

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



HONGOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DEL CACAO *Theobroma cacao*
L. EN EL SOCONUSCO, CHIAPAS Y PATOGENICIDAD Y CONTROL *IN*
VITRO DE *Nodulosporium*.

Tesis

Que presenta AIDEÉ GONZÁLEZ RUÍZ
como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Junio 2019

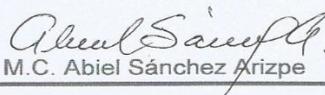
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



HONGOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DEL CACAO *Theobroma cacao*
L. EN EL SOCONUSCO, CHIAPAS Y PATOGENICIDAD Y CONTROL *IN*
VITRO DE *Nodulosporium*.

Tesis

Que presenta AIDEÉ GONZÁLEZ RUÍZ
como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA


M.C. Abiel Sánchez Arizpe

Director UAAAN


Dr. Raúl Rodríguez Guerra

Asesor Externo

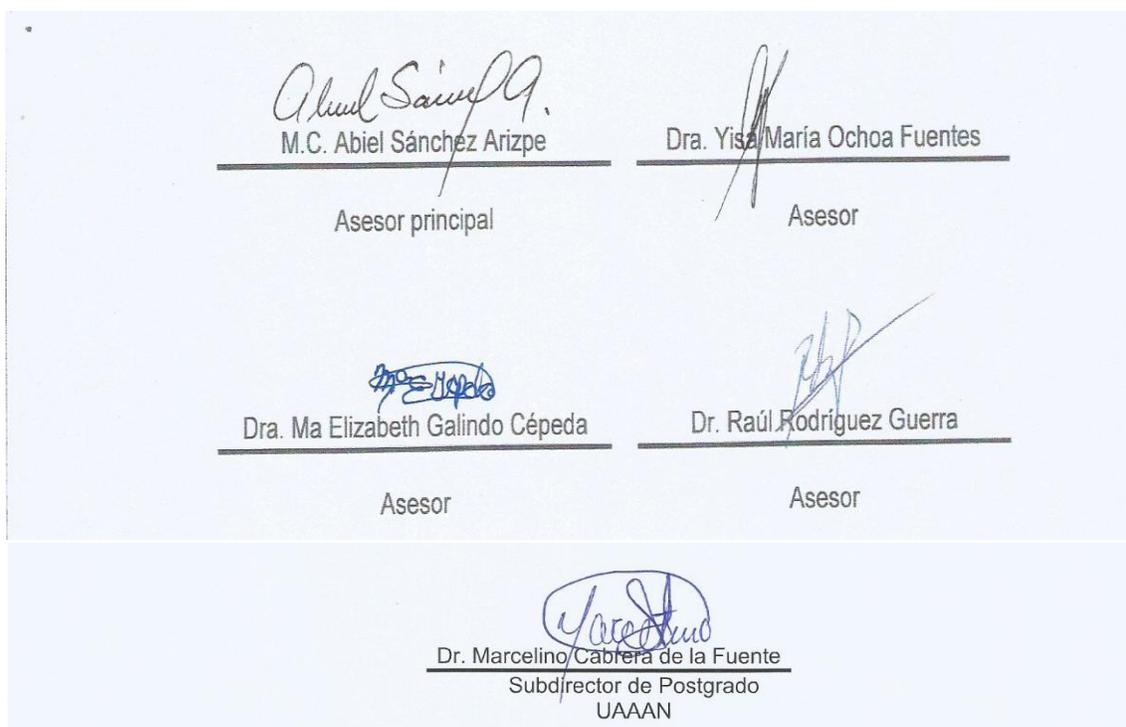
Saltillo, Coahuila

Junio 2019

HONGOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DEL CACAO *Theobroma cacao*
L. EN EL SOCONUSCO, CHIAPAS Y PATOGENICIDAD Y CONTROL *IN*
VITRO DE *Nodulosporium*.

Tesis

Elaborada por AIDEÉ GONZÁLEZ RUÍZ como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado, parte esencial para la realización de este postgrado.

A Mi Alma Terra Mater: Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, y en especial a todos los maestros del Departamento de Parasitología que me brindaron sus conocimientos y amistad.

A Dios por permitirme realizar y concluir esta meta en mi vida.

Al M. C. Abiel Sánchez Arizpe por su apoyo, dedicación, experiencia y tiempo prestado en la realización de este trabajo.

A la **Dra. Yisa María Ochoa Fuentes** por el apoyo, experiencia, dedicación, y tiempo brindado durante mi estancia en el programa de maestría.

A la **Dra. Ma Elizabeth Galindo Cepeda** por su apoyo, dedicación, experiencia y tiempo prestado en la realización de este trabajo.

Al Dr. Raúl Rodríguez Guerra por su apoyo, dedicación, experiencia y tiempo prestado en la realización de este trabajo.

A los **profesores** del Departamento de Parasitología por haberme compartido su conocimiento y sabiduría para fortalecer más la parte de mi formación profesional.

Muy especial a **Agustín Hernández Juárez**, por el amor, cariño, paciencia, comprensión, confianza y apoyo moral que siempre he recibido de ti y con el cual he logrado obtener una meta más (armadura de plata), este logro también es tuyo e inspirado en ti y quiero compartirlo por siempre contigo.

A todos los **compañeros** y en especial a mis **amigos** que me acompañaron y me apoyaron durante mi estancia en el posgrado por su apoyo y todas sus buenas vibras y palabras de aliento para seguir adelante.

A la **Sra. Teresita y el Sr. Jorge** por brindarme el espacio en su finca para la realización de este trabajo muchas gracias.

Dedicatoria

Austín Joseph Hernández González
Alessandra Elizabeth Hernández González
Airis Aideé Hernández González

Por ser los seres que me impulsan a seguir en mi camino con derrotas y victorias, gracias por amarme tanto, gracias por permitirme ser una madre para ustedes, este logro sin ustedes no hubiera podido ser, los amo hijos míos.

Agustín Hernández Juárez

Por ser mi compañero de vida, mi amigo y mi maestro gracias por todo tu apoyo incondicional y experiencia te amo esposo mío.

A mis Padres:

Al *Sr. Alfonso González Simón* y *Sra. Enoely Ruíz Nataren* y hermanos *Alberto González Ruíz* y *Alfonso González Ruíz* por el apoyo, amor y confianza brindados; quiero que sientan que esta meta alcanzada también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo y amor, los amo.

A mi Familia:

A mi familia, que aunque a distancia nunca han dejado de echarme porras.

Índice de contenido

Índice de cuadros.....	X
Índice de figuras.....	Xii
Introducción.....	1
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos.....	2
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1. El cultivo del cacao.....	4
2. Origen Prehispánico del cacao.....	5
2.1. Descripción botánica del cacao.....	6
2.2. Variedades o tipos de cacao.....	7
2.3. Cacao criollo.....	7
2.4. Cacao forastero.....	8
2.5. Cacao trinitario.....	8
2.6. Condiciones climatológicas para el cultivo del cacao.....	9
2.7. Importancia del cacao.....	9
2.8. Enfermedades del cacao.....	10
3. Fitopatógenos asociados al cultivo de cacao.....	11
3.1. <i>Moniliophthora roreri</i> (Moniliasis del cacao).....	11
3.2. Taxonomía de <i>Moniliophthora roreri</i>	12
3.3. Características morfológicas de <i>Moniliophthora roreri</i>	12
3.4. Ciclo de la enfermedad por <i>Moniliophthora roreri</i>	13
3.5. Síntomas de <i>Moniliophthora roreri</i>	13
3.6. Control de <i>Moniliophthora roreri</i>	13
4. <i>Phytophthora palmivora</i> (mancha Negra del Cacao).....	14
4.1. Características morfológicas de <i>Phytophthora palmivora</i>	15
4.2. Ciclo de la enfermedad por <i>Phytophthora palmivora</i>	15
4.3. Síntomas de <i>Phytophthora palmivora</i>	16
4.4. Control de <i>Phytophthora palmivora</i>	16
5. <i>Verticillium sp.</i>	17
5.1. Características morfológicas de <i>Verticillium sp.</i>	17
5.2. Ciclo de la enfermedad por <i>Verticillium sp.</i>	17
5.3. Síntomas de <i>Verticillium sp.</i>	18
5.4. Control de <i>Verticillium sp.</i>	18
6. <i>Aspergillus sp.</i>	19
6.1. Características morfológicas de <i>Aspergillus sp.</i>	20
6.2. Ciclo de la enfermedad por <i>Aspergillus sp.</i>	20
6.3. Síntomas de <i>Aspergillus sp.</i>	20
6.4. Control de <i>Aspergillus sp.</i>	21
7. <i>Penicillium sp.</i>	21
7.1. Características morfológicas de <i>Penicillium sp.</i>	22
7.2. Ciclo de la enfermedad por <i>Penicillium sp.</i>	23
7.3. Síntomas de <i>Penicillium sp.</i>	24

7.4. Control de <i>Penicillium sp.</i>	24
8. <i>Fusarium sp.</i>	25
8.1. Características morfológicas de <i>Fusarium sp.</i>	26
8.2. Ciclo de la enfermedad por <i>Fusarium sp.</i>	27
8.3. Síntomas de <i>Fusarium sp.</i>	28
8.4. Control <i>Fusarium sp.</i>	29
9. <i>Colletotrichum sp.</i>	29
9.1. Características morfológicas de <i>Colletotrichum sp.</i>	30
9.2. Ciclo de la enfermedad por <i>Colletotrichum sp.</i>	31
9.3. Síntomas de <i>Colletotrichum sp.</i>	31
9.4. Control de <i>Colletotrichum sp.</i>	32
10. <i>Lasiodiplodia Theobromae L.</i>	33
10.1. Características morfológicas de <i>Lasiodiplodia Theobromae L.</i>	34
10.2. Ciclo de la enfermedad por <i>Lasiodiplodia theobromae L.</i>	36
10.3. Síntomas <i>Lasiodiplodia theobromae L.</i>	36
10.4. Control de <i>Lasiodiplodia theobromae L.</i>	37
11. <i>Nodulosporium sp.</i>	39
11.1. Características morfológicas de <i>Nodulosporium sp.</i>	40
11.2. Ciclo de la enfermedad por <i>Nodulosporium sp.</i>	41
11.3. Síntomas de <i>Nodulosporium sp.</i>	42
12. Agentes de control biológico de fitopatógenos.....	43
12.1. <i>Trichoderma harzianum</i>	43
12.2. Características morfológicas de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai.	44
12.3. Ciclo de vida de <i>Trichoderma harzianum</i>	44
12.4. Síntomas de <i>Trichoderma harzianum</i>	45
12.5. <i>Trichoderma harzianum</i> como control	45
12.6. Principales mecanismos de acción de <i>Trichoderma harzianum.</i>	46
13. <i>Bacillus subtilis</i>	47
13.1. Características de <i>Bacillus subtilis</i>	47
13.2. Ubicación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	48
13.3. Morfología de <i>Bacillus subtilis</i>	48
13.4. Biología de <i>Bacillus subtilis</i>	48
13.5. Ecología de <i>Bacillus subtilis</i>	49
13.6. Mecanismos de Acción de <i>Bacillus subtilis</i>	49
13.7. Importancia de <i>Bacillus subtilis</i> en el control de hongos fitopatógenos.	54
14. Generalidades del control mediante fungicidas químicos.....	54
14.1. Tipos de fungicidas.....	55
14.2. Clasificación de los fungicidas según su uso.....	56
14.3. Mecanismos de acción.....	57
14.4. Importancia del uso de productos químicos en el control de hongos fitopatógenos.....	58
15. Ingredientes químicos en el control de hongos fitopatógenos.....	59
15.1. Azoxystrobin (Amistar®).....	59
15.2. Propiedades fisicoquímicas de la formulación.....	59
15.3. Mecanismos de acción.....	59

15.4. Modo de penetración.....	60
16. Clorotalonil (Trevanil 720F)	60
16.1. Propiedades físicas y químicas de la formulación.....	61
16.2. Mecanismo de acción.....	61
16.3. Modo de penetración.....	62
17. Tiabendazol (Tecto® 60)	62
17.1. Propiedades físicas y químicas de la formulación.....	62
17.2. Mecanismo de acción.....	62
17.3. Modo de penetración.....	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
18. Localización de las parcelas de cacao.	64
18.1. Material biológico.	64
18.2. Incidencia y severidad de pudrición en campo.....	65
18.3. Análisis de datos.	66
18.4. Aislamiento y purificación de hongos.	66
18.5. Identificación morfológica.	66
18.6. Identificación morfométrica y molecular.....	67
18.7. Pruebas de Patogenicidad de <i>Nodulosporium sp.</i>	68
19. Pruebas de control in vitro con microorganismos y productos químicos sobre <i>Nodulosporium sp.</i>	69
19.1. Microorganismos de control biológico.	69
19.2. Re-Activación de los agentes de control biológico.....	69
19.3. Efecto antagónico in vitro con microorganismos sobre <i>Nodulosporium sp.</i>	69
19.4. Evaluación.	70
19.5. Análisis de Datos.	71
19.6. Fungicidas químicos.	71
19.7. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> con fungicidas químicos sobre <i>Nodulosporium sp.</i>	71
19.8. Evaluación.	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
20. Muestreo de la pudrición de fruto de cacao.....	73
20.1. Identificación morfológica de hongos asociados a frutos de cacao.....	76
20.2. Identificación morfológica, morfométrica y molecular del hongo <i>Nodulosporium sp.</i>	77
20.3. Pruebas de Patogenicidad del hongo <i>Nodulosporium sp.</i>	82
20.4. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre <i>Nodulosporium sp.</i>	84
20.5. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> sobre <i>Nodulosporium</i> <i>sp.</i>	87
20.6. Inhibición <i>in vitro</i> del fungicida azoxystrobin sobre <i>Nodulosporium sp.</i>	90
20.7. Inhibición <i>in vitro</i> del fungicida clorotalonil sobre <i>Nodulosporium sp.</i>	92

20.8. Inhibición <i>in vitro</i> del fungicida tiabendazol sobre <i>Nodulosporium sp.</i>	93
CONCLUSIONES.....	96
LITERATURA CITADA.....	98

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Clasificación taxonómica del cacao.....	5
Cuadro 2.	Clasificación Taxonómica de <i>Moniliophthora roreri</i>	12
Cuadro 3.	Clasificación Taxonómica de <i>Phytophthora palmivora</i>	14
Cuadro 4.	Clasificación taxonómica de <i>Verticillium sp.</i>	17
Cuadro 5.	Clasificación Taxonómica de <i>Aspergillus sp.</i>	19
Cuadro 6.	Clasificación Taxonómica de <i>Penicillium sp.</i>	22
Cuadro 7.	Clasificación Taxonómica de <i>Fusarium sp.</i>	26
Cuadro 8.	Clasificación Taxonómica de <i>Colletotrichum sp.</i>	30
Cuadro 9.	Clasificación Taxonómica de <i>Lasiodiplodia Theobromae L.</i>	34
Cuadro 10.	Clasificación Taxonómica de <i>Nodulosporium sp.</i>	40
Cuadro 11.	Clasificación Taxonómica de <i>Trichoderma harzianum</i>	43
Cuadro 12.	Clasificación Taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	48
Cuadro 13.	Escala sintomatológica externa para pudrición por moniliasis en cacao.	65
Cuadro 14.	Tratamientos para evaluar el efecto inhibitorio <i>in vitro</i> sobre <i>Nodulosporium sp.</i> , con fungicidas comerciales.....	71
Cuadro 15.	Incidencia y severidad de pudrición de fruto de cacao en dos localidades de la región Soconusco, en el estado de Chiapas.	73
Cuadro 16.	Precipitación (cm ³) mensual y media anual de los años 2014 y 2015 en la región Soconusco, en el estado de Chiapas.....	74
Cuadro 17.	Incidencia y severidad de pudrición de fruto de cacao en dos localidades de la región Soconusco, en el estado de Chiapas relacionado desde el punto de vista de la altura sobre el nivel del mar.	74
Cuadro 18.	Comparación de secuencias en el banco de genes del NCBI.	81

Cuadro 19.	Diámetro de micelio, porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium sp.</i> , en medio PDA con <i>Trichoderma harzianum</i> a 7 días de evaluación.....	85
Cuadro 20.	Medias del crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Nodulosporium sp.</i> , testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.....	86
Cuadro 21.	Medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Nodulosporium sp.</i> , testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.....	87
Cuadro 22.	Diámetro de crecimiento, porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium sp.</i> , en medio PDA con <i>Bacillus subtilis</i> a 7 días de evaluación.	88
Cuadro 23.	Medias del crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Nodulosporium sp.</i> , testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.	89
Cuadro 24.	Medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Nodulosporium sp.</i> , testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.....	89
Cuadro 25.	Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium sp.</i> , en medio PDA a diferentes concentraciones del fungicida azoxystrobin a 7 días de evaluación.	91
Cuadro 26.	Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium sp.</i> , en medio PDA a diferentes concentraciones del fungicida clorotalonil a 7 días de evaluación.	92
Cuadro 27.	Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de <i>Nodulosporium sp.</i> , en medio PDA a diferentes concentraciones con el fungicida tiabendazol a 7 días de evaluación.	94
Cuadro 28.	Concentración inhibitoria y límites fiduciales de fungicidas químicos aplicados a <i>Nodulosporium sp.</i> , en medio PDA a 7 días de evaluación.	95

Índice de figuras

Figura 1.	Dispersión de la Moniliasis de Colombia a México.....	11
Figura 2.	Crecimiento radial de <i>Nodulosporium</i> sp., en caja de Petri durante 7 días.....	78
Figura 3.	Detalle de hifas y esporas de <i>Nodulosporium</i> sp., a 40X.	78
Figura 4.	Detalle de conidio y ramificaciones de <i>Nodulosporium</i> sp., a 40X.	79
Figura 5.	Observación de picnidios de <i>Hypoxylon</i> sp., en medio PDA.	80
Figura 6.	a). Estroma de <i>Hypoxylon</i> sp., diferenciándose, b). Espora hialina sin madurar.	81
Figura 7.	a y b). Hoja de cacao sin presencia de daño por <i>Nodulosporium</i> sp. (Testigo) c y d). Presencia de daño por <i>Nodulosporium</i> a los 48 horas en follaje de cacao.....	83

Resumen

HONGOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DEL CACAO *Theobroma cacao*
L. EN EL SOCONUSCO, CHIAPAS Y PATOGENICIDAD Y CONTROL *IN*
VITRO DE *Nodulosporium*.

POR

AIDEÉ GONZÁLEZ RUÍZ

MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

M.C. ABIEL SANCHEZ ARIZPE – ASESOR –

RESUMEN

El cultivo de cacao *Theobroma cacao* L. se encuentra en un agroecosistema altamente favorable para el desarrollo de enfermedades. Siendo tres especies las más importantes; *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora* con pérdidas de 80-100% en la producción. La presencia de frutos con pudrición es un factor importante de infección para el cultivo del cacao, debido a agentes de diseminación como el aire y el agua, y la infección de frutos se puede presentar en cualquier momento, existiendo tejido susceptible y condiciones ambientales favorables como la temperatura y la humedad. El objetivo de este trabajo es por la escasa investigación sobre la pudrición de fruto para la región del Soconusco, Chiapas y a la falta de un manejo adecuado para reducir el daño por esta enfermedad. Se evaluó la incidencia y severidad de la pudrición de cacao en frutos infectados en árboles de cacao en dos parcelas en 2014 y 2015. La severidad se evaluó mediante la escala sintomatológica para moniliasis y la incidencia, se calculó con (%) de los frutos que mostraron síntomas. Se llevó a cabo la identificación morfológica de los hongos asociados al fruto de cacao y se destacó el género *Nodulosporium* el cual fue identificado morfométrica y molecularmente utilizando los iniciadores universales ITS4 e ITS5. Con este género se realizaron pruebas de patogenicidad en follaje y fruto a una concentración de 1×10^8 esporas/mL. Se realizaron pruebas de control biológico *in vitro* de *Nodulosporium* con *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* y de control químico con los productos azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol. Los parámetros se examinaron con análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), utilizando el software SAS Institute 2002. El porcentaje de frutos afectados y el grado de severidad de la enfermedad fue mayor durante el año 2014 en ambas parcelas de producción, en comparación al 2015, con diferencias significativas entre estos años; diferencia influenciada por la precipitación, la cual fue mayor durante el primer año, y entre ambas localidades durante el mismo año no se presentó diferencia significativas, lo que indica que la altura no influye en la incidencia y severidad de la enfermedad. Se

aislaron diversos hongos a partir de las esporas presentes en el tejido dañado del fruto y tejido vegetal enfermo; se encontró *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Nodulosporium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp., y dos hongos no reconocidos. Se destaca la ausencia de los hongos fitopatógenos importantes en el cultivo de cacao. En este estudio se registra para Chiapas, México la presencia del hongo *Nodulosporium* en frutos de cacao y se identifica a su teleomorfo como *Hypoxyton*; estos últimos además corroborados morfológica y molecularmente. En pruebas de patogenicidad con follaje del cultivo de cacao, se encontró que *Nodulosporium* es levemente patógeno, causando clorosis y deshidratación de la hoja. El control biológico del fitopatógeno *Nodulosporium* con el antagonista *B. subtilis* y *T. harzianum* en confrontación ejercen un efecto inhibitorio significativo sobre el fitopatógeno con 71.86 y 69.93% respectivamente; incluso *T. harzianum* sobrecreció al patógeno, ubicándose en la clase 1 de antagonismo de Bell. *Nodulosporium* sp., presentó susceptibilidad a la acción de los fungicidas azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol adicionados en medio PDA. El tiabendazol fue más efectivo; con 2.5 ppm inhibió el crecimiento micelial del hongo, seguido por el clorotalonil que a 1000 ppm ya no permite el crecimiento del hongo y azoxystrobin, aunque menos efectivo, requirió concentraciones altas arriba de 1000 ppm para tener un buen control. Reconocer la diversidad de patógenos asociados al cultivo de cacao, su incidencia, severidad y patogenicidad es de suma importancia, debido a que pueden representar una amenaza para el cultivo en un futuro. Los productos químicos azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol y los agentes de control biológico *T. harzianum* y *B. subtilis* son eficientes para el control *in vitro* del hongo *Nodulosporium* sp.

Palabras clave: Cacao, control biológico, control químico, hongos fitopatógenos, *Nodulosporium* sp., pudrición de fruto.

Abstract

FUNGI ASSOCIATED WITH THE COCOA PURITY *Theobroma cacao* L. IN
THE SOCONUSCO, CHIAPAS AND PATHOGENICITY AND *IN VITRO*
CONTROL OF *Nodulosporium*.

BY

AIDEÉ GONZÁLEZ RUÍZ

MASTER IN SCIENCES
AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

M.S. ABIEL SANCHEZ ARIZPE – ADVISER –

The cocoa crop *Theobroma cacao* L. is an agroecosystem highly favorable for the development of diseases. The most important and greatest impacting problems worldwide are the phytopathogenic fungi, mainly three species; *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa* and *Phytophthora palmivora* with losses of 80-100% in production. Fruit rot is an important infection factor in cocoa, due to dissemination agents such as air and fruit infection at any time, susceptible tissue presence and favorable environmental conditions. The present work was carried out because research on fruit rot for Soconusco region, Chiapas is scarce and the lack of adequate management to reduce damage caused by this disease. The incidence and severity of cocoa rot in infected fruits in cocoa trees was evaluated in two plots in 2014 and 2015. The severity was evaluated by the external symptomatic scale for moniliasis rotting and the incidence was calculated as the number of fruits that showed disease symptoms (%). The morphological identification of fungi associated with cocoa fruit was carried out and the genus *Nodulosporium* was highlighted, which was also identified morphometrically and molecularly using universal primers ITS4 and ITS5. With this genus, pathogenicity tests were carried out on foliage and fruit at 1×10^8 spores/mL concentration. *In vitro* biological control tests were carried out, *Nodulosporium* with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* and chemical control products: azoxystrobin, chlorothalonil and thiabendazole. The parameters were examined with analysis of variance and comparison of Tukey means ($P < 0.05$), using SAS software. The percentage of affected fruits and the degree disease severity was greater during 2014 in both production plots, compared to 2015, with significant differences between these years; this difference was influenced by precipitation, which was greater during the first year, and between both locations during the same year there was no significant difference, which indicates that height does not influence the disease incidence and severity. Various spore fungi were isolated from fruit damaged tissue and diseased plant tissue; *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Nodulosporium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp., and two unrecognized fungi were

found. The absence of important phytopathogenic fungi in cocoa agroecosystem is highlighted. In this study, the presence of *Nodulosporium* fungus in cocoa fruits was recorded for Chiapas, México and its teleomorph is identified as *Hypoxylon*; the two latter also corroborated morphometrically and molecularly. In pathogenicity tests with cocoa foliage crop, it was found that *Nodulosporium* is slightly pathogenic, causing chlorosis and dehydration of the leaf. The biological control of phytopathogen *Nodulosporium* with the antagonist *B. subtilis* and *T. harzianum* in confrontation exert a significant inhibitory effect on the phytopathogen with 71.86 and 69.93% respectively; even *T. harzianum* overcame the pathogen, placing it in class 1 of Bell antagonism. *Nodulosporium* sp., Showed susceptibility to the action of fungicides azoxystrobin, chlorothalonil and thiabendazole added in PDA medium. Thiabendazole was more effective; with 2.5 ppm inhibited mycelial growth of the fungus, followed by chlorothalonil that at 1000 ppm no longer allows the fungus growth and azoxystrobin, although, less effective, since it requires high concentrations above 1000 ppm to have a good control. Recognize the pathogens diversity associated with cocoa crop, its incidence, severity and pathogenicity is utmost importance, because they can pose a threat to the crop in the future. The chemicals products azoxystrobin, chlorothalonil and thiabendazole and the biological control agents *T. harzianum* and *B. subtilis* are efficient for *in vitro* control of *Nodulosporium* sp. fungus.

Key words: Cocoa, biological control, chemical control, phytopathogenic fungi, *Nodulosporium* sp., fruit rot.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao *Theobroma cacao* L., es un cultivo tropical que en México se desarrolla en una superficie sembrada de 61,397.06 ha., de las cuales 243 se localizan en el estado de Guerrero, 20,284.90 en el estado de Chiapas y 40,869.16 en el estado de Tabasco, mismas que producen 28,006.59 ton., de grano seco, con un rendimiento promedio de 470 kg por hectárea (SAGARPA-SIAP, 2017). De este cultivo dependen más de 45,000 familias, generando 4.98 millones de jornales al año, con un valor de la producción de 1, 034,792.76 pesos (Ogata, 2007; SAGARPA-SIAP, 2017).

Actualmente el cultivo de cacao presenta bajos rendimientos, que oscilan alrededor de los 450-520 kg de grano seco por ha. La edad avanzada de las plantaciones y la falta de variedades mejoradas de alto rendimiento y de variedades con resistencia a plagas y enfermedades, constituyen las causas principales de estos bajos rendimientos; ocasionando pérdidas superiores a los \$16, 000.00 por hectárea en nuestro país (Solís *et al.* 2009; Solís y Zamarripa, 2010; SAGARPA-SIAP, 2017). Otro factor que contribuye a la baja productividad es la presencia de enfermedades; consideradas uno de los factores limitantes más importantes que devastan al cultivo del cacao (Fulton, 1989), las cuales son: escoba de bruja *Moniliophthora perniciosa* (Sthael) Aime y Phillips-Mora (*Marasmiaceae*), mancha negra *Phytophthora palmivora* Butler (*Peronosporaceae*) y monilia o moniliasis *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.* (*Marasmiaceae*); estos hongos en conjunto con la gama de fitopatógenos asociados y saprofitos ocasionan desequilibrio productivo del cultivo del cacao en Centro y Sur América (Phillips-Mora, 2003; Aime y Phillips-Mora, 2005).

En Mexico, entre las enfermedades más importantes se encuentra la moniliasis causada por el hongo *M. roreri*, que aunado a la alta susceptibilidad de las variedades de cacao cultivadas, provocan pérdidas superiores al 80-90% de la producción por unidad de superficie (Phillips-Mora, 2003; Isla y Andrade, 2009; Zamarripa y Solís, 2009). Esta enfermedad se observó por vez primera en marzo de 2005, en Ignacio Zaragoza, Pichucalco, Chiapas y en abril del mismo año, se

determinó que al menos 1000 ha ya estaban infectadas en Pichucalco, Juárez y Ostoacán en Chiapas y en las inmediaciones de Huimanguillo en Tabasco (Phillips-Mora *et al.*, 2007).

De acuerdo a la amenaza que provoco la llegada de este hongo y los daños perjudiciales que ocasiona al cultivo del cacao (Phillips-Mora, 2003; Phillips-Mora *et al.*, 2007). El presente trabajo tiene como propósito la identificación de la micofauna endófito asociada al cultivo del cacao; ya que debido a la ausencia de manejo fitosanitario en las plantaciones se desarrollan diversas enfermedades que afectan principalmente frutos y así monitorear las enfermedades que se pueden desarrollar y ocasionar impacto económico en la producción.

Objetivo general

- ❖ Identificar los hongos fitopatógenos asociados al cultivo de cacao en la región del Soconusco Chiapas, la pudrición de fruto, patogenicidad y control *in vitro*.

Objetivos específicos

- ❖ Identificar morfológicamente la micofauna asociados al cultivo del cacao.
- ❖ Identificar morfométrica y molecularmente los hongos de importancia fitopatológica asociados al cacao.
- ❖ Evaluar la incidencia y severidad en campo de la pudrición de fruto de cacao
- ❖ Evaluar la patogenicidad de los hongos de importancia fitopatológica asociados al cacao.
- ❖ Evaluar la efectividad de agentes de control biológico y productos químicos sobre hongos de importancia fitopatológica asociados al cacao.

Hipótesis

Se encontrarán los agentes causales de las enfermedades de mayor importancia en frutos del cultivo del cacao: *Moniliophthora roreri*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Phytophthora palmivora* y una alta incidencia y severidad de pudrición de fruto en campo asociada a hongos fitopatógenos. Y se espera controlar *in vitro* al menos un hongo fitopatógeno.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. El cultivo del cacao

El cacao *Theobroma cacao* L. (Malvales: Malvaceae), es un árbol perenne nativo del trópico americano. Existen muchas hipótesis sobre el origen del cacao; se considera que el cacao se originó en América del Sur, en el área que comprende la Amazonía (Perú, Ecuador, Colombia, Brasil y Venezuela), en la cuenca alta del río Amazonas, luego fue introducido por el hombre a Centroamérica; donde se le considera como el primer centro de domesticación y cultivo desde hace más de 2000 años por poblaciones mesoamericanas, quienes cultivaron una variedad de cacao de alta calidad aromática, denominado Criollo, probablemente originario de la parte norte de Suramérica. Cuando llegaron los primeros colonizadores a América, el cacao era cultivado por los indígenas, principalmente por los aztecas en México y mayas en México y Centroamérica. Según los historiadores, este árbol, denominado por los indígenas cacahualt, se consideraba sagrado. Los aztecas y los mayas creían que el cacao era de origen divino, los primeros lo consideraban “la bebida de los dioses”, de allí deriva su nombre científico (*Theobroma*, que significa bebida de dios) (Whitlock, 2001; Motamayor *et al.*, 2002; Motamayor *et al.*, 2008).

Quetzalcóatl fue quien enseñó a los aztecas a cultivarlo tanto para alimento como para embellecer los jardines de la ciudad de Talzitapec y era utilizado además en el comercio como moneda de cambio (Wood, 1975). Después de la colonización de los españoles; estos lo llevaron a Europa, para luego convertirse en materia prima para la elaboración de uno de los productos más populares del mundo: el chocolate; y para satisfacer el incremento de la demanda europea, la producción de la variedad Criollo se dispersó por Suramérica y regiones del Caribe (Marcano *et al.*, 2007).

2. Origen Prehispánico del cacao

La historia prehispánica menciona que el dios Quetzalcóatl bajo del reino de los dioses y trajo consigo al dios Tláloc, el cual entre sus facultades era dueño de la lluvia, el dador de vida y el dueño de almas. También vino Xochiquetzal, quien era la esposa de Tláloc, la diosa de la alegría y del amor. Al ver que los toltecas eran un pueblo trabajador, Quetzalcóatl decidió premiarlos con una planta de dioses y pidió a Tláloc que lo llenara de agua y a Xochiquetzal que le colocara flores, la planta creció y se llenó de frutos y cuando estaba listo. Quetzalcóatl recogió las vainas y enseñó a las mujeres a tostarlo, molerlo y combinarlo con agua obteniendo así el chocolate. Los Mayas son la comunidad original que inicio los cultivos de cacao en los periodos prehispánicos. La palabra maya que define al cacao es “cacau” derivada de “chacahuaa”. En el imperio azteca, Moctezuma recibía parte de sus tributos en almendras de cacao, porque estimaba mucho sus bayas como monedas y como bebida personal Moctezuma recibía anualmente 400,000 countles, equivalentes a 160 millones de bayas de cacao (Hernández *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del cacao (Hardy, 1961, Dostert *et al.*, 2002).

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Sub-clase:	Dilleniidae
Orden:	Malvales
Familia:	Malvaceae
Subfamilia:	Byttnerioideae
Tribu:	Theobromeae
Género:	<i>Theobroma</i>
Especie:	<i>cacao</i> L.

Nombres comunes en México. Cacao (Rep. Mex.); Biziáa, Bizoya, Pizoya, Yagabizoya, Yagabisoya, Yagapi-zija (l. zapoteca, Oax); Cacaotero, Cacaocuáhuatl (l. nahuatl); Caco (l. mixe); Cágau (l. Popoluca, Ver); Kahau, Haa (l. maya, Yuc); Cajecua (l. tarasca); Chudenchú (l. otomí); Ma-micha-moya, Mochá (l. chinanteca); Yau (Yuc); Cacao, Cacahuatzaua (l. zoque, Chis) (Cruz, 2014).

2.1. Descripción botánica del cacao

El cacao es un árbol que posee raíz principal y secundaria profunda y posee una infinidad de raicillas o pelos absorbentes, que por lo general están entre 0-5 cm del suelo; por tal motivo, el primer criterio para la instalación de una plantación comercial, son suelos profundos. Este árbol tiene dos tipos de tallos; el primero orto trópico (de crecimiento recto, vertical), son las plantas que provienen de semillas o plantas francas (híbridos y segregantes de híbridos) y el segundo plagio trópico (de crecimiento horizontal o lateral), son las plantas producidas por injerto. Las hojas de cacao, poseen una estructura especial, llamada "pulvínulos" que son abultamientos entre la base de la hoja y la base del pecíolo y sirven para seguir la dirección del sol (Isla y Andrade, 2009).

Las flores del árbol del cacao nacen en grupos pequeños llamados cojines florales y se desarrollan en el tronco y ramas principales. Cada cojín puede tener entre 1-40 flores. Las flores de cacao una vez abiertas, solo tienen 48 horas de viabilidad o receptividad del polen (Isla y Andrade, 2009). Las flores salen donde antes hubieron hojas y siempre nacen en el mismo lugar; por eso, es importante no dañar la base del cojín floral para mantener una buena producción. De las flores se desarrollan los frutos o mazorcas con ayuda de algunos insectos pequeños (Mendoza y Navarro, 2006).

Las hojas tienen características propias dependiendo del tipo de tallo en que se originan comúnmente poseen un pecíolo largo (7 a 9 cm) con dos pulvinos, uno en la inserción del tallo y otro inmediatamente abajo de la lámina, lo cual permite que la hoja se oriente respecto a la luz. La mayoría tienen pigmentación, cuyo color varía desde un verde claro, casi blanquecino, hasta el violeta oscuro el tamaño de la hoja puede variar mucho, pero esta variación está influenciada por el ambiente donde se desarrolla; así en plantas que crecen bajo poca luz las hojas son más grandes y viceversa: a mayor luminosidad es menor su tamaño (Avendaño *et al.*, 2011).

El fruto del cacao es una baya, llamada mazorca y puede ser de tres tipos: criollo, forastero y trinitario. Los frutos de cacao maduran entre 5-6 meses si son del tipo trinitario y de 6-7 meses si son del tipo criollo y forastero o amazónico (Isla y Andrade, 2009). Tienen diferentes tamaños, colores y formas según las variedades. Generalmente tienen un tamaño de 12 pulgadas de largo y 4 pulgadas de ancho y contienen entre 20 a 40 semillas. La pulpa puede ser blanca, rosada o café, olorosa y con sabor variado entre ácido y dulce dentro de las mazorcas se encuentran las semillas, las cuales son planas o redondeadas, de color blanco, café o morado. Están ubicadas en cinco hileras dentro del fruto (Mendoza y Navarro, 2006).

La semilla o almendras son de tamaño variable (1.2 a 3 cm), cubiertas con un mucílago o pulpa de color blanco cremoso, de diversos sabores y aromas (floral, frutal) y grados de acidez, dulzura y astringencia. En el interior de la almendra se encuentran los cotiledones, que pueden ser de color morado, violeta, rosado o blanco, según el genotipo (Avendaño *et al.* 2011).

2.2. Variedades o tipos de cacao

En el mundo existen diferentes variedades de cacao, originalmente eran sólo dos tipos; el criollo y el forastero, pero el cruce de estas dos variedades dio origen al trinitario, y del cruce repetido entre ellos, se originaron los diferentes tipos de cacao que se conocen y utilizan (Mendoza y Navarro, 2006). Estas descripciones consideran las formas de las mazorcas semejantes entre sí pero rara vez iguales y sobre la cual la planta pertenece cada grupo y debido a la enorme heterogeneidad (Mora, 1956).

2.3. Cacao criollo

Esta variedad de cacao es originaria de Centroamérica, Colombia y Venezuela. Se distingue por tener frutos de cáscara suave, con 10 surcos, intercalando un

surco profundo con otro de menor profundidad y terminando en una punta aguda y presenta constricción. El color del fruto puede ser un poco morado o verde. Pero en realidad la característica principal es la semilla y la cascara ya que la semilla se diferencia por ser dulces, color blanca o purpura (violeta) y la cascara del fruto de forma delgada lo cual hace ver que el cacao criollo tiene caracteres heterocigotos, además de no ramificar tanto como otras variedades. De esta variedad se produce el chocolate fino o de mejor calidad. Actualmente no existe cacao criollo puro, sino lo que llamamos variedades acriolladas debido a que han tenido varios cruces con otras variedades (Mora, 1956; Mendoza y Navarro, 2006).

2.4. Cacao forastero

Es originario de América del sur y es el más cultivado en las regiones cacaoteras de África y Brasil. Se distingue porque tiene frutos de cáscara dura más o menos lisa, surcos superficiales, ápice redondo no presenta constricción con forma oval. Fruto de color verde o blanco. Las semillas son aplanadas, de color morado (purpura), pequeña de sabor amargo y cascara con forma muy gruesa y una subcapa dura de romper y poco contenido de semilla. (Mora, 1956; Mendoza y Navarro, 2006).

2.5. Cacao trinitario

Esta variedad es producto de la cruce del cacao criollo y forastero. Las mazorcas pueden ser de muchas formas y colores; las semillas son más grandes que las del cacao criollo y forastero; las plantas son fuertes, de tronco grueso y hojas grandes. En la actualidad la mayoría de los cacaotales que existen en el mundo son trinitarios (Mendoza y Navarro, 2006).

2.6. Condiciones climatológicas para el cultivo del cacao

El clima favorable para el crecimiento normal del cultivo de cacao es el trópico húmedo, que se caracteriza por tener lluvias, calor y humedad durante todo el año. El cacao es una planta que se desarrolla bajo sombra y no soporta climas fríos ni secos, siendo su temperatura límite promedio anual de 21°C y óptima de 25°C. Estos dos factores afectan el crecimiento y la producción, por eso cuando el clima es muy caliente, el cultivo debe estar bajo sombra para evitar los daños que le pueda ocasionar el sol y mantener el cultivo a una temperatura adecuada. Las plantaciones también deben estar libres de vientos, para evitar la caída de las hojas y las plantas. Para enfrentar este problema, es recomendable sembrar árboles en hileras que funcionen como cortinas rompe vientos y también utilizar árboles frutales y forestales. Al controlar todos estos factores bióticos y abióticos se obtienen como resultado un mayor control sobre los agentes fitopatógenos que dañan este cultivo (Ocampo *et al.*, 2012).

2.7. Importancia del cacao

México es uno de los doce países que alberga una gran diversidad ecológica en el planeta, es por ello que albergan diferentes variedades de cacao para la explotación agrícola y a pesar que este cultivo se produce en los países de mayor desarrollo, son los países en vías de desarrollo que en conjunto los que le dan un valor agregado al cacao, transformándolo y obteniendo una infinidad de productos para ser comercializados al resto del mundo. Es por ello que la situación de la producción del cacao mexicano es preocupante ya que es un cultivo que pertenece a nuestra historia y forma parte importante de nuestra economía (Salas y Hernández, 2015).

En México la producción del cultivo del cacao está concentrada en los estados de Guerrero, Chiapas y Tabasco. Debido a la disminución progresiva de producción y la escasa tecnología del manejo de los cultivos y el uso de materiales genéticos de baja calidad agronómica y alta heterogeneidad ha

generado una crisis de desabasto que obliga al país a la importación de semilla de cacao de otros países.

En el estado de Chiapas, el cacao se cultiva en cuatro regiones agronómicas principales: Soconusco, Norte, Centro y Selva Palenque. Este cultivo tiene gran relevancia ecológica, económica, cultural e histórica. Ocupa el sexto lugar en superficie cultivada en el estado, detrás de maíz, café, frijol, palma de aceite y mango. Las variedades cultivadas en la región Soconusco son el forastero, trinitario y criollo; este último el de mejor sabor y aroma, pero con mayor su susceptibilidad a las enfermedades (González y Amaya, 2005).

2.8. Enfermedades del cacao

El cacao es un cultivo de gran importancia económica, social y ambiental además de ser una especie primordial en el sistema agroforestal campesino en muchas regiones. Sin embargo; los factores de más importancia que limitan el desarrollo de este cultivo son la frecuencia de enfermedades por hongos, insectos, aves y roedores provocando la disminución de la producción (Hernández *et al.*, 2015) y las condiciones ambientales que provocan la pérdida considerable de este producto, ya que el medio ambiente es favorable para la reproducción total de todos los patógenos, provocando pérdidas que van desde el 40-100 % (Jaimes y Aránzazu, 2010).

Las enfermedades fungosas más importantes en el cultivo del cacao son; la mancha negra por *Phytophthora palmivora* Butl o *Phytophthora capsici* Leonian, la escoba de bruja *Moniliophthora perniciosa* (Sthael) Aime y Phillips-Mora y la moniliasis *Moniliophthora roreri* (cif y Par) Evans *et al.*; siendo estas dos últimas las más destructivas de dicho cultivo, causando pérdidas que oscilan del 50 a 100% de la producción (Aime y Phillips-Mora, 2005; Hernández *et al.*, 2015).

3. Fitopatógenos asociados al cultivo de cacao

3.1. *Moniliophthora roreri* (Moniliasis del cacao)

El origen de esta enfermedad se localiza en América del Sur (Fig. 1), Colombia 1817 (Phillips-Mora, 2003), Ecuador 1917 (Rorer, 1918), Venezuela 1941 (Muller, 1941), Perú 1950 (Mc Laughlin, 1950), Panamá 1956 (Orellana, 1956), Costa Rica 1978 (Enríquez y Suarez, 1978), Nicaragua 1980 (López y Enríquez, 1980), Honduras 1997 (Porrás y Enríquez, 1998), Guatemala 2002 (Phillips-Mora y Wikilson, 2007), Belice 2004 (Phillips-Mora *et al.*, 2006a) y en México 2005 (Phillips-Mora *et al.*, 2006b).

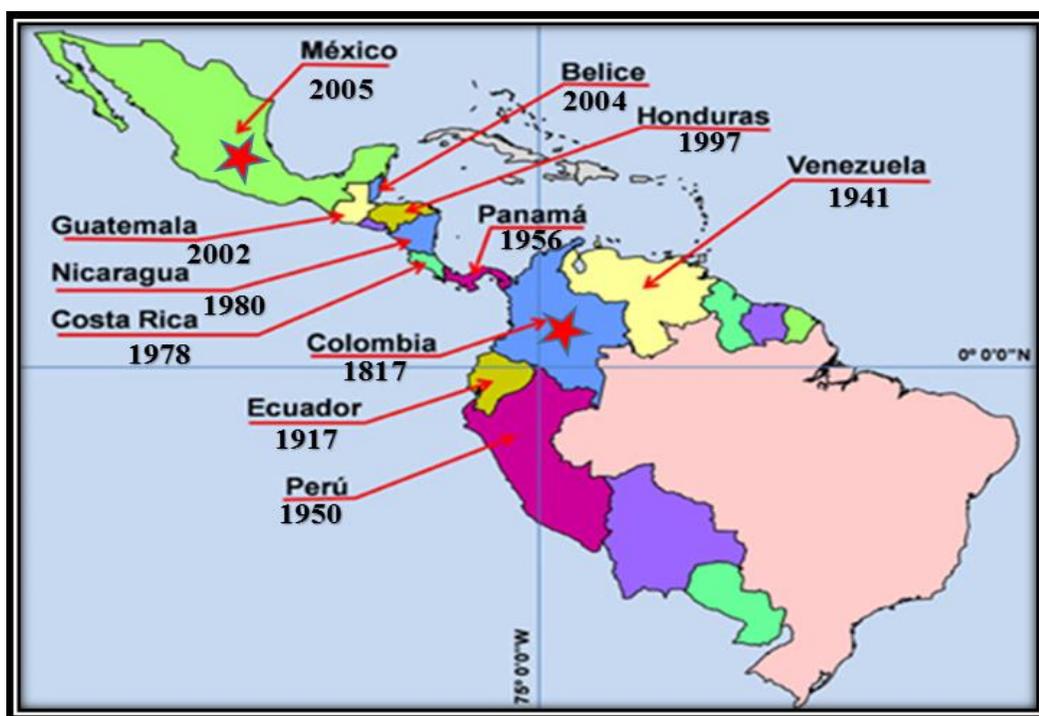


Fig. 1. Dispersión de la Moniliasis de Colombia a México (FUNDESYRAM, 2018).

La Moniliasis del cacao también conocida como pudrición del fruto o pudrición acuosa provocada por el patógeno *M. roreri*; la llegada de este patógeno, en México ha ocasionado pérdidas de más del 80% de la producción de este cultivo (Isla y Andrade, 2009; Zamarripa y Solís, 2009).

3.2. Taxonomía de *Moniliophthora roreri*

Este patógeno fue descrito originalmente por Ciferri y Parodi (1933), clasificándolo como Clase: Deuteromycetes, Orden: Hyphales, Género: *Monilia* y Especie: *roreri*. Evans *et al.* (1978) identificaron características distintivas de los Basidiomycetes, por lo cual lo agruparon dentro de la Clase: Basidiomycetes y crearon un nombre para la especie: *Moniliophthora roreri*. Philips-Mora (2003) mediante técnicas moleculares confirmo que es un Basidiomycetes perteneciente al Orden: Agaricales y la ubicación de este en la Familia: *Marasmiaceae* por Evans *et al.* (1978) y Aime y Philips-Mora (2005).

Cuadro 2. Clasificación Taxonómica de *Moniliophthora roreri*

Clase:	Basidiomycetes
Orden:	Agaricales
Familia:	<i>Marasmiaceae</i>
Genero:	<i>Moniliophthora</i>
Especie:	<i>Roreri</i> (Cif. y Par.) Evans <i>et al.</i>

Fuente: (Agrios, 1978; Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

Esta enfermedad afecta únicamente a los frutos, se caracteriza por expresar síntomas en cualquier etapa de desarrollo de estos, los frutos de menor edad son los más susceptibles presentando deformaciones y coloración irregular y si llegan a la madurez exhiben manchas color chocolate aceitosas al inicio de la expresión de la enfermedad y al finalizar son recubiertas por las esporas del hongo de color blanquecino y al interior forman una masa compactada (Phillips-Mora, 2003).

3.3. Características morfológicas de *Moniliophthora roreri*

La forma conidial de *M. roreri* es hialina, simples o ramificados, hifas vegetativas poco diferenciadas no erectas, bifurcada en la parte distal y con una constricción ligera en el septo que separa la hifa de origen. Sus esporas son globosas-

elipsoides formando cadenas que va de 2-3 esporas hasta 35 o más (Delgado y Suarez, 1993).

3.4. Ciclo de la enfermedad por *Moniliophthora roreri*

Este comienza cuando la spora se posa en la mazorca sana, germina, crece y genera nuevas estructuras conidiales. Para que inicie este proceso de infección son necesarios los factores de humedad y temperatura, esta infección ocurre principalmente en las primeras etapas de crecimiento del fruto (Ártica, 2008). La sobrevivencia de este patógeno inicia en los residuos de cosecha (mazorcas dañadas), los conidios se diseminan via aérea y por la lluvia contaminando a mazorcas sanas y la actividad de cosecha hace que las esporas se diseminen fácilmente en el ambiente (Navarro y Mendoza, 2006).

3.5. Síntomas de *Moniliophthora roreri*

Las mazorcas menores de un mes presentan madurez prematura, secamiento, a los 3 meses presentan abultamientos llamados gibas, las mayores de 3 meses presentan puntos aceitosos e islas amarillentas parecida a la maduración y posteriormente se desarrolla una mancha color marrón a chocolate con polvillo blanquecino tornándose a un tono gris después un tiempo (Ártica, 2008).

3.6. Control de *Moniliophthora roreri*

Se realiza la poda para disminuir los niveles de sombreado, eliminar arboles improductivos y drenar los espacios para evitar el exceso de humedad (Ártica, 2008).

Control químico: azoxystrobin con aspersiones dirigidas a frutos menores de dos meses de edad y posteriores aspersiones mensuales con hidróxido de cobre (Ortíz-García *et al.*, 2015).

4. *Phytophthora palmivora* (Mancha negra del cacao)

Esta enfermedad es más común en Centro América. Este puede atacar todos los tejidos de las plantas como cojinetes florales, chupones o brotes tiernos y plántulas en viveros, causando una mancha color café tabaco a nivel de las hojas nuevas; también es responsable del cáncer del tronco y raíces, pero el principal daño lo ocasiona en los frutos. El patógeno puede atacar cualquier parte de la planta, pero el daño más importante de la enfermedad ocurre cuando ataca al fruto. En los últimos años ha pasado a ser secundario, ya que cuando se realizan prácticas de control para la moniliasis, como regulación de sombra, podas y eliminación de frutos enfermos, también se controla la mazorca negra. Al igual que con la moniliasis el control químico es caro y usualmente poco efectivo, especialmente en épocas de alta presión de inóculo y alta humedad (Rivera, 2017).

Cuadro 3. Clasificación Taxonómica de *Phytophthora palmivora*

Clase:	Oomycetes
Orden:	Peronosporales
Familia:	Peronosporaceae
Genero:	<i>Phytophthora</i>
Especie:	<i>Palmivora</i> Butl.

Fuente: (Agrios, 1978; Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

P. palmivora se distribuye en las regiones tropicales y de clima templado que reciben un alto nivel de precipitación pluvial. Se cree que se originó en el sureste asiático, donde se presenta gran diversidad genética y poblaciones equilibradas de tipos de apareamiento A1 y A2 (Coffey, 2010). Este patógeno es más activo durante la temporada más húmeda y cálida del año en primavera y verano, pero también puede manifestarse en el invierno, más fresco y seco, especialmente en sitios donde estuvo activo anteriormente (Elliott y Uchida, 2004; Pérez *et al.*, 2010).

4.1. Características morfológicas de *Phytophthora palmivora*

Es una especie heterotálica, forma oosporas ligeramente apleróticas. El oogonio y la oospora son esféricos, con un diámetro de 17 a 29 μm . El anteridio es anfígeno, con un diámetro de 12 a 16 μm . Presenta esporangios papilados, elipsoides con un pedicelo corto, y tamaño promedio de 37,1 μm x 52, μm . El diámetro promedio de las clamidosporas es de 42,4 μm . Estas se observan frecuentemente sobre las lesiones en el tejido enfermo, y son características de esta especie (Martínez *et al.*, 2010; Ronquillo, 2012). El mínimo de temperatura de crecimiento para esta especie es de 11°C, con una temperatura óptima de 27.5 a 30°C y un máximo de 35°C (Gallegly y Hong, 2008).

4.2. Ciclo de la enfermedad por *Phytophthora palmivora*

P. palmivora produce un micelio vegetativo, cenocítico diploide y clamidosporas resistentes de pared gruesa, que se separan del micelio en el suelo. La reproducción asexual involucra la formación de esporangios en presencia de agua. Las zoosporas (10-40 por esporangio) se producen dentro del esporangio y son liberadas por medio de la pared esporangial a nivel de la papila, la cual se disuelve. Las zoosporas son altamente móviles y tienen dos flagelos. Pueden agruparse (agregado) en respuesta a un determinado estímulo, como los exudados de la planta. Posteriormente, forman quistes que germinan formando hifas infecciosas. Las zoosporas enquistadas infectan a los hospedantes y después el micelio coloniza los tejidos, produciendo más esporangios y la subsiguiente repetición del ciclo asexual-la fase de multiplicación. Un ciclo puede tardar entre 5 y 7 días. Las clamidosporas actúan como estructuras de supervivencia permitiendo la permanencia y distribución de *Phytophthora* en el suelo. En condiciones óptimas de temperatura (25- 32°C) y con alta humedad en los suelos y en los tejidos vegetales infectados, el inóculo inicial se reproduce rápidamente con ciclos repetidos de esporangios y zoosporas. *P. palmivora* sobrevive períodos secos como clamidosporas o micelios latentes en el suelo, en

infecciones en las raíces o en desechos vegetales infectados. Todo esto proporciona una fuente de esporangios y zoosporas cuando regresan las lluvias (Coffey, 2010).

4.3. Síntomas de *Phytophthora palmivora*

Los síntomas varían según el lugar de la planta afectada: en plántulas seca las hojas y el tallo, dando una apariencia inicial de quemazón. Se desarrolla en ambientes húmedos con poca aireación y riego sin drenar, las zoosporas salpican del suelo hacia el follaje con la precipitación y riego. En los frutos inicia sobre la cáscara de la mazorca con una mancha chocolate o negra, pero, a diferencia de la monilia, esta muestra unos límites bien definidos. Estas manchas se pueden localizar en los extremos o en el centro de la mazorca y las lecciones van de afuera hacia la parte interna del fruto, donde el daño es una pudrición acuosa. En mazorcas mayores de tres meses de edad, las infecciones inician en la punta o al final del pedúnculo que une a la mazorca. El patógeno aparece sobre la superficie de la mazorca como una pelusa blanquecina, sobre la que se forma la masa de esporas. La mazorca finalmente se ennegrece y marchita y es colonizada por hongos secundarios (Alarcón *et al.*, 2012).

4.4. Control de *Phytophthora palmivora*

Consiste en efectuar control cultural de podas aéreas y terrestres de malezas, mantenimiento en el drenaje del riego esto en caso que el suelo lo exija, realizar recolección semanal de frutos enfermos. Y control químico con aplicaciones de productos cúpricos en dosis de 9 g/litro, cada 20 días en la época que los frutos alcancen la edad de 4 meses (120 días); aplicar cal a los residuos de cosecha (Alarcón *et al.*, 2012).

5. *Verticillium sp.*

Es un hongo fitopatógeno que se encuentra presente solo en algunas áreas en México, este se reporta provocando daños en especies de solanáceas (Rodríguez Alvarado, 2000). *Verticillium sp.*, tiene un amplio rango de hospedantes, incluyendo plantas anuales y perennes, herbáceas y leñosas perennes (Farr y Rossman, 2014).

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de *Verticillium sp.*

Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Genero:	<i>Verticillium</i> (Nees)
Especie:	sp.

Fuente: (Agrios, 1978; Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

5.1. Características morfológicas de *Verticillium sp.*

El micelio vegetativo es hialino, septado y multinucleado. Los núcleos son haploides. Los conidios son de forma oval-alargada y normalmente unicelulares. Estos se producen en fiálides, que son hifas especializadas producidas en cada conidióforo. Cada fiálide contiene una masa de conidios. La ramificación de los conidióforos se produce en verticilos (Berlanger y Powelson, 2000; Fradin y Thomma, 2006).

5.2. Ciclo de la enfermedad por *Verticillium sp.*

El hongo penetra la raíz en la zona de alargamiento y coloniza la corteza. Desde la corteza, las hifas invaden los vasos del xilema donde forman conidios. La colonización vascular ocurre cuando los conidios son transportados con la savia ascendente. Debido a los materiales fúngicos y productos de defensa producidos

por el hospedante, como son tilosas (crecimiento de células del parénquima adyacentes a vasos del xilema) y goma, el sistema vascular es bloqueado, evitando que el agua llegue a las partes superiores de la planta. La obstrucción vascular ocasiona que tanto hojas como tallos, comiencen a exhibir síntomas de marchitez y clorosis. Conforme las plantas enfermas envejecen, el hongo produce micro esclerocios que son liberados en el suelo con la descomposición de residuos vegetales. El hongo sobrevive durante muchos años en esta forma latente o como micelio o conidios en el sistema vascular de plantas perennes (Berlanger y Powelson, 2000; Steffek *et al.*, 2006).

5.3. Síntomas de *Verticillium sp.*

En hojas incluyen marchitez, clorosis, enanismo, necrosis, o aclaramiento de nervaduras. Las secciones transversales de los tejidos del tallo pueden presentar un tejido vascular color marrón (Frandin y Thomma, 2006). Se observa una coloración marrón en los márgenes y entre las nervaduras de hojas exteriores. Las hojas interiores se atrofan, pero generalmente permanecen verdes y turgentes hasta que ocurre la muerte de la planta, estas hojas tienden a enrollarse a lo largo de la nervadura central y muestran rayas o manchas de color café negruzco. Este último síntoma a veces ayuda a diferenciar esta enfermedad de la pudrición de la corona provocada por *Phytophthora* (Zalom *et al.*, 2005; Steffek *et al.*, 2006).

5.4. Control de *Verticillium sp.*

Control cultural: Fertilización adecuada para promover el crecimiento vigoroso y mantener un balance de nitrógeno, fósforo y potasio, rotación de cultivos y eliminar malezas que puedan servir como reservorios de inóculo en los alrededores de los sitios de plantación (Report on Plant Disease, 2001; Berlanger y Powelson, 2000). Solarización por 30-45 días y temperaturas del suelo superiores a 50 °C (Ajwa *et al.*, 2003). Control químico: Mezcla de cloropirina

(gas lacrimógeno) al 33% y bromuro de metilo 66%; cabe mencionar que en la actualidad ya no se recomienda el uso de bromuro de metilo, por su efecto negativo al ambiente. Resistencia genética: El uso de variedades resistentes es uno de los métodos de control más importantes para esta enfermedad (Ellis, 2008).

6. *Aspergillus* sp.

La mayoría de las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente; se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas. Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90%, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20% y un rango de temperatura amplio (0 a 45 °C). Una de las particularidades de las especies de *Aspergillus* es su capacidad para producir micotoxinas, en este caso, aflatoxinas (Klich, 2002). Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos (Hawksworth *et al.*, 1995).

Cuadro 5. Clasificación Taxonómica de *Aspergillus* sp

Clase:	Eurotiomycetes
Orden:	Eurotiales
Familia:	Trichocomaceae
Genero:	<i>Aspergillus</i> (<i>Micheli</i>)
Especie:	sp.

Fuente: (Agrios, 1978; Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

6.1. Características morfológicas de *Aspergillus sp.*

Aspergillus es un hongo filamentoso hialino, saprofita, perteneciente al filo Ascomycota. Se caracteriza por tener micelio vegetativo compuesto de hifas septadas, ramificadas, incoloras, estructura conidial desarrollada como pedicelos y cabezuelas formando conidióforos. La clasificación de este género se hace por las estructuras de reproducción y color de sus colonias, estas colonias forma hifas delgadas y septadas. El verticilo es fundamental en la clasificación del hongo, así pueden clasificarse en cuatro grupos: monovercillata, asimétrica, biverticillata-simétrica y poliverticillata. Las diferentes especies se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia (Guzmán, 1977). Estas colonias son de un color blanquecino y algodonoso al inicio a medida que madura y aparece la esporulación, el centro de la colonia se va tornando de color distinto según la especie: amarillo (*A. flavus*), verdoso (*A. glaucus*), negro (*A. niger*) y gris (*A. fumigatus*), marrón (*A. terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales (Guzmán, 1977; García y Verástegui, 2001).

6.2. Ciclo de la enfermedad por *Aspergillus sp.*

El reservorio de *Aspergillus sp.*, es el suelo y vegetales (en descomposición), crece en cualquier tipo de sustrato, es un contaminante habitual, termo tolerante ya que puede vivir entre los 12°C y los 57°C y sus esporas pueden sobrevivir a 70°C (Hawksworth *et al.*, 1995).

6.3. Síntomas de *Aspergillus sp.*

El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el ambiente. La interacción de dichos factores determina la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y la cantidad de las aflatoxinas

producidas (García y Heredia, 2006). Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90%, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20% y un rango de temperatura amplio (0 a 45°C) (Klich, 2002).

6.4. Control de *Aspergillus* sp.

El control de *Aspergillus* o sus toxinas en la planta de maíz consiste en la utilización de productos químicos para su erradicación. Sin embargo; esta estrategia es relativamente costosa. Los insectos actúan como vectores al facilitar la entrada de conidios dentro de la mazorca han generado resistencia a los insecticidas (Martinez *et al.*, 2003).

7. *Penicillium* sp.

El nombre del género, *Penicillium* deriva del latín penicillus (pincel) debido a que producen sus esporas asexuales (conidias) en una estructura llamada conidióforo, semejando un pincel. Los conidióforos pueden ser simples o ramificados y terminan en racimos de fiálides en forma de botella. Las fiálides son las encargadas de producir los conidios que se distribuyen formando cadenas hasta que son completamente liberados. El género *Penicillium* se clasifica dentro del filo Ascomycota, representando uno de los géneros más extensos del reino Fungi con más de 250 especies descritas. Se encuentra ampliamente distribuido en las diferentes regiones del planeta. Sus especies son mayoritariamente saprófitas, con una elevada actividad anabólica y catabólica. Los miembros de este género son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios beneficiosos y perjudiciales para la especie humana, así como ácidos orgánicos y enzimas que degradan una amplia variedad de biomoléculas complejas (Pitt y Hocking, 2009; Samson *et al.*, 2010).

Al género *Penicillium* pertenecen especies de gran importancia económica. Algunas de ellas son utilizadas en la industria alimentaria como en la maduración

de quesos, productos cárnicos y en la producción de aditivos para alimentos (Grazia *et al.*, 1986). También son utilizadas industrialmente tanto para la producción de enzimas como poliamina oxidasa, fosfogluconato deshidrogenasa y glucosa oxidasa así como fuente de antibióticos como penicilina, xantocilina X y griseofulvina (Fleming, 1929; De Carli y Larizza, 1988).

Algunas especies de este género también están vinculadas a procesos perjudiciales para las personas, animales de granjas y cultivos ya que son capaces de descomponer los alimentos almacenados produciendo micotoxinas. Estos compuestos pueden encontrarse contaminando tanto los piensos como las materias primas utilizadas para su elaboración, lo cual origina un grupo de enfermedades y trastornos denominados micotoxicosis, que resultan dañinos para los animales que los consumen, su temperatura óptima de crecimiento es de 20-30°C, aunque dependiendo de la especie puede crecer en el intervalo de 5-37°C, produciendo la alteración de alimentos en refrigeración; también tolera grandes variaciones de pH entre 3,5-10, aunque crece mejor y más rápido a pH cercano a 4. Sus esporas se encuentran en forma de bioaerosol en el aire, con una concentración ambiental más o menos estable a lo largo del año, aunque se dan concentraciones pico en invierno y primavera (Soriano del Castillo, 2007).

Cuadro 6. Clasificación Taxonómica de *Penicillium* sp.

Clase:	Eurotiomycetes
Orden:	Eurotiales
Familia:	Trichocomaceae
Genero:	<i>Penicillium</i> (Link)
Especie:	<i>sp.</i>

Fuente: (Agrios, 1978; Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

7.1. Características morfológicas de *Penicillium* sp.

Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. Los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican

formando verticilos. Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. Las ramificaciones de un pincel poliverticilado son ramas, rámulas, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico (Webster, 2007).

Penicillium es un hongo filamentoso hialino, saprófito perteneciente al filo Ascomycota. Macroscópicamente las colonias son normalmente de crecimiento rápido; al principio de color blanco y con el tiempo adquieren color azul, azul verdoso, verde, gris oliva o tonos rosados, con reverso amarillo cremoso. La textura puede ser plana, filamentosa, aterciopelada o algodonosa dependiendo de la especie; además puede presentar gotas de exudado. Microscópicamente presenta hifas hialinas septadas. Los conidióforos tienen ramas secundarias, denominadas métulas. Estas son de forma cilíndrica, con paredes lisas y portan de 3 a 6 fiálides en forma de matraz; de las cuales surgen largas cadenas sin ramificar de esporas o conidios formando el penacho o pincel característico del género (Pontón, 2002).

7.2. Ciclo de la enfermedad por *Penicillium sp.*

El *Penicillium* es un género cosmopolita, siendo el género de hongos más abundante en suelos. La fácil proliferación de los *Penicillium* en los alimentos es un problema. Algunas especies producen toxinas y pueden hacer el alimento no comestible o aún peligroso. El micelio del hongo, conjunto de filamentos tubulares llamados hifas, crece en la superficie de frutas, pan, quesos y otros alimentos. Es una buena práctica desechar los alimentos que demuestran el desarrollo de cualquier moho. Se encuentra con frecuencia en los edificios húmedos y mohosos donde deteriora diferentes materiales de construcción, entre los que

resaltan el papel de decoración (crece bien en el pegamento empleado para su adhesión a las paredes). No muestra una notable variación estacional. Las máximas concentraciones de conidios en el aire se alcanzan en invierno y primavera (mayores en las áreas urbanas que en las rurales). Su temperatura óptima de crecimiento es de 23C°, pero crece entre 5 y 37C°. La reproducción asexual se produce en *Penicillium* mediante unas células, los conidios, que se forman en el extremo de hifas especializadas, los conidióforos. Éstos son ramificados y en forma de abanico. Los órganos sexuales son gametangios arrollados en hélice (ECURED, 2018).

7.3. Síntomas de *Penicillium* sp.

Las esporas son diseminadas por corrientes de aire y pueden sobrevivir, por períodos apreciablemente largos en el suelo, en el ambiente de las empacadoras y locales de almacenamiento de las frutas. Estas germinan sobre la superficie de los frutos, en presencia de agua libre y penetra únicamente a través de heridas en la cáscara; por lo cual también puede infestar los frutos en forma directa a través de la cutícula (Brown y Eckert, 1989; Brades *et al.*, 1959; Galli *et al.*, 1968; Smoot *et al.*, 1971; Snowdon, 1991). La contaminación de los frutos puede ocurrir en el campo (al momento de la cosecha), durante el transporte, en las empacadoras, en las cámaras de refrigeración y durante la distribución y venta en los mercados, bien sea por esporas acarreadas por el viento, contenidas en embalajes usados (sacos, cajones, etc.) o procedentes de frutos infectados adyacentes (Tuset, 1987).

7.4. Control de *Penicillium* sp.

Químico. El Tiabendazol es un fungicida sistémico perteneciente al grupo de los benzimidazoles, que actúa contra un amplio espectro de hongos patógenos (Van Tuyl, 1977; Delp, 1987) y fue el primer benzimidazol en ser usado en los citrus. Diversos trabajos realizados en los años comprendidos entre fines de la década

de los sesenta y principios de la década de los setenta, demostraron que este fungicida protegía eficientemente las frutas de las podredumbres causadas por *Penicillium* spp., además de inhibir la esporulación de estos hongos en frutas afectadas, el imazalil es un fungicida sistémico perteneciente al grupo de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol y, dentro de éstos, al de los imidazoles. Es considerado como un producto eficiente en el control de podredumbres de postcosecha causadas por hongos resistentes a los benzimidazoles (Brown *et al.*, 1967; Harding, 1972; Houck, 1977; Eckert y Ogawa, 1985; Eckert, 1990). Desinfectantes a base de cloro (hipoclorito de sodio o calcio), amonio cuaternario, formaldehído y alcohol son muy útiles para prevenir el depósito y/o el incremento de inóculo (Brown y Eckert, 1989).

Cultural. Se recomiendan diversas formas de manejo de la fruta, con el objeto de disminuir las heridas u otros daños mecánicos en la cáscara, debidos a procesos bióticos y abióticos que comprometan las primeras capas de la epidermis y las vesículas de jugo, así como para evitar la penetración de estos patógenos por la cicatriz del pedúnculo. Esto se logra con un cuidadoso y adecuado manipuleo de la fruta y limpieza de los embalajes y de los lugares de depósito y/o almacenamiento, incluyendo las cámaras de frío (Smoot *et al.*, 1971; Tuset, 1987; Brown y Eckert, 1989).

8. *Fusarium* sp.

El género *Fusarium* comprende 70 especies descritas, más de la mitad de las especies son parásitas de plantas y entre ellas se encuentran algunos de los más serios patógenos del mundo agrícola. Dentro del género *Fusarium* existen especies que presentan formas con reproducción sexual conocida, como *F. solani*, y otras, como *F. oxysporum*, en las que no se conoce fase sexual y diferentes teleomorfos se han asociado con las especies de *Fusarium*, la mayoría de los teleomorfos son miembros de los Hypocreales, ubicados en la clase Ascomycetes. Tres teleomorfos se relacionan con los anamorfos del género

Fusarium: *Gibberella*, *Haematonectria* y *Albonectria*. *Gibberella* es el género más comúnmente asociado a la mayoría de las especies de *Fusarium* e incluye a los patógenos de plantas como *Gibberella zeae* (*F. graminearum*), *G. moniliformis* (*F. verticillioides*) y otras especies incluídas en el complejo *G. fujikuroi*. Los miembros de este género son numerosos y se pueden encontrar como patógenos, endófitos y saprófitos en plantas y suelos de todo el mundo (Summerell y Leslie, 2011). Tiene como temperatura óptima para su crecimiento en medio de cultivo de 24 a 26°C, en condiciones de laboratorio y en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), presenta variaciones en color, de rosa o café hasta rojo intenso o púrpura. Produce un abundante micelio aéreo que se torna blanco o rojo cuando hace contacto con el agar (Ireta y Gilchrist, 1994).

Cuadro. 7. Clasificación Taxonómica de *Fusarium* sp.

Clase:	Hyphomycetes
Orden:	Moniliales
Familia:	Tuberculariceae
Genero:	<i>Fusarium</i> (Link ex Grey)
Especie:	sp.

Fuente: (Agrios, 1978; Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

8.1. Características morfológicas de *Fusarium* sp.

Hongo deuteromicetes (imperfecto), patógeno causante del marchitamiento vascular, en la mayoría de los casos del marchitamiento es debido a este género (Agrios, 1978). Las especies del género pueden producir tres tipos de esporas asexuales llamadas macroconidios, microconidias y clamidosporas. El macro conidio es la espora principal en la caracterización, su forma y tamaño varían según la especie: Los macro conidios pueden originarse a partir de estructuras especializadas, los esporodoquios, como así también en monofiálides, polifiálides o directamente a partir del micelio aéreo. Estas esporas son curvadas, pluriseptadas con una célula apical bien diferenciada, que puede ser redondeada, puntiaguda, filamentosa o en forma de gancho y poseen una célula basal en

forma de pie considerada característica de *Fusarium* sp. El micro conidio es un carácter taxonómico primario a nivel de especie, se considera la presencia o ausencia de estas microconidias, ya que no todas las especies del género *Fusarium* producen microconidias, estas pueden ser unicelulares o bicelulares si están presentes las microconidias, se considera el tamaño, la forma, modo de formación, si están solos, en falsas cabezas, cabezas o cadenas; estas esporas se forman en el micelio aéreo y dependiendo de la especie se pueden producir en fiálides con un solo poro llamadas monofiálides o en fiálides con más de un poro, llamadas polifiálides (Nelson *et al.*, 1994; Leslie *et al.*, 2006).

Las clamidosporas son una importante estructura de supervivencia, estas pueden estar solas, en pares, en grupos o en cadenas. Es una espora de pared gruesa, la pared externa puede ser rugosa o lisa. Estas esporas, se pueden encontrar en el micelio aéreo o incrustado en el agar, debido a esto, la localización de las clamidosporas es importante en la identificación de la especie. Generalmente, se requiere un mayor tiempo para su producción (superior a seis semanas) y puede que no se produzcan en grandes cantidades. En algunos casos, se requiere el uso de un medio de cultivo más especializado, como el medio agar suelo, para la observación de estas esporas (Leslie *et al.*, 2006).

8.2. Ciclo de la enfermedad por *Fusarium* sp.

Es un parásito facultativo, y como tal tiene la capacidad de sobrevivir como saprófito asociado a restos de trigo, maíz, arroz, y varias malezas del tipo de gramíneas (Kohli *et al.*, 1995). El hongo sobrevive como saprófito en el suelo en forma de micelio; con paredes gruesas y densas, o en clamidosporas. Los desechos de las plantas huéspedes, tales como los tallos, mazorcas o espigas y rastrojos, son las principales fuentes de inóculo y los rastrojos infectados de los cultivos que quedan en la superficie del suelo, desempeñan un papel importante en la supervivencia del hongo en los campos donde se presentan la rotación de siembra (Reis, 1989).

Los factores climáticos que favorecen la producción y dispersión de esporas, el desarrollo sobre la superficie del huésped y la infección, deben coincidir con el momento en que la planta es susceptible al hongo. Las temperaturas entre 15 y 35°C, la lluvia salpicada o arrastrada por el viento, que contribuyen a la dispersión de esporas y la humedad persistente ($\geq 48-60$ hrs) en las espigas y mazorcas favorecen a la infección del hongo (Evans y Howard, 1997).

Los principales medios de diseminación del inóculo son la lluvia y el viento, aunque los conidios formados en la superficie de los órganos infectados, no son adaptados a la diseminación anemófila por estar embebidos en una sustancia gelatinosa que los protege de la desecación, y que sólo es disuelta por el agua. Por lo que éste tipo de inóculo es diseminado por la salpicadura de la lluvia, por lo cual hay varias alternativas que han sido propuestas; se tiene a los artrópodos como vectores (Ireta y Gilchrist, 1994 y Parry *et al.*, 1995).

8.3. Síntomas de *Fusarium sp.*

Los síntomas de *Fusarium* aparecen de forma unilateral y se acompaña de un amarillamiento parcial de la hoja, a veces se observa la mitad clorótica y la otra mitad verde natural y el marchitamiento de los brotes doblados a un lado de la planta enferma (Agrios, 1978). La enfermedad puede producir puntos negros. La mancha y decoloración se expande en todas direcciones desde el punto de infección, cuando la infección es fuerte, los dañados son cubiertos por el micelio del hongo y toman una apariencia de masa algodonosa de color rosa. Si la severidad del ataque es moderada, los daños a los frutos de la planta pueden quedar chupados y de bajo peso, además de tomar una coloración blanquecina. La formación de los peritecios se puede observar cuando el cultivo, en general, ha llegado o está próxima a la madurez. Es entonces cuando en las plantas enfermas aparecen masas de peritecios de color negro que parecen emerger de los tejidos infectados (Ireta y Gichrist, 1994).

8.4. Control de *Fusarium sp.*

No existe un control efectivo para detener la muerte de la planta después que la infección ha tenido lugar, así, el control se basa en la prevención y desinfección de los suelos con productos químicos antes de la siembra y posteriormente un control regular, suprimirá los hongos en el suelo y protegerá a las plantas contra una infección, el mejor método de prevención puede ser el uso de material vegetal tolerante o resistente (Stefanova, 1999).

Control cultural. Preparación del terreno, este se realiza 8 días antes de la siembra y consta con el paso de rastra y arado a una profundidad de 30 cm. Aireación del terreno, este es beneficiado por el paso de rastra ya que voltea el suelo y eso permite la aireación, ayudando a mejorar el suelo. El uso de semilla certificada, permite tener una planta resistente, vigorosa, uniformidad en la plantación y mayores rendimientos. La solarización, consiste en cubrir con nylon el área a sembrar, por un período de seis semanas, antes de la siembra (Castellanos, 2010).

Control biológico. El control biológico de patógenos del suelo a través de adición de microorganismos antagonistas, es un medio no contaminante potencial para el control de enfermedades de plantas, el uso de estos organismos vivos para control de plagas y/o enfermedades pueden ser: insectos, bacterias, hongos o malezas (Fernández y Juncosa, 2002).

9. *Colletotrichum sp.*

La antracnosis es la enfermedad más importante en el mundo, es causada por varias especies de hongos del género *Colletotrichum* pertenecientes a los complejo *Colletotrichum acutatum* sensu lato (s.l) y *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. las especies más frecuentes asociadas con la antracnosis pertenecen al complejo *C. acutatum* s.l.; enfermedad de importancia económica, así como una

sería amenaza para la producción del trópico y subtropico y a nivel mundial (Álvarez *et al.*, 2005).

La enfermedad presenta dos síndromes característicos, el primero es la podredumbre del fruto de aspecto jabonoso que puede avanzar hasta afectar al fruto completo y que termina por momificarse. El segundo síndrome es la muerte y desecación de ramas y está asociado a las toxinas que produce el patógeno en los frutos afectados y que se movilizan a las ramas (Patiño, 2010).

La antracnosis del fruto, causada por un complejo de especies de *Colletotrichum*, es una enfermedad de importancia económica, así como una seria amenaza para la producción en el trópico y sub tropico y a nivel mundial. Dado que afecta directamente la superficie del fruto y por ende la calidad y su comercialización, las especies de *Colletotrichum* ocasionan un daño considerable en un gran número de cultivos tales como cereales, café, leguminoso, cítricos, hortalizas, etc., e incluso ocasionan grandes pérdidas económicas debido principalmente a las pérdidas de postcosecha de frutos tropicales y subtropicales como aguacate, banano y mango (Marulanda *et al.*, 2007).

Cuadro 8. Clasificación Taxonómica de *Colletotrichum* sp.

Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Glomerellales
Familia:	Glomerellaceae
Genero:	<i>Colletotrichum</i> (Corda)
Especie:	sp.

Fuente: (Agrios, 1978; Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

9.1. Características morfológicas de *Colletotrichum* sp.

El hongo *Colletotrichum* sp., produce conidios incoloros, de una sola célula, ovoides, cilíndricos y en ocasiones encorvados o en forma de acervulos. Las masas de conidios son de color salmón o rosa. Los acervulos son subepidemicos

y brotan a través de la superficie de los tejidos de la planta, tienen forma de disco o cojín y son cerosos, con conidioforos simples, cortos y erectos. En general la antracnosis puede presentarse en hojas, tallos y frutos en pre y postcosecha, y aun pequeñas lesiones causadas por este patógeno sobre la superficie del fruto, disminuyen su valor comercial. Muchas enfermedades de postcosecha del fruto presentan el fenómeno de la quiescencia en el cual los síntomas no se desarrollan hasta que el fruto madura. Las especies de *Colletotrichum* son reconocidas como los principales patógenos que causan infecciones latentes. Los apresorios son conocidos por formar discos adhesivos que se fijan a la superficie de la planta y permanecen latentes hasta que los cambios fisiológicos suceden en el fruto, principalmente los cambios ontogénicos (Agrios, 2005).

9.2. Ciclo de la enfermedad por *Colletotrichum* sp.

El hongo puede sobrevivir en hospederos alternos tales como otras solanáceas, leguminosas, plantas acompañantes y frutos en descomposición dentro del campo. Las especies de *Colletotrichum* producen naturalmente micro esclerocios que permanecen latente en el suelo durante el invierno o cuando son sometidos a condiciones de estrés. Y estos micro esclerocios pueden sobrevivir por muchos años. Sus conidios son liberados y se diseminan solo cuando los acervulos se encuentran húmedos, y son generalmente diseminados por las lluvias o el salpique de agua de riego desde tejidos enfermos a hojas y frutos sanos. Además pueden ser transportados por el viento o al entrar en contacto con los insectos, u otros animales, herramientas, etc. Los frutos enfermos actúan como fuente principal de inóculo permitiendo la diseminación de la enfermedad de planta a planta dentro del campo (Than *et al.*, 2008a).

9.3. Síntomas de *Colletotrichum* sp.

Este género producen una serie de estructuras de infección especializadas como tubo germinativo, apresorio, hifa intracelular e hifa necrótica secundaria. En

general los eventos de pre-penetración son básicamente los mismos para todas las especies de *Colletotrichum*, las principales diferencias, llegan a presentarse aparentemente después de la penetración y es ahí cuando se pueden diferenciar las dos estrategias de infección. Inicialmente, la conidia se adhiere y germina sobre la superficie de la planta (solo en presencia de agua), produce un tubo germinativo que forma un apresorio y se introduce directamente en la cutícula de su hospedante. Después de la penetración el patógeno que coloniza la región intramural, a través de la cutícula, invade de manera necrótica y se disemina rápidamente a través del tejido; en esta forma de parasitismo, no se presenta una etapa biotrófica detectable. Por el contrario la mayoría de los patógenos de la antracnosis presentan inicialmente una estrategia de infección biotrófica a través de la colonización del plasmalema y la pared celular, intracelularmente (por lo general esta fase puede durar de 24-72 horas. Después de su estado biotrófico, se desarrolla su etapa necrótica destructiva, la cual comienza con la presencia de una hifa necrótica secundaria, que se ramifica a través del tejido del hospedero tanto inter como intracelularmente afectando una o dos células, de ahí que este patógeno sea reconocido como hemibiotrofo o biotrofo facultativo (Than *et al.*, 2008b; Mahasuk *et al.*, 2009).

9.4. Control de *Colletotrichum sp.*

Prácticas culturales. El uso de semillas sanas (libres del patógeno) o tratadas con compuestos químicos y con agua caliente, rotación de cultivos cada 2 o 3 años cuando sea posible, control de solanáceas que pudieran servir como hospederos alternos, buen drenaje del campo y estar libre de material vegetal en descomposición, uso de cultivares con frutos resistentes con un corto periodo de madures que permitan que el fruto escape de la infección del hongo y remoción de los desechos de materia orgánica del campo y/o arados profundos que cubran completamente los cultivos enfermos. Uso de químicos y cultivares resistentes el manejo de la antracnosis del fruto se ha hecho principalmente mediante el uso de fungicidas (benomyl, maneb, zineb, mancozeb, clorotalonil, captafol y el

folpet). Sin embargo; la aplicación de fungicidas es efectiva de manera parcial bajo condiciones ambientales que son favorables para la infección del patógeno. Además el uso de fungicidas no es sostenible en pequeños sistemas de producción debido al alto costo y riesgos para el ambiente. Uso de biofungicidas y control biológico. El control biofungicida de la pudrición del frutos con productos de plantas han demostrado que extractos crudos de rizomas, hojas y tallos de *Acoroscalamus L*, *Cymbopogon martinii*, *Ocimum sanctus*, *Azadirachta indica*, podrían restringir el crecimiento del hongo. Además el uso de controladores biológicos como *Pseudomonas fluorescens* cepas DGg13 y BB133 han sido encontradas efectivas para el control de la pudrición también el uso de especies de *Trichoderma*, *Bacillus subtilis* y *Candida oleophila* como otros agentes de control biológico eficaces contra el género *Colletotrichum* (Agrios, 2005; Mahasuk *et al.*, 2009).

10. *Lasiodiplodia theobromae* L.

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* L. es el agente causal de numerosas enfermedades de plantas en una gran variedad de hospederos. Los cultivos hortofrutícolas son particularmente sensibles a la infección por este hongo. Aunque, en México *L. theobromae* está asociado con la muerte descendente y pudrición de frutos como mango, uva, papaya, rambután, zapote y cítricos aún es escaso el número de reportes relacionados con enfermedades causadas en diferentes especies vegetales (Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

Este hongo que fue descrito por primera vez alrededor de 1890 por Saccardo, afectando frutos de cacao *T. cacao* en Ecuador. Este hongo es cosmopolita y tiene un amplio rango de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, especialmente de los trópicos y subtrópicos. Es un hongo pleomórfico y ubicuo, por lo cual ha tenido más de un sinónimo. Las enfermedades ocasionadas por este patógeno incluyen muerte descendente, cáncer, gomosis, tizón de la hoja, pudrición de raíz en plantas maderables y

cultivos. *L. theobromae* es saprófito pero se le considera un patógeno latente, encontrándose como endófito en tejidos sanos de la planta, convirtiéndose en patógeno cuando el hospedero está debilitado o estresado (Crous y Palm, 1999; Rubini *et al.*, 2005; Mohali *et al.*, 2005; Pitt y Hocking, 2009; Shahbaz *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

Cuadro 9. Clasificación Taxonómica de *Lasiodiplodia Theobromae* L.

Clase:	Dothideomycetes
Orden:	Botryosphaerales
Familia:	Botryosphaeriaceae
Genero:	<i>Lasiodiplodia</i>
Especie:	<i>Theobromae</i> L.

Fuente: (Agrios, 1978; Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

10.1. Característica morfológica de *Lasiodiplodia theobromae*

El hongo *L. theobromae* se clasifica dentro de los Ascomicetos en el orden Botryosphaerales y en la familia Botryosphaeriaceae; presenta un estado sexual (teleomorfo) poco común *Botryosphaeria rhodina*. Sin embargo no existen descripciones recientes (Schoch *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008; Slippers *et al.*, 2013). El estado sexual que se tienen de este hongo hasta ahora han sido inconclusos dado que no se han encontrado subsecuentes reportes que confirmen esta conexión (Alves *et al.*, 2008). *L. theobromae* tuvo como sinónimo a *Diplodia theobromae* (Alvarez, 1976; Denman *et al.*, 2000). Además, morfológicamente los dos géneros son claramente distintos. Por ejemplo, las estrías de los conidios están presentes solo en *Lasiodiplodia* por lo tanto, no hay razón para considerar a estos dos géneros como sinónimos (Phillips *et al.*, 2013). La morfología de su ascocarpo es de color café oscuro a negro, agregado, con pared gruesa de color café oscuro y hialino en capas internas, de 250-400 µm de diámetro. El asca es bitunicada, estipitada, con 8 esporas, de 90-120 µm de longitud. Las ascosporas son biseriadas, hialinas, aseptadas de 30-35 x 11-14 µm. El conidiomata es estromático, simple o agregado, inmerso en el hospedero

y una vez maduro emerge de éste, de color café oscuro, unilocular, de pared gruesa o delgada de color marrón, con frecuencia setoso, de hasta 5 mm de ancho, ostiolo central, único, papillado. Paráfisis hialinas, cilíndricas, tabicadas, ocasionalmente ramificadas con los extremos redondeado hasta 55 μm de largo y 3-4 μm de ancho (Phillips *et al.*, 2013).

Las células conidiogénicas son hialinas, de pared gruesa, lisas, cilíndricas a sub-obpiriformes, holoblásticos, con una o dos anillaciones. Los conidios son subovoides a elipsoidales, con ápices ampliamente redondeados, que se estrechan para trincar la base, más ancha a mediados del tercio superior, de paredes gruesas, con contenido granular, en un principio hialino y aseptados, convirtiéndose a café oscuro una vez maduros, con 1 septo, presentan depósitos de melanina en la superficie interior de la pared dispuestos longitudinalmente dando una apariencia estriada con medidas de 21.5-31-5 x 13-17 μm y una proporción de 1.9 Largo/Ancho (Pitt y Hocking, 2009; Phillips *et al.*, 2013).

Las colonias en medio de cultivo son moderadamente densas, con micelio aéreo, inicialmente blancas tornándose gris-olivo a los 7 días y con el tiempo adquieren un color negro. Las temperaturas de crecimiento para *L. theobromae* son 15°C mínima, 28°C como óptima y 40°C como máxima (Slippers *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008). La esporulación del hongo es favorecida por fotoperiodos de más de 16 horas de exposición de luz lo que permite la formación de picnidios; por el contrario, una exposición menor a 4 horas de luz diaria en un periodo de 23 días inhibe la esporulación del hongo (Perera y Lago, 1986). La presencia de nitrógeno en el medio de cultivo favorece la esporulación; Saha *et al.* (2008) evaluaron la concentración de nitrógeno en distintos medios de cultivo, encontrando que el agar de papa dextrosa (PDA) adicionado con extracto de raíz de té induce a un crecimiento rápido y mayor del micelio, además de una concentración de esporas superior al resto de los medio evaluados.

10.2. Ciclo de la enfermedad por *Lasiodiplodia theobromae*

La principal vía de entrada de *L. theobromae* a los hospederos es a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, insectos o causas naturales. Se ha reportado que durante los periodos lluviosos hay mayor producción de esporas las cuales pueden ser diseminadas por las gotas de lluvia y el viento. El hongo coloniza el sistema vascular y avanza por delante de los síntomas visibles. El hongo sobrevive sobre tejidos muertos en el árbol o suelo y especialmente en frutos momificados. La incidencia de *L. theobromae* está influenciada por la temperatura (mayor a 30°C), al estrés hídrico y bajos niveles de nutrición de la planta. Cuando los frutos son infectados en el árbol, el patógeno puede permanecer quiescente hasta que los frutos maduran. En postcosecha, los frutos pueden ser infectados al colocarlos sobre el suelo después de cosechados o a través del contacto físico de un fruto sano con uno enfermo (Pegg *et al.*, 2003; Ploetz, 2003; Ventura *et al.*, 2004; Khanzada *et al.*, 2005; Burgess *et al.*, 2006; Shahbaz *et al.*, 2009; Vásquez *et al.*, 2009).

10.3. Síntomas de *Lasiodiplodia theobromae*

En la pudrición del fruto y del pedúnculo, la enfermedad está condicionada a alta temperatura y humedad relativa. Las lesiones ocasionadas por *L. theobromae* en frutos de mango son inicialmente difusas, acuosas-hundidas dispersándose desde el pedúnculo en forma de proyecciones de huellas dactilares, las cuales va formando márgenes ondulados. La necrosis ocurre debajo de la cutícula, invadiendo la pulpa del fruto y llegando a momificarlo. Se llegan a observar picnidios primero sobre el pedúnculo y después sobre el fruto; además, de las lesiones puede fluir un exudado café (Ploetz, 2003; Ventura *et al.*, 2004).

La principal vía de entrada de *L. theobromae* a los hospederos es a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, insectos o causas naturales. Se ha reportado que durante los periodos lluviosos hay mayor producción de

esporas las cuales pueden ser diseminadas por las gotas de lluvia y el viento (Ploetz, 2003; Vázquez-López *et al.*, 2009). El hongo coloniza el sistema vascular y avanza por delante de los síntomas visibles. El hongo sobrevive sobre tejidos muertos en el árbol o suelo y especialmente en frutos momificados (Ploetz, 2003; Pegg *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 2006; Shahbaz *et al.*, 2009).

La incidencia de *L. theobromae* está influenciada por la temperatura (mayor a 30° C), al estrés hídrico y bajos niveles de nutrición de la planta. Cuando los frutos son infectados en el árbol, el patógeno puede permanecer quiescente hasta que los frutos maduran. En postcosecha, los frutos pueden ser infectados al colocarlos sobre el suelo después de cosechados o a través del contacto físico de un fruto sano con uno enfermo (Ventura *et al.*, 2004; Khanzada *et al.*, 2005).

10.4. Control de *Lasiodiplodia theobromae*

Numerosos son los estudios realizados para controlar a *L. theobromae* una vez detectado en el cultivo. Li *et al.* (1995), evaluaron fungicidas contra *L. theobromae* y *Botryosphaeria dothidea* causantes de gomosis en duraznos y albaricoque, encontrando que el fungicida metil-tiofanato inhibió el crecimiento micelial, la germinación de conidios y controló el desarrollo de la enfermedad en árboles de albaricoque; también reportaron que los fungicidas asperjados, metil-tiofanato 70WP y carbendazima 50WP se pueden usar como tratamiento auxiliar para prevenir la infección del patógeno. Por otro lado, Tamayo (2007) recomienda la utilización de hipoclorito de calcio y carboxin/captan, a fin de prevenir posibles pudriciones o la manifestación del hongo en el semillero, y antes del almacenamiento se deben sumergir los frutos en una solución fungicida a base de procloraz. También recomienda aspersiones precosecha con fungicidas a base cobre, benomil, metil tiofanato, carbendazim o tiabendazol en forma rotativa a fin de evitar la aparición de poblaciones del patógeno resistentes a los fungicidas. En un estudio de evaluación de la sensibilidad de *L. theobromae* hacia dos grupos de fungicidas se concluyó que un 91.6% de 120 aislados provenientes

de huertos de papaya fueron sensibles a los ingredientes activos del grupo de carbamatos del tipo metil benzimidazol (benomyl y tiabendazol). En cuanto al grupo de fungicidas del tipo inhibición por demetilación (Imazalil, procloraz, tebuconazol) se encontró gran variabilidad en cuanto al grado de sensibilidad de los aislados analizados concluyendo que *L. theobromae* es menos sensible a este grupo de fungicidas (Da Silva *et al.*, 2012). En poscosecha, Barbosa-Martínez *et al.*, (2002), evaluarón el efecto del ozono, yodo y cloro en la germinación de esporas de *L. theobromae* aislado de frutos de mango y encontraron que en la aplicación de yodo (500 mg. L⁻¹) la germinación de esporas de *L. theobromae* fue de 10%; mientras que con ozono (2.2 mg. L⁻¹) y cloro (360 mg. L⁻¹) la germinación de esporas fue de 30 y 40%, respectivamente. Tovar *et al.* (2013) reportaron que la combinación de lavado y posterior aplicación de tiabendazol redujo la incidencia de la enfermedad ocasionada por *L. theobromae* hasta un 81% en injertos de zapote. Los fungicidas ciprodinil+fludioxinil, piraclostrobin+boscalid, procloraz, tebuconazol, iprodione fueron eficaces para inhibir el crecimiento micelial de *L. theobromae in vitro*. En cítricos, Varela *et al.* (2013) reportan la aplicación de benomyl y compuestos a base de oxiclورو de cobre contra *L. theobromae* en las distintas etapas del cultivo. Canales (1998) sugiere, para el control del cáncer de tronco y ramas de mango, realizar una cirugía en los cánceres hasta eliminar el tejido dañado y aplicar Benlate®, Tecto 60® o Derosal 50® en las heridas. También en mango, en la muerte descendente se recomienda podar las heridas y realizar aspersiones de fungicidas a base de cobre cada 15-20 días, también se puede aplicar los productos Captán, Maneb, Zineb y Benomyl, desde el inicio de la floración hasta un mes antes de la cosecha (Tucuch *et al.*, 2005). En marañón se recomiendan podas sanitarias y tratamiento preventivo con fungicidas a base de oxiclورو de cobre o azufre como ingrediente activo antes de iniciar la floración; durante la floración y formación del fruto se puede utilizar un fungicida sistémico a base de Fosetyl-al, Metalaxil-m o Triforine para reducir la incidencia de la necrosis en frutos (Canales, 2007).

11. *Nodulosporium* sp.

Nodulosporium sp. (*Hypoxylon* Bull), está delimitado por cuatro caracteres principales: anamorfos *Nodulosporium* Preuss. Como el criterio principal para reconocer un hongo Xylariaceae como miembro de Hypoxyloideae, estromata unipartite tejido estromal por debajo de la capa peritecial sólido y homogéneo y estromata no en posición vertical, es decir; con una altura menor que la longitud y la anchura. *Nodulosporium* sp. (*Hypoxylon* Bull), difiere de los géneros en Xylarioideae como *Nemania* Gray., que tiene anamorfos tipo *Geniculosporium* Chesters y Greenhd., *Biscogniauxia* Kuntze y *Camillea* Fr., que tienen estromas bipartitos, *Daldinia* Ces. y De Not., que tiene anillos concéntricos, *Entonaema* A. Möller que tiene una cavidad hueca revestida con tejido gelatinoso y *Rhopalostroma* D. Hawksw., que tiene estipitate estromata (Rogers *et al.*, 2018). De los hongos Ascomycetes de la familia Xylariaceae, *Nodulosporium* sp. (*Hypoxylon*), después de *Xylaria* Hill ex Schrank., es el género con mayor número de especies en el territorio mexicano (San Martín, 1992). La revisión mundial del género por Ju y Rogers (1996) y el trabajo de Van der Gucht *et al.* (1997), arrojan un total de 121 especies, de tal manera que México con 41, cuenta con 34% de esa cantidad global. El número de componentes de *Hypoxylon* presentes en el país debe ser mayor si se considera que no se ha explorado micológicamente de una manera minuciosa, ni la mitad del territorio de la República. Por lo anterior es de esperarse la existencia en México de especies ya citadas de otras latitudes y por supuesto también de otras nuevas para la ciencia (Van der Gucht *et al.*, 1997). El género *Nodulosporium* (*Hypoxylon*) presenta mayor distribución dentro de las plantas leñosas en el mundo, formando parte importante de las masas arboladas de las regiones montañosas. Este género se distribuye ampliamente en el nuevo mundo desde el sur de Canadá hasta Colombia, incluyendo Cuba (Nixon, 1998; Valencia, 2004). Se encuentra presente en casi toda la república mexicana, causa daños muy significativos en los pinos, encinos y robles y provoca muerte descendente, principalmente en los estados de Colima, Guanajuato, Jalisco, Nayarit y Aguascalientes (Moreno-Rico *et al.*, 2010).

Cuadro 10. Clasificación Taxonómica de *Nodulosporium* sp.

Clase:	Deuteromicetes
Orden:	Xilarial
Familia:	Xilareaceae
Genero:	<i>Nodulosporium</i>
Especie:	sp.

Fuente: (Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

11.1. Características morfológicas de *Nodulosporium* sp.

Hypoxylon tiene estrecha afinidad con *Entonaema* y *Daldinia* debido a que comparte con ellos la conexión anamórfica del tipo *Nodulosporium* sp., y caracteres teleomórficos como la presencia de pigmentos estromáticos, la morfología del anillo apical de las ascas (más ancho que alto), el episporio conspicuo y generalmente dehiscente en KOH a 10%, así como la localización de la línea germinal por lo regular dorsal y recta, raramente sigmoide o espiral, en las ascosporas (Ju *et al.*, 1997; San Martín *et al.*, 1999). Los anamorfos de *Hypoxylon* son atribuibles al género de forma *Nodulosporium* sp., para facilitar la comunicación, *Nodulosporium* sp., se subdivide en cuatro tipos, basados en los patrones de ramificación de las estructuras conidiógenas en listadas en orden ascendente de complejidad: *Sporothrix* Hektoen y CFPPerkins., *Virgariella* S. Hughes, *Nodulosporium* y *Periconiella* (G. Winter) Sacc. El género *Nodulosporium* presenta conidióforos simples a menudo septados, sin un eje dominante con ramificaciones dicotómicas o no ramificadas, ramas adicionales que surgen del primer nivel y segundo nivel de regiones conidiógenas, ramas que terminan con tres o cuatro células conidiógenas que surgen en espirales del eje principal y/o de ramas principales o de ramas subordinadas adicionales, este proceso de producción de conidiógenas suelen continuar varias veces, puede dar lugar a varios niveles de regiones conidiógenas quedando una o dos en cada término, pero con conidióforos originales y ramas adicionales que dan como resultado una estructura más compleja y espesa, no obstante, *Periconiella* al igual que *Nodulosporium* tienen la tendencia a producir más de dos células conidiógenas en cada extremo de la rama. Son similares en la producción

frecuente de ramas adicionales, pero difieren en que la última es más simple en su ramificación (Rogers *et al.*, 2018).

Nodulosporium sp., presenta colonia micelial blanquecina y aspecto algodonoso con anillos concéntricos, adquiriendo una coloración ligeramente verdosa y al final pardo claro, crecimiento conglomerado de micelio que forma cuerpos globosos oscuros, en cuyo interior hay ascas y ascosporas con masa micelial pardo claro que contiene conidióforos y conidios hialinos, con forma elipsoidal y un extremo truncado, con medidas de 5.14-6.66 × 4.13-4.86 mm. Estroma aglomerado o pulvinado formando peritecios globosos negros y labios periteciales conspicuos, superficie negra brillante, de consistencia serosa. Los peritecios globosos a subglobosos miden de 0.32-0.48 mm de diámetro con ostiolos umbilicados con gránulos rojizos a negruzcos dispersos inmediatamente bajo la gruesa capa peritecial y entre las paredes, las ascas miden entre 153.1-173.37 µm de longitud total, de 10.2-12.83 µm de anchura, la parte del alineamiento de esporas de 82.37-99.96 µm y el tallo de la asca de 59.08-83.36 µm de longitud, las ascosporas son pardo-oscuros, unicelulares, elipsoides inequilaterales, con extremos ligeramente redondeados (De la Torre-Almararáz *et al.*, 2009).

11.2. Ciclo de la enfermedad por *Nodulosporium sp.*

Poco se conoce sobre la actividad de este hongo relacionado con la muerte de encinos en México. En la sierra fría de Aguascalientes, Romo *et al.* (2007) reportaron la presencia de ascomas de *Hypoxylon* spp., en los tallos de *Quercus obtusata* Bonpl., y *Quercus potosina* Trel. Sin embargo, no identificaron la especie del hongo y no relacionaron su presencia con síntomas en los árboles. En un estudio realizado en la Sierra de Lobos, Gto., Vázquez *et al.* (2004) encontraron que los principales agentes biológicos responsables de la declinación de los bosques de encino son el efecto combinado de *Nectria galligena* (Bres.) Rossman y Samuels e *Hypoxylon thouarsianum* (Lév.) Lloyd.,

quienes actúan en sinergia y causan una fuerte micosis en los encinos con un comportamiento agresivo.

En 2001, plantas de mezquite (*Prosopis laevigata* L.) con muerte descendente de ramas, fueron observadas en la reserva de la Biosfera de Tehuacán Puebla, se encontró ramas con daños, en el cual se desarrolló un hongo de color pardo claro que produjo conidióforos y conidios hialinos, verdosos, elipsoides con un extremo truncado. En el estroma pulvinado y aglomerado hubo masas de peritecios negros conspicuos y globosos. Las ascosporas son pardo-oscuro, unicelulares, elipsoides desiguales, con extremos redondeados y un tubo germinativo a lo largo de la espora. El hongo fue identificado como *Hypoxylon diatrypeoides* Rehm y su anamorfo como una especie del tipo *Nodulosporium* (De la Torre-Almararáz *et al.*, 2009).

11.3. Síntomas de *Nodulosporium* sp.

Los síntomas que provoca es una pudrición blanquecina de la albura y con ello canchales de diferentes dimensiones en los encinos afectados, sobre todo en la base del tallo. La madera al inicio presenta manchas húmedas, posteriormente son secas y en los márgenes se observan líneas oscuras. También, causa amarillamiento, marchitamiento y caída de las hojas, muerte descendente de las ramas y finalmente, declinamiento y muerte del árbol, principalmente los que se encuentran debilitados por sequía u otros factores abióticos y bióticos (Downer, 2006; Swiecki y Bernhardt, 2006). Los miembros del género *Nodulosporium* se encuentran como saprófitos o patógenos débiles en madera de árboles de clima templado o principalmente tropical o como endófitos (quizás en simbiosis mutualista) en los tejidos internos de plantas leñosas o herbáceas (San Martín *et al.*, 1999).

12. Agentes de control biológico de fitopatógenos

12.1. *Trichoderma harzianum*

El género *Trichoderma* fue introducido por Persoon hace casi 200 años y consiste de hongos anamórficos aislados principalmente del suelo y de materia orgánica en descomposición (Grondona *et al.*, 1997). Este género comprende un conjunto de especies sin fase sexual evidente. Pertenece al grupo de hongos deuteromicetes u hongos imperfectos, al orden hifales (moniliales) y se caracteriza por presentar conidióforos hialinos, muchas veces blanquecinos, no verticilados, fiálides simples o en grupos, conidias hialinas, unicelulares ovoides que yacen en pequeños racimos terminales, se les reconoce fácilmente por su rápido crecimiento y el color verde de las conidias. En su estado vegetativo presentan un micelio o septos simples. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Son anaerobios facultativos y se reproducen asexualmente por conidios. Las hifas que llevan las esporas o conidióforos son ramificadas (Barnett y Hunter, 1999; Atlas y Bartha, 1992; Alexopoulos *et al.*, 1996; Hermosa *et al.*, 2000; Rodríguez y verónica, 2002; Harman *et al.*, 2004). Las especies de este género (en su mayoría micoparasíticas), son las antagonistas más utilizadas para el control de enfermedades producidas por hongos debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en varios sustratos, combate una amplia variedad de hongos fitopatógenos responsables de la mayoría de las enfermedades en cultivos, pero sobretodo porque no ataca plantas superiores (De la Cruz *et al.*, 1995; Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998; Rey *et al.*, 2000; Howell, 2003; Ezziyani *et al.*, 2004).

Cuadro 11. Clasificación Taxonómica de *Trichoderma harzianum*

Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Genero:	<i>Trichoderma</i>
Especie:	<i>harzianum</i> Rifai

Fuente: (Agrios, 1978; Barnett y Hunter, 1999; Mycobank, 2018)

12.2. Características morfológicas de *Trichoderma harzianum* Rifai.

Las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración, blancas-verdes, amarillo-verdosas; las áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos (Arango *et al.*, 1988; Barnett y Hunter, 1999). El revés de las colonias es usualmente no coloreado, amarillo, ámbar o amarillo-verde, y muchas especies producen grandes cantidades de clamidosporas en cultivos sumergido (Howell, 2003).

Los conidióforos son erectos, hialinos, en las mayorías ramificadas, no verticiladas, los cuales pueden ser solitarios o en grupos. Las fiálides son en forma de botella, únicas o en grupos, hinchadas en la región central pero delgadas hacia el ápice; son unicelulares sub-globosas u oblongas, lisas o equinuladas, hialinas o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fiálides (Arango *et al.*, 1988; Barnett y Hunter, 1999).

Las especies del género *Trichoderma* presentan conidióforos complejos y altamente ramificados en forma piramidal o cónica dando origen a estigmas, con extremos ahusados. Al microscopio las fiálides se observan más estrechas en la base que en la parte superior, que permitiendo una buena correlación entre el sistema de ramificación del conidióforo y la disposición de estas (Barnett y Hunter, 1999).

12.3. Ciclo de vida de *Trichoderma harzianum*

Trichoderma sp., es un habitante natural del suelo, caracterizado por un comportamiento saprófito o parásito, propiedades que benefician su actividad antagonica, es considerado un colonizador secundario dado su frecuente aislamiento a partir de la superficie de raíces de varias plantas de madera y parasita estructuras de diferentes hongos patógenos debido a la competencia por nutrientes y micoparasitismo (Camargo, 2005).

12.4. Síntomas de *Trichoderma harzianum*

El micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* se produce en varias etapas sucesivas, comienza por el crecimiento quimiotrófico hacia el hospedero, estimulado por las moléculas procedentes del mismo (Chet *et al.*, 1981). Los hongos del género *Trichoderma* se adhiere con carbohidratos unidos a lectinas en la pared celular del patógeno. El paso siguiente consiste de la producción de, peptaiboles y enzimas hidrolíticas (Howell, 2003), lo cual facilita la entrada de la hifa de *Trichoderma* dentro del lumen del hongo parasitado y la asimilación del contenido de la pared celular (Benítez *et al.*, 2004).

T. harzianum es capaz de segregar una gran cantidad de compuestos antimicrobianos capaces de afectar a los fitopatógenos. Estos metabolitos secundarios, que pueden ser tanto volátiles como no volátiles, pueden actuar mediante contacto directo con los patógenos o mediante contacto en la distancia (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

T. harzianum se caracteriza por presentar un rápido crecimiento, que le confiere mayor capacidad a la hora de colonizar un espacio. De este modo, compiten directamente por los mismos nichos que algunos hongos fitopatógenos; la colonización de los sitios de unión de estos patógenos en la planta por *T. harzianum* permite reducir la enfermedad. Además, su carácter saprofito les permite utilizar un amplio rango de sustratos, compitiendo directamente por los nutrientes presentes en el medio (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

12.5. *Trichoderma harzianum* como control

La capacidad de *T. harzianum* de parasitar otros hongos (Chet *et al.*, 1998), es un mecanismo que puede actuar junto a fenómenos de antibiosis y competencia. Las hifas de *T. harzianum* son capaces de detectar la presencia de un posible hospedero en el medio, mediante la detección de moléculas liberadas por el posible hospedero, debido a la acción de las enzimas líticas producidas por *T.*

harzianum. Mediante quimiotropismo, *T. harzianum* es capaz de crecer hasta el hospedador, reconociéndolo mediante lectinas específicas. Es entonces cuando *T. harzianum* es capaz de crecer rodeando al patógeno, mediante la formación de ovillos y apresorios, que atraviesan la pared celular del hongo y permiten que las hifas de *Trichoderma* penetren en el hospedero (Brotman *et al.*, 2010).

Este fenómeno está ligado a la síntesis de una gran batería de enzimas líticas que degradan la pared del patógeno. Entre estas enzimas destacan las quitinasas, las glucanasas y las proteasas (Viterbo *et al.*, 2002); la combinación de estas hidrolasas es capaz de lisar completamente la pared celular del hospedador, compuesta principalmente por quitina, un polímero formado por N-acetil-glucosamina unida mediante enlace 1,4, o de celulosa en el caso de los oomicetos. Además, también encontramos en la pared fibras de glucano, polisacárido lineal de residuos de glucosa unidos por enlace 1,3 con ramificaciones con enlace 1,6. Todos estos compuestos están inmersos a su vez en una matriz proteica. El sistema hidrolítico encargado de lisar esta estructura ha sido profundamente estudiado en algunas especies de *Trichoderma*. De este modo, para *T. harzianum*, se han descrito hasta cinco quitinasas (CHIT42, CHIT33, CHIT37, CHIT52, y CHIT40) y dos N-acetil-glucosaminidasas (EXC1 y EXC2); cuatro 1,3-glucanasas (BGN13.1, GLUC78, GLU36 y LAM1.3) y tres 1,6-glucanasas (BGN16.1, BGN16.2, y BGN16.3); y tres proteasas (PRB1, PAPA, y PRA) (Rincón *et al.*, 2008).

12.6. Principales mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum*

Los modos de acción de estos hongos antagonistas pueden resumirse en mecanismos directos, que engloban el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia; e indirectos, que incluyen la estimulación del crecimiento y la inducción de resistencia vegetal a estrés biótico y abiótico. Todos estos mecanismos pueden darse de forma simultánea en un mismo aislado, y no se excluye ninguno de ellos. De la eficacia de cada uno de ellos o de su combinación

dependerá el éxito en la supresión de la enfermedad (Benítez *et al.*, 2004).

13. *Bacillus subtilis*

13.1. Características de *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus* se encuentra entre los agentes más adecuados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza (Chatterjee *et al.*, 2007). Este género, además ha tenido mucho éxito en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos (Sosa *et al.*, 2006; Reinoso-Pozo, 2007). La mayoría de los *Bacillus* spp. producen muchas clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, que son efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ* (Pal y Gardener, 2006; Leelasuphakul *et al.*, 2008). De hecho, *Bacillus* sp., actúa vía antibiosis, competencia por nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia (Kloepper *et al.*, 2004). Dentro del género *Bacillus* la especie con mayores antecedentes como antagonista es *Bacillus subtilis*, varios autores han analizado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas (Cazorla y Romero, 2007).

Numerosos estudios sugieren la utilización de *B. subtilis* para controlar biológicamente diversos hongos fitopatógenos, tales como *Cercospora kikuchii* T. Matsumoto y Tomoy (Mycosphaerellaceae) (Soldano *et al.*, 2010) *Cercospora beticola* Sacc. (Mycosphaerellaceae) (Collins y Jacobsen, 2003), *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn. (Ceratobasidiaceae) (Montealegre *et al.*, 2003), *Botrytis cinerea* Pers. (Sclerotinaceae) (Hang *et al.*, 2005), *Colletotrichum gloeosporioides* (Stoneman) Spauld. y H. Schrenk (Glomerellaceae) (Senghor *et al.*, 2007) y *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

13.2. Ubicación taxonómica de *Bacillus subtilis*

Cuadro 12. Clasificación Taxonómica de *Bacillus subtilis*

Clase:	Bacilos
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Genero:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn.

Fuente: (Schaad *et al.*, 2001; Kreieg *et al.*, 2010)

13.3. Morfología de *Bacillus subtilis*

Entre las características más importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* están: forma bacilar, movilidad flagelar por flagelos insertados en forma peritrica, pueden llegar a medir de 0.5-2.5 a 1.2-10 μm , además son aerobias estrictas o facultativas, saprófitas, Gram positivas, catalasa positiva, quimiorganótrofas de metabolismo fermentativo o realizan una respiración aerobia (Holt *et al.*, 2000). También cumplen importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno, una cualidad adicional por la cual son muy estudiadas estas bacterias es que presentan una potencial capacidad para producir antibióticos, lo que puede servir como antifúngico, para proteger a plantas de enfermedades producidas por hongos (Castillo *et al.*, 2004).

13.4. Biología de *Bacillus subtilis*

Debido a sus características, *B. subtilis*, microorganismo cuyo hábitat natural es el suelo, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, entre sus principales características se encuentra su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55°C), presentar motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl), producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares (Nakamura *et al.*, 1999).

En base a su capacidad para crecer en presencia o ausencia de oxígeno, los organismos se dividen en tres grupos (Schmitz *et al.*, 1999): a) aerobios que pueden utilizar otros aceptores finales de electrones diferentes al oxígeno, tales como el nitrato y el nitrito, entre otros. El transporte de electrones desde NADH hasta estos aceptores esta acoplado a la fosforilación de ADP; b) facultativos; y c) anaerobios estrictos.

13.5. Ecología de *Bacillus subtilis*

Es una bacteria Gram positiva, produce endospora las que son termorresistentes y también resisten factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos lo que permite que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones, producen antibióticos como la bacitricina, polimixina, gramicidina y circulina, fermentan la caseína y el almidón, vive dentro de los límites de 55 a 70°C. Es un gran controlador biológico, *B. subtilis* promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfsii*, (Atheliaceae) *Fusarium* spp., (Nectriaceae) *Verticillium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotiniaceae) *Phytophthora capsici* (Pythiaceae) *Pythium* spp. (Pythiaceae), *Rhizoctonia solani* (Ceratobasidiaceae) y el nematodo agallador de raíces *Meloidogyne* spp. (Heteroderidae) (Cuervo, 2010).

13.6. Mecanismos de acción de *Bacillus subtilis*

Una gran diversidad de especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagonica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, tales como maíz, arroz, frutales, entre otros (Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). En la actualidad diversas especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) son ampliamente estudiadas

para mitigar la incidencia de enfermedades de importancia agrícola (Raaijmakers y Mazzola, 2012).

Entre las principales vías por las cuales estas cepas evitan el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos es a través de diferentes mecanismos, que incluyen la excreción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas e inducen la resistencia sistémica de la planta (IRS) (Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

a) Producción de lipopéptidos

Una de las características más importantes del género *Bacillus* es su capacidad de producir una gran variedad de antibióticos con capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, entre éstos, los lipopéptidos cíclicos no ribosomales han sido los más estudiados. Los lipopéptidos (LPs), estructuralmente consisten en un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso β -hidroxi o β -amino, clasificándose en 3 diferentes familias (Iturinas, Fengicinas y Surfactinas), de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud del ácido graso (Ongena y Jaques, 2008; Falardeau *et al.*, 2013). Estas moléculas son sintetizadas por complejos multi-enzimáticos, conocidos como sintetisas de péptidos no ribosomales (NRPS del inglés, nonribosomal peptide synthetase), las cuales son independientes del ARN mensajero (Chowdhury *et al.*, 2015). Las familias de las Iturinas, Fengicinas y Surfactinas, han sido ampliamente estudiadas por su actividad antibacteriana y antifúngica (Meena y Kanwar, 2015). La actividad antimicrobiana de estos LPs tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos (Aranda *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se ha reportado que algunos lipopéptidos pueden tener múltiples mecanismos de acción, alterando

procesos celulares como homeostasis intracelular de calcio, metabolismo energético y procesamiento del ARN (Zhang *et al.*, 2016).

El papel de los LPs se ha evidenciado en la inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos, así como la Identificación de múltiples isoformas de lipopéptidos en extractos generados a partir de cultivos líquidos de *B. subtilis* (Touré *et al.*, 2004). No obstante, los lipopéptidos no son los únicos metabolitos del antibioma del género *Bacillus* involucrados en el control biológico de fitopatógenos, éstos han sido propuestos como los metabolitos más eficientes para esta actividad biológica debido a su papel ecológico y capacidad antimicrobiana, por lo cual se han utilizado para la búsqueda y selección de agentes de control biológico promisorios de este género (Cawoy *et al.*, 2015).

b) Producción de enzimas líticas

La producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de agentes fitopatógenos es uno de los mecanismos de control biológico más reportados, especialmente contra patógenos de origen fúngico. La pared celular de hongos está conformada por glicoproteínas, polisacáridos y otros componentes que varían según la especie. La fracción de polisacáridos puede comprender hasta un 80% de la pared celular de hongos, encontrándose principalmente quitina (10-20%) y glucano (50-60%), los cuales están compuestos por residuos de beta-1,3-glucosa y beta-1,4-N-acetilglucosamina, respectivamente. Estos polímeros tienen un papel estructural determinante en la rigidez de la pared celular, mediante una red extensa de enlaces glucosídicos. Así, la interferencia en estos enlaces deteriora la pared celular de hongos fitopatógenos, lo que conduce a su lisis y muerte celular (Bowman y Free, 2006). La producción de enzimas líticas como quitinasas y β -glucanasas excretadas por los agentes de control biológico, que incluye el género *Bacillus*, han mostrado un efecto inhibitorio contra patógenos de origen fúngico (Compant *et al.*, 2005). Estas enzimas son responsables de la degradación de los principales

polisacáridos que conforma la pared celular de hongos, mediante la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos. Actualmente, existen diversos estudios científicos que reportan el papel de estas enzimas en la actividad antifúngica *in vitro* obtenidas de cepas del género *Bacillus* (Kishore *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010).

c) Producción de sideróforos

El hierro (Fe) es un nutriente esencial para importantes funciones celulares, tales como en las reacciones redox de las proteínas con cofactores (Fe-S), en la cadena de transporte de electrones, y en la función de catalizar reacciones enzimáticas vitales, como aquellas en las que se encuentra involucrado el hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003). El Fe es encontrado en la naturaleza mayormente en forma férrica (Fe^{3+}) de baja solubilidad, imposibilitando su uso por algunos seres vivos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). En respuesta a la restricción de hierro en el ambiente, algunos microorganismos han desarrollado diversas estructuras proteicas receptoras, de bajo peso molecular y con alta afinidad por el hierro, llamados sideróforos, facilitando la captación de Fe^{3+} (Thyagarajan *et al.*, 2017).

Los sideróforos son metabolitos secundarios que actúan como secuestrantes o quelantes de hierro, consecuencia de su elevada constante de disociación por este metal, oscilando entre 10^{22} y 10^{55} . Lo cual permite la formación de complejos Fe^{3+} -sideróforo, así los microorganismos productores de sideróforos, mediante un receptor específico localizado en la membrana, pueden utilizarlo por dos mecanismos: 1) directamente mediante el complejo Fe^{3+} -sideróforo a través de la membrana celular, o 2) reducido extracelularmente a complejos Fe^{2+} (Neilands, 1995). Los sideróforos en función de su principal grupo quelante se clasifican en: hidroxamatos (utilizando ácidos hidroxámicos), catecolatos (conteniendo anillos catecol), carboxilatos, fenolatos, y en combinación de dos o más de estos grupos (Wilson *et al.*, 2016).

Diversas especies del género *Bacillus* han sido reportadas por su capacidad para controlar enfermedades de plantas mediante la secreción de sideróforos, y así limita el crecimiento y colonización de microorganismos fitopatógenos dependientes del hierro (Fgaier y Eberl, 2011).

d) Respuesta sistémica inducida

Durante la historia evolutiva, las plantas han desarrollado mecanismos para defenderse de la invasión de organismos patógenos (bacterias, hongos, nematodos, insectos, etc.). Dichos mecanismos se encuentran latentes y son activados por estímulos durante la interacción con agentes patógenos, en términos generales estos mecanismos se conocen como resistencia sistémica adquirida y se caracteriza por activarse no solo en el sitio de la infección, sino de manera sistémica en otros tejidos y la resistencia sistémica adquirida es activada a través de estímulos percibidos principalmente por dos receptores, los receptores de reconocimiento de patrones y repetición rica en leucina que se une a nucleótidos (Pieterse *et al.*, 2014). El primero de éstos percibe componentes celulares como quitina fúngica o flagelinas desencadenando la primera línea de defensa, conocida como PTI (PAMP-triggered immunity), en patógenos con mecanismos para evadir a PTI, una segunda línea de defensa es activada, la cual percibe proteínas efectoras de virulencia mediante receptores NB-LRRs (Boller y Felix, 2009).

Bacillus produce una gran diversidad de moléculas elicitoras que inducen respuesta sistémica en plantas, incluyendo a lipopéptidos (Chowdhury *et al.*, 2015), fitohormonas (Ryu *et al.*, 2003) y compuestos volátiles (Kim *et al.*, 2015). Estos últimos activan genes PR (Pathogenesis related), los cuales protegen de la invasión de agentes patógenos, además de genes PR, *Bacillus* activa otros mecanismos de protección en plantas, los cuales incluyen cambios estructurales en la pared celular mediante la acumulación de lignina (Singh *et al.*, 2016) o la

producción de metabolitos secundarios como flavonoides, fitoalexinas, auxinas o glucosinolatos en general (Pretali *et al.*, 2016).

13.7. Importancia de *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos

El control biológico o el uso de microorganismos antagonistas como bacterias, hongos y levaduras ha surgido como una alternativa viable para el control de enfermedades en pre y postcosecha (Sharma *et al.*, 2009).

El potencial de *Bacillus* spp., para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana se ha utilizado en el control biológico de fitopatógenos. La formación de endosporas les otorga una alta viabilidad comparada con células vegetativas, ya que son resistentes a la desecación y al calor, pudiéndose formular fácilmente en productos estables (Wulff *et al.*, 2002). De los péptidos antifúngicos producidos por *Bacillus* podemos citar a micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas. Estos péptidos generalmente tienen un PM < 2000 Da, particularmente *B. subtilis* es una especie que produce diferentes metabolitos secundarios en la forma de lipopéptidos con buena actividad antifúngica, antibacteriana y frente a algunas levaduras; como consecuencia son de alto valor biotecnológico y farmacéutico (Volpon *et al.*, 2000). La aparición de resistencia contra péptidos antimicrobianos es menos probable que la resistencia a antibióticos convencionales (Oard *et al.*, 2004).

14. Generalidades del control mediante fungicidas químicos

Alrededor del 60% de los productos químicos utilizados actualmente son fungicidas. La palabra fungicida se deriva de los términos latinos “fungus”: hongo y “cidium”: que mata. En este sentido etimológico, fungicida es todo agente con habilidad para destruir organismos fungosos. El calor, los ácidos, la luz

ultravioleta, son agentes físicos fungicidas. Sin embargo, el término fungicida se refiere a los productos químicos usados en la prevención y en algunos casos en la erradicación o curación de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos (Ochoa, 2004). En este sentido estricto, es conveniente distinguir entre acción fungicida y acción fungistática. Se habla de la primera cuando la sustancia química produce la destrucción del organismo fungoso, es decir, ocasiona una acción irreversible. En cambio, cuando la actividad es reversible, produciendo un efecto inhibitorio temporal en la germinación de las esporas, se hace referencia a una acción fungistática (Ochoa, 2004).

En la actualidad se cuenta con un amplio espectro de compuestos fungicidas; estos pueden adaptarse en pequeñas parcelas o miles de hectáreas utilizando máquinas apropiadas para este fin (Ochoa, 2004).

Entre las características deseables en un fungicida se encuentran:

- Aspectos biológicos: Deben ofrecer el control de la enfermedad eficaz y consistente.
- No debe ser tóxico a la concentración recomendada. No debe afectar adversamente a otras partes del ecosistema del cultivo.
- Aspectos toxicológicos: residuos que queden en el cultivo no deben ser un problema para el consumidor.
- No debe construir un peligro durante la aplicación.
- Aspectos de la formulación: debe ser seguro al almacenarse y transportarse.
- El método de formulación debe aumentar su eficiencia como fungicida.
- Debe ser fácil de aplicar a la concentración precisa (Ochoa, 2004).

14.1. Tipos de fungicidas

Según su toxicidad

- Categoría I: toxicidad alta

Compuesto cuya DL50 va de 0.50mg del toxico por kg de peso. Estos productos son muy peligrosos, solo pueden manejarse bajo normas de seguridad muy estrictas y por personal preparado.

- Categoría II: toxicidad media

Compuestos cuya DL50 va de 50-500mg del toxico por kg de peso. Productos medianamente tóxicos y peligrosos que pueden manejarse bajo normas de seguridad.

- Categoría III: toxicidad baja o moderada

Se encuentran en ella productos con DL50 superior a 500mg del toxico de peso (Patiño y Rodríguez, 2001).

14.2. Clasificación de los fungicidas según su uso

En el caso de los fungicidas sistémicos, para poder determinar el modo de acción es necesario cuantificar una amplia gama de interacciones complejas que son difíciles de medir, ya que el producto necesita vencer algunos obstáculos para llegar su sitio de acción. Estos obstáculos que el producto tiene que pasar son:

- Cutícula de la planta
- Células subcuticulares
- Metabolismo de la planta hospedera
- Absorción dentro de la planta durante la translocación
- Membrana del patógeno
- Metabolismo que se desarrolla en el patógeno (Alfonso, 2008).

a) Contacto

La mayoría de los fungicidas se usan como protectante debido a que forman una barrera protectora en la planta. Los fungicidas de contacto actúan en sitios múltiples, ya que interfieren con los procesos metabólicos centrales de los hongos. Además, la mayoría de estos fungicidas afectan la producción de

energía o ATP, inhiben la respiración o desacoplan la fosforilación oxidativa (Patiño y Rodríguez, 2001).

b) Sistémicos

Interrumpen el desarrollo del agente causal de la enfermedad, después de la iniciativa de la infección. Comprende un grupo reducido de fungicidas, se usa con fines de protección sistémica, en la cual la sustancia química se introduce o absorbe en el sistema circulatorio de la planta actuando como una especie de vacuna (Patiño y Rodríguez, 2001).

14.3. Mecanismos de acción

La acción fungicida es usualmente expresada en uno de los efectos físicamente visibles: la inhibición de la germinación de esporas o la inhibición de crecimiento micelial. Muchos fungicidas previenen la germinación de esporas o matan la espora inmediatamente iniciado el proceso de germinación. Algunos de estos inhibidores químicos o fungicidas también retardan o detienen el crecimiento del hongo cuando se aplican después de que se ha desarrollado el estado de infección (Tabares, 2002).

Todos los fungicidas son inhibidores metabólicos; es decir, bloquean algunos procesos metabólicos vitales de la célula. Por consideración se ha clasificado a los diferentes mecanismos de acción dentro de tres amplios grupos:

- Interferencia con la división celular
- Inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo celular
- Interferencia con la función y síntesis de la pared celular de los hongos (Tabares, 2002).

14.4. Importancia del uso de productos químicos en el control de hongos fitopatógenos

Las enfermedades son comunes en las plantas, a menudo producen un impacto económico significativo en el rendimiento y calidad, lo que nos indica que el manejo de enfermedades es un componente esencial en la producción de la mayoría de los cultivos. En un sentido general, existen tres razones principales por las cuales se utilizan los fungicidas (McGrath, 2004).

(a) Para controlar a la enfermedad durante el establecimiento y desarrollo de un cultivo.

(b) Para incrementar la productividad de un cultivo y reducir sus daños. Los cultivos alimenticios enfermos pueden producir menos si sus hojas, necesarias para la fotosíntesis, son afectadas por una enfermedad. Los daños pueden afectar las partes comestibles del cultivo o, en el caso de cultivos ornamentales, pueden perder su vistosidad, en ambos casos se puede afectar el valor comercial del cultivo.

(c) Para mejorar el período de almacenamiento y la calidad de las plantas y los productos cosechados. Las pérdidas por enfermedades ocurren después de la cosecha, durante el almacenamiento. Los hongos a menudo echan a perder (hacen inutilizable) frutas, hortalizas, tubérculos y semillas almacenadas. Algunos hongos que infectan granos producen toxinas (micotoxinas) que producen trastornos severos e incluso la muerte de los seres humanos y animales que las consumen. Los fungicidas han sido utilizados para reducir la contaminación por micotoxinas en trigo afectado por la fusariosis de la espiga, pero la mayoría de los fungicidas desarrollados, no han sido suficientemente eficientes para ser utilizados en el manejo de micotoxinas asociadas con otras enfermedades (McGrath, 2004).

15. Ingredientes químicos en el control de hongos fitopatógenos

Algunos de estos compuestos químicos son tóxicos para la mayoría de los fitopatógenos (amplio espectro), mientras que otros pueden ser tóxicos para uno o varios de ellos. La mayoría de las sustancias químicas se usan para el control de las enfermedades de las partes aéreas de la planta; otras para el tratamiento del suelo; para el tratamiento de material de propagación; para el tratamiento de heridas; para desinfectar almacenes y, para proteger a los frutos, hortalizas y granos durante el transporte y almacenamiento (Achicanoy, 2001).

15.1. Azoxystrobin (Amistar®)

Inhíbe el proceso respiratorio de los hongos, es especialmente eficaz para impedir la germinación de esporas y el desarrollo inicial del patógeno. Además, la azoxistrobina posee actividad translaminar, otorgando una mejor eficacia en cultivos densos. Su efecto de contacto y prolongada residualidad, aseguran la protección de las hojas, retarda la senescencia y las mantiene verdes por más tiempo, lo que favorece el llenado de grano (Syngenta, 2018).

15.2. Propiedades fisicoquímicas de la formulación

- Estado Físico: Sólido (Gránulos)
- Flamabilidad: No inflamable
- Densidad: 0.54 g / cm³
- Solubilidad: En agua: Miscible

15.3. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las estrobilurinas se basa en la inhibición de la respiración, deteniéndose entre otras funciones básicas celulares las síntesis de proteínas, ARN y ADN, debido a una deficiencia en ATP. La diana de las

estrobilurinas se localiza en el complejo mitocondrial citocromo bc1 (complejo III), concretamente se unen al citocromo b de este complejo, cerca del centro Qo y de la ferrosulfoproteína de Rieske, de ahí que estos compuestos también se conozcan con el nombre de inhibidores Qo (QoI). Las estrobilurinas actúan bloqueando la transferencia de electrones entre el citocromo b y el citocromo c, y por tanto interrumpiendo el flujo de electrones hacia el complejo terminal del citocromo c oxidasa, lo que a su vez destruye la fuerza protón-motriz generada por ambos complejos. Todo ello se traduce en la reducción de la producción de ATP. Además, el bloqueo de la respiración genera electrones en estado de alta energía que provoca una rápida aparición de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, que hacen que las estrobilurinas tengan actividad fungicida (Pérez *et al.*, 2005).

15.4. Modo de penetración

- Azoxystrobin tiene propiedades sistémicas y traslaminares
- Es muy bien absorbido y redistribuido dentro de la planta
- Una gran cantidad del producto es tomado por la planta lo cual asegura que el ingrediente activo que permanece sobre la hoja prevenga la infección al afectar las esporas de los hongos.
- Se difunde a través de la hoja hasta alcanzar los tejidos vasculares para posteriormente moverse acropetalmente por transpiración.
- El resultado es una distribución uniforme del azoxystrobin dentro de la hoja, dando una excelente protección (Syngenta, 2018).

16. Clorotalonil (Trevanil 720F)

Trevanil 720 FW, es un fungicida preventivo de contacto, que actúa esencialmente en la protección de las plantas contra las infecciones de los hongos fitopatógenos. Por consiguiente, el fungicida debe estar presente en las plantas antes del inicio de la infección. Los síntomas generales de su acción

sobre las células de los hongos son el retraso del crecimiento del micelio y la inhibición de la germinación de las esporas. Se considera que el clorotalonil actúa como un fungitóxico no específico (Gowan, 2018).

16.1. Propiedades físicas y químicas de la formulación

Sólido cristalino de color blanco, sin olor. Su punto de ebullición es igual a 350 °C a 760 mm Hg y su punto de fusión a 250 °C; su densidad relativa es igual a 1.7 a 25°C. Su solubilidad en agua es igual a 0.6 mg/kg a 25 °C. Es ligeramente soluble en disolventes orgánicos. Su presión de vapor es menor a 0.01 mm Hg a 40°C (Gowan, 2018).

16.2. Mecanismo de acción

Clorotalonil protege la planta contra el proceso de infección del hongo. Para ello, el fungicida debe estar presente en la parte de la planta donde se dé la infección antes de que ésta tenga lugar. La prevención de la infección es el resultado de la interacción entre el clorotalonil y las células fúngicas como resultado de una pérdida de viabilidad de las mismas. El producto inhibe la respiración de las células del hongo, debido a que las moléculas del clorotalonil se unen a grupos sulfhidrilo de los aminoácidos. Las enzimas que afectan al ciclo de Krebs se desactivan y no se produce ATP. Al no poder completar este proceso esencial, la célula muere. Se considera que clorotalonil actúa como un fungitóxico general, no específico. Se caracteriza por ser de acción rápida, acumulándose grandes cantidades en las células del hongo y reaccionando indiscriminadamente con los componentes celulares. Los síntomas generales de la interacción entre el clorotalonil y las células fúngicas son el retraso en el crecimiento del micelio y la inhibición de la germinación de las esporas (Arysta, 2017).

16.3. Modo de penetración

Trevanil 720 FW, es un fungicida multisitio, inhibe la respiración de las células del hongo debido a que las moléculas del clorotalonil se unen a grupos sulfhidrilo de los aminoácidos. Las enzimas que afectan al ciclo de Krebs se desactivan y no se produce ATP. Al no poder completar este proceso esencial, la célula muere (Gowan, 2018).

17. Tiabendazol (Tecto® 60)

Tecto® 60 es un fungicida sistémico de amplio espectro que puede ser utilizado para tratamientos preventivos y/o curativos. Puede aplicarse como aspersión foliar antes de la cosecha o en tratamientos postcosecha (Syngenta, 2018).

17.1. Propiedades físicas y químicas de la formulación

Tiene una apariencia de polvo blanco, sin olor, la presión de vapor es de 4×10^{-9} mm Hg a 25°C, como característica radiactiva, es estable bajo condiciones normales de almacenaje (Syngenta, 2018).

17.2. Mecanismo de acción

El Tiabendazol detiene la división nuclear interfiere en el ensamblaje de microtúbulos al unirse a proteínas de β -tubulina. La tubulina (microtúbulos-cytosqueleto), es una molécula importante en la formación y segregación de cromosomas en la división celular; la alteración de esta afecta la mitosis a nivel de la metafase (El huso acromático es distorsionado y la separación del núcleo es suspendida, causando la muerte de la célula fungosa) (Román, 2014).

17.3. Modo de penetración

Acción sistémica y de contacto, a concentraciones bajas, los benzimidazoles, inhiben la elongación del micelio y a altas actúan sobre la germinación de las esporas. Aunque hace tiempo se conoce que los derivados de benzimidazol interfieren en la mitosis de los hongos, su acción real debida al efecto sobre los microtúbulos, se ha interpretado hace relativamente poco tiempo. La inhibición de la formación de microtúbulos trae, como consecuencia, la ausencia de división celular, lo que produce además una desorganización citoplasmática de tipo general (Danaher *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

18. Localización de las parcelas de cacao.

La recolección y muestreos de frutos de cacao con pudrición se llevaron a cabo durante los años 2014-2016 en localidades del Estado de Chiapas. Durante el primer año se recolectó en una parcela “sin nombre” en cacao cultivado con la variedad criollo, en el municipio de Villa de Comaltitlán. Además se recolectó durante los tres años en la parcela de cacao denominada “La Flor”, propiedad de Sr. Jorge Hernández Zunum; cultivada con la variedad criollo-trinitario en una superficie de 40,000 m², con 25 años de establecida y bajo condición de manejo cultural. Esta parcela localizada en el ejido Adolfo Ruiz Cortines de la comunidad de Costa Rica, perteneciente al municipio de Mapastepec, situada entre los 15° 28.131` LN y 92° 49.38` LO, con una elevación de 294 msnm y temperaturas que oscilan entre los 27.6 y 32.2 ° C (situada en la región del Soconusco, entre los municipios de Villa de Comaltitlán, Mapastepec y Tapachula) y en la parcela denominada “La Playa”, propiedad de Teresita de Jesús López Osorio; cultivada con la variedad criollo-trinitario en una superficie de 10,000 m², con 40 años de establecida y bajo condición de manejo cultural. Esta parcela se encuentra localizada en la comunidad de La playa, perteneciente al municipio de Mapastepec en el estado de Chiapas, situada entre los 15° 25.14` LN y 101° 52.2651` LO, con una elevación de 21 msnm y temperaturas que oscilan entre los 30.5 y 31.8 °C (situada en la región del Soconusco, entre los municipios de Villa de Comaltitlán, Mapastepec y Tapachula).

18.1. Material biológico.

Se recolectaron 100 frutos (mazorcas) de 15-20 cm de longitud en cinco puntos en cada parcela del cultivo de cacao, con signos típicos de pudrición (puntos aceitosos, decoloración o manchas cafés, maduración irregular o en forma de protuberancia o giba, necrosis con y sin esporulación en forma de polvo fino y

esporas maduras). El material biológico recolectado se colocó en bolsas de polietileno transparente estériles con cierre hermético tipo “ziploc”, contenido en hieleras de poliestireno expandido y trasladado al laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila.

18.2. Incidencia y severidad de pudrición en campo.

Esta evaluación se llevó a cabo en las parcela de cacao denominadas “La Flor” y “La Playa”, realizando dos muestreos; uno el 28 de diciembre 2014 y otro el 20 de julio 2015. Para esta actividad se evaluó el número de mazorcas infectadas por pudrición; se realizó un muestreo en zigzag sobre la parcela, donde se tomó un total de 25 árboles (muestras), dentro de los cuales; en cada uno, se evaluaron 4 frutos (submuestras) correspondiendo a los 4 puntos cardinales, a una altura del árbol de 1-1.5 metros, para un total de 100 submuestras.

Evaluación. La evaluación de la severidad se realizó mediante la escala sintomatológica externa para pudrición por moniliasis en cacao (Sánchez, 1982; Phillips-Mora *et al.*, 2005) (Cuadro 13) y se calculó la incidencia, entendida como el número de frutos que mostraron síntomas de la enfermedad (%).

Cuadro 13. Escala sintomatológica externa para pudrición por moniliasis en cacao.

Escala	Daño (%)	Sintomatología
0	0	Ningún síntoma aparente, fruto sano
1	1-20	Pequeños y pocos puntos aceitosos
2	21-40	Puntos aceitosos bien definidos y abundantes, mas maduración o madurez irregular
3	41-60	Necrosis sin esporulación
4	61-80	Necrosis más esporulación en un área menor de la cuarta parte de la superficie necrótica
5	81-100	Necrosis más esporulación en un área mayor de la cuarta parte de la superficie necrótica

18.3. Análisis de datos.

Los datos de incidencia y severidad se transformaron por raíz cuadrada de arcoseno y se analizaron entre años en la misma parcela y entre parcelas dentro del mismo año y sometieron a un ANVA y la comparación de medias con una prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$), utilizando el software SAS/STAT (SAS Institute, 2002).

18.4. Aislamiento y purificación de hongos.

El tejido vegetal enfermo se procesó en el Laboratorio de Fitopatología. El aislamiento de hongos para la obtención de colonias puras, se llevó a cabo por dos vías; la primera consistió en tomar esporas directamente del tejido dañado del fruto, utilizando una aguja de disección estéril y sembrarlas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (Bioxon®) y la segunda vía consistió en seccionar tejido vegetal enfermo con un bisturí, tanto del exterior del fruto (cascara), como de la parte interior (pulpa) y de la semilla del mismo; los cuales se desinfectaron con un triple lavado con hipoclorito al 3%, agua destilada estéril (dH_2O), alcohol al 70% y dH_2O y sembrarlo en medio de cultivo PDA. En ambas vías de aislamiento, se incubó a 27 ± 2 °C en una cámara de crecimiento (Binder®) y a partir de los distintos crecimientos; estos se separaron para su purificación e identificación.

18.5. Identificación morfológica.

La identificación morfológica se realizó mediante montas de estructuras del micelio y sus respectivas conidias y esporas en porta y cubreobjetos, con una solución de lactofenol y azul de algodón. Su observación se llevó a cabo a 40 y 100X en microscopio compuesto y se apoyó de las claves taxonómicas para géneros de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1998).

18.6. Identificación morfométrica y molecular.

Estas actividades se realizaron solo para el hongo *Nodulosporium* sp. (= *Nodulisporium*) Preuss (Xylariaceae), debido a la poca información y su reducida presencia en cultivos de importancia. La morfométrica se realizó a partir de las montas en porta y cubreobjetos de las estructuras del micelio (conidios, hifas, esporas, septos y ramificaciones) en microscopio digital con cámara integrada (AM4023X) y con apoyo del software de medición DinoCapture 2.0.

La identificación molecular se realizó mediante la extracción y evaluación de ADN del hongo, siguiendo el método de CTAB (Almeyda *et al.* 2001) y posteriormente el método de PCR, utilizando los iniciadores universales ITS4 (5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3´) e ITS5 (5´-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3´) (White *et al.*, 1990). La amplificación y visualización del producto de PCR se realizó con base en el protocolo de Ahrens y Seemüller (1992), con modificaciones en las reacciones de PCR y cuyo volumen fue de 25 µL [agua ultrapura estéril: 11.9 µL, Buffer 10X (2.5 µL) dNTPs a 10 mM (0.4 µL), iniciadores ITS4 e ITS5 a 5 mM (3 µL de cada uno), ADN polimerasa (Green Taq DNA Polimerase, GenScript®) a 1U (0.2 µL) y muestra problema de ADN a 96.7 ng (4 µL)]. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, alineamiento a 57 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 45 segundos y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 minutos. El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de PCR se purificó con el kit de bandas *In vitro* gen (QuickClean II Gel Extraction Kit [100rxns], GenScript®) y el producto purificado se envió para su secuenciación en dos direcciones (5´ a 3´ y 3´ a 5´) al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT) y el resultado obtenido se comparó con las secuencias en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2018), mediante el algoritmo BLAST.

18.7. Pruebas de Patogenicidad de *Nodulosporium* sp.

Para esta prueba se realizó una suspensión de esporas. La fuente de inóculo se obtuvo a partir de esporas del medio PDA, obtenidas con una varilla de vidrio de estéril y se colocaron en un tubo de ensayo de 10 mL diluidos en agua destilada estéril. El conteo se realizó en cámara de Newbauer para determinar la concentración de esporas en la suspensión (1×10^8 esporas/mL).

Para las pruebas de patogenicidad se recolectaron frutos de 15-20 cm presuntamente sanos y follaje sano y libre de heridas. La inoculación en frutos se realizó por punción, con aguja de disección colonizada con esporas del hongo *Nodulosporium* cultivado en medio PDA, colocando el inóculo en la parte distal (punta) del fruto. En esta prueba se utilizaron 10 frutos y se realizaron cuatro replicas, colocadas sobre papel estroza estéril durante el estudio.

La inoculación en follaje se realizó con la técnica de hoja desprendida (Pettitt *et al.* 2011) sobre una charola plástica de 25 cm, con una suspensión de 1×10^8 esporas/mL, colocando esta suspensión sobre la superficie adaxial (haz) en un total de 10 hojas, replicado tres veces. En ambas pruebas se consideró un testigo absoluto en el que solo se aplicó agua destilada estéril siguiendo la misma metodología.

Ambas pruebas se desarrollaron bajo condiciones controladas a una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de $70 \pm 5\%$ y 12:12 luz: oscuridad. Además, la prueba con follaje se hidrató con una pequeña torunda de algodón saturada de agua estéril y reponiendo esta humedad cuando fue necesario. Cuando aparecieron síntomas en el tejido inoculado, se re-aisló el patógeno en medio de cultivo PDA y se identificó nuevamente.

19. Pruebas de control *in vitro* con microorganismos y productos químicos sobre *Nodulosporium* sp.

19.1. Microorganismos de control biológico.

Los agentes de control biológico *Trichoderma harzianum* Rifai (Hypocreaceae) y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. (Bacillaceae) se obtuvieron del cepario del Departamento de Parasitología de la UAAAN. El hongo *T. harzianum* fue corroborado con claves taxonómicas para géneros de Barnett y Hunter (1998) y para la especie, las claves de Schaad y manual de Kreieg *B. subtilis* mediante pruebas bioquímicas (Schaad *et al.*, 2001, Kreieg *et al.*, 2010)).

19.2. Re-Activación de los agentes de control biológico.

Explantos (discos de 5 mm de medio de cultivo con el microorganismo) de *T. harzianum* y *B. subtilis* fueron limpiados con un triple lavado de dH₂O y sembrados en medio de cultivo PDA en caja de Petri e incubados a 28 ± 2 °C en una cámara de crecimiento BD 115 L (Binder®) hasta el llenado de las cajas para el incremento de *B. subtilis* y *T. harzianum* respectivamente.

19.3. Efecto antagónico *in vitro* con microorganismos sobre *Nodulosporium* sp.

La capacidad antagónica de *T. harzianum* y *B. subtilis*, se llevó a cabo usando la técnica de cultivo dual en medio PDA (cajas de Petri 90 x 15 mm). Para la confrontación con *T. harzianum*, se colocó un explante (disco con micelio) de 5 mm y otro explante del mismo tamaño de *Nodulosporium* sp., opuestos en el interior de la caja de Petri. Para la confrontación con *B. subtilis*, se colocaron cuatro explantes (disco con la bacteria) de 5 mm en los cuatro puntos cardinales de la caja de Petri y un explante de *Nodulosporium* sp., al centro del mismo tamaño. En ambos casos se realizaron siete repeticiones, se consideró como

unidad experimental una caja de Petri, de igual manera se consideraron siete repeticiones testigo del fitopatógeno y de los antagonistas, crecidos por separado. Las cajas de Petri inoculadas y testigos, se incubaron a una temperatura de 28 ± 2 °C en una cámara de crecimiento BD 115 L (Binder®). El crecimiento radial del hongo fitopatógeno y el antagonista en confrontación se midió con apoyo de un calibrador (vernier) con compuesto digital (Titan®) en dirección uno a al otro cada 24 horas, hasta el llenado del testigo (7 días).

19.4. Evaluación.

Se evaluó por observación el tiempo en el que el antagonista-fitopatógeno entraron en contacto y se calculó el porcentaje de crecimiento radial y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) empleando la fórmula de Suarez *et al.* (2008): $PICR = (R1-R2)/R1*100$.

Donde:

R1 es el radio mayor (radio del fitopatógeno testigo)

R2 es el radio menor (radio del fitopatógeno en enfrentamiento con el antagonista).

Se determinó el tipo de antagonismo para *T. harzianum* con base en la escala de clases del grado de antagonismo de 1-5, denominada escala de Bell (Bell *et al.*, 1982).

Donde:

Clase 1= Antagonista cubre (sobrecubre) al patógeno y llena por completo la superficie del medio de cultivo;

Clase 2= Antagonista cubre al menos dos tercios de la superficie del medio;

Clase 3= Antagonista y el patógeno, cada uno colonizan aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo (más de un tercio y menos de dos tercios) y ningún organismo parece dominar al otro;

Clase 4= El patógeno coloniza al menos dos tercios de la superficie del medio y parece resistir la invasión del antagonista; y la

Clase 5= El patógeno cubre completamente al antagonista y llena por completo la superficie del medio de cultivo.

19.5. Análisis de Datos.

Para el crecimiento de los antagonistas y del fitopatógeno testigos y en cultivo dual se realizó un análisis de varianza (ANVA) y comparación de medias con una prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$); se utilizó el software SAS/STAT (SAS Institute, 2002).

19.6. Fungicidas químicos.

Los productos químicos bajo estudio fueron azoxystrobin (Amistar®), clorotalonil (Trevanil 720F) y tiabendazol (Tecto® 60), obtenidos por la vía comercial.

19.7. Efecto inhibitorio *in vitro* con fungicidas químicos sobre *Nodulosporium* sp.

De los ingredientes activos de los fungicidas comerciales azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol, se prepararon en agua destilada concentraciones madre de 4000, 1500 y 100 ppm respectivamente y se derivaron en 8 concentraciones menores en cada uno (Cuadro 14), además se incluyó un tratamiento testigo sin fungicida (0 ppm) y cada concentración por cada tratamiento, se repitió 10 veces.

Cuadro 14. Tratamientos para evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Nodulosporium* sp., con fungicidas comerciales.

Ing. Activo	Nombre comercial	Grupo Toxicológico	Concentraciones (ppm)
Agua destilada	Testigo	No aplica	0
Azoxystrobin	Amistar®	Estrobilurina	1000, 1350, 1650, 1950, 2600, 3000, 3200, 3800
Clorotalonil	Trevanil 720F	Ftalonitrilo aromático policlorado	100, 200, 350, 450, 650, 850, 950, 1000
Tiabendazol	Tecto® 60	Benzimidazol	0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60

La preparación de los medios PDA (Cajas de Petri 90 x 15 mm) se realizaron en matraz de Erlenmeyer y se esterilizaron en una olla de presión (Presto Modelo 79291, capacidad 21 L.) por 15 minutos a 15 libras a 121°C y se dejaron enfriar a 50°C (10-15 min) sin llegar a la solidificación y posteriormente se le añadieron las concentraciones correspondientes de cada tratamiento fungicida. Cada concentración fue extendida en las cajas de Petri, sobre las cuales se colocó en el centro un explante de 5 mm de *Nodulosporium* sp. Las cajas de Petri, se incubaron a una temperatura de 28 ± 2 °C por 7 días en una cámara de crecimiento BD 115 L (Binder®).

19.8. Evaluación.

La evaluación consistió en medir el crecimiento micelial, en dos ejes (horizontal y vertical) del fitopatógeno, cada 24 horas, hasta el llenado del testigo (7 días), utilizando como apoyo un calibrador (vernier) con compuesto digital (Titan®). Con los datos obtenidos en la evaluación se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula de Abbott (1925), tomando como 100% el crecimiento micelial del testigo (0 ppm).

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Crecimiento testigo} - \text{Crecimiento concentración}}{\text{Crecimiento testigo}} * 100$$

Con el porcentaje de inhibición micelial se realizó un análisis Probit de máxima verosimilitud y se determinó los valores de la concentración inhibitoria al 50 y 90% (CI₅₀ y CI₉₀) y sus límites fiduciales al 95% de confiabilidad.

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento micelial, se realizó un análisis de varianza (ANVA) y comparación de medias de los tratamientos con una prueba de rango múltiple de Tukey (P<0.05), utilizando el software SAS/STAT (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSION

20. Muestreo de la pudrición de fruto de cacao en campo

Se llevó a cabo el sub-muestreo de cuatro frutos de cacao por cada árbol, para un total de 100 frutos en cada parcela por año. En la parcela La Flor se muestrearon frutos de 16.66 y 11.05 cm de largo y 17.48 y 15.51 cm de diámetro ecuatorial en promedio en 2014 y 2015 respectivamente. En la parcela La Playa los frutos muestreados en promedio variaron de 10.82 y 14.58 cm de largo y 10.62 y 17.89 cm de diámetro ecuatorial en 2014 y 2015 respectivamente.

El porcentaje de frutos afectados y el grado de severidad de la enfermedad fue mayor durante el año 2014 en ambas parcelas de producción de cacao, en comparación al 2015 (Cuadro 15) con diferencias significativas entre los años de producción (La Flor. Incidencia: $g/1,24$; $F=20.68$; $p=0.0001$. Severidad: $g/1,24$; $F=25.94$; $p=0.0001$) (La Playa. Incidencia: $g/1,24$; $F=12.07$; $p=0.0020$. Severidad: $g/1,24$; $F=23.70$; $p=0.0001$), lo que indica que esta diferencia está influenciada por la precipitación, la cual fue mayor durante el año 2014 (Cuadro 16).

Cuadro 15. Incidencia y severidad de pudrición de fruto de cacao en dos localidades de la región Soconusco, en el estado de Chiapas.

Localidad	Incidencia (%) ¹		Severidad ²	
	2014	2015	2014	2015
La Flor	65.4 a	27.6 b	3.46 a	1.13 b
La Playa	54.6 a	25.2 b	3.01 a	0.96 b

¹Datos transformados por arcoseno. ²Media escala sintomatológica. Comparación de medias de la misma localidad entre los dos años con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey; $p < 0.05$).

Cuadro 16. Precipitación (cm³) mensual y media anual de los años 2014 y 2015 en la región Soconusco, en el estado de Chiapas.

Mes	2014	2015
Enero	0	0
Febrero	22.5	0
Marzo	5	43.5
Abril	100.5	89.5
Mayo	460	184
Junio	554	284.5
Julio	427	324
Agosto	539.5	248
Septiembre	698	452
Octubre	493	323.5
Noviembre	16.5	159
Diciembre	0	0
Media anual	276.33	175.66

Fuente: CONAGUA, 2015

Con base en la incidencia y severidad en ambos años de evaluación, se puede apreciar que la comparación entre ambas localidades durante el mismo año no presentan diferencia significativas, aunque estas se encuentran a dos alturas diferentes (Incidencia. 2014: $g/1,24$; $F=1.93$ $p=0.1774$. 2015: $g/1,24$; $F=0.15$; $p=0.7005$) (Severidad. 2014: $g/1,24$; $F=1.05$; $p=0.3163$. 2015: $g/1,24$; $F=0.29$; $p=0.5983$), lo que indica que la altura no influye en la incidencia y severidad de la enfermedad (Cuadro 17).

Cuadro 17. Incidencia y severidad de pudrición de fruto de cacao en dos localidades de la región Soconusco, Chiapas relacionado desde el punto de vista de la altura sobre el nivel del mar.

Localidad	Incidencia (%)¹		Severidad²	
	2014	2015	2014	2015
La Flor³	65.4 a	27.6 a	3.46 a	1.13 a
La Playa⁴	54.6 a	25.2 a	3.01 a	0.96 a

¹Datos transformados por arcoseno. ²Media escala sintomatológica, ³Altura 294 msnm, ⁴Altura 21 msnm. Comparación de medias entre localidades en el mismo año con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey; $p < 0.05$).

De acuerdo a los trabajos de Evans (1986), Phillips-Mora (2003), Phillips-Mora *et al.* (2005), Phillips-Mora *et al.* (2006a), Phillips-Mora *et al.* (2006b) y López-Báez *et al.* (2015) atribuyen a *M. roreri* como agente causal de la pudrición de mazorca o moniliasis del cacao, provocando en la mayoría de los establecimientos la pérdida total de la producción de cacao para la zona de Suramérica y México, no obstante; en la presente investigación para la región de la zona del Soconusco, Chiapas este fitopatógeno no fue localizado para esta área cacaotera.

López-Báez *et al.* (2015) mencionan que *M. roreri* en la región Costa-Soconusco de Chiapas, México alcanza una alta incidencia debido a su capacidad de infectar todos los estados de desarrollo de los frutos, mostrando deformación, manchas y estroma esporulante, decoloración de tejido con daños de 80 a 100%.

Cuervo-Parra *et al.* (2014) concuerda con los anteriores, y mencionan que además de *M. roreri*, *Phytophthora megasperma*, *Aspergillus niger*, *Cochliobolus lunatus*, *Cochliobolus hawaiiensis*, *Neurospora crassa*, *Fusarium coeruleum*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Phytophthora capsici*, *Corynespora cassiicola*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris tetramera*, *Byssochlamys nivea* y *Byssochlamys spectabilis* son los fitopatógenos causantes de la pudrición en mazorcas de cacao.

Hernández-Gómez *et al.* (2015) mencionan que en la evaluación realizada en parte de la región Soconusco (Cacahoatán, Huehuetán, Tapachula, Tuxtla Chico, Tuzantán, Ostuacán, Pichucalco e Ixtacomitán y Tapachula) identifican que las principales enfermedades, *M. roreri* y *P. capsici* están asociadas a una serie de hongos alternos como: *Fusarium sp.*, *C. gloeosporioides*, *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht & T.C. Harr. Considerando a *M. roreri* como el principal factor que afecta la supervivencia del cacao y su biodiversidad en Chiapas. Esta

enfermedad destruye la producción, ocasionando que su control no sea rentable e induce a los agricultores a abandonar sus huertas.

En acuerdo a los trabajos de Cuervo-Parra *et al.* (2014) y Hernández-Gómez *et al.* (2015) se coincide en la presencia de diferentes hongos asociados a la pudrición de la mazorca como: *Aspegillus sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Verticillium sp.*, solo difiriendo en la presencia de *Lasiodiplodia theobromae* y *Nodulosporium sp.*

20.1. Identificación morfológica de la micofauna asociada a frutos de cacao

En medio de cultivo PDA se obtuvieron diversos hongos aislados de las esporas del tejido dañado del fruto y tejido vegetal enfermo con síntomas de pudrición, los cuales fueron purificados e identificados. Durante el 2014 en la parcela de Villa de Comaltitlán, se encontró *Aspergillus sp. Micheli* (Trichocomaceae), *Penicillium sp. Link* (Trichocomaceae), *Rhizopus sp. Ehrenb* (Mucoraceae), *Trichoderma sp. Persoon* (Hypocreaceae) con una incidencia de 85% en los diferentes aislados y *Nodulosporium sp. (=Nodulisporium) Preuss* (Xylariaceae) con el 15% de incidencia en los aislados. Durante 2014 y 2015 en las parcela, La Flor, ubicada en la comunidad de Costa Rica y La playa, de la localidad del mismo nombre, se aislaron *Aspergillus sp.*, *Colletotrichum sp. Corda* (Glomerelaceae), *Fusarium sp. Link ex Grey* (Tuberculariceae), *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (Botryosphaeriaceae), *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Verticillium sp. Nees* (Hypocreaceae) y dos hongos no reconocidos con una incidencia del 100% en todos los frutos revisados.

Se destaca la ausencia de los hongos, *M. rozeri*; el cual es considerado como el agente causal de la pudrición de mazorca o moniliasis y del alga *Phytophthora palmivora* agente causal de la mancha negra; importantes en diversas regiones productoras de cacao (Phillips-Mora *et al.*, 2006; Phillips-Mora *et al.*, 2007).

20.2. Identificación morfológica, morfométrica y molecular del hongo *Nodulosporium* sp.

En este estudio se registra por primera ocasión la presencia del hongo *Nodulosporium* en frutos del cultivo de cacao en Chiapas, México, obtenido en 2014 en cacao cultivado con la variedad criollo, en el municipio de Villa de Comaltitlán. En México, el género *Nodulosporium* se ha encontrado en mezquite (*Prosopis laevigata* L.) (Fabaceae) en el estado de Puebla (De la Torre-Almaráz *et al.*, 2009), en el cáliz de Flor de Jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) en el estado de Guerrero (Ruiz-Ramírez *et al.* 2015) y en cacahuananche *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex. Walp. (Fabaceae) en el estado de Morelos (Sánchez-Fernández, 2016). En el cultivo de cacao, el género *Nodulosporium* ha sido mencionado por Márquez-Dávila *et al.* (2013), aislado de hojas y tallos de cacao nativo en cuencas del alto amazonas de Perú.

Este hongo en medio PDA presentó un rápido crecimiento, con un llenado de la caja de Petri (9 cm diámetro) en 7 días, desarrollando una colonia micelial de color blanquecino y de aspecto algodonoso al principio, 5 días después de la siembra se presentó la maduración de conidios, tornándose de color beige (similar a lo observado en el tejido enfermo), para posteriormente al séptimo día, las colonias maduras de conidios adquirieron una coloración café-oscuro (Fig. 2).

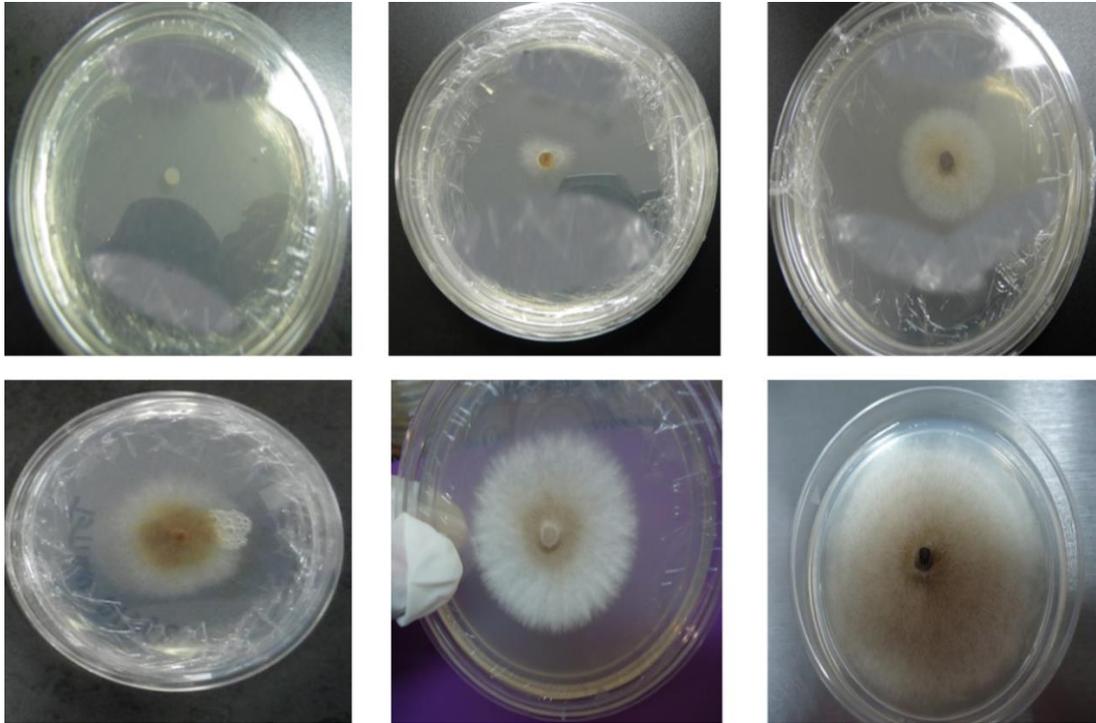


Figura. 2. Crecimiento radial de *Nodulosporium* sp., en caja de Petri durante 7 días.

Presenta hifas poco septadas de color café claro, que en combinación con el lactofenol y azul de algodón se tiñen de color azul claro al centro, conidioesporas en el conidióforo de forma sarcinada, hialinas alimonadas, que en combinación con el lactofenol tomaron un color verde claro. La pared o membrana de la espore ligeramente amarilla (Fig. 3). Además de presentar un olor característico a musgo.

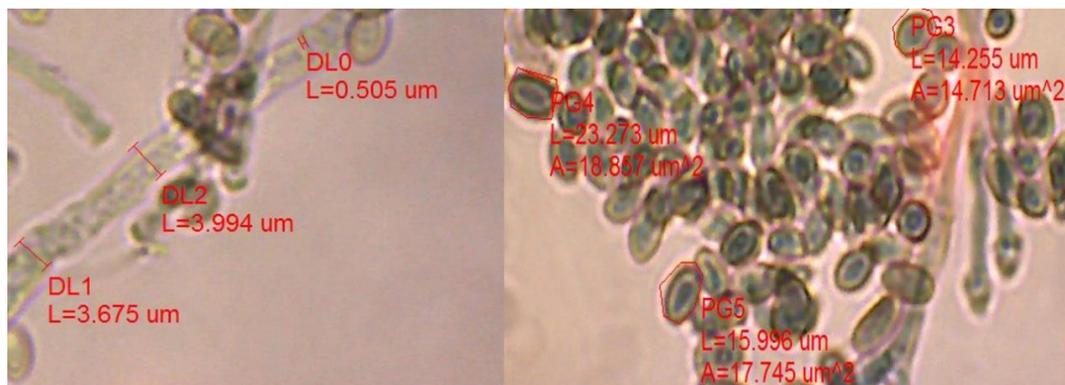


Figura. 3. Detalle de hifas y esporas de *Nodulosporium* sp., a 40X.

La observación al microscopio digital permitió observar las estructuras del micelio, con un tamaño (L= Longitud) de conidios de 117.189-117.589 μm , grosor de hifas que va de 3.675-3.994 μm , grosor de septos de 0.505 μm , largo de ramificaciones de 34.797-75.848 μm , grosor de ramificaciones de 3.194-3.761 μm , esporas de 13.415-23.273 μm en forma poligonal (la periferia) y un área de 12.816-21.666 μm^2 (A= Área) y un grosor de la membrana de la espora de 1.197-1.249 μm (Fig. 3 y 4).

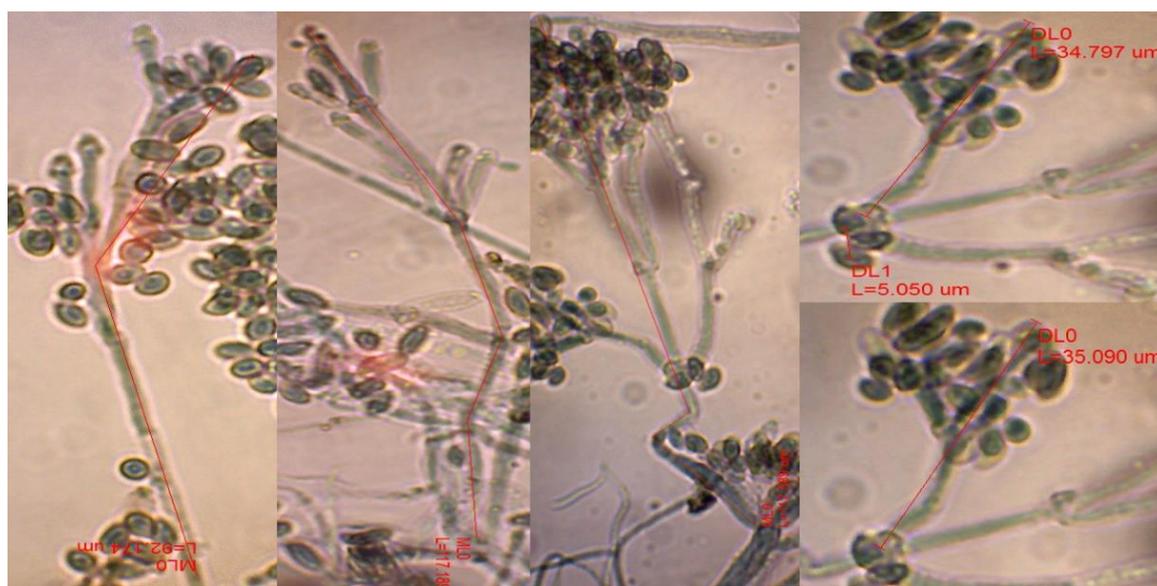


Figura. 4. Detalle de conidio y ramificaciones de *Nodulosporium* sp., a 40X.

De pruebas de patogenicidad en follaje se logró recuperar el hongo, el cual fue aislado del tejido y puesto en medio de cultivo PDA, de este solo se obtuvo micelio y conglomerados de hifas (picnidios), con una sustancia gelatinosa (mucosidad) de color naranja claro sobre y en la periferia del conglomerado (Fig. 5).

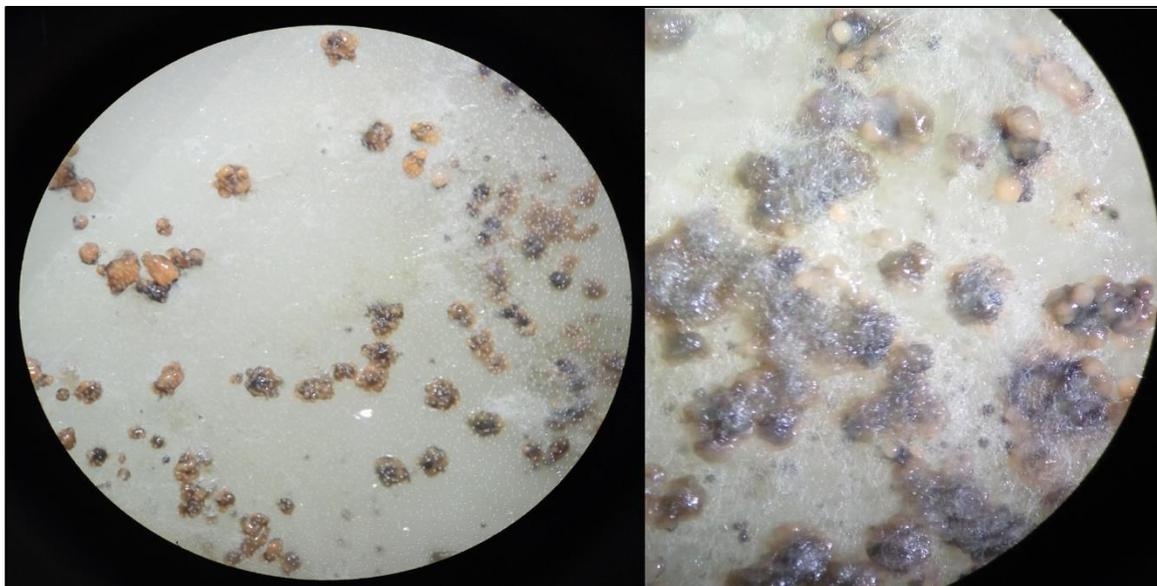


Figura 5. Observación de picnidios de *Hypoxylon* sp., en medios PDA.

Estas estructuras fueron montadas en porta y cubreobjetos con solución de lactofenol y azul de algodón, donde se observó al microscopio la formación de estromas con esporas, las cuales son de color hialino (nunca se tornaron oscuras, incluso ante oscuridad durante un periodo de 24 días), unicelulares, elipsoides-inequilaterales, con extremos ligeramente más redondeados, con abertura germinal alargada ($11.5 \mu\text{m}$) y con presencia de periespora dehiscente (largo: $13.188\text{-}14.526 \mu\text{m}$; ancho $4.342\text{-}5.427 \mu\text{m}$) hialina (Fig. 6A,B); estructuras características que con base en las claves de Barnett y Hunter (1999), se identifica como el género *Hypoxylon* Bull. (Xylariaceae) teleomorfo de *Nodulosporium*, por lo cual ambos están relacionados; en este sentido Ju y Rogers (1996), reconocen a *Nodulosporium* como anamorfo o fase sexual de varias especies del género *Hypoxylon*.

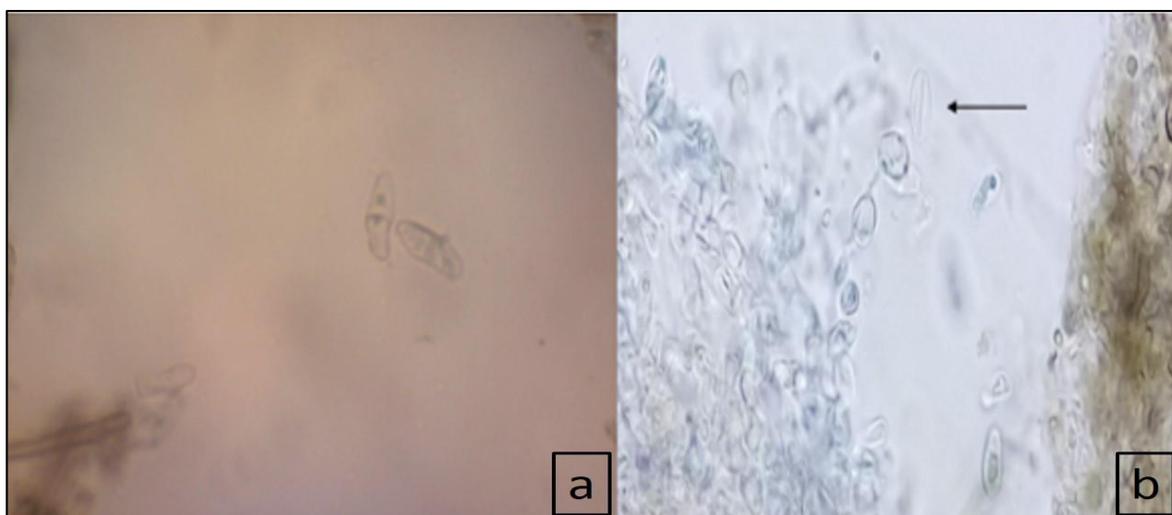


Figura 6. a). Estroma de *Hypoxylon* sp., diferenciándose, b). Espora hialina sin madurar.

Se obtuvo el producto de PCR del ADN del micelio de *Nodulosporium* y de picnidios de *Hypoxylon*; ambos con un producto de 600 pb con los oligonucleótidos ITS4-ITS5. Se obtuvieron 2 secuencias para *Nodulosporium* y 3 de *Hypoxylon*, para su comparación en la base de datos del banco de genes del algoritmo BLAST (NCBI, 2018). La comparación permitió confirmar la identidad del hongo aislado de frutos de cacao con pudrición y el recuperado en la prueba de patogenicidad en follaje, revelando a *Hypoxylon* en las 5 secuencias homologas en dos aislados en el GenBank, procedentes de Estados Unidos (No. de acceso: KF496192.1) con una identidad de 100% (Cuadro. 18).

Cuadro 18. Comparación de secuencias en el banco de genes del NCBI.

Identificación Morfológica	Total Score	Valor E	Identidad (%)	No. Acceso	Identificación Molecular
<i>Hypoxylon</i> sp.	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.
<i>Nodulosporium</i> sp.	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.
<i>Nodulosporium</i> sp.	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.
<i>Hypoxylon</i> sp.	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.
<i>Hypoxylon</i> sp.	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.

Primer's utilizados: ITS4-ITS5

20.3. Pruebas de Patogenicidad del hongo *Nodulosporium* sp.

La prueba de patogenicidad con frutos de cacao durante un periodo de 15 días de evaluación demostró ciertos síntomas leves de crecimiento del hongo inoculado, sin embargo; los frutos de esta prueba provenientes de campo, se encontraban naturalmente enfermas con pudrición, incluso se observó esta condición en los frutos que se utilizaron como testigo inoculado solo con agua destilada estéril. La infección natural bajo las condiciones de laboratorio presentó un crecimiento rápido, lo que indica que el interior del fruto ya se encontraba invadido antes de la inoculación. Desde el cuarto día de inoculación, de la infección natural se observaron las primeras manchas asimétricas de color café oscuras y brillantes, posteriormente al octavo día el fruto se encontraba completamente cubierta por la mancha con presencia de mezcla de micelios de colores blanquecinos, naranjas, verdes y café; con pudrición en alta severidad.

La prueba de patogenicidad con follaje mostró sensibilidad al patógeno a las 24 horas de la inoculación, con presencia de clorosis sobre la hoja y esta exhibió a partir del punto de inoculación un proceso de deshidratación (deseccamiento sin perder el color verde totalmente) y posteriormente a las 48 horas presento crecimiento de micelio blanquecino, quedando de esta manera hasta el término de la prueba, sin cambios (7 días en total) (Fig. 7). Esta lesión se observó solamente en el 30% de las muestras inoculadas. En el testigo inoculado con agua destilada estéril no se observó ningún síntoma o lesión por la presencia del patógeno. En las muestras sintomáticas fue re-aislado el hongo, encontrando únicamente al hongo inoculado en forma de picnidios y micelio con conidios, correspondiendo al teleomorfo de *Nodulosporium*, identificado como *Hypoxylon*.

Este resultado indica que *Nodulosporium* es levemente patogénico en follaje de cacao, causando clorosis y deshidratación de la hoja.

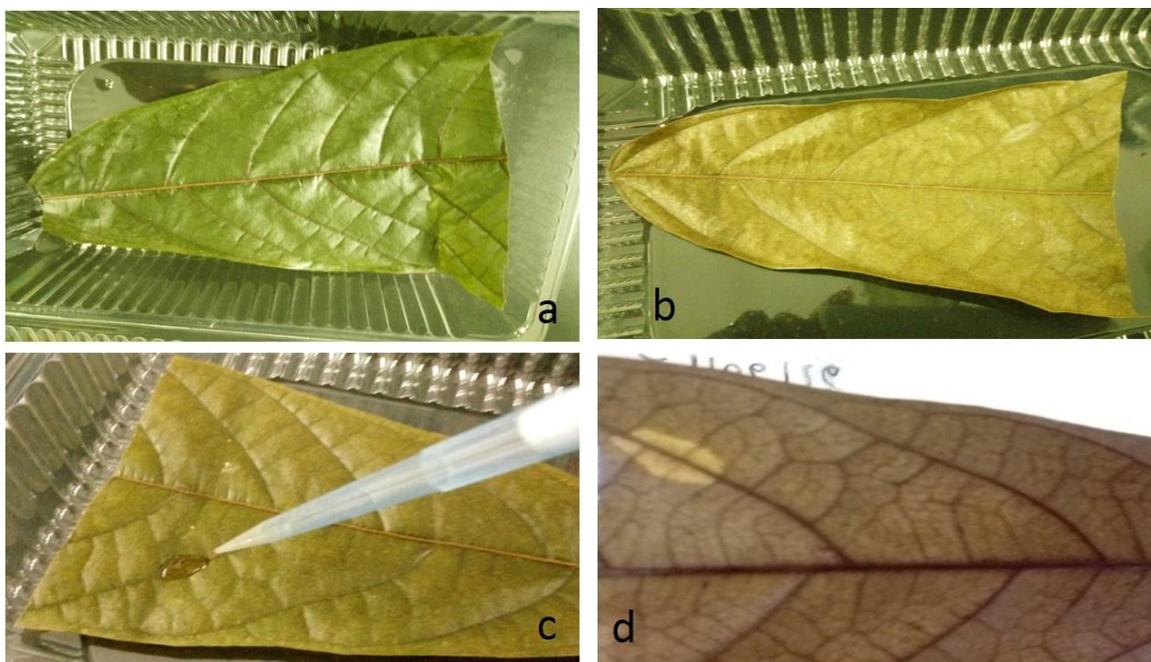


Fig. 7. a y b). Hoja de cacao sin presencia de daño por *Nodulosporium* sp. (Testigo) c y d). Presencia de daño por *Nodulosporium* a los 48 horas en follaje de cacao.

Los géneros *Nodulosporium* e *Hypoxylon* se han reportado como fitopatógenos, ocasionando muerte descendente, pudrición del tronco negro y resinosidad de ramas de mezquite *P. laevigata* (De la Torre-Almaráz *et al.*, 2003; De la Torre-Almaráz *et al.*, 2009). *Nodulosporium* además se ha encontrado provocando pudrición basal del estípote en palma africana de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. (Arecaceae) (Mestizo *et al.*, 2012) y pudrición basal en el cáliz de Flor de Jamaica *H. sabdariffa* (Ruiz-Ramírez *et al.*, 2015).

Por otro lado, el género *Nodulosporium* se ha asociado como endófito a diversas plantas; Collado *et al.* (2001) lo reportan en corteza del tronco, hojas y ramas sanas y secas de *Quercus ilex* L. (Fagaceae). Salgado y Cepero (2005) lo encontraron en hojas de *Rosa hybrida* L. (Rosaceae), Márquez-Dávila *et al.* (2013) aislado a partir de hojas y tallos de cacao *T. cacao*, Lizarazo-Medina *et al.* (2014) en hojas de dos especies de orquídeas *Cattleya percivaliana* y *Cattleya trianaei* (Orchidaceae) y se aisló también de cacahuananche (*G. sepium*) con

potencial como antagonista contra hongos y oomicetos (Sánchez-Fernández, 2016).

Las especies del género *Hypoxylon* se han reportado como endófitos en tejidos de plantas leñosas o herbáceas (Petrini y Petrini, 1985), así como saprofitos o fitopatógenos débiles en madera de árboles de zonas templadas o tropicales (Miller, 1961). Para México, este género es el segundo con mayor número de especies en la Familia Xylariaceae (San Martín, 1992) con 41 especies identificadas, 14 registradas para el estado de Chiapas en 7 municipios, encontradas sobre madera, principalmente en bosque tropical alto perennifolio, bosque tropical mediano subcaducifolio, bosque tropical bajo caducifolio, bosques de pino encino y bosque mesófilo de montaña (San Martín, 1999).

Reconocer la diversidad de patógenos asociados al cultivo de cacao es de suma importancia, debido a que pueden representar una amenaza para el cultivo en un futuro.

20.4. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* sobre *Nodulosporium sp.*

En el presente estudio de control biológico del fitopatógeno *Nodulosporium* con el antagonista *T. harzianum*, este último; no permitió el crecimiento del fitopatógeno, reduciendo su crecimiento hasta un 69.93%; lo que indica que *T. harzianum* al estar en confrontación ejerce efecto inhibitorio sobre *Nodulosporium sp.*, superior al 50% del crecimiento micelial; lo que indica un buen control (Suarez *et al.*, 2008), mientras que el antagonista expresa su crecimiento sin dificultad, incluso sobre el fitopatógeno (Cuadro 19). Con base en la escala de Bell *et al.* (1982), *T. harzianum*, se ubica en la clase 1; el antagonista tuvo contacto con el fitopatógeno a las 72 horas, posteriormente este último fue invadido por *T. harzianum*, alcanzando cobertura total en el medio de cultivo y sobrecreciendo al patógeno.

Cuadro 19. Diámetro de micelio, porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA con *Trichoderma harzianum* a 7 días de evaluación.

No.	Diámetro de micelio (mm)			Testigo	%C	%I
	Testigo	Cultivo dual				
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>Nodulosporium</i> *			
			<i>Nodulosporium</i>			
1	86.6	86.6	26.7	86.6	30.83	69.16
2	86.6	86.6	26.2	86.6	30.25	69.74
3	86.6	86.6	21.9	86.6	25.28	74.71
4	86.6	86.6	24.9	86.6	28.75	71.24
5	86.6	86.6	27.2	86.6	31.40	68.59
6	86.6	86.6	26	86.6	30.02	69.97
7	86.6	86.6	29.4	86.6	33.94	66.05
\bar{X}	86.6	86.6	26.04	86.6	30.07	69.93

No.=Repeticiones. \bar{X} = Promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición.

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos (González *et al.*, 2002). Suarez *et al.* (2008), reportan que *T. harzianum* es un antagonista con habilidades de micoparasitismo, competencia por espacio e inhibe el crecimiento para el control *in vitro* de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Nectriaceae).

Rivero (2008) al evaluar el efecto de antibiosis de dos aislados de *Trichoderma* spp., en cultivo dual con *Alternaria padwickii* (Ganguly) M. B. Ellis, *Bipolaris oryzae* (Breda de Hann) Shoemaker, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (= *Cochliobolus lunatus* R.R. Nelson y Haasis) (Pleosporales: Pleosporaceae) y *Phoma* sp., Saccardo (Pleosporales: Pleosporaceae) observó inhibición significativa del crecimiento radial de estos patógenos; lo que nos indica el potencial de inhibición de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos.

En el crecimiento micelial se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.05$) entre *Nodulosporium* sp., en cultivo dual con *T. harzianum* para un periodo de 7 días; por lo que se puede deducir que el antagonista crece con gran rapidez a tal grado que sobrecrece a *Nodulosporium* y este comienza a decrecer con síntomas de necrosis (comienza a morir el fitopatógeno) (Cuadro 20). En este sentido, Stefanova *et al.* (1999) informaron de la presencia de metabolitos no

volátiles con actividad antifúngica en cuatro aislamientos de *Trichoderma* y concluyeron que estos mismos son los responsables de la reducción del crecimiento micelial del hongo *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (Pythiales: Pythiaceae).

Cuadro 20. Medias del crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* y *Nodulosporium* sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.

Tratamiento	Media (mm) ^{***}
<i>T. harzianum</i> testigo	86.60 a
<i>T. harzianum</i> cultivo dual	86.60 a
<i>Nodulosporium</i> sp. cultivo dual	26.04 b
<i>Nodulosporium</i> sp. Testigo	86.60 a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey; $P < 0.05$). $R^2=0.99$, $CV=1.60$, $F=4883.80$; $gl=3,27$; $P=<0.0001$. *** Indica significancia contraste valor F a $P < 0.001$.

En los resultados del porcentaje de crecimiento de *T. Harzianum* y *Nodulosporium* solos y en cultivo dual, se observa que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) con un porcentaje de crecimiento menor del fitopatógeno en cultivo dual con *T. harzianum*, inhibiendo al fitopatógeno significativamente en 69.93% (Cuadro 21); estos resultados indican que *T. harzianum* exhibe un efecto antagónico sobre *Nodulosporium* en cultivo dual *in vitro*. Esto probablemente se debe a que *T. harzianum* expone diferentes mecanismos, como micoparasitismo, antibiosis y competencia por nutrientes y espacio para disminuir poblaciones de otros hongos, principalmente fitopatógenos (Chet *et al.*, 1997; Valencia, 2004; Kullnig, 2000).

Con base en evaluaciones previas de Papavizas y Lumsden (1980), Lorito *et al.* (1993), Herrera *et al.* (1999), y Sid Ahmed *et al.* (2000) mencionan que *T. harzianum* presenta gran velocidad de crecimiento, efecto de hiperparasitismo, que se manifiesta en inhibición del crecimiento micelial de otros hongos, no solo por compartir el mismo sustrato, sino también porque produce antibióticos (trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, penicilina, trichotecenos,

trichorzianinas) y enzimas (β -1,3-glucanasas, quitinasas, proteasas y celulosas) degradadoras de la pared celular que juegan un importante papel en el micoparasitismo.

Cuadro 21. Medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Trichoderma harzianum* y *Nodulosporium* sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.

Tratamiento	Crecimiento (%)***	Inhibición (%)***
<i>T. harzianum</i> testigo	100.00 a	00.00 b
<i>T. harzianum</i> cultivo dual	100.00 a	00.00 b
<i>Nodulosporium</i> sp. cultivo dual	30.07 b	69.93 a
<i>Nodulosporium</i> sp. Testigo	100.00 a	00.00 b
CV	1.60	7.57

Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey; $P < 0.05$). $R^2=0.99$, $F=4883.80$; $gl=3,27$; $P=<0.0001$. *** Indica significancia contraste valor F a $P < 0.001$. CV= Coeficiente de Variación.

20.5. Antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* sobre *Nodulosporium* sp.

Con base en los resultados de control de *B. subtilis* sobre *Nodulosporium* sp., en cultivo dual y con respecto a sus testigos, se observa que *B. subtilis* presenta un lento crecimiento comparado con el hongo *Nodulosporium* sp., e incluso el antagonista y el fitopatógeno nunca tuvieron contacto en la caja de Petri, no obstante; si se aprecia en la confrontación que *B. subtilis* no permite el buen desarrollo del hongo, con un crecimiento promedio de 28.13% (Cuadro. 22); e incluso se pudo observar al noveno día (se mantuvo para observar el seguimiento del comportamiento del hongo y la bacteria), que *Nodulosporium* sp., comenzó a decrecer y el micelio tomo una coloración café en la periferia del hongo; esto, probablemente debido a que *B. subtilis* produce una amplia variedad de metabolitos y enzimas hidrolíticas extracelulares (Nakamura *et al.*, 1999), sideróforos, toxinas y lipopéptidos (LPs) cíclicos no ribosomales (Ongena y Jaques, 2008; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; Falardeau *et al.*, 2013), con capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos. La

actividad antimicrobiana de los LPs tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células fúngicas, inhibiendo el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, deteniendo la germinación de esporas de patógenos e interrumpiendo el crecimiento del tubo germinativo y del micelio y provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos (Butt *et al.*, 1999; Touré *et al.*, 2004; Aranda *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006).

Cuadro 22. Diámetro de crecimiento, porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA con *Bacillus subtilis* a 7 días de evaluación.

No.	Diámetro de crecimiento (mm)			Testigo	%C	%I
	Testigo	Cultivo dual				
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Nodulosporium</i> *			
1	23.15	19.8	22.1	86.6	25.51	74.48
2	22.85	22.85	26.9	86.6	31.06	68.93
3	23.67	20.17	24.5	86.6	28.29	71.70
4	23.5	23.7	22.8	86.6	26.32	73.67
5	23.7	23.5	23.9	86.6	27.59	72.40
6	23.95	23.95	25.45	86.6	29.38	70.61
7	22.42	19.05	24.95	86.6	28.81	71.18
\bar{X}	23.32	21.86	24.37	86.6	28.14	71.86

No.=Repeticiones. \bar{X} =Promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición.

El diámetro de crecimiento de *B. subtilis* y *Nodulosporium* sp., solos y en confrontación, presento diferencias significativas ($P<0.05$) entre tratamientos, con mayor crecimiento en *Nodulosporium* sp., solo y en cultivo dual, mientras que *B. subtilis* en cultivo dual presentó un menor crecimiento, comparado con su testigo, este último nos indica que, este organismo es de lento crecimiento. No obstante, para el caso de *Nodulosporium* sp., en cultivo dual, el fitopatógeno se vio afectado por la presencia de *B. subtilis*, con respectivo al testigo.

Cuadro 23. Medias del crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Nodulosporium* sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.

Tratamiento	Media(mm) ^{***}
<i>B. subtilis</i> testigo	23.32 bc
<i>B. subtilis</i> cultivo dual	21.86 c
<i>Nodulosporium</i> sp. cultivo dual	24.37 b
<i>Nodulosporium</i> sp. Testigo	86.60 a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey; $P < 0.05$). $R^2=0.99$, $CV=3.46$, $F=3848.59$; $gI=3,27$; $P < 0.0001$. *** Indica significancia contraste valor F a $P < 0.001$.

Del crecimiento e inhibición de *B. subtilis* y *Nodulosporium* sp., solos y en confrontación se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.05$) (Cuadro 24), con el menor porcentaje de crecimiento del hongo en cultivo dual y a su vez el mayor porcentaje de inhibición en este mismo tratamiento; lo que indica que *B. subtilis* tiene un efecto antagonista y permite tener un excelente control sobre *Nodulosporium* sp.

Cuadro 24. Medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Bacillus subtilis* y *Nodulosporium* sp., testigos y en cultivo dual en medio PDA a 7 días de evaluación.

Tratamiento	Crecimiento (%) ^{***}	Inhibición (%) ^{***}
<i>Bacillus subtilis</i> testigo	97.37 ab	2.63 bc
<i>Bacillus subtilis</i> cultivo dual	91.27 b	8.73 b
<i>Nodulosporium</i> sp. cultivo dual	28.14 c	71.86 a
<i>Nodulosporium</i> sp. testigo	100.00 a	00.00 c
CV	5.83	22.21

Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey; $P < 0.05$). $R^2=0.98$, $F=384.34$; $gI=3,27$; $P < 0.0001$. *** Indica significancia contraste valor F a $P < 0.001$. CV=Coefficiente de Variación.

Entre las principales vías por las cuales cepas de *B. subtilis* evitan el establecimiento y desarrollo de organismos patógenos, está determinado por su perfil bioquímico; existen diferentes mecanismos, que incluyen, la producción de una gran variedad de metabolitos biológicamente activos, con capacidad de inhibir el desarrollo y crecimiento normal de agentes fitopatógenos, entre éstos,

se encuentran los lipopéptidos cíclicos no ribosomales, clasificados en 3 diferentes familias, de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud del ácido graso (Iturinas, Fengicinas y Surfactinas), sideróforos, enzimas líticas, toxinas e inducen resistencia sistémica en plantas (IRS) (Butt *et al.*, 1999; Ongena y Jaques, 2008; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; Falardeau *et al.*, 2013).

Evaluaciones realizadas por Villa *et al.* (2007) con tres cepas de *B. subtilis* en cultivo dual frente a los hongos *F. solani*, *F. sporotrichioides* y *F. oxysporum*, observaron que *B. subtilis* disminuye el crecimiento micelial de estos hongos entre 50 y 60% por excreción al medio de metabolitos antifúngicos. Al respecto, Corrales *et al.* (2011) con *Bacillus subtilis*, aislada de rizósfera de plantas aromáticas, realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* en medio PDA frente a *Fusarium acuminatum* Ellis y Everh. (Hypocreales: Nectriaceae) y encontraron de 70-100% de inhibición del micelio del hongo por la producción de sustancias antifúngicas.

20.6. Inhibición *in vitro* del fungicida azoxystrobin sobre *Nodulosporium* sp.

El fungicida azoxystrobin mostro efectividad para el control *in vitro* de *Nodulosporium* sp., causando inhibición sobre el crecimiento micelial en 82.90% en una concentración alta (Cuadro 25). El crecimiento del hongo *Nodulosporium* sp., en presencia del fungicida azoxystrobin presento diferencias altamente significativas ($P < 0.05$), con un decrecimiento micelial a medida que aumento la concentración. La azoxistrobina (activo principal de este fungicida), actúa inhibiendo el proceso respiratorio de los hongos y resulto especialmente eficaz para impedir la germinación de esporas y el desarrollo inicial del patógeno; además, de que posee actividad translaminar, efecto de contacto y prolongada residualidad, para una mejor eficacia (Syngenta, 2018).

Cuadro 25. Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA a diferentes concentraciones del fungicida azoxystrobin a 7 días de evaluación.

Concentración Ppm	Diámetro de micelio (mm)			%C***	%I***
	DV	DH	DP***		
Testigo (0)	86.60	86.60	86.60 a	100.00 a	00.00 i
1000	45.13	45.13	45.13 b	52.11 b	47.89 h
1350	43.31	43.15	43.23 c	49.92 c	50.08 g
1650	40.82	40.82	40.82 d	47.14 d	52.86 f
1950	36.32	36.32	36.32 e	41.94 e	58.06 e
2600	23.36	23.36	23.36 f	26.97 f	73.02 d
3000	19.76	19.76	19.72 g	22.82 g	77.18 c
3200	18.04	18.04	18.04 h	20.83 h	79.17 b
3800	14.81	14.81	14.81 i	17.10 i	82.90 a
CV	--	--	3.01	3.00	2.19

DV=Diámetro vertical, DH=Diámetro horizontal, DP=Diámetro promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición. CV=Coeficiente de Variación. Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey; $P < 0.05$). $R^2 = 0.99$, $F = 4065.97$; $gl = 8, 89$; $P < 0.0001$. *** Indica significancia contraste valor F a $P < 0.001$.

Azoxystrobin es un fungicida efectivo para el control de hongos fitopatógenos, no obstante requiere concentraciones altas; Félix y Gálvez (2002) evaluando este fungicida en un rango de las 10 ppm contra *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (Pleosporales: Pleosporaceae) observaron un efecto inhibitorio en la germinación de los conidios; no obstante, observaron un efecto mínimo en el desarrollo micelial en un periodo de 10 días de evaluación, lo que indica que bajo la dosis de 10 ppm, este fungicida ejerce un efecto fungistático muy leve, pero no suprime el desarrollo del hongo, lo que sugiere una actividad curativa limitada contra *A. alternata*. Por otro lado, Herrera *et al.* (2011) en concentraciones de 500 ppm, encontraron un 93.61% de efectividad en *A. alternata*.

Torres *et al.* (2013) con este fungicida, encontraron una inhibición del 100% de la germinación de conidios a una concentración de 450 mg L⁻¹ y 96% del crecimiento micelial con una concentración de 1250 mg L⁻¹. Gaviria-Hernández *et al.* (2013) encontraron un porcentaje de inhibición de 38.75 y 70% del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* J. H.

Simmonds (Glomerellales: Glomerellaceae) respectivamente, a una concentración de 95 ppm.

20.7. Inhibición *in vitro* del fungicida clorotalonil sobre *Nodulosporium* sp.

El hongo *Nodulosporium* sp., fue susceptible al fungicida clorotalonil, con diferencias significativas ($P < 0.05$) en el diámetro de crecimiento micelial, porcentaje de crecimiento e inhibición, en las diferentes concentraciones utilizadas, con un decrecimiento de micelio a medida que se aumentó la concentración de fungicida, correlacionado a su vez en el incremento del porcentaje de inhibición (Cuadro 26).

Cuadro 26. Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA a diferentes concentraciones del fungicida clorotalonil a 7 días de evaluación.

Concentración Ppm	Diámetro de micelio (mm)			%C***	%I***
	DV	DH	DP***		
Testigo (0)	86.6	86.6	86.60 a	100.00 a	00.00 f
100	21.74	21.31	21.52 b	24.85 b	75.14 e
200	19.56	19.56	19.56 b	22.57 b	77.41 e
350	15.81	15.81	15.81 c	18.15 c	81.85 d
450	15.08	15.08	15.08 c	17.41 c	82.59 d
650	11.64	11.64	11.64 d	13.44 d	86.56 c
850	12.01	12.01	12.01 d	13.87 d	86.13 c
950	7.83	7.83	7.83 e	9.04 e	90.96 b
1000	5.00	5.00	5.00 f	5.77 f	94.23 a
CV	--	--	7.01	7.01	2.34

DV=Diámetro vertical, DH=Diámetro horizontal, DP=Diámetro promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición. CV=Coeficiente de Variación. Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey; $P < 0.05$). $R^2 = 0.99$, $F = 2690.81$; $gI = 8,89$; $P < 0.0001$. *** Indica significancia contraste valor F a $P < 0.001$.

La efectividad del fungicida clorotalonil, se debe a la acción que este producto ejerce sobre hongos fitopatógenos, e interviene en la síntesis de las enzimas y provoca que el hongo no se desarrolle y muera (Thomson, 1997) e inhibe la

respiración de las células del hongo, debido a que las moléculas del clorotalonil se unen a grupos sulfhidrilos de los aminoácidos, las enzimas que afectan al ciclo de Krebs se desactivan y no se produce ATP, y al no poder completar este proceso esencial, la célula muere. Los síntomas generales de la interacción entre el clorotalonil y las células fúngicas son el retraso en el crecimiento del micelio y la inhibición de la germinación de las esporas (Arysta, 2017).

Para el control de *Spilocaea oleagina* (Castagne) S. Hughes (Pleosporales: Venturiaceae) se encontró que el clorotalonil tiene un efecto *in vitro* en la germinación de conidios (Obanor *et al.*, 2005). Pérez y Lannacone (2006), evaluaron diversos fungicidas, entre ellos el clorotalonil para el control de *C. gloeosporioides*, encontrando alta efectividad sobre la germinación de conidios en cultivo *in vitro*, aislados de *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae).

Arahana *et al.* (2012) determinaron que el clorotalonil es efectivo previniendo la germinación de esporas de fitopatógenos como *Monilinia honey* (Sclerotiniaceae). Mogollón y Castaño (2012), evaluaron el efecto *in vitro* de inductores de resistencia y encontraron que el fungicida clorotalonil es efectivo e inhibe totalmente el desarrollo de la sigatoka negra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Mycosphaerellaceae).

20.8. Inhibición *in vitro* del fungicida tiabendazol sobre *Nodulosporium* sp.

El fungicida tiabendazol presentó un efecto altamente significativo sobre el hongo *Nodulosporium* sp., inhibiendo totalmente el crecimiento micelial del hongo, y es importante señalar que se produjo la inhibición desde la concentración más baja (0.5 ppm) y a partir de 2.5 ppm, el micelio del hongo no pudo desarrollarse sobre el medio (Cuadro, 27). Este fungicida ejerce una acción sistémica y de contacto a concentraciones bajas, los benzimidazoles inhiben la elongación del micelio y a altas actúan sobre la germinación de las esporas. Además, se conoce que los derivados de benzimidazol interfieren en la mitosis de los hongos y su acción real

es debida al efecto sobre los microtúbulos. La inhibición de la formación de microtúbulos trae, como consecuencia, la ausencia de división celular, produciéndose además una desorganización citoplasmática de tipo general (Danaher *et al.*, 2007).

Cuadro 27. Medias del diámetro de micelio, medias del porcentaje de crecimiento y de inhibición de *Nodulosporium* sp., en medio PDA a diferentes concentraciones con el fungicida tiabendazol a 7 días de evaluación.

Concentración Ppm	Diámetro de micelio (mm)			%C***	%I***
	DV	DH	%I***		
Testigo (0)	86.6	86.6	86.6 a	100.00 a	00.00 c
0.5	12.31	12.31	12.31 b	14.21 b	85.78 b
1	12.13	12.13	12.13 b	14.01 b	85.99 b
2.5	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
5	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
10	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
20	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
40	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
60	5	5	5.0 c	5.77 c	94.23 a
CV	--	--	4.88	4.88	1.08

DV=Diámetro vertical, DH=Diámetro horizontal, DP=Diámetro promedio. C=Crecimiento. I= Inhibición. CV=Coeficiente de Variación. Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey; $P < 0.05$). $R^2 = 0.99$, $F = 12243.8$; $gl = 8, 89$; $P < 0.0001$. *** Indica significancia contraste valor F a $P < 0.001$

Arahana *et al.* (2012) demostraron la efectividad *in vitro* del tiabendazol sobre la germinación de esporas de *Monilinia* Honey (Helotiales: Sclerotiniaceae).

Yossen y Conles (2014) evaluaron de forma *in vitro* en medio envenenado la eficacia de fungicidas con distintos modos de acción y con grupos químicos no relacionados, para el control de *F. oxysporum* Schldl. y *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach y Nirenberg (Hypocreales: Nectriaceae), encontrando que ambos aislados fueron susceptibles significativamente a tiabendazol con valores de 80-99% de inhibición en concentraciones de 1,2 y 4 ppm.

Resultados similares al presente encontraron Ruíz *et al.* (2016), al evaluar el tiabendazol *in vitro* por 8 días contra *Colletotrichum* spp., con un control significativo con crecimiento micelial de 12.54 mm, no obstante; para la inhibición micelial requirieron mayor cantidad de ingrediente activo; concentraciones de 50 a 1000 mg/L (50-1000 ppm).

El hongo *Nodulosporium* obtenido de mazorcas de cacao, presento susceptibilidad a la acción de los fungicidas azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol adicionados en medio PDA. No obstante, de estos tres; el tiabendazol fue más efectivo, ya que con 2.5 ppm inhibe el crecimiento micelial del hongo, por lo que se requiere de poco ingrediente activo para su control, seguido por el clorotalonil que a 1000 ppm ya no permite el crecimiento del hongo y azoxystrobin el menos efectivo por requerir concentraciones altas arriba de 1000 ppm para tener un buen control (Cuadros 25, 26 y 27).

El hongo *Nodulosporium* sp., con base en los resultados de acuerdo a cada fungicida probado, presento diferentes valores en la Concentración Inhibitoria media (CI_{50}), lo cual sugiere la variación natural del hongo en niveles de resistencia ante los fungicidas evaluados (Cuadro 28), corroborando la efectividad del tiabendazol con la CI_{50} más baja, seguido por clorotalonil y azoxystrobin.

Cuadro 28. Concentración inhibitoria y límites fiduciales de fungicidas químicos aplicados a *Nodulosporium* sp., en medio PDA a 7 días de evaluación.

Fungicidas	Ppm			CI_{90}
	CI_{50}	Límites fiduciales 95%		
		Inferior	Superior	
Azoxystrobin	1290	1056	1479	6024
Clorotalonil	13.7	0.84	40.52	1035
Tiabendazol	0.00003	1.35	0.0041	1.70

Ppm=partes por millón, CI_{50} = Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento, CI_{90} = Concentración inhibitoria del 90% del crecimiento.

CONCLUSIONES

La región estudiada del Soconusco, Chiapas, México presenta una alta incidencia y severidad de pudrición de frutos del cultivo de cacao; influenciada por la alta precipitación.

No se detectaron *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*, dos de los principales agentes causales de pudrición de fruto de cacao para la región cacaotera del Soconusco, Chiapas.

Se registra la presencia del hongo *Nodulosporium* sp., y se identifica el teleomorfo *Hypoxyton* en cacao para el estado de Chiapas.

Nodulosporium es levemente patogénico en follaje de cacao, causando clorosis y deshidratación de la hoja.

Los productos químicos azoxystrobin, clorotalonil y tiabendazol y los agentes de control biológico *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* son eficientes para el control *in vitro* del hongo *Nodulosporium* sp.

Los agentes de control biológico mostraron durante el mismo periodo de evaluación un efecto de control de *Nodulosporium* sp., similar a los productos químicos.

LITERATURA CITADA

- ABBOTT W, S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology* 18: 265-267.
- ACHICANOY, L. H. 2001. Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 54 (1) (2):1251-1273.
- AGUADO-SANTACRUZ, G. A., MORENO-GÓMEZ, B., JIMÉNEZ-FRANCISCO, B., GARCÍA-MOYA, E. Y PRECIADO-ORTIZ, R. E. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidóforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35:9-21.
- AGRIOS, G. N. 1978. *Plant Pathology, Second Edition*. Academic, Press. New York, San Francisco, Londres. 43 p.p.
- AGRIOS, G. N. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press. San Diego California. 922 p.p.
- AJWA A. H., KLOSE S., NELSON D. S., MINUTO A., LODOVICA G. M., LAMBERTI, F. and LOPEZ ARANDA, J. M. 2003. Alternatives to methyl bromide in strawberry production in the United States of America and the Mediterranean region. *Phytopathol. Mediterr.* 42:220–244.
- ALARCON RESTREPO, J. J., AREVALO PEÑARANDA, E., DIAZ JIMENEZ, A. L., GALINDO ALVAREZ, J. R., ALBERTO ROSERO, A. 2012. Manejo fitosanitario del cultivo del cacao (*Theobroma cacao L.*) Medidas para la temporada invernal. Línea Agrícola ICA. Bogotá D.C. Colombia. 40 p.p.
- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS G. W. AND BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th edition. John wiley & sons. New York. 869 p.p.
- ALFONSO, P. D. P. Y SANDOVAL, S. E. R. 2008. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas. 80 p.p.
- ALMEYDA, L. I. H., ROCHA, P. M. A., PIÑA, R. J. AND MARTÍNEZ, J. P. S. 2001. The Use of Polymerase Chain Reaction and Molecular Hybridization

- for Detection of Phytoplasmas in Different Plant Species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19(1):1-9.
- ALVAREZ, E., OSPINA, C. A., MEJIA, J. F. Y LLANO, G. 2005. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en Guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del cauca. *CIAT. Fitopatología Colombiana*. 28 (1): 1-8
- ALVAREZ, M. G. 1976. Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. *Fitofilo* 71: 169 p.p.
- ALVES, A., CROUS, P. W., CORREIA, A. AND PHILLIPS, A. J. L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13.
- AIME, M. C., PHILLIPS-MORA, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97(5): 1012-1022.
- ARAHANA, V., BORJA. E., SALGADO. C., TOBAR, J. Y TORRES, M. L. 2012. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Monilinia* spp., que afecta el cultivo de durazno (*Prunus persica*) en provincias de la Sierra Ecuatoriana. *Avances*. 4(1): 5-10.
- ARANDA, F. J., TERUEL, J. A. AND ORTIZ, A. 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochemistry et Biophysics Acta (BBA) - Biomembranes*. 1713:51-56. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- ARANGO, M., ORDOÑEZ N., CASTAÑEDA E. Y RESTREPO A. 1988. Manual hongos contaminantes del laboratorio. Instituto nacional de salud. Corporación para Investigación Biológica. 127 p.p.
- ARTICA, M. R. (2008). MONILIASIS DEL CACAO. En CULTIVO DEL CACAO. Republica de Panama: Editora macro EIRL. 60 p.p.
- ARYSTA, LIFE SCIENCE. 2017. Ficha Técnica Fungitox® 720 SC. Disponible en:[http://www.arysta.com.co/ProductosProteccion/PDF/F.T.%20FUNGITO%20\(vr.%202\).pdf](http://www.arysta.com.co/ProductosProteccion/PDF/F.T.%20FUNGITO%20(vr.%202).pdf). Fecha de consulta 30 de abril del 2018.

- ATLAS, R.M. Y BARTHA R. 1992. Microbial ecology, fundamentals and applications. Third edition. Ed. Benjamín/Cummings. Redwood, usa. 466 p.p.
- AVENDAÑO A, C.H., VILLARREAL F, J. M., CAMPOS R, E., GALLARDO M, R. A., MENDOZA L, A., AGUIRRE M, J. F., SANDOVAL E, A., ESPINOSA Z, S. 2011. Diagnóstico del cacao en México. Patronato Universitario Chapingo, Texcoco, Estado de México. 78 p.p.
- BARBOSA-MARTÍNEZ, C., LEÓN-GARCÍA, L. P., SEPÚLVEDA-SÁNCHEZ, J. AND NIETO-ANGEL, D. 2002. Effects of ozone, iodine and chlorine on spore germination of fungi isolated from mango fruits. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(1): 60-65.
- BARNETT, H. L. AND HUNTER B.B. 1999. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society Press. United States of America. 218 p.p.
- BELL, D. K., WELLS H. D. AND MARKHAM C. R. 1982. *In Vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six Fungal plant pathogens. *Phytopathology*.72: 379-382.
- BENÍTEZ, T., RINCÓN A.M., LIMÓN M.C. AND CODÓN A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International microbiology*. 7: 249-260.
- BERLANGER, I. and POWELSON, M. L. 2000. *Verticillium* wilt. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094 / PHI-I-2000-0801-01 Updated 2005.
- BOLLER, T. AND FELIX, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology*. 60:379-406. <http://dx.doi.org/10.1146/an-nurev.arplant.57.032905.105346>.
- BOWMAN, S. M. AND FREE, S. J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28:799-808. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20441>
- BRADES, G. A., CORDERO, T. M. and SKILES, R. L. 1959. Compendium of Plant Diseases. Chicago, Lakeside Press. 130 p.p.
- BROTMAN, Y., KAPUGANTI J.G. AND VITERBO A. 2010. *Trichoderma*. *Current Biology* 20(2): 390-391.

- BROWN, G. E. y ECKERT, J. W. 1989. Blue mold y Green mold. In: Whiteside, J. O.; Garney, S. M. y Timmer, L. W. (Eds.). Compendium of citrus diseases. 2nd Printing. St. Paul, APS Press. 32: 35-36.
- BROWN, G. E., McCORNACK, A. A. and SMOOT, J. J. 1967. Thiabendazole as a postharvest fungicide for Florida citrus fruit. Plant Disease Reporter 51 (2): 95-98.
- BURGESS, T. I., BARBER, P. A., MOHALI, S., PEGG, G., DE BEER, W. AND WINGFIELD, M. J. 2006. Three new *Lasiodiplodia spp.*, from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. Mycologia 98:423-435.
- BUTT, T.M., HARRIS, J.G. AND POWEL, K.A.1999. Microbial Biopesticides: The European scene. Eds.F.R. Hill & J.J. Menn. Humana Press, NJ. 23-44 p.p.
- CANALES, C. R. 1998. Tecnología para la producción temprana de mango. 1 ed. Comité Editorial del Campo Experimental Edzná. 12 p.c.
- CANALES, C. R. 2007. Control de la necrosis en frutos de marañón *Anacardium occidentale* en la península de Yucatán. Reporte anual de investigación e innovación tecnológica INIFAP. Consultado: Agosto de 2017. Disponible en línea: http://utep.inifap.gob.mx/tecnologias_agricolas.php.
- CAMARGO, H. 2005. Evaluación en campo de la incidencia de *Rhizoctonia solani* en arroz (*Oriza satriva*), luego de la inoculación en semilla de un formulado comercial a base del antagonista *Trichoderma harzianum*. Transferencia Tecnológica y Emprendimiento CITTE 20-2. 17 p.c.
- CASTELLANOS, J. 2010. Estudios relacionados con el uso de *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos. Revista Agrotecnia de Cuba. La Habana, Cuba. Consultado: 19 de septiembre 2018. Disponible en línea en: www.actaf.co.cu
- CASTILLO, C., SOSA, B. Y SCORZA, J. 2004. Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos, producidos por esporulados del género *Bacillus*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 24(1) (2):65-67.

- CAWOY, H., DEBOIS, D., FRANZIL, L., DE PAUW, E., THONART, P. AND ONGENA, M. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. Microbial Biotechnology. 8:281-295. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12238>.
- CAZORLA, F. AND ROMERO D. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. Journada Appl Microbiology. 103(5):1950-1959.
- CHATTERJEE, S. N., BHALTACHARYA, T., DANGAR, T. K. AND CHANDRA, G. 2007. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. Afrontier J Biotechnology 6(13):1587-1591.
- CHET, I. AND BAKER, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 71:286-290.
- CHET, I., INBAR, J., AND HADAR, Y. 1997. Fungal Antagonists Andmycoparasites. In: Wicklow, Soderstrom eds. The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships. Heidelberg: Springer Verlag. 165–184 p.p.
- CHOWDHURY, S. P., HARTMANN, A., GAO, X. AND BORRISS, R. 2015. Bio-control mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a Review. Frontiers in Microbiology. 6:780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- CIFERRI, R. and PARODI, E. 1933. Descrionizione del fungo che causa la “Moniliasis del cacao. Phytopathologische Zeitschrift. 6: 539-542.
- COFFEY, D. M. 2010. Especies de Phytophthora que atacan las palmas: su naturaleza, supervivencia y control. PALMAS 31: 376-382.
- COLLADO, J., PLATAS, G. AND PELÁEZ, F. 2001. Identification of an endophytic *Nodulisporium* sp. from *Quercus ilex* in Central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. Mycologia. 93(5):875-886

- COLLINS, D. P. AND JACOBSEN, B. J. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet *Cercospora* leaf spot. *Biological Control* 26(2):153-161.
- COMPANT, S., DUFFY, B.; NOWAK, J., CLÉMENT, C. AND BARKA, E. A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*. 71:4951-4959. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959>.
- CONAGUA. 2015. Comisión Nacional del agua del estado de Chiapas Disponible: <https://www.gob.mx/conagua>. Julio 2015.
- CORRALES, L.C., SANCHEZ, L.C., CUERVO, J., BAUTISTA, D., GONZALEZ, L. Y GUEVARA, M. 2011. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *Ciencias Biomedicas*. 8(3):63-759.
- CROUS, P. W. AND PALM, M.E. 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia* 52:167-175.
- CRUZ, C. A. 2014. Cacao Soconusco Apuntes sobre Chiapas, México y Centroamérica. UNICACH (Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas) Selva Negra. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 115 p.p.
- CUERVO, L. J. P. 2010. Tesis de asilamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Basicas. 28 p.p.
- CUERVO-PARRA, J. A., ROMERO-CORTES, T., LÓPEZ-PÉREZ, P. A., RAMÍREZ-LEPE, M. 2014. El cultivo del Cacao, enfermedades, identificación de hongos, modelado y métodos de control. *Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial (Facultad De Ciencias Agrarias – UNCa)*. 58: 1-8.
- DANAHER, M., DE RUYCK, H., CROOKS, S. R. H., DOWLING, G., O'KEEFFE, M. 2007. Review of methodology for the determination of benzimidazole

- residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*. 845(1):1-37.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.046>
- DA SILVA, A., BRAINER, R., MICHEREFF, S., DA SILVA, M. AND SARAIVA, M. 2012. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 132:489-498.
- DE CARLI, L. Y LARIZZA, L. 1988. Griseofulvin. *Mutat. Res.* 195:91–126.
- DE LA CRUZ, J., PINTOR-TORO J., BENÍTEZ T. AND LLOBELL A. 1995. Purification and characterization of an endo - β - 1, 6- glucanasa from *Trichoderma harzianum* that is relat to its mycoparasitism. *Journal of Bacteriology*. 77(7):1864-1871.
- DE LA TORRE-ALMARÁZ, R., F. M. COTA-TRUJILLO, J. L. GARCÍA-ROJAS, J. E. CAMPOS Y F. SAN-MARTÍN. 2009. Etiología de la muerte descendente del mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biosfera del Valle de Zapotitlán, México. *Agrociencia*. 43(2):197-208.
- DELGADO, A., SUAREZ, C.C. 1993. Moniliasis del Cacao. Documento Técnico N° 10. EET Pichilingue, INIAP. FUNDAGRO. Quito, Ecuador. 18 p.p.
- DELP, C. J. 1987. Benzimidazole and related fungicides. In Lyr, H. (Ed.). *Modern, selective fungicides-properties, applications, mechanisms of action*. London, Longman. 233-244 p.c.
- DENMAN, S.; CROUS, P. W.; TAYLOR, J.; KANG, C.; PASCOE, I. AND WINGFIELD, M. J. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45:125-140.
- DOSTERT, N., ROQUE, J., CANO, A., La TORRE, M. I. y WEIGEND, M. 2012. Hoja botánica: Cacao. Giacomotti Comunicación Gráfica S.A.C. Lima, Perú. 19 p.p.
- DOWNER, J. 2006. Diagnosing your oak tree: Part 1 "Diseases". *Landscapes Notes*. University of California.19 (4):12.
- ECURED. 2018. Conocimiento con todo y para todos. Disponible en: <https://www.ecured.cu/index.php?title=Penicillium&oldid=2007058>

- ECKERT, J. W. and OGAWA, J. M. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual. Review of Phytopathol.* 23: 421-454.
- ECKERT, J. W. 1990. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. In Green, M. B.; Lebaron, H. M.; Moberg, W. K. (Eds). *Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies.* ACS Symp. Series 421: 286-302.
- ELLIOTT, M. L. and UCHIDA, J. Y. 2004. Diseases and Disorders of Ornamental Palms. APSnet Features. Online.doi:10.1094/APSnetFeature2004-0304.
- ELLIS, A. M. 2008. *Verticillium* Wilt of Strawberry. Fact Sheet HYG-3012-08. Agriculture and Natural Resources. Ohio State University Extension. Department of Plant Pathology. 2 p.c.
- EVANS, H. C., HOLMES, K. A., REID, A. P. 2003. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology* 52: 476-485.
- EVANS, I. AND HOWARD, R. 1997. Fusarium head blight of barley and wheat. Plant Pathologists. Alberta Agriculture, Food and Rural Development. Alberta Canadá.
- EZZIYYANI, M., PÉREZ, C., AHMED, A., REQUENA, M. AND CANDELA, M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología.* 26:35-45.
- FALARDEAU, J., WISE C., NOVITSKY, L. AND AVIS, T.J. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology.* 39:869-878. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>.
- FARALDO, G. J. D. AND SANSOM, M. S. 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 4:105-116. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1015>.
- FARR, D. F. and ROSSMAN, A. Y. 2014. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Consultado: 09 de abril 2018. Disponible en: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>.

- FÉLIX-GASTÉLUM, R. Y GÁLVEZ-FIGUEROA, C. A. 2002. Control del moho negro, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) en el fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) considerando unidades calor y variables ambientales para la aplicación de azoxystrobin en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20:72-76.
- FERNÁNDEZ, C. Y JUNCOSA, R. 2002. Biopesticidas: ¿La agricultura del futuro?; *Phytoma*, 141: 14-19.
- FGAIER, H. AND EBERL, H. J. 2011. Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup. *Journal of Theoretical Biology*. 273:103-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.12.034>
- FLEMING, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *Br. J. Exp. Pathol.* 10:226– 236.
- FULTON, R. H. 1989. The cacao disease Trilogy: black pod, *Monilia* pod rot and witches' broom. *Plant Disease*. 73: 601–603.
- FUNDESYRAM (Fundación para el Desarrollo Socioeconómico y Restauración Ambiental). 2018. Fecha de consulta: 02 de enero de 2018. Disponible en: <http://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=3742>.
- FRADIN, E. F. and THOMMA, B. P. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. alboatrum*. *Mol. Plant Pathol.* 7(2):71-86.
- GALLEGLY, M.E. Y HONG, C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS Press. 158 p.p.
- GALLI, F., TOKESHI, H., TORRES DE CARVALHO, P., BALMER, E., KIMATI, H., NOGUEIRA CARDOSO, C. AND SALGADO, C. 1968. *Manual de Fitopatología. Doenças das plantas e seu controle*. Sao Paulo, CERES. 640 p.p.
- GARCÍA, L. Y VERASTEGUI, L. 2001. Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de *Aspergillus sp.*, aislada del páramo del

- tablazo, Departamento de Cundinamarca. Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Bogotá D.C. 72 p.p.
- GARCÍA, S. AND HEREDIA, N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia* 162:255-264.
- GAVIRIA-HERNÁNDEZ, V., PATIÑO-HOYOS, L. F., Y SALDARRIAGA-CARDONA, A. 2013. Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 14(1):67-75.
- GONZÁLEZ, C. M. M., TORRES P. I. Y GUZMÁN M. H. 2002. Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. Proceedings of the 16th International Pepper Conference.
- GONZÁLEZ, L. V. W. Y AMAYA, G. 2005. Cacao en México: Competitividad y Medio Ambiente con Alianzas (Diagnóstico Rápido de Producción y Mercadeo). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Agencia Internacional de los Estados Unidos (USAID), Chemonics International Inc. e Iniciativa de Prosperidad Rural y Conservación del Medio Ambiente (IPRC). México. 80 p.p.
- GONG, M., WANG, J. D., ZHANG, J., YANG, H., LU, X. F., PEI, Y. AND CHENG, J. Q. 2006. Study of the Antifungal ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 *in vitro* and Identification of its antifungal substance (Iturin A). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 38:233-240. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00157.x>
- GOWAN, AGROQUIMICOS. 2018. Ficha Técnica Trevanil720FW. Disponible en: <http://www.gowanmexicana.com/productosgmd.php?producto=42&idioma=3&categoria>. Fecha de consulta 30 de abril de 2018.
- GRONDONA, I., HERMOSA, R., TEJADA, M., GOMIS, M., MATEO, P., BRIDGE, P., MONTE, E. AND GARCIA-ACHA, I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology.* 63 (8):3189-3198.

- GUZMÁN, M. 1977. *Micología Médica*. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 386 p.p.
- HANG, N. T. T., OH, S. O., KIM, G. H., HUR, J. S. AND KOH, Y. J. 2005. *Bacillus subtilis* s1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberry. *Plant Pathology*. 21(1):59-63.
- HARDING, P. 1972. Differential sensitivity to thiabendazole by strains of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Plant Disease Reporter* 56 (3): 256-260.
- HARDY, F. 1961. *Manual de Cacao*. Edición español. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, Costa Rica. 439 p.p.
- HARMAN, G., HOWELL, C., VITERBO, A., CHET, I. and LORITO, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*. 2:43-56.
- HAWKSWORTH, D. L., KIRK, P. M., SUTTON, B. C., AND PEGLER, D. N. 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. CAB International, Cambridge, University Press. 770 p.p.
- HERMOSA, M., GRONDONA, E., ITURRIAGA, E., DÍAZ-MINGUEZ, J., CASTRO, C., MONTE, E. and GARCÍA-ACHA, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5):1890-1898.
- HERNÁNDEZ-GÓMEZ, E., HERNÁNDEZ-MORALES, J., AVENDAÑO-ARRAZATE, C. H., LÓPEZ-GUILLEN, G., GARRIDO-RAMÍREZ, E. R., ROMERO-NÁPOLES, J. Y NAVA-DÍAZ, C. 2015. Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 232-246.
- HERNÁNDEZ M, E. L., OLGUIN T, N., QUIROZ O, T. 2012. *Industria del Cacao: Mercado Nacional e Internacional. Técnicas de Investigación*. 43 P.p. disponible en: <https://investigacion-2257-2012-2.wikispaces.com/file/view/trabajo+final+.pdf>

- HERRERA-LÓPEZ, J., PÉREZ-JIMÉNEZ M., LLOBEL A., MONTE- VÁZQUEZ E. AND ZEA-BONILLA T. 1999. Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 261-265.
- HERRERA, P.E., PÉREZ, B.I.M., ALEJO, C. J., SUAREZ, T.J.M. Y SÁNCHEZ, R. E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) k. Schum. y su control *in vitro*. Fitosanidad, 15(4):231-236.
- HJELJORD, L., and TRONSMO, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biocontrol: An Overview, in 135- 151 p.p.
- HOLT, J., KRIEG, N., SNEATH, P., STALEY, J. AND WILLIAMS, S. 2000. Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 787 p.p.
- HOUCK, L. G. 1977. Problems of resistance to citrus fungicides. Proc. Int. Soc. Citric. 1: 263-269.
- HOWELL, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease. 87(1):4-10.
- IRETA, M. J. Y GILCHRIST, L. S. 1994. Roña de la espiga de trigo. Informe especial de trigo No. 20. México, D.F. CIMMYT. 25 p.p.
- ISLA, R. E. y ANDRADE, A. B. 2009. Propuesta para el manejo del cacao orgánico. Fundación Conservación Internacional. Lima Perú. 87 p.p.
- JAIMES S. Y., ARANZAZU H. F. 2010. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en *Monilia* (*Monilophthora roreri*). Corpoica. Colombia. 91 p.p.
- JU, Y. M. and ROGERS, J. D. 1996. A revision of the genus *Hypoxylon*. Mycologia Memoirs 20. APS Press. St. Paul, Minnesota. 382 p.p.
- JU, Y. M., ROGERS, J. D. and SAN MARTÍN, F. 1997. A revision of the genus *Daldinia*. Mycotaxon 61:243- 293.

- KHANZADA, M. A.; LODHI, A. M. AND SHAHZAD, S. 2005. Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. Pakistan Journal of Botany 37:1023-1030.
- KIM, J. S., LEE, J., LEE, C. H., WOO, S. Y., KAMG, H., SEO, S. G. AND KIM, S. H. 2015. Activation of pathogenesis-related genes by the *Rhizobacterium*, *Bacillus* sp. JS, which induces systemic resistance in tobacco plants. Plant Pathology Journal. 31:195-201. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.NT.11.2014.0122>.
- KISHORE, G. K., PANDE, S. AND PODILE, A. R. 2005. Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. Phytopathology. 95:1157-1165. [http:// dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-1157](http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-1157).
- KLICH, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. First edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. 166 p.p.
- KLOEPPER, J. W., RYN, C. M. AND ZHANG, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. Phytopathol 94:1259-1266.
- KULLNIG, C., MACH R., LORITO M. AND KUBICEK C. 2000. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (*T. Harzianum*) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech42 gene expression before mycoparasitic contact. Applied and Environmental Microbiology. 66(5):2232-2234.
- KRIEG, N. R., STALEY, J. T., BROWN, D. R., HEDLUND, B. P., PASTER, B. J., WARD, N. L., LUDWIG, W. AND WHITMAN, W. B. 2010. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Four. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 976 p.p.
- LAYTON, C., MALDONADO, E., MONROY, L., CORRALES, L. C. Y SÁNCHEZ, L. C. 2011. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por topatógenos. Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 9:177-187. <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.501>.

- LEELASUPHAKUL, W., HEMMANEE, P. AND CHUENCHI, S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology technology* 48(1):113-121.
- LESLIE, J. F., SUMMERELL, B. A. AND BULLOCK, S. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Wiley Online Library. Vol. 2: 369 p.p
- LI, H. Y., CAO, R. B. AND MU, Y. T. 1995. *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Protection* 14:187-191.
- LI, Y., GU, Y., LI, J., XU, M., WEI, Q. AND WANG, Y. 2015. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers Microbiology*. 6:883. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>.
- LIU, D., CAI, J., XIE, C., LIU, C. AND CHEN, Y. 2010. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme Microbial Technology*. 46:252-256. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.007).
- LIZARAZO-MEDINA, P. X., MENDOZA-SALAZAR, M. M. Y GUTIÉRREZ-GALLO, A. I. 2014. Diversidad de la microbiota endófito de *Cattleya percivaliana* y *Cattleya trianaei* cultivadas en invernadero. *Actualidades Biológicas*. 37(102):307-318.
- LÓPEZ-BÁEZ, O., RAMÍREZ-GONZÁLEZ, S. I., ESPINOSA-ZARAGOZA, S., MORENO-MARTÍNEZ, J. L., RUIZ-BELLO, C., VILLARREAL-FUENTES, J. M. Y GONZÁLEZ-MEJÍA, O. 2015. Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. *ACTA AGRÍCOLA Y PECUARIA*, 1 (1): 16-23.
- LORITO, M., HARMAN G.E., HAYES C.K., BROADWAY R.M., TRANS- MO A., WOO S.L. AND DI PIETRO A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.

- MAHASUK, P., THUMPING, N., WISE, S., TAYLOR, P. W. J. AND MONGKOLPORN, O. 2009. Inheritance of resistance to anthracnose (*Colletotrichum capsici*) at seedling and fruiting stages in chili pepper (*Capsicum spp.*). *Plant Breeding*. 128: 701-706
- MÁRQUEZ-DÁVILA, K., E. ARÉVALO; B. LEÓN, J. CAYOTOPA, D. OLIVERA, G. J. SAMUELS. 2013. Composición de comunidades de hongos endofitos de cacao nativo en cuencas del alto amazonas del Perú. *Fitopatología*. 45(1):17.
- MARTÍNEZ, F. R., GARCÍA, A. G. Y MELGAREJO, H. J. 2003. Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en el estado de Sonora durante el año 1998. Informe Técnico. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica, Universidad Nacional Autónoma de México*. 2 (72): 187-193.
- MARCANO, M., PUGH, T., CROS, E., MORALES, S., PORTILLO PAEZ, E. A., COURTOIS, B., GLAZMANN, J. C., JAN, M., ENGELS, M., PHILLIPS, W., ASTORGA, C., RISTERUCCI, A. M., FOUET, O., GONZALEZ, V., ROSEMBERG, K., VALLAT, I., DAGERT, M., AND LANAUD C. 2007. Adding value to cocoa (*Theobroma cacao L.*) germplasm information with domestication history and admixture mapping. *Theoretical Applied Genetic* 114, 877-884.
- MARTÍNEZ, G., SARRIA, A.G., TORRES, A.G. y VARÓN, F. 2010. Avances en la investigación de *Phytophthora palmivora*, el agente causal de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. *PALMAS* 31(1): 55-63.
- MARULANDA, M. L., ISAZA. V. L. Y RAMÍREZ, A. M. 2009. Identificación de la especie de *Colletotrichum* responsable de la antracnosis en la mora de castilla en la región cafetera. *Scientia et technica*. 37 (13): 585-590.
- MCGRATH, M. T. 2004. Qué son los fungicidas *Trans. Santamaria. L and Ureta R.J.C.* 2014. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01.
- MESTIZO, Y. A., G. BANDERA, H. AYA, G. SARRIA, F. VARÓN, M. NAVIA Y G. MARTÍNEZ. 2012. Caracterización de síntomas e identificación de

- microorganismos en palmas de aceite afectadas por la pudrición basal del estípote. *PALMAS*. 33(4):13-27.
- MILLER, J. H. 1961. A monograph of the world species of *Hypoxylon*. University of Georgia Press. USA. 158 p.p.
- MOGOLLÓN, O. A. M. Y CASTAÑO, Z. J. 2012. Evaluación *in vitro* de Inductores de resistencia sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 65(1): 6327-6336.
- MOHALI, S., BURGESS, T. I. AND WINGFIELD, M. J. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35:385-396.
- MORA U, J. 1956. Origen y Tipos de Tipos de Cacao. *Suelo Tico (Costa Rica)* 9(36): 196-200.
- MORENO, R. O., VELÁSQUEZ-VALLE, R., SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, G., SIQUEIROS-DELGADO, M. E., CERDA-LEMUS, M. y DÍAZ-MORENO R. 2010. Diagnóstico fitopatológico de las principales enfermedades en diversas especies de encinos y su distribución en la Sierra Fría de Aguascalientes, México. 29:165-189.
- MOTAMAYOR, J. C., RISTERUCCI, A. M., LOPEZ, P. A., ORTIZ, C. P., MORENO, A. AND LANAUD, C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89, 380-386.
- MOTAMAYOR, J. C., LACHENAUD, P., DA SILVA E MOTA, J. W., LOOR, R., KUHN, D. N., BROWN, J. S. and SCHNELL, R. J. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*. 3(10): 3311.
- MONTEALEGRE, J. R., REYES, R., PÉREZ, L. M., HERRERA, R., SILVA, P. AND BESOAIN, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal Biotechnology*. 6:116-127.
- MYCOBANK, DATABASE. 2018. Ubicación taxonómica de *Trichoderma harzianum*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora palmivora*, *Verticillium sp*,

Aspergillus sp, *Nodulosporium* sp, Disponible en:
<http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx>. Fecha de consulta: 15 de mayo.

NAKAMURA, L. K., ROBERTS, M. S. AND COHAN, F. M. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. and *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* subsp. International Journal Systematic Bacteriology. 49: 1211-1215.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). 2018. Disponible en:
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. Ultimo acceso: 09 de enero de 2018.

NAVARRO, P. M., MENDOZA, A. I. 2006. Cultivo del cacao en sistemas agroforestales. Guía técnica para promotores. Río San Juan, NI. 67 p.p.

NEILANDS, J. B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. Journal of Biological Chemistry. 270:26723-26726.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>.

NELSON, P. E., DIGNANI, M. C. AND ANAISSIE, E. J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clinical Microbiology Reviews. 7(4): 479.

NIXON, C.K. 1998. "El género *Quercus* en México". En: *Diversidad biológica de México orígenes y distribución*. UNAM. México. 792 p.p.

OARD, S., RUSH, M. C. AND OARD, J. H. 2004. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. Journal of Applied Microbiology. 97:169-180.

OBANOR, F., WALTER, M., JONES, E., AND JASPERS, M. 2005. *In vitro* effects of fungicides on conidium germination of *Spilocaea oleaginosa*, the cause of olive leaf spot. New Zealand Plant Pathology Protection Society. 58:278-282.

- OCAMPO B, E. G., RIOS B, J. I., SORIA L, Z. B. 2012. LA PRODUCCION DE CACAO EN MEXICO: Investigación del cacao en México. Facultad de Ciencias Agrícolas de la UNAM. México. 47 p.p.
- OCHOA, D. 2004. Determinación de los niveles de sensibilidad en aislamiento colombianos de *Phytophthora infestans* hacia tres fungicidas comúnmente utilizados en su control. Tesis Licenciatura título de microbiólogo industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. 75 p.p.
- OGATA, N. El Cacao. CONABIO. Biodiversitas. 2007, 72: 1-5
- ONGENA, M. AND JACQUES, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiolgy. 16:15-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>.
- ORTÍZ-GARCÍA, C. F., TORRES-DE-LA-CRUZ, M. Y HERNÁNDEZ-MATEO, S. C. 2015. Comparación de dos sistemas de manejo del cultivo del cacao, en presencia de *Moniliophthora roreri*, en México. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 38 (2): 191 – 196.
- PAL, K. K. AND GARDENER, B. M. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. En: APSnet, www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/documents/PHI-biologicalControl.pdf. Fecha de consulta: abril de 2018.
- PAPAVIZAS, G.C. AND LUMSDEN R.D. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology 18: 389-413.
- PARRY, D. W., JENKINSON, P. AND MCLEOD, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. Plant Pathology. (44): 207-238.
- PATÍÑO, L. Y RODRÍGUEZ, M. 2001. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos y evaluación de fungicidas frente a los hongos más relevantes en vid (*Vitis vinifera*), variedad chardonnay en el viñedo San Martín en el municipio de Sogamoso, Departamento de Boyacá. Título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas.
- PATÍÑO, T. C. 2010. Producción *in vitro* de peptinasas por *Colletotrichum acutatum*. Acta Agronómica. 59 (1): 80-90.

- PEGG, K. G., COATES, L. M., KORSTEN, L. AND HARDING, R. M. 2003. Foliar, fruits and soilborne diseases. p. 299-337. In A. W. Whiley AW, Schaffer B and Wolstenholme BN (Eds.). *The Avocado: Botany, Production, and Uses*. CABI Publishing, UK. 560 p.p.
- PERERA, E. AND LAGO, E. 1986. Effect of the light period on mycelial growth and pycnidia formation of *Diplodia natalensis* (Abstr.). *Ciencias de la Agricultura* 26:14-18.
- PÉREZ, D. Y IANNACONE, J. 2006. Control químico de la antracnosis causado por *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo del camu camu (*Myrciaria dubia* Myrtaceae) en Ucayali, Perú. *Fitopatología Brasileira* 31(5):518. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000500015>.
- PÉREZ, G. A., FERNÁNDEZ, O. D., DE VICENTE, A., TORRÉS, J. A Y LÓPEZ, R. F. J. 2005. Resistencia a inhibidores de la biosíntesis de ergosterol y a estrobilurinas en oídio de cucurbitáceas. *Phytoma*, Edic. 173 p.p.
- PÉREZ, C.M., PEÑARANDA, A.L. y HERAZO, M. 2010. Impacto, Manejo y Control de Enfermedades Causadas por *Phytophthora palmivora* en Diferentes Cultivos. Programa de Microbiología. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona. Colombia. 71 p.p.
- PETRINI, L. E. AND PETRINI, O. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia* 38: 216-234.
- PHILLIPS-MORA, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao fungus *Moniliophthora roreri* as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence [Doctoral dissertation]. Reading, UK: Univ. Reading. 349 P.p.
- PHILLIPS-MORA, W., CAWICH, J., GARNETT, W., AND AIME, M.C. 2006 a. First report of frosty pod rot (*Moniliasis disease*) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belice. *Plant Pathology* 55: 584.
- PHILLIPS-MORA, W., COUTIÑO, A., ORTIZ, C.F., LÓPEZ, A.P., HERNÁNDEZ, J. AND AIME, M.C. 2006 b. First Report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rod (*Moniliasis disease*) of cocoa in México. *Plant Pathology* 55: 584.

- PHILLIPS-MORA, W; AIME, M.C.; WILKINSON, M.J. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56: 911–922.
- PHILLIPS, A. J. L., ALVES, A. PENNYCOOK, S. R., JOHNSTON, P. R., RAMALEY, A., AKULOV, A. AND CROUS, P. W. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21:29-55.
- PHILLIPS, A. J. L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M. J., GROENEWALD, J. Z. AND CROUS, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51-167.
- PIETERSE, C. M. J., ZAMIOUDIS, C., BERENDSEN, R. L., WELLER, D. M., VAN WEES, S. C. AND BAKKER, P. A. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52:347-375. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>.
- PICOS-MUÑOZ, P. A., GARCÍA, E. R. S., LEÓN, F. J., SAÑUDO, B. A. Y ALLENDE, M. R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 54-74.
- PITT, J. AND HOCKING, A. 2009. *Fungi and food spoilage* (Springer; New York). 518 P.p.
- PLAN RECTOR CACAO CHIAPAS. 2002. Comité estatal sistema producto cacao en Chiapas número 12. 35 P.p. Disponible en: http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/estatales/EPT%20COMITE%20SISTEMA%20PRODUCTO%20CACAO%20CHIAPAS/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_CACAO_CHIAPAS_2012.pdf
- PLOETZ, R. C. 2003. *Diseases of tropical fruit crops*. CABI Publishing. Wallingford, UK. 76-77 p.c.

- PONTÓN, J., MORAGUES, M. D., GENÉ, J., GUARRO, J., QUINDÓS, G. 2002. Hongos y actinomicetos alergénicos. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao. 272 p.p.
- PRETALI, L., BERNARDO, L., BUTTER ELD, T. S., TREVISAN, M. AND LUCINI, L. 2016. Botanical and biological pesticides elicit a similar Induced systemic response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. *Phytochemistry*. 130:56-63. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.04>.
- RAAIJMAKERS, J. M. AND MAZZOLA, M. 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Reviews of Phytopathology*. 50:403-424. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-17>.
- REPORT ON PLANT DISEASE. 2001. RPD No. 707: *Verticillium* Wilt of Strawberry. Department Of Crop Sciences. University Of Illinois Extension. 4 p.c.
- REY, M., DELGADO-JARANA, J., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M. C. Y BENÍTEZ, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicida. *Revista Iberoamericana de Micología* 17:31-36.
- REINOSO. P. Y., VAILLANT, F. D., CASADESÚS, R. L., GARCÍA, P. E. Y PAZOS, V. 2007. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos patógenos. *Fitosanidad*. 11(1): 35-40.
- RINCÓN, A. M., CODÓN, A. C. y BENÍTEZ, T. 2008. Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol. En: Pallás V., Escobar C., Rodríguez P. P. y Marcos J.F. (Eds.), *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 345-368 p.p.
- RIVERA, M. 2017. Reconociendo los síntomas y signos de la mazorca negra. *Ciencia y Tecnología al Servicio del Sector Cacaotero*. La Lima, Cortés, Honduras. 13: 1-4.

- RIVERO, G.D. 2008. Identificación y control *in vitro* con quitosana y *Trichoderma* spp., de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oriza sativa* L.). Revista de Protección Vegetal. 23(1):67.
- RODRÍGUEZ ALVARADO, G., FERNÁNDEZ PAVÍA, S.P., GALINDO ALONSO, J. 2000. First report of *Verticillium dahliae* causing wilt on *Solanum cardiophyllum* and *Solanum ehrenbergii*. Plant Disease 84(7): 808.1 - 808.3.
- ROGERS, J. D., JU, Y.M. and ADAMS, M. J. 2018. Home of Xylareacea. Mycology. Disponible en: http://mycology.sinica.edu.tw/Xylariaceae/Format/but_YMJ.jpg. Fecha de consulta: 22 de abril del 2018.
- ROMÁN, A. 2014. Manual de métodos y mecanismos de acción de los fungicidas. Control de Enfermedades I. Escuela superior Politecnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Agronómicas. 93 p.p.
- ROMO, D.B., VELÁZQUEZ, V.R., SIQUEIROS, D.M.E., SÁNCHEZ, M.G., DE LA CERDA, L. M., MORENO, R.O. y PÉREZ, M. B. E. 2007. "Organismos con efecto potencial en el declinamiento de encinos de la Sierra Fría, Aguascalientes, México". Investigación y Ciencia, 15:11-19.
- RONQUILLO, N.M. 2012. Etiología de la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en el Ecuador. Tesis de maestría. Universidad De Puerto Rico de Mayagüez. 101 p.p.
- RUBINI, M.R., SILVA-RIBEIRO, R. T., POMELLA, A. W., MAKI, C.S., ARAUJO, W. L., DOS SANTOS, D. R. AND AZEVEDO, J. L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. International Journal of Biological Sciences 1:24-33.
- RUÍZ, R. F. G., CRUZ, V. J. K., NARCISO, Y. ÁVILA, S. N. Y. Y SANTÍZ, R. E. 2016. Evaluación de la sensibilidad *in vitro* ejercida por azoxystrobin, metalaxil-M, tiabendazol, trifloxistrobin, en *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en frutos de papaya (*Carica papaya*). Temas de Ciencia y Tecnología. 20 (60): 57-64.

- RUIZ-RAMÍREZ, R. J., HERNÁNDEZ-MORALES, V., AYALA-ESCOBAR, L., SOTO-ROJAS, S., GERARDO LEYVA-MIR Y J. HERNÁNDEZ-RUIZ. 2015. Hongos asociados a cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) deshidratados y almacenados en Guerrero, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 33(1):12-30.
- RYU, C. M., HU, C. H., REDDY, M. S. AND KLOEPPER, J. W. 2003. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. New Phytologist. 160:413-20. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00883.x>
- SAGARPA-SIAP (2017) Producción Agrícola 2015. Consulta: 02 Enero 2017. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp
- SAHA, A., MANDAL, P., DASGUPTA, S. AND SAHA, D. 2008. Influence of culture media and environmental factors of mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. Journal of Environmental Biology 29:407-410.
- SALAS T, J., HERNANDEZ S, L. Y. 2015. Cacao una aportacion de México al mundo. Revista Ciencia. 33-39 Pag. Disponible en: http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/66_3/PDF/Cacao.pdf
- SALGADO S. C y Cepero, M. C. G. 2005. Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. Revista Iberoamericana de Micología. 22: 99-101.
- SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. E., D. DIAZ, G. DUARTE, P. LAPPE-OLIVERAS, S. SÁNCHEZ AND M. L. MACÍAS-RUBALCAVA. 2016. Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1a: a qualitative change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*. Microbial ecology. 71(2): 347-364.
- SAMSON, R., HOUBRAKEN, J., THRANE, J., FRISVAD, J., AND ERSEN, B. 2010. Food and indoor fungi, CBS laboratory manual series 2: CBS-Fungal Biodiversity Centre, Utrecht. (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre).

- SAN MARTÍN, F. 1992. A mycofloristic and cultural study of the Xylariaceae of Mexico. Ph. D. Thesis. Washington State University. Pullman, Washington. 560 p.p.
- SAN MARTÍN, F., JU, Y. M. y ROGERS, J. D. 1999. Algunas especies de *Hypoxyylon* (Pyrenomycetes, Xylariaceae) de México. Acta Botánica Mexicana. 47:31-53.
- S.A.S., Institute. 2002. The SAS System for Windows, Release 9.0. SAS, Institute, Cary N. C. U.S.A.
- SCHOCH, C.L., SHOEMAKER, R. A., SEIFERT, K. A., HAMBLETON, S., SPATAFORA, J. W. AND CROUS, P. W. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. Mycologia 98:1041-1052.
- SCHMITZ, R. A., ROLF, D., DEPPENMEIER, U. AND GOTTSCHALK, G. 1999. The anaerobic way of life. En The Prokaryotes on line. Ed. M Dworkin. Springer-Verlag, New York, EUA. 1115 p.p.
- SENGHOR, A. L., LIANG, W. J. AND HO, W. C. 2007. Integrated control of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruit in Taiwan by the combination of *Bacillus subtilis* and fruit bagging. Biocontrol Sci Technology. 17(8): 865-870.
- SCHAAD N. W., JONES J.B., CHUN W. 2001. Plant Pathogenic Bacteria. 3er Edicion. Editorial APS PRESS. Estados Unidos. 365pp.
- SHARMA, R. R., SINGH, D. AND SINGH, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50: 205-221.
- SHAHBAZ, M., IQBAL, Z., SALLEM, A. AND ANJUM, M. A. 2009. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). Pakistan Journal of Botany 41:359-368.
- SID AHMED, A., PÉREZ SÁNCHEZ, C. AND CANDELA, M.E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. European Journal of Plant Pathology 106: 817-824.

- SINGH, U. B., MALVIVYA, D., WASIULLAH SINGH, S., IMRAN, M., PA-THAK, N., ALAM, M., RAI, J. P., SINGH, R. K., SHARMA, B. K., SHARMA, P. K. AND SHARMA, A. K. 2016. Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Soil Ecology*: 108:300-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.09.014>.
- SLIPPERS, B., CROUS, P. W., DENMAN, S., COUTINHO, T. A., WINGFIELD, B. D. AND WINGFIELD, M. J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83-101.
- SLIPPERS, B., BOISSIN, E., PHILLIPS, A. J. L., GROENEWALD, J. Z., LOMBARD, L., WINGFIELD, M. J., POSTMA, A., BURGESS, T. AND CROUS, P. W. 2013. Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology* 76:31-49.
- SMOOT, J. J., HOUCK, L. G. and JOHNSON, H. B. 1971. Market diseases of citrus and other subtropical fruits. Washington, U. S. Dept. of Agriculture. *Agriculture Handbook*. 398:115.
- SNOWDON, A. 1991. A color atlas of postharvest. 70-72 p.p.
- SOLDANO, A., GARATE, V., VACCARI, M. C. LATORRE, R. G. LURÁ, M. C. Y GONZÁLEZ, A. M. 2010. Inhibición del crecimiento de *Cercospora kikuchii* por especies de *Bacillus* y efecto sobre la acumulación de cercosporina. *FABICIB*. 14: 97-106.
- SOLÍS, J., RUIZ, P. y ZAMARRIPA, A. 2009. Mejoramiento genético para resistencia, rendimiento y calidad agroindustrial del cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. En: *Memorias de la IV Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal*. Saltillo, MX. 142 p.p.
- SOLÍS, B. J. L. y ZAMARRIPA, C. A. 2010. Evaluación agronómica de genotipos élite de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Soconusco, Chiapas. En: *Memoria XII Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas*. Universidad Autónoma Chapingo (UACH) Chapingo, Estado de México. 276 p.p.

- SORIANO, D. C. J. M. 2007. Micotoxinas en alimentos. Departament de Medicina Preventiva. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España. 397 p.p.
- SOSA, A., CARRERAS, B., FERNÁNDEZ, L. O. Y TORRES, D. 2006. Aislados de *Bacillus* spp., promisorios para el control de hongos patógenos. Fitosanidad 10(2):55.
- SUAREZ, C., FERNÁNDEZ, R., VALERO, N., GÁMEZ, N. Y PEAZ, A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Zacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología. 10(3): 35-43.
- SUMMERELL, B. A. AND LESLIE, J. F. 2011. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? Fungal Diversity. 50(1): 135-144.
- STEFANOVA, M. 1999. Producción y aplicación de *Trichoderma* spp., como antagonista de hongos fitopatógenos. Laboratorio de Bacteriología. La Habana. Cuba. Consultado: 20 de septiembre 2018. Disponible en <http://www.aguascaliente.gob.mx/agro/produce/TRICHODE.htm>
- STEFANOVA, M., LEIVA, A., LARRINAGA, L. Y CORONADO, M. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp., para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 16: 509-516.
- SYNGENTA AGRO, S. A. DE C.V. 2018. Benzimidazol. . Modo de penetración. Disponible en: <http://www.agromich.com/imagenes/productos/tecto/63.pdf>. Fecha de consulta 30 de abril del 2018.
- SYNGENTA CROP, PROTECTION S. A. 2018. Azoxystrobin. Modo de penetración. Disponible en: <http://www.ingagricola.com/wp-content/uploads/2017/04/AMISTAR-50-WG.pdf>. Fecha de consulta 30 de abril del 2018.
- STEFFEK, R., SPORNBERGER, A. and ALTENBURGER, J. 2006. Detection of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil samples and prospects to reduce the inoculum potential of the Fungus in the Soil. Agriculturae Conspectus Scientificus 71 (4): 145-148.

- TABARES, F. 2002. Evaluación *in vitro* de diferentes compuestos químicos agrícolas para el control de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum*, causantes de la antracnosis de los cítricos. Tesis Licenciatura Título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. 78 p.p.
- TEJERA-HERNÁNDEZ, B., ROJAS-BADÍA M. M. Y HEYDRICH-PÉREZ M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 42:131-138. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>.
- THAN, P. P., PRIHASTUTI, H., PHOULIVONG, S., TAYLOR, P. W. J. AND HYDE, K. D. 2008a. Chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. Journal of Zhejiang University Science B. 9 (10): 764-778.
- THAN, P. P., JEEWON, R., HYDE, K. D.; PONGSUPASAMIT, S., MOMGKOLPORN, O., AND TAYLOR P. W. J. 2008b. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chili (*Capsicum* spp.) in Thailand. Plant Pathology. 57: 562-572.
- THYAGARAJAN, S. I., RAMANATHAN, G., SINGARAVELU, S., KANDHASAMY, S., PERUMAL, P. T. AND SIVAGNAM, U. T. 2017. Microbial Siderophore as MMP inhibitor: an interactive approach on wound healing application. Wound Medicine. 17:7-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wndm.2016.12.002>.
- SWIECKI, T. J. and BERNHARD, T. 2006. A field guide to insects and diseases of California oaks. Gen. Tech Rep. PSW-GTR-197. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, 151 p.p.
- TAMAYO, P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. Politécnica 4:51-70.
- THOMSON, W. 1997. Agricultural Chemicals. Book IV: Fungicides, Thomson Publications, Fresno, CA. 12 Edition. 236 p.p.
- TORRES DE LA CRUZ, M., ORTÍZ GARCÍA C. F., TÉLIZ ORTÍZ D., MORA AGUILERA, A. Y NAVA DÍAZ C. 2013. Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis

- del cacao (*Theobroma cacao*). Revista Mexicana de Fitopatología 31:65-69.
- TOURÉ, Y., ONGENA, M., JACQUES, P., GUIRO, A. AND THONART, P. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. Journal of Applied Microbiology. 96: 1151-1160. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- TUCUCH, C. F. M., PALACIOS, P. A., KU, N. R. Y GUZMÁN, E. C. 2005. Manejo del cultivo de mango en el estado de Campeche. Campo Experimental Edzna, INIFAP. Folleto Técnico. Campeche, Camp. México. 33-34 p.c.
- TUSET, J. J. 1987. Podredumbre de los frutos cítricos. Valencia, Esp., Generalitat Valenciana. 206 p.p.
- VALENCIA, A.S. 2004. "Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México". Boletín de la Sociedad Botánica de México. 75: 33-53.
- VAN DER GUCHT, K., JU, Y. M. y ROGERS, J. D. 1997. New *Hypoxyylon* species from Papua New Guinea and notes on some other taxa. Mycologia 89(3):503-511
- VAN TUYL, J. M. 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. Wageningen, Netherland. 77(2)1-136.
- VARELA, F. S. E., OROZCO, S. M., TORRES, A. R. I. Y SILVA, A. G. L. 2013. Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas 428 p.p.
- VÁSQUEZ-LÓPEZ, A., MORA-AGUILERA, J. A., CÁRDENAS-SORIANO, E. Y TÉLIZ-ORTIZ, D. 2009. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn] en el estado de Guerrero, México. Agrociencia 43:717-728.
- VÁZQUEZ, S. L., TAMARIT, U. J. C., QUINTANAR, O. J. y VARELA, F. L. 2004. "Caracterización de la declinación de bosques de encino en "Sierra de Lobos" Guanajuato, México". *Polibotánica*. 17:1-14.
- VAZQUEZ-GARCIDUEÑAS, S., LEAL-MORALES, C. and HERRERA-ESTRELLA, A. 1998. Analysis of the β -1, 3- glucanolytic system of the

- biocontrol agent *Trichoderma harzianum* Applied and Environmental Microbiology. 64(4):1442-1446.
- VENTURA, J. A., COSTA, H. AND TATAGIBA, J. 2004. Papaya diseases and integrated control. p. 201-268. In: Naqvi SAMH (ed.). Diseases of Fruits and Vegetables: Diagnosis and Management. Volume II. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, United States of America. 704 p.p.
- VILLA, P., ALFONSO I., RIVERO M.J. Y GONZÁLEZ G. 2007. *Bacillus subtilis* bioantagonistas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium* ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, Icidca. 41(1):52-56.
- VITERBO, A., RAMOT, O., CHERNIN, L. and CHET, I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie Van Leeuwenhoek 81:549–556.
- VOLPON, L., BESSON, F., LANCELIN, J. M. 2000. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. FEBS Letters 485: 76-8
- WANG, X., WANG, L., WANG, J., JIN, P., LIU, H. AND ZHENG, Y. 2014. *Bacillus cereus* AR156-Induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit. PLOS ONE. 9 (11): e112494. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112494>
- WANG, F., ZHAO, L., LI, G., HUANG, J. AND HSIANG, T. 2011. Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, Central China. Plant Disease 95:1378-1384.
- WEBSTER, J. 2007. Introduction to Fungi. Third Edition. Cambridge University Press. 841 p.p.
- WILSON, B. R., BOGDAN, A. R., MIYAZAWA, M., HASHIMOTO, K. AND TSUJI, Y. 2016. Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential. Trends in Molecular Medicine. 22:1077-1090. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mol-med.2016.10.005>.
- WHITLOCK, B., BAYER, C., y BAUM, D. 2001. Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae “Sterculiaceae” or Malvaceae.), based

don sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Systematic Botany* 26: 240-437.

Wood, G. A. R. 1975. *Cacao*. Ed. C.E.C.S.A. México. 363 p.p.

WULFF, E. G., MGUNI, C. M., MANSFELD-GIESE, K., FELLS, J., LÜBECK, M. AND HOCKENHULL, J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 51(5): 574-584.

YOSSEN, V. E. Y CONLES, M. Y. 2014. Eficacia de fungicidas *in vitro* para el control de *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum*, agentes causales de marchitamiento en el cultivo de orégano en la Argentina. *Revista Industrial y Agrícola Tucumán*. 91(1): 19-25.

ZHANG, B., QIN, Y., HAN, Y., DONG, C., LI, P. AND SHANG, Q. 2016. Comparative proteomic analysis reveals intracellular targets for bacillomycin L to induce *Rhizoctonia solani* Kühn hyphal cell death. *Biochimica Biophysica Acta (BBA), Proteins and Proteomics*. 1864:1152-1159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.003>

ZALOM, F. G., KOIKE, S.T. Y WESTERDAHL, B.B. 2005. Guía para el manejo de las plagas: fresas. Trad. Riesa Bigelow. Publicación 3473. Universidad de California Manejo Integrado de Plaga FRESAS. 70 p.p.

ZAMARRIPA, C. A. y SOLÍS, B. J. L. 2009. Comportamiento de híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) resistentes a moniliasis en el estado de Chiapas. In: Memoria 55 Reunión Anual de la Sociedad del PCCMCA. San Francisco de Campeche, México.