



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN CBS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS.

Producción de conidios de *Cordyceps fumosorosea* EH-510 para el control biológico de moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*) en Tuzantán Chiapas, México.

TESIS

Idónea Comunicación de Resultados

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias.

PRESENTA

Biólogo Izaú Federico Moreno Antillón

Comité tutorial

Directora

Dra. María Judith Castellanos Moguel.

Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

Codirectora

Dra. Sandra Luz Cabrera Hilerio.

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Asesor

Dr. German Pérez García.

Universidad Autónoma de Chiapas.

COMITÉ TUTORAL.



Directora

Dra. María Judith Castellanos Moguel
Departamento El Hombre y su Ambiente.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco



Co-directora

Dra. Sandra Luz Cabrera Hilerio
Departamento Bioquímica-Alimentos.
Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.



Asesor

Dr. German Pérez García
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chiapas.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Departamento de Sistemas Biológicos.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Dra. Sandra Hernández Muñoz
Departamento Ciencias Naturales
División Ciencias Naturales e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Dr. German Pérez García
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chiapas.



CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

Los autores del presente agradecen al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de Maestría otorgada al Biólogo Izaú Federico Moreno Antillón con número de CVU 1230909

Agradezco el apoyo brindado de CONAHCYT, el cual fue fundamental para mi desarrollo académico. Gracias a esta beca, pude participar en este proyecto de investigación y adquirir conocimientos especializados que de otra manera hubieran sido difíciles de alcanzar.

AGRADECIMIENTOS

Doctora Judith por el continuo apoyo, paciencia, motivación y la confianza que me brindo, gracias por permitirme crecer profesionalmente.

Doctora Sandra siempre estuvo en la mejor disposición de apoyar y revisar este trabajo.

Doctor German agradezco las aportaciones realizadas y por ser mi guía de campo.

Doctora Sandra Hernández por su tiempo valioso, su apoyo y paciencia en esta investigación.

Agradezco al laboratorio de **Micología** por los recursos y el espacio brindado.

Agradezco a la **Universidad Autónoma Metropolitana** por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y por las facilidades brindadas.

Quiero externar mi agradecimiento a la **Cooperativa Agroproducciones Integrales Sarabia** a **Don Nico, Nehmías** y **Don Martin** por darme la confianza y abrirme las puertas de su comunidad, permitiéndome la continuación de esta investigación.

Finalmente, agradezco a mi amigo **Israel Rojas** quien me han acompañado a lo largo de estos años universitarios, a las nuevas amistades y colegas que formé en este trayecto.

Gracias por aplaudir cada uno de mis logros y por siempre estar presentes a su manera.

DEDICATORIA

A mis padres **Luis Moreno** y **Emma Antillón** por su apoyo incondicional, su paciencia y su constante motivación. Gracias a su amor he podido llegar hasta donde ahora me encuentro.

A mis hermanos **Nairobi**, **Francisco** y **Aysacin**, que han sido mi apoyo y mi inspiración en todo momento.

Sonia Pérez mi compañera de vida, por su apoyo incondicional, su amor y comprensión durante este proceso.

En honor a el Doctor **Juan Rivera**, que me guio y apoyo en mi camino académico y profesional , siempre creyó en mí y me inspiro a seguir adelante.

Tabla de contenido.

1. Resumen.	4
2. Introducción.	6
3. Marco de Referencia.....	7
3.1 Historia del cacao.....	7
3.2 Cacao en el Mundo.	9
3.3 Cacao en América Latina y el Caribe.	11
3.4 Cacao en México.....	12
4. Marco Teórico.....	13
4.1 <i>Theobroma cacao</i>	13
4.1.1 Taxonomía.....	13
4.1.2 Distribución.	14
4.1.3 Morfología.....	14
4.2 Problemáticas del cacao.	15
4.3 <i>Moniliophthora roreri</i>	17
4.3.1 Taxonomía.....	17
4.3.2 Distribución.....	17
4.3.3 Morfología.....	17
4.3.4 Ciclo de vida.	17
4.3.5 Síntomas externos.	19
4.3.6 Síntomas internos.	19
4.4 Tácticas de prevención, manejo y control de <i>Moniliophthora roreri</i>	20
4.4.1 Prevención:.....	20
4.4.2 Manejo:.....	20
4.4.3 Control Cultural.....	21
4.4.4 Control Químico.....	22
4.4.5 Control Biológico.....	23
4.5 Hongos entomopatógenos.	25
4.6 <i>Cordyceps fumosorosea</i>	26
4.6.1 Taxonomía.....	26
4.6.2 Morfología.....	26
4.6.3 Condiciones de crecimiento, ciclo de vida y usos.....	26

4.6.4 Producción de <i>Cordyceps fumosorosea</i>	27
4.7 Mecanismos de acción del antagonismo.	28
4.7.1 Hiperparasitismo.	28
4.7.2 Antibiosis.	29
4.7.3 Competencia.....	30
4.8 Estado del cultivo de cacao en Tuzantán Chiapas México.	31
5. Justificación.	31
6. Hipótesis.	32
7. Objetivo General.....	32
7.1 Objetivos específicos.....	33
8. Materiales y Métodos.....	33
8.1 Material Biológico.	33
8.2 Área de Estudio.....	33
8.3 Toma de muestras para el Aislamiento de <i>M. roreri</i>	34
8.3.1 Mazorcas.	35
8.3.2. Suelo.	35
8.3.3 Cajas Petri.	35
8.3.4. Papel.	35
8.3.5 Preparaciones en fresco	36
8.4 Propagación del hongo <i>Cordyceps fumosorosea</i> EH-510.	36
8.5 Propagación del hongo <i>Moniliophthora roreri</i>	36
8.6 Placas de Warcup.	37
8.7 Identificación de Géneros.....	37
8.8 Análisis Genético (PCR punto final).....	37
8.8.1 Extracción de ADN.....	37
8.8.2 Cuantificación DNA.....	38
8.8.3 Selección de Primers.	38
8.8.4 Aislamiento de ADN.....	38
8.8.5 Amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa.	38
8.8.6 Visualización en Gel de Agarosa	39
8.8.7 Purificación de DNA.....	39
8.8.8 Secuenciación de ADN.	39
8.8.9 Análisis Bioinformático.....	39

8.9 Evaluación de la capacidad antagónica de <i>Cordyceps fumosorosea</i> EH-510 vs <i>Moniliophthora roreri</i>	39
8.10 Cinéticas de producción de conidios de <i>Cordyceps fumosorosea</i> EH-510.	41
8.11 Conteo de Conidios.	42
8.12 Diagnostico y Aplicación en Campo.	43
8.13 Desarrollo de un programa a corto plazo para introducir el control biológico con <i>C. fumosorosea</i> EH-510 contra <i>M. roreri</i> en la región de Tuzantán Chiapas.	45
9. Resultados.	46
9.1 Sembrado del exterior de la mazorca.	46
9.2 Sembrado del interior de la mazorca.	46
9.3 Placas de Warcup.	47
9.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (punto final).	48
9.4.1 Cuantificación de ADN.	48
9.4.2 Visualización en Gel de Agarosa de <i>C. fumosorosea</i> EH-510 y <i>M. roreri</i>	48
9.4.3. Análisis Bioinformático.	50
9.5 Técnica de Cultivo Dual.	52
9.6 Evaluación de cinéticas de producción de conidios de <i>C. fumosorosea</i> EH-510. ...	58
9.7 Rendimiento de conidios de <i>C. fumosorosea</i> EH-510 en sustrato sólido (Arroz). ...	59
9.8 Diagnóstico de la zona.	61
9.9 Aplicación en campo.	62
9.10 Desarrollo del programa a corto plazo para introducir el control biológico con <i>C. fumosorosea</i> EH-510 contra <i>M. roreri</i> en la región de Tuzantán Chiapas.	67
10. Discusión.	70
11. Conclusiones.	75
12. Recomendaciones.	76
13. Referencias.	77

1. Resumen.

La moniliasis del cacao causada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* es la principal enfermedad que afecta a este cultivo en México, su ataque es severo y constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción, por esa razón como parte del manejo integrado de plagas se propuso encontrar un hongo antagonista, que permita disminuir el uso de químicos y mantener una producción orgánica de cacao, por lo que el objetivo de este trabajo es producir conidios de *Cordyceps fumosorosea* EH-510 para su posterior uso en fincas cacaoteras en Tuzantán Chiapas, México. Este hongo se encuentra en el suelo y puede ser una alternativa viable y amigable con el medio ambiente para el control de la moniliasis en cacao. Se propagó *C. fumosorosea* EH-510 en medio artificial PDA y de *M. roreri* en medio artificial MSA. Posteriormente se realizó un análisis genético estandarizando la técnica de PCR para *M. roreri* se hizo la identificación molecular utilizando las regiones ITS 1 e ITS 2. Para la evaluación de la capacidad antagónica de *C. fumosorosea* EH-510 vs *M. roreri* se utilizó la técnica de cultivo dual medido en la escala de Bell et al;(1982). Se realizó la cinética de producción de *C. fumosorosea* EH-510 para posteriormente asperjar las esporas en la comunidad de Tuzantán Chiapas. El trabajo en campo se realizó en una parcela de la Cooperativa Agroproducciones Integrales Sarabia llamada “La Mandarina” contando con 11 árboles de *T. cacao*. Respecto al desarrollo de un programa a corto plazo para la introducción del control biológico de la moniliasis, los productores de la Cooperativa Agroproducciones Integrales Sarabia tomaron talleres, conferencias y recomendaciones sobre el control de la moniliasis.

Los resultados obtenidos en esta investigación respecto a la prueba PCR, se identificó molecularmente a *M. roreri* como el hongo patógeno. En cuanto a la prueba de antagonismo se obtuvieron 15 platos duales con antagonismo “Muy bueno” y 15 platos duales con antagonismo “Bueno”, dando como resultado 50% con antagonismo “Muy Bueno” 50% con antagonismo “Bueno”, teniendo un PICR de 70.03%, observando en el microscopio lisis celular en las paredes de las hifas del patógeno y penetración de las mismas, provocado por el antagonismo de *C. fumosorosea* EH-510. En cuanto a la cinética de producción de *C. fumosorosea* EH-

510, arrojó que para el día 4 después de la inoculación en arroz comienza un incremento significativo, alcanzando mayores diferencias al día 14 con una producción máxima de 1.44×10^{10} con/gssi, para poder realizar aspersiones en campo. En el trabajo en campo se hizo el reconocimiento del terreno, encontrando mazorcas infectadas con *M. roreri* sobre un río de agua limpia, mazorcas infectadas a un costado del río, mazorcas infectadas creciendo a un costado de mazorcas sanas corriendo el riesgo de que con el viento se dispersen las esporas de *M. roreri*. Se realizaron aplicaciones periódicas bimestrales en la parcela “La Mandarina” con *C. fumosorosea* EH-510, después de dichas aplicaciones se redujo en un 71% la incidencia de *M. roreri*, resultado similar al que se obtuvo en la evaluación de la capacidad antagónica. Los productores de la Cooperativa Integrales Sarabia ahora conocen la información sobre la moniliasis y su transmisión, así mismo desarrollar estrategias efectivas de prevención.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que el hongo entomopatógeno *C. fumosorosea* EH-510 muestra actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *M. roreri*, por lo que puede ser una alternativa de control biológico de *M. roreri*.

2. Introducción.

Para México el cacao, representa tradición, un gran legado cultural por preservar, una gran fuente de riquezas naturales y más que un producto alimenticio es un generador de empleos, identidad de la historia y la economía mexicana. Su cultivo es un pulmón para la región, una fuente de ingresos y hasta hace pocos años una parte importante del Producto Interno Bruto de los estados de Tabasco y Chiapas (Gonzales, 2008; Vidal & Rodríguez, 2021). Su consumo a nivel mundial es significativo, no solo como un producto terminado (chocolate), sino también como ingrediente básico, teniendo una gran valoración de la exquisitez de sus granos para una alimentación saludable (Huamanchumo, 2017).

México presume de tener una cultura rica en tradiciones, una de ellas por la que es internacionalmente reconocidos es la del cacao, cuando se menciona la palabra chocolate en el extranjero, se viene a la mente a México como uno de los fundadores de este producto. Aunque en la actualidad no se cuenta con una importante exportación y una gran producción de cacao, en México se sigue teniendo la cultura del cultivo del mismo (Tornés *et al.*, 2015).

Theobroma cacao es uno de los más importantes cultivos tropicales, esta especie se desarrolla y florece en diferentes agroecosistemas principalmente bajo sombra, mayormente de árboles frutales (Anzules *et al.*, 2018), posee dos centros de diversidad reportados según Bartley (2005) y Solis *et al.* (2015): uno en la Amazonia de América, desde el Sur de Colombia y Venezuela hasta el este del Perú y Bolivia en el Sur, y la otra área de diversificación: en México, América Central y las islas del Caribe. Actualmente el cacao que se comercializa es de dos tipos: común u ordinario (Forastero) que tiene una participación en el mercado mundial del 80-85%, el cacao fino y de aroma (Criollo y Trinitario) que solo tiene el 15-20%, y es utilizado principalmente en la producción de chocolate gourmet (González, 2011; Tadeo & Tolentino, 2020). Entre los países exportadores de cacao fino y de aroma se encuentran: Ecuador, México, Perú y Colombia principalmente (MINAGRI, 2017).

Los productores de cacao en la actualidad enfrentan muchos desafíos para producir y aumentar el rendimiento de cacao, mientras ajustan sus fincas a las

incertidumbres ambientales y socioeconómicas. Mejorar las prácticas de manejo de los sistemas de cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) requiere conocer los factores determinantes que los afectan (Ballesteros *et al.*, 2021).

Entre las enfermedades más frecuentes y devastadoras que afectan la producción y calidad de las cosechas de este cultivo en la actualidad se destaca la moniliasis, cuyo agente causal es el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, este organismo ataca al fruto en cualquier edad de desarrollo y puede ocasionar pérdidas económicas entre un 45 % a 100 %, lo que representa millones de pérdidas por año (Alvarado, 2017), las pérdidas informadas en el año 2001 fueron de 30 % de la producción mundial, con un costo de 51 millones de USD (Bowers *et al.*, 2001), mientras que en 2013 estas ascendieron a 50 mil toneladas (Ploetz, 2016). En el 2022 Peralta *et al.*, (2024) en un estudio menciona que la pérdida total en términos monetarios por moniliasis en Ecuador suma alrededor de USD 45.854,22; cada productor perdió unos USD 460,000 en promedio en ese año (Peralta *et al.*, 2024).

La moniliasis del cacao es la enfermedad más severa del cultivo en México, la cual ocasiona pudrición total de los frutos, en condiciones de temperatura y humedad altas presenta mayor dispersión, provocando en la proliferación y severidad del hongo, dependiente de la zona, la altitud y la época del año (Barrera & Hurtado, 2016).

3. Marco de Referencia.

3.1 Historia del cacao.

Theobroma cacao es el nombre científico muy distintivo que describe muchos aspectos de la historia de un producto alimenticio que se ha cimentado en diferentes culturas, tanto por sus propiedades curativas como por su degustación, pero sobre todo por los efectos que causa en el ser humano (González, 2014).

Cuenta la leyenda que Quetzalcóatl robó una planta a sus hermanos los dioses, pues se decía que la bebida que de ella se preparaba sólo estaba destinada a ellos como un manjar, la sembró en los campos de Tula y pidió a Tláloc que la alimentara con lluvia y a Xochiquetzal que la adornara con flores. La planta creció y se convirtió

en árbol, que a su vez el árbol dio frutos y cuando estuvo listo Quetzalcóatl recogió sus mazorcas, hizo tostar las semillas, enseñó a las mujeres a molerlo y a batirlo con agua en las jícaras; obteniendo así una bebida (chocolate). En un principio era tan apreciada esta bebida, que sólo los sacerdotes y los nobles podían beber de ella (Coe *et al*; 1999; Strong 2020).

De acuerdo con Ogata (2007), el cacao en México fue reconocido mucho antes de la conquista, era utilizado por los olmecas, mayas y aztecas que estaban asentados en el centro y el sur de lo que hoy se conoce como República Mexicana, la llegada del cacao en México se dio con los olmecas (1500 a.C. a 400 a.C.), quienes fueron los primeros en domesticarlo y utilizarlo, los olmecas se localizaban en los llanos del Golfo de México, los cuales abarcan el sur de Veracruz y Tabasco.

Con el tiempo los olmecas desaparecieron dando paso a los Mayas (1000 a.C.-800 d.C.), éstos heredaron los conocimientos de sus antecesores sobre el cacao. El área cacaotera maya se volvió un punto de guerras continuas por el control del comercio y las zonas productoras de cacao donde las comunidades que la conformaban peleaban continuamente (Coe *et al*; 1999).

En la cultura maya, para los infantes era común hacer el rito de iniciación que marcaban su entrada en la comunidad y conexión con los dioses, en la práctica se asemejaba mucho a lo que se conoce como el “bautismo cristiano”. El ritual consistía en colocar al niño dentro de un cuadrante formado por una sogá sostenida por cuatro ancianos en cada esquina, estos eran la representación de los dioses de la lluvia, al mismo tiempo que un sacerdote ungía a los niños en el rostro, pies y manos con agua de cacao; también se utilizaba en rituales matrimoniales en donde el novio y la novia intercambiaban cada uno cinco granos de cacao, como símbolo de la abundancia, esto a su vez asemeja el intercambio de arras en la religión cristiana (Ibarra, 2003).

Para los aztecas y los mayas las bebidas de cacao tuvieron un valor más allá que el de sólo un alimento, se utilizaba en los rituales como conexión con los dioses y en los banquetes de la clase dirigente les daba riqueza y estatus, los nobles y los mercaderes utilizaban el cacao como moneda de intercambio, la relación entre ellos

se basó principalmente en la guerra y el intercambio de éste producto; ésta tuvo tal influencia que su uso se extendió hasta lugares tan alejados como Nicaragua y Brasil (Pérez, 2006).

Con el tiempo los aztecas lograron controlar, toda la zona del Soconusco y en una sociedad estratificada como la de los aztecas, su significado iba más allá de un simple alimento, era un símbolo de riqueza, estatus, energía, fertilidad y conexión con lo divino; el chocolate era símbolo de distinción ya que éste sólo lo consumían los señores de linaje real, los comerciantes y los guerreros. El cacao era consumido en una bebida que llamaban xocolatl (xococ, agrio, atl, agua), ésta se preparaba con cacao puro, agua, miel, y algunas veces, harina de maíz, le atribuían múltiples virtudes entre ellas calmar el hambre y la sed, proporcionar la sabiduría universal y curar las enfermedades (García, 1994).

Cuando Hernán Cortés conquistó México, tuvo un papel importante en la historia del cacao, entre otras cosas al conocer el árbol de cacao, se dio cuenta del valor que los aztecas le daban al fruto, observó que no solamente era un excelente alimento, éste también aumentaba la resistencia del organismo y evitaba las fatigas corporales (Díaz, 1986).

Cortes se enamoró del xocolatl, que era la bebida hecha a partir del cacao, decidió adoptar los granos de cacao como forma de pago y era la única moneda de validez universal, además los impuestos a los aztecas en las provincias conquistadas se pagaban con semillas de cacao, el trueque era sin lugar a duda el método más popular de obtención de mercancía en el México antiguo, vigente aún en la actualidad, cuando Hernán Cortés envió el primer cargamento de cacao a España en 1524, se convirtió en una bebida popular entre la nobleza (Shuhmanche *et al.*, 2000). En la actualidad el cacao se produce en América Latina y en el continente africano principalmente.

3.2 Cacao en el Mundo.

El cacao es un producto muy valorado en todo el mundo, no solo por su sabor y aroma sino también por sus propiedades medicinales y culturales. Para el 2021 la producción mundial de cacao fue de 4.84 millones de toneladas al año, con 5.5

millones de pequeños productores y una superficie de producción de 0.2 a 1.5 hectáreas, los porcentajes de los principales productores para ese año fueron: 1. 45% Costa de Marfil, 2. 18% Ghana, 3. 7% Ecuador, 4. 6% Camerún, 5. 5% Nigeria, 6. 4% Brasil, 7. 4% Indonesia, 8. 2.1% Perú, 9. 2.1% República Dominicana, 10. 2% Colombia, 11. 0.8% México. El cacao es un importante generador de ingresos en exportaciones, da empleo y bienestar en las zonas rurales. El continente africano es el principal productor de cacao con el 73 % y del 64 % de la superficie mundial está sembrada con cacao; los países de América contribuyen con el 17 % de producción mundial y el 17 % del área sembrada de cacao; mientras que Asia y Oceanía aportan el 10 % de la producción y el 19 % de la superficie sembrada (Muñoz, 2021).

La demanda mundial de cacao ha crecido en más de 35% anual para el año 2019, coincide con la reactivación de mercados, para cacaos especiales como orgánico, comercio justo y cacaos de origen (Córdova *et al.*, 2021) lo que permite prever una carencia de 150.000 toneladas de cacao para el año 2020, la mayor en 50 años (Jerez & Richardson, 2018). A partir del año 2012 se denotó una importante reducción de la tasa de crecimiento de dicha producción a nivel mundial, estimándose una disminución de 300 000 toneladas con respecto a la alcanzada en la cosecha del año anterior (Arvelo *et al.*, 2016). La demanda de cacao sigue siendo alta, es importante considerar las condiciones climáticas, las lluvias, las temperaturas y la humedad relativa son parámetros que tienen un impacto sobre la producción cacaotera, la variabilidad de los factores climáticos afectan el ciclo fisiológico del cultivo, pero además condicionan la probabilidad de incidencia de las plagas y enfermedades, razón por la cual la producción de cacao ha sido interanualmente errática (ICCO, 2016).

La producción mundial de cacao cayó de 4 313,000 t en 2011 a 4 052,000 t en 2012; es decir 6%, aunado a esto existen otros problemas como el predominio de unidades de producción pequeñas, deforestación, baja productividad, plantaciones viejas, volatilidad de precios, el cambio climático, así como la presencia de plagas y enfermedades (ICCO, 2013).

Mucha de la oferta mundial proviene del continente africano donde se produce la mayor cantidad de cacao en el mundo, siendo Costa de Marfil, Ghana, Nigeria, Camerún los países más representativos, ya que juntos obtienen alrededor de 2.752 mil toneladas por año, el continente asiático, en este caso, sólo Indonesia produce alrededor de 738 mil toneladas. En América, Brasil y Ecuador son los principales productores: 235 y 138 mil toneladas respectivamente (FAO, 2018).

3.3 Cacao en América Latina y el Caribe.

El cacao es un producto muy importante en América Latina y el Caribe donde se cultiva desde hace miles de años, desde México hasta Brasil; este último es el más importante en hectáreas sembradas, ya que representa el 40% del total de la región. Los países que le siguen en cantidad de hectáreas sembradas son Ecuador (24%), Colombia (9%), República Dominicana (9%), Perú (6%) y Venezuela (4%) (FAO,2018).

En América Latina y el Caribe, a pesar de la problemática descrita previamente a nivel mundial, ha existido un incremento sostenido en la superficie de cultivo. Desde el año 2006 hasta el 2016 la misma aumentó en más de 377 mil hectáreas. La ampliación de la superficie de cultivo está concentrada en cinco países: Ecuador, Colombia, Brasil, Perú y República Dominicana, pues, en conjunto incrementan alrededor de 354 mil hectáreas. Colombia y Perú incrementaron la superficie de cultivo en más del 100% para el 2016 si se la compara con el 2006 (FAO, 2018).

La producción en América Latina y el Caribe se logra con más de 350 000 familias de productores, 1,750,000 personas dependen o se benefician directamente de ésta. El consumo per cápita de chocolate en Suiza es de 11.9 kilos al año, mientras que en México es de solo 750 gramos (Avendaño *et al.*, 2021).

En América Latina y el Caribe se ha dado un importante incremento en la producción cacaotera para exportación, en el 2016 los países de la Unión Europea fueron los que más importaron cacao (64% del total), seguidos por los países de Asia (20%) y Norte América (16%). Entre los países latinoamericanos se destaca Ecuador con un 4% y Brasil el 3% de participación en el mundo en la producción (ProEcuador, 2019).

En América Latina y el Caribe, el cacao es un producto que cada vez toma mayor importancia en la economía de los países de la región, especialmente en áreas rurales. Los ingresos de los países por efecto de las exportaciones de cacao son crecientes desde el 2000. Para el 2016, los ingresos por efecto de las exportaciones se alcanzaron 165 mil millones de pesos. El análisis de los ingresos venidos de la comercialización de cacao, desde los países más representativos de la región, indica que Ecuador es el que mayores cifras reporta, seguido de Brasil, Perú y República Dominicana (Córdova *et al.*, 2021). Cabe destacar que otro país de gran importancia en la producción de cacao es México como se describe a continuación.

3.4 Cacao en México.

El cacao es un producto muy importante en México, donde se cultiva desde la época prehispánica, durante la década del 2000, México se encontró dentro de los 12 principales países productores, con 43,000 toneladas aportando el 1% de la producción mundial. En el caso del rendimiento, México ocupa el 11.º lugar a escala mundial, ya que está por el orden de los 597 kg/ha en rendimiento en la producción de cacao (Ramírez, 2008; Morales *et al.*, 2021).

El trópico mexicano presenta condiciones agroecológicas favorables para el desarrollo de cultivos perennes como el cacao, que se distribuye en forma natural en los estratos medios de las selvas cálidas húmedas del hemisferio occidental, a 18° latitud norte. En México se produce principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas. A pesar de que, en otros países de América Latina, ha aumentado, en nuestro país la superficie sembrada con la producción de cacao ha disminuido al pasar de 75,356 ha y 36,360 t en 1980 a 64,143 ha y 27,618 Ton en 2012 (SIAP, 2014).

En el año 2018 Tabasco contaba con una superficie sembrada de 40, 886.26 (ha), con un valor de producción de cacaos perennes de \$733 654.39 siendo este el más alto, seguido de Chiapas con \$340 298.17 respectivamente (Vidal & Rodríguez, 2021). Los factores que se mencionan a continuación son la causa de esta tendencia a la baja: bajos rendimientos, cambio climático, la edad avanzada de las plantaciones, deforestación, los altos costos de producción, presencia de plagas y

enfermedades, el exceso de intermediarios y la dependencia de precios internacionales (Díaz *et al.*, 2013).

En el estudio más reciente México produjo 28,607 toneladas anuales de cacao; Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Guerrero son los principales estados productores; el consumo representa 0.6% del gasto total realizado en alimentos y bebidas por las familias mexicanas (Muñoz, 2021).

La producción de cacao en México está en manos de 37 mil productores, es cultivado principalmente por comunidades de pueblos originarios de Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Guerrero. En Tabasco en 10 de los 17 municipios se siembra esta planta, los municipios de Comalcalco, Cárdenas, Cunduacán y Huimanguillo concentran el 87% de la producción de la entidad. En Chiapas se cultiva principalmente en cuatro regiones: Norte, Centro, Soconusco y Selva-Norte. El cultivo de cacao representa una magnífica oportunidad para implementar alternativas de desarrollo cultural y económico. El cacao mexicano se consume en países como Bélgica, Francia y Estados Unidos, constituyendo hacia este último un 39.4% de la exportación del cacao nacional (Díaz *et al.*, 2013).

Trabajos realizados por la Universidad Autónoma de Chiapas (2006), determinaron que el 73% del cacao que se cultiva en el estado de Chiapas es por tradición y el 27% lo ha sembrado por considerar que el cacao es rentable y le permite obtener ganancias. De ahí que el 65% de los productores principalmente ha heredado la plantación esto refleja la explotación tradicional del cultivo, en las regiones productoras. Para un buen manejo de estos plantíos es importante conocer la taxonomía del cacao.

4. Marco Teórico.

4.1 *Theobroma cacao*.

4.1.1 Taxonomía.

El cacao (*Theobroma cacao*, L.), es una especie del género *Theobroma*, de la familia de las Malvaceae, la cual cuenta a la fecha con más de 22 especies (ICCO, 2016); es un árbol pequeño, pero económicamente importante. Taxonómicamente

el género *Theobroma* y sus respectivas especies estaban circunscritas a la familia Sterculiaceae (Cronquist, 1988), actualmente por nuevas disposiciones está posicionado en la familia Malvaceae (Bremer *et al.*, 2009).

4.1.2 Distribución.

Se cultiva en las regiones tropicales entre 15°N,15°S de la línea ecuatorial. No obstante, se puede encontrar hasta las latitudes subtropicales de 18° N y 20° S de la línea ecuatorial, su altura ideal de cultivo más o menos a 400 msnm. (MINAGRI, 2016).

4.1.3 Morfología.

Árbol. Es un árbol perenne, se encuentra en floración durante todo el año, la altura promedio es de entre los 5 y los 10 m de altura, aunque puede alcanzar alturas hasta de 20 m o más, crece libremente bajo sombra intensa (de otros árboles más grandes como cocotero y platanero entre otros), estos le brindan protección del viento y requieren de un suelo rico en nitrógeno, magnesio, potasio y que sea poroso. Su temperatura ideal de crecimiento es desde los 20 C° a los 30 C°. Tiene un tronco recto inicial principal, que alcanza de 80 cm a 120 cm de altura, a partir de donde crece la primera horqueta (ramas secundarias) el mismo que se emite a partir de los 8 a 12 meses de edad, en ese punto nace un piso con tres a seis ramas principales que forman el esqueleto del árbol, este se puede desarrollar en formas muy variadas, según las condiciones ambientales y de manejo, así como a la densidad de plantación (Quiroz y Elizalde, 2014).

Raíz. Es pivotante y extensa, los primeros meses puede desarrollarse normalmente entre 120 a 150 cm, alcanzando en suelos sueltos hasta 2 m, un poco por debajo del cuello del tronco, nacen muchas raíces secundarias (hacia los lados), el mayor volumen (entre 85 a 90%) de las cuales se ubican en los 25 cm iniciales del suelo en el contorno del árbol, en el área de su propia sombra; sin embargo, es posible encontrar árboles con raíces muy alejadas del tronco principal (Arvelo *et al.*, 2017).

Frutos. Los frutos de cacao cuando maduran se vuelven de un color rojo o amarillo purpúreo y pesan aproximadamente 450 g, maduran entre 5 y 6 meses después de la polinización, y son de tamaño y forma muy variable, generalmente son una baya

grande de unos 30 cm de largo y 10 cm de diámetro. Le sostiene un pedúnculo no muy largo que fluctúa entre 3 y 5 cm, pero robusto. Los frutos tienen cinco lóculos y cada lóculo tiene dos partes formadas por dos carpelos o un surco interno, lo que en algunos frutos es evidente y en otros casi ha desaparecido, cuando están maduros la cáscara se separa de las semillas que germinan o se van secando si no se cosechan a tiempo (Quiroz y Elizalde, 2014).

Semillas. Son de tamaño variable de 1.2 a 3 cm de longitud, cada fruto contiene de 20 a 40 semillas cubiertas con un mucílago o pulpa de color blanco cremoso, aromas y grados de acidez, dulzura y astringencia, este mucílago permite diferenciar algunos genotipos de cacao, por su sabor. Al interior están los cotiledones que pueden ser de color morado, violeta, rosado o blanco que también permite diferenciar algunos genotipos, las dimensiones son variables, oscilando un diámetro de 1 a 1.7 cm y el espesor 0.7 a 1.2 cm, la forma también es variable puede ser ovoide, elíptica, alargada y aplanada, dependiendo de las variedades, número de semillas por fruto y condiciones climáticas. Los cotiledones son las partes que tienen los nutrimentos para la próxima planta, una vez secas, las semillas alcanzan pesos entre 0.8 y 1.5 gr cada una, fermentadas y secadas adecuadamente se comercializan para hacer el chocolate (Quiroz y Elizalde, 2014)., en la actualidad dichos plantíos cuentan con ciertas problemáticas que a continuación se mencionan.

4.2 Problemáticas del cacao.

La producción de cacao es muy importante en países tropicales, sin embargo, el cultivo de cacao enfrenta varios problemas y riesgos que limitan el aumento de la productividad y por tanto causan un daño a la economía de los pequeños productores cacaoteros. La presencia de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la mazorca negra o pudrición parda (*Phytophthora palmivora*) y la escoba de brujas (*Crinipellis perniciosa*) ya ha sido reportada en muchos países en América Latina. Según Anzules *et al.*, (2018), en los países de América Latina el cacao presenta un 49,4% de moniliasis que es la enfermedad más severa, seguida de la mazorca negra con un 3,7% y la escoba de brujas con un 1,2%. Además, el 43,2% de

productores reporta el ataque de más de una enfermedad disminuyendo un 50% hasta 100% de la producción de mazorcas de cacao (Anzules *et al.*, 2019).

Phillips (2006), menciona que *M. royeri* se describió por primera vez en Colombia en el año 1817; desde entonces se ha dispersado a 11 diferentes países sur y centroamericanos productores de cacao como Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Honduras, Guatemala, Belice y México, ocasionando pérdidas superiores al 90% de la producción y el abandono del cultivo por miles de productores a lo largo del continente americano, situación que ha causado efectos negativos en la comunidad de cacaocultores y en los agroecosistemas. La moniliasis destruye los granos, la pulpa y la cascara de cacao, un gran número de esporas del hongo son transportadas por el aire, este hongo les da a las vainas una apariencia escarchada, y sin duda, son una vía para transmitir la enfermedad a otras regiones productoras de cacao (Phillips 2006).

La enfermedad que causa la destrucción generalizada de cacao en todo el mundo es la vaina negra, que es causada por varias especies de *Phytophthora*, una especie, es *P. megakarya*, se está extendiendo a lo largo de África Occidental, que es la región con la mayor área cultivada con cacao y causa grandes pérdidas. La enfermedad de la vaina negra de cacao es un problema económico serio en todas las áreas del mundo donde se produce este cultivo, aunque en América Latina aún no está tan extendida. Las pérdidas anuales debido a la vaina negra pueden variar entre 30-90% de la cosecha. Esta enfermedad es especialmente grave en África occidental y central, región que contribuye al 60-70% de la producción mundial de cacao en grano (Bowers *et al.*, 2001; Ramírez, 2016).

En Brasil, la producción de cacao en grano se ha reducido de 400,000 a 100,000 toneladas métricas en tan sólo 10 años, en gran parte como resultado de la infección por *C. pernicioso*, este hongo se ha diseminado más allá de Brasil en Perú, Ecuador, Venezuela, Colombia en América del Sur y Panamá en América Central. El patógeno también se encuentra en las islas caribeñas de Trinidad y Tobago (Bowers *et al.*, 2001). Por esta razón es importante conocer la taxonomía de dicho patógeno.

4.3 *Moniliophthora roreri*.

4.3.1 Taxonomía.

La historia taxonómica de *M. roreri*, ha pasado por varios cambios desde la primera identificación de este patógeno. Phillips-Mora (2005) examinó los caracteres estructurales de *M. roreri* y encontró que la estructura interna del micelio del hongo es más típica de basidiomicetos que de los ascomicetos describiendo el nuevo género (*Moniliophthora*) como un basidiomiceto en estado asexual, por lo tanto *M. roreri* fue ubicado dentro del Phylum Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Agaricales, Familia Marasmiaceae, Género *Moniliophthora*, especie *Moniliophthora roreri*.

4.3.2 Distribución.

La enfermedad fue reconocida tempranamente en 1817 en el noreste de Colombia. El patógeno se encuentra presente en Belice, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Nicaragua, México, Panamá, Perú y el noreste de Venezuela (Phillips-Mora, 2007).

4.3.3 Morfología.

Posee micelio hialino, ramificado, septado con doliporos típicos (Torres, 2010). Su reproducción se realiza asexualmente por conidios, los cuales son la única estructura hasta ahora conocida capaz de causar infección (Evans *et al.*, 2003). Los conidios pueden ser globosos de 7 a 10.5µm, subglobosos de 6.3 a 9.3µm y elípticos de 7.5 a 11.6µm, (Villavicencio *et al.*, 2010) y presentan una pared gruesa de hasta 2µm (Evans *et al.*, 2003).

4.3.4 Ciclo de vida.

El agente causal de la moniliasis muestra una fase biotrófica, necrotrofica y otra hemibiotrófica durante el desarrollo de la enfermedad, la especie fitopatógena causa daños necróticos en el tejido interno del fruto, lo que culmina en la mayoría de los casos en la pérdida de éste (Hipólito-Romero *et al.*, 2017), el genoma de *M. roreri* codifica proteínas relacionadas con fenómenos de retrotransposición (proteínas transposasas), su finalidad es la transferencia de material genético entre organismos, este microorganismo produce toxinas específicas en las células del

hospedero (Tiburcio *et al.*, 2010), las proteínas secretadas en la fase hemibiotrófica son proteínas ricas en cisteína (SCP), peptidasas tipo S8 y celulasas que se asocian principalmente con la descomposición de la pared celular del fruto de cacao (Hipólito-Romero *et al.*, 2020).

Este hongo presenta un período de incubación largo de 3 a 8 semanas dependiendo de la edad del fruto, aunque el ciclo es más corto en climas calientes y húmedos que en climas frescos. En días de lluvia y calor los síntomas de la enfermedad aparecen de los 15 a 20 días en frutos tiernos (Mamani, 2019). Se considera que la primera etapa menor a tres meses de desarrollo del cacao es la más susceptible a la infestación del hongo. El ataque inicial es en la parte interior del tejido; produce nuevas hifas infectivas alcanzando de esta manera intracelular su forma adulta, al emitir conidióforos ramificados para propagarse e iniciar la manifestación de los síntomas en la mazorca. A los dos o tres días de la colonización total en el interior, aparecen manchas color café, dependiendo de las condiciones climáticas se producen esporas, las mismas que se desprenden y son fácilmente transportadas por el viento, dando inicio un nuevo ciclo en mazorcas sanas. Después de la destrucción total de los tejidos, pasado los cuatro meses pocas mazorcas se puede aprovechar ya que la enfermedad alcanzó la madurez, momificando los frutos (Phillips Mora & Cerda, 2009).

Independientemente de las condiciones ambientales, el hongo inicia su ciclo de vida, generalmente cuando comienza la época seca, una vez que los propágulos de los frutos infectados inician la dispersión de las esporas, ya sea por corrientes de aire, vibraciones del árbol durante la cosecha o poda; normalmente no se necesitan lluvias abundantes para que estas esporas puedan iniciar la infección, tan solo con el rocío de la noche y la madrugada la espora puede tomar el líquido necesario para iniciar este proceso. Situación que explica por qué en países con estaciones secas prolongadas el hongo logra mantener su ciclo infeccioso (Martínez, 2015).

Las esporas llegan a la superficie de las mazorcas, se adhieren, ahí germinan y penetran la mazorca directamente desde la epidermis de los frutos, a través de la cutícula o las estomas y colonizan los tejidos internos (Bailey *et al.*, 2017). El hongo

invade los tejidos del mesocarpo y exocarpo de forma intracelular, dando lugar a la necrosis. En la superficie del fruto, las manchas necróticas se cubren de micelio y abundante esporulación; de esta manera, *M. roreri* completa su ciclo de vida (Torres *et al.* 2019).

4.3.5 Síntomas externos.

Como se observa en la figura 1 descrito por López-Báez (2015); las mazorcas infectadas con edad menor a un mes presentan maduración prematura, marchitez y secamiento, los frutos de uno a tres meses presentan deformaciones o abultamientos, luego de los primeros síntomas, las mazorcas de dos a tres meses presentan una mancha de color marrón, a los pocos días sobre la mancha marrón inicia la esporulación y aparece el micelio, seguido de esporas de color crema sobre las lesiones iniciales. Algunos frutos de 60 a 80 días pueden completar su desarrollo sin síntomas externos y la maduración de las esporas viene después de los tres meses de esta manera, *M. roreri* completa su ciclo de vida (Bailey *et al.*, 2013).

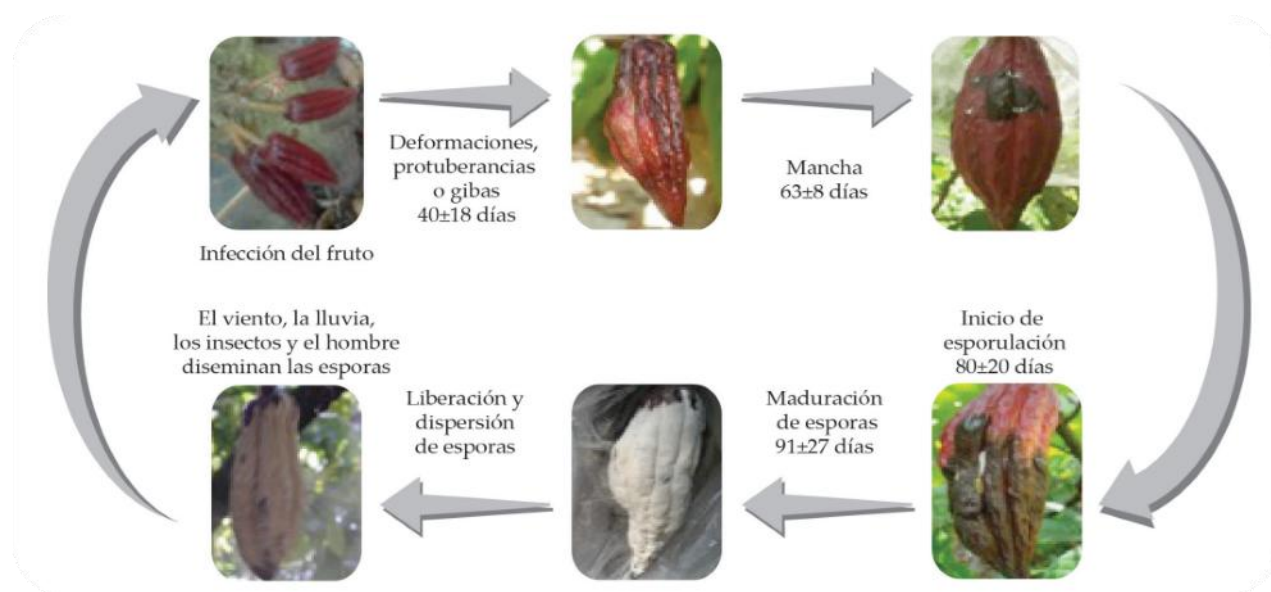


Figura 1. Ciclo de la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri* en *Theobroma cacao* (modificado de López-Báez *et al.*, 2015).

4.3.6 Síntomas internos.

Los tejidos centrales tales como la pulpa y la cáscara forman una sola masa en donde los tejidos son rodeados por una sustancia acuosa producida por la

descomposición, así como también las semillas destruidas parcial o completamente, dependiendo del tiempo de infestación de los frutos (Mora & Fiallos, 2012). Se pierden casi todas las semillas, sin importar la edad del fruto (Villavicencio & Jiménez 2010).

A pesar de la importancia de esta enfermedad, son pocos los estudios llevados a cabo para controlarla de forma eficiente y ecológicamente aceptable. Así, el manejo de las enfermedades requiere enfoques integradores con un proceso de identificación y prevención con un componente agronómico, genético, biológico y químico, evitando de esta forma la creación de resistencia por parte de los hongos, y disminuyendo los efectos nocivos al ambiente. Es importante que los componentes del manejo integrado de enfermedades tengan estrecha relación con los factores climáticos de cada zona, siendo necesario el estudio del manejo integrado en estas regiones (Bowers *et al.*, 2001; McElroy *et al.*, 2018). Para mitigar daños provocados por *M. roreri* se deben acatar las siguientes sugerencias de prevención, manejo y control.

4.4 Tácticas de prevención, manejo y control de *Moniliophthora roreri*.

4.4.1 Prevención:

- Los países libres de la infección deben prohibir la introducción de mazorcas de áreas infestadas, sobre todo de campos de producción. El patógeno tiene un largo periodo de latencia que puede burlar la vigilancia.
- Preferiblemente debe usarse una cuarentena intermedia y tratar mazorcas con fungicidas.
- Entrenar inspectores de frontera e investigadores en detección de la moniliasis. (Jiménez, 2016).

4.4.2 Manejo:

- Saneamiento, destrucción de residuos de mazorcas infectadas antes de que comiencen a esporular, para prevenir la dispersión de la misma, se sugiere que sea con frecuencia semanal.
- El corte de la mazorca infectada debe ser hecho al pedúnculo del fruto.

-Realizar podas regulares para mantener follaje con porte bajo y poder desarrollar saneamientos.

-Recoger en los lugares donde hay picos de cosecha todas las mazorcas sanas y si hay presencia de mazorcas infectadas retirarlas inmediatamente y no esperar al final de la cosecha para interrumpir su ciclo y evitar la dispersión de esporas.

-Monitoreo regular para detectar tempranamente la presencia de la enfermedad.

-Aplicaciones de fungicidas (preferentemente de cobre) de forma frecuente, sin embargo, los costos son un problema.

-Uso de antagonistas.

-De acuerdo con Torres *et al.* (2019), el uso de variedades resistentes es la mayor promesa para el manejo de la enfermedad, haciendo énfasis en la obtención de líneas híbridas de cacao resistentes al patógeno.

Jiménez (2016), menciona que las estrategias de manejo y control de plagas son métodos de implementación de acciones particulares. Existen diversos tipos de tácticas que pueden actuar preventiva y/o curativamente las cuales son:

4.4.3 Control Cultural.

Son prácticas de cultivo que implican modificar estrategias agronómicas y de manejo que ayudan a prevenir y reducir la incidencia y severidad de la enfermedad, pueden ser empleadas de manera que se crean condiciones desfavorables al desarrollo de la plaga, y favorables al desarrollo del cultivo como son la preparación de suelo, ajuste de fechas de siembra, rotación de cultivos, eliminación de malezas o arvenses, actividades sanitarias, manejo de residuos etc., el desarrollo de variedades resistentes constituye un elemento importante para el control, pero resulta muy costoso y se requiere de mucho tiempo para su obtención (Zepeda, 2018).

En el combate de la moniliasis del cacao, el manejo cultural ha sido el método más utilizado, en el cual se ha incluido el control de arvenses, mejoramiento del drenaje de la parcela, poda del árbol de cacao y de los árboles de sombra (Torres *et al.*,

2019). Así también, la eliminación total de frutos enfermos en periodo de baja o nula producción (Bateman *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2019). Los frutos con aspecto de ceniza se deben tumbar o remover en las primeras horas de la mañana o en la tarde después de las 16:00 pm, evitando el desprendimiento de los conidios y dándole las condiciones menos favorables para su desarrollo, y por último dependiendo de la cantidad de estos, puedan enterrarse o ser trasladados a otro sitio (Sánchez *et al.*, 2003; Armengot *et al.*, 2020).

4.4.4 Control Químico.

Entre los diferentes métodos de control empleados para la disminución de estas enfermedades se encuentra la implementación de productos químicos para eliminar o reducir la población del fitopatógeno, los cuales son eficaces en la mayoría de los casos, pero causan daños graves al entorno, entre ellos al suelo y a los seres humanos (Tirado *et al.*, 2016). Los productos a base de oxiclورو de cobre (OC) han mostrado la mayor efectividad en el control de la enfermedad de la moniliasis del cacao, pero los resultados en la mayoría de los casos, son variables y no económicos comparados con el manejo cultural. Actualmente, en el mercado nacional existen diversos fungicidas protectantes como son: sulfato de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso, oxiclورو de cobre y polisulfuro de calcio, todos presentan una categoría toxicológica de 5 (siendo 5 la categoría menos toxica y 1 la más tóxica). Así también, existen fungicidas sistémicos con capacidad de translocación y con efecto de eliminación de infecciones recién establecidas, los cuales pueden ser utilizados en etapas tempranas de desarrollo de la epidemia (Bateman *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2019). Estos fungicidas pueden ser evaluados contra *M. roreri* e incluirse en programas de manejo de la moniliasis del cacao.

El control químico también produce otros efectos como: brotes de enfermedades secundarias, resurgencia de enfermedades y disminución de las poblaciones de enemigos naturales. A partir de esa situación, se hace necesario desarrollar métodos de manejo de enfermedades compatibles con el ambiente, uno de los cuales es el control biológico (Pacheco *et al.*, 2019).

4.4.5 Control Biológico.

El control biológico implica el uso de organismos vivos o productos derivados de ellos para prevenir o reducir la incidencia de la enfermedad como parte del Manejo Integrado de Plagas (MIP), utiliza diversas técnicas para mantener o administrar la población de las plagas y enfermedades en equilibrio a niveles inferiores a los que provocan un daño económico, al tiempo que se mantiene la calidad ambiental. Es una de las alternativas viables a considerar en busca de moderar el uso de los plaguicidas químicos, debido a que éstos han venido presentando problemas en su uso, como son: toxicidad para el ser humano y el ambiente, desarrollo de resistencia de insectos, toneladas de plaguicidas caducados abandonados a cielo abierto en países en desarrollo, contaminación de los mantos freáticos, por mencionar sólo algunos ejemplos de ello. Además, en vista de las crecientes necesidades en la producción agrícola y al constante crecimiento poblacional a nivel mundial, es indispensable el desarrollo de técnicas alternativas eficientes en el control de plagas y responsables en el cuidado del ambiente (Robson & Hamilton 2010; Cruz *et al.*, 2015).

El Control Biológico abarca más de 100 años, durante los cuales se han tenido algunos éxitos importantes. Desde 1900 se comenzó a utilizar hongos entomopatógenos para controlar insectos, sin embargo, desde 1990 el papel del control biológico se ha formalizado en los niveles de gobierno federal, estatal de México y dentro de la comunidad académica. En 1991, se inauguró el Centro Nacional de Referencia para el Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima, México, que fue reconocido por la Organización Internacional para el Control Biológico como un centro de referencia internacional. El CNRCB tiene la misión de desarrollar y establecer estrategias para plagas reglamentadas, generando y proporcionando tecnología alternativa al uso de plaguicidas químicos. De igual modo, coadyuva con programas o campañas fitosanitarias en las que se promueve el uso de organismos benéficos, todo ello con la finalidad de fortalecer la sanidad de los cultivos vegetales en México (CNRCB, 2018).

El control biológico ofrece una alternativa segura, sostenible y efectiva para el manejo de enfermedades y plagas, beneficios a la economía de los agricultores, protección del ambiente y a la salud de los consumidores, además ha contribuido al desarrollo de la agricultura de México y de muchos países (Arredondo & Rodríguez 2008; Pacheco *et al.*, 2019). Los técnicos y productores, intuitivamente, se han percatado de que su uso les permite combatir plagas principalmente contra las cuales se dispone de especies de hongos entomopatógenos, a un bajo costo que las generadas por el empleo de plaguicidas químicos. Por ello, en la actualidad se asume que dicha alternativa constituye (por sus virtudes económicas, ambientales y ecológicas) la estrategia más viable para el manejo de las poblaciones de organismos patógenos en los ámbitos agrícola, pecuario y forestal (Pacheco *et al.*, 2019).

El control biológico se incrementará como consecuencia de la globalización de la economía, la apertura al comercio internacional y a que se tiene una mayor conciencia ambiental; por lo tanto el uso de bioinsecticidas y bioplaguicidas será la norma, ya que estos últimos se han convertido en una buena herramienta para el control de muchas plagas y están recibiendo más atención por su naturaleza respetuosa del medio ambiente, su eficacia contra las plagas, mejora de la calidad del producto y sus fáciles protocolos de producción masiva (García & González, 2013; Pacheco *et al.*, 2019).

A nivel mundial se desarrollan agentes de control biológico, organismos vivos como hongos, bacterias, virus e insectos que reducen la población de plagas que afectan a los cultivos. Los hongos entomopatógenos en particular despiertan el interés de empresas y organismos de investigación por su papel en el control de insectos y enfermedades, sin dañar el ambiente y la salud. El desarrollo sustentable debe garantizar a las generaciones futuras, activos naturales equivalentes a los que las generaciones presentes heredaron y el avance de la sustentabilidad ambiental hacia la sostenibilidad requerirá cambios conductuales en las personas, y los patrones de consumo, lo que tendrá consecuencias en los roles tradicionales de la familia, la comunidad, los entes gubernamentales y el mercado, así como una

reorganización completa de las técnicas de cultivos tradicionales (Viera *et al.*, 2020), una de las alternativas para el desarrollo sustentable es el uso de hongos entomopatógenos como se menciona a continuación.

4.5 Hongos entomopatógenos.

Es un grupo de microorganismos que se caracteriza por su gran potencial como agentes controladores. Pertenece a un grupo que está conformado por más de 750 especies reunidas en 100 géneros, que se encuentran esparcidas en el medio ambiente, causando infecciones fungosas a diversas poblaciones principalmente de artrópodos, aunque pueden actuar como antagonistas o hiperparásitos de otros hongos causantes de enfermedades en las plantas (Delgado *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2019).

Los hongos entomopatógenos son microorganismos eucariontes y heterótrofos; pueden ser unicelulares (como las levaduras) o multicelulares (especies filamentosas), estos últimos constan de células alargadas provistas de una pared que contiene quitina, además de otros carbohidratos y proteínas. Estas estructuras vegetativas son llamadas hifas, después de la infección exitosa de un hospedero, producen asexualmente estructuras reproductivas conocidas como conidios que lo ayudan a su dispersión (Moreira, 2012; Correal, 2018).

Existen factores de los cuales depende la eficacia de los hongos entomopatógenos:

- Especie y/o aislamiento específico del hongo entomopatógeno.
- Humedad alta de 80 a 100% y temperatura entre 25 y 30°C.
- Uso racional y selectivo de agroquímicos durante el ciclo del cultivo o fuera de él para evitar desfavorecer la acción del hongo entomopatógeno (Castillo *et al.*, 2021).

El uso de hongos entomopatógenos es una estrategia de control biológico que puede ser una herramienta promisorio en el control de diversas plagas y enfermedades para sustituir la dependencia de insecticidas químicos. Para ello es de vital importancia seleccionar las especies más eficaces que controlen el organismo de interés. En la selección de especies, para poder ser aplicada en campo necesariamente se sigue un protocolo: la evaluación en el laboratorio,

seguido de la evaluación en experimental en invernadero, y luego la utilización en campo (Acosta *et al.*, 2021). Entre los hongos entomopatógenos más utilizados para el control biológico son *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps fumosorosea*.

4.6 *Cordyceps fumosorosea*.

4.6.1 Taxonomía.

La primera descripción de este hongo fue hecha por Wize y ocurrió en el inicio del Siglo XX. Por muchos años fue incluido en la sección *Paecilomyces*, por lo que fue conocido como *Paecilomyces fumosoroseus* (Zimmermann, 2008). Los estudios taxonómicos posteriores, determinaron que este hongo debía ser agrupado dentro del género *Isaria* (Luangsa-ard *et al.*, 2005), y en la actualidad pertenece al género *Cordyceps* por ello, ahora es conocido con este nombre.

4.6.2 Morfología.

Cordyceps fumosorosea es un hongo entomopatógeno que pertenece a la división Ascomycota, forma micelio tabicado de color blanco que puede cambiar a púrpura o rosa, sus fiálides tienen forma de botella y sus conidios tienen forma ovoide alargada con un tamaño de 3 a 4µm, las hifas vegetativas presentan paredes lisas, cuando este hongo se cultiva en medios sólidos, produce conidios con un color gris-rosado típico atribuido a las melaninas, pigmentos que pueden contribuir a la protección de los conidios contra la radiación solar, particularmente de la luz ultravioleta, así mismo brindarle protección contra patógenos (Zimmerman, 2008).

4.6.3 Condiciones de crecimiento, ciclo de vida y usos.

Es un microorganismo mesofílico, su temperatura de crecimiento óptimo está entre 20 y 30°C; sin embargo, la temperatura de crecimiento varía entre 5 a 33°C, dependiendo del aislado que se trate (Asaff *et al.*, 2009). Las especies del género *Cordyceps* se encuentran predominantemente en trópicos, por lo cual pueden emplearse para desarrollar productos que se usen en regiones de clima caliente (Carrillo-Pérez *et al.*, 2013).

Se reproducen de forma asexual a través de conidios unicelulares y blastosporas, estas últimas son producidas por medio de fermentación bifásica líquido-sólido, en

donde la fase líquida es la que provee el crecimiento activo de estas estructuras. Las blastosporas se caracterizan por su rápido crecimiento y alta tasa de germinación en promedio >90% en seis horas (Jaronski y Mascarín 2017). *C. fumosorosea* pueden sintetizar una variedad de metabolitos secundarios como cordicepina, militarinona, miriocina, ciclosporina, destruxinas y enniatinas, etc. *C. fumosorosea* también puede comportarse como un micoparásito. (Mularczyk *et al.*, 2020).

Las especies de *Cordyceps* en fase sexual se han utilizado en la medicina tradicional en China, Japón y Corea por varios años (Wen *et al.*, 2012) y de acuerdo con las investigaciones científicas se ha podido comprobar que estas poseen componentes bioactivos los cuales son benéficos para la salud humana, tales como la cordicepina, un metabolito secundario con propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antiinflamatorias (Tuli *et al.*, 2014).

4.6.4 Producción de *Cordyceps fumosorosea*.

La producción de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas se basa en la multiplicación masiva de las estructuras de dispersión en un sustrato natural que pueda brindar los nutrientes necesarios para obtener la mayor producción de conidios al menor costo posible. Este procedimiento se ha desarrollado desde hace ya varios años con diversas técnicas de formulación, actualmente se conocen diferentes métodos de producción de hongos entomopatógenos, artesanal, semi industrial e industrial, y se pueden realizar en cultivos líquidos, mixtos (bifásico) y sólidos (Rodríguez *et al.*, 2017).

Para llevar a cabo la producción masiva de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico es necesario el estudio de sustratos que sean más eficientes y más económicos. Además, se debe trabajar con cepas que expresen una alta virulencia y que tengan la capacidad de ser antagonistas de fitopatógenos, lo que puede resultar de gran utilidad a la hora de su utilización en programas de control biológico (García *et al.*, 2019).

Para poder implementar a los hongos entomopatógenos como antagonistas deben producirse grandes cantidades para poder asperjarlos en campo, y así mantener su

capacidad infectiva por un período de tiempo considerable para tener un impacto en el patógeno. La mayoría de las especies de hongos entomopatógenos son producidas en medios sólidos, donde crecen como micelio superficial y producen conidios en hifas aéreas (Rodríguez *et al.*, 2017).

Los bioplaguicidas que utilizan hongos como antagonista activo pueden certificarse para su aplicación en cultivos orgánicos y proporcionar los tratamientos de rescate necesarios para prevenir daños en los cultivos (Mascarín *et al.*, 2019).

4.7 Mecanismos de acción del antagonismo.

El biocontrol de enfermedades con hongos puede resultar de un antagonismo contra un fitopatógeno, éste implica interacción directa entre dos microorganismos que comparten el mismo nicho ecológico y se refiere a la capacidad de inhibir o prevenir el crecimiento de otro organismo, mediante la secreción de metabolitos nocivos, entre otros mecanismos. Se pueden caracterizar tres modos de acción directa: hiperparasitismo, antibiosis y competencia por espacio y/o por nutrientes, el mecanismo de acción puede variar dependiendo del antagonista y el fitopatógeno, la comprensión de estos mecanismos es importante para el desarrollo de estrategias de control biológico efectivas. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno y puede reducirse aún más mediante el uso de combinaciones de antagonistas (Fernández *et al.*, 2001; Companioni *et al.*, 2019).

4.7.1 Hiperparasitismo.

Es la capacidad que tienen algunos hongos de parasitar a otros hongos, para controlar el desarrollo de patógenos, se define como una confrontación la cual causa interacciones que generan diferentes desórdenes morfológicos, los cuales pueden ser de tipo biotrófico, si aseguran los nutrientes de las células vivas, o necrotrófico, si adquieren su fuente de carbono y de energía de las células muertas del hospedero, siendo éste destruido por las toxinas extracelulares producidas por el micoparásito antes de invadir (Infante *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2019).

Villavicencio (2018), menciona que el hiperparasitismo es considerado el mecanismo de acción más importante, ya que es un proceso complejo donde está involucrada la producción de enzimas líticas tales como quitinasas, glucanasas, glucosidasas, lipasas y proteasas. En el micoparasitismo la hifa de *C. fumosorosea* entra en contacto con el hongo fitopatógeno a controlar e inicia un crecimiento alrededor de ésta, y por acción enzimática comienza la degradación del patógeno; posteriormente, puede ocurrir penetración por parte del hongo antagonista, causando degradación celular, rompimiento o destrucción total de la hifa del patógeno.

Actividad lítica: En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que atacan y penetran las células, alteran y degradan la pared celular, causan retracción de la membrana plasmática, desorganización en el citoplasma y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista. Por los puntos de contacto donde se produce la lisis y aparecen los orificios, penetra la hifa del micoparásito en las del hongo hospedante (Lira *et al.*, 2019).

4.7.2 Antibiosis.

Es la interacción de dos especies diferentes la cual una resulta nociva para la otra especie, en la antibiosis hay producción de antibióticos o metabolitos secundarios por parte del microorganismo considerado benéfico, los cuales tienen un efecto directo en el crecimiento del fitopatógeno, algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistente al antibiótico (Cubilla-Ríos *et al.*, 2019). El efecto dañino de toda antibiosis se debe a la acción de una sustancia química nociva producida por el organismo para acabar con sus competidores.

En la actividad antibiótica, existen un gran número de compuestos de importancia para la biorregulación de patógenos, en el caso de *C. fumosorosea* produce metabolitos secundarios como los previamente mencionados: cordycepina, militarinona, miriocina, ciclosporina, destruxinas y enniatinas, éstos inhiben la germinación de conidios y el crecimiento de tubos germinales, evitando el

crecimiento y el desarrollo de microorganismos patógenos (Infante *et al.*, 2009; Nehra *et al.*, 2022).

4.7.3 Competencia.

Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento, esto nos lleva a la inhibición o prevención de crecimiento del microorganismo competidor. Este tipo de interacción se ve favorecida por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Infante *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2019).

En la competencia por nutrientes puede ser por fuentes de nitrógeno, fósforo, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos) y microelementos. Esta forma de competencia en los suelos o sustratos ricos en nutrientes no tiene importancia desde el punto de vista práctico. Por ello, cuando se emplea fertilización completa o existe exceso de algunos de los componentes de los fertilizantes e inclusive en suelos con alto contenido de materia orgánica, este tipo de antagonismo es poco eficaz (Vera *et al.*, 2018).

En la competencia por sustrato o espacio, los organismos compiten por espacio en un ambiente limitado, este depende de si el espacio está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato (Vera *et al.*, 2018). Con este tipo de biocontrol se busca solucionar una problemática en los cacaotales de AL.

4.8 Estado del cultivo de cacao en Tuzantán Chiapas México.

En la región de Tuzantán, perteneciente al Soconusco, se encuentra la Cooperativa Agroproducciones Integrales Sarabia, cuyos productores refieren que comenzaron a tener problemas con este hongo a raíz del paso del huracán Stan en 2005, y reportan una infestación de entre el 50 y el 90% de moniliasis en sus cacaotales, lo que representa una gran pérdida económica, es por esta razón que se pusieron en contacto con el laboratorio de Micología del DEHA de la UAM-X, para solicitar una alternativa de control para esta enfermedad, este proyecto se plantea como parte de la respuesta a la comunidad.

5. Justificación.

Por toda la problemática antes mencionada; la utilización de insecticidas y fungicidas sintéticos durante décadas para el control de enfermedades, insectos plaga y nematodos han conllevado a generar problemas de resistencia a estos productos químicos, reducción de poblaciones de enemigos naturales, contaminación ambiental, riesgos a la salud humana y el desequilibrio en los ecosistemas urbanos y forestales. Este deterioro ha llevado al hombre a buscar alternativas amigables que contribuyan a minimizar el impacto negativo sobre el medio y a la prevención de los efectos negativos a corto y a mediano plazo de estos compuestos frente al daño ambiental. Entre las alternativas tenemos la aplicación exitosa de programas de control biológico como parte del manejo integrado de plagas ya que es una alternativa segura, eficaz y sostenible para el manejo de plagas y enfermedades.

El impacto del cambio climático, la intensa explotación en los sistemas de producción agrícola, pecuaria y forestal, el uso de monocultivos y la apertura comercial a nivel mundial hace necesario fomentar el control biológico de plagas y enfermedades (bioinsecticidas y agentes biológicos como organismos entomopatógenos) así como evaluar el impacto ambiental de estos productos con más pruebas bajo condiciones de campo que permitan identificar los efectos de los factores bióticos y abióticos sobre su eficacia y persistencia, ya que estos además de ser útiles a la agricultura, favorecen a la salud humana y al ambiente. Por otra

parte, también es indispensable diseñar novedosos sistemas de producción, formulación y entrega en masa para abastecer un mercado cada vez mayor.

Debido a lo anterior, es necesario el desarrollo de alternativas viables para el control de plagas y enfermedades, como son los métodos de control biológico, entre los cuales se incluye el uso de hongos entomopatógenos los cuales proporcionan una producción sostenible y respetuosa con el medio ambiente, la reducción en los costos para el control de plagas, cuidado en la salud de los productores y de la sociedad como un todo, entre otras cosas. Sin embargo, para incrementar su uso comercial, tales métodos requieren mejorar en ciertos aspectos como:

1. Incrementar su virulencia y velocidad para matar al organismo objetivo.
2. Un adecuado desarrollo bajo condiciones ambientales adversas.
3. Mayor eficiencia en su producción.
4. Aceptación de parte de los productores y de la sociedad en general.

Es sorprendente el hecho que la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*) no tenga una distribución mayor, dado a la gran capacidad de producción de esporas, la resiliencia de las mismas a las condiciones ambientales, la facilidad con que se dispersan, el largo periodo de latencia en mazorcas infectadas que facilitan el movimiento a grandes distancias antes de que aparezcan síntomas y la gran susceptibilidad del cacao y otras especies, las cuales tienen el potencial de devastar el suministro mundial de cacao si se diseminan fuera de América.

6. Hipótesis.

El aislado de *Cordyceps fumosorosea* EH-510 presenta una alta patogenicidad y capacidad antagónica hacia *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en cultivos de cacao (*Theobroma cacao*) en Tuzantán Chiapas, México.

7. Objetivo General.

- Evaluar las cinéticas de producción del hongo *Cordyceps fumosorosea* EH-510 y determinar la patogenicidad del hongo en la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*), en la comunidad de Tuzantán Chiapas México.

7.1 Objetivos específicos.

- Evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de *C. fumosorosea* EH-510 contra *M. roreri*.
- Evaluar cinéticas de producción de conidios de *C. fumosorosea* EH-510.
- Determinar el rendimiento de conidios de *C. fumosorosea* EH-510 en un sustrato sólido (Arroz).
- Desarrollar un programa a corto plazo para introducir el control biológico con *C. fumosorosea* EH-510 contra *M. roreri* en la región de Tuzantán Chiapas.

8. Materiales y Métodos.

8.1 Material Biológico.

La cepa *C. fumosorosea* EH-510 proviene del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico de Tecomán, Colima y está depositada en el cepario del Laboratorio de Micología de la UAM-X y *M. roreri* se obtuvo de los frutos infestados obtenidos en la comunidad de Tuzantán Chiapas, México.

8.2 Área de Estudio.

Tuzantán es tierra de oportunidades con un 90 % de su territorio aprovechable para las actividades en todos los sectores productivos, con una diversidad de cultura, sectores sociales, actividades económicas y culturales, por ello es importante la planeación para estar en condiciones de aprovechar los recursos naturales, humanos y financieros con la finalidad de lograr un desarrollo económico y social que garantice mejorar las condiciones de vida (Suarez *et al.*, 2019).

El nombre de Tuzantán es de origen náhuatl y significa "Lugar donde abundan las tuzas". El territorio que habita el pueblo de Tuzantán Chiapas se localiza entre la planicie costera del Pacífico y en los límites de la Sierra Madre, se encuentra en el Distrito de Huixtla, con 6 460 hectáreas, superficie 64,600 km² y a una altitud de 125 msnm (Ardón *et al.*, 2022). El promedio anual de precipitación va de 3000 a 3500 mm, el clima es cálido húmedo con lluvias en verano (Suarez *et al.*, 2019).

El municipio de Tuzantán, cuenta con una población de 28,137 habitantes de los cuales 14,241 son hombres que equivale al 50.61% y 13,896 son mujeres y equivale al 49.39 %, con una densidad de población de 491.56 hab/km².

La actividad económica del municipio se divide en 3 aspectos:

- Agricultura y Ganadería: 54.23% PEA (Población económicamente activa). Una de las principales actividades del municipio es la agricultura se produce principalmente el café, cacao, plátano, caña de azúcar, maíz y mango.
- Comercio: 31.49% PEA se emplea en actividades relacionadas con el comercio o la oferta de servicios a la comunidad.
- Industria de la Transformación: 12.40% PEA (Ardón *et al.*, 2022).

Trabajo experimental.

La parte experimental se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, en el laboratorio de Micología.

La aplicación en campo se realizó en una finca llamada “La Mandarina” perteneciente a un integrante de la Cooperativa Agroproducciones Sarabia de la comunidad de Tuzantán, Chiapas.

La etapa de propagación, producción e inoculación se basó en la metodología del “Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos” FUNICA (Monzón, 2011).

La etapa del Bioensayo en Laboratorio y la aplicación se basó en el manual de Producción y uso de hongos entomopatógenos elaborada y utilizada por el laboratorio SCB del Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA (Gómez *et al.*, 2014).

8.3 Toma de muestras para el Aislamiento de *M. roreri*.

Los objetivos de la visita a la comunidad de Francisco Sarabia fueron la toma de muestras para el aislamiento de la cepa de *M. roreri* y recopilar datos e información

precisos sobre la comunidad, conocer la microbiota existente y detectar la moniliasis.

8.3.1 Mazorcas. Se colectaron frutos de cacao (mazorcas) con los signos de moniliasis en la superficie, a partir de esas lesiones, se realizó un sembrado de estas en Agar Maltosa Sabourand (MSA), para detectar la presencia del hongo en el interior, se colocaron fracciones de la pulpa también en MSA, aunque no se observara la pudrición característica de las semillas, se llevaron a la incubadora por 28 días a una temperatura promedio de 32° C para su crecimiento (Monzón, 2011).

8.3.2. Suelo. Este procedimiento se realizó con la finalidad de aislar los hongos microscópicos del suelo y detectar si estaba presente tanto *C. fumosorosea* como *M. roreri* para esto se colectó suelo de la parcela “La Mandarina” y se procesó con el método de las placas de Warcup. (Mier *et al.*, 2002).



Figura 2 Toma de muestra de *M. roreri* en medio artificial MSA en la parcela “La Mandarina”.



Figura 3. Preparaciones en fresco de *M. roreri* tomadas de la parcela “La Mandarina”.

8.3.3 Cajas Petri. Para esta toma de muestra se llevaron a la zona de estudio cajas Petri con medio sólido MSA, se identificaron mazorcas micosadas en su exterior con signos de moniliasis y por medio de pequeños golpes, se liberaron las esporas para que se depositaran dentro de la caja Petri, se llevaron a la incubadora durante 28 días a una temperatura promedio de 32°C para su crecimiento e identificación.

8.3.4. Papel. Una forma de transportar esporas de hongos microscópicos es con la ayuda de papel estéril, este ayuda a la estabilidad del hongo ya que el papel no induce el crecimiento de las esporas y da la facilidad de un mejor manejo para ser

transportadas al laboratorio para ser sembradas en medio artificial MSA y ser estudiadas.

8.3.5 Preparaciones en fresco. Con portaobjetos y cinta adhesiva, se tomaron las muestras directamente de mazorcas micosadas que en su exterior tenían signos de moniliasis, se llevaron a laboratorio para ser examinadas en microscopio y sembradas en medio artificial MSA.

8.4 Propagación del hongo *Cordyceps fumosorosea* EH-510.

De acuerdo con el protocolo FUNICA (Monzón, 2011), para la producción del inóculo de *C. fumosorosea* EH-510 se utilizó un medio de cultivo artificial Agar Papa Dextrosa (PDA, MCD Lab, México), se esterilizó, se vertió en cajas Petri de 90 * 15 mm, se dejó a prueba de esterilidad durante 24 horas para asegurar que no exista crecimiento bacteriológico o algún otro hongo que pudiera afectar en su crecimiento; el principal objetivo de los medios de cultivos artificiales es crear un ambiente adecuado para el crecimiento, simulando las condiciones lo más cercanas posibles a las naturales, posterior a la prueba de esterilidad, con la ayuda de un asa micológica y por el método de estría cruzada masiva se sembró *C. fumosorosea* EH-510; posteriormente las cajas Petri se incubaron a 28 - 30 °C. Se tomó en cuenta la temperatura promedio de la comunidad de Tuzantán Chiapas, y así asegurar el crecimiento de la cepa, se mantengan activas y en constante crecimiento durante un tiempo de 6 a 10 días (Gómez & Batista, 2006).

Durante el periodo de incubación se observó el crecimiento del micelio y la producción de conidios. Normalmente esta etapa finaliza cuando el hongo llega a cubrir toda la superficie del medio de cultivo PDA en la caja Petri (Monzón, 2011).

8.5 Propagación del hongo *Moniliophthora roreri*.

El inóculo de *M. roreri* se sembraron en un medio de cultivo Agar Maltosa Sabouraud (MSA, MCD Lab, México); este se esterilizó y se vertió en cajas Petri de 90 * 15 mm, al igual que el PDA se realizó una prueba de esterilidad en las mismas condiciones, posteriormente con la ayuda de un asa de sembrado y por el método de estría cruzada masiva se sembró *M. roreri*; las cajas Petri se incubaron a 28 - 30 °C, y las primeras observaciones de crecimiento se hicieron de los 6 a 10

días, sin embargo, el tiempo de crecimiento se alargó hasta 28 días, ya que la moniliasis es una enfermedad de latencia larga (Monzón, 2011).

8.6 Placas de Warcup.

Siguiendo la técnica de Mier *et al.*, (2002), se pesó 1 g de suelo que fue traído de la finca “La Mandarina” de Tuzantán Chiapas, se agregaron 9 mL de tween 80 al 0.02% se hicieron dos diluciones decimales seriadas. Se agregaron 100 µL de la suspensión diluida en cajas de Petri estériles de 90 mm de diámetro, posteriormente se agregó PDA y MSA, a punto de solidificar. Se hizo un juego de cajas de cada medio y se incubó de 3 a 6 días a una temperatura promedio de 26 a 28°C. (Mier *et al.*, 2002).

8.7 Identificación de Géneros.

Extraídas las mazorcas infectadas de la zona de estudio, se realizó un sembrado del exterior de estas mazorcas, sembrado del interior de las mismas y del suelo de la zona de estudio (placas de Warcup), para esta sección y la identificación de hongos, se realizaron preparaciones en fresco: se colocó una pequeña porción de micelio sobre una gota de lactofenol sobre un portaobjetos (Mier *et al.*, 2002); se llevaron al microscopio y con la ayuda de un manual de identificación de hongos (Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungí; second edition) se llegó a los géneros encontrados.

8.8 Análisis Genético (PCR punto final).

Se estandarizó la técnica de PCR utilizando *C. fumosorosea* EH-510, por la razón de que se contaba con una mayor cantidad de material biológico de dicho hongo comparado con *M. roreri*.

8.8.1 Extracción de ADN. Se utilizó un Kit de ADN/ARN EZNA®, el ADN genómico de *M. roreri* se extrajo del micelio obtenido después de ser cultivado en caja de Petri, con MSA donde creció hasta 28 días. Para la extracción y purificación del ADN genómico se extrajo el micelio de *M. roreri* con agua destilada aproximadamente 0.5 - 0.75 g y se almacenó en nitrógeno líquido por 24 horas. Cada muestra fue macerada con ayuda de un mortero y pistilo y se colocó en un microtubo de 2 mL con 500 µL de buffer de extracción.

8.8.2 Cuantificación DNA. Para estimar la pureza de ADN se considera la proporción de absorbancia a 260 nm/ 280 nm, una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, una proporción menor a este valor indica presencia de proteínas. La cuantificación se llevó a cabo en un Nanodrop (Thermo Fisher®), se colocaron 2 µL de *M. royeri* obtenidos de la extracción de ADN y como blanco se utilizó el buffer de extracción del kit ADN/ARN EZNA®.

8.8.3 Selección de Primers. Las regiones ribosomales ITS se amplificaron utilizando los cebadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990), los cuales se anclan en los ADNr 25 S y 18 S, respectivamente, por lo que incluyen también la región 5.8 S (Suarez, 2015).

8.8.4 Aislamiento de ADN. Se utilizó un kit de extracción de ADN QIAGEN®, la muestra se trituró por 5 minutos, se llevó al vortex por un minuto y centrifugó a 6000 rpm por diez minutos para homogenizar la muestra; se colocó en la columna para DNA, se le agregó 700 µL del mix del Buffer de lisis y se llevó a centrifugar a 13,000 rpm durante cinco minutos, se vació el tubo colector; se adicionó 500 µL del Buffer HTC, se centrifugó a 13 000 rpm por cinco minutos y se decantó el tubo colector; se adicionó 700 µL Buffer DNA wash, se centrifugó a 10 000 rpm durante tres minutos y se decantó el tubo colector; para secar la muestra se llevó a centrifugar a 10 000 rpm durante diez minutos; se etiquetó el tubo de almacenaje y se colocó la columna de DNA; se agregaron 40 µL de buffer elución, se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos y se llevó a -20 °C para su almacenaje (Suarez, 2015).

8.8.5 Amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa. La amplificación por PCR se realizó bajo las siguientes condiciones, en un volumen final de 25 µL, constituido de taq polimerasa Acuarius® 87.5 µL; Primer Forward ITS5 7 µL, Primer Reverse 7 µL, DMSO 7 µL como intercalante aditivo, agua PCR 52.7 µL y 2 µL de ADN genómico de *M. royeri* (Suarez, 2015).

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Axigen, Maxigene II®) con un ciclo inicial a 95 °C por 2 minutos (desnaturalización); 40 ciclos de 95 °C por 15

segundos (desnaturalización), 52 °C por 15 segundos (hibridación) y 72 °C por 1 minutos (extensión) y un ciclo final de 72 °C por 7 minutos.

8.8.6 Visualización en Gel de Agarosa. Las amplificaciones se revisaron en un gel de agarosa al 1.5% (1xTAE buffer) teñidas con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y visualizado bajo luz UV en un transiluminador. Se colocaron 7 µL en cada pozo del Gel de Agarosa y se dejó correr durante 90 min a una corriente inicial de 75 volts, se utilizó una escalera (E) Ampligene® la cual amplifica de 100 a 1500 pb.

8.8.7 Purificación de DNA. Se utilizó un kit de purificación EXOSAP-IT EXPRESS®, la mezcla consistió en 5 µg del producto de la reacción de PCR con 2 µg del reactivo EXOSAP-IT® se mezcló en un vortex y se centrifugo por 1 min a 500 rpm para llevar el contenido al fondo del tubo, se calentó la reacción en un ciclador térmico con tapa, se llevó a una temperatura de 37 °C durante 4 minutos para degradar el exceso de cebadores y nucleótidos, inmediatamente se llevó a una temperatura de 80 °C durante 1 minuto para inactivar el reactivo EXOSAP-IT®, se mantuvo la reacción a 4 °C y se transfirió a hielo para su conservación.

8.8.8 Secuenciación de ADN. Las bandas obtenidas mediante ITS fueron secuenciadas por los laboratorios de INMEGEN en la Ciudad de México, se utilizó BigDye™ Terminator Cycle Sequencing usando electroforesis capilar y un secuenciador ABI PRISM® 3730XL Analyzer (96 capillary type) siguiendo los protocolos de los fabricantes.

8.8.9 Análisis Bioinformático. El análisis bioinformático se hizo mediante los programas BLAST (GenBank), Bioedit, y IUPAC.

8.9 Evaluación de la capacidad antagónica de *Cordyceps fumosorosea* EH-510 vs *Moniliophthora roreri*.

Para la capacidad antagónica de *C. fumosorosea* EH-510 se utilizó la Técnica del Cultivo Dual, la cepa se sembró en cajas Petri de 90 * 15 mm, con medio PDA (Agar Papa Dextrosa); al depositar una sección de 5 mm de cultivo del patógeno *M. roreri* frente a una sección del antagonista *C. fumosorosea* EH-510 de igual tamaño y a distancia de 4 cm, (estas secciones se tomaron de la propagación de ambos

hongos; que se describió en el apartado 8.4 y 8.5 de la metodología). Las placas selladas con parafilm fueron incubadas durante 11 días a una temperatura de 28 °C. Los testigos se sembraron en forma individual con *M. royeri* y *C. fumosorosea* EH-510. Durante el período de incubación se midió el diámetro de las colonias cada 24 horas de los microorganismos en estudio, hasta que hubo contacto directo de ambos hongos, con el objetivo de evaluar el efecto del antagonista sobre las colonias del patógeno (Meza *et al.* 2008).

Se compararon las cepas con respecto a la capacidad antagonista y se clasificó el grado de la capacidad antagónica de acuerdo con la escala de notas establecida por Bell *et al.* (1982).

Cuadro 1. Escala para la evaluación de la capacidad antagónica según Bell et al.,1982.

Clase	Características	Grado Capacidad antagónica.
Clase 1	Sobrecrecimiento del antagonista, colonizo toda la superficie del medio y redujo la colonia del fitopatógeno.	Muy bueno
Clase 2	Sobrecrecimiento del antagonista, colonizo al menos 2/3 de la superficie del medio.	Bueno
Clase 3	El antagonista y el fitopatógeno colonizaron medio a medio (más que 1/3 y menor que 2/3). Uno no se sobrepuso al otro	Deficiente
Clase 4	Hongo fitopatógeno colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio y resistió la invasión del antagonista.	Malo

Clase 5	Sobrecrecimiento del hongo fitopatógeno que colonizó toda la superficie del medio	Muy malo
---------	---	----------

Se calcularon los valores medios de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) por la fórmula:

$$\text{PICR} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Donde:

R1: es el crecimiento radial del testigo (fitopatógeno sin antagonista).

R2: el crecimiento radial del fitopatógeno en los tratamientos en cultivo dual (Pincay *et al.*, 2021).

8.10 Cinéticas de producción de conidios de *Cordyceps fumosorosea* EH-510.

Para realizar las cinéticas de producción de *C. fumosorosea* EH-510 se utilizó un sustrato sólido (granos de arroz, marca genérica), el cual se pesaron 400 g de arroz, previamente lavado y seco a una humedad relativa del 30%, se dividieron en 25 frascos con 15 g de arroz cada uno, posteriormente se llevaron a la autoclave para esterilizar por 20 minutos, después de enfriar los frascos a temperatura ambiente, se dividieron en 5 testigos que fueron inoculados con 0.5 mL de Tween 80 al 0.02% y 20 frascos inoculados con suspensión madre preparada como se describe a continuación (Monzón, 2011).

Para obtener la suspensión madre se hizo un raspado de cajas Petri (obtenidas como se describió en el apartado 16.4, propagación del hongo *C. fumosorosea*), se agregaron 20 mL de Tween 80 al 0.02% a dichas cajas, con la ayuda de una espátula estéril se hizo el raspado, se filtró a través de papel filtro y se agregó a un tubo Falcón, se agitó por un minuto en el vortex para obtener dicha suspensión; se agregó de forma equitativa en los 25 frascos y fueron expuestas en condiciones favorables para su crecimiento en una incubadora donde permanecieron a una temperatura de 28 °C durante 14 días según el manual.

8.11 Conteo de Conidios.

Para realizar dicho conteo se utilizó una cámara de conteo Neubauer, con una pipeta Pasteur, se tomó una alícuota de la dilución seleccionada para el conteo y se colocó en la cámara de conteo, a través del microscopio se hizo la cuantificación, este paso se realizó por duplicado para cada matraz y se cuantificaron todos hasta obtener un rendimiento promedio (Monzón, 2011). Para calcular la concentración de conidios por mililitro, se multiplica el número de conidios observados en el campo de conteo, por el factor de cámara, se multiplicó luego por el factor de dilución. El factor de cámara es 10,000 para cuadrados principales y 250,000 para cuadrados secundarios, como se observa en la figura en la figura 4.

Cálculo:

Conidios/g = Σ de Conidios 4 cuadros / 4, * Factor de Cámara * Factor de Dilución.



Figura 4. Cámara Neubauer visto a 40X:

Estos conteos se hicieron con la finalidad de conocer el rendimiento de conidios, la cuantificación se realizó los días 4, 7, 10 y 14 después de que se llevó a cabo la inoculación. Para realizar el conteo de conidios se hizo un lavado agregando 10 mL de Tween 80 al 0.02% a 3 frascos con 4, 7, 10 Y 14 días respectivamente se agitaron por un minuto en un vortex, se filtró el lavado, se hacen diluciones decimales y se observó al microscopio a una ampliación de 40x para realizar dicho conteo (Cañedo, 2004).

-Fase de campo.

8.12 Diagnostico y Aplicación en Campo.

Se realizó un diagnóstico de la zona, en el cual se conoció la problemática a la que se están enfrentando los agricultores, en un inicio ellos mencionan que tienen perdidas en su producción de cacao hasta de un 80% afectando su economía, por esta razón los productores consideraban retirar estos árboles de *T. cacao* y sembrar otro tipo alimento.

La aplicación en campo se llevó a cabo en una finca “La Mandarina” de la Cooperativa Agroproducciones Sarabia de la comunidad de Tuzantán, Chiapas. De acuerdo con Monzón (2011), para la aplicación en campo, es necesario saber cuántos gramos de arroz inoculado con *C. fumosorosea* EH-510 se utilizarían por m²; y sugiere que en promedio se necesita 1 kg de arroz inoculado con hongo

entomopatógeno por ha, siempre y cuando se obtenga una cantidad mayor a 1×10^8 con/ gssi (conidios/ gramo de sustrato de solido inicial); ya que esta cantidad asegura que los conidios se encuentren con el organismo a controlar.

Las coordenadas de la parcela “La Mandarina” son 15°09’35” de latitud norte y 92°23’51” de longitud oeste con 240 msnm, la unidad experimental quedo conformada de once árboles de *Theobroma cacao* dichos arboles cuentan con mazorcas de cacao en diferente estado de crecimiento, (desde brotes o floración hasta ejemplares adultos) llevando un monitoreo de las mismas (figura 5), con la siguiente disposición:



Figura 5. Disposición de ejemplares de *Theobroma cacao* para aplicación en campo dentro de la parcela "La Mandarina".

Para la aplicación en la parcela "La Mandarina" se utilizaron 400 gr de arroz, previamente inoculado con *C. fumosorosea* EH-510, se agregó agua para obtener la suspensión madre, se hizo un filtrado con gasa clínica estéril, se utilizó una bomba aspersora de mochila Jacto®, con capacidad 20 lts, y una boquilla TXVK 3 de cono hueco, dicha bomba trabaja a una presión de 100 psi, la aplicación fue foliar dirigida a la copa del árbol y al tronco y se utilizó un volumen de agua de 1.81 L, equivalente a 200 L ha⁻¹ (Gómez *et al.*, 2014).; se hizo la aplicación en la finca "La Mandarina" en ejemplares de *T. cacao*, infectados de manera natural con *M. royeri*.

La aplicación en campo se basó en el manual "Principios Agronómicos" (Soto, 2014), donde menciona que por cada hectárea deben ocuparse 200 lts de agua, tomando estas indicaciones se hizo la aspersión en campo, se realizó el cálculo para el volumen necesario para la bomba de aspersión y se lleva un control de crecimiento de dicha parcela.

8.13 Desarrollo de un programa a corto plazo para introducir el control biológico con *C. fumosorosea* EH-510 contra *M. roreri* en la región de Tuzantán Chiapas.

Introducir el control biológico en una comunidad puede llevar tiempo, pero es una forma efectiva y segura de cultivar alimentos sin dañar el medio ambiente y mejorar la salud pública. La concienciación, la capacitación y la colaboración son fundamentales para su éxito; es importante educar a las personas sobre sus beneficios e implementarlo (Rivas *et al.*, 2012), por esta razón se propusieron estrategias para el trabajo con la Cooperativa:

1. Argumentos: Se identificaron las necesidades de la comunidad, antes de introducir un programa de control biológico, es importante que se identificaran las necesidades de la comunidad. ¿Qué tipo de plaga y enfermedades afectan a los cultivos? ¿Cómo afectan estas plagas a su economía y a la salud de la comunidad? Al comprender estas necesidades se pudo realizar un programa de control biológico más adecuado.
2. Educación y capacitación: Es importante educar y capacitar a la comunidad sobre el programa de control biológico. Esto puede incluir talleres seminarios y otras actividades que pueden ayudar a la comunidad a comprender los beneficios del control biológico y cómo implementarlo de manera efectiva.
3. Demostraciones prácticas: Son una excelente forma de mostrar los beneficios del control biológico. Se realizaron demostraciones de aspersión en la finca “La Mandarina” para que los agricultores pudieran ver directamente cómo funciona el control biológico en la práctica. Se les invito a dar seguimiento para que ellos sacaran conclusiones del uso de los hongos hiperparásitos para el control de la moniliasis.
4. Fomentar la colaboración: Es importante fomentar la colaboración entre los agricultores y la comunidad en general para que puedan compartir sus experiencias y conocimientos. (Zepeda, 2018). Esto ayudo a crear conciencia lo que mejoro la implementación del control biológico.

9. Resultados.

9.1 Sembrado del exterior de la mazorca.

Se verificó que la mazorca de cacao presentara síntomas de moniliasis y las lesiones se sembraron en medio MSA (figura 6A), se dejaron crecer por 28 días creció un gran número de colonias (figura 6B), entre los aislados se encontró en mayor cantidad *Fusarium sp.*, seguido de *Glocladium* y *Acremonium sp.*, dejando en menor crecimiento a *Moniliophthora roreri*.



Figura 6. A) Mazorca de cacao infectada con síntomas de moniliasis, manipulada en laboratorio. B) Crecimiento de hongos microscópicos resultado del sembrado del exterior de la mazorca en medio artificial MSA.

9.2 Sembrado del interior de la mazorca.

En la figura 7A se muestra el sembrado del interior de la mazorca con síntomas de moniliasis, de este procedimiento se aislaron hongos endófitos se incubaron y se identificaron microscópicamente a *Moniliophthora roreri* y *Fusarium sp.* (figura 7B).

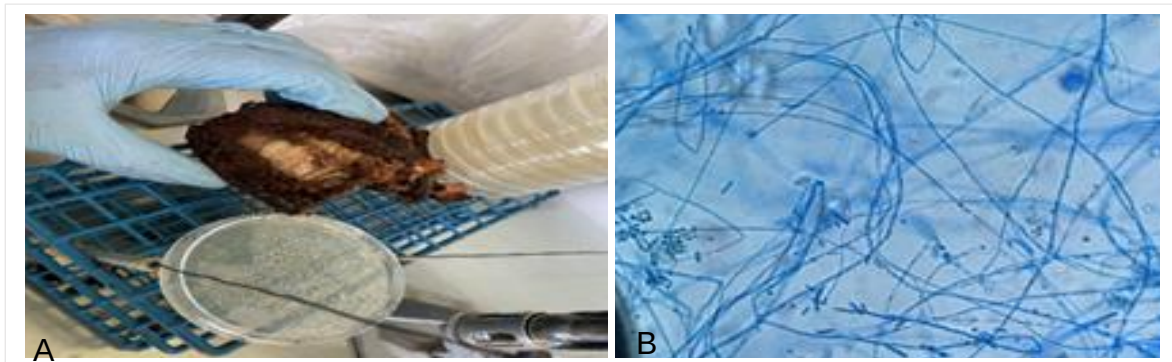


Figura 7. A) Sembrado del interior de la mazorca en medio artificial MSA. B) Hifas de *M. roreri* y conidios de *Fusarium sp.*; visto a 40X, teñidos con azul de Lactofenol.

9.3 Placas de Warcup.

Se realizaron aislamientos de suelo en medio rosa Bengala y MSA, con este procedimiento se identificaron hongos del suelo de “La Mandarinina”, identificando principalmente *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Gliocladium*, *Penicillium* sp, (figura 8A), *Geotrichum* (figura 8B), *Cordyceps* sp., *Acremonium* (figura 8C), *Moniliophthora roreri* (figura 8D).

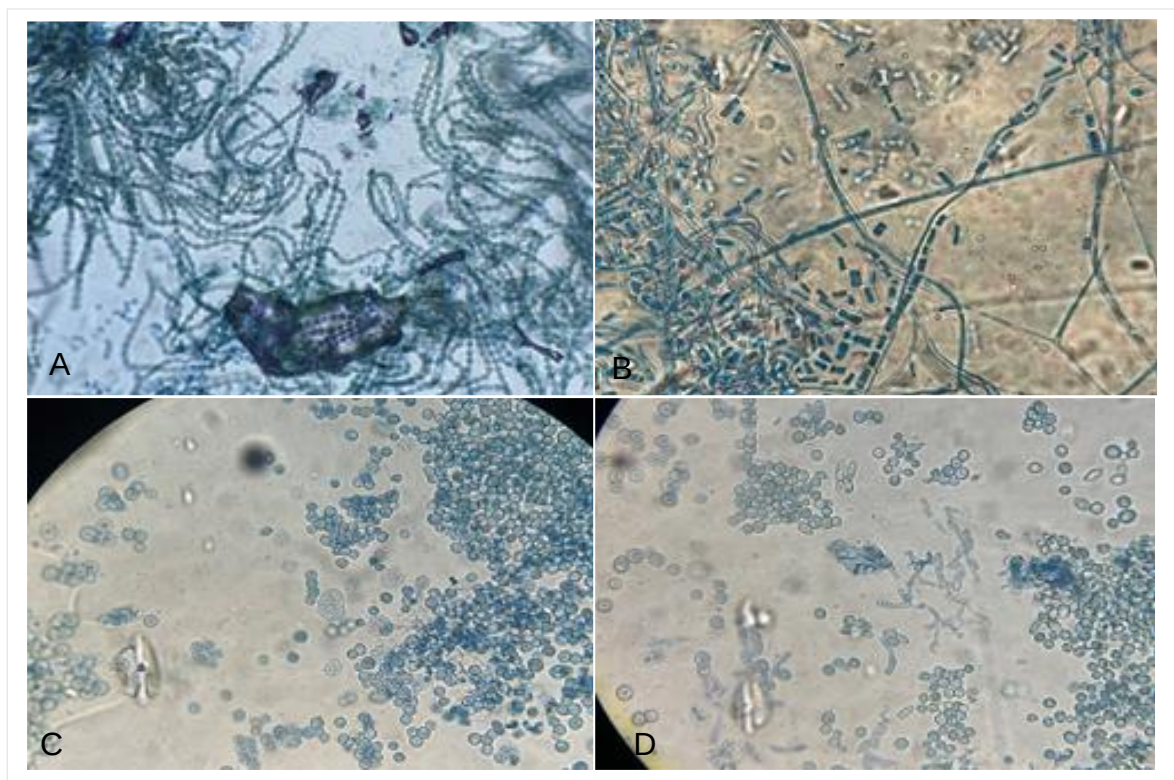


Figura 8. A) Conidios de *Penicillium* sp., B) *Geotrichum* sp., C) *M. roreri* con *Acremonium* sp., D) Conidios de *M. roreri*. Vistas a 40X, y teñidas con azul de Lactofenol.

Existe gran diversidad de microorganismos que pueden ser utilizados para planes de manejo integral de plagas, lo que llama la atención es *C. fumosorosea* que se ha encontrado en muestras de suelo, esto indica que está formando parte de la microbiota del suelo de la parcela “La Mandarinina” y favorece para el control biológico de *M. roreri* como antagonista.

9.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (punto final).

9.4.1 Cuantificación de ADN.

Cuadro 2 Resultados de la Cuantificación de ADN

# Muestra	ID Muestra	Conc. Nucleic Acid	Unidad	260/280	260/230	Tipo de Muestra
1	<i>M. roreri a</i>	7.4	ng/μL	1.85	0.03	DNA
2	<i>M. roreri a</i>	7.2	ng/μL	1.77	0.03	DNA
3	<i>M. roreri b</i>	11.6	ng/μL	2.27	0.02	DNA
4	<i>M. roreri b</i>	10.9	ng/μL	2.26	0.02	DNA

Después de haber extraído el ADN se realizó la cuantificación del mismo, se determinó el rendimiento de ADN mediante espectrofotometría, en el presente estudio (cuadro 2) en la escala 260 nm/280 nm está por encima de 1.8 ng/μL en promedio, lo cual indica que hay presencia de sales. Teniendo en cuenta los resultados se obtiene un ADN de óptima calidad para ser utilizado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

9.4.2 Visualización en Gel de Agarosa de *C. fumosorosea* EH-510 y *M. roreri*.

En la figura 9 se muestran las bandas obtenidas para *C. fumosorosea*, se obtuvieron amplificaciones por 700 pb en los tres gradientes de temperatura, para las 3 TM no hubo diferencia entre la Albúmina Serica Bovina y el DMSO, la TM1 obtuvo una amplificación de DNA muy tenue, así mismo la TM2 Y TM3 la amplificación de DNA se observa con mayor intensidad, con estos resultados la temperatura de Melting idónea para realizar amplificación de DNA va de 52 -54°.

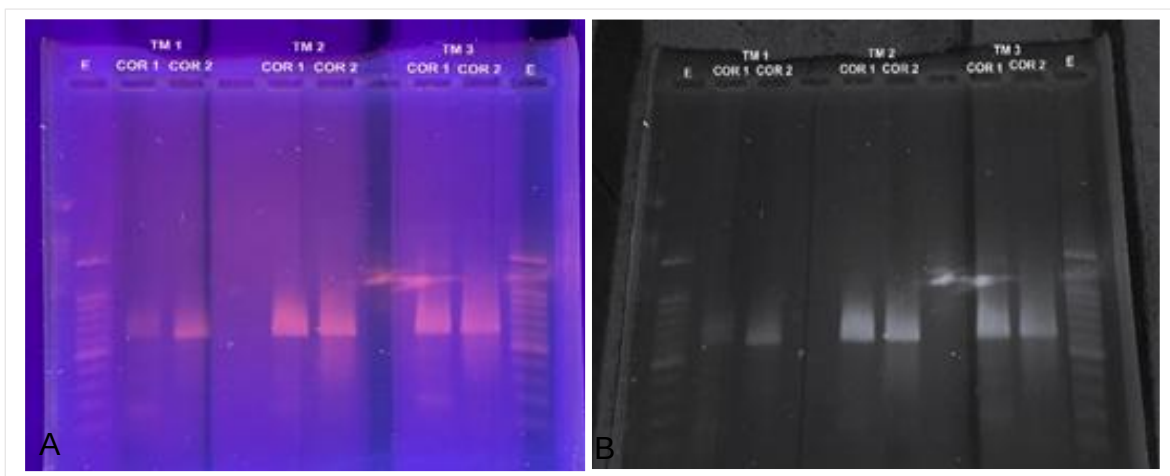


Figura 9. A) Gel de agarosa al 1.5% de *C. fumosorosea* EH 510. B) Negativo de gel de agarosa al 1.5% de *C. fumosorosea* EH 510. Visualizados con luz UV.

En la figura 10 la primera banda en el gel de Agarosa: (E) corresponde a la escalera (ampligene); la segunda banda (B) es un control negativo no amplifico absolutamente nada; seguido de la banda M1 (muestra 1 de *M. roreri*) que presenta una amplificación de DNA bastante marcada a las 700 pb, de igual manera que M2 (muestra 2) de *M. roreri* presenta una amplificación en 700 pb, la banda Cor que representa una muestra de *C. fumosorosea* EH-510 amplifico a 700 pb; con estos resultados se tiene estandarizada la técnica de PCR punto final para hongos microscópicos utilizados en este estudio.

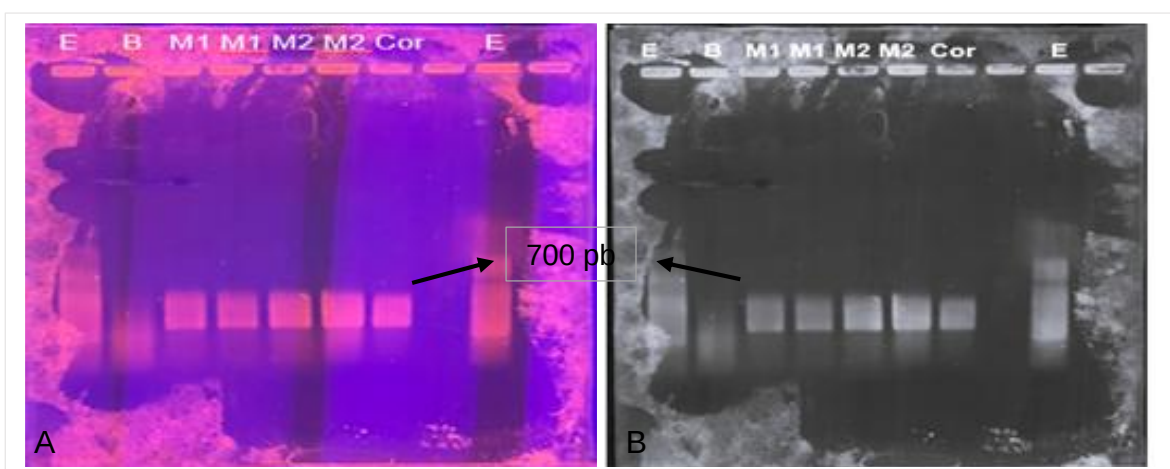


Figura 10. A) Gel de agarosa al 1.5% de *M. roreri*. B) Negativo de gel de agarosa al 1.5% de *M. roreri*. Visualizados con luz UV.

9.4.3. Análisis Bioinformático.

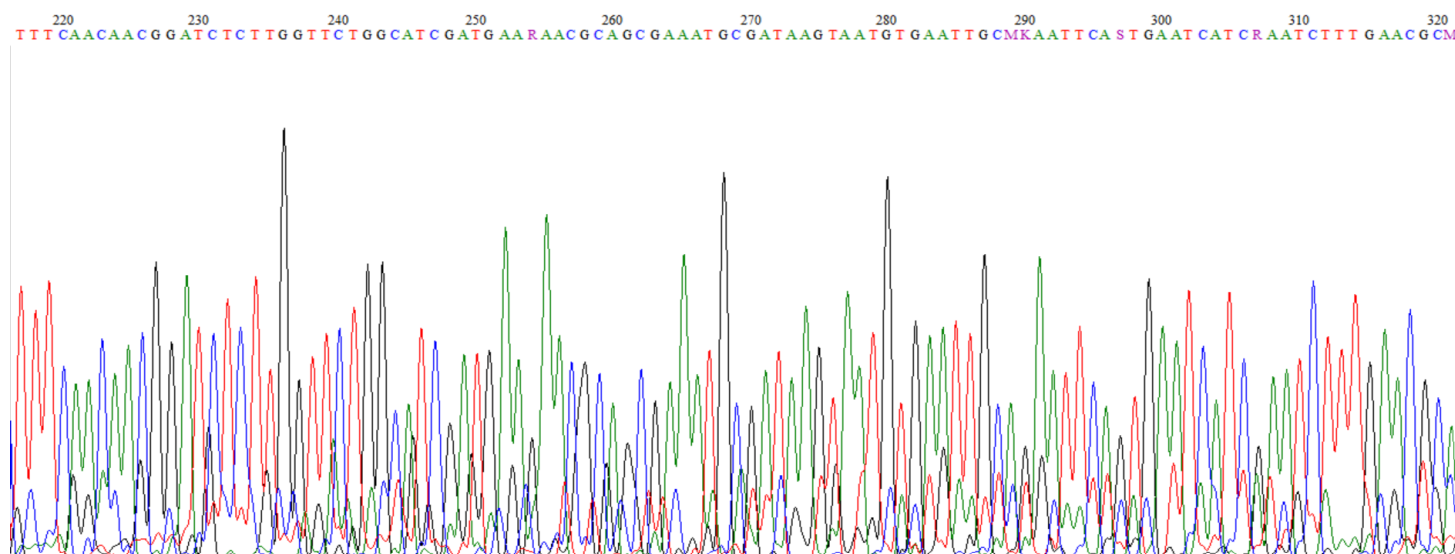


Figura 11. Representación de Electroferograma de *M. roleri* rango de amplificación de 220pb – 320pb, realizado en el programa Bioedit®.

Una vez secuenciadas las muestras por INMEGEN, se obtuvieron los electroferogramas en el programa Bioedit®, uno de ellos de la región 18.5 se muestra en la figura 11; donde se observa las bases de los nucleótidos claramente, este cuenta con polimorfismos que son equivalentes según el programa IUPAC (figura 12).

	G o C	A o T	G o T	A o C	C, G o T	A, G o T	A, C o T	A, C o G
residuo:	S	W	K	M	B	D	H	V
	enlace fuerte, Strong	enlace débil, Weak	oxobases, Keto	aminobases, aMino	no es A; siguiente letra	no es C; siguiente letra	no es G; siguiente letra	no es T; siguiente letra

Figura 12. Abreviaturas de polimorfismos de ácidos nucleicos, tomados del programa IUPAC.

Mediante el análisis correspondiente, se logró correlacionar el material genético de *M. roleri* de la región de Tuzantán Chiapas México (cuadro 3), con lo ya reportado por ciertos autores de identidad genómica respecto a la cepa de referencia. Se realizó un análisis BLAST para identificar a los organismos que coincidieron con la muestra, por lo que se filtraron las secuencias correspondientes a *M. roleri* y se hizo una comparación de las cepas ya reportadas en BLAST.

En el cuadro 3 se observa la descripción de secuencias identificadas en su máxima similitud y características contenidas por columna.

Cuadro 3. Análisis de similitud genética entre la cepa Moniliophthora roreri de Tuzantán Chiapas con secuencias reportadas en GenBank.

Autor., año	Bioproyecto	Localidad	Género y especie	Identidad (%)
Aime et al., 2005	AY916746.1	Costa Rica	<i>Moniliophthora roreri</i> C21	90.0
Phillips-Mora., 2006	PRJNA279170	Chiapas, México	<i>Moniliophthora roreri</i> strain MCA2954	92.0
Phillips-Mora et al., 2006	GU457436.1	Guatemala	<i>Moniliophthora roreri</i> isolate GU1	90.0
Torres de la Cruz et al., 2016	GU108605	Jalpa de Méndez Tabasco	<i>Moniliophthora roreri</i> isolate	89.7
Hipólito-Romero et al., 2020	PRJNA515757	Tabasco	<i>Moniliophthora roreri</i> CPMRT01	90.0

En el análisis BLAST se reportó un gran parecido con las cepas de *M. roreri* ya reportadas, entre ellas la cepa que más similitud presenta es la reportada en el municipio de Pichucalco en el norte del Estado de Chiapas (figura 14) con un 92% de similitud, seguido de las cepas de *M. roreri* reportadas en Tabasco, Guatemala y Costa Rica con un 90% de similitud y por último la cepa reportada en Tabasco en el municipio de Jalpa de Méndez con un 89.7% (figura 13). Con estos resultados se puede contrastar la similitud de *M. roreri* y saber si se trata de la misma cepa.

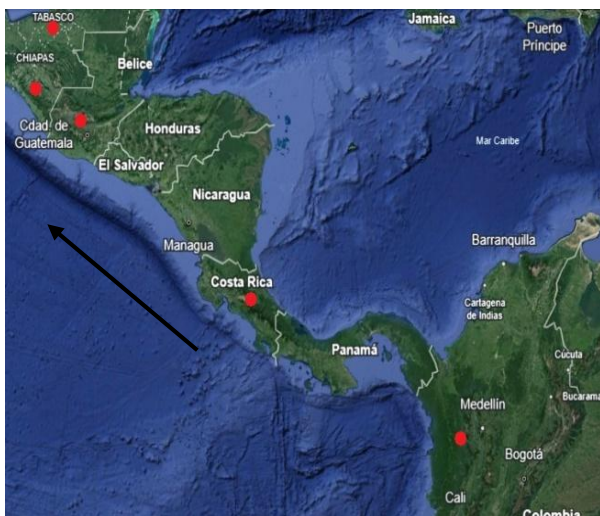


Figura 13. Países de América Latina con cepas reportadas de *M. roleri* en GenBank.



Figura 14. Reportes de *M. roleri* en GenBank en el estado de Chiapas, México.

9.5 Técnica de Cultivo Dual.

Para evaluar el grado de antagonismo de *C. fumosorosea* EH-510, se realizó una prueba de antagonismo preliminar contra hongos basidiomicetes confrontando a *C. fumosorosea* EH-510 vs *Lentinula edodes*, donde se observa que existió una inhibición de crecimiento por parte de *C. fumosorosea* (color blanco), evitando el desarrollo y crecimiento de *L. edodes* (color gris oscuro) como se observa en la figura 15.

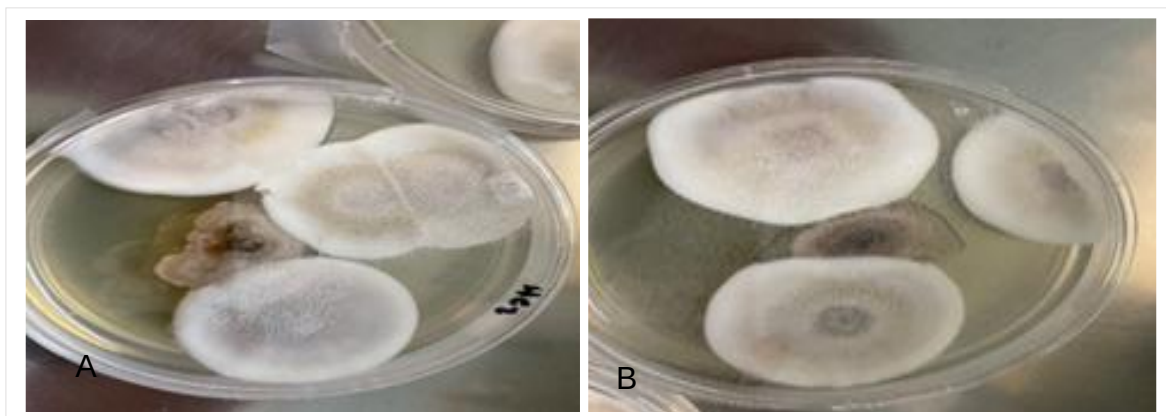


Figura 15) A y B, antagonismo de *C. fumosorosea* EH-510 vs *L. edodes* en medio artificial PDA.

Los resultados muestran que *C. fumosorosea* EH-510 tiene una gran capacidad antagónica ante hongos basidiomicetos, se hicieron preparaciones en fresco, se observaron al microscopio y se encontraron fíbulas (figura 16), que son estructuras de defensa cuando un hongo se encuentra en estrés, se debe al hiperparasitismo que ejerce *C. fumosorosea* ante *L. edodes*.

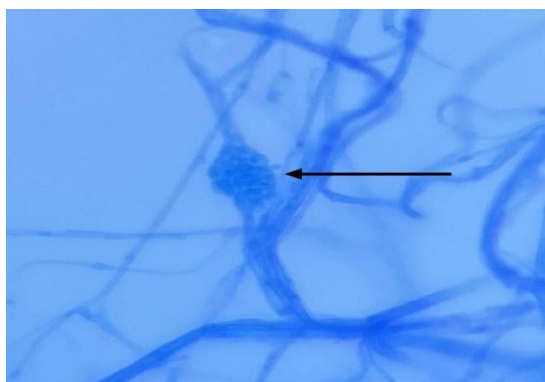
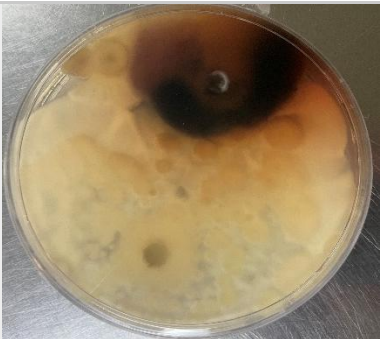
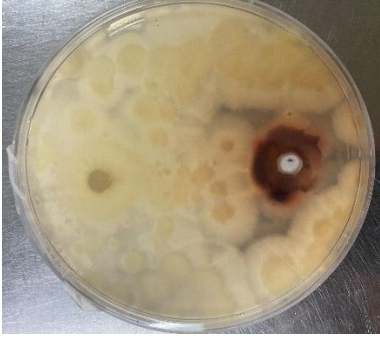
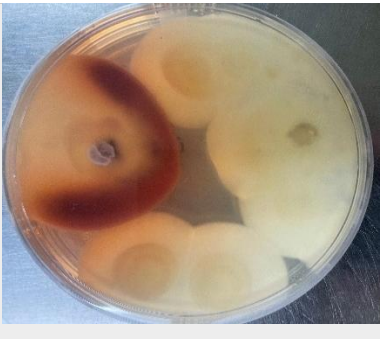
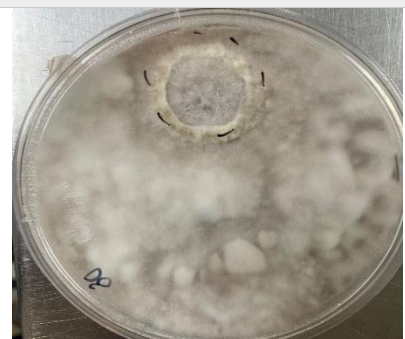
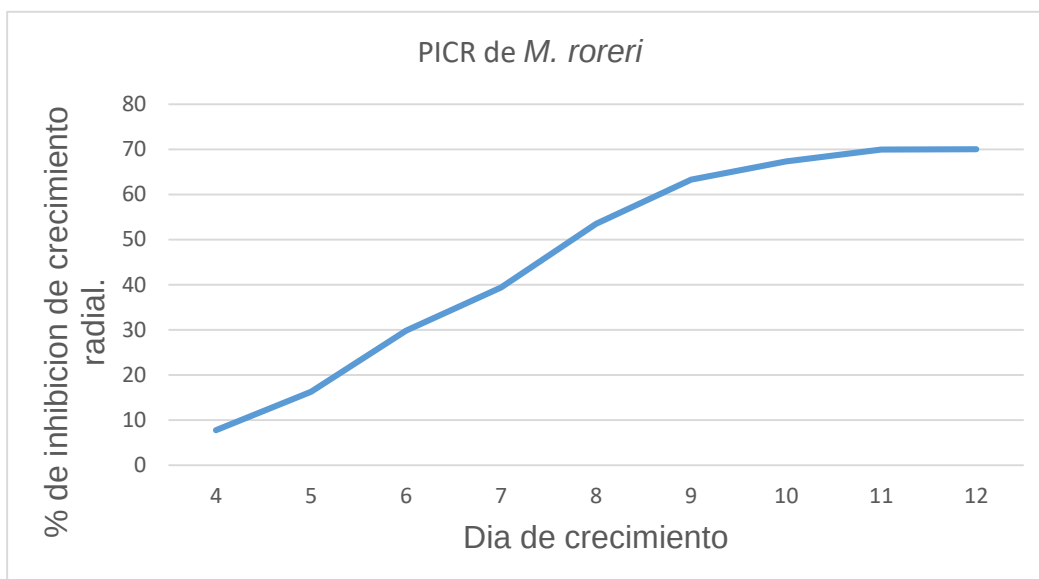


Figura 16. Presencia de fíbulas en el hiperparasitismo de *C. fumosorosea* vs *L. edodes* en medio artificial PDA visto a 40X y teñido con azul de Lactofenol.

En los resultados en la evaluación de la capacidad antagónica (cuadro 4) se realizaron pruebas de plato dual con el mismo tiempo de crecimiento (12 días) y la misma temperatura de crecimiento (30 - 32 °C Aproximadamente) se midieron cada 24 horas, teniendo como resultado en la escala de Bell *et al*;(1982) 15 platos duales con antagonismo “Muy bueno” y 15 platos duales con antagonismo “Bueno”, dando como resultado 50% con antagonismo “Muy Bueno” 50% con antagonismo “Bueno”.

Cuadro 4. Aspecto de algunos de los ensayos de la Capacidad Antagónica de *Cordyceps fumosorosea* EH-510 vs *Moniliophthora roreri* evaluados según Bell et al., (1982).

Imagen Anverso.	Imagen Reverso.	Grado de Antagonismo en la escala de Bell et al, (1982).
		Sobrecrecimiento del antagonista (<i>C fumosorosea</i> EH-510), colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio. Bueno
		Sobrecrecimiento del antagonista (<i>C fumosorosea</i> EH-510), colonizo toda la superficie del medio y redujo la colonia del fitopatógeno (<i>M. roreri</i>). Muy Bueno.
		Sobrecrecimiento del antagonista (<i>C fumosorosea</i> EH-510), colonizo al menos 2/3 de la superficie del medio. Bueno
		Sobrecrecimiento del antagonista (<i>C fumosorosea</i> EH-510), colonizo toda la superficie del medio y redujo la colonia del fitopatógeno (<i>M. roreri</i>). Muy Bueno.



Grafica 1. Porcentaje de inhibición de Crecimiento Radial de *M. roreri*

La actividad antagónica de *C. fumosorosea* EH-510 contra *M. roreri* mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) al realizar un Análisis de Varianza de una sola vía, mientras que el coeficiente de determinación R^2 ajustado solo explica el 27% del modelo.

El testigo *M. roreri* presentó un crecimiento diario promedio de 2.16 cm al estar solo en la caja Petri, en comparación con el plato dual donde *M. roreri* en presencia de *C. fumosorosea* EH-510 tuvo un crecimiento promedio de 1.1 cm en caja Petri; es decir, *C. fumosorosea* EH-510 puede utilizarse como agente de control biológico por ser eficaz contra *M. roreri*, teniendo un PICR de 70.03% a los doce días de crecimiento (grafica 1).

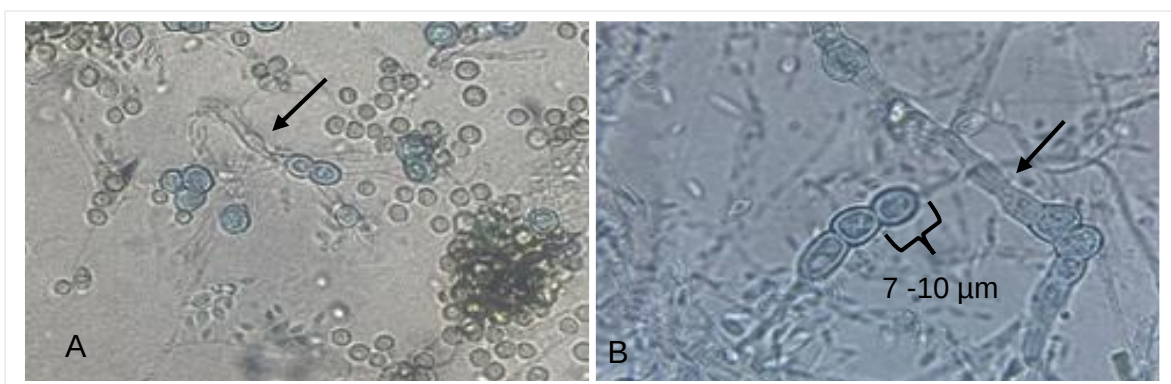


Figura 17. A) deformación de hifas de *M. roreri* en presencia de *C. fumosorosea* EH-510. B) hifas de *C. fumosorosea* EH-510 dentro de hifas de *M. roreri*, ambas vistas a 100X, teñidas con azul de lactofenol.

La cepa de *C. fumosorosea* EH-510 presento efecto hacia la cepa de *M. roreri*, durante el ensayo se observó micelio después de 4 días de crecimiento, creció en cima teniendo contacto directo y limito el crecimiento de *M. roreri*.

A través de preparaciones en fresco se observó que el micelio de *C. fumosorosea* EH-510 creció alrededor (enrollado) o interponiéndose sobre las hifas de *M. roreri* (figura 17B), causando deformaciones en las hifas de *M. roreri* como se observa en la figura 17A, algunas hifas de *M. roreri* se observaron vacías o con la pared celular totalmente degradada, por lo que *C. fumosorosea* pudo provocar lisis celular (figura 18B). Se observó que las hifas del antagonista eran de menor diámetro, lo que podría indicar que el micelio joven es el que realizó el contacto con las hifas del fitopatógeno y por la diferencia de crecimiento de ambos hongos, como se observa en las figuras 18C y 18D.

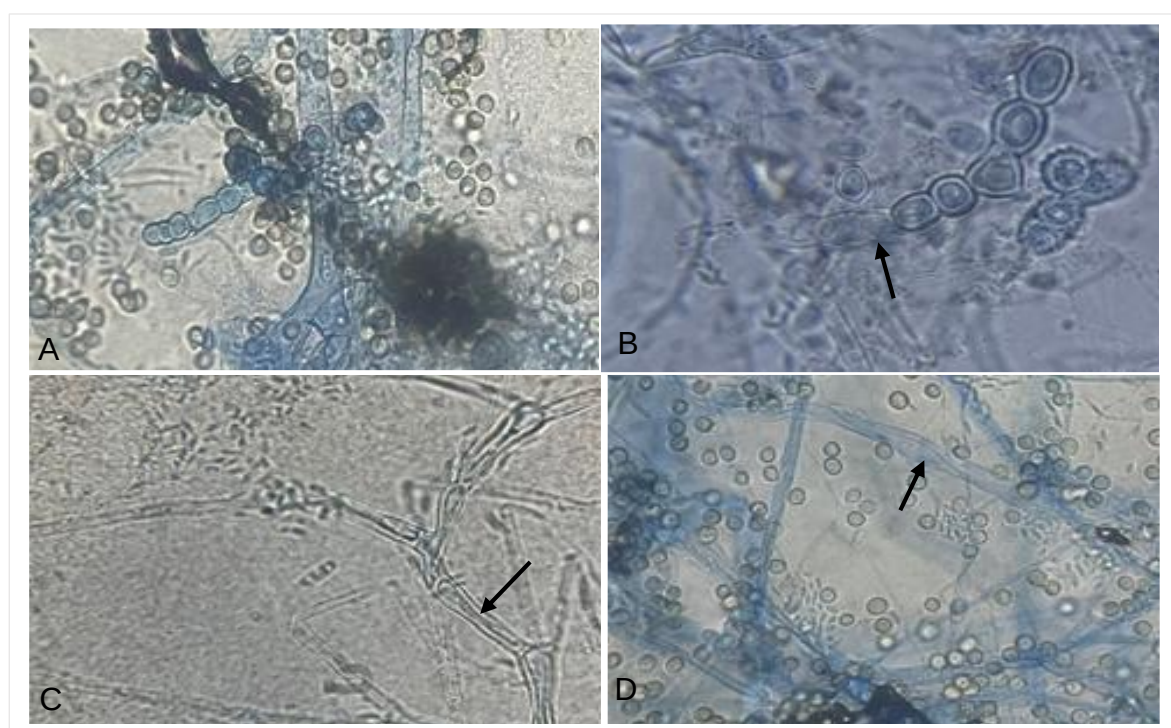


Figura 18. A) Hifas de *M. roreri* en presencia de conidios de *C. fumosorosea* EH-510, visto a 40X. B) Lisis celular de *M. roreri*, vista a 100X. C) Superposición de Hifas de *C. fumosorosea* EH-510 a *M. roreri*, visto a 40X. D) Penetración de hifas de *C. fumosorosea* EH-510 en hifas de *M. roreri*, vista a 40X. todas las muestras teñidas con azul de Lactofenol.

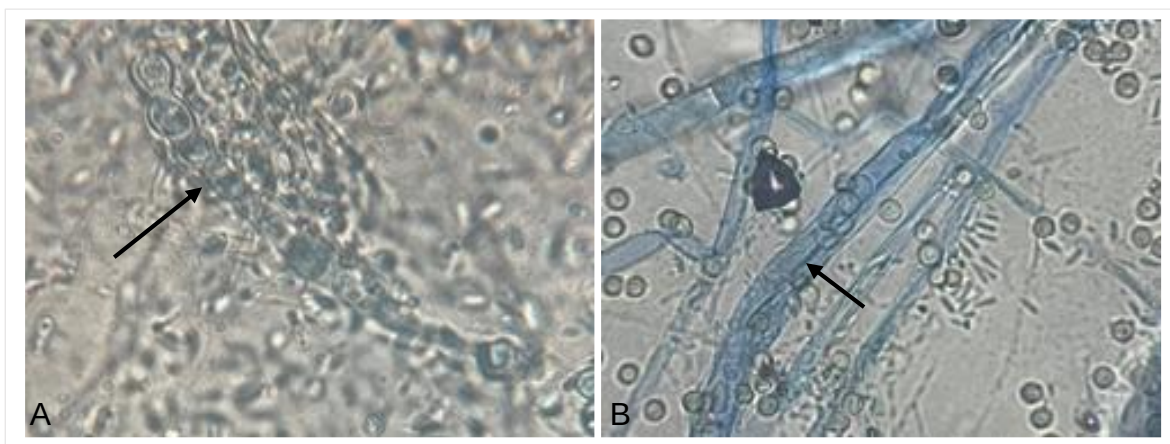


Figura 19.A) Lisis celular de *M. roreri*, visto a 100X. B) Penetración de hifas de *C. fumosorosea* EH-510 sobre hifas de *M. roreri*, visto a 40X. Teñidas con azul de Lactofenol.

En la figura 19A se observan hifas de *M. roreri* totalmente degradadas provocado por el contacto de *C. fumosorosea*, en la figura 19B existe la presencia de hifas de *C. fumosorosea* dentro de hifas de *M. roreri*.

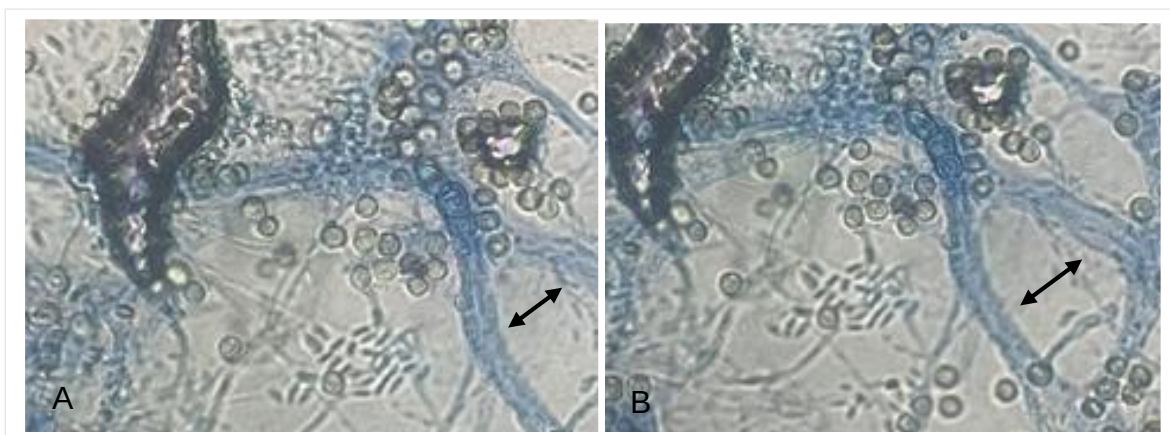


Figura 20. A Y B principios de Lisis celular de *M. roreri*, provocado por el crecimiento de *C. fumosorosea*, visto a 40X, teñido con azul de Lactofenol.

En la figura 20 A y B se observa la degradación de la pared celular de *M. roreri*, junto a conidios de *C. fumosorosea* EH-510, en la figura 21A se observa degradación de la pared celular de *M. roreri* provocada por *C. fumosorosea* EH-510 a un lado se observan conidios de *C. fumosorosea* y conidios de *M. roreri* mientras en la figura 21B se observan hifas de *C. fumosorosea* en contacto directo con hifas de *M. roreri*.

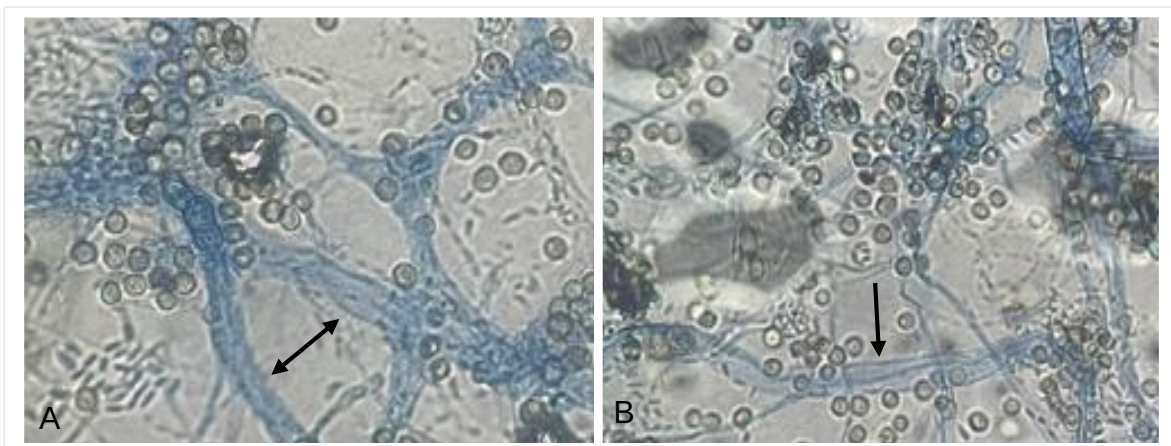


Figura 21. A) Principios de lisis celular de *M. royeri* provocado por *C. fumosorosea* EH-510. B) Hifa de *C. fumosorosea* EH-510 parasitando hifa de *M. royeri*. Vistos a 40X y teñidos con azul de Lactofenol.

9.6 Evaluación de cinéticas de producción de conidios de *C. fumosorosea* EH-510.

Se realizó un conteo en cámara Neubauer (figura 22B) para obtener las cinéticas de producción de conidios/ gssi en medio artificial PDA (Agar Papa Dextrosa).

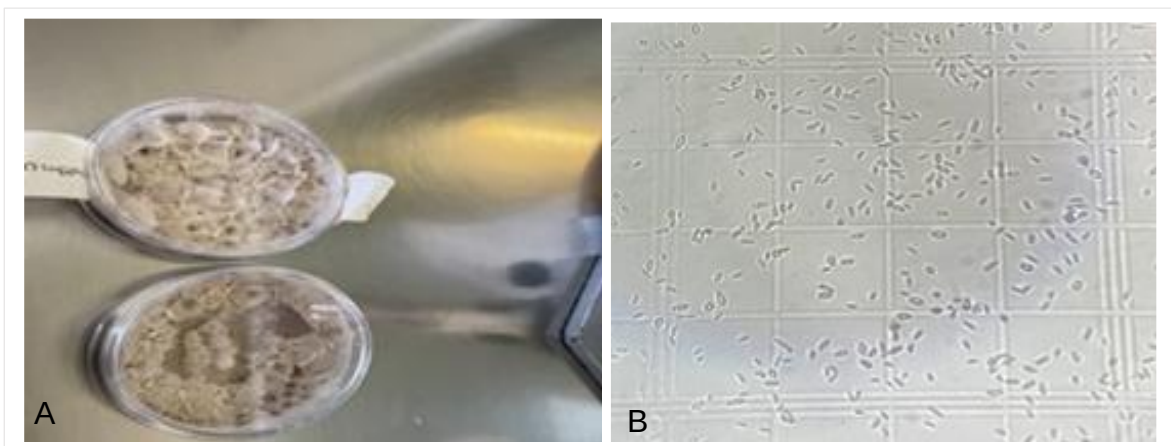
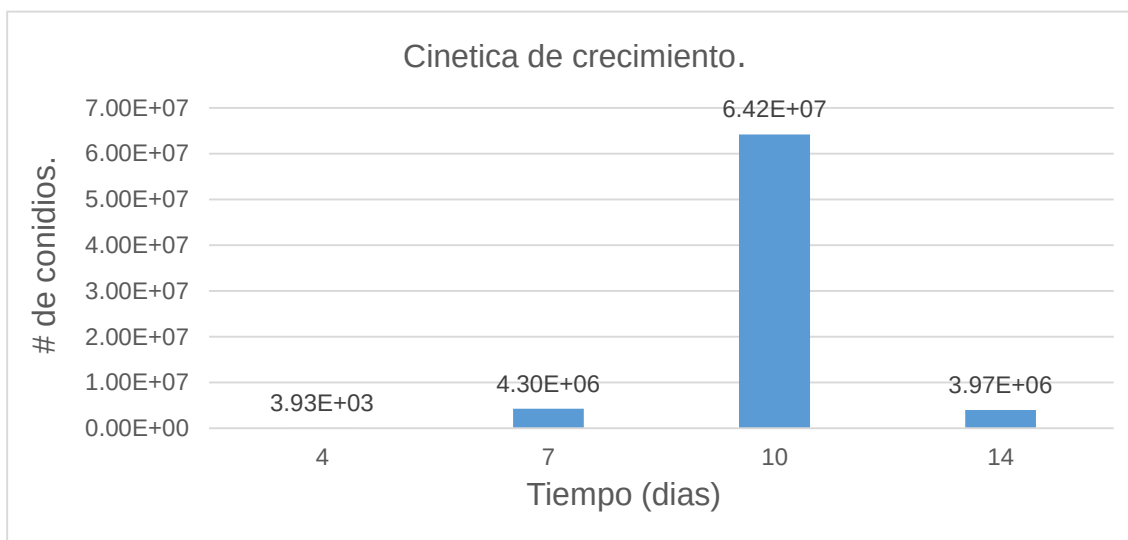


Figura 22. A) Crecimiento de *C. fumosorosea* al día 14 de ser incubado en un medio artificial PDA. B) Conteo de conidios de *C. fumosorosea* EH-510 en Cámara Neubauer, visto a 40X.

Con las cinéticas de producción se pretende saber cómo se comporta el crecimiento de *C. fumosorosea* EH-510 (figura 22A), nos ayuda para optimizar la producción de conidios y estudiar la influencia de factores como la temperatura de crecimiento.

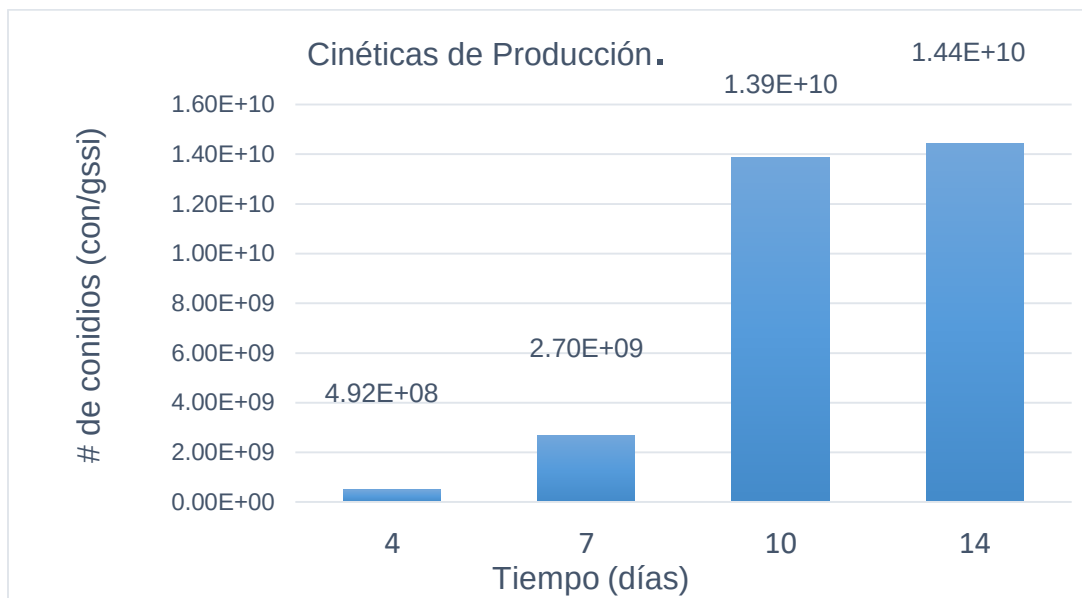


Grafica 2. Cinética de crecimiento de *C. fumosorosea* EH-510 en medio artificial PDA.

Los resultados obtenidos después del sembrado por estriado en medio artificial PDA para *C. fumosorosea* EH-510, mostraron que al día 4 comienza el crecimiento con un promedio de 3.93×10^3 conidios, al día 7 se obtuvo un promedio de 4.30×10^6 conidios, al día 10 existe un incremento significativo con 6.42×10^7 conidios, mientras que al día 14 se obtuvieron en promedio 3.97×10^6 conidios, mostrando que se tiene la mayor cantidad de conidios al día 10 (grafica 2), para corroborar se dejó crecer al día 14 (figura 22A), obteniendo una cantidad máxima de 6.65×10^7 conidios.

9.7 Rendimiento de conidios de *C. fumosorosea* EH-510 en sustrato sólido (Arroz).

La cinética de producción de *C. fumosorosea* EH-510 en arroz, (figura 23) indica que para el día 4 después de la inoculación comienza un incremento significativo en la cantidad de conidios obteniendo 4.92×10^8 con/gssi, al día 7 se tiene un incremento de 2.20×10^9 con/gssi, alcanzando la máxima producción de conidios en los días 10 al 14, este último con la producción máxima de 1.44×10^{10} con/gssi (Gráfica 3). Las diferencias entre la producción de conidios en sustrato sólido son notables cuando se comparan con el sembrado en medio artificial PDA.



Grafica 3. Cinéticas de producción de *C. fumosorosea* EH-510 en sustrato sólido arroz.



Figura 23. Producción de *C. fumosorosea* EH-510 en sustrato sólido arroz.

Estos datos arrojados explican la velocidad de crecimiento de *C. fumosorosea* EH-510 en sustrato sólido, ahora se sabe que su punto máximo de crecimiento es después del día 10, saber qué día se tienen mayor cantidad de conidios y poder realizar aplicaciones en laboratorio, aplicaciones en campo y obtener mejor probabilidad de contagio y lograr mejores resultados.

Con los resultados obtenidos ahora se tienen las diferencias entre un sembrado en medio PDA y sembrado en un sustrato sólido para *C. fumosorosea* EH-510.

9.8 Diagnóstico de la zona.

La parcela “La Mandarina” perteneciente al Sr. Nehemías Zunum integrante Cooperativa Agroproducciones Integrales Sarabia, está ubicada en la comunidad de Tuzantán Chiapas, dicha cooperativa cuenta con una certificación orgánica, por lo cual no cuenta con aplicaciones de Agroquímicos, se hizo el reconocimiento del terreno y a continuación se describe el estado del mismo:



Figura 24. A) Mazorcas infectadas con *M. royeri* conviviendo con mazorcas sanas. B) Mazorcas infectadas con *M. royeri* depositadas sobre un río de agua cristalina. C) Mazorcas infectadas con *M. royeri* a un costado del río. D) Mazorcas infectadas con *M. royeri* tiradas en la parcela.

Los productores mencionan que tienen pérdidas de hasta un 80% de su producción, al llegar a la zona de estudio se encontró un mal manejo cultural, se observaron mazorcas infectadas con *M. royeri* sobre un río de agua limpia (figura 24B), este río baja a otras comunidades siendo esto una fuente de dispersión de esporas. De igual manera estas mazorcas infectadas se encontraron a un costado del río (figura 24C). Se observaron mazorcas infectadas creciendo a un costado de mazorcas sanas (figura 24A), corriendo el riesgo de que con el viento o el movimiento de los

agricultores se dispersen las esporas de *M. royeri*. Se observaron mazorcas infectas tiradas sobre el suelo de la parcela (figura 24D), con la probabilidad de que exista la presencia del patógeno en el suelo. A partir del diagnóstico de la zona se sugirió al propietario hacer aspersiones con *C. fumosorosea* EH-510 y se hicieron recomendaciones de manejo agronómico.

9.9 Aplicación en campo.

Se produjo en laboratorio arroz inoculado con *C. fumosorosea* EH-510 y se dejó crecer más de 14 días para alcanzar la concentración de conidios adecuada para hacer la aplicación en campo.

Derivado de las recomendaciones hechas en la visita de diagnóstico se limpió la parcela, se podaron árboles que les brindan sombra a los cacaos, se quitaron todas las mazorcas infectadas con signos de moniliasis y solo se dejaron las mazorcas sanas, esas mazorcas variaron en edad y en madurez, en la época que se realizó la primera aspersión se tenían pocos frutos debido a que fue temporada de floración (crecimiento o brotes de fruto) figura 25A.



Figura 25.A) Floración del fruto en *T. cacao*. B) Lavado de arroz inoculado con *C. fumosorosea* EH-510 para la aspersión en campo.

En campo se realizó un lavado de arroz con *C. fumosorosea*, se utilizó agua de río hasta que se completaron los 20L de capacidad de la bomba (figura 25B).

La aplicación en campo fue junto con los agricultores de la Cooperativa de Tuzantán Chiapas (figura 26A), para compartir con ellos el proceso y hacer énfasis en las

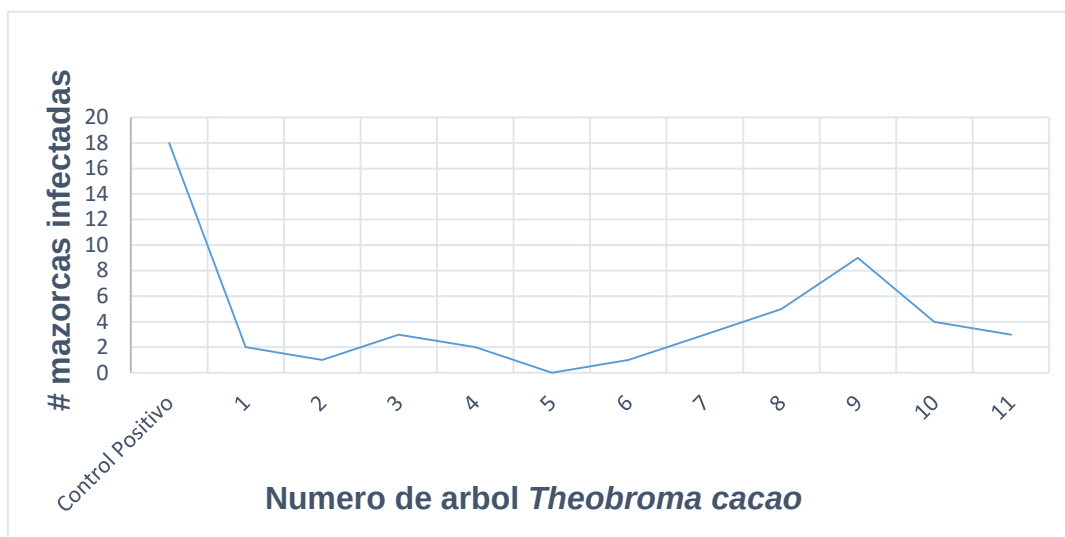
condiciones que se requieren para hacer una aspersión con *C. fumosorosea* EH-510.



Figura 26. A) Aspersión directa de *C. fumosorosea* EH-510 a ejemplares de *Theobroma cacao*. B) Aplicación de *C. fumosorosea* EH-510 hecha por uno de los agricultores.

Con las aplicaciones demostrativas en campo (figura 26B), se buscó tener una capacitación practica para los agricultores, sobre cómo implementar una aplicación de hongos entomopatógenos para el control biológico y la promoción de buenas prácticas agrícolas.

Se han realizado aspersiones periódicas, aproximadamente cada mes y medio, con *C. fumosorosea* EH-510, la primera que se realizó fue una aspersión demostrativa, el objetivo era exhibir el cómo se debe realizar una aplicación de este tipo, para las siguientes aspersiones se llevó un registro de crecimiento de mazorcas de cacao para conocer el porcentaje de incidencia de *M. royeri* (grafica 4).



Grafica 4. Incidencia de *M. roreri* en Mazorcas de cacao después de la aplicación con *C. fumosorosea* EH-510.

En la Grafica 4 se muestra la incidencia de *M. roreri*, comenzando con el control positivo el cual se encontró fuera de la parcela de estudio, este control positivo no cuenta con control cultural y no recibió aplicaciones de *C. fumosorosea* EH-510, fue la referencia para poder comparar el antes y después de las aplicaciones. El control positivo contó con una alta incidencia, llegando a un 85% de infestación de *M. roreri*. Los agricultores comentaron que en los últimos años se ha presentado como una constante en sus parcelas, mientras que en la parcela de estudio “La Mandarina” después de la segunda aplicación con *C. fumosorosea*, *M. roreri* mostró una incidencia máxima del 14% en los 11 árboles de *T. cacao*, una diferencia notable entre el Control positivo y la parcela experimental (Cuadro 5).

En el cuadro 5 se muestra la cantidad de mazorcas sanas después de la segunda aplicación, en el control positivo se observó un total de 3 mazorcas sanas; mientras tanto la parcela “La Mandarina” presentó un número mayor de mazorcas sanas teniendo un total de 205; reduciendo un 71% la incidencia de *M. roreri* en la parcela “La Mandarina”.

Cuadro 5. Registro de Mazorcas en la parcela de estudio después de dos aplicaciones de *C. fumosorosea* EH-510.

<i>Theobroma cacao</i> (árbol)	Mazorcas infectadas	Mazorcas sanas
1	2	6
2	1	4
3	3	21
4	2	19
5	0	9
6	1	6
7	3	16
8	5	31
9	9	20
10	4	17
11	3	56
Suma Mazorcas	33	205
Suma total	238	
%	14%	86%

En cuanto a la morfología de los frutos una comparación del antes (figura 27A) y después de la aplicación donde se observó un aspecto limpio en la mazorca, una mayor cantidad de pulpa, así como semillas más grandes (figura 27B), aprovechando todo el fruto de *T. cacao*.



Figura 27. A) fruto de *T. cacao* antes de realizar la aspersión, puede observarse el aspecto acuoso de la pulpa. B) fruto de *T. cacao* después de realizar la aplicación de *C. fumosorosea* EH-510.

Con los resultados obtenidos después de las aspersiones con *C. fumosorosea* EH-510 se pudo observar una gran diferencia hacia los ejemplares de *T. cacao*. Se presentaron parcelas más limpias, con un adecuado control biológico y cultural, en la figura 28A se tienen ejemplares adultos listos para su cosecha y libres de moniliasis, en la figura 28C se observan brotes y juveniles sanos en crecimiento, en la figura 28B se ven mazorcas adultas libres de moniliasis listas para su cosecha y en la figura 28D se muestran ejemplares juveniles sanos en crecimiento libres de moniliasis, estos resultados se han obtenido gracias a que se ha conjugado un manejo cultural y un manejo por control biológico.



Figura 28. A) Mazorca de *T. cacao* sana y lista para su cosecha en la parcela "La Mandarina". B) Mazorcas adultas sanas de *T. cacao* en la parcela "La Mandarina". C) Juveniles de *T. cacao* en crecimiento en la parcela "La Mandarina". D) Crecimiento de juveniles sanos de *T. cacao* en la parcela "La Mandarina".

Con la aplicación de campo se mejoró la calidad de los frutos y ayudó a que los agricultores tuvieran mejores ingresos económicos ya que la producción de cacao es mayor comparada con otras zonas de Tuzantán donde no se hizo el control cultural y el control biológico de la moniliasis.

9.10 Desarrollo del programa a corto plazo para introducir el control biológico con *C. fumosorosea* EH-510 contra *M. roreri* en la región de Tuzantán Chiapas.

-Argumentos: Se identificaron las necesidades de la comunidad de Tuzantán, de acuerdo con las características morfológicas, microscópicas, moleculares y de literatura el patógeno identificado es *M. roreri*, que provoca la moniliasis del cacao. Esta plaga afectó hasta en un 80 % en la producción al inicio de esta investigación.

-Educación y Capacitación: Se impartieron talleres para tener un manejo cultural apropiado, los productores fueron muy receptivos ante estos talleres, se presentaron videos (figura 29) y trípticos (figura 30), ahora disponen de una mayor información de cómo tener un manejo cultural adecuado ante la presencia de la moniliasis. Se impartió un seminario que ayudó a comprender los beneficios del Control Biológico, como funciona, como implementarlo para obtener mejores resultados (figura 29).



Figura 29. Taller de cómo implementar el Control Biológico impartido por el Biólogo. Izaú Federico Moreno Antillón.



Figura 30. Trípticos presentados a los agricultores realizados por la Dra. Judith Castellanos.

Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran que los agricultores participantes en el estudio comprendieron el manejo cultural, tienen sus parcelas limpias, libres de frutos infectados por moniliasis (figura 31A), tienen periódicamente un control de arvenses, la poda de los árboles de cacao y de los árboles que les dan sombra, a diferencia de los productores que no contaron con esta información y este taller (figura 31B) donde se observaron mazorcas de cacao infectadas a un lado de mazorcas sanas entre otras prácticas que favorecen la dispersión del patógeno.



Figura 31. A) Árboles de *T. cacao* con un adecuado manejo cultural dentro de la parcela de estudio. B) Manejo cultural no adecuado dentro de la cooperativa.

En la última visita a la zona de estudio en Tuzantán Chiapas, se realizó un taller con la participación de los agricultores, para que comenzaran a producir su propio arroz inoculado con *C. fumosorosea* EH-510 (figura 32A), para que ellos pudieran hacer sus aplicaciones y llevar a cabo su control biológico. Los resultados obtenidos hasta ahora de la participación de los agricultores, son que en sus parcelas se presentan frutos sanos y listos para cosechar (figura 32B).



Figura 32. A) Don Nico, cooperativista participante en el estudio, participando en un taller de como inocular su propio arroz con *C. fumosorosea* EH-510. B) Frutos sanos resultado de un manejo cultural adecuado y el control biológico con *C. fumosorosea* EH-510.

-Demostraciones Prácticas: Los productores que realizaron aplicaciones en campo de *C. fumosorosea* EH-510 (figura 33A) ahora saben que cantidad de arroz

necesitan para hacer una aspersión (figura 33B) y se percataron cómo funciona directamente el Control Biológico.



Figura 33.A) Aspersión de C. fumosorosea EH 510 por los agricultores en la parcela “La Mandarina”. B) Entrega de arroz inoculado con C. fumosorosea EH510 a los agricultores para su aspersión en la comunidad de Tuzantán Chis.

-Fomentar la colaboración: Entre Agricultores y comunidad cada vez se suman más productores aledaños preguntando qué fue lo que se hizo para controlar la moniliasis buscando una solución a su problema; entre ellos comparten experiencias y conocimientos para mejorar la implementación del Control Biológico. En la figura 34A se observan tres agricultores de cacao (de izquierda a derecha), que pertenecen a esta comunidad, interesados en el control biológico de la moniliasis del cacao.



Figura 34. A) Colaboración de agricultores de la Cooperativa Agroproducciones Sarabia en Tuzantán Chiapas México. B) Dos de los agricultores de la comunidad y el autor.

10. Discusión.

Trabajo en laboratorio.

Con respecto al sembrado del interior y exterior de las mazorcas se confirmó morfológicamente que *M. roreri* está presente mayoritariamente en los frutos de *T. cacao* en la comunidad de Tuzantán Chiapas, México. De los demás hongos obtenidos de las mazorcas existe la posibilidad de una exclusión hacia *M. roreri* por *Fusarium* sp. ya que el crecimiento de *Fusarium* sp. es más rápido comparado con *M. roreri*, por la diferencia en días de crecimiento es probable que esta condición inhiba la aparición inmediata de *M. roreri in vitro*, además de otros aislados identificados este estudio (*Acremonium* sp, *Penicillium* sp, *Geotrichum* sp, *Gliocladium* sp). Como lo menciona Necha & Barrera, (2008), *M. roreri* presenta un modo de infección del interior de la mazorca hacia afuera presentando un crecimiento lento y completando su ciclo de vida en 90 días.

Otra posibilidad es que exista una coinfección entre *M. roreri* y *Fusarium* sp, aunque aún no hay literatura que corrobore esta información, sin embargo, fue difícil obtener el cultivo puro de *M. roreri*, lo que sugiere el crecimiento simultáneo de ambos hongos desde el interior de la mazorca.

En cuanto a las muestras de suelo, se encontró una gran diversidad de microbiota fúngica, hay microorganismos beneficiosos que no solo mejoran la disponibilidad de nutrientes para las plantas de cacao, sino que también establecen relaciones sinérgicas como es el caso de *Trichoderma* sp, que pueden influir en la tolerancia de las plantas al estrés abiótico como lo menciona Guerrero & Meléndez (2023), Tejedor (2020) menciona que las semillas de cacao son muy amargas y ácidas, para que pierdan ese mal sabor, deben ser fermentadas por *Geotrichum* sp. que fue aislado en muestras de suelo de Tuzantán Chiapas, Berruti et al. (2016) también reporta a *Fusarium* sp como un hongo perjudicial para *T. cacao*, este causa marchitez en estos plantíos.

No todos los microorganismos encontrados producen enfermedades a *T. cacao* como lo hace *M. roreri*, la presencia de *M. roreri* en muestras de suelo indica la presencia del patógeno en la zona, esto junto con la gran capacidad de dispersión

de las esporas, ya sea por corrientes de aire, vibraciones del árbol durante la cosecha o poda (Martínez, 2015) es la razón de la gravedad de esta enfermedad en esta comunidad.

Una vez aislada y purificada la cepa de *M. roreri*, se corroboró su identidad con un análisis genético, con la técnica de PCR de punto final en las regiones ITS 1 y 2. Se obtuvieron amplificaciones por 700 pb como lo reporta Suarez (2015), según Bridge y Arora (1998) la región ITS es utilizada para estudios de caracterización molecular en hongos debido a que es una región relativamente corta (500 - 800 pb) y puede ser fácilmente amplificada por PCR utilizando solo pares de cebadores universales (ITS 4 y 5)..

Para el análisis molecular *Raja et al* (2017), mencionan que la mayoría de las especies fúngicas descritas morfológicamente (alrededor del 70%), hasta ahora no han sido secuenciadas, y pueden dar falsos positivos al compararlas en BLAST, debido a las limitantes de secuencias previamente mencionadas y a que los nombres científicos taxonómicos no están actualizados por la naturaleza rápidamente cambiante de la taxonomía de los hongos, al correr la secuencia completa (700pb) en el análisis BLAST arrojó que se trataba de *Trichoderma sp*, por esta razón se decidió acortar la secuencia a 189 pb que corresponde a la región 18S y correrlo nuevamente en análisis BLAST, obteniendo como resultado la identificación de *M. roreri* tanto fenotípica como genotípicamente.

Raja et al. (2017) mencionan que las cepas tipo no son obvias ni están claramente indicadas, muchas secuencias no tienen nombre o sólo se nombran parcialmente, aunado a que las anotaciones de registros de terceros no están permitidas en GenBank; con esto se muestra que aún hay muchos sesgos en este tipo de análisis, por estas razones se deben manipular con sumo cuidado para no cometer errores con respecto a la identificación de hongos microscópicos.

La homología de la secuencia de ADN ribosomal de *M. roreri*, con las secuencias provenientes de aislamientos de plantaciones de cacao de América Latina, confirma que *M. roreri* se dispersó hacia México a partir de cepas presentes en países de Centroamérica como lo menciona Torres de la Cruz *et al.* (2016), algunos factores

que facilitaron la dispersión de *M. roreri* la ausencia de control fitosanitario efectivo, falta de conciencia sobre la enfermedad, el movimiento de personas y mercancías sin restricciones y las condiciones climáticas.

En la evaluación *in vitro* la capacidad antagonica de *C. fumosorosea* EH-510 contra *M. roreri* el primero reduce o detiene el desarrollo del segundo al detener completamente el desarrollo del fitopatógeno estos resultados son similares a los que menciona Sánchez-García *et al.* (2017) para *Trichoderma* al enfrentarlo con *M. roreri*, encontrando que el hongo benéfico mostró capacidad inhibitoria por arriba del 70%, sus resultados son similares a los que se presentaron al evaluar en campo *C. fumosorosea* EH- 510 ante *M. roreri*.

El hongo antagonista *C. fumosorosea* EH-510 provoco inhibición en el crecimiento de *M. roreri* al inducir la lisis celular, por el contacto directo de hifas o probablemente mediante la secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares que degradaron la pared del fitopatógeno, o por la combinación de estos; los mecanismos mencionados son considerados como lo principal en el biocontrol a través de su acción sobre los constituyentes de la pared celular del patógeno. como lo menciona Villavicencio (2018), los mecanismos antes mencionados son considerados importantes en el biocontrol, porque su acción ocurre sobre los componentes de la pared celular del patógeno. Bell *et al.* (1982), mencionan que se puede conocer la capacidad genética del antagonista y del fitopatógeno para resistir el antagonismo *in vitro*, pero no se puede relacionar con lo que sucede en campo, sin embargo, en el presente estudio pudo observarse un comportamiento semejante en las pruebas antagonicas en laboratorio y en los arboles de cacao.

Una vez que se comprobó el antagonismo fue necesario realizar pruebas de producción de conidios. En la cinética de producción Behle *et al.* (2022), mencionan que para considerar un sustrato sólido como idóneo a los fines para la producción de una cepa o aislado de un hongo entomopatógeno, debe tomarse en cuenta su bajo costo, fácil adquisición, producción de alta concentración de conidios y capacidad para mantener la virulencia de la cepa.

Para evaluar las cinéticas de producción de conidios de *C. fumosorosea* EH-510, tuvieron como objetivo determinar la velocidad de esporulación de *C. fumosorosea* EH-510 y la cantidad de conidios a un tiempo determinado. Monzón (2011) menciona para tener una mayor probabilidad de contacto y causar patogenicidad a un hospedador susceptible se necesita obtener cantidades mayores a 1×10^8 con/gssi, con el medio artificial PDA *C. fumosorosea* EH-510 no alcanza esa concentración de conidios, por eso que se recurre a un sustrato sólido en este caso arroz. Behle *et al.* (2022), mencionan una mayor producción de esporas da como resultado un menor costo del producto y, por lo tanto, brinda una mayor oportunidad de competir con los insecticidas químicos en el mercado.

Para determinar el rendimiento de conidios de *C. fumosorosea* EH-510 en un sustrato sólido, el grano de arroz es el más común usado para la producción masiva de hongos entomopatógenos Bhanu *et al.* (2008), ya que mantiene una adecuada superficie efectiva para el crecimiento micelial, balance nutricional y condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en aireación y humedad (Rodríguez *et al.*, 2017).

Trabajo en Campo.

La aspersión en campo *C. fumosorosea* EH-510 con concentraciones aproximadas a 1.44×10^{10} con/gssi presentó el mayor porcentaje de reducción de moniliasis de cacao en campo, con una reducción de 71% en comparación al testigo, este resultado concuerda con la evaluación realizada por Reyes- Figueroa *et al.* (2016), los cuales utilizaron *Trichoderma sp* como biocontrolador para *M. roreri*, en la actualidad los productores de la Cooperativa Agroproducciones Sarabia presentan una reducción de la incidencia de *M. roreri* de hasta el 90%, ya que se ha seguido trabajando en las aspersiones en campo con *C. fumosorosea* EH-510.

Respecto a la aplicación en campo de *C. fumosorosea* EH-510 sirve para prevenir el desarrollo y crecimiento de la moniliasis, contribuyendo a la reducción en el uso de plaguicidas como parte de una estrategia de manejo integral de plagas. Este tipo de control se basa en la premisa de contrarrestar la pérdida de hábitat y las alteraciones ambientales asociadas con los cultivos de cacao como lo mencionan

Arroyo *et al.* (2020), proporcionando un valioso servicio ecosistémico Villareal (*et al.*, 2018). La aplicación de estos antagonistas microbianos debe integrarse con prácticas de prevención de diseminación de la enfermedad y con la asociación a prácticas culturales.

La cepa de *C. fumosorosea* EH-510, posee un potencial de biocontrol contra *M. royeri* los resultados obtenidos indican que controló al fitopatógeno, ya que ahora el número de mazorcas sanas ahora se presentan en mayor número, con un aspecto más limpio, más grande, mayor cantidad de pulpa y semillas más grandes, la energía del fruto se concentró en crecer y no en combatir una enfermedad como lo menciona Avendaño (2018), comparadas con las mazorcas enfermas, se invirtió este número, la disminución de la moniliasis por la presencia de *C. fumosorosea* EH-510, puede ser por hiperparasitismo, por la producción enzimas extracelulares hidrolíticas como quitinasas, glucanasas y proteasas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante y poder penetrar y micoparasitar al hospedero, lo cual causa deformaciones del micelio rompiendo las paredes celulares y evitando que siga su crecimiento tal como lo menciona Villavicencio (2018).

López-Báez *et al.* (2016) mencionan que los frutos de menor edad son más susceptibles al desarrollo de la infección, el patógeno presenta la capacidad para infectarlos en cualquier momento, con aspersiones periódicas, *C. fumosorosea* EH-510 formara parte de la microbiota de la comunidad del suelo, alcanzando el equilibrio entre fitopatógeno (*M. royeri*) y antagonista (*C. fumosorosea* EH-510).

Michel *et al* (2019), manifiestan que la combinación de labores culturales junto con fungicidas, pueden incrementar la producción de cacao sano en un 20%, obteniendo mejores resultados ante este manejo cultural. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que puede obtenerse hasta un 80% de producción al incorporar el uso de antagonistas al control cultural y eliminando los fungicidas químicos.

Para futuras aspersiones, en la práctica es necesario realizar una selección exhaustiva del agente biocontrolador conocer su forma de ataque frente a cada fitopatógeno antes de ser empleado en campo. Dado que los intereses comerciales y de los consumidores apoyan el uso de insecticidas biológicos de base microbiana

para el control de plagas, es importante descubrir y evaluar las cepas en función de sus características beneficiosas que son relevantes para la creación de bioplaguicidas.

Para desarrollar el programa a corto plazo para introducir el control biológico con *C. fumosorosea* EH-510 contra *M. roreri* en la región de Tuzantán Chiapas, Rivas *et al.* (2012), mencionan que para tener mayores beneficios para introducir el control biológico, la concientización, la capacitación y la colaboración son fundamentales, en cuanto a los agricultores de la Cooperativa Agroproducciones Sarabia tienen el conocimiento de la moniliasis, saben su ciclo de vida, como actuar en presencia de la misma, ellos cuentan con la información necesaria para hacer un control cultural efectivo y han comprendido los beneficios del control biológico, al inicio de esta investigación no se comprendían estos beneficios y no se contaba con la información necesaria, en cuanto a la colaboración los agricultores han sido muy receptivos y compartidos ante toda la información que se les ha brindado, los agricultores comparten la información adquirida con la Cooperativa, tienen el conocimiento de que entre más agricultores se sumen a esta participación tendrán mejores resultados y toda la comunidad tendrán mejores beneficios en la producción de cacao como lo menciona Zepeda (2018).

11. Conclusiones.

- El hongo entomopatógeno *C. fumosorosea* EH-510 mostró actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *M. roreri*, por lo que puede ser una alternativa de control biológico de la moniliasis.
- Las características macro y microscópicas del aislamiento estudiado coincidieron con las reportadas por Phillips-Mora *et al.* (2006), para *M. roreri*. Así también, el análisis molecular confirmó la identificación del hongo causante de la moniliasis del cacao en Tuzantán Chiapas México.
- Se aisló e identificó molecularmente a *M. roreri* extraído de *T. cacao* de la comunidad de Tuzantán Chiapas México, se estandarizó una técnica molecular en *M. roreri*, utilizando los marcadores moleculares ITS 4 e ITS 5, siendo además una herramienta confiable para el estudio de variabilidad genética entre diferentes

muestras y las relaciones existentes entre ellas, esta confirmación es relevante para estudios posteriores que permitan evaluar estrategias de control eficientes a nivel regional.

- Las cinéticas de producción permitieron identificar el comportamiento y la velocidad de crecimiento del hongo entomopatógeno *C. fumosorosea* EH-510 en arroz para aspersiones en campo.
- La evaluación en campo con las aspersiones realizadas con *C. fumosorosea* EH-510, logro un avance notable en el control biológico de la moniliasis, durante los muestreos ambientales se observó la presencia del objetivo *C. fumosorosea* EH-510 en la zona para realizar el control biológico de la enfermedad.
- Los productores de la Cooperativa Agroproducciones Integrales Sarabia después de los talleres, recomendaciones y conferencias conocen:
 - La información sobre la moniliasis y su transmisión, así mismo desarrollar estrategias efectivas de prevención.
 - La investigación y el monitoreo continuo permiten entender la dinámica de la moniliasis y ajustar las estrategias de control biológico.
 - La información sobre las condiciones climáticas y ambientales puede ayudar a predecir y prevenir brotes de la moniliasis.
 - La educación y la conciencia sobre la moniliasis ayudan a los productores a tomar decisiones sobre el manejo de su cultivo.
- En cuanto a la patogenicidad de *C. fumosorosea* EH-510 ante *M. royeri*:
 - Invadió y colonizo a *M. royeri* inhibiendo su crecimiento y desarrollo.
 - Adhirió y colonizo a las hifas de *M. royeri*.
 - Causo daño irreversible a *M. royeri* degradando sus hifas.
 - Evadió la respuesta inmune de *M. royeri*.

12. Recomendaciones.

Se debe considerar a *C. fumosorosea* EH-510 un controlador biológico efectivo ante *M. royeri*.

Desarrollar una formulación de *C fumosorosea* EH-510 para implementarla en campañas de control biológico de la moniliasis.

Realizar estudios sobre los factores que favorecen la eficiencia de la aplicación de *C. fumosorosea* EH-510 en campo (equipo de aplicación, gasto de agua, tipo de boquillas, cobertura, velocidad de germinación, número de aplicaciones).

Seguir con las investigaciones sobre el control biológico de la moniliasis, ya que existe poca o nula información sobre esta problemática en AL.

13. Referencias.

-Acosta, R. S., Pacheco, J. D. S., Medina, A. D. V., García, B. Z., Sirlopú, R. Y., Sánchez, P. C., & Saavedra, C. C. (2021). Microorganismos entomopatógenos y antagonistas empleados en cultivos de agroexportación en Perú en el nuevo milenio. *Agroindustrial Science*, 11(3), 323-338.
<https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2021.03.10>

-Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97(5), 1012-1022.
<https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832751>

-Alvarado, A. H. (2017). Estudio económico de la producción de cacao y las principales enfermedades de la variedad CCN - 51 en el cantón La Troncal, Guayas, Ecuador. *DELOS*;10(30), 1.

-Andrade, H. P., Luna, C. A., Osorio, H. E., Molina, G. E., Landero, V. N., & Barrales, H.J. (2019). Antagonismo de *Trichoderma spp.* vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(6), 1259-1272.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>

-Anzules, T. V.; Borjas, V. R.; Castro, C. V.; Julca, O. A. (2018). Caracterización y tipificación de fincas productoras *Theobroma cacao* L. en Santo Domingo de Los Tsáchilas, Ecuador. *Revista Bosques Latitud Cero* 8(2): 39-50.

- Anzules T. V., Borjas V. R., Alvarado, H. L., Castro, C. V., & Julca, O. A. (2019). Control cultural, biológico y químico de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora spp* en *Theobroma cacao* 'CCN-51'. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 511-520. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.08>
- Ardón, R. W. R., Damon, A. A., & Ortiz, W. S. (2022). El policultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) y la cultura qato'ok de Tuzantán, Chiapas, México: una aproximación etnoecológica. *Ethnoscintia-Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology*, 7(4), 14-32. <http://dx.doi.org/10.18542/ethnoscintia.v7i4/12777>
- Armengot, L., Ferrari, L., Milz, J., Velásquez, F., Hohmann, P., & Schneider, M. (2020). Cacao agroforestry systems do not increase pest and disease incidence compared with monocultures under good cultural management practices. *Crop protection*, 130, 105047. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105047>
- Arredondo B., H. C. & Rodríguez L. A. (2008). Casos de control biológico en México. Mundi Prensa México. México, D. F., México. 423 p.
- Arroyo, W. F. V., Torres, C. M. T., Salinas, A. A. M., Santillán, D. F. N., Rivera, L. A. M., Párraga, A. G. D., & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149.
- Arvelo M., Tanya D., Steven M., Javier R., Inocencio H., & Alejandra N. (2016). Estado actual sobre la producción y el comercio del cacao en América. San José, C.R.: IICA: CIATEJ. Recuperado de: <http://www.iica.int/sites/default/files/publications/files/2017/BVE17048806e.pdf>
- Arvelo M A., González L. D., Maroto A.S., Delgado L. T., Paola Montoya L.P. (2017). Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), San José-Costa Rica.
- Asaff, A., Escobar, F., & de la Torre, M. (2009). Culture medium improvement for *Isaria fumosorosea* submerged conidia production. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1): 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.007>

- Avendaño Arrazate, C. (2018). Biología floral de cacao (*Theobroma cacao* L.); Criollo, Trinitario y Forastero en México. *Agro Productividad*, 11(9). <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i9.1225>
- Avendaño, A. C. H, Suárez, V. G. M., Mendoza, L. A., Martínez, B. M., Reyes, R. J., & Espinosa, Z. S. (2021). Composición arbórea de especies asociadas al cacao: selva lacandona y sistemas agroforestales, Chiapas, México. *Agronomía Mesoamericana*, 32 (2), 365-381. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v32i2.41630>
- Bailey, B.A., Crozier, J., Sicher, R.C., Strem, M.D., Melnick, R., Carazzolle, M.F., Costa, G.G.L., Pereira, G.A.G., Zhang, D. & Maximova, S. (2013). Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 81, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.11.005>
- Bailey, B., Evans, H., Phillips - Mora, W. & Ali, Sh. Meinhardt, L. (2017). *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao Frost. *Molecular Plant Pathology*.
- Ballesteros, P. W., Navia, E, J. F., & Solarte, G. J. G. (2021). Socio-economic characterization of the traditional cacao agroforestry system (*Theobroma cacao* &L.). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 38(2), 17-35. <https://doi.org/10.22267/rcia.213802.156>
- Barrera L., & Hurtado N. (2016). Enfermedades del cultivo de cacao. Nicaragua: Instituto Nacional Tecnológico.
- Bartley BGD. (2005). The genetic diversity of cacao and its utilization. Wallingford: CABI Publishing.341pp.
- Bateman. R.P., Hidalgo, E., García, J., Arroyo, C., ten Hoopen, G.M., Adonijah, V. & Krauss, U. (2005). Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rica cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology*.147: 129-138. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.00012.x>

- Behle, R. W., Wu, S., Toews, M. D., Duffield, K. R., & Shapiro-Ilan, D. I. (2022). Comparing production and efficacy of *Cordyceps javanica* with *Cordyceps fumosorosea*. Journal of Economic Entomology, 115(2), 455-461. <https://doi.org/10.1093/jee/toac002>
- Bell, D. K.; Wells H. D. & Markham. C. R. (1982) In Vitro Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens, Phytopathology, 72:379-382.
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., & Bianciotto, V. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. Frontiers in Microbiology, 6, 1559. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01559>
- Bhanu, P. G. V., Padmaja V, & Siva, K. R. R. (2008) Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. BioresourceTechnol. 99: 1530-1537. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.031>
- Bowers, J. H., Bailey, B. A., Hebbar, P. K., Sanogo, S., & Lumsden, R. D. (2001). The Impact of Plant Diseases on World Chocolate Production Plant Health Progress Plant Health Progress. Plant Health Progress, (June). <https://doi.org/10.1094/PHP-2001-0709-01>
- Bremer, B., Bremer, K., Chase, M., Fay, M., Reveal, J., Soltis, Douglas, E., & Stevens, P. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society.
- Bridge, P. D. & Arora, D. K. (1998). Interpretation of PCR methods for species definition. UK. CAB International 63 - 84 p.
- Cañedo V., Ames T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. pp. 62.
- Carrillo, P. E., Acosta, E., Montesinos-Cisneros, R. M., & de la Torre, M. (2013). Performance of two isolates of *Isaria fumosorosea* from hot climate zones in solid and submerged cultures and thermotolerance of their propagules. World Journal of

Microbiology and Biotechnology, 29(2): 309-317. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1184-1>

-Castillo, G. J. A., & Koch, K. A. R. (2021). “Aislamiento e identificación de dos hongos entomopatógenos y evaluación de su antagonismo en la plaga *Frankliniella occidentalis* en cultivos de Rosa spp. de una florícola, Ecuador”. Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura. Universidad de las Fuerzas Armadas. Ecuador.

-Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB). (2018). Introducción al CNRCB. <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/centro-nacional-de-referencia-de-control-biologico-103097>

-Coe, S. D., Coe, M. D., & Rull, M. A. P. (1999). La verdadera historia del chocolate. México FDF: Fondo de Cultura Económica.

-Companioni, G. B., Domínguez, A. G., & García, V. R. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, 19(4), 237-248.

-Córdova, K. S. A., Campoverde, J. Q., Unda, S. B., Montealegre, V. J. G., & Romero, H. C. (2021). Análisis económico de la exportación del cacao en el Ecuador durante el periodo 2014–2019. *Polo del Conocimiento: Revista científico-profesional*, 6(3), 2430-2444. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i3.2522>

-Correal, C. E., Torres, L. A. T., Rivero, L. F. V., Pardey, A. E. B., Mogollón, M. V. Z., & Prado, A. M. C. (2018). Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga. COTES, AM Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Mosquera, (Colombia): Agrosavia.

-Costa, A. F., da Silva, L. R., Diniz, A. G., Ribeiro, T. K. O., da Silva, S. A. C., Tiago, P. V., & de Oliveira, L. G. (2022). Controle alternativo e biológico de pragas e fitopatógenos: uma década de contribuição. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, 27(2). <https://doi.org/10.12661/pap.2022.007>

- Cronquist A. (1988). The evolution and classification of flowering plants, 2nd edn. New York Botanical Garden, Bronx.
- Cruz, V. H. M., Navarro, S. R., Florido, J. E. B., & Tovar, D. C. (2015). Hongos entomopatógenos y sus metabolitos, una alternativa sustentable para el control de plagas en viveros forestales y agricultura protegida: caso *Bradysia impatiens* (Johannsen). *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, (30), 111-134.
- Cubilla, R. A. A., Ruíz, D. D., Romero, R. M. C., Flores, G. M. E., & Barúa, C. J. E. (2019). Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 63-77. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>
- Delgado, P. A. M. & Murcia, O. B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua*, Taubaté, v.6, n.2, p.77-90. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.187>
- Díaz, C. B. (1986). Historia verdadera de la conquista de la Nueva España. Ed. Valle de México, S. A de C.V. México.
- Díaz, J. O.; Aguilar, A. J. J.; Rendón, M. R. & Santoyo, C. V. H. (2013). Current state of and perspectives on cocoa production in México. *Cien. Inv. Agr.* 40(2):279-289.
- Evans, H. C.; Holmes, K. A.; & Reid, A. P. (2003). Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology* 52: 476-485. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00867.x>
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). FAOSTAT. Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Fernández Larrea V. O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario.
- García, C. I., del Pozo, N. E. M., & Hernández, P. Y. (2019). Producción y conservación de conidios del aislado Ma-005 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Centro Agrícola*, 46(1), 5-12.

- García G., C. & M. B. González M. (2013). Síntesis sobre el uso de bioinsecticidas y otros agentes de control biológico de plagas en México. *Vedalia* 14 (1): 35-42.
- García Yanes, M. (1994). *El Cacao: Origen, Cultivo e Industrialización en Tabasco*. Centro de Investigación de Ciencias Agropecuarias. pg.11
- Gómez, Gretel; Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola *Cultivos Tropicales*, vol. 27, núm. 3, pp. 17-24 Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba.
- Gómez, R., Zapata, G., Torres, D., Tenorio, C. SENASA (2014). *Manual de Producción y uso de Hongos Entomopatógenos*. LABORATORIO DE ENTOMOPATÓGENOS SCB – SENASA.
- González, D. (2011). *Cacao fino y de aroma del Ecuador "Cacao arriba"*. Trabajo para optar el título de especialista en agronegocios y alimentos. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- González, J. A. (2014). Un vertiginoso viaje etnohistórico dentro de los “imaginarios alimentarios” en el simbolismo del cacao en México. In *Anales de Antropología* (Vol. 48, No. 1, pp. 79-95). [https://doi.org/10.1016/S0185-1225\(14\)70490-4](https://doi.org/10.1016/S0185-1225(14)70490-4)
- González, S. I. R. (2008). La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. *Tecnología en marcha*, 21(1), 97-110.
- Guerrero, G. T., & Meléndez, V. E. P. (2023). Microbiota asociada a plantaciones agroforestales de cacao y su impacto en la tolerancia al estrés abiótico. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1). <https://doi.org/10.24054/cyta.v8i1.2877>.
- Hernández, T. A., Estrada, D. B., Rodríguez, H. R., García, G. J. M., Patiño, A. S. A., & Osorio, H., E. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 803-813. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1665>
- Hipólito, R. E., Carcaño, M. M.G., Ramos, P. J.M., Vázquez, C. E.A., López, R. L., Ricaño, R. J. (2017). Efecto de inoculantes bacterianos edáficos mixtos en el

desarrollo temprano de cultivares mejorados de cacao (*Theobroma cacao* L) en un sistema agroforestal tradicional del norte de Oaxaca, México. Revista Argentina de Microbiología. 49: 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.003>

-Hipólito-Romero, E., Cocolletzi-Vásquez, E., Ramos-Prado, J. M., Espinoza, C., Torres-de la Cruz, M., & Ricaño-Rodríguez, J. (2020). Breve aproximación a la naturaleza genómica de *Moniliophthora roreri* CPMRT01 aislado de cacao en Tabasco, México. Biotecnia, 22(2), 39-49. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1244>

-Howell CR (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases. The history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4-10. <https://www.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>

-Huamanchumo de La Cuba, O. (2017). Cacao. Producción, consumo y comercio. Del período prehispánico a la actualidad en América Latina. Fronteras de la Historia, 22(1), 237-242.

-Ibarra, Silvia. (2003). El Chocolate es cacao: Herencia de México al mundo. Disponible en: <http://www.elportaldemexico.com/arteculinario/chocolatecharla.htm>

-ICCO (Organización Internacional del Cacao). (2016). Boletín Trimestral de Estadísticas del Cacao v. 2, tomo 42, año cacaotero 2015-2016.

-ICCO. (International Cocoa Organization). (2016). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistic, Recuperado el 9 de noviembre de 2016, de <http://www.icco.org/about.cocoa/growing-cocoa.htm>

-Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de protección vegetal, 24(1), 14-21.

-Inteligencia Comercial e Inversiones. (2013). Análisis del sector cacao y elaborados. Pro Ecuador, Instituto de Promoción de Importaciones e Inversiones. Quito, Ecuador. 42 p.

- Jaronski S.T., Mascarin G. M. (2017). Mass Production of Fungal Entomopathogens. En: Lacey LA, editor. Microbial control of insect and mite pests: From theory to practice: Elsevier. p. 141– 155.
- Jerez, Á. C., & Richardson, J. E. (2018). El mundo quiere cacao.
- Jiménez Martínez E. (2009). “Métodos de Control de Plagas”. Universidad Nacional Agraria. Facultad de agronomía. Managua, Nicaragua. pp 22-23.
- Jiménez Díaz, Z. (2016). Vigilancia fitosanitaria en cultivo de cacao *Theobroma cacao L.*, en las veredas el Centro, Cantarranas y la Esmeralda del municipio de san Vicente de Chucurí Santander.
- Lacey L.A., Frutos R., Kaya H.K., Vails P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: ¿Do they have a future? *Biological Control* 21:230-248. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0938>
- Lira, V. L., Santos, A. C. D. S., Tiago, P. V., Oliveira, N. T. D., & Moura, R. M. D. (2019). Hiperparasitismo de *Fusarium spp.* em *Austropuccinia psidii* em Jambo-do-Pará. *Summa Phytopathologica*, 45, 204-206 <https://doi.org/10.1590/0100-5405/187593>
- López-Báez O., Ramírez-González S., Espinosa-Zaragoza S., Moreno Martínez L., Ruiz-Bello C., Villarreal-Fuentes J., & Mejía O. (2015). Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. *Acta agrícola y pecuaria*.
- Luangsa-ard J.J., Hywel-Jones N.L., Manoch L., Samson R.A. (2005). On the Relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research*. 109:581-589. <https://doi.org/10.1017/S0953756205002741>
- Mamani Macuaga, S. (2019). Caracterización morfológica de árboles promisorios de cacao (*Theobroma cacao L.*) con grados de tolerancia a moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & par. Evans *et al.*) en area IIA, municipio de Palos Blancos-La Paz (Doctoral dissertation).

- Márquez *et al.* (2021). Glosario de Términos Agronómicos. Obtenido de <https://www.unheval.edu.pe/portal/wp-content/uploads/2021/03/Libro-GLOSARIO-DE-TERMINOS-AGRONOMICOS.pdf>
- Martínez D.H. (2015). Caracterización de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) por su respuesta de defensa a *Moniliophthora roreri* y su polimorfismo de SSRs. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá-Colombia. 27-29 pp.
- Mascarin, G. M. Lopes, R. B, Delalibera, Jr. Í., Fernádes, É. K. K, Luz C. & Faria, M. (2019). Estado actual y perspectivas de los entomopatógenos fúngicos utilizados para el control microbiano de plagas de artrópodos en Brasil. J. Invertebr. Pathol. 165: 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>
- McElroy, M. S., Navarro, A. J., Mustiga, G., Stack, C., Gezan, S., Peña, G., & Motamayor, J. C. (2018). Predicción de la resistencia del cacao (*Theobroma cacao*) a las enfermedades de *Moniliophthora spp.* mediante análisis de asociación de todo el genoma y selección genómica. *Fronteras de la ciencia de las plantas*, 9, 343.
- Meza, C.; Fernández, R. J.; Valero, N. O.; Gámez, R. M.; & Páez, A. R. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Rev. Col. de Biotec. 10(2):35- 43.
- Michel A., Otero M, Solano L, Arizaga R, Barrios A, y Rebolledo A. (2019). Biocontrol in vitro con *Trichoderma spp.* de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la " Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). 8-26. Revista mexicana de fitopatología.
- Mier, T., Toriello, C., & Ulloa, M. (2002). Hongos microscópicos saprobios y parásitos. UNAM.
- Mier, T. F., Rivera-Becerril, M.A. Ayala-Zermeño, C., Toriello, S., Aguilar Ogarrío y M. Ulloa. (2013). Métodos experimentales para el estudio de hongos microscópicos, Instituto de Biología, UNAM, Universidad Autónoma Metropolitana. México.

- Ministro de Agricultura y Riego-Viceministro de Políticas Agrarias –Dirección General de Políticas Agrarias-Director de Estudios Económicos e Información Agraria (MINAGRI-DGPA-DEEIA). (2016). Estudio del CACAO en el Perú y en el Mundo un análisis de la producción y el comercio, Lima Perú.
- MINAGRI. 2017. Estudio del cacao en el Perú y en el mundo. Dirección general de políticas agrarias. Disponible en: http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/videoconferencias/2017/estudio_cacao_para_iica.pdf.
- Monzón C. A. (2011). “Producción y uso de hongos entomopatógenos”. FUNICA. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía, Departamento de Protección Agrícola y Forestal
- Mora, F. D. S., & Fiallos, F. R. G. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) *Evans et al.*, en el cultivo de cacao. *Scientia agropecuaria*, 3(3), 249-258.
- Morales, R. B., Pulido, S. A. A., Muñoz, S. A. G., Ramírez, F. J. P., & Rodríguez, A. O. (2021). Propuesta para el establecimiento del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L) en la zona norte del estado de Veracruz. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 9(1), 181-191. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v9i1.350>
- Moreira, F. (2012). Manual de biología de suelos tropicales. Instituto Nacional de Ecología. Pág. 287-289.
- Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. (2020). Astaxantina y otros nutrientes de *Haematococcus pluvialis*: aplicaciones multifuncionales. *Mar Drogas* 18:459.
- Muñoz, O. G., & Santamaría, C. Y. (2021). Capítulo 7. Chocolate, un acercamiento a la importancia histórica del cacao en México. *La gastronomía como extensión del conocimiento*, 141.
- NCBI. 2010. National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).
- Necha, L. L. B., & Barrera, L. J. G. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista científica UDO agrícola*, 8(1), 33-41.

- Nehra, S., Gothwal, R. K., Dhingra, S., Varshney, A. K., Solanki, P. S., Meena, P., & Ghosh, P. (2022). Mechanism of antagonism: hyperparasitism and antibiosis. In *Microbial Biocontrol: Sustainable Agriculture and Phytopathogen Management: Volume 1* (pp. 257-277). Cham: Springer International Publishing.
- Ogata N. (2007). Cacao. *Biodiversitas* 72:1-5. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad.
- Pacheco Hernández, M., Reséndiz Martínez, J., & Arriola Padilla, V. J. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 10(56), 4-32. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>
- Peralta, S. L. P., Herrera, C. W., & Castro, B. D. R. G. (2024). Estimación de pérdidas económicas en Cacao causado por Escoba de Bruja (*Crinipellis perniciosa*) y monilia (*Moniliophthora roreri*) en pequeños productores. *Revista de la Universidad del Zulia*, 15(42), 179-192. <https://doi.org/10.46925/rdluz.42.10>
- Pérez, A. (2006). La importancia del chocolate en la gastronomía mexicana (Licenciatura). Universidad de las Américas Puebla.
- Phillips-Mora. W.; Castillo, J.; Krauss, U.; Rodríguez, E.; & Wilkinson, M.J. (2005). Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology* 54: 483-490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01210.x>
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortiz, C. F., López, A. P., Hernández, J., & Aime, M. C. (2006). First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico.
- Phillips-Mora. W., Cawicha, J., Garnettb W., & Aime C. (2006). First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. *Plant Pathology*. 55, 584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01378.x>
- Phillips, W. 2006. "Origen, biogeografía, diversidad genética y afinidades taxonómicas del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif)" Evans et al. del caco (*Theobroma*

cacao *L.*) determinadas mediante evidencia molecular, fitopatológica y morfofisiológica.

-Phillips-Mora W, & Wilkinson MJ. (2007). Frosty pod, a disease of limited geographic distribution but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97:1644–1647.

-Phillips Mora, W & Cerda, R. (2009). Catálogo: enfermedades del cacao en Centroamérica. Serie Técnica. Manual Técnico. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) Turrialba, Costa Rica. No. 93. 24 p.

-Pincay, A., Noboa, M., Viera, W., Herrera, K., León, A., & Jackson, T. (2021). Evaluación in vitro del potencial antagonista de *Trichoderma sp.* y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus Benth*) para el control de *Botrytis cinerea*. *Journal of Science and Research*, 6(1), 109-124.

-Ploetz RC. (2016). The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview. (Chapter 2) Cacao Diseases. © Springer International Publishing Switzerland. 33-59. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_2

-ProEcuador. (2019). Cacao y Elaborados. In Plan de Mejora Competitiva del Cacao y sus Derivados en Ecuador. <https://www.proecuador.gob.ec/category/sector/cacao-y-elaborados/>

-Quiroz V., & Elizalde M. (2014). Guía técnica del cultivo de cacao para la amazonia norte del ecuador, recuperado de <https://www.feedingknowledge.net/>

-Ramírez G. Sandra. (2008). La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México *Tecnología en Marcha*, Vol. 21-1, P. 97-110

-Ramírez Gil, J. G. (2016). Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora spp.*, y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, en la hacienda *Theobroma*, Colombia. *Revista de Protección Vegetal*, 31(1), 42-49.

-Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research

community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>

-Rivas, A., Rivas R., D. Hinojosa, J. C. Pérez, A. Méndez, y M. A. Martínez. (2012). Percepción de productores de tabaco sobre insectos plagas y su manejo en el municipio Jesús Menéndez (Las Tunas). *Revista Protección Vegetal*. Vol. 27, Núm. 1, pp: 19-25.

-Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., Torres-de la Cruz, M., Lagunes-Espinoza, L. D. C., & Valdovinos-Ponce, G. (2016). *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora roreri*. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 22(2), 149-163.
<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.08.036>

-Robson, G. & Hamilton G., (2010). "Control de plagas y pesticidas, en Frumkin, H. (Ed.), *Salud ambiental de lo global a lo local*. Cuarta parte: Salud ambiental en la escala local, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, México.

-Rodríguez-Gámez, L. A., Gandarilla-Pacheco, F. L., Maldonado-Blanco, M. G., Quintero-Zapata, I., Ramos, L. H. M., Alvarez, J. H. A., & Elías-Santo, M. (2017). Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (bals.) vuill(hypocreales: cordycipitaceae) en cultivo bifásico. *Interciencia*, 42(11), 739-743.

-Sánchez, L.; Gamboa, E.; Rincón, J. (2003). Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)* 20: 188-194.

-Sánchez, G. B. M.; Espinosa, H. E.; Villordo, P. E.; Rodríguez, G. R. & Mora, A. M. A. (2017). Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma spp.* sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. *Agrociencia*. 1(51):63-79.

-Santos T.T.M., Quintela E.D., Mascarín G.M., & Santana M.V. (2017) Aumento de la mortalidad de ninfas de *Bemisia tabaci* por *Isaria javanica* combinada con dosis

subletales de insecticidas químicos. *J Appl Entomol* 142:598–609.
<https://doi.org/10.1111/jen.12504>

-SIAP, 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
<http://www.siap.gob.mx/> Consultado el 1 de septiembre de 2022

-Shuhmancher, K., Forsthofer, L., Rizzzi, S., & Teubner, C. (2000). El gran libro del chocolate. Everest.

-Solís Bonilla, J. L., Zamarripa Colmenero, A., Pecina Quintero, V., Garrido Ramírez, E., & Hernández Gómez, E. (2015). Evaluación agronómica de híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) para selección de alto rendimiento y resistencia en campo a moniliasis. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(1), 71-82.

-Soto-Aguilar, R. N. (2014). PRINCIPIOS AGRONÓMICOS: Bases para una Teoría Agronómica.

-Strong Zúñiga, A. (2020). Riqueza, prestigio y ofrenda divina: los usos del cacao en el mundo nahua. *Hospitalidad ESDAI*, (37).

-Suárez Contreras, L. Y. (2015). Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta agronómica*, 65(1), 51-57. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n1.47994>

-Suárez-Venero, G. M., Avendaño-Arrazate, C. H., Ruiz-Cruz, P. A., & Estrada-de-los-Santos, P. (2019). Estructura e impacto de la diversidad taxonómica en cacao del Soconusco, Chiapas, México. *Agronomía Mesoamericana*, 353-365.
<https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34032>

-Tadeo-Sánchez, J. M., & Tolentino-Martínez, J. M. (2020). El cacao Grijalva de Tabasco: dinámicas socio territoriales en torno a su producción. *Estudios sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional*, 30(56).
<https://doi.org/10.24836/es.v30i56.1002>

-Tejedor Junco, M. T. (2020). Microduendes: los microorganismos que nos ayudan a celebrar la Navidad. *The conversation*.

- Thambugala K.M., Daranagama D.A., Phillips A.J., Kannangara S.D., Promputtha I. (2020) Fungi vs.fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>
- Tiburcio, R.A.; Costa, G.G.L.; Carazzolle, M.F.; Mon-dego, J. M. (2010). Genes acquired by horizontal transfer are potentially involved in the evolution of phytopathogenicity in *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, two of the major pathogens of cacao. *J. Mol. Evol.* 70:85 - 97. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9311-9>
- Tirado Gallego, P. A., Lopera-Álvarez, A., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 417-430. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:517
- Tornés, S. & Hernández S. (2015). Cacao, una aportación de México al mundo. *Revista Ciencia*. Julio - septiembre 2015.
- Torres, M. (2010). Progreso temporal y manejo integrado de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al.,) del Cacao (*Theobroma Cacao*) en Tabasco. México (tesis doctoral). Institución de la Enseñanza e Investigación en ciencias Agrícolas. México.
- Torres de la Cruz, M., Ortiz-García C., Nava Díaz C., & De la Cruz Pérez A., (2016). Confirmación morfológica y molecular de *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*) en tabasco, México. *La Perspectiva Científica desde la UJAT*. Tomo 4.
- Torres de la Cruz, M., Quevedo-Damián, I., Ortiz-García, C. F., del Carmen Lagúnez-Espinoza, L., Nieto-Angel, D., & Pérez-de la Cruz, M. (2019). Control químico de *Moniliophthora roreri* en México. *Biotecnia*, 21(2), 55-61. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i2.906>

- Tuli, H. S., Sandhu, S. S. & Sharma, A. K. (2014). Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to Cordycepin. *Biotech*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0121-9>
- Uc-Arguelles A.K., Pérez-Moreno J., Ayala-Escobar V., Zavaleta-Mejía E. (2017) Antagonism of *Saccharicola* sp. against phytopathogens of the root of jalapeno pepper (*Capsicum annuum*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 263-283. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-6>
- Vargas, R., Rangel, L. F., Cañola, E. A., Rodríguez Jimenez, E. L., Klinger, J. C., & Bastidas Gustin, A. E. (2006). Detección y cuantificación de niveles de ADN circulante en suero humano utilizando espectrofotometría uv-visible. *Revista Colombiana de Física*, 38(2).
- Vera Loor, M. A., Bernal Cabrera, A., Leiva Mora, M., Vera Loor, A. E. A., Vera Coello, D., Peña Herrera Villafuerte, S. & Jiménez Guerrero, V. E. (2018). Microorganismos endófitos asociados a *Theobroma cacao* como agentes de control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Centro Agrícola*, 45(3), 81-87.
- Vidal, V. V., & Rodríguez, W. B. L. (2021). Comportamiento de la producción de cacao en Comalcalco, Tabasco durante el periodo 2014-2018. *Publicaciones e Investigación*, 15(2). <https://doi.org/10.22490/25394088.5549>
- Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149.
- Villarreal M., Villa E., Cira L., Estrada M., Parra F., & De los Santos S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 2018;36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Villavicencio, M., & Jiménez, M. (2010). Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana.

-Villavicencio Vásquez, M. E. (2018). Identificación y evaluación de hongos endófitos de *Theobroma cacao* L. como candidatos a agentes de control biológico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) del cacao (Master's thesis).

-Wen, T. C., Li, M. F., Kang, J. C. & He, J. (2012). A molecular genetic study on fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*. African Journal of Microbiology Research, 6, 5215– 5221. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.522>

-White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; & Taylor, J.; (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. San Diego, EE.UU. Academic Press 315 - 322 p.

-Zepeda Jazo Isaac. (2018). Manejo sustentable de plagas agrícolas en México. Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, México. vol.15 no.1

-Zimmermann G. (2008). The entomopathogenic fungi *Isaria farinose* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and *Isaria fumosorosea* (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. Biocontrol Sci Technol 18:865–901. <https://doi.org/10.1080/09583150802471812>

Referencia de cuadros.

-Cuadro 1. Escala para la evaluación de la capacidad antagónica de los biocontroladores. Bell, D. K.; H. D. Wells; C. R. Markham. (1982) «In Vitro Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens», Phytopathology, 72:379-382.

-Cuadro 2. Resultados de la Cuantificación de ADN, tomados con un Nanodrop Thermo Fisher®. Realizado por Izaú Federico Moreno Antillón.

-Cuadro 3. Análisis de similitud genética entre la cepa *Moniliophthora roreri* de Tuzantán Chiapas con secuencias reportadas en GenBank- Realizado por Izaú Federico Moreno Antillón.

-Cuadro 4. Registro de Evaluación de Capacidad Antagónica según Bell *et al.*, (1982)

-Cuadro 5. Registro de Mazorcas de *T. cacao* en la zona de estudio en Tuzantán Chiapas México. Realizado por Izaú Federico Moreno Antillón.

Referencia de Gráficas.

Todas las gráficas presentadas fueron realizadas con el programa Excel® y realizadas por Izaú Federico Moreno Antillón.

Referencia de Figuras.

Figura 1.

-Orlando López-Báez, Sandra I. Ramírez-González, Saúl Espinosa-Zaragoza, José Luis Moreno Martínez, Carmen Ruiz-Bello, Juan M. Villarreal-Fuentes, Omar González-Mejía. (2015). Comportamiento de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. Acta agrícola y pecuaria.

Las figuras restantes presentadas en este documento fueron tomadas por el Biólogo Izaú Federico Moreno Antillón.