Esporulación (120 -240 horas); (L) Esporulación masiva (120- 240 horas) 40x, en medio de cultivo de PDA.

Fuente: Autoría propia.

En relación con la descripción morfométrica, posee conidios tipo fialosporas, hialinas, forma elipsoides a ovadas, ligeramente apiculadas en los extremos, son brillosas, globosas, miden de 2.8 – 6.3 x 1.8 -3µm. Los conidióforos hialinos, erectos, segmentados, generalmente ramificados, los cuales dan origen a conidióforos más cortos en forma verticiladas y en algunas ocasiones la ramificación ocurre en la parte central del conidióforo. Las fiálides son lageniforme o en forma de botellas alargadas y un poco globosas en la parte central, éstas dan lugar a las fialosporas que se alojan en la parte terminal y forman cadenas de fialosporas.

**Imagen 32 – Micrografías del género *Clonostachys* sp.**

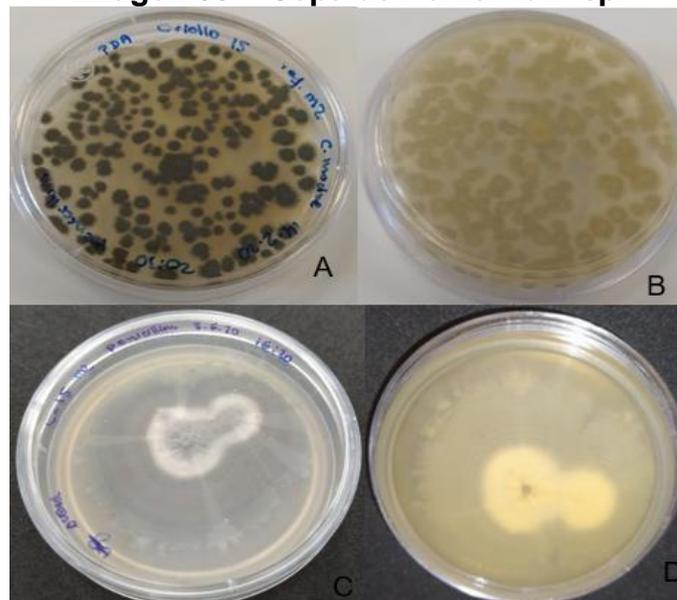


Leyenda: proceso de desarrollo del hongo.

Fuente: Autoría propia.

#### 4.8.1.6 Identificación morfológica de especies del género *Penicillium* (Cepa c-15)

**Imagen 33 – Cepa de *Penicillium* sp.**



Leyenda: a y b) colonia de *Penicillium* en medio de cultivo de PDA, c y d) colonia de *Penicillium* en medio de cultivo V8a.

Fuente: Autoría propia.

La colonia de *Penicillium* sp. en cultivo de PDA presenta un crecimiento volátil (esparcido, inestable) abarcando todo el medio de cultivo (Imagen 33 A-B), formando colonias de diversos tamaños, forma circular a irregular los cuales presentan una elevación convexa, algodonosa a floccoso, son de color verde olivo oscuro (anverso). El reverso de la colonia presenta una pigmentación amarillo verdoso.

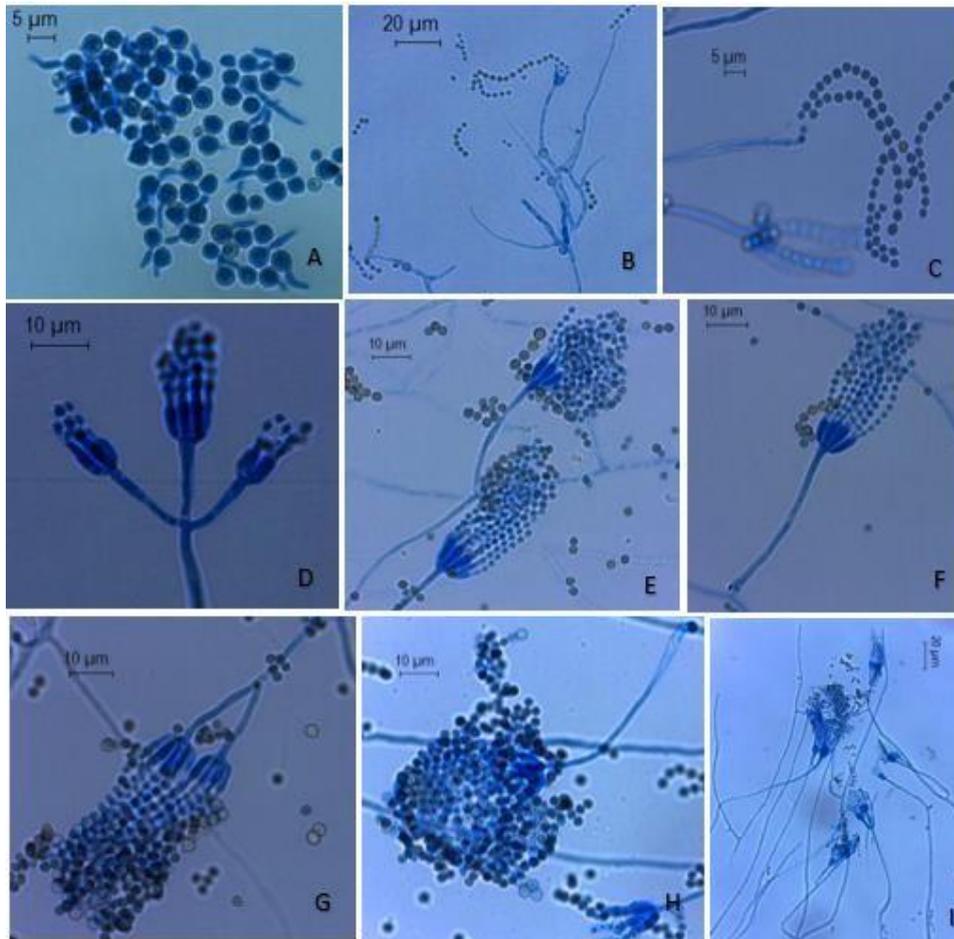
Este medio ayuda al hongo a propagarse con mayor facilidad y colonizar mayores espacios. Su velocidad de crecimiento fue de 4.72mm por día, a una temperatura de  $\pm 24^{\circ}\text{C}$ . En cambio, en medio de cultivo de Avena agar (Imagen 33 C-D), se observa un desarrollo de la colonia más estable, de textura lisa en los bordes, la parte central presenta una elevación tipo agrietada, seguida de un borde blanquecino a verde agua, formando anillos finos, y posteriormente se observa los anillos de color verde olivo muy finos con superficies lisa y filamentosas.

A nivel morfométrico, presenta hifas hialinas septadas, simples y ramificadas, conidióforos septados, con ramificaciones secundarias denominadas métulas generalmente presenta en forma verticilada, y algunas presentan dos métulas y éstas dan soporte a las fiálides que tienen una forma langiforme o botellas alargadas de paredes lisas y portan de 1 a 6 fiálides y en las cabezas da origen a los conidios que dan lugar a las largas cadenas.

A nivel morfométrico los conidios son ovoides, hialinos y brillosos, cuyas dimensiones son: Conidios (2.87-) 2.7-2.3 (-2) x 2.5-1.6  $\mu\text{m}$ ; fiálides ((9.92-) 9.5-7 (-6.7) x 2.3-1.6  $\mu\text{m}$ ; conidióforos (58.9-) 51.5- 25.6 (-22.5)  $\mu\text{m}$  x 2 – 1.8  $\mu\text{m}$  de ancho.

A continuación, se muestra el proceso de desarrollo del género *Penicillium* desde la germinación de los conidios hasta la etapa reproductiva (Imagen 34):

### Imagen 34 – Micrografías del género *Penicillium* sp.



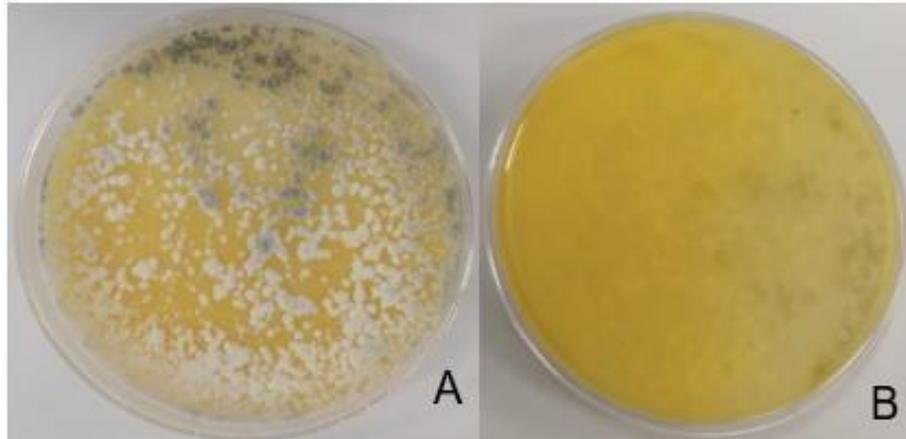
Leyenda: (A) Detalle de conidios germinación (24 horas) 100x.; (B) Germinación unipolar de conidios y esporulación (24 horas) 40x.; (C) Formación de fiálides y esporulación (48 horas) 100x.; (D) Detalle de fiálides (48 horas) 100x.; (E-F) Esporulación (72 horas) 100x.; (G) Esporulación y cadenas de conidios (72- 96 horas) 100x.; (H) Esporulación (144 horas) 100x.; (I) Patrón de esporulación (72 horas) 40x.

Fuente: Autoría propia.

#### 4.8.1.7 Identificación morfológica de especies del género *Trichoderma* (cepa Sial 163)

En medio de cultivo de PDA (Imagen 35), la colonia presenta un crecimiento rápido, forma puntiforme, elevación umbonada, margen filamentososo; en las primeras 24 a 48 horas se observa colonias blanquecinas, algodonosas y el medio de cultivo, al reverso de la colonia, se observa pigmentación del medio de cultivo. Después de las 48 horas, el color de la colonia se torna verde olivo claro a oscuro, presenta un aroma a moho fuerte.

**Imagen 35 – Cepa pura de *Trichoderma* sp. en medio de PDA**



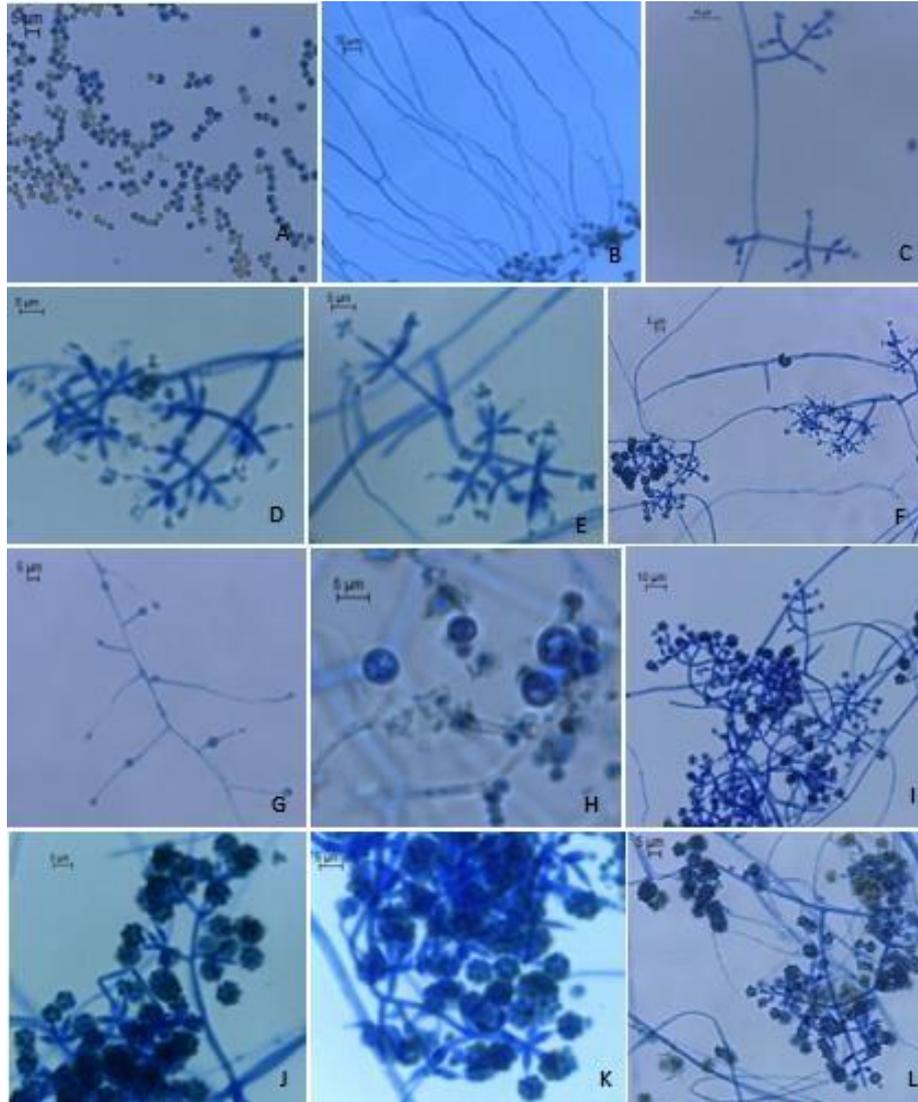
Leyenda: cepa pura de *Trichoderma* en medio de cultivo de PDA, anverso (a), reverso de la colonia (b).

Fuente: Autoría propia.

A continuación, se muestra el desarrollo del hongo (Imagen 36), son micrografías, que muestra el proceso de desarrollo del hongo que inicia desde la germinación de los conidios hasta la fase de esporulación y en algunos casos se pueden observar estructuras de resistencia como las clamidosporas.

Se observan conidios ovoides de color verde olivo claro ( $3.9 - 2.9 \times 3 - 2.5 \mu\text{m}$ ); fiálides subglobosas, presenta terminaciones verticiladas y también con 4 septos, los cuales se encuentran formando las ramas del conidióforo ( $9.12 - 6 (-5.20) \times 2 - 1.7 \mu\text{m}$ ); clamidosporas, terminales, intermedios, brillosas, la mayoría son globosas ( $8.5) 7.9 - 6 (-3.6) \mu\text{m}$ .

**Imagen 36 – Micrografías del género de *Trichoderma* sp.**



Leyenda: (A) detalle de conidios 40x.; (B) Germinación unipolar de conidios (24 horas) 40x.; (C) Formación de conidióforos y fiálides (96 horas) 100x.; (D-E) Detalle de fiálides (96 horas) 100x.; (F-I-L) Esporulación y fiálides formadas (96 horas) 40x.; (G) Clamidosporas (72 horas) 40x.; (H) Clamidosporas (96 horas) 100 x.; (J-K) Esporulación (120 horas) 100x.

Fuente: Autoría propia.

## 5. DISCUSIÓN

La enfermedad de la moniliasis del cacao debido a su severidad se encuentra reportada actualmente en 14 países de América Latina (Phillips, 2017), y es la principal enfermedad para el cultivo de cacao. Debido a su agresividad, puede causar pérdidas hasta el 100% como es el caso de Costa Rica (Krauss *et al.*, 2003), Ecuador entre 20% y 80% (Evans, 1981), Colombia de 40% a 100% (Jaimes; Aranzazu, 2010), Perú mayor al 50% (Organización Internacional del Cacao, 2017). A su vez, en México se ha reportado pérdidas del 5% hasta el 95% (Sagarpa, 2014), en el Estado de Tabasco afecta de 30% a 100%, afectando del rendimiento (Barrón *et al.*, 2014), y en el Estado de Chiapas que es el mayor productor del país, se ve afectado al 100% del cultivo y destruye el 76.98% de la producción (Senasica, 2018). Frente a la situación fitosanitaria que se observa, la ciencia e investigación, también está en desarrollo, tal es así la FRAC donde cada año se actualizan los productos como son los fungicidas, las cuales cuentan con estudios e investigaciones de respaldo y ya se encuentran disponibles en los mercados para su uso.

La buena noticia es que cada año, va aumentando el número de fungicidas o más conocidos como los de control biológico, de acuerdo a la (FRAC 2019, 2022), se encuentran reportados los géneros de *Trichoderma* y *Clonostachys* como controladores biológicos, y estos dos géneros también fueron hallados como micoparásitos en el presente trabajo, los cuales fueron aislados del signo de la moniliasis del cacao.

Asimismo, de acuerdo a la revisión bibliográfica se encuentran reportados como controladores para la enfermedad.

Sin embargo, con el presente trabajo de investigación se obtuvieron siete géneros, que fueron aislados a partir del signo de la enfermedad, donde se encontraban como micoparásitos, y estos géneros son: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Clonostachys* y *Penicillium*, y estos géneros también se encuentran reportados como micoparásitos (Tabla 4), el cual muestra que contamos con otros géneros de hongos que pueden servir para el control biológico de la moniliasis del cacao.

**Tabla 4 – Géneros reportados como micoparásitos en cultivo de cacao**

Géneros	Micoparásitos	Autores
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp	Hoopen <i>et al.</i> , 2003;
<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys rosea</i>	Krauss & Soberanis, 2001; Hoopen <i>et al.</i> , 2003
	<i>Clonostachys rosea</i>	Krauss <i>et al.</i> , 2001
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> spp.	Krauss & Soberanis, 2001; Blakeman & Fokkema, 1982; Hoopen <i>et al.</i> , 2003
		Bolaños, <i>et al.</i> , 2016
	<i>Trichoderma ovalisporum</i>	Holmes & Samuels, 2006; Holmes, <i>et al.</i> , 2006
	<i>Trichoderma</i> sp	Krauss, <i>et al.</i> , 2001
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Bolaños, <i>et al.</i> 2016

Fuente: Autoría propia.

Por otra parte, el género de *Trichoderma* se encuentra reportado como epífito (Tabla 5), y también como micoparásito y endófito (Tabla 6), el cual muestra que este género cuenta con gran potencial como alternativa para el control biológico de la moniliasis del cacao, al ser específico y obtenido de la parte aérea y presente en el signo de la enfermedad. Además, este es un género de suelo, pero en el presente estudio se encontró en la parte aérea.

**Tabla 5 – Géneros reportados como hongos epífitos en cultivo de cacao**

Géneros	Epífitos	Autor
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Yáñez <i>et al.</i> , 2017
	<i>Trichoderma ovalisporum</i>	
	<i>Trichoderma ovalisporum</i>	Holmes <i>et al.</i> , 2006

Fuente: Autoría propia.

Finalmente, la Tabla 6 muestra a los seis géneros reportados como endófitos encontrados en cacao, los cuales también se obtuvieron como hiperparásitos en el presente estudio, porque se hallaron en el signo como micoparásitos. Esto muestra también, que los géneros obtenidos cuentan con gran potencial genético, primero porque son cepas nativas, y segundo como hiperparásitos y endófitos.

**Tabla 6 – Hongos reportados como endófitos en el cultivo de cacao**

Géneros/ especies	Endófitos	Autor
<i>Acremonium</i>	<i>Acremonium</i> sp	Rubini <i>et al.</i> 2005
<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Mejía <i>et al.</i> 2008
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	Rubini <i>et al.</i> 2005
	<i>C. gloeosporioides</i>	Bailey, <i>et al.</i> 2008
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp.	Rubini <i>et al.</i> 2005
	<i>F. chlamyosporum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. polyphialidicum</i> ,	Rubini <i>et al.</i> 2005
<i>Gliocladium</i>	<i>Gliocladium</i> sp., <i>G. catenulatum</i>	Rubini <i>et al.</i> 2005
	<i>Clonostachys rosea</i>	Mejía <i>et al.</i> 2008
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma ovalisporum</i>	Yáñez <i>et al.</i> , 2017
	<i>T. koningiopsis</i>	
	<i>Trichoderma ovalisporum</i>	Holmes, <i>et al.</i> , 2006
	<i>Trichoderma</i> spp.	Rubini <i>et al.</i> , 2005
	<i>T. harzianum</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. cf. harzianum</i> , <i>T. Tkon 21</i> , <i>T. cf. espirales</i> , <i>T. strigosum</i> , <i>T. stromaticum</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. asperellum</i>	Bailey <i>et al.</i> , 2008

Fuente: Autoría propia.

La obtención de cepas puras de *Moniliophthora roreri*, se realizó en tres medios de cultivo (PDA, MEA Y V8a), con el objetivo de verificar en qué medio de cultivo presenta mayor desarrollo, identificar y caracterizar las colonias, asimismo, observar la velocidad de crecimiento. De acuerdo con esta observación *M. roreri* presenta mayor crecimiento tanto somático como reproductivo en MEA, seguido de V8a y PDA. Después de una semana de aislamiento en cada medio de cultivo, se presenta el tamaño de cada colonia: MEA, 19mm, V8a, 21 mm y PDA, 4 mm.

El resultado obtenido de aislamiento en PDA discrepa en el sentido de que la colonia es muy pequeña (4 mm), que no ayuda para hacer una identificación a nivel macroscópico o cultural, como mencionan los Suárez & Rangel (2013), que también utilizaron PDA y que a los 8 a 10 días se identificaron a nivel macroscópico y microscópico, posteriormente lo conservaron. De igual forma, Contreras, (2006) reporta en cultivo de PDA, como el óptimo medio de cultivo para el crecimiento de *M. roreri*.

La obtención de cepas puras de los géneros como *Fusarium*, *Trichoderma*, que se caracterizan generalmente por ser hongos de suelo (Siddiquee, 2017; Howell, 2003; Mpika *et al.*, 2009; Blakeman & Fokkema, 1982). Los resultados obtenidos en la presente investigación se obtuvieron en mazorcas de cacao (aéreo), esto nos genera contar con material nativo y muy específico.

De los 7 géneros obtenidos, solo 2 se encuentran reportados por la FRAC como controladores biológicos y disponibles comercialmente, lo que implica que los resultados presentan un indicador bueno. Por otro lado, estos géneros que fueron encontrados como micoparásitos, puedan ser vistas como controladores biológicos para la moniliasis del cacao, objetivando con perspectivas futuras, debido a la severidad de la enfermedad, y así aumentar otros géneros alternativos como controladores biológicos para la moniliasis del cacao.

## 6. CONCLUSIONES

De los 7 géneros identificados, 6 se encuentran reportados, como, hiperparásitos: *Clonostachys* sp, *Trichoderma* sp, *Acremonium* sp, *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp y *Cladosporium* sp, con gran potencial de control biológico de *M. roreri*.

Cuatro de siete géneros asociados al signo de *M. roreri*, (*Fusarium* sp, *Cladosporium* sp, *Trichoderma* sp, *Clonostachys* sp, *Penicillium* sp, *Acremonium* sp, *Colletotrichum* sp) también, se encontraron géneros asociados al síntoma como son: *Acremonium* sp, *Trichoderma* sp, *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp, más dos géneros como *Alternaria* sp y *Epicocum* sp. pero, estas cepas sólo se aislaron, y guardaron para próximas investigaciones.

El género de *Penicillium* se encontró como hiperparásito en la colonia de *Moniliophthora roreri*, y este género en específico presentaba mayor crecimiento sobre la colonia de monilia, pero no se encuentra reportado como hiperparásito.

La enfermedad conocida como monilia, podredumbre helada, el cual se encuentra distribuida en 14 países de ALC, es una de las principales limitantes para la producción de este cultivo de importancia económica.

Las enfermedades más letales para el cultivo de cacao son la monilia y la escoba de bruja, estos fitopatógenos a nivel fúngico.

Se logro cumplir con los objetivos propuestos en la tesis y los productos (cepas puras) se conservaron en el silica gel y papel filtro que se integraron al cepario del Laboratorio de Fitopatología de la FES C4- Cuautitlán Izcalli.

Los medios de cultivos para *M. roreri* es MEA (extracto de malta agar), tanto para la identificación cultural y microscópica, como segundo medio es el PDA (presenta crecimiento lento) y como último medio el medio de cultivo de V8a.

Los géneros aislados fueron solo de aquellas mazorcas de cacao que presentaban el signo de la enfermedad, por ello el material genético que se tiene es nativo y de alto valor a nivel de investigación.

Se concluye que existe una gran diversidad de microorganismos asociados al signo de *M. roreri*, los cuales se pueden utilizar como biofungicidas en las futuras investigaciones, ya que se cuenta con el material genético nativo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aime, M.; Phillips, M. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, 97(5), p. 1012-1022, 2005.

Atanasova, L.; Druzhiniana, I.; Jaklitsch, W. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. In: P. Mukherjee, B. A. Horwitz, U. S. Singh, M. Mukherjee; M. Schmoll (Eds.) **Trichoderma Biology and Applications**, p. 10-42. Boston: CAB International, 2013.

Ayala Zermeño, M. Métodos de conservación de hongos entomopatógenos. **Servicio de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria**, Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA, SAGARPA, 2017.

Báez, O. L.; González Ramírez, S.; Zaragoza Espinoza, S.; Martínez Moreno, J.; Bello Ruiz, C.; Fuentes Villarreal, J.; Mejía González, O. Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Monilophthora roreri* (Cif. & Par.) en Tapachula, Chiapas, México. **Acta Agrícola y Pecuaria**, 1(1), p. 16-23, 2014.

Bailey, B. A.; Evans, H. C.; Phillips M.; W. Ali, S. S.; Meinhardt W., L. *Monilophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. **Molecular Plant Pathology**, 19(7), p. 1580-1594, 2018.

Bailey, B.; Bae, H.; Strem, M.; Crozier, J.; Thomas, S.; Samuels, G.; Holmes, K. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, 46(1), p. 24-35, 2008.

Barnett, H.; Lilly, V. A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. **Mycologia**, 54(1), p. 72-76, 1962.

Barnett, H.; Hunter, B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. New York: MACMILLAN PUBLISHING COMPANY, 1987.

Barrón García, Y. P.; Azpeitia Morales, A.; López Andrade, P. A.; Mirafuentes Hernández F. Metodología adaptada para la formación de híbridos F1 De Cacao (*Theobroma Cacao* L.) en Tabasco. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, 5(5), p. 765–777, 2014.

Barros, O. Historia de la Moniliasis y sus repercusiones en los países productores de cacao en Sur América. In G. A. Enríquez (Ed.), **La moniliasis del cacao**, p. 14-17, 1980. Costa Rica. Disponible en: <[http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/2789/La\\_moniliasis\\_del\\_cacao.pdf;jsessionid=5E99DF3EEF443BD8BCB8FC2C0E45FCEB?sequence=1](http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/2789/La_moniliasis_del_cacao.pdf;jsessionid=5E99DF3EEF443BD8BCB8FC2C0E45FCEB?sequence=1)>.

Bensch, K.; Braun, U.; Groenewald, J.; Crous, P. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, 72, p. 1-401, 2012.

Bensch, K.; Groenewald, J.; Braum, U.; Dijksterhuis, J. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, 82(82), p. 23-74, 2015.

Bissett, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II ingrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, 69(11), p. 2357-2372, 1991.

Blakeman, J. P.; Fokkema, N. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Phytopathol**, 20(1), p. 167-190, 1982.

Bolaños, M.; Vasco, A.; Mercado, A.; Caicedo Corozo, J.; Castro Arroyo, S.; Morales, D.; Tezara, W. Agronomic performance of 31 clones of national cocoa with the moniliasis biocontrol. **Investigación Y Saberes**, 5(1), p. 39-54, 2016.

Cárdenas Prado, N.; Darghan, A.; Sosa Rico, M.; Rodriguez, A. Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (casanare), Colombia. **Acta Biológica Colombiana**, 22(2), p. 209-220, 2017.

Carrera Sánchez, K.; Mosquera Paredes, L.; Leiva Mora, M. Protocolo para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.* en frutos de cacao cv. "Nacional" de la Amazonia ecuatoriana. **Biotecnología Vegetal**, 14(3), p. 147-150, 2014.

Castillo, H.; Rojas, R.; Villalta, M. *Gliocladium* sp., agente biocontrolador con aplicaciones prometedoras. **Tecnología en Marcha**, 29(7), p. 65-73, 2016.

Chithra, S.; Jasim, B.; Sachidanandan, P.; Jyothis, M.; Radhakrishnan, E. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, 21(4), p. 534-540, 2014.

Ciferri, R.; Parodi, E. Descrizione del fungo che causa la "Moniliasi" del cacao. **Phytopath**, 6, p. 539-542, 1933. Disponible en:  
<[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?hl=en&volume=6&publication\\_year=1933&pages=539-542&journal=Phytopath.+Z.&author=R.+Ciferri&author=E.+Parodi&title=Descrizione+del+fungo+che+causa+la+%E2%80%9CMoniliasi%E2%80%9D+del+cacao](https://scholar.google.com/scholar_lookup?hl=en&volume=6&publication_year=1933&pages=539-542&journal=Phytopath.+Z.&author=R.+Ciferri&author=E.+Parodi&title=Descrizione+del+fungo+che+causa+la+%E2%80%9CMoniliasi%E2%80%9D+del+cacao)>.

Contreras, L. Y. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en municipios del Nororiente colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. **Universidad Francisco de Paula Santander**, 11(1), p. 3-8, 2006.

Crozier, J.; Thomas, S.; Aime, M.; Evans, H.; Holmes, K. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, p. 783-791, 2006.

Cuervo Usán, J.; Espadas Reséndiz, M.; Navarrete Maya, R.; Zita Padilla, G. **Manual de prácticas de laboratorio de Fitopatología**. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2018.

Evans, H. C. Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). In: M. L. Bailey B. (Ed.) **Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**. Springer: Cham, 2016.

Evans, H. C. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. In: M. I. Commonwealth. (Ed.) **Phytopathological Papers**, Kew, Surrey, UK., p. 24-44, 1981.

Evans, H. C.; Holmes, K.; Phillips, W.; Wilkinson, M. What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? **Mycologist**, 16(4), p. 148-152, 2002.

Evans, H.; Bezerra, J.; Barreto, R. Of mushrooms and chocolate trees: aetiology and phylogeny of witches' broom and frosty pod diseases of cacao. **Plant Pathology**, 62, p. 728-740, 2013.

Evans, H.; Holmes, K.; Thomas, S. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma giliri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, 2(2), p. 149-160, 2003.

Evans, H.; Stalpers, J.; Samson, R.; Benny, G. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. **Revista canadiense de botánica**, 56(20), p. 2528-2532, 1978.

FAO. Cultivos y productos de ganadería. **Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo de la Alimentación y la Agricultura**. 2019. Disponible en: <<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>>.

Fernández Mendiola, J. **Control biológico de *Fusarium* spp. con cepas nativas de *trichoderma* spp. en plántulas de tomate (*lycopersicon esculentum* mill)**. Cuautitlan Izcalli, Estado de México, México, 2016.

Freile Almeida, J. A.; Morgado Martínez, M.; Pérez García, G. A.; Alemán Pérez, R. D.; Dominguez Brito, J. Soil microorganisms and plant diseases associated to cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes in the Ecuadorian Amazon. **Acta Agronómica**, 67(1), p. 23-29, 2018.

FRAC. **Fungal control agents by cross resistance pattern and mode of action**. Octubre 14, 2022. Disponible en <https://www.frac.info/>

Giraldo, A.; Gené, J.; Sutton, D.; Madrid, H.; Hoog, G.; Cano, J.; Crous, P. Phylogeny of *Sarocladium* (*Hypocreales*). **Persoonia**, 34, p. 10-24, 2015.

Harman, G. E.; Kubicek, C. P. Morphology and identification of Trichoderma. In: **Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics**. Vol. 1, p. 4-6, 2002.

Hebbar, P. K. Cacao Diseases: A global perspective from and industry point of view. **The American Phytopathology Society**, 97, p. 1658-1663, 2007.

Heuchert, B.; Braun, U.; Schubert, K. Morphotaxonomic revision of fungicolous Cladosporium species (hyphomycetes). **Schlechtendalia**, 13, p. 1-78, 2005.

Disponível em:

<<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000063&Rec=14662&Fields=All>>.

Holliday, P. **Fungus diseases of tropical crops**. Toronto, Canada: General Publishing Company, 1980.

Holmes, K.; Krauss, U.; Samuels, G. Trichoderma ovalisporum, a novel biocontrol agent of frosty pod rot (moniliophthora roreri) of cocoa (theobroma cacao): from discovery to field. (S. S. O., Ed.) **Proceedings of the 1st International Conference on Plant Microbe Interactions: Endophytes and Biocontrol Agents**, p. 54-65, 2006. Disponível em:

<<https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=179627>>.

Hoopen, G. M.; Rees, R.; Aisa, P.; Stirrup, T.; Krauss, U. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera Clonostachys and Fusarium for the biocontrol of black pod (Phytophthora palmivora) and moniliasis (Moniliophthora roreri) on cocoa (Theobroma cacao). **Mycological Research**, 107(5), p. 587-596, 2003.

Howell, C. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant Diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, 87(1), p. 4-10, 2003.

Jaimes Suárez, Y.; Aranzazu Hernández, F. Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia, con énfasis en Monilia (Moniliophthora roreri). **Primera**. (L. M. Hoyos, Ed.) Colombia: Corpoica, 2010.

Krauss, U.; Ten Hoopen, M.; Hidalgo, E.; Martínez, A.; Arroyo, C.; García, J.; Sánchez, V. Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) del cacao (Theobroma cacao) en Talamanca, Costa Rica. **Agroforestería en las Américas**, 10(37-38), p. 52-58, 2003.

Krauss, U.; Ten Hoppen, M.; Rees, R.; Stirrup, T.; Argyle, T.; George, A.; Casanoves, F. Mycoparasitism by Clonostachys byssicola and Clonostachys rosea on Trichoderma spp. from cocoa (Theobroma cacao) and implication for the design of mixed biocontrol agents. **Elsevier**, 67, p. 317-327, 2013.

Krauss, U.; Soberanis, W. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. **Biological Control**, 22(2), p. 149-158, 2001.

Latz, M.; Jensen, B.; Collinge, D.; Jorgensen, H. Identification of two endophytic fungi that control *Septoria tritici* blotch in the field, using a structured screening approach. **Biological Control**, 141, 2020.

Leslie, J. F.; Summerell, B. **The Fusarium Laboratory Manual**. USA: Blackwell Publishing, 2006.

McSpadden Gardener, B.; R. Fravel, D. Biological control of plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. **Plant Health Progress**, 2002.

Mejía, L.; Rojas, E.; Maynard, Z.; Van Bael, S.; Arnold, A.; Hebban, P.; Allen Herre, E. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Elsevier**, 46, p. 4-14, 2008.

Monzón, A. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo integrado de plagas. **CATIE**, (63), p. 95-103, 2001.

Moss O., M. Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. In M. Moss, & P. J. F. (Ed.) **Biotechnology Handbooks**. Vol. 1. Boston, MA: Springer, 1987.

Motamayor, J. C.; Lanchenaud, F.; Mota da Silva, J.; Loor, R.; Kuhn N.; Brown J. S.; Schnell J. R. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.). **Plos One**, 3(10), 2008.

Mpika, J.; Kébe, I.; Issali, A.; NGuessan, F.; Druzhinina, S.; Komon, Z.; Aké, S. Antagonist potential of *Trichoderma* indigenous isolates for biological control of *Phytophthora palmivora* the causative agent of black pod disease on cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cote d'Ivoire. **African Journal of Biotechnology**, 8(20), p. 5280-5293, 2009. Disponible en: <<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-73349093408&origin=inward&txGid=677dbb9baac839d356562b249fe9f607>>.

Murillo, D.; González, L. Evaluación en laboratorio y campo de fungicidas para el combate de la Moniliasis del cacao. **Agronomía Costarricense**, p. 83-88, 1984.

Mycobank. *Gliocladium*. **Fungal Databases – Nomenclature y Species Banks**, May 2020. Disponible en: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=39109&Fields=All>>.

Narayanasamy, P. Biological Management of Diseases of Crops. In: Hokkanen, H.; Gao, Y. (Ed.) **Progress in Biological Control**. USA: Springer, 2013.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. April 30, 2020. Disponible en: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5455>>.

Onions, A. H. S.; Brady, B. L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: Peberdy, J. F. (Ed.) **Biotechnology Handbooks**. USA, Springer: 1987.

Orea, M. D.; Cortés Romero, T; Pérez López, P.; España Pérez, V.; Lepe Ramíres, M.; Parra Cuervo, J. Current Status of Cocoa Frosty Pod Rot Caused by *Moniliophthora roreri* and a Phylogenetic Analysis. **Plant Pathology Journal**, 16(1), p. 41-53, 2017.

Organización Internacional del Cacao. Poda coronal en el manejo integrado de la moniliasis en cacao Criollo. In: Cortes, I. (Ed.) **Simposio internacional de investigación del cacao**. Lima-Perú, 2017. Disponible en: <[https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/search\\_result.html](https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/search_result.html)>.

Peixoto, N. S.; Accioly, P.; De Azevedo, J.; Caetano, L. Microorganismos endofíticos en plantas: Status actual y perspectivas. **Redalyc**, 3(4), p. 69-72, 2004.

Perelló, A.; Simón, M.; Sisterna, M.; Cordo, C.; Arambarri, A. Microflora of wheat (*Triticum aestivum* L.) in Buenos Aires Province (Argentina) and its possible significance in biological control of foliar pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 108(5), p. 459-471, 2001.

Phillips Mora, W. Biología de la moniliasis del cacao y desarrollo de genotipos resistentes. **Revista Mexicana de Fitopatología**, 35, S6- S9, 2017. Disponible en: <<http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>>.

Phillips Mora, W.; Wilkinson, M. J. Frosty Pod of Cacao: A Disease with a Limited Geographic Range but Unlimited Potential for Damage. **Phytopathology**, 97(12), p. 1644-1647, 2007.

Phillips Mora, W., Aime, M.; Wilkinson, M. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. **Plant Pathology**, 56, p. 911-922, 2007.

Phillips Mora, W.; Baqueros, F.; Melnick, R.; Bayley, B. First report of frosty pod rot caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Bolivia. **Nem Disease Reports**, 31(29), 2015.

Phillips Mora, W.; Cawich, J.; Garnett, W.; Aime, M. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. **Plant Pathology**, 55(4), p. 584, 2006a.

Phillips Mora, W., Coutiño A., Ortiz, C., López, A., Hernández, J., Aime, M. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cacao in Mexico. **Plant Pathology**, 55(4), p. 584, 2006b.

Ploetz, R. C. Cacao Diseases: Important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, 97(12), p. 1634-1639, 2007.

Refai, M.; Hassan, A.; Hamed, M. **Monograph on The Genus Fusarium**. Cairo, Egypt: University of Cairo, 2015.

Roskov, Y.; Abucay, L.; Orell, T.; Nicolson, D.; Kunze, T.; Culham, A.; De Wever, A. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life. Annual Checklist. **Especies 2000**. Leiden, Holanda, 2015. Disponible en: <[www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2015](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2015)>.

Rubini R., M.; Silva Ribeiro, R. V.; Pomella, A. S.; Maki, C. L.; Araújo, W.; Dos Santos, D.; Azevedo, J. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and control of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of witches Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, p. 24-33, 2005.

Sagarpa. **Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural**. 2014. Disponible em: <[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/156457/Manejo\\_fitosanitario\\_del\\_cacao.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/156457/Manejo_fitosanitario_del_cacao.pdf)>.

Samuels, G. J. Perfect states of *Acremonium* the genera *Nectria*, *Actiniopsis*, *Ijuhya*, *Neohenningsia*, *Ophiodictyon* and *Peristomialis*. **Mycology**, 14(3), p. 231-260, 1976.

Sánchez, V.; Zambrano, J.; Iglesias, C. **La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe**. Quito: INIAP, 2019. Disponible en: <<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5382>>.

Sánchez Mora, F.; Garcés Fiallos, F. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.* en el cultivo de cacao. **Scientia Agropecuaria**, 3, p. 249-258, 2012.

Schöneberg, A.; Musa, T.; Voegele, R.; Vogelgsang, S. The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* depending on the experimental approach. **Journal of Applied Microbiology**, 118(5), p. 1165-1179, 2015.

Schroers Hans, J. A monograph of *Biotectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys abamorphs*. **Studies in Mycology**, (46), 2001.

Schubert, K. **Morphotaxonomic revision of foliicolous Cladosporium especies (hyphomycetes)**. Alemania: Universidad Martin Luther Halle-Wittenberg, 2005. Disponible en: <<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H208/index.htm>>.

Senasica. **Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas**. 2018. Disponible en: <<https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/principales-plagas-y-enfermedades-en-cacao>>.

Siddiquee, S. Morphology based characterization of Trichoderma species. In: **Practical handbook of the Biology and Molecular diversity of Trichoderma species from tropical regions**. USA: Springer, 2017.

Smith, I.; Dunez, J.; Lelliott, R.; Phillips, D.; Archer, S. **Manual de enfermedades de las plantas**. Madrid: Mundi Prensa, 1992.

Suárez Contreras, L.; Rangel Riaño, A. Aislamiento de microorganismos para el control biológico de *Moniliophthora roreri*. **Acta Agronómica**, p. 370-378, 2013. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169930016012>>.

Summerbell, R.; Gueidan, C.; Schroers, H.; de Hoog, G.; Starink, M.; Rosete, Y.; Scott, J. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium* and *Trichothecium*. **Studies in Mycology**, 68, p. 139-162, 2011.

Torres, D. E.; Rojas Martínez, R.; Zavaleta Mejía, E.; Guevara Feter, P.; Márquez Guzmán, G.; Pérez Martínez, C. *Cladosporium cladosporoides* and *Cladosporium pseudocladosporoides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. **Plos One**, 12(1), p. 1-16, 2017.

Ulloa, M.; Hanlin, R. T. **Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología**. Minnesota: The American Phytopathological Society, 2006.

Valderrama, J. R.; Aime, M. C. The cacao pathogen *Moniliophthora roreri* (Marasmiaceae) produces rhexolytic thallic conidia and their size is influenced by nuclear conditions. **Mycoscience**, 57(3), p. 208-216, 2016.

Wang, X.; Radwan, M.; Taráwneh, A.; Gao, J.; Wedge, D.; Rosa, L.; Cutler, S. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporoides*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 61(19), p. 4551-4555, 2013.

Wijayawardene, N.; Hyde, K.; Rajeshkumar, K. Notes for genera: Ascomycota. **Fungal Diversity**, 86(1), p. 1-594, 2017.

Yáñez, S.; Castro, B.; Silvestre, L.; Hernandez, H.; Tafur, V. Development of an integrated management system Diseases cacao (*Theobroma cacao* L.) with emphasis biological control. **International Journal of Current Innovation Research**, 3(12), p. 923-928, 2017.

Zhan, G.; Tian, Y.; Wang, F.; Chen, X.; Guo, J.; Jiao, M. A novel Fungal Hyperparasite of *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*, the Causal Agent of Wheat Stripe Rust. **Plos One**, 9(11), 2014.

Zhou, S.; Qiao, L.; Jayawardena, R.; Hyde, K.; Ma, X.; Wen, T.; Kang, J. Two new endophytic *Colletotrichum* species from *Nothapodytes pittosporoides* in China. **Myco Keys**, 49, p. 1-14, 2019.

## GLOSARIO

**Célula de pie:** célula hifal que soporta una célula esporógena o un talo.

**Conidióforo:** hifa simple o ramificada, el cual se diferencia de la parte somática por producir y sustentar conidios, estas son generadas en células especializadas denominadas conidiógenas.

**Clamidospora:** esporas de origen asexual, recubierta por una pared recia y de tipo perdurante, que funciona como espora de resistencia o latencia.

**Fialospora:** espora de reproducción asexual, formada por abstricción en el ápice de una fiálide.

**Fialospora *phialospore* (del gr. *phialís*, dim. de *phiále*, vaso, botella y *sporá*, semilla, espora):** espora de reproducción asexual, formada por abstricción en el ápice de una fiálide; termino relacionado con la ontogenia conidial, que se aplica principalmente a hongos imperfectos de orden Moniliales.

**Flocoso:** tomentoso flojamente algodonoso o lanoso o más densamente aglomeradas en copos como la franela.

**Fiálide:** tipo de célula conidiógena en forma de botella, que produce conidios blásticos (fialoconidios o fialosporas) en sucesión basípeta.

**Phialophora terminal:** es una espora de una fiálide monospórica, es decir, con su producción termina el crecimiento de la fiálide.

**Hialino:** sin color.

**Ramo Conidio *ramocodium* (del lat. *ramus*, rama y *conidium*, del gr. *rónis*, polvo e *ídon*, suf. *dim.*):** rama intercalar o apical de un conidióforo que al desprenderse funciona como un conidio, tal como ocurren en las esporas del género de *Cladosporium* (Moniliales).

**Septado:** con septos o particiones como las hifas de la mayoría de los hongos.

**Teleomorfo:** estado sexual o perfecto de un hongo (ascógenas o basidiógeno), cuyas esporas se reproducen por meiosis.

**Verruculoso:** con superficie áspera, ornamentada de diminutas o microscópicas prominencias semejantes a verrugas.

## ANEXO A – Formato de colecta de ejemplares fitopatológicas (campo)

A) DATOS GENERALES	
Colecta No.	01
Localidad	Municipio Huimanguillo, Tabasco
Coordenadas	17.848619, -93.394940
Fecha	07/01/2020
Nombre Científico	<i>Theobroma cacao</i> L.
Nombre Común	cacao



B) APARIENCIA GENERAL DEL HOSPEDERO		
Madurez prematura	Necrosis	Monnificación de la vaina
Defomaciones	Plecionerosis	Desarrollo anormal
<p><b>Observaciones y/o especificaciones:</b> La enfermedad afecta sólo las mazorcas, las más susceptibles o críticas son aquellas menores a 3 meses de edad, los síntomas típicos son la deformación, madurez prematura, necrosis tipo plecionerosis y holocrecrosis, manchas de color chocolate y finalmente se observan la esporulación (signo).</p>		



C) ÓRGANOS AFECTADOS				
Raiz	Tallo	Hoja	Flor	Fruto



D) SEVERIDAD					
D) SEVERIDAD	25%	E) INCIDENCIA	25%		
	50%		50%		
	75%		75%		
	100%		100%		

F) DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD		
Plantas aisladas	Bandas o franjas	Áreas pequeñas
Áreas grandes	Manchones	Bordes de cultivo
<p><b>Observaciones y/o especificaciones:</b> Generalmente se observaron en variedades de cultivos que son más susceptibles a <i>Monilophthora roteri</i>, como la var. Rim 75. La forma de dispersión es por viento, el único fuente de inoculo son las esporas o conidios.</p>		

### G) TIPO DE SÍNTOMA

Anexo: Clave de identificación de síntomas y signos.

**Síntoma:** protuberancias o deformaciones, necrosis interna y externa (holonecrosis y plecionerosis) en las mazorcas, manchas, madurez prematura.



### I) CONDICIONES DURANTE LA APARICIÓN DE LOS SÍNTOMAS Y DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Precipitación

Vientos

T° alta o baja

Humedad

Sombra

HR alta o baja

#### Observaciones y/o especificaciones:

La enfermedad se encuentra en rangos de una altitud entre 0 - 1520 m.s.n.m., con una precipitación anual de 780 - 5,500 mm y una temperatura promedio de 18 a 28 °C. (Phillips Mora, 2006). Las condiciones secas, humedad relativa baja y temperatura mayor a 26°C, favorecen la liberación y dispersión de los conidios y las lluvias intensas y frecuentes favorecen la presencia de agua sobre los frutos, facilitando la germinación y penetración de los conidios (Sánchez Mora & Garcés Fiallos, 2012).

### K) QUÍMICOS APLICADOS

Fertilizantes

Defoliantes

Insecticidas

Herbicidas

Fungicidas

Ninguno

#### Observaciones y/o especificaciones:

### H) SIGNO

Anexo: Clave de identificación de síntomas y signos.

**Signo:** esporulación en la parte afectada (fruto).



### J) LABORES CULTURALES

Riego

Materia orgánica

Podas

Aclareos

Fertilizaciones

Deshierbe

#### Observaciones y/o especificaciones:

La producción es orgánica, no se aplica ningún tipo control en el área de investigación.

### L) CARACTERÍSTICAS DEL SUELO

#### Observaciones y/o especificaciones:

Suelos vertisoles arcillosos

### M) DEFICIENCIAS Y/O EXCESOS NUTRICIONALES

#### Observaciones y/o especificaciones:

### A) DESCRIPCIÓN DEL SÍNTOMA

Forma

Se presentan protuberancias deformes, manchas de color café oscuro a chocolate con crecimiento irregular, madurez prematura y necrosis.

Tamaño

La necrosis puede ser de tipo holonecrosis o plecionecrosis y las manchas son de forma irregular.

Ubicación en el órgano

Sólo en los frutos o mazorcas del cultivo.



### B) CARACTERÍSTICAS DEL SÍNTOMA Y SIGNO



**Sintoma:** necrosis interna, las almendras afectadas presentan un líquido y se endurecen...



**Sintoma:** manchas de color chocolate, de forma irregular.



**Signo:** Momificación de la vaina, se observa necrosis general y muerte de la mazorca.

## ANEXO B – PROTOCOLOS

### 1. AISLAMIENTO DE *MONILIOPHTHORA RORERI* POR MÉTODO DIRECTO



Cepa pura: MEA: *Moniliophthora roreri*.

Materiales:

- Medio de cultivo
- Mazorcas de cacao con esporulación
- Agujas de disección
- Microscopio estereoscópico
- Agua destilada
- Alcohol
- Mechero bunsen

Procedimiento: desinfectar el área a trabajar y mantener en condiciones asépticas. Primero, desinfectar y esterilizar la aguja de disección. Segundo, con ayuda del microscopio estereoscópico graduar la medida del lente para observar la muestra, y con apoyo de la aguja de disección, retirar algunas esporas y colocar en el medio de cultivo específico para la monilia. Tercero, rotular y colocar en la incubadora a 24°C, por 48 horas, después colocar a temperatura ambiente y revisar cada 24 horas por 7 días. Cada día, realizar la bitácora sobre el desarrollo del agente, como son el crecimiento somático, forma, color, textura, tamaño de la colonia, temperatura.

### 2. GUARDADO Y CONSERVACIÓN EN SÍLICA GEL

Recomendación general: Antes de comenzar a trabajar, limpiar el área donde se va a trabajar, para evitar contaminación. Para la limpieza se emplea cloro y secar con papel absorbente y encender los mecheros.

Previo: *Realizar validación temporal en tela adhesiva con azul lactofenol.*

## 2.1. Protocolo de guardo en sílica gel (elaboración propia), Cuervo, *et al.*, 2018.

### Materiales:

- Alcohol
- Portaobjetos (estéril)
- Mechero
- Agua destilada (estéril)
- Rotulador
- Cubitos de hielo (picado)
- Pipeta
- Cloro
- Microscopio compuesto
- Bitácora
- Cepa pura (identificada a nivel de género)
- Tubo vial con perlitas de sílica gel (esterilizado)

### a) Preparación de los viales (kits).



### Materiales:

- Frasco con sílica gel
- Gradilla
- Tubos viales
- Algodón
- Papel aluminio
- Vaso precipitado (vidrio)

Procedimiento: Colocar los viales en la gradilla y agregar las perlitas de silica como a  $\frac{3}{4}$  del tubo, realizar una pequeña bolita de algodón, tapar el vial, colocar en el vaso de precipitado, a un lado las tapas y forrar con papel aluminio. Finalmente esterilizar. Se recomienda preparar estos materiales con anticipación.

b) Preparación de la solución de leche al 10%. Para 100 ml.

- Leche en polvo
- Agua estéril

Procedimiento: De acuerdo con la formulación el tarro de leche dice: 36g para 240ml, despejando  $X = 15g$  de leche para 100ml (100%). Como se desea a una concentración de 10%, al final tendremos 1.5g de leche (10%). Después se tapa con papel aluminio y se esteriliza.

36g.....240ml  
X.....100 ml

X= 15g, se tiene al 100%
--------------------------

15g.....100%  
X.....10%

X= 1.5g diluido al 10%.
-------------------------

c) Proceso de guardado.



En condiciones asépticas, colocar los viales en un recipiente que contenga el hielo picado (realizar este proceso con 10 a 15 min de anticipación), para evitar que al momento de echar la leche se quiebren. Ahora tomamos la cepa y agregar 1/2 ml de leche (si es caja chica, caso contrario 1 ml de leche) y se empieza a raspar con los

portaobjetos (estéril), tener cuidado en no raspar medio de cultivo, en seguida tomar ½ ml del raspado con la pipeta previamente calibrada y colocar la solución en el vial, tapar con el algodón.

Rotular (género, fecha, medio de cultivo, cultivo, grupo). Finalmente, colocar en un frasco de vidrio colocado verticalmente y dejar en la incubadora por 2 a 4 días, para saber si ya se puede guardar le damos un pequeño golpe al vial y ver que las perlitas se mueven, esto es una señal de que ya podemos guardarlo en la refrigeradora (retirar el algodón y cerrar con su tapa).

### 3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

#### 3.1. PDA (papa dextrosa agar)

##### Materiales

- PDA (fórmula comercial) 39g
- Agua destilada 1000ml
- Matraz
- Cajas de Petri desechables
- Papel aluminio
- Cloranfenicol 2 ml

##### Equipos

- Campana de flujo laminar
- Báscula analítica
- Mechero Bunsen
- Micropipeta
- Probeta graduada
- Autoclave

Procedimiento: pesar 39 g de PDA (fórmula comercial), luego agregar de a pocos en el matraz con agua destilada (1000 ml) y calentar de a pocos hasta disolver. Finalmente agregar el antibiótico de cloranfenicol (200ug/ml), agitar y tapar con papel

aluminio. Dejar reposar por 10 minutos, después centrifugar por 20 minutos a 3000 rpm. Finalmente, llenar en las cajas Petri desechables y almacenar en el refrigerador.

### 3.2. V8A (jugo de V8 Agar)

#### Materiales

- Jugo de v8 100ml
- $\text{CaCO}_3$  2g
- Agar bacteriológico 15g
- Agua destilada 900 ml
- Cloranfenicol 2 ml
- Tubos falcón 2und
- Matraz 1und
- Cajas de Petri desechables
- Papel aluminio
- Probeta graduada de 100ml

#### Equipos

- Campana de flujo laminar
- Centrífuga
- Báscula analítica
- Mechero bunsen
- Autoclave

Procedimiento: colocar el jugo de V8 en los tubos de falcón, agregar el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), agitar hasta disolver todo. Dejar reposar por 10 minutos, después centrifugar por 20 minutos a 3000 rpm. Decantar el líquido y colocar en otro tubo de falcón la cantidad de 100ml. Después, agregar los 100 ml (V8A decantado) a la solución realizada previamente de agar bacteriológico y agua destilada (900 ml), para obtener al final 1 litro de solución final (medio de cultivo), finalmente adicionar el antibiótico de cloranfenicol ( $2\mu\text{g/ml}$ ), agitar y cubrir la boquilla del matraz con papel aluminio.

### 3.3. AvA (avena- agar)

#### Ingredientes

- Avena 60 gr
- Agar 12gr
- Extracto de levadura 2 gr
- Agua destilada 1000ml
- Cajas de Petri desechables
- Cloranfenicol 2 ml
- Probeta graduada de 100ml
- Papel aluminio

#### Equipos

- Báscula analítica
- Mechero Bunsen
- Autoclave
- Campana de flujo laminar

Procedimiento: Remojar los 60 g de avena en 600ml de agua por 24 horas. Después, hervir por 30 minutos, dejar enfriar, centrifugar por 15 minutos a 3000 rpm. Decantar el líquido final y reservar. Posteriormente, disolver el agar en 400 ml de agua destilada calentando ligeramente, después añadir a esta solución el extracto de levadura y mezclar bien, finalmente aforar con agua destilada a 1000 ml, agregar el antibiótico (2µg/ml), tapar con papel aluminio. Esterilizar a 121 ° C por 15 minutos.

### 3.4. Agar Czapot Dox (Cz)

#### Materiales

- Agar Czapot Dox (fórmula comercial) 25g
- Agua destilada 500ml

- Probeta graduada
- Cloranfenicol 1 ml
- Probeta graduada de 100ml
- Papel aluminio
- Cajas de petri desechables
- Matraz

#### Equipos

- Campana de flujo laminar
- Mechero bunsen
- Balanza analítica

Procedimiento: Disolver el Agar Czapot con agua destilada, calentando de a pocos, agregar (1 µg/ml), agitar y cubrir con papel aluminio. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

### 3.5. Malta Agar (MEA)

#### Materiales

- Extracto de malta 5g
- Dextrosa 5g
- Agar 7g
- Agua destilada 250 ml
- Peptone 0.25g
- Cajas de Petri desechables
- Cloranfenicol 0.5 ml

#### Equipos

- Campana de flujo laminar
- Mechero bunsen
- Balanza analítica
- Matraz

Procedimiento: Disolver el extracto de malta con agua destilada, calentando de a pocos, enseguida agregar de a pocos Dextrosa, agitar hasta disolver, después agregar el agar y mezclar hasta disolver moviendo constantemente. Finalmente,

agregar el antibiótico (0.5 µg/ml), agitar y sellar con papel aluminio. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

#### 4. TÉCNICA DE VALIDACIÓN TEMPORAL EN CINTA ADHESIVA CON AZUL LACTOFENOL

##### Materiales

- Muestras (mazorca de cacao)
- Guía morfológica
- Pinza de disección
- Agua destilada
- Portaobjetos
- Azul lactofenol
- Cinta adhesiva
- Rotulador
- Mechero bunsen
- Microscopio Compuesto
- Microscopio Estereoscópico

Procedimiento: Realizar observaciones de la mazorca con ayuda del Microscopio Estereoscópico, para observar mejor el signo. Después, colocar en un portaobjetos una pequeña gota de azul lactofenol, enseguida cortar un trozo de cinta adhesiva y con ayuda de las yemas de los dedos realizar un ligero dobléz y hacer un pequeño toque sobre la colonia, enseguida estirar la cinta y la parte que se impregnó con el hongo colocar encima de la gota de azul de lactofenol. Finalmente, realizar las observaciones a 4x, 10x, 40x y 100x para observar las estructuras del microorganismo. Después, revisar la guía morfológica para identificar el género asociado al síntoma y signo presente en la mazorca.

#### 5. PROTOCOLO DE AISLAMIENTO

##### 5.1. Aislamiento por método directo

##### Materiales

- Muestras (mazorca de cacao)
- Cajas de Petri con medio de cultivo
- Guía morfológica
- Papel parafilm
- Pinza de disección
- Bisturí
- Agua destilada
- Portaobjetos
- Azul lactofenol
- Cinta adhesiva
- Rotulador
- Mechero bunsen
- Microscopio Estereoscópico
- Incubadora

Procedimiento: En condiciones asépticas, realizar previamente una validación temporal en azul de lactofenol, para ver el microorganismo a realizar el aislamiento. Enseguida, observar la preparación y verificar con ayuda de la guía morfológica para determinar el género de la especie a trabajar. Después, observar en el microscopio estereoscópico la parte donde se encuentra el microorganismo para realizar el aislamiento; con ayuda de la pinza de disección (previamente desinfectada), tomar una pequeña porción de la colonia del signo presente en la mazorca de cacao e inocular en el medio de cultivo. Finalmente rotular la caja Petri (fecha, hora, n° de aislamiento, variedad del cacao) y colocar en la incubadora a 22 ° C°. Después de 24 horas, sellar las cajas con papel parafilm.

## 5.2. Dilución en serie de partes vegetales

### Materiales

- Muestras (mazorca de cacao)
- Agua destilada 100 ml
- Puntas para micropipeta 1unid
- Micropipeta
- Tubos de ensayo 6unid

- Gradilla
- Mechero bunsen
- Pinza de disección
- Microscopio compuesto
- Rotulador Incubadora
- Agitador vortex
- Papel parafilm
- Bisturí
- Cajas Petri con medio de cultivo 6unid

Procedimiento: colocar 9ml de agua destilada estéril a 5 tubos de ensayo y 10 ml a 1 tubo de ensayo, se escogió la mazorca de cacao con signo de *Moniliophthora roreri* y se raspó con ayuda del bisturí y aguja de disección hasta obtener 1 gramo de la esporulación y se agregó al tubo de ensayo estéril con 10 ml de agua destilada (solución madre) se agitó con ayuda del vórtex para obtener una solución homogénea. A partir de esta suspensión, con ayuda de una pipeta estéril, se transfirió 1 ml a otro tubo de ensayo que contiene (9 ml) y se le rotuló  $10^{-2}$ ; este mismo procedimiento se realizó para los demás tubos de ensayo, hasta obtener una dilución final de  $10^{-6}$ . A partir de la dilución  $10^{-3}$ , se tomó una alícuota de 1 ml e inocular la caja de Petri (medio de cultivo), distribuir uniformemente hasta cubrir toda la superficie de la placa de agar, se realizó el mismo procedimiento con la dilución  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . Posteriormente, rotular cada caja de Petri (fecha, hora, n° dilución y nombre del hospedante “cacao”). Finalmente, colocar en la incubadora a ( $\pm$ ) 24 °C. Sellar con papel parafilm al cabo de 24 horas, revisar las cajas cada 24 horas.

### 5.3. Cultivo monospórico

#### Materiales

- Ceba inoculada
- Agua destilada 100 ml
- Puntas para micropipeta 1unid
- Micropipeta
- Tubos de ensayo 6unid

- Gradilla
- Mechero bunsen
- Microscopio compuesto
- Rotulador
- Incubadora
- Agitador vortex
- Papel parafilm

Procedimiento: para realizar el presente protocolo, se empleó la técnica de dilución en serie. Por consiguiente, se realizó 4 trazos en la cepa inoculada (colonia), formando un cuadrado de 0.5 x 0.5 cm, se raspó y se colocó en un tubo de ensayo con 10 ml (solución madre) de agua destilada, agitar. A partir de la solución “madre o base”, se tomó una alícuota de 1ml y se colocó en otro tubo de ensayo que contiene 9 ml de agua destilada y rotular  $10^{-2}$ , este proceso se realizó para las demás diluciones de  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-6}$ . Para inocular la caja de Petri con medio de cultivo, se tomó de la última dilución  $1 \times 10^{-6}$ , una alícuota de 1ml, distribuyó uniformemente en la placa, finalmente rotular (fecha, hora, n° de dilución, hospedante), sellar con papel parafilm y se colocó a incubar. Al cabo de 24 horas, se observó la esporulación y se realizó un aislamiento de esta colonia y se colocó en otra caja de Petri con medio de cultivo, se rotuló y se puso a incubar a ( $\pm$ ) 24 °C, para tener el desarrollo de la colonia.

## 6. CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA

### Materiales

- Cajas de Petri (dilución de serie)
- Equipo de contador de colonia Q-14
- Bitácora (libreta de notas)

Procedimiento: Colocar la primera caja de Petri  $10^{-3}$  en el área milimétrica del equipo (centrar), colocar el contador de colonias en 0 y con ayuda del lápiz señalador de colonias, hacer pequeños toques sobre la pantalla y empezar a realizar los toques en todas las unidades de colonias, al final anotar el número de colonias en la bitácora.

Realizar el mismo procedimiento para las demás colonias  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-6}$ . Finalmente, realizar la gráfica teniendo en cuenta las variables independiente y dependiente, donde: n° de colonias (dependiente, eje y) y nivel de concentración de la solución (dependiente, eje x).

## 7. MICROCULTIVO

### Materiales

- Cepa pura
- 03 unidades de dispositivos de microcultivo
- Agua destilada
- Aguja de disección
- Cubreobjetos
- Mechero Bunsen
- Micropipeta
- Papel parafilm
- Bisturí

Procedimiento: En condiciones asépticas en la campana de flujo laminar, cortar con ayuda del bisturí estéril, 03 cuadros de 1 cm<sup>2</sup> de medio de cultivo específico para el género a trabajar. Después, colocar el cuadrado de medio de cultivo en el portaobjetos, y con ayuda de la aguja de disección inocular con el hongo (cepa pura), solo se inocula los costados tanto superior como inferior (cuadrado de medio cultivo), enseguida colocar el cubreobjetos sobre el medio de cultivo inoculado. Graduar la pipeta y agregar 3 ml de agua destilada y humedecer el papel filtro presente en el dispositivo del microcultivo. Sellar con papel parafilm, rotular y colocar en la incubadora a 27°C. Posteriormente, revisar cada 24 horas los microcultivos (Fernandez, 2016).