



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

“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”

**Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de Magister En
Biotecnología Agrícola**

Presentado por: **Ing. Mirian Elizabeth Villavicencio Vásquez**

Guayaquil – Ecuador

2018

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo fue gracias a la Directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL) y a la vez Directora del trabajo de titulación, Daynet Sosa. Mi más sincero agradecimiento por permitirme trabajar con usted, por el apoyo, dedicación de tiempo y orientación.

A mi familia, por su apoyo brindado y ser mi inspiración para seguir adelante con mi carrera profesional.

A mi esposo, por su amor incondicional que me brinda día a día y por existir en mi vida, por ser además mi equipo de trabajo y ayudarme en los experimentos de laboratorio para la culminación del presente trabajo.

A mis compañeros de oficina de Analistas del CIBE, por hacer los días de trabajo momentos de alegría día a día.

Un agradecimiento a mi co-director por la orientación y revisión del trabajo.

A todos mis amigos, quienes me dieron ánimos y sugerencias para la culminación del proyecto.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar una meta más propuesta en mi vida.

A mi esposo Fernando, por su paciencia, motivación para seguir adelante y apoyo incondicional.

A mis padres Kléver y Digna por ser mis guías a lo largo de mi vida, por su amor de padres y comprensión.

A mi hermana Diana y sobrinitos Sebastián y Bianca, quienes me hacen reír en todo momento con cada una de sus ocurrencias y a quienes llevo siempre en mi corazón y pensamiento.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Edwin Jiménez Ruiz, Ph.D.
DECANO O DELEGADO

Daynet Sosa del Castillo, Ph.D.
DIRECTORA DE PROYECTO DE TITULACIÓN

Simón Pérez Martínez, Ph.D.
CO-DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

Efrén Santos Ordoñez, Ph.D.
VOCAL

Luis Galarza Romero, Ph.D.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral

Mirian Elizabeth Villavicencio Vásquez

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	viii
Índice de tablas	X
Resumen	xii
1. Introducción.....	1
Antecedentes y justificación	1
Objetivo general	2
Objetivos específicos.....	3
Marco Teórico.....	3
2. Materiales y Métodos	7
Recolección de muestras	7
Cepas de <i>M. roreri</i> y <i>M. perniciosa</i>	8
Aislamiento, purificación y preservación de hongos endófitos	8
PARTE I: Identificación de especies.....	8
Identificación molecular de los aislados endófitos	8
Análisis de filogenia	9
PARTE 2: Ensayos de antagonismo y patogenicidad con el total de aislados (126)	10
Antagonismo <i>in vitro</i> mediante cultivos duales	10
Patogenicidad en hojas sueltas y frutos de cacao	11
Preselección de cepas endófitas promisorias	13
PARTE 3: Determinación del micoparasitismo y capacidad endofítica.....	13
Sobrevivencia de <i>Moniliophthora</i> spp. luego de la interacción con los endófitos (micoparasitismo)	13
Actividad antifúngica de los metabolitos crudos de los endófitos ..	14
Colonización de hojas sueltas de cacao por las cepas endófitas..	14
3. Resultados	15
PARTE 1: Identificación de especies.....	15
Abundancia y riqueza de especímenes endófitos	15
Análisis de filogenia	19
PARTE 2: Ensayos de antagonismo y patogenicidad con el total de aislados (126).....	26
Competencia por sustrato frente a <i>M. roreri</i> y <i>M. perniciosa</i> en cultivos duales	26
Actividad Antagonista	28
Patogenicidad de cepas endófitas en hojas y frutos de cacao	30
Cepas promisorias en el biocontrol de <i>M. roreri</i> y <i>M. perniciosa</i>	32
PARTE 3: Análisis de cepas pre-seleccionadas.....	32
Sobrevivencia de <i>M. roreri</i> y <i>M. perniciosa</i> después de interactuar con los endófitos preseleccionados (Micoparasitismo).....	32
Evaluación de extractos fúngicos.....	33

Colonización de hongos endófitos en hojas sanas de cacao (Capacidad endófitas)	35
4. Discusión.....	35
Riqueza de especies y su relación con el hospedante.....	35
Actividad antagonista contra <i>M. roleri</i> y <i>M. perniciosa</i>	37
Patogenicidad de cepas endófitas.....	39
Capacidad endófitas en hojas de cacao.....	40
Selección de cepas promisorias a control biológico de <i>Moniliophthora</i> spp.....	41
5. Conclusiones.....	42
6. Recomendaciones	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa del Ecuador indicando las localidades muestreadas para el aislamiento de los hongos endófitos y patógenos	7
Figura 2. Ejemplo de confrontación dual patógeno <i>M. roreri</i> (MR) vs. Endófito (E)	11
Figura 3. Hoja inoculada con discos de micelio de la cepa endófito. Fruto inoculado con discos de micelio en perforaciones de 0.5 cm. ...	12
Figura 4. Enfrentamiento <i>M. pernicioso</i> vs Endófito.	13
Figura 5. Géneros de hongos endófitos encontrados en cacao tipo Nacional en tres localidades de la Costa ecuatoriana en 2014	15
Figura 6. Colonias de los hongos endófitos más comunes aislados de hojas sanas de cacao	16
Figura 7. Relaciones filogenéticas entre los aislados endófitos de hojas de cacao basados en el análisis de Máxima Parsimonia usando la región ADN _r -ITS	17 - 19
Figura 8. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Máxima Parsimonia basado en secuencias del gen ITS	21 - 22
Figura 9. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Máxima Parsimonia basado en secuencias del gene GAPDH	24
Figura 10. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Máxima Parsimonia basado en secuencias del gen EF	24
Figura 11. Árbol filogenético con valores de soporte (MP/BS/ML) de la concatenación de las secuencias de las regiones ITS y GAPDH ..	26
Figura 12. Interacción endófito-patógeno en cultivo dual (PDA/10d/26±1°C) de la cepa Ec008 ((<i>Phanerochaete</i>	

<i>chrysosporium</i>) frente a los patógenos <i>M. perniciosa</i> (A) y <i>M. roreri</i> (B). Patógenos testigos sin el antagonista (C) y (D)	26
Figura 13. Grupos de cepas endófitas conformados de acuerdo con el PIC evaluados en cultivos duales contra <i>M. roreri</i> durante 10 días a 26°	27
Figura 14. Dinámica de los Porcentajes de inhibición del crecimiento de los grupos de endófitos contra <i>M. perniciosa</i> en cultivos duales	28
Figura 15. Tipos de interacción endófito-patógeno observadas en este estudio (PDA/10d/26±1°C/ oscuridad)	29
Figura 16. Síntomas en hojas de cacao.....	31
Figura 17. Síntomas provocados por la inoculación en frutos sueltos de cacao	31
Figura 18. Supervivencia de <i>M. roreri</i> después de 13 días de la interacción con endófitos	33
Figura 19. Inhibición del crecimiento de <i>M. roreri</i> (A) y <i>M. perniciosa</i> (B) en presencia de metabolitos de hongos endófitos de cacao	34
Figura 20. Crecimiento diferenciado de <i>M. roreri</i> en medio PDA envenenado con metabolitos crudos	35

ÍNDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1. Resumen de la actividad antagonista de las interacciones de los 126 endófitos contra los patógenos <i>M. royeri</i> y <i>M. perniciosa</i>	30

ABREVIATURAS

PIC: Porcentaje de inhibición de crecimiento

UTOs: Unidades Taxonómicas Operativas

Resumen

Las enfermedades causadas por *Moniliophthora roreri* (MR) y *M. perniciosa* (MP) ocasionan en el país pérdidas de producción en cacao mayores al 60%. El empleo de hongos endófitos antagonistas es una alternativa en el control de enfermedades debido a los diversos mecanismos que poseen, favoreciendo a las plantas. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad de hongos endófitos de cacao Nacional como candidatos a agentes de control biológico contra ambos patógenos en condiciones controladas. Se aislaron 126 hongos endófitos de tejido foliar aparentemente sano y se identificaron mediante secuenciación de la región ADNr-ITS. La totalidad de los aislados se enfrentaron mediante cultivo dual a MR y MP y se determinó su capacidad antagónica (porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) y el resultado de la interacción de las colonias) y la patogenicidad del endófito en hojas y frutos sanos de cacao. De esta etapa se preseleccionaron 17 cepas promisorias (antagónicas y no patogénicas) las cuales se evaluaron mediante otros ensayos de enfrentamiento (micoparasitismo y acción de los metabolitos crudos), y se determinó su capacidad endofítica en hojas de cacao. No hubo una especie o cepa que lograra satisfacer todos los indicadores estudiados: *Lasiodiplodia theobromae* logró los mayores PICs y niveles de micoparasitismo frente a ambos patógenos; *Colletotrichum* spp. inhibió a MR en mayor medida debido a la acción de sus metabolitos; y *Xylaria* spp. mostró mayor capacidad de colonizar las hojas sanas de cacao después de la inoculación. Como promisorios para el control de ambos patógenos luego de estos ensayos, se destacaron las cepas Ec035 (*L. theobromae*), Ec107 (*Colletotrichum* spp.) y Ec059 (*Xylaria feejeensis*).

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa*, hongos endófitos, metabolitos, micoparasitismo.

1. INTRODUCCIÓN

La producción del cultivo de cacao en Ecuador y a nivel mundial se encuentra afectada por la incidencia de enfermedades, entre las cuales se encuentran: Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), Mal de machete (*Ceratocystis fimbriata*) y principalmente las denominadas Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), ocasionando bajos rendimientos y pérdidas totales de producción. Los patógenos *M. roreri* y *M. perniciosa* son altamente agresivos una vez que llegan a infectar al cultivo, en el caso de *M. roreri* afecta principalmente a los frutos en cualquier estado de desarrollo, lo cual provoca bajos rendimientos en la producción. De igual manera *M. perniciosa* ocasiona considerables pérdidas ya que afecta a hojas, ramas, cojinetes florales y frutos en todos sus estados.

En la actualidad para controlar enfermedades en los cultivos agrícolas se están combinando el control biológico con el control cultural (Krauss & Soberanis, 2002). El control biológico consiste en el uso de microorganismos antagonistas contra enfermedades y patógenos específicos, en esta investigación se utilizaron hongos endófitos asociados al mismo cultivo para el control de las dos principales enfermedades en cacao. Estudios realizados con microorganismos nativos como antagonistas, tanto bacterias como hongos, han demostrado ser eficientes para el control de *M. roreri* y *M. perniciosa* (Bailey et al., 2008; Hebbar, 2007; Hernández-Rodríguez, Ruíz-Beltrán, Acebo-Guerrero, Miguélez-Sierra, & Heydrich-Pérez, 2014; Krauss et al., 2010; Suárez & Cabrales, 2008). Los hongos más promisorios han sido a partir de *Trichoderma*. Sin embargo, la disponibilidad es limitada a nivel de oferta de producto.

Por lo tanto, el presente trabajo es una respuesta a esa necesidad de continuar con investigaciones que permitan conocer e identificar el potencial de los hongos endófitos como agentes de control biológico (ACB), cuya finalidad es el reemplazo de los productos químicos por los impactos ecológicos que causan en los agroecosistemas, que sean de fácil aplicación y sostenibles a través del tiempo (CATIE, 2011).

1.1 Antecedentes y justificación

La producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Ecuador es un producto de exportación tradicional con mayor ingreso en la economía del país. Sin embargo, uno de los mayores problemas que presenta el cultivo del cacao,

es la amenaza de enfermedades fitosanitarias, siendo las enfermedades moniliasis (*M. roleri*) y escoba de bruja (*M. perniciosa*) las de mayor interés, con pérdidas de producción del 60% (ANECACAO, 2016b).

Las prácticas agrícolas que realizan los agricultores para estas enfermedades se basan en un sistema de manejo integrado, como la siembra de variedades resistentes a enfermedades, prácticas culturales, control químico y control biológico (Bailey et al., 2008; Krauss & Soberanis, 2001; Phillips-Mora et al., 2006; Rodríguez, 2006; Sánchez-Mora & Garcés-Fiallos, 2012; Sánchez F., Gamboa, & Rincón, 2003; Suárez, 2006; Suárez & Cabrales, 2008; Suárez & Rangel, 2013). La constante aplicación de productos químicos ha traído como consecuencia severos problemas de contaminación al medio ambiente, salud a los trabajadores, resistencia de plagas y enfermedades (Bravo et al., 2006) y altos costos de producción, que limitan la producción del cultivo de cacao.

Actualmente existen diversos estudios de hongos en base al control biológico como una estrategia para el manejo de enfermedades de gran importancia en el cultivo de cacao, tales como: *Cladobotryum amazonense*, *Hypomyces spp*, *Verticillium lecanii*, *Penicillium spp*, *Clonostachys spp*. (*Gliocladium*), *Trichoderma spp*, *Aspergillus niger*, *Acremonium spp*, *Didymella spp*, *Nectria spp*, y *Didymostilbe spp*, (Bateman et al., 2005; Krauss et al., 2013). *Trichoderma stromaticum* y *T. koningiopsis* son antagonistas que evitan la formación de basidiocarpos y parasitan las hifas de *M. perniciosa* (Samuels et al., 2000). Además, para el control de *M. roleri* se han determinado bacterias antagonistas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis* y *P. cepacia* (Suárez & Rangel, 2013).

El empleo de hongos endófitos en el cultivo de cacao puede llegar a ser una eficiente alternativa para el manejo de la incidencia de enfermedades debido a los mecanismos que estos poseen: competencia por el espacio y los nutrientes, micoparasitismo, producción de compuestos inhibidores, inactivación de enzimas del patógeno y la inducción de resistencia en la planta (Hernández-Rodríguez et al., 2014; Martínez et al., 2008; Shores, Harman, & Mastouri, 2010; Tchameni et al., 2011).

1.2 Objetivo general

Evaluar la capacidad de hongos endófitos de cacao Nacional como candidatos a agentes de control biológico contra *M. roleri* y *M. perniciosa* en condiciones controladas.

1.3 Objetivos específicos

1. Identificar los especímenes endófitos hasta especie o género mediante secuenciación del gen ADNr-ITS y/o morfología.
2. Determinar el nivel y tipos de antagonismo de las cepas endófitas contra *M. roleri* y *M. pernicioso* mediante ensayos de cultivo dual.
3. Evaluar la patogenicidad de las cepas endófitas en hojas y frutos sanos de cacao en cámara húmeda.
4. Evaluar la capacidad endófitas de las cepas promisorias en hojas de cacao bajo condiciones *in vitro*.

1.4 MARCO TEÓRICO

Producción de cacao

Ecuador es el cuarto productor mundial de cacao y representa uno de los principales ingresos en la economía del país. Según datos de la Organización Internacional del Cacao (ICCO), representa el 60% de la demanda internacional de producción de cacao fino o de aroma convirtiéndose como primer productor mundial. En 2016, Ecuador exportó 232 mil toneladas métricas de cacao (ANECACAO, 2016a). El tipo de cacao conocido a nivel mundial es el denominado “Nacional”, por producir un chocolate de buen aroma y sabor. Su producción se encuentra entre 0.3 y 0.5 t/h al año (MAGAP, 2013).

Las zonas con mayor producción son las provincias de la Costa debido a sus favorables condiciones de suelos y clima, siendo la más destacada Guayas y Los Ríos. En el año 2014 la provincia del Guayas tuvo el rendimiento más alto (0.92 t/ha), seguida de Los Ríos (0.53 t/ha) y Manabí con 0.24 t/ha (MAGAP, 2015). En términos generales la mayor producción se logra mediante el monocultivo. Se estima que entre 2002-2015 se produjo de esta forma 102.842,77 TM de cacao en comparación a las 16.774,41 en cultivos asociados (Montenegro, 2016). En el mismo periodo el mismo autor estima una pérdida total de 25719,24 Ha por concepto de inundaciones, plagas, enfermedades, entre otros.

Enfermedades causadas por *Moniliophthora* spp.

Moniliasis (*M. roleri*)

La enfermedad también se la conoce con los nombres de monilia, pudrición acuosa, helada, mancha ceniza o enfermedad de Quevedo. Estudios genéticos afirman que el origen de la enfermedad se localiza en los departamentos de Santander y Antioquia de Colombia (Phillips-Mora, Aime, & Wilkinson, 2007). Se reportó en Ecuador en 1917 y fue ascendiendo por

Sur y Centroamérica: Venezuela en 1941, Perú en 1950, Panamá en 1959), Costa Rica en 1978, Nicaragua en 1980, Honduras en 1997, Guatemala en 2002, Belice en 2004 y México en 2005 (Phillips-Mora et al., 2007). En la actualidad, esta enfermedad es la más importante en Colombia (Rodríguez, 2006) y Ecuador (Sánchez-Mora & Garcés-Fiallos, 2012) provocando pérdidas mayores al 60%. El hongo ataca solo a los frutos de los géneros *Theobroma* y *Herrania*.

El ciclo del agente causal dura entre 60 a 70 días, las mazorcas menores a dos meses son los más susceptibles (H. Evans, 1981), produce deformaciones o gibas y pérdidas totales del grano. El hongo continúa su desarrollo y aparecen unos puntos aceitosos que aumentan de tamaño en el transcurso de 10 a 20 días (Jaimes & Aranzazu, 2010). Luego se forman la denominada “mancha chocolate”, al transcurrir de tres a ocho días después aparece un micelio blanquecino que luego se torna de color crema y sobre ella se encuentran las esporas del hongo (conidios) (H. Evans, 1981). Las esporas contagian a los demás frutos sanos por el viento, lluvia, herramientas, etc., desarrollando nuevamente el ciclo de la moniliasis (Evans, 1981; Wilbert Phillips-Mora, 2003). Las mazorcas pueden presentar madurez prematura, en su interior se encuentran las almendras infectadas que provocan su pérdida total.

El control cultural como la poda, quema de frutos infectados, regulación de sombrero y remoción de frutos cada siete días ayudan a la disminución del patógeno y el control biológico usando hongos parasíticos como *Clonostachys* y *Fusarium*, se han utilizado como estrategia de control para reducir la enfermedad (Krauss & Soberanis, 2002)

Escoba de bruja (*M. pernicioso*)

La enfermedad causada por el hongo *M. pernicioso* se encuentra distribuida en Panamá, Venezuela, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Surinam y Trinidad (Purdy & Schmidt, 1996). Este hongo ataca todas las partes activas de crecimiento de la planta, principalmente los brotes nuevos, cojines florales, frutos y flores (Evans & Bastos, 1980). Las ramas terminales y axilares presentan hiperplasia e hipertrofia, en un tiempo transcurrido de seis semanas empiezan a morir y van tomando la apariencia de escobas secas (Meinhardt et al., 2008). Los cojines florales presentan crecimientos anormales y yemas vegetativas con formas de escobas, las flores muestran síntomas de “flor estrellada” (Parra, Contreras, & Pineda, 2008).

Se observan deformaciones en frutos jóvenes (menores a tres meses) los cuales son denominados como “fruto chirimoya”, se necrosan y luego mueren. Si los frutos tienen más de tres meses, adquieren una apariencia de

madurez prematura, presentando zonas verdes y amarillas, abultamientos e hinchazones, luego se necrosan y las almendras infectadas forman una masa gelatinosa (Jaimes & Aranzazu, 2010; Oliveira & Matins, 2005). Cuando inician los periodos de lluvias, el hongo produce los denominados “basidiocarpos”, que son la fuente de inóculo de la enfermedad y contagia a los demás tejidos sanos (Meinhardt et al., 2008).

Las condiciones favorables para que se desarrolle la enfermedad son la alta humedad relativa, precipitaciones, falta de regulación de sombra, suelos pesados y mal drenaje en la plantación (Sánchez et al., 2003). Prácticas culturales como poda, raleo, deschuponado y mantenimiento de zanjas de drenaje disminuye la incidencia de la enfermedad en el cultivo (Parra & Sánchez, 2005).

Control Biológico

Es una alternativa de control para el manejo de enfermedades de plantas de interés agrícola (Serrano & Galindo, 2007), se basa en que un organismo tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de un fitopatógeno o a la vez destruirlo (Whipps & Lumsden, 2001). En el cultivo de cacao se han identificado cepas de *Trichoderma* spp como micoparásitos sobre *M. roleri*, *M. pernicioso* y *Phytophthora* spp., por poseer diversas características como su velocidad de crecimiento, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Hernández-Rodríguez et al., 2014; Martínez et al., 2008; Shores et al., 2010; Tchameni et al., 2011).

Bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas* se ha demostrado que son antagonistas de *P. palmivora* en la utilización de productos realizados a base de caldos libres de células que son aplicados como biofungicidas para controlar la infección de la enfermedad en las mazorcas de cacao (Koranteng & Awuah, 2011). En Ecuador se están aplicando productos comerciales elaborados a partir de *Trichoderma harzianum*, tales como “Neocontrol” y “TrichoD”, que actúan como bioestimulantes y como antagonistas de hongos del suelo (INIAP, 2017).

Hongos endófitos

Son aquellos microorganismos que se encuentran en los tejidos internos de las plantas sin causar síntomas de enfermedad (Arnold, 2005). Establecen una relación de simbiosis; los endófitos se alimentan de los nutrientes que sintetiza la planta y ésta a la vez se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen (alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, glucósidos, lignanos, lactonas, etc.) (Salgado & Caridad, 2005) con un amplio

rango de actividades biológicas (antifúngica, antibiótica e insecticida) (Chowdhary & Kaushik, 2015). De esta manera aumenta el desarrollo de la planta huésped y productos naturales que tienen un rol importante en su defensa (Gunatilaka, 2006) frente a tolerancia al stress, cambios de temperatura, salinidad, y resistencia frente a enfermedades causadas por herbívoros, insectos, nemátodos, bacterias y hongos patógenos (Kaul et al., 2012).

Existen algunos hongos que actúan como patógenos en unas especies de plantas y de manera endófito en otras especies. Algunas veces se encuentran de forma saprófita y también como hongos patógenos latentes y pueden producir síntomas cuando la planta se debilita o empieza su estado de senescencia (Arnold et al., 2003; Promputtha et al., 2007). En el grupo de los hongos endófitos de la familia Clavicipitaceae su transmisión es vertical. En el grupo de endófitos no-clavicipitaceae que comprende a la familia de las Malváceas, su transmisión es horizontal (Partida-Martínez & Heil, 2011).

Mecanismos de acción de los agentes biocontroladores

Entre los mecanismos de acción que poseen los microorganismos antagonistas, se encuentran: Antibiosis: producción de sustancias tóxicas (enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas) de un microorganismo y que tienen efectos dañinos para otros microorganismos (Pérez, 2004). En ensayos de aislamientos de endófitos en cacao se han encontrado a especies de *Trichoderma* como buenos inhibidores del crecimiento de los patógenos *M. roleri* y *M. pernicioso*. Además especies como *Botryosphaeria*, *Xylaria*, *Pestalotiopsis* y *Colletotrichum* también se han encontrado con efectos inhibitorios para el crecimiento de *M. pernicioso* (Bailey et al., 2008; Rodríguez, Flores, Leon, & Arévalo, 2011).

Competencia por sustrato o nutrientes: cuando dos o más organismos requieren del mismo alimento y uno de ellos reduce la cantidad o espacio disponible para el otro. La competencia más común es por nutrientes: nitrógeno, azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, pectinas y microelementos (Robles, 2010). Se han identificado a cepas de *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Verticillium* y *Paecilomyces* con mayores porcentajes de inhibición de crecimiento radial del patógeno *M. roleri* (Suárez & Rangel, 2013).

Micoparasitismo: acción antagónica entre dos hongos, el uno (hiperparásito) parasita al otro (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante

(Pérez, 2004). En el cultivo de cacao aislados endófitos de *Trichoderma* presentaron agresividad para micoparasitar *M. royeri* (Bailey et al., 2008).

Características de selección de agentes de control biológico

Los microorganismos endófitos para considerarlos como agentes de control biológico deben poseer ciertas características mencionadas por Hernández y Escalona (2003) (Hernandez-Montiel & Escalona-Aguilar, 2003):

- a) Que no sea patógeno de plantas, hombres o animales.
- b) Elevada capacidad de colonización y reproducción en los tejidos internos después de su inoculación en las plantas
- c) Capacidad de reducir o suprimir eficientemente la población de nematodos por debajo del nivel crítico.
- d) Capacidad de reproducirse en condiciones *in vitro* para asegurar su reproducción y conservación a nivel comercial; además, debe ser de fácil aplicación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de muestras

Se realizó un muestreo dirigido en plantaciones de cacao Nacional de diferentes localidades (Figura 1). Se colectaron hojas sin manifestación de síntomas ni daños físicos en diferentes cantones del Guayas y en la provincia del Azuay entre los meses de Enero y Febrero de 2014.

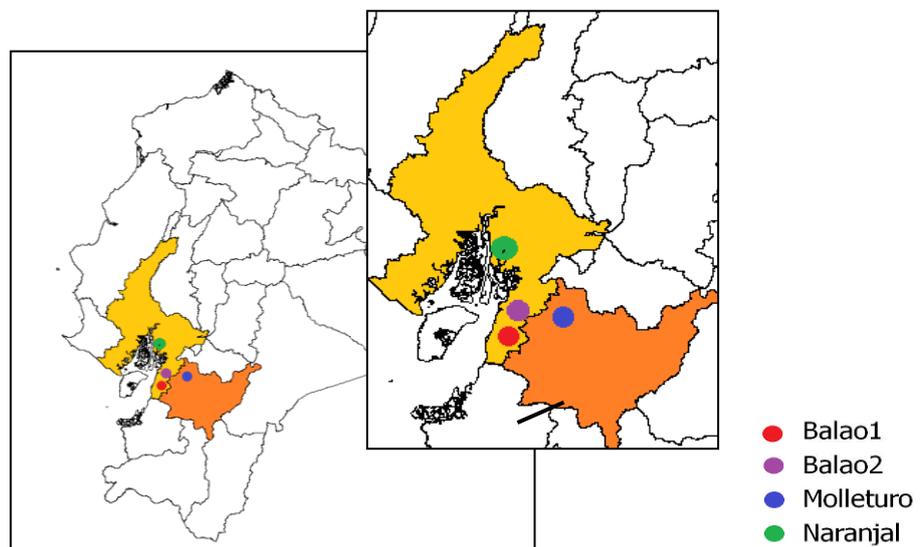


Figura 1. Mapa del Ecuador indicando las localidades muestreadas para el aislamiento de los hongos endófitos y patógenos.

2.2 Cepas de *M. roreri* y *M. pernicioso*

Se emplearon las cepas CIBE-MP22 (*M. pernicioso*) y CIBE-A12.1 (*M. roreri*) conservadas en la colección de cultivos microbianos del CIBE-ESPOL. Las mismas fueron aisladas en 2010 en las provincias de Los Ríos y de la Amazonía, respectivamente. Estas cepas son los estándares para ensayos de laboratorio en varios trabajos que se encuentran realizando.

2.3 Aislamiento, purificación y preservación de hongos endófitos

Las hojas sanas de cacao se lavaron con agua corriente, luego se cortó la lámina foliar en fragmentos de 1 cm² de cada lado de la nervadura central, se desinfectaron de manera consecutiva con etanol (70%/2 min), hipoclorito de sodio (0.5%/2 min) y enjuagados con agua destilada estéril por tres veces. Posteriormente se secaron los fragmentos sobre papel toalla estéril, se sembraron en medio de cultivos papa-dextrosa agar (PDA) y agar extracto de malta 2% (MEA) (Arnold & Herre, 2003). En cada caja de Petri se sembraron ocho fragmentos de hoja y se incubaron a 26°C en oscuridad. Se aislaron todas las colonias con morfología diferente durante 10 días y se purificaron en PDA. La cantidad de aislados se encontraron distribuidas de la siguiente manera: en el cantón Balao, con la presencia de 51 aislados, seguidas por Naranjal con 41 aislados y Molleturo con 34 aislados.

El micelio de las colonias de aislados purificados se conservaron bajo congelación (-80°C) en el CIBE-ESPOL. Previamente se esterilizó medio caldo de papa dextrosa (PDB) y glicerol al 25% como crioprotector.

PARTE 1: IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

2.4 Identificación molecular de los aislados endófitos (126)

Para la identificación de los especímenes se secuenció la región ITS del ADNr. La extracción de ADN se realizó a partir de micelio raspado de la superficie de las colonias en medio PDA siguiendo el protocolo de Ceniz (Ceniz, 1992). Luego se amplificó la región ITS1, 5.8S, ITS2 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). El volumen de la reacción final fue de 25 µl; conteniendo la siguiente mezcla a concentración final: 1X solución tampón (Invitrogen), dNTPs 0,2 mM, Mg₂Cl 1,5 mM, iniciadores 0,4 µM cada uno, *Taq* polimerasa 0,5 U por reacción (Invitrogen) y 2 µl de ADN (10-50 ng). La PCR fue realizada bajo las condiciones siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 minuto; seguidos por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 68°C por 1 minuto; una extensión final de 68°C por 3 minutos. El producto

amplificado se visualizó en gel de agarosa al 2%. La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría.

Los productos amplificados fueron secuenciados en el Interdisciplinary Center for Biotechnology Research de la Universidad de Florida (ICBR). La calidad de las secuencias se analizó con el programa FinchTV (Versión 1.4.0, <http://www.geospiza.com/finchtv>). Las secuencias obtenidas se compararon con la información existente en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/), utilizando las búsquedas BLAST y se alinearon utilizando el programa MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013). Se consideró una similitud $\geq 97\%$ de la secuencia con las ingresadas en el GenBank para la identificación de la especie (O'Brien, Parrent, Jackson, Moncalvo, & Vilgalys, 2005). Se analizaron las relaciones filogenéticas entre el total de cepas secuenciadas mediante el método Máxima Parsimonia, usando *Bootstrap* con 1000 réplicas. Como grupo externo se usó *Aspergillus niger* (LC105682).

2.5 Análisis de Filogenia

Con el objetivo de diferenciar los aislados previamente identificados como *Colletotrichum* spp. se consideró inferir su relación genética basado en regiones parciales de los genes GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), usando los primers GDF1 (5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3') y GDR1 (5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3'), y TEF-1a (Factor de elongación uno alfa) con los primers EF1F (5'-TGCGGTGGTATCGACAAGCGT-3') y EF2R (5'-AGCATGTTGTGCGCCGTTGAAG-3'). Para este análisis se usaron nueve aislados de *Colletotrichum* spp. provenientes de las provincias Guayas y Azuay. Reacciones de PCR para los dos genes fueron generadas siguiendo las condiciones de amplificación siguientes: desnaturalización a 94°C por 3 minutos; seguidos por 6 ciclos de 94°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos y 29 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos; una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron secuenciados en el ICBR. La edición y el alineamiento de secuencias se realizó usando los softwares Genious v11 (Kearse et al., 2012) y MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

La inferencia filogenética, para cada uno de los genes en mención, se basó en el método de máxima parsimonia (MP) usando el software MEGA 6. Los árboles más parsimoniosos fueron obtenidos usando el algoritmo de "Subtree-pruning regrafting" (SPR) con un solo nivel de búsqueda. La

robustez de cada clado fue evaluada con un bootstrapping (error de muestreo) de 1000 réplicas.

También se realizó la inferencia filogenética del set de datos resultante de la concatenación de los genes ITS y GAPDH. Para este análisis se consideraron los métodos de máxima verosimilitud (ML), máxima parsimonia (MP), y Bayesianos, usando los softwares MEGA 6 y MrBayes (Ronquist et al., 2012).

Para construir el árbol con la máxima verosimilitud se usó Kimura-2 como el modelo más apropiado para explicar la sustitución de nucleótidos observado en el set de datos. Se usó una búsqueda heurística con un error de muestreo de 1000 réplicas. En el caso del análisis Bayesiano, se usó el método de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) con una longitud de cadenas de 1.000.000. Se empleó el modelo general reversible de sustitución de nucleótidos (GTR) con una distribución gamma. La frecuencia de muestreo fue cada 400 árboles, y se obvió las primeras 10.000 interacciones como valores no estacionarios. La convergencia de la distribución y el tamaño efectivo de muestra fue considerado apropiado si los valores obtenidos eran mayores a 300.

Con fines comparativos se incluyeron secuencias de cepas de referencia del complejo *C. gloeosporioides* estudiadas por Weir et. al (Weir, Johnston, & Damm, 2012), Cannon et. al (Cannon, Damm, Johnston, & Weir, 2012) y Rojas et. al (Rojas et al., 2010). Además, se incorporaron cepas endófitas aisladas de Venezuela identificadas como *C. gloeosporioides* mediante la región ADNr-ITS. *C. boninense* y *C. hippeastri* fueron usados como outgroups.

PARTE 2: ENSAYOS DE ANTAGONISMO Y PATOGENICIDAD CON EL TOTAL DE AISLADOS (126)

2.6 Antagonismo *in vitro* mediante cultivos duales

2.6.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno

Cada endófito se enfrentó con ambos patógenos por la técnica de cultivos duales (Calvo-Araya et al., 2012), según se muestra en la Figura 2. Las placas se incubaron a $26^{\circ}\text{C}\pm 1$, bajo oscuridad y se tomaron mediciones diarias de crecimiento (mm) del patógeno durante 10 días. Se realizaron dos repeticiones por cada tratamiento. Debido a la cantidad de combinaciones para las evaluaciones se realizaron lotes y en cada uno se incluyeron los

respectivos controles. Como control, se sembraron en cajas separadas el patógeno y en otra caja el endófito.

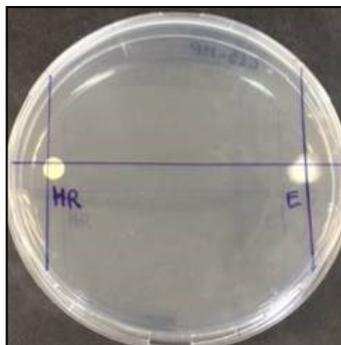


Figura 2. Ejemplo de confrontación dual patógeno *M. roreri* (MR) vs. Endófito (E).

M. pernicioso se sembró siete días antes debido a su lento crecimiento respecto a los endófitos. Los datos obtenidos fueron expresados en porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio (PIC) mediante la fórmula: $PICR = ((R1 - R2) / R1) * 100$ donde R1 corresponde al radio mayor (radio patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento) (Ezziyyani et al., 2004).

El PIC de cada interacción endófito-patógeno se determinó desde la siembra hasta el momento del contacto, lo cual sucedió entre los 4-10 días dependiendo de las interacciones. Una vez que las cepas hacían contacto se dejó de medir el crecimiento y se dejaron las colonias hasta los 10 días, momento en el que se determinó el tipo de interacción entre ambas colonias. El resultado de esa interacción se evaluó como: i) Antibiosis: Inhibición de crecimiento por presencia de una zona de inhibición sin existir contacto (interacción neutral); ii) competencia por sustrato: sobrecrecimiento de un hongo por otro (se determinó si gana o pierde el endófito y/o patógeno); iii) contacto de micelios sin existir sobrecrecimiento (interacción neutral). La interacción se consideró mixta cuando las dos repeticiones del mismo endófito mostraron diferentes interacciones contra el mismo patógeno (Mejía et al., 2008).

Se registró el tiempo de contacto antagonista-patógeno (número de días en el cual las cepas antagonistas y patógenas entran en contacto (Calvo-Araya et al., 2012).

2.7 Patogenicidad en hojas sueltas y frutos de cacao

Se emplearon hojas y frutos sanos en una plantación de cacao Nacional procurando la mayor similitud posible de tamaño y edad. Fueron lavadas con

agua corriente y desinfectada con etanol 95%. En las hojas, se realizaron cuatro puntos de inoculación (heridas), dos en cada lado de la nervadura central para colocar de lado derecho discos de 5 mm de diámetro de la cepa endófito y en el lado izquierdo dos discos de PDA (control) (Figura 3A) (Newhouse, Spitzer, Maynard, & Powell, 2014). Se realizaron dos réplicas por cada tratamiento. Se inocularon frutos en fase de madurez técnica, por cada fruto se inocularon tres cepas endófitas y un control a razón de tres discos por tratamiento (Figura 3B). Se realizaron perforaciones de 0,5 cm de profundidad para colocar la cepa endófito o de PDA (Tahi et al., 2007). Las hojas y frutos fueron colocados en bolsas plásticas conteniendo papel filtro húmedo para mantener 100% de humedad y se incubaron a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad. En el caso de las hojas se registró la presencia/ausencia de necrosis y/o clorosis a los cuatro días después de la inoculación. Los frutos se incubaron durante 8 días y se registró presencia/ausencia de necrosis al final del periodo.



Figura 3. Hoja inoculada con discos de micelio de la cepa endófito del lado derecho de la nervadura, y del izquierdo disco de PDA como control (A), Fruto inoculado con discos de micelio en perforaciones de 0,5 cm (B).

Análisis estadísticos

Los resultados de PIC respecto a los enfrentamientos hacia *M. roreri* se agruparon mediante un Análisis de Conglomerados con el método de Ward y distancia Euclídea, con el patógeno *M. pernicioso* los valores obtenidos de PIC se utilizó el método Centroide Ponderado con distancia Manhattan. Los diferentes métodos y distancias usadas fueron por representar valores altos de correlación cofenética al realizar los análisis. Para identificar si los grupos conformados por el Análisis de Conglomerados eran diferentes de manera significativa se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, debido a que los datos del PIC no presentaron una distribución normal usando la prueba de Shapiro-Wilks (Anexo 1). Se utilizó el software Infostat (Di Rienzo

et al., n.d.). Los resultados de la patogenicidad fueron evaluados mediante estadística descriptiva.

2.8 Preselección de cepas endófitas promisorias

La estrategia general de selección de cepas promisorias fue partir de los mayores PIC frente a ambos patógenos de los experimentos anteriores. Se preseleccionaron 17 cepas con elevados PIC y que no provocaran síntomas en hojas ni frutos.

PARTE 3: DETERMINACIÓN DEL MICOPARASITISMO Y CAPACIDAD ENDOFÍTICA

A las cepas preseleccionadas se les evaluaron capacidad micoparasítica hacia *M. royeri* y *M. pernicioso* y endofítica mediante pruebas complementarias.

2.9 Supervivencia de *Moniliophthora* spp. luego de la interacción con los endófitos (micoparasitismo)

Se enfrentaron patógenos-endófitos en cultivo dual durante 13 días (Condori, Leon, & Zapana, 2016), transcurrido este tiempo se extrajeron diez discos de la zona de la interacción (Figura 4) y se sembraron en PDA. A los siete días se registraron el número de discos con crecimiento del endófito y/o del patógeno de cada interacción. Se determinó el porcentaje de supervivencia del patógeno a partir de 10 discos por interacción. Se realizaron dos repeticiones por cada tratamiento.

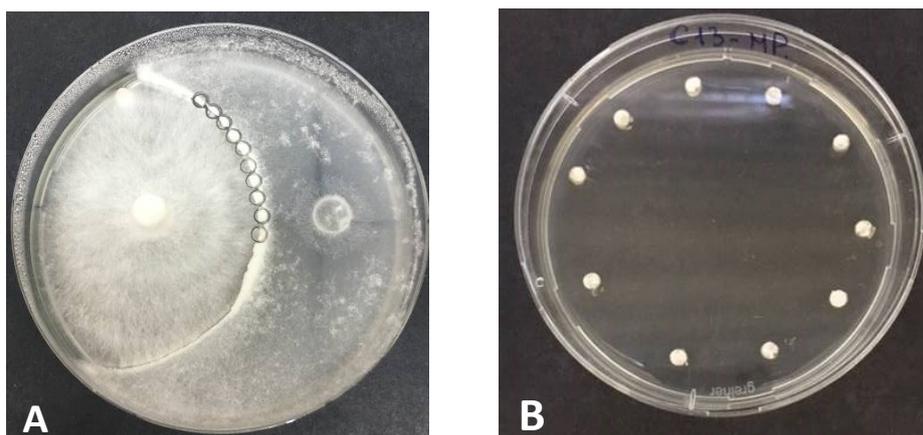


Figura 4. Enfrentamiento *M. pernicioso* vs Endófito (A) durante 13 días y distribución de discos de 0,5 mm sembrados aparte (B) para evaluar crecimiento del patógeno a los 7 días.

2.10 Actividad antifúngica de los metabolitos crudos de los endófitos

Los filtrados crudos se obtuvieron en medio Czapeck líquido. En frascos de 250 ml se vertieron 150 ml de medio y fueron inoculados con cuatro discos de micelio+agar de cada cepa crecidas previamente (PDA/ 7d/ oscuridad). Se taparon con papel de aluminio e incubaron a temperatura ambiente del laboratorio ($\approx 25^{\circ}\text{C}\pm 2$) en agitación (110 rpm/ 21d). Se emplearon tres réplicas por cada tratamiento (cepa). Transcurrido el tiempo de incubación se filtró por gasa estéril y se esterilizó por filtración ($0,22\ \mu\text{m}$) en un sistema al vacío. Posteriormente, se esterilizó el medio de cultivo con el volumen exacto para las cajas Petri a utilizar, luego se adicionó el volumen de metabolitos calculado para cada una de las concentraciones (50 y 75%) y se usó agua destilada estéril como control. Una vez que el medio de cultivo y el filtrado fúngico habían solidificado, se realizó la siembra de un disco de 5 mm del patógeno correspondiente (PDA/ 7d/ oscuridad) en el centro de la caja Petri. Se incubó a 26°C y se evaluó cada 24 horas el crecimiento micelial (Rodríguez et al., 2011). El PIC fue determinado mediante la fórmula descrita anteriormente.

Análisis estadísticos

Los porcentajes de sobrevivencia y los PIC obtenidos en el ensayo de micoparasitismo y extractos crudos, respectivamente, fueron comparados utilizando un análisis de varianza no paramétrica (Kruskal Wallis) ya que luego de varias transformaciones no presentaron distribución normal (Anexo 1).

2.11 Colonización de hojas sueltas de cacao por las cepas endófitas

Este ensayo pretendió determinar la habilidad de cada cepa de colonizar tejido foliar sano de cacao Nacional de dos meses de edad. El inóculo de las 17 cepas preseleccionadas se obtuvo en PDA en condiciones similares a las descritas previamente. A los siete días se colocó Tween 20 al 0.05% y se rasparon las placas con un asa estéril, se maceró el micelio y se ajustó la concentración a $10^6 - 10^7$ UFC ml^{-1} en agua destilada estéril. Las hojas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (2%/2 min) y lavadas con agua destilada estéril (Mayek Pérez, 2008). Posterior al lavado fueron asperjadas hasta la saturación de la superficie e incubadas en bandejas con papel filtro húmedo (100% HR), selladas con envoltura plástica (26°C / 7d/ oscuridad).

Posterior a la incubación las hojas se lavaron con agua corriente, se extrajeron seis discos de 5 mm de cada lado de la nervadura central

(extremo superior, centro y extremo inferior) y se desinfectaron con lavados consecutivos de etanol (70%/2 min), hipoclorito de sodio (0.5%/2 min), y enjuagadas tres veces con agua estéril (Ruiz et al., 2014). Los discos de hojas se sembraron en AM (2%) y se incubaron tal como se describió antes. Al tercer día de incubación se aislaron en PDA pedazos de micelio de las colonias que emergieron de cada disco de hojas y según la morfología que presentaron se comparó con las cepas promisorias inoculadas. Se determinó el porcentaje de colonización de cada aislado endófito dividiendo la cantidad de hongos crecidos en el medio AM con respecto al total de los discos sembrados y el resultado multiplicado por 100.

3. RESULTADOS

PARTE 1: IDENTIFICACION DE ESPECIES

3.1 Abundancia y riqueza de especímenes endófitos

Del total de 126 aislados se obtuvieron 24 géneros agrupados en 18 familias y 10 órdenes. Del total de especies identificadas, 17 fueron Ascomycetes, 6 Basidiomycetes y 1 Deuteromycete. Los géneros que mayormente se aislaron fueron *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Xylaria* y *Pestalotiopsis*. Otros géneros se presentaron raramente con un solo aislado cada vez (Figura 5).

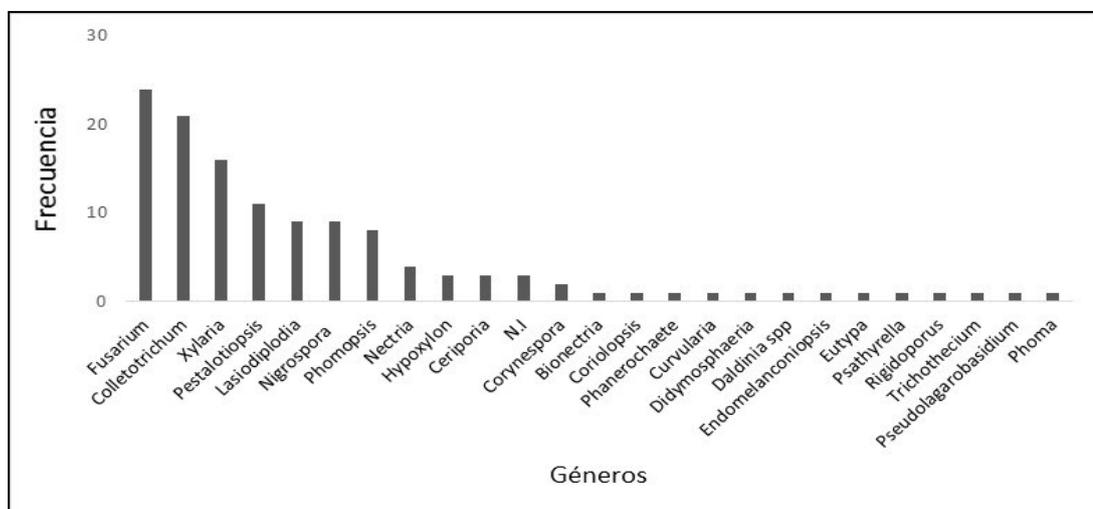


Figura 5. Géneros de hongos endófitos encontrados en cacao tipo Nacional en las tres localidades. Se muestra la frecuencia absoluta. NI indica aislado no identificado (cepas Ec053, Ec110 y Ec180) debido a que no pudieron ser identificados en la base de datos.

La Figura 6 muestra la diversidad de colonias de los géneros más comunes en PDA. Es de destacar que las colonias obtenidas fueron poco propensas a esporular en este medio, razón por la cual para las inoculaciones se usó fundamentalmente el micelio.

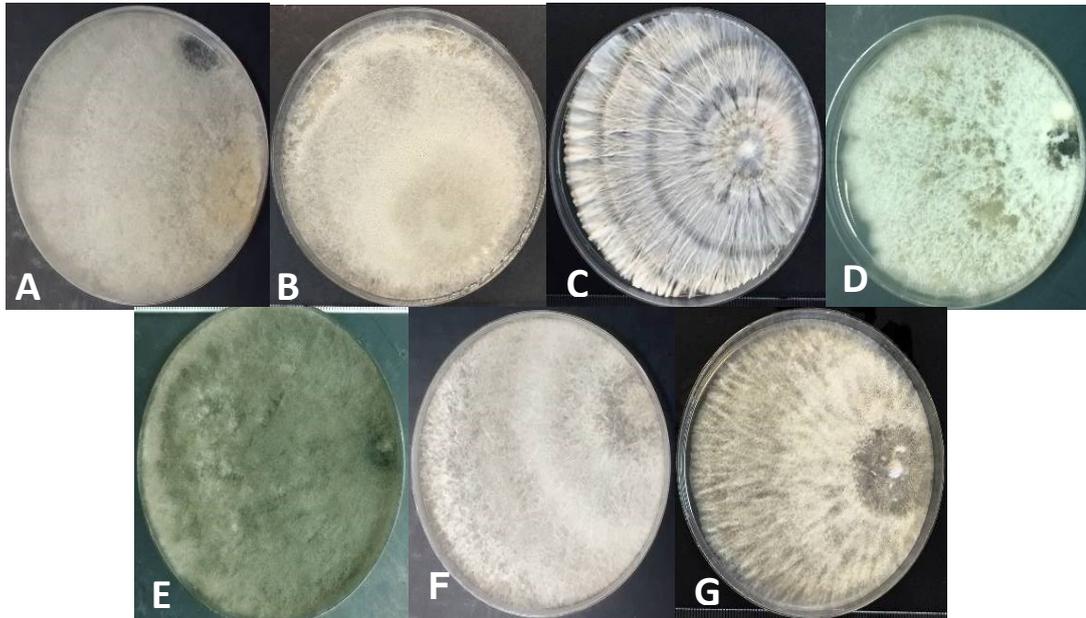


Figura 6. Colonias de los hongos endófitos más comunes aislados de hojas sanas de cacao. A) *Fusarium*, B) *Colletotrichum*, C) *Xylaria*, D) *Pestalotiopsis*, E) *Lasiodiplodia*, F) *Nigrospora*, y G) *Phomopsis*. Placas cultivadas en PDA (10 d/ 26±1°C/ oscuridad).

El árbol filogenético muestra las secuencias de 119 aislados obtenidos en este estudio, más una secuencia del GenBank como grupo externo (Figura 7). No se consideraron siete aislados porque sus secuencias de ITS no presentaron buena calidad para el análisis y los aislados Ec053, Ec110 y Ec180 no pudieron ser identificados en la base de datos y se nombraron como *N.I.* Se formaron grupos monofiléticos que corresponden a las especies. Los grupos filogenéticos formados no muestran una relación con la localidad de origen. Se observan 32 especies diferentes en las distintas localidades, las cuales se agruparon en grupos similares, existen unas especies que se formaron pequeños subgrupos. Se destacan las que resultaron promisorias en la capacidad de inhibir el crecimiento de *Moniliophthora* spp. En el caso de las poblaciones de *Xylaria*, la cepa Ec099 tuvo mayor capacidad inhibitoria en comparación con las demás del grupo conformado en el árbol filogenético. En el grupo conformado por las especies de *Colletotrichum*, que fueron las especies más numerosas, solo dos cepas

mostraron la mayor capacidad de control sobre los patógenos, a pesar de encontrarse dentro de un mismo grupo en sus relaciones filogenéticas

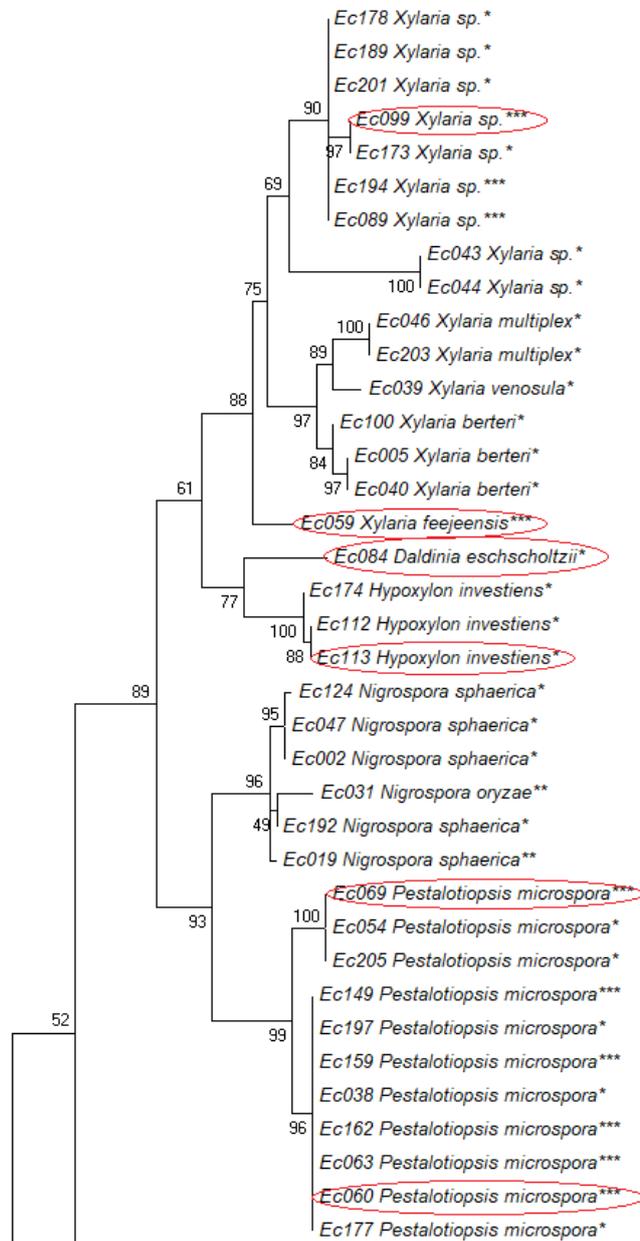


Figura 7. Relaciones filogenéticas entre los aislados endófitos de hojas de cacao basados en el análisis de Máxima Parsimonia usando la región ADNr-ITS (*bootstrap* 1000 repeticiones). La secuencia de *Aspergillus niger* corresponde al *outgroup*. (*) Balao, (**) Molleturo, (***) Naranjal.

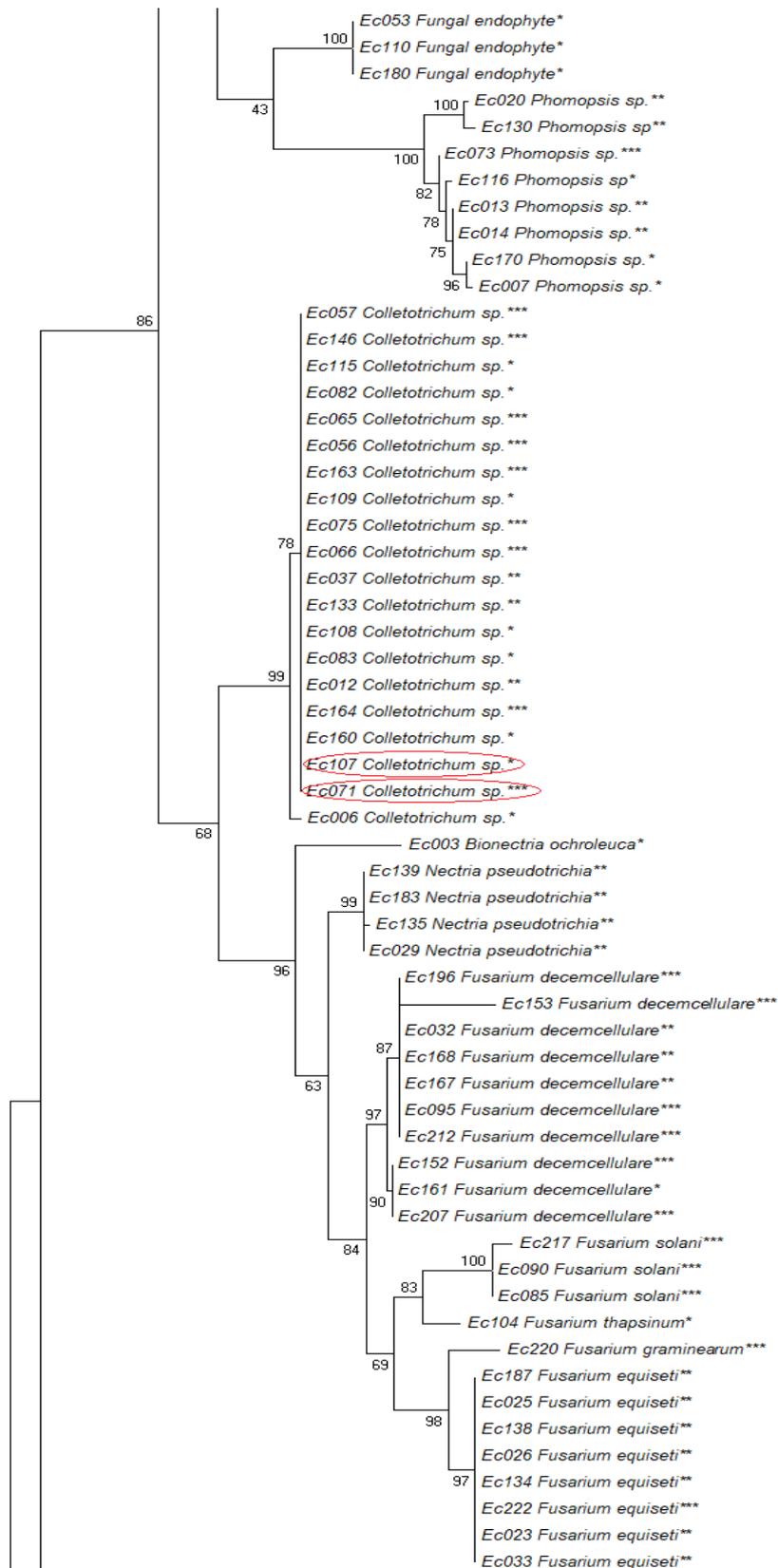


Figura 7. (Continuación)

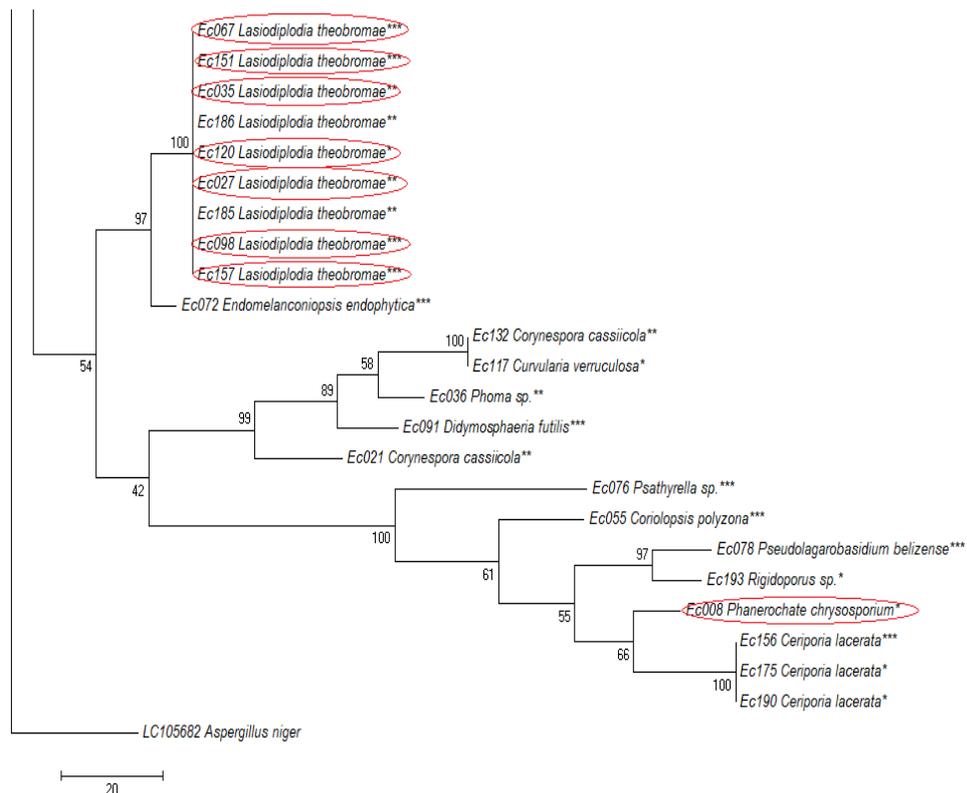


Figura 7. (Continuación)

3.2 Análisis de filogenia

Los aislados provenientes de Ecuador no presentaron relación genética con aquellas reportadas por Weir et. al (Weir et al., 2012) como *C. gloeosporioides* (sensu stricto) al considerar las regiones parciales de los genes ITS y GAPDH, tanto de manera independiente como concatenada.

En el primer análisis realizado con el gen ITS se observó la conformación de tres grupos diferenciados (Figura 8). Un primer grupo se conformó de tres cepas endófitas de Ecuador (Ec133, Ec160 y Ec115) con seis especies dentro del complejo *C. gloeosporioides* propuestas por Weir (*C. queenslandicum*, *C. aenigma*, *C. alienum*, *C. clidemiae*, *C. ti* y *C. tropicale*). Dentro de este grupo se encontraron también 12 cepas de Venezuela (1C, 2C, 4C, 5C, 7C, 8C, 11C, 14C, 16C, 19C, 20C y 23C).

Un segundo grupo fue conformado por las cepas endófitas Ec065 y Ec163, provenientes de Ecuador, únicamente asociadas con *C. theobromicola*.

Un tercer grupo incluyó cuatro cepas de Ecuador (Ec082, Ec083, Ec146 y Ec109) y seis cepas de Venezuela (3C, 6C, 9C, 10C, 17C y 18C), las cuales estaban relacionadas genéticamente con las especies *C. siamense*, *C. aeschynomenes* y *C. fruticicola*.

En un segundo análisis realizado con el gen GAPDH (Figura 9) se observó que los aislados Ec082, Ec083 y Ec109 además de guardar relación con las mismas especies reportadas en el análisis previo (ITS), también compartieron relación genética con la especie *C. nupharicola*.

El aislado Ec065 se volvió a agrupar con la especie *C. theobromicola*, mientras que el aislado Ec163 se agrupó con el aislado Ec146 en un clado diferenciado compartiendo incluso ancestría con cepas de la especie *C. tamarilloi* obtenidos del cultivo de tamarillo (*Solanum betaceum*) de Ecuador.

Los aislados Ec133 y Ec160 formaron un solo clado compartiendo ancestría con las especies *C. siamense* y *C. aeschynomenes* nuevamente. Sin embargo, el aislado Ec115, el cuál según la región ITS pertenecía al mismo grupo, fue separado en un solo taxón.

En un tercer análisis con el gen TEF (Figura 10) solo el aislado Ec163 guarda relación con *C. theobromicola*. Los aislados Ec082, Ec083 y Ec109 se muestran en un clado diferenciado sin agruparse con los otros aislados.

Los aislados Ec133 y Ec160 al igual que con el gen ITS y GAPDH muestran que son de la misma especie, sin relacionarse con las especies propuestas por Weir et. al (Weir et al., 2012), por lo tanto, sugiere la presencia de dos nuevas especies dentro del complejo *C. gloeosporioides*

El aislado Ec065 no guarda relación genética con los demás aislados al igual que Ec115 y Ec146.

El análisis concatenado (Figura 11) sugiere que los individuos Ec082, Ec083 y Ec109, podrían pertenecer a la especie *C. fructicola*. Su similaridad genética también demostrada con el gen TEF soporta esta hipótesis. A pesar de que el aislado Ec146 fue agrupado dentro del mismo clado, la inconsistencia observada en los análisis individuales con los genes ITS, GAPDH y TEF, amerita cautela y la necesidad de considerar otros genes para mayor resolución.

La agrupación de los aislados Ec065 y Ec163 en un mismo clado con la cepa tipo ICMP17099 y con valores de bootstrap significativos es indicativo de su identidad como *C. theobromicola*.

Por otro lado, los aislados Ec133, Ec160 y Ec115, agrupados en clados separados y diferenciados del resto de aislados ecuatorianos y de cepas tipo, sugiere la presencia de dos nuevas especies dentro del complejo *C. gloesporioides*.

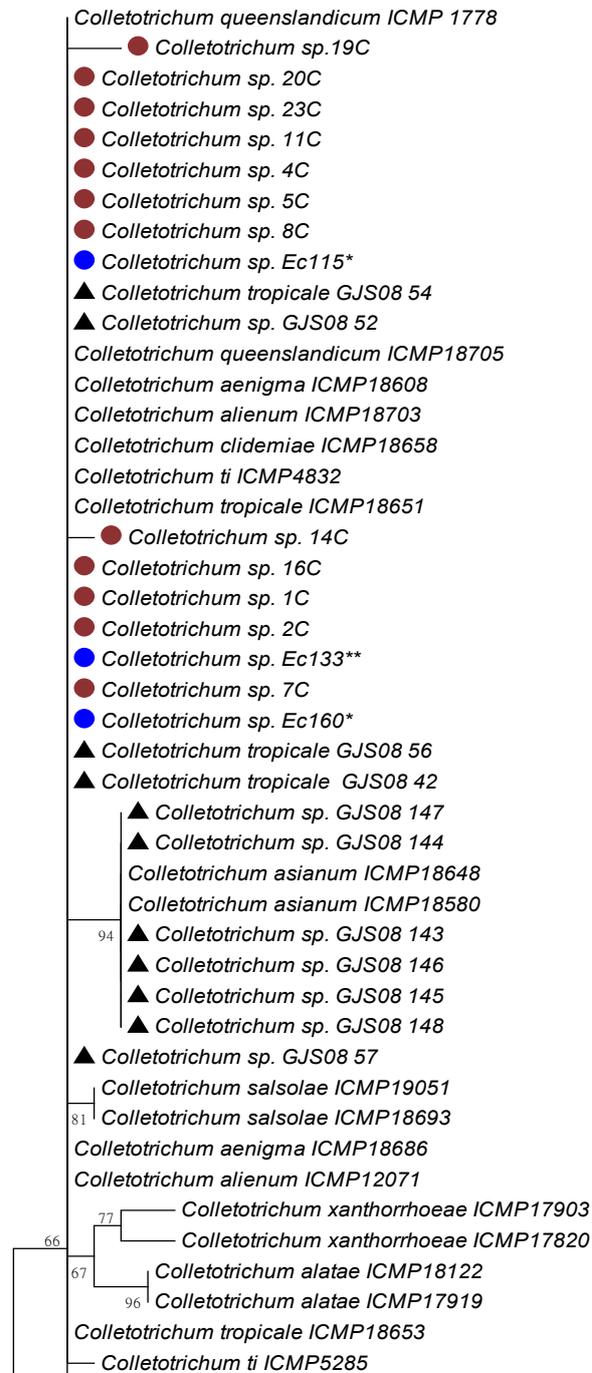


Figura 8. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de MP. Se muestra 1 de los 3 árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de la región ITS de endófitos de *Colletotrichum* spp. analizadas en este estudio en conjunto con cepas del complejo de especies “*gloeosporioides*” propuestas por Weir et al. (2012), cepas endófitas procedentes de Venezuela y otras especies aisladas de Panamá (Rojas et al. 2010). *C. boninense* y *C. hippeastri* fueron usados como outgroups. (*) Aislados procedentes de Balao, (**) Molleturo, (***) Naranjal. Los símbolos a color representan: ● Aislados de Venezuela; ● Aislados de Ecuador; ▲ Cepas tipo de Rojas et. al.; ▲▲▲▲ Cepas tipo de Cannon et. al.

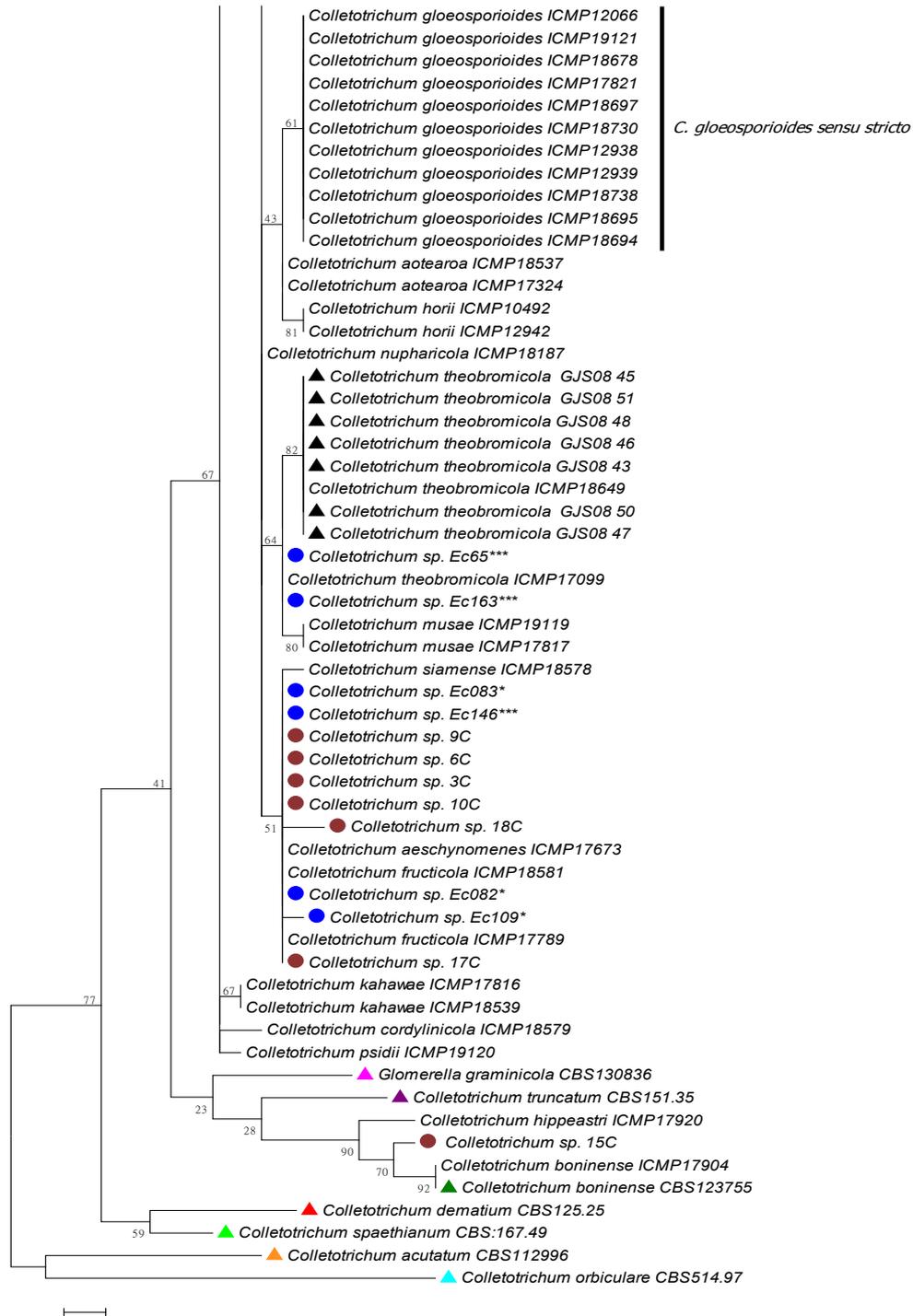


Figura 8. (Continuación).

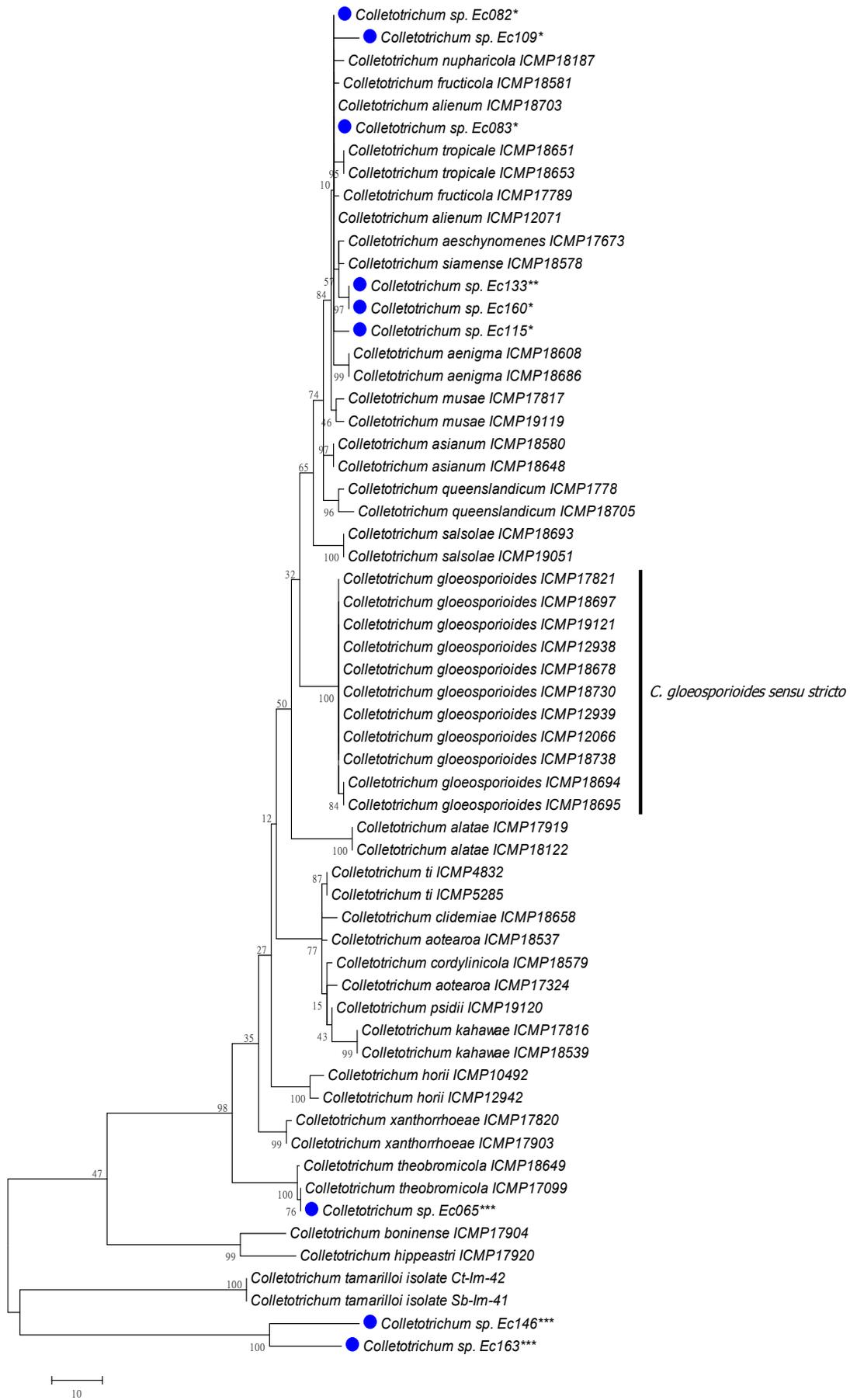


Figura 9. Árbol filogenético generado con análisis de MP. Se muestra 1 de los 8 árboles más parsimoniosos obtenidos de secuencias de aislados endófitos de *Colletotrichum* spp. de Ecuador con el gen GAPDH, aislados referencias o tipo de Weir et al. (2012) y dos cepas patógenas de tamarillo (*Solanum betaceum*) procedentes de Ecuador. *C. boninense* y *C. hippeastri* fueron usados como outgroups. (*) Balao, (**) Molleturo, (***) Naranjal. Los símbolos a color se detallan en la Figura 8.

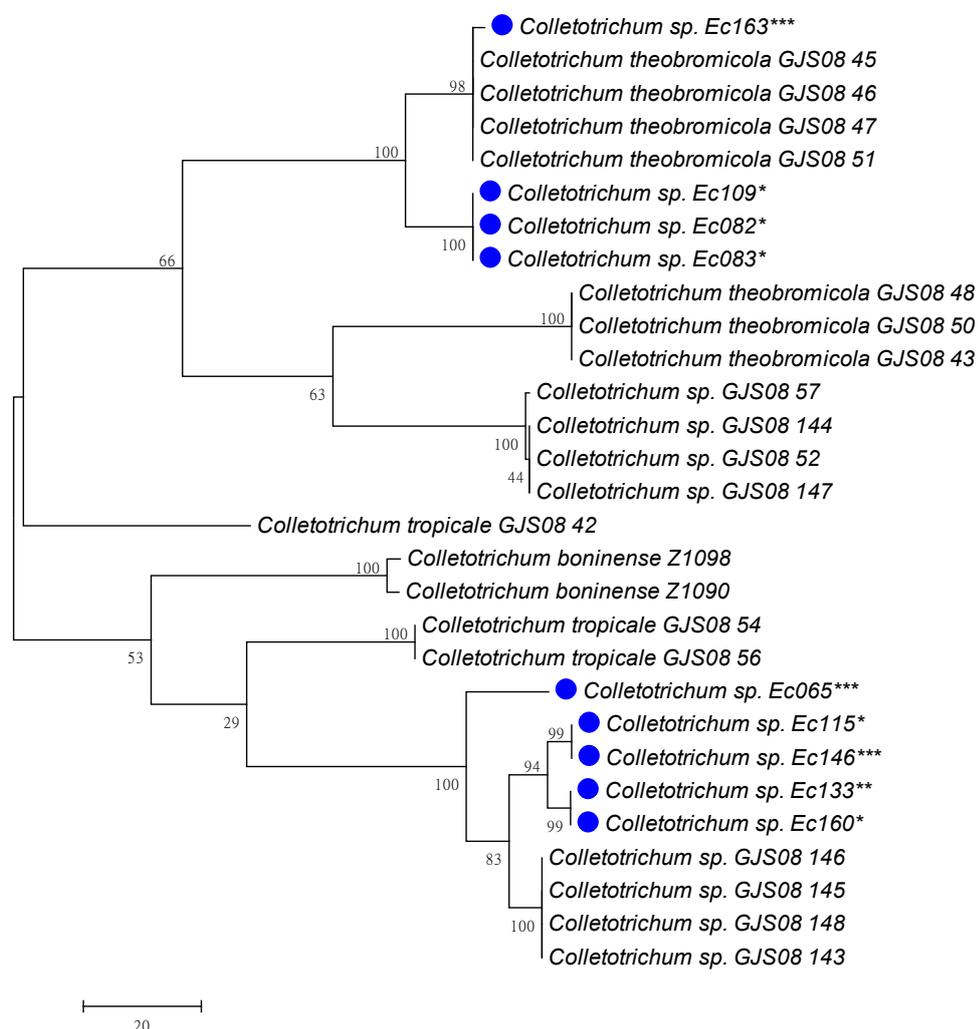
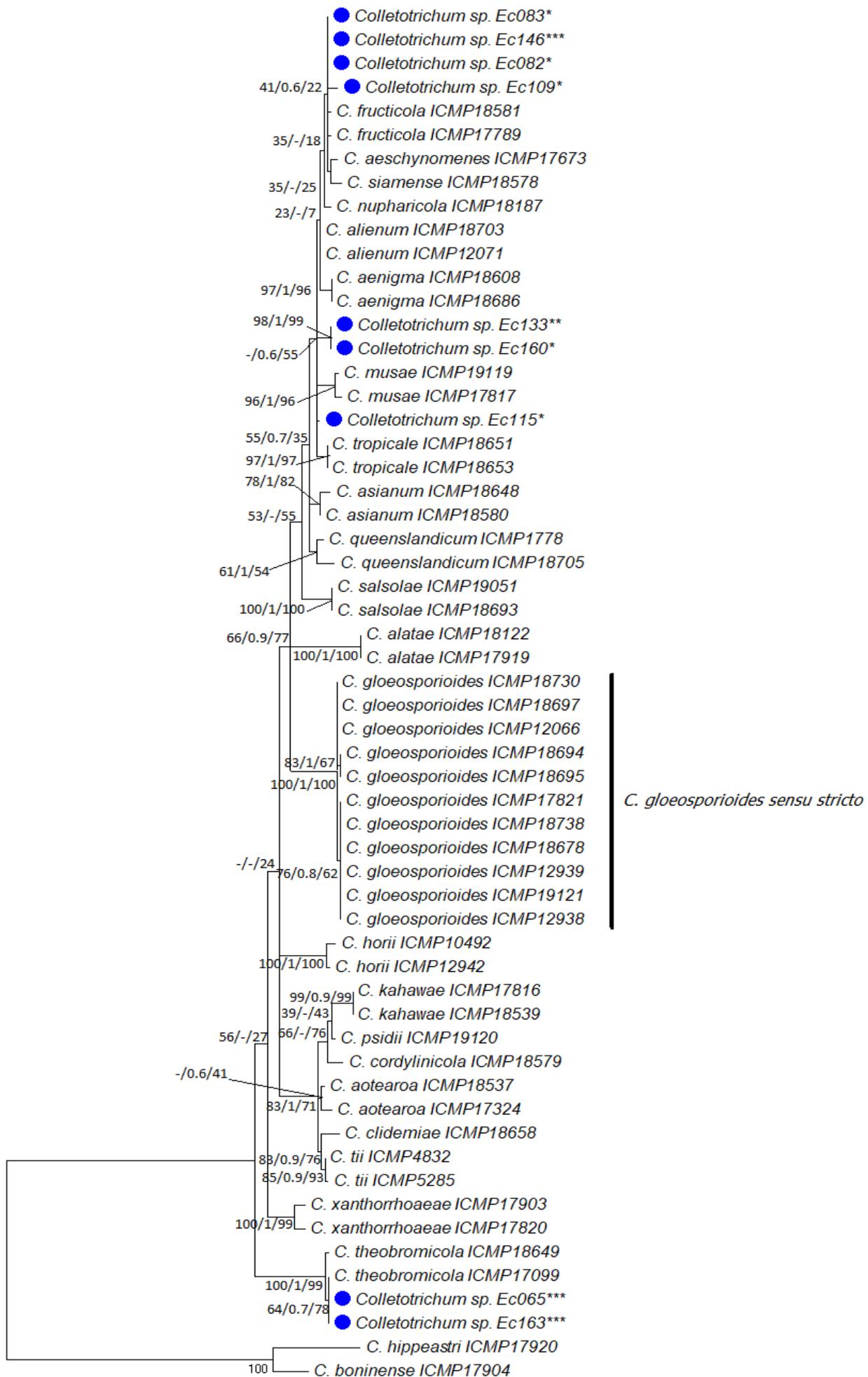


Figura 10. Filogenia con secuencias de *Colletotrichum* spp. aisladas de este estudio incluyendo secuencias de Rojas et al. (2010) para comparar los análisis usando el método de Máxima Parsimonia. Se muestra 1 de los 9 árboles más parsimoniosos. (*) Balao, (**) Molleturo, (***) Naranjal. Los símbolos a color se detallan en la Figura 8.



0.02

Figura 11. Árbol filogenético con valores de soporte (MP/BS/ML) de la concatenación de las secuencias de las regiones ITS y GAPDH de nueve especies de endófitos del género *Colletotrichum* aislados de Ecuador y secuencias de referencias del complejo de especies *C. gloeosporioides* reportadas por Weir et al. (2012). *C. boninense* y *C. hippeastri* fueron usados como outgroups. (*) Balao, (**) Molleturo, (***) Naranjal. Los símbolos a color se detallan en la Figura 8.

PARTE 2: ENSAYOS DE ANTAGONISMO Y PATOGENICIDAD CON EL TOTAL DE AISLADOS (126)

3.3 Competencia por sustrato frente a *M. roreri* y *M. pernicioso* en cultivos duales

A los 10 días de evaluación de los cultivos duales, cada una de las cepas endófitas presentó variaciones en el día de contacto de las colonias y PIC frente a los patógenos correspondientes (Figura 12).

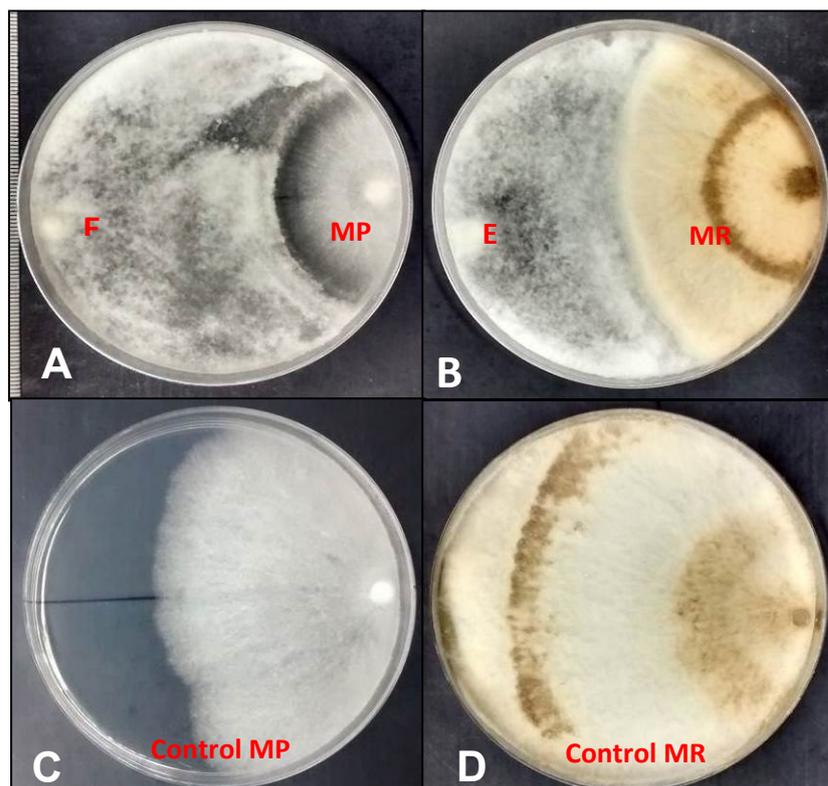


Figura 12. Interacción endófito-patógeno en cultivo dual (PDA/10 d/26 \pm 1°C) de la cepa Ec008 (*Phanerochaete chrysosporium*) frente a los patógenos *M. pernicioso* (A) y *M. roreri* (B). Patógenos testigos sin el antagonista (C) y (D).

Endófitos vs *M. roreri*

Mediante el análisis de conglomerados de los PICs entre los 2-10d de todos los aislados se conformaron de tres grupos homogéneos utilizando el método de Ward (Anexo 2, correlación cofenética de 0,63). Los grupos fueron denominados MR-1, MR-2 y MR-3. El grupo MR-1 lo integraron 18 UTOs (Unidades Taxonómicas Operativas) y 52 aislados; el MR-2, 10 UTOs y 34 aislados; y MR-3 12 UTOs y 40 aislados (Anexo 4). El grupo MR-1 siempre inhibió el crecimiento de MR (Ver Figura 13, los valores positivos), en cambio los aislados de los grupos MR-2 y MR-3 estimularon al patógeno hasta el 5to y 6to día de enfrentamiento (ver valores negativos de las curvas (Figura 13). A partir del día nueve (PIC 9) los tres grupos no muestran diferencias estadísticamente significativas, presentando 100% de inhibición (Anexo 3).

Tiempo de contacto

Otra característica deseable de un antagonista que presentó MR-1 fue el corto tiempo de contacto (tres días). Los grupos MR-2 a los seis días y MR-3 a los ocho días (Anexo 3).

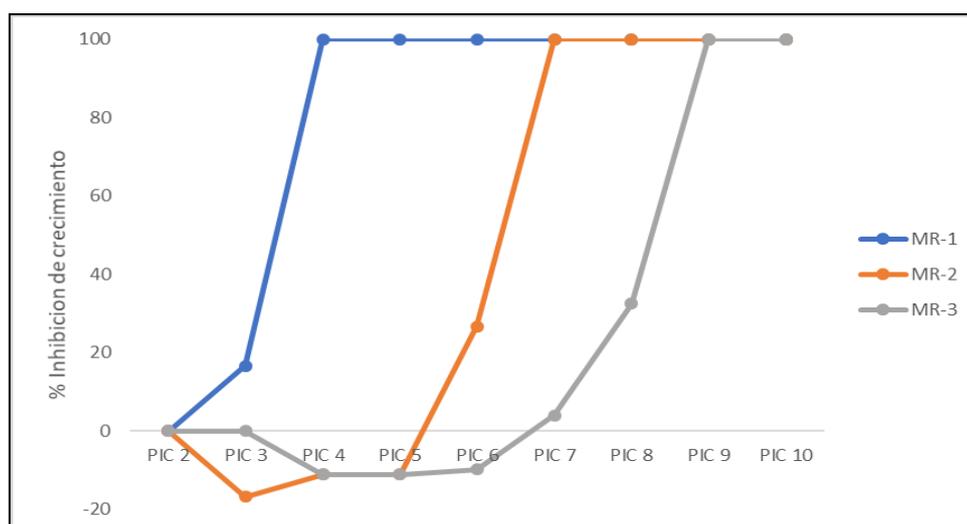


Figura 13. Grupos de cepas endófitas conformados de acuerdo con el PIC evaluados en cultivos duales contra *M. roreri* durante 10 días a 26°C.

Endófitos vs *M. perniciososa*

Se conformaron tres grupos homogéneos mediante el análisis de conglomerados: MP-1, MP-2 y MP-3 (Anexo 5). Se observó 100% de inhibición de crecimiento en algunos grupos a partir del día seis (PIC6) (Figura 14). Los aislados del grupo MP-3 presentaron mayor inhibición en el día seis (100%), mientras que los grupos restantes presentaron valores

negativos (Anexo 3). El grupo MP-1 se encuentra conformado por ocho UTOs, 15 en MP-2 y 15 en el grupo MP-3 (Anexo 6). La mayoría de las cepas endófitas del grupo MP-3 consideradas como las promisorias debido a su mayor PIC, coinciden con las cepas del grupo MR-1.

Tiempo de contacto

El menor tiempo de contacto fue el día cinco, correspondiente al grupo MP-3, mostrando diferencias significativas entre los demás grupos (Anexo 3).

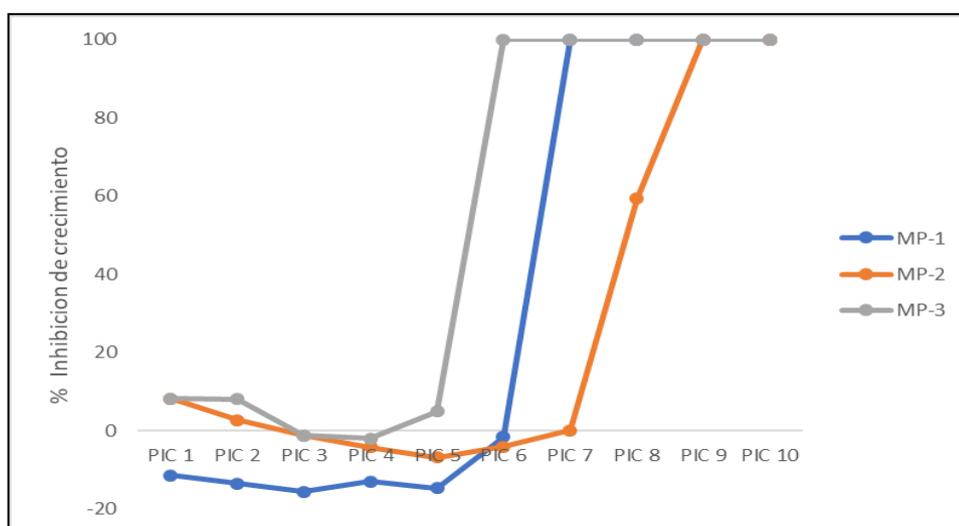


Figura 14. Dinámica de los Porcentajes de inhibición del crecimiento de los grupos de endófitos contra *M. perniciosa* en cultivos duales.

3.4 Actividad Antagonista

Del total de endófitos evaluados en el ensayo de cultivos duales, el 8% (10/126) y 14,3 % (18/126), mostraron antagonismo *in vitro* contra *M. roleri* y *M. perniciosa*, respectivamente (Tabla 1). El contacto de micelio, sin sobrecrecimiento fue el más común (Figura 15A), para *M. roleri*, se presentó el 73,0% (92/126) y para *M. perniciosa* 80% (101/126). La competencia por sustrato fue 8% (10/126) y 14,2 % (18/126) contra *M. roleri* y *M. perniciosa*, respectivamente (Figura 15B). El sobrecrecimiento de *M. roleri* sobre los endófitos fueron 18,2% (23/126), mientras que *M. perniciosa* solo ganó en dos interacciones 2% (2/126) (Figura 15C). Antibiosis se presentó 4% (5/126) contra *M. perniciosa* y un aislado 0,8% (1/126) para *M. roleri* (Figura 15D).

La antibiosis contra *M. perniciosa* observadas en cinco aislados pertenece a Ec057 (*Colletotrichum* spp.), Ec129 (*Nigrospora sphaerica*), Ec177 y Ec197 (*Pestalotiopsis microspora*). El aislado Ec059 (*Xylaria feejeensis*) presentó antibiosis para ambos patógenos.

Los mejores colonizadores de sustrato frente a *M. roreri* fueron especies de *Xylaria* (6 aislados), *Lasiodiplodia* (2 aislados), *Bionectria* (1 aislado) y el aislado no identificado y contra *M. perniciososa* especies de *Xylaria* (10 aislados), *Ceriporia* (3 aislados), *Bionectria*, *Pestalotiopsis*, *Hypoxylon* y *Nigrospora* (1 aislado cada uno), y un aislado N.I.

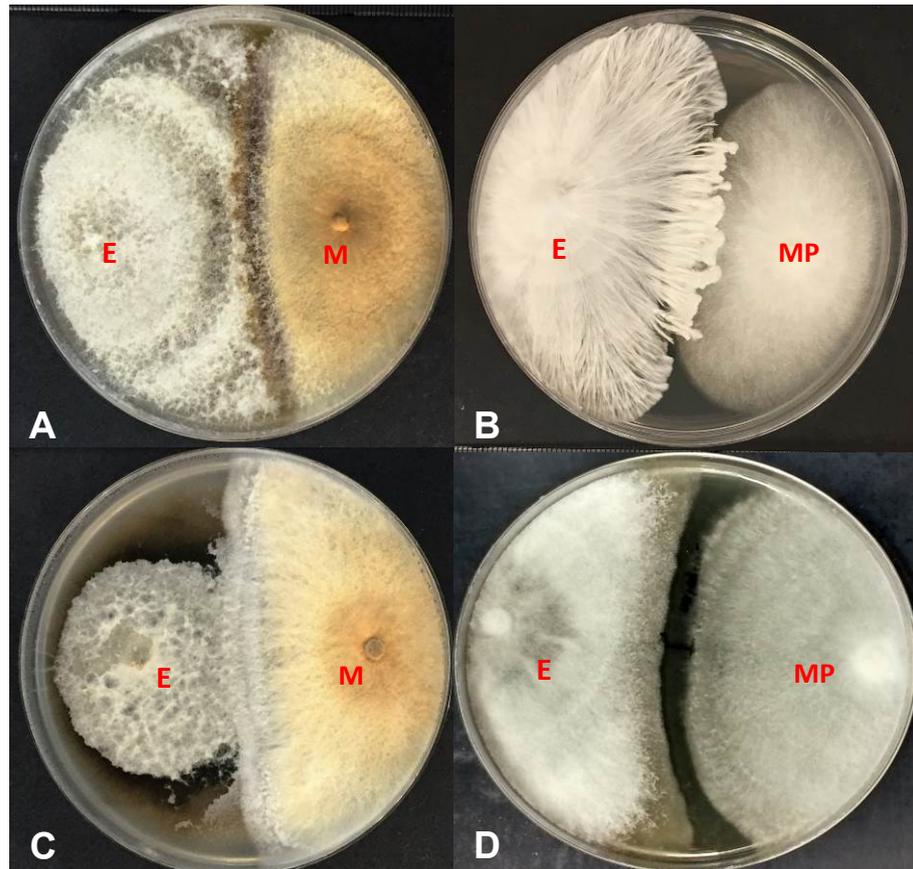


Figura 15. Tipos de interacción endófito-patógeno observadas en este estudio (PDA/10d/26±1°C/oscuridad). Las cepas mostradas son Ec076 (*Psathyrella* sp) (A), Ec046 (*Xylaria multiplex*) (B), Ec036 (*Phoma* sp.) (C), Ec059 (*X. feejeensis*) (D). Gana endófito (B), Pierde endófito (C), Neutral (A: Contacto sin sobrecrecimiento, D: Antibiosis).

Tabla 1. Resumen de la actividad antagonista de las interacciones de los 126 endófitos contra los patógenos *M. roleri* y *M. pernicioso*.

Actividad Antagonista	Resultado de la interacción <i>M. roleri</i>		
	Gana ^a	Pierde	Neutral ^b
Competencia	10	23	0
Antibiosis	0	0	1
Contacto de micelio, sin sobrecrecimiento	0	0	92
Total	10	23	93
	Resultado de la interacción <i>M. pernicioso</i>		
Competencia	18	2	0
Antibiosis	0	0	5
Contacto de micelio, sin sobrecrecimiento	0	0	101
Total	18	2	106

^a Endófitos ganan cuando sobrecrecen al patógeno y pierden cuando son sobrecrecidos por el patógeno.

^b La interacción es neutral cuando existe una zona de inhibición de 1 cm entre el margen de la colonia del endófito y el patógeno o cuando existe contacto entre micelios sin sobrecrecimiento.

3.5 Patogenicidad de cepas endófitas en hojas y frutos de cacao

En este ensayo un total de 30 cepas endófitas presentaron síntomas en hojas y/o frutos después de la inoculación. Las hojas presentaron clorosis de una magnitud aproximada de 0,4-1,5 cm, en los puntos de inoculación del endófito en comparación al control (Figura 16) conformando cuatro unidades taxonómicas diferentes. Los aislados Ec013 (*Phomopsis*) y Ec076 (*Psathyrella*) presentaron además síntomas de necrosis de 0,2-0,3 cm. En frutos, 26 aislados presentaron necrosis (1,0-3,7 cm), conformando 10 unidades taxonómicas diferentes (Figura 17).

Los géneros que mayormente se destacaron en presentar síntomas en hojas y frutos fueron *Colletotrichum* (11 aislados), *Fusarium* (5 aislados) y *Phomopsis* (3 aislados) (Anexo 7).

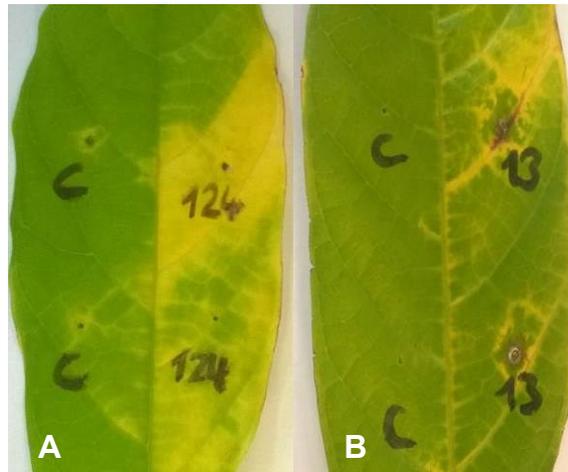


Figura 16. Síntomas en hojas de cacao: A) Inoculación de cepa Ec124 (*Nigrospora sphaerica*) mostrando clorosis y B) Inoculación de cepa Ec013 (*Phomopsis* sp.) con síntomas de clorosis y necrosis en los puntos de inoculación con respecto al control (lado izquierdo del limbo) a los 4 días de incubación a 26°C.

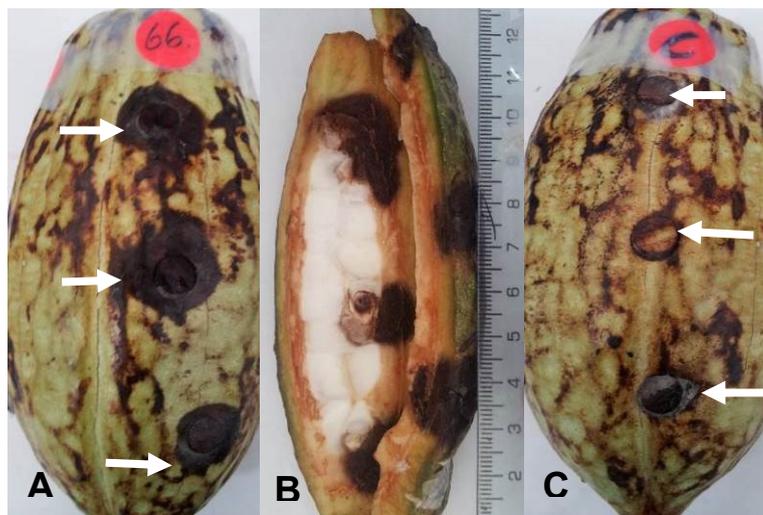


Figura 17. Síntomas provocados por la inoculación en frutos sueltos de cacao: Presencia de necrosis luego de la inoculación de la cepa Ec066 (*Colletotrichum* spp.) (A), parte interna del fruto con presencia de necrosis en los puntos de inoculación (B), fruto sin inoculo usado como control (C). A los 8 días de incubación a 26°C.

3.6 Cepas promisorias en el biocontrol de *M. roreri* y *M. pernicioso*

A partir de la identificación de los mejores grupos conformados por el análisis de conglomerados debido a que sus aislados presentaron los mayores valores del PIC en un tiempo corto, se identificaron 17 cepas endófitas promisorias, y que además no presentaron síntomas después de la inoculación en hojas y frutos. Las cepas Ec008, Ec027, Ec035, Ec059, Ec060, Ec067, Ec069, Ec071, Ec084, Ec098, Ec099, Ec107, Ec113, Ec120, Ec129, Ec151 y Ec157 mostraron ambas características deseadas (ver en anexo 8 detalles de las cepas). Las cepas Ec013, Ec081, Ec135, Ec139, Ec156 y Ec160 también presentaron buena inhibición contra los dos patógenos, sin embargo, luego de la inoculación presentaron síntomas.

PARTE 3: ANÁLISIS DE CEPAS PRE-SELECCIONADAS

3.7 Supervivencia de *M. roreri* y *M. pernicioso* después de interactuar con los endófitos preseleccionados (Micoparasitismo)

El porcentaje de recuperación a partir de la zona de interacción (Figura 18) permitió seleccionar 13 cepas (Ec027, Ec035, Ec067, Ec069, Ec071, Ec084, Ec098, Ec099, Ec107, Ec113, Ec120, Ec151 y Ec157) que inhibieron completamente a *M. roreri*. Las otras cepas inhibieron del 20-70%. Contra *M. pernicioso* fueron 10 las promisorias (Ec027, Ec035, Ec067, Ec084, Ec098, Ec107, Ec113, Ec120, Ec151, Ec157) y siete inhibieron del 20-85%.

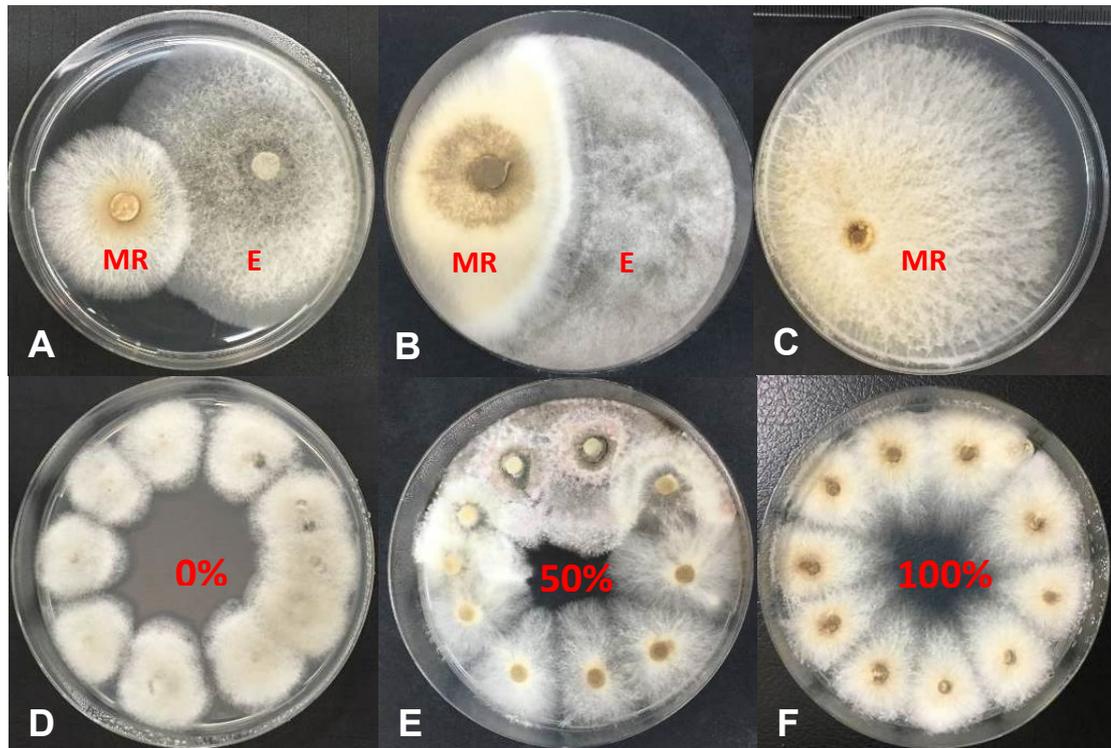


Figura 18. Supervivencia de *M. roreri* después de 13 días de la interacción con endófitos. Las placas D-F fueron inoculadas con discos cerca del punto de inóculo del patógeno de las colonias de A-C.

3.8 Evaluación de extractos fúngicos

El porcentaje de inhibición de crecimiento de *M. roreri* y *M. pernicioso* fueron significativamente diferentes entre los extractos de los endófitos promisorios (Anexo 9, 10).

Los metabolitos crudos de 11 de las 17 cepas lograron inhibir el crecimiento de *M. roreri* al 50% y 75% (v/v). La cepa Ec107 al 75% presentó la mayor inhibición con respecto a los demás antagonistas (Figura 19A, 20A).

De la misma manera se observa la inhibición de los metabolitos crudos contra *M. pernicioso* (7/17) al 50% y 75%. La cepa Ec035 al 75% presentó la mayor inhibición con respecto a los demás extractos (Figura 19B, 20C).

El extracto de Ec084 (*Daldinia eschscholtzii*) fue el menos efectivo para el control de ambos patógenos a las concentraciones empleadas, mostrando valores negativos del porcentaje de crecimiento, es decir que los metabolitos producidos por el hongo promovieron el crecimiento de ambos patógenos.

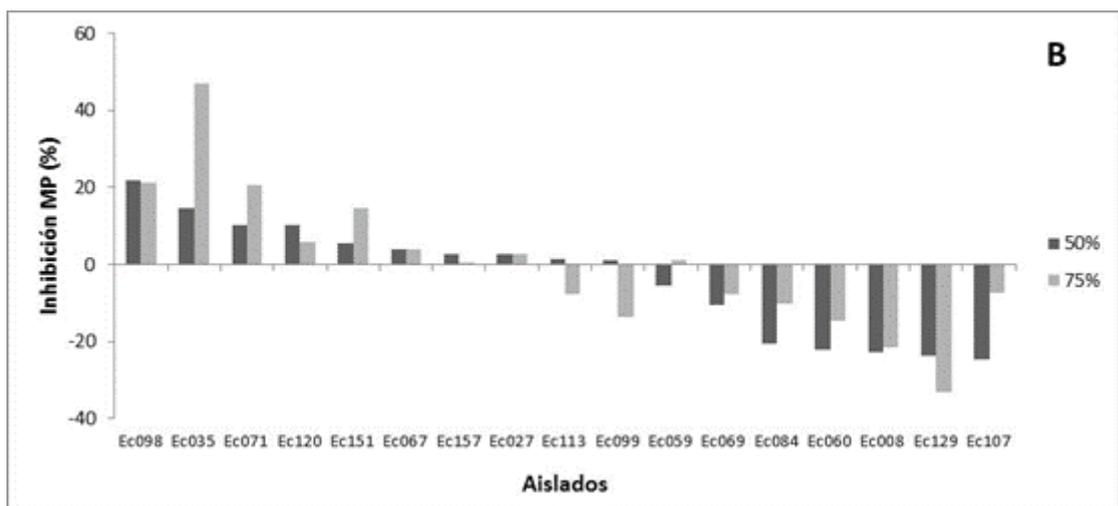
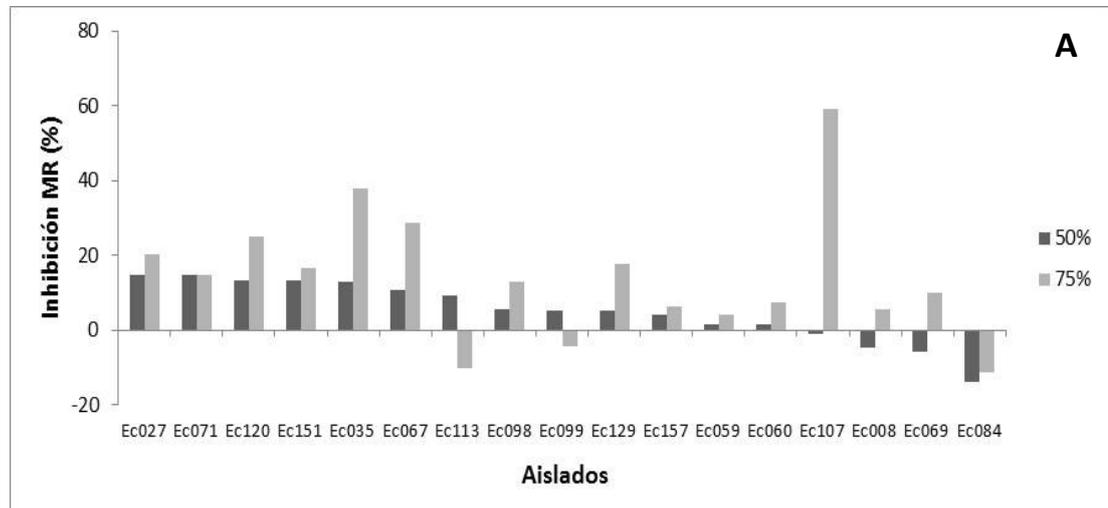


Figura 19. Inhibición del crecimiento de *M. royeri* (A) y *M. pernicioso* (B) en presencia de metabolitos de hongos endófitos de cacao.

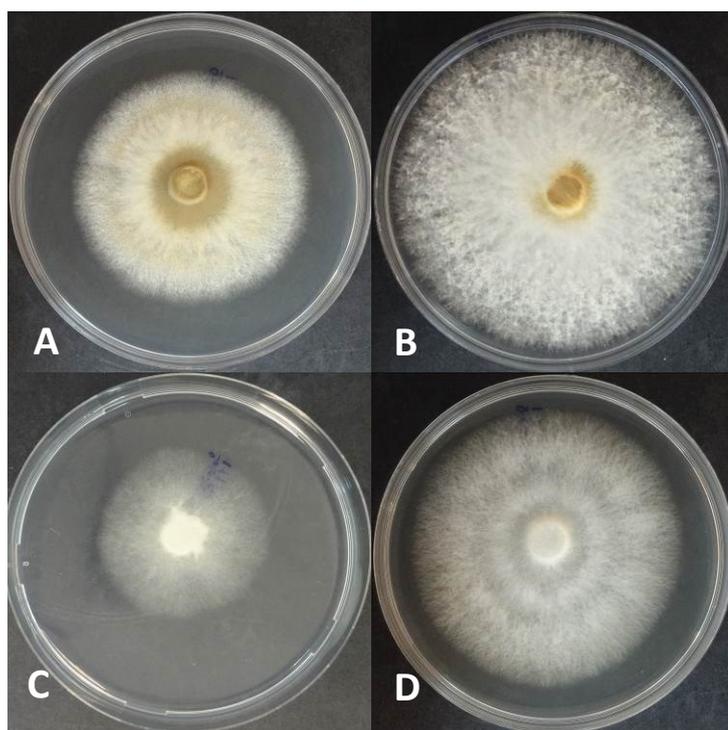


Figura 20. Crecimiento diferenciado de *M. roreri* en medio PDA envenenado con metabolitos crudos de Ec107 (*Colletotrichum* spp.) al 75% (A) y de *M. pernicioso* con metabolitos crudos de Ec035 (*L. theobromae*) (C) y del propio patógeno (controles B y D).

3.8 Colonización de hongos endófitos en hojas sanas de cacao (Capacidad endófito)

La mayor capacidad colonizadora mostraron las cepas Ec059, Ec098 y Ec151 (100%), seguidas de Ec157 (83%), Ec067 (56%), Ec120 (56%), Ec027 (44%) y Ec099 (33%). Las cepas restantes no pudieron ser recuperadas en las hojas de cacao (Anexo 11).

4. DISCUSION

4.1 Riqueza de especies y su relación con el hospedante

La diversidad de hongos endófitos en el cacao ha sido reportado como abundante según indican varios estudios (Arnold et al., 2003; Mejía et al., 2008). Un estudio realizado por Mejía et. al (Mejía et al., 2008) a partir de aislamientos de hojas de cacao encontró a los géneros *Colletotrichum*, *Xylaria* y *Phomopsis*, como los más abundantes. Estos hongos habitan mayormente en hojas y ramas. Además son comúnmente reportados como endófitos en otras especies vegetales (Arnold et al., 2003). En una misma planta pueden aislarse varias especies de endófitos, es decir que no existe

especificidad entre los hongos endófitos y un género hospedero en particular, tal como se encontró en el presente estudio (Arnold & Herre, 2003).

La riqueza de especies en nuestro estudio mostró que los principales endófitos asociados al cacao pertenecen a la división Ascomycetes. El género *Fusarium* fue el género más abundante. Es un género descrito como endófito y/o patógeno (Rubini et al., 2005). Otros géneros abundantes fueron *Colletotrichum*, que es considerado como patógeno del cacao, pero ha demostrado actividad de inhibición de *Moniliophthora* spp. por procesos de competencia (Mejía et al., 2008) y *Xylaria*, que son especies reportadas como endófitos en diferentes cultivos (Mejía et al., 2008). Existe también un estudio realizado por Tirado-Gallego (2016) (Tirado-Gallego, Lopera-Alvarez, & Ríos-Osorio, 2016) con hongos endófitos aislados a partir de hojas de cacao donde los géneros más comunes que se encontraron fueron *Colletotrichum*, *Botryosphaeria ribis*, *Xylaria* y *Phomopsis*.

Las cepas promisorias señaladas en el árbol filogenético, al guardar relación dentro de sus grupos monofiléticos, solo pocas son las que se evidencian con mayor capacidad de biocontrol para ambos patógenos, lo cual puede deberse a que estas cepas poseen posibles mutaciones y por esta razón se tornan con cierta ventaja de antagonismo sobre las demás de la misma especie.

En el análisis de filogenia el gen ITS utilizado no resuelve de manera confiable las relaciones dentro del complejo *C. gloeosporioides* (Crouch, Clarke, & Hillman, 2009), por lo tanto, el uso de los genes GAPDH y TEF son los más utilizados por su eficiencia para distinguir especies.

Los cuatro árboles filogenéticos mostraron que las cepas Ec115, Ec133 y Ec160 no lograron agruparse con ninguna de las anteriores formando un clado filogenético diferente apoyado con un soporte fuerte por lo cual probablemente sean especies novel, aunque se necesitan la incorporación de otros genes como los utilizados por Weir et. al (Weir et al., 2012) para inferir con mayor confianza.

En los análisis con los genes empleados, se conformaron diferentes grupos de relaciones genéticas entre ellas, estas diferencias pueden deberse a que *C. gloeosporioides* es un hongo con una amplia variabilidad, poca especificidad y tiene el rango más amplio de hospederos de todas las especies de *Colletotrichum* (Bustamante, 2006).

En los agrupamientos formados con los diferentes genes existen cepas endófitas de este estudio que proceden de diferentes lugares, lo cual destaca

la variación genética existente en *C. gloeosporioides*, es decir que este hongo tiene la capacidad de evolucionar y adaptarse a diferentes ambientes. Además, se reporta que *C. gloeosporioides* es recombinante y tiene un alto potencial de flujo de genes (Abang et al., 2004; Pinzón, 2014; Sanabria et al., 2010). En los diferentes árboles filogenéticos la cepa Ec146 muestra una incongruencia con los genes analizados, por lo que puede deberse a una posible recombinación genética. Sin embargo, el presente estudio es un trabajo previo por lo cual se requieren de análisis posteriores para un mayor soporte de los distintos linajes filogenéticos para confirmación de las especies.

En cuanto a las posibles especies identificadas con los diferentes genes según las relaciones filogenéticas mostradas, *C. theobromicola* se reporta como patógena, causando antracnosis en flores y frutos del cacao (Rojas et al., 2010), por lo cual mencionarla como endófito, según los datos obtenidos no puede recomendarse como un controlador biológico. De igual manera *C. fructicola* es reportada como biológica y geográficamente diversa, causando daños en *Theobroma* en Panamá (Weir et al., 2012) y como patógenos en otros cultivos, como banano y mango (Salazar et al., 2012; Sandoval-Sánchez et al., 2013).

4.2 Actividad antagonista contra *M. roleri* y *M. perniciosa*

La competencia por el sustrato y la actividad antagonista se han reportado como dos indicadores importantes en la selección de ACB (B. Bailey et al., 2006; Mejía et al., 2008), dado por su potencial predictivo de seleccionar cepas efectivas en el control de la enfermedad. Varias especies de los géneros promisorios identificados en nuestro estudio también lo han sido en otros reportes, entre ellos cabe citar los géneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Xylaria* y *Pestalotiopsis* (Arnold et al., 2003; Mejía et al., 2008; G. Rodríguez et al., 2011; Suárez & Rangel, 2013).

Al intentar encontrar un(os) candidato(s) a ACB(s) contra *Moniliophthora* spp., la competencia por el sustrato mostro diferentes PICs, donde los aislados del grupo MR-1 tuvieron un tiempo corto de inhibición, en cuatro días las colonias hicieron contacto. Los aislados de *L. theobromae*, dentro de MR-1 mostraron la mayor habilidad de competencia por el sustrato (mayores PICs) contra *M. roleri*, al tercer día completaron la totalidad de la caja en el ensayo. Entre mayor sea esta habilidad, implica una mayor agresividad del ACB y en consecuencia el patógeno no debe llegar a producir esporas y/o disminuir la formación de estructuras infectivas (Martínez, Infante, & Reyes, 2013). En el caso de la inhibición de *M. perniciosa*, los aislados

correspondientes del grupo MP-3 coinciden con las encontradas en el grupo MR-1 en los enfrentamientos contra el patógeno *M. royeri*, contribuyendo de manera eficiente a la inhibición de *M. royeri* y *M. perniciososa in vitro*.

L. theobromae es un hongo saprófito pero considerado como un patógeno latente, que se encuentra de forma endófito en tejidos sanos de las plantas, cuando el hospedero se encuentra en alguna circunstancia de estrés por factores bióticos o abióticos puede convertirse en patógeno (Rubini et al., 2005). Su velocidad de crecimiento en medio PDA (20,22 mm/día) contribuye a una rápida competencia por sustrato (Alama, Maldonado, & Rodríguez-Galvez, 2006) y de esta manera reduce el espacio disponible para el patógeno enfrentado, haciéndolo eficiente como agente de control biológico. Sin embargo, en condiciones *in vivo* la velocidad de crecimiento del endófito antagonista no necesariamente puede presentar una colonización efectiva en la planta debido a que en condiciones naturales se encuentran diferentes nichos.

Otra especie destacada en este estudio como posibles candidatos a ACB por su mayor PIC contra ambos patógenos fue *Colletotrichum* spp., reportado como un patógeno en el cultivo de cacao (Mejía et al., 2008).

Una vez que las colonias endófito-patógenas hicieron contacto se observó que las colonias podían responder de diferente manera (Tabla 1), debido a que los endófitos poseen diferentes mecanismos, tales como; micoparasitismo, competencia por nutrientes y espacio los cuales se expresan de acuerdo a las condiciones en que se desarrollan o se encuentran favorecidos (Harman et al., 2004).

Los endófitos al sobrecrecer a los patógenos pudieron inhibir y micoparasitar sus hifas, estos efectos sobre las estructuras de los patógenos pueden estar relacionados con la producción de enzimas que secretan los endófitos (Harman, 2006; Suárez & Rangel, 2013). A pesar de que Harman (2000) (Harman, 2000) sostiene que puede darse el caso de que un antagonista sea eficiente en el control de patógenos *in vitro*, mientras que en campo no tenga la misma eficiencia. Cabe recalcar además que nunca puede suceder que un agente ineficiente en laboratorio sea eficiente en campo.

La presencia de antibiosis es el resultado de la actividad antagonista del endófito al producir sustancias inhibitorias propias del endófito y de la susceptibilidad del patógeno para continuar su crecimiento (Sempere & Santamarina, 2008). El presente estudio indicó que cinco aislados mostraron efecto de antibiosis.

De acuerdo a los resultados de los ensayos de micoparasitismo y la producción de extractos fúngicos, la cepa Ec035 (*L. theobromae*), es la que posee el mayor potencial de biocontrol contra *Moniliophthora spp.* con respecto a las demás cepas promisorias. Lo más probable es que mató al patógeno por la producción de exoenzimas hidrolíticas (quitinasas, glucanasas, proteasas y celulasas) para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante y poder penetrar y micoparasitar al hospedero, lo cual causa deformaciones del micelio. Cepas de *L. theobromae* como Ec027, Ec035, Ec067, Ec098, Ec120, Ec151 y Ec157 micoparasitaron a ambos patógenos completamente (100%) y presentaron inhibición de crecimiento de los patógenos a las concentraciones evaluadas, por lo que pueden ser especies eficientes en el biocontrol de estos patógenos.

La concentración de extractos fúngicos utilizado fue determinante para conocer la actividad inhibitoria y control al patógeno, en el caso de la cepa Ec107 una mayor cantidad de metabolitos extracelulares producidos (75%) fue eficiente en el control de *M. roreri*, la cual puede ser considerada una candidata a biocontrol.

Las enzimas quitinolíticas y glucanolíticas, son consideradas que tienen el papel principal en el biocontrol a través de su acción sobre los constituyentes de la pared celular del patógeno. En *Colletotrichum spp.* se han encontrado metabolitos que degradan la pared celular de sus hospedantes como colletotricina A, B, C, taxol, ergosterol y pironas (Gangadevi & Muthumary, 2008). *L. theobromae* principalmente presenta metabolitos secundarios como ácido jasmónico y macrolactonas (Yang et al., 2000).

La mayoría de los aislados presentaron una interacción neutral, para *M. roreri* y *M. perniciosa*, es decir que los micelios endófitos crecieron sin causar alguna interacción favorecedora para los patógenos. Pueden estar involucrado diversos mecanismos, como la producción de compuestos inhibitorios al medio; antibiosis por producción de metabolitos volátiles y no volátiles (Howell, 2003), producción de enzimas extracelulares e inactivación de las mismas hacia el patógeno (Harman et al., 2004), por lo que no llegan a tener contacto físico.

4.3 Patogenicidad de cepas endófitas

En consideración al total de aislados inoculados (126 aislados) fueron pocas (30 aislados) las cepas que presentaron síntomas en las hojas y frutos sanos de cacao. Las cepas Ec013 (*Phomopsis sp.*) y Ec135 (*Nectria pseudotrichia*) a pesar de haber obtenido los mayores valores de PIC para ambos patógenos y presentar una interacción neutral en los cultivos duales,

presentaron síntomas en hojas y frutos bajo las condiciones evaluadas, las cuales no deben ser considerados como candidatos promisorios a biocontroladores.

Existieron cepas endófitas que no mostraron síntomas en hojas sino solo en frutos (ver anexo 7), es decir que los endófitos foliares pueden presentar daños en otras partes del hospedero. La presencia de síntomas tanto en hojas como en frutos presentados por las 30 cepas, puede referirse a que son especies que se encuentran en estado latente y que al utilizar hojas y frutos sueltos para evaluaciones *in vitro*, debido a que empieza la senescencia del hospedero, el hongo comienza a expresarse como patógeno (Sánchez-Fernández et al., 2013). En estudios realizados por Photita (2004) (Photita et al., 2004) encontró que al reinocular artificialmente endófitos de banano obtuvo como resultado síntomas de enfermedad.

4.4 Capacidad endófitas en hojas de cacao

Una característica de ACB es su elevada capacidad de colonización y reproducción en los tejidos internos después de la inoculación en las plantas, que genera beneficios a la hospedera de acuerdo a los diferentes mecanismos que posee, tales como: actividad antagonista, inducción de resistencia contra patógenos y promoción de crecimiento mediante la secreción de fitohormonas (Harman et al., 2004).

Especies del género *Lasiodiplodia* y *Xylaria* mostraron alta capacidad de colonizar las hojas, se destaca en que los endófitos que son más abundantes en hojas de cacao son los que presentan más alta colonización que los endófitos que se encuentran menos frecuentes, que tienen pobre capacidad de colonizar (A. E. Arnold et al., 2003) y a que cada endófito posee características propias de capacidad colonizadora.

Aunque la cepa Ec107 (*Colletotrichum* spp.) más eficiente contra *M. royeri* en sus metabolitos producidos, no presentó colonización en hojas, es importante destacar que en estudios realizados por Arnold (2003) (Arnold & Herre, 2003), fue la especie que mayormente se encontró en hojas maduras (15-30 días) de cacao después de la inoculación. De igual manera Mejía et. al (2008) (Mejía et al., 2008) reportó alta capacidad de colonización en hojas de plántulas de cacao en ensayos en invernadero y campo. La diferencia con este estudio puede sugerirse a que fue realizado en condiciones *in vitro* en hojas sueltas de cacao.

4.5 Selección de cepas promisorias a control biológico de *Moniliophthora spp.*

Las 17 cepas que fueron pre-seleccionadas fueron por su rápido crecimiento, la cual representan una ventaja en la competencia por espacio y nutrientes. Es importante mencionar que los diferentes tiempos de contacto que tuvieron en los enfrentamientos contra *M. roreri* y *M. perniciososa* puede deberse a que, por el lento crecimiento de *M. perniciososa*, se sembró siete días antes que los endófitos. Por lo tanto, el patógeno pudo estar mejor desarrollado en el medio de cultivo y los endófitos no influenciaron en el crecimiento del patógeno.

Las cepas que presentaron una estimulación a las cepas patógenas no fueron consideradas como candidatas promisorias. Rodríguez et. al (2011) (Rodríguez et al., 2011) en ensayos de capacidad antagónica de hongos endófitos contra *M. perniciososa* también presentaron estimulación de crecimiento en el patógeno, es decir que los valores de PIC fueron negativos. Una de las características más importantes de los hongos endófitos es que sintetizan compuestos particulares para el crecimiento de las plantas, los cuales también pudieron ser sustancias que promovieron el crecimiento de los hongos patógenos (Hayat et al., 2010). Otra característica de pre-selección de las 17 cepas promisorias fue la ausencia de síntomas en las hojas y frutos inoculados.

Luego de los respectivos ensayos, se pueden destacar las mejores cepas como posibles antagonistas que fueron las que presentaron antibiosis contra los patógenos y una alta capacidad de colonizar las hojas de cacao. Las cepas Ec035, Ec067, Ec098, Ec120, Ec151 correspondientes a *L. theobromae* y Ec107 pertenecientes a *Colletotrichum spp.* mostraron capacidad de control con sus metabolitos secundarios producidos y las cepas Ec067, Ec098, Ec120 y Ec151 presentaron diferentes porcentajes de colonización en las hojas de cacao.

La aplicación de un conjunto de hongos endófitos que reúnan diversos mecanismos de acción antagonista, tales como una alta velocidad de crecimiento combinado con algún grado de antibiosis, buena colonización y sobrevivencia en los tejidos de la planta, lo que le permita excluir al patógeno, mediante competencia por nutrientes, puede reducir los daños causados por *Moniliophthora spp.* y poseer diversos beneficios, como en el caso del estudio realizado por Arnold et al., (2003) (Arnold et al., 2003) al combinar seis especies endofíticas asociadas a la planta de cacao, redujo las lesiones ocasionadas por *Phytophthora spp.* En estudios realizados por Yuan

et al. (2009) (Yuan, Chen, & Yang, 2009), la aplicación de inóculos de endófitos con organismos del género *Xylaria* limita de manera efectiva daños causados por patógenos en *Theobroma cacao*.

Estos resultados permiten conocer que los hongos endófitos aislados de hojas sanas de cacao inhiben el crecimiento *in vitro* de las dos enfermedades más importantes en *T. cacao* (*M. roleri* y *M. pernicioso*) y que pueden ser utilizados como agentes biocontroladores.

5. CONCLUSIONES

1. Se evidenció la diversidad de hongos endófitos foliares presentes en plantas de cacao de las localidades muestreadas, muchos de ellos son reportados como patógenos.
2. Las cepas de *L. theobromae* fueron las más importantes, al presentar altos porcentajes de inhibición, micoparasitismo e inhibición por la producción de metabolitos secundarios. La cepa Ec035 es la más promisorio de este grupo. Ec107 (*Colletotrichum* spp.) fue efectiva contra *M. roleri* en la producción de sus metabolitos.
3. Las cepas endófitas que presentaron síntomas, se deban a que son saprofitas, pero también consideradas patógenos latentes, que pueden convertirse en patógenas cuando la planta se encuentra en un estado de estrés o sus tejidos empiezan el estado de descomposición.
4. La mayor capacidad de colonización presentaron las especies de *L. theobromae* y *Xylaria* sp., estas especies son más abundantes en cacao como endófitos, por lo que representa su capacidad de colonizar rápidamente en las hojas evaluadas.

6. RECOMENDACIONES

1. Con las cepas de *L. theobromae* en ensayos posteriores se pueden obtener compuestos bioactivos de utilidad para reducir las principales enfermedades causadas por *Moniliophthora* spp.
2. Es de importancia evaluar el micoparasitismo que presentan los hongos endófitos y los patógenos, para conocer diferentes tipos de interacciones de las hifas como enrollamiento o penetración.

3. Asimismo, se debe conocer como los metabolitos secundarios inhiben el crecimiento de los patógenos, ya que puede deberse a una inhibición del desarrollo de los conidios y el crecimiento de tubos germinativos de los hongos patógenos.
4. Se hace necesario comprobar la patogenicidad y endofitismo de los aislados endófitos seleccionados mediante ensayos en invernadero y campo.
5. Se hace necesario comprobar la eficiencia del biocontrol o control biológico en condiciones reales de campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abang, M. M., Winter, S., Mignouna, H. D., Green, K. R., & Asiedu, R. (2004). Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 486–496.
- Alama, I., Maldonado, E., & Rodríguez-Galvez, E. (2006). *Lasiodiplodia theobromae* affect the cultivation of Palto (*Persea americana*) under the conditions of Piura , Peru. *Universalía*, 11(2), 4–13.
- ANECACAO. (2016a). Balance 2016 de exportaciones de cacao ecuatoriano. Retrieved August 2, 2017, from <http://www.anecacao.com/uploads/magazine/revista-sabor-arriba-11-ava.pdf>
- ANECACAO. (2016b). Exportación Ecuatoriana De Cacao - 2015, 6p. Retrieved from <http://www.anecacao.com/index.php/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html>
- Arnold, A. E., & Herre, E. A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*, 95(3), 388–398.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Allen Herre, E. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100(26), 15649–15654.
- Arnold, E. (2005). Diversity and Ecology of Fungal Endophytes in Tropical Forests. *Current Trends in Mycological Research*, 49–68.
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., ... Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46(1), 24–35.
- Bailey, B., Bae, H., Strem, M., Roberts, D., Thomas, S., Crozier, J., ... Holmes, K. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *An International Journal of Plant Biology*, 246(224), 1449–1464.
- Bateman, R. P., Hidalgo, E., Garcia, 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 Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology*, 147(2), 129–138.
- Bravo, A., Ibarra, J. E., Cristina Del Rincón Castro, M., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., ... Soberón, M. (2006). Los microorganismos en el control de insectos y patógenos. *Revista, Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 113–120.
- Calvo-Araya, J., Rivera-Coto, G., Orozco Cayasso, S., & Orozco-Rodríguez,

- R. (2012). Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 225–231.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum* current status and future directions. *Studies in Micology*, 73, 181–213.
- CATIE. (2011). Control integrado de la moniliasis basado en variedades tolerantes. *Proyecto Cacao Centroamérica*.
- Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2380.
- Chowdhary, K., & Kaushik, N. (2015). Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum*, 550(37), 1–25.
- Condori, N., Leon, B., & Zapana, J. (2016). Antagonistic native fungi of *Vicia Faba* L. with biocontrol capacity to *Botrytis fabae* S. *Rev. Investig. Altoandin*, 18(3), 281–288.
- Crouch, J. A., Clarke, B. B., & Hillman, B. I. (2009). What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored gramminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia*, 101(5), 648–656.
- Di Rienzo, J. ., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. . (n.d.). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Evans, H. (1981). Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. *Phytopathological Papers*, (No. 24), 1–44.
- Evans, H. C., & Bastos, C. N. (1980). Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) in cocoa cultivars. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(3), 525–536.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Ahmed, A. S., & Emilia, M. (2004). pimiento (*Capsicum annum* L .) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*, 26:, 61–68.
- G.E.Harman. (2000). Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Biological Control*, (D), 377–393.
- Gangadevi, V., & Muthumary, J. (2008). Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* , a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant , *Justicia gendarussa*. *Mycologia Balcanica*, 5, 1–4.
- Gunatilaka, A. A. L. (2006). Natural Products from Plant-associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J Nat Prod.*, 69(3), 509–526.
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190–194.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56.

- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579–598.
- Hebbar, P. K. (2007). Cacao Diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide Cacao Diseases: A Global Perspective from an Industry Point of View. *Phytopathology*, 97(12), 1658–1663.
- Hernandez-Montiel, L., & Escalona-Aguilar, M. (2003). Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *Revista de Divulgación Científica Y Tecnológica de La Universidad Veracruzana*, 29–32.
- Hernández-Rodríguez, A., Ruíz-Beltrán, Y., Acebo-Guerrero, Y., Miguélez-Sierra, Y., & Heydrich-Pérez, M. (2014). Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L: Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 11–19.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *USDA/ARS Southern Plains Agricultural Research Center*, 87(1), 7.
- INIAP. Ficha Técnica. Retrieved August 2, 2017, from http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com_content&view=article&id=694:fichas-tecnicas&catid=93#
- Jaimes, Y., & Aranzazu, F. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao en Colombia. *Revista Corpoica*, 90.
- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., & Dhar, M. K. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 11(4), 487–505.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.
- Koranteng, S., & Awuah, R. T. (2011). Biological suppression of black pod lesion development on detached cocoa pods. *African Journal of Agricultural Research*, 6(1), 67–72.
- Krauss, U., Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., García, J., ... Holmes, K. A. (2010). Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biological Control*, 54(3), 230–240.
- Krauss, U., & Soberanis, W. (2001). Biocontrol of Cocoa Pod Diseases with Mycoparasite Mixtures. *Biological Control*, 22(2), 149–158.
- Krauss, U., & Soberanis, W. (2002). Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biological Control*, 24(1), 82–89.
- Krauss, U., ten Hoopen, M., Rees, R., Stirrup, T., Argyle, T., George, A., ...

- Casanoves, F. (2013). Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biological Control*, 67(3), 317–327.
- Lopes de Oliveira, M., & Matins, E. D. (2005). *Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil*. Ilhéus, Bahia: Centro de Pesquisas do Cacau. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC/ CEPEC/SEFIT).
- MAGAP. (2013). *Proyecto de Reactivación de Café y Cacao Nacional Fino de Aroma*. Retrieved from <http://www.agricultura.gob.ec/proyecto-de-reactivacion-de-cafe-y-cacao-nacional-fino-de-aroma-realizo-mesa-de-concertacion-de-cafes-especiales-del-ecuador/>
- MAGAP. (2015). Boletín Situacional - Cacao. Retrieved August 3, 2017, from <http://sinagap.agricultura.gob.ec>
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.*, 28(1), 1–11. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>
- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H., & Cruz, A. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev. Protección Veg*, 23(2), 118–125.
- Mayek Pérez, N. (2008). Evaluación no Destructiva de la Patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid . en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L .). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(1), 71–75.
- Meinhardt, L. W., Rincones, J., Bailey, B. A., Aime, M. C., Griffith, G. W., Zhang, D., & Pereira, G. A. G. (2008). *Moniliophthora perniciosa* , the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology*, 9(5), 577–588.
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Bael, S. Van, Arnold, A. E., Hebbar, P., ... Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>
- Montenegro, F. (2016). Escenario de producción y comercialización del cacao en Ecuador. In S. A. Campaña A, Hidalgo F (Ed.), *Cacao y campesinos: Experiencias de producción e investigación* (pp. 61–95). Quito.
- Newhouse, A., Spitzer, J., Maynard, C., & Powell, W. (2014). Chestnut Leaf Inoculation Assay as a Rapid Predictor of Blight Susceptibility. *Plant Disease*, 98(1), 4–9.
- O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J., & Vilgalys, R. (2005). Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5544–5550.
- Parra, D., Contreras, I., & Pineda, J. (2008). Escoba de Bruja del Cacao en

- Venezuela. *INIA Divulga*, 52–56.
- Parra, D., & Sánchez, L. (2005). El control de la moniliasis en el cacao. *INIA Divulga* 6, 23–26.
- Partida-Martínez, L. P., & Heil, M. (2011). The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact? *Frontiers in Plant Science*, 2, 1–16.
- Pérez, N. (2004). Manejo Ecológico de Plagas. In *Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural*. (1st ed., Vol. 1, pp. 127–284).
- Phillips-Mora, W. (2003). Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence.
- Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56(6), 911–922. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01646.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. *Plant Pathology*, 55(4), 584.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., Eric, H. C., & Hyde, K. D. (2004). Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity*, 16, 131–140.
- Pinzón, Y. (2014). Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica. Universidad Nacional de Colombia.
- Promputtha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D., & Jeewon, R. (2007). A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotrophs at Host Senescence. *Microbial Ecology*, 53(4), 579–590.
- Purdy, L., & Schmidt, R. (1996). Status of Cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 573–594.
- Robles, A. (2010). Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. *Centro de Biotecnología*, 1, 5.
- Rodríguez, E. (2006). Capacitación sobre uso de metodologías y protocolos para realizar investigaciones con fitopatógenos y potenciales antagonistas en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78.
- Rodríguez, G., Flores, E. ., Leon, B., & Arévalo, E. (2011). Caracterización morfológica de hongos endófitos asociados a cacao nativo y su capacidad antagonista para el control de *Moniliophthora perniciosa*.
- Rojas, E. I., Rehner, S. A., Samuels, G. J., Van Bael, S. A., Herre, E. A.,

- Cannon, P., ... Sha, T. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*, 102(6), 1318–1338.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542.
- Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W. V, Maki, C. S., Araújo, W. L., dos Santos, D. R., & Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1, 24–33.
- Ruiz, A., Parra, C. C., John, V., Salas, B., Malik, S. A., & Kunta, M. (2014). Caracterización Molecular y de Ensayos de Patogenicidad de *Colletotrichum acutatum* , Agente Causal de la Antracnosis del Limón en Texas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32, 52–61.
- Salazar, E., Hernández, R., Tapia, A., & Gómez-Alpízar, L. (2012). Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp.) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agron. Costarricense*, 36(1), 53–68.
- Salgado, C., & Caridad, M. (2005). Aislamiento de hongos endófitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. *Rev Iberoam Micol*, 22, 99–101.
- Samuels, G. J., Pardo-Schultheiss, R., Hebbar, K. P., Lumsden, R. D., Bastos, C. N., Costa, J. C., & Bezerra, J. L. (2000). *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research*, 104(6), 760–764.
- Sanabria, A., Mahuku, G., Kelemu, S., Cadavid, M., García, C., Hío, J. C., ... Osorio, J. A. (2010). Molecular identification and characterization of *Colletotrichum* sp . isolates from Tahiti lime , tamarillo , and mango. *Agronomía Colombiana*, 28(3), 391–399.
- Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, Y., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M., & Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132–146.
- Sánchez-Mora, F., & Garcés-Fiallos, F. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al . en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 3, 249–258.
- Sánchez F., 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 de La Facultad de*

- Agronomía*, 20(2), 188–194.
- Sandoval-Sánchez, M., Nieto-ángel, D., Sandoval-islas, J. S., Téliz-ortiz, D., Orozco-Santos, M., & Silva-Rojas, H. (2013). Hongos asociados a pudrición del pedunculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia*, 47, 61–73.
- Sempere, F., & Santamarina, M. P. (2008). Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berck & Broowe) Petch. by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalium* Curve & Thom. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), 35–43.
- Serrano, L., & Galindo, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario (p. 13).
- Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 21–43.
- Suárez, L. (2006). Aislamiento e Identificación De *Moniliophthora roreri* Causante De La Moniliasis En Municipios Del Nororiente Colombiano Y Ensayos Preliminares Para Su Control Biológico. *Respuestas*, 11(2), 3–8.
- Suárez, L., & Cabrales, C. (2008). Identificación de las especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *M. roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Respuestas*, 13(1), 45–56.
- Suárez, L., & Rangel, A. L. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronomica*, 62(4), 370–378.
- Tahi, G. M., Kébé, B. I., Sangare, A., Cilas, C., & Eskes, A. B. (2007). Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: The effect of light intensity and time of day of leaf collection. *Plant Pathology*, 56(2), 219–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01547.x>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Tchameni, S. N., Ngonkeu, M. E. L., Begoude, B. A. D., Wakam Nana, L., Fokom, R., Owona, A. D., ... Kuaté, J. (2011). Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. *Crop Protection*, 30(10), 1321–1327.
- 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. *Revista Corpoica - Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 417–430.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Micology*, 73, 115–180.

- Whipps, J. M., & Lumsden. (2001). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. (T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan, Eds.). Wallingford: CABI.
- Yang, Q., Asai, M., Matsuura, H., & Yoshihara, T. (2000). Potato micro-tuber inducing hydroxylasiodiplodins from *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry*, 54(5), 489–494.
- Yuan, Z., Chen, Y., & Yang, Y. (2009). Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic , medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization, 295–303.

ANEXOS

Anexo 1.

1.1. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilks (modificado) del PIC de cultivos duales frente a *Moniliophthora roreri*.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p
PIC2	126	2,95	50,81	0,89	<0,0001
PIC3	126	-5,55	37,90	0,95	<0,0001
PIC4	126	1,94	46,14	0,86	<0,0001
PIC5	126	16,99	50,97	0,81	<0,0001
PIC6	126	39,84	52,74	0,77	<0,0001
PIC7	126	63,27	46,54	0,68	<0,0001
PIC8	126	81,36	36,58	0,53	<0,0001
PIC9	126	90,68	27,9	0,36	<0,0001
PIC10	126	95,23	20,1	0,25	<0,0001
T.contacto	126	5,99	1,93	0,93	<0,0001

1.2. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilks (modificado) del PIC de cultivos duales frente a *Moniliophthora perniciosa*.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p
PIC1	126	0,49	12,15	0,82	<0,0001
PIC2	126	-0,15	10,35	0,92	<0,0001
PIC3	126	-3,84	9,82	0,95	<0,0001
PIC4	126	2,57	30,27	0,6	<0,0001

PIC5	126	12,62	42,4	0,64	<0,0001
PIC6	126	51,23	51,67	0,67	<0,0001
PIC7	126	68,03	47,26	0,6	<0,0001
PIC8	126	80,98	39,53	0,49	<0,0001
PIC9	126	94,2	22,45	0,27	<0,0001
PIC10	126	96,49	17,36	0,21	<0,0001
T. contacto	126	5,83	1,76	0,91	<0,0001

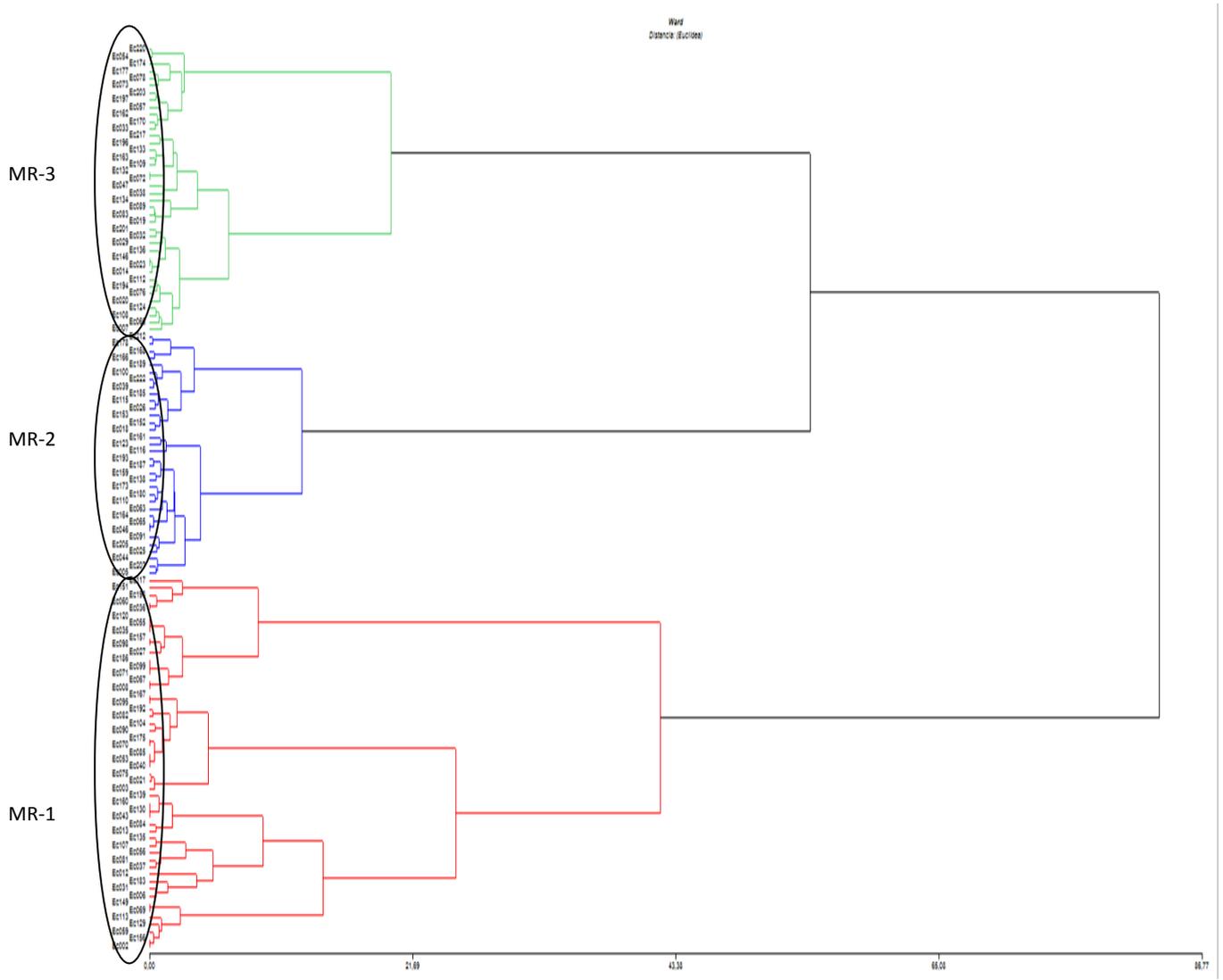
1.3. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilks (modificado) del PIC de los extractos fúngicos evaluados contra *M. royeri*.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p
%Inhibición	306	11,96	18,21	0,94	<0,0001

1.4. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilks (modificado) del PIC de los extractos fúngicos evaluados contra *M. pernicioso*

Variable	n	Media	D.E.	W*	p
%Inhibición	306	-1,64	20,96	0,97	<0,0001

Anexo 2. Dendograma obtenido del análisis de conglomerados de las evaluaciones de los cultivos duales contra *M. royeri*.



Anexo 3. Comparación de las medias de los PIC y del tiempo de contacto de las colonias de cultivos duales frente a *Moniliophthora roreri* (Grupos MR) y *Moniliophthora perniciosa* (Grupos MP) mediante la prueba de Kruskal Wallis.

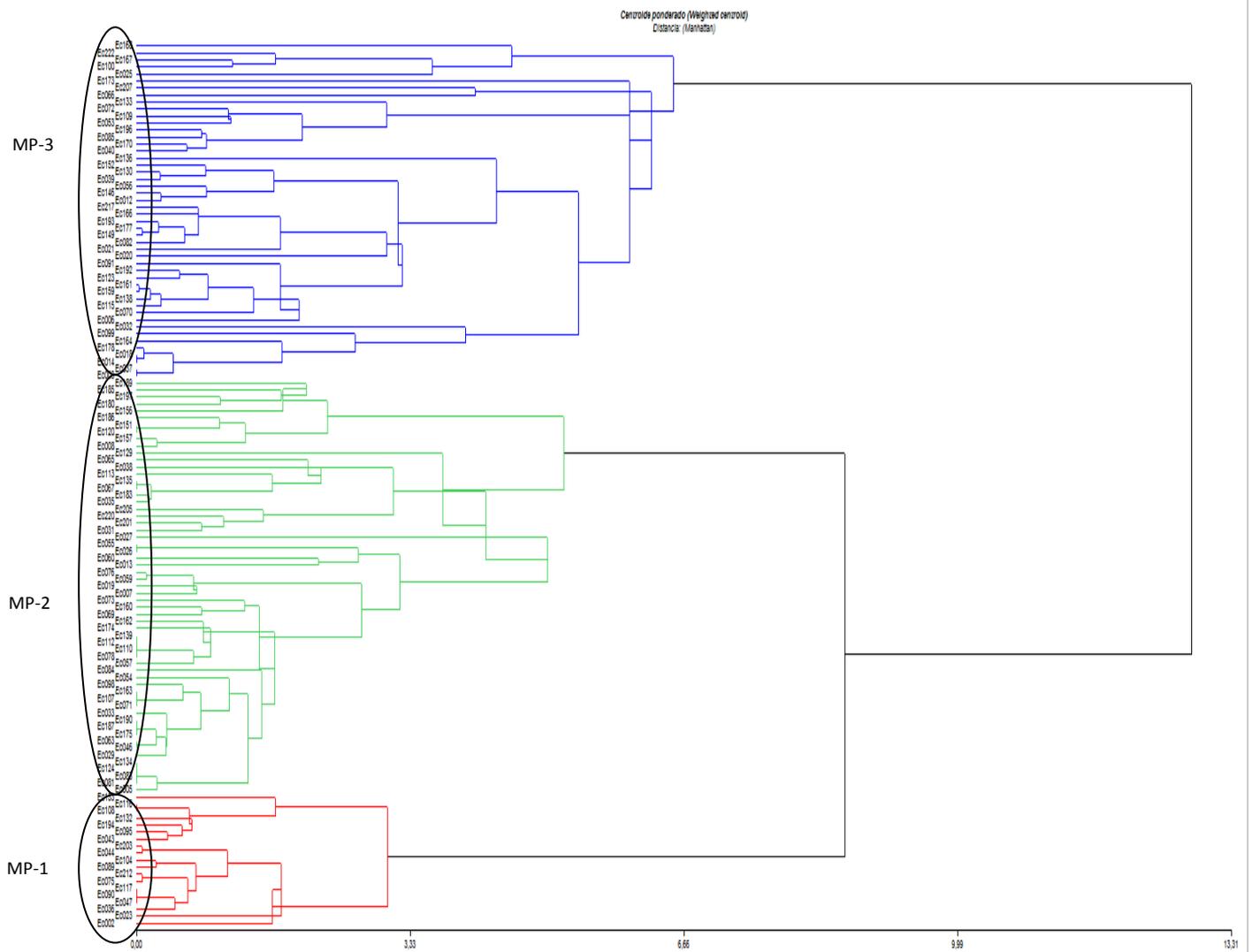
Grupo	n	Porcentaje de Inhibición de Crecimiento (%)									Tiempo contacto (días)
		PIC 2	PIC 3	PIC 4	PIC 5	PIC 6	PIC 7	PIC 8	PIC 9	PIC 10	
MR-1	52	0 ^a	16,7 ^a	100,0 ^b	100,0 ^b	100,0 ^c	100,0 ^b	100,0 ^b	100,0 ^a	100,0 ^a	3 ^a
MR-2	34	0 ^a	-16,7 ^b	-11,1 ^a	-11,1 ^a	26,8 ^b	100,0 ^b	100,0 ^b	100,0 ^a	100,0 ^a	6 ^b
MR-3	40	0 ^a	0 ^a	-11,1 ^a	-11,1 ^a	-9,8 ^a	4,1 ^a	32,6 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	8 ^c

Grupo	n	Porcentaje de Inhibición de Crecimiento (PIC)										Tiempo contacto (días)
		PIC 1	PIC 2	PIC 3	PIC 4	PIC 5	PIC 6	PIC 7	PIC 8	PIC 9	PIC 10	
MP-1	19	-11,48 ^a	-13,5 ^a	-15,6 ^a	-13,0 ^a	-14,8 ^a	-1,6 ^a	100,0 ^b	100,0 ^b	100,0 ^a	100,0 ^a	6 ^b
MP-2	48	8,2 ^b	2,7 ^b	-1,2 ^b	-4,3 ^b	-6,9 ^b	-4,2 ^a	0,0 ^a	59,4 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	7 ^c
MP-3	59	8,2 ^b	8,1 ^b	-1,2 ^b	-2,1 ^b	4,9 ^c	100,0 ^b	100,0 ^b	100,0 ^b	100,0 ^a	100,0 ^a	5 ^a

Anexo 4. Géneros de los aislados ubicados según grupos conformados por los PIC entre los 1-10 días contra *M. royeri* obtenido del análisis de conglomerados.

Grupo MR-1	Grupo MR-2	Grupo MR-3
<i>Colletotrichum</i> (10 aislados)	<i>Fusarium</i> (12)	<i>Colletotrichum</i> (8)
<i>Lasiodiplodia</i> (8)	<i>Xylaria</i> (8)	<i>Fusarium</i> (6)
<i>Fusarium</i> (5)	<i>Pestalotiopsis</i> (3)	<i>Pestalotiopsis</i> (5)
<i>Xylaria</i> (4)	<i>Colletotrichum</i> (3)	<i>Xylaria</i> (4)
<i>Nigrospora</i> (4)	<i>N.I.</i> (2)	<i>Phomopsis</i> (5)
<i>Pestalotiopsis</i> (3)	<i>Didymosphaeria</i> (1)	<i>Nigrospora</i> (4)
<i>Nectria</i> (3)	<i>Phomopsis</i> (1)	<i>Nectria</i> (2)
<i>Ceriporia</i> (3)	<i>Eutypa</i> (1)	<i>Hypoxyton</i> (2)
<i>Phomopsis</i> (2)	<i>Rigidoporus</i> (1)	<i>Endomelanconiopsis</i> (1)
<i>Bionectria</i> (1)	<i>Lasiodiplodia</i> (1)	<i>Psathyrella</i> (1)
<i>Phanerochaete</i> (1)	<i>Nigrospora</i> (1)	<i>Pseudolagarobasidium</i> (1)
<i>Corynespora</i> (1)		<i>Corynespora</i> (1)
<i>Phoma</i> (1)		
<i>Corioloopsis</i> (1)		
<i>Trichotecium</i> (1)		
<i>Daldinia</i> (1)		
<i>Hypoxyton</i> (1)		
<i>Curvularia</i> (1)		
<i>N.I.</i> (1)		

Anexo 5. Dendograma obtenido del análisis de conglomerados de los PICs de los enfrentamientos endófitos-*M. perniciososa*. Correlación cofenética de 0,54.



Anexo 6. Grupos conformados del PIC contra *M. pernicioso* obtenido del análisis de conglomerados.

Grupo MP-1	Grupo MP-2	Grupo MP-3
<i>Fusarium</i> (6)	<i>Fusarium</i> (12)	<i>Lasiodiplodia</i> (9)
<i>Xylaria</i> (5)	<i>Colletotrichum</i> (11)	<i>Colletotrichum</i> (8)
<i>Nigrospora</i> (2)	<i>Xylaria</i> (6)	<i>Pestalotiopsis</i> (8)
<i>Colletotrichum</i> (2)	<i>Phomopsis</i> (4)	<i>Xylaria</i> (5)
<i>Phoma</i> (1)	<i>Nigrospora</i> (3)	<i>Fusarium</i> (5)
<i>Phomopsis</i> (1)	<i>Pestalotiopsis</i> (3)	<i>Nigrospora</i> (4)
<i>Curvularia</i> (1)	<i>Bionectria</i> (1)	<i>Nectria</i> (4)
<i>Corynespora</i> (1)	<i>Corynespora</i> (1)	<i>Hypoxyton</i> (3)
	<i>Nectria</i> (1)	<i>Ceriporia</i> (3)
	<i>Trichotecium</i> (1)	<i>Phomopsis</i> (3)
	<i>Endomelanconiopsis</i> (1)	<i>N.I.</i> (2)
	<i>Didymosphaeria</i> (1)	<i>Psathyrella</i> (1)
	<i>Eutypa</i> (1)	<i>Pseudolagarobasidium</i> (1)
	<i>Rigidoporus</i> (1)	<i>Daldinia</i> (1)
	<i>N.I.</i> (1)	<i>Phanerochaete</i> (1)
		<i>Corioliopsis</i> (1)

Anexo 7. Aislados endófitos que indujeron síntomas en hojas y/o frutos sueltos de cacao después de la inoculación.

Aislados	Especies	Síntomas	
		Hojas	Frutos
Ec013	<i>Phomopsis sp</i>	x	x
Ec014	<i>Phomopsis sp</i>		x
Ec026	<i>Fusarium equiseti</i>		x
Ec036	<i>Phoma sp</i>		x
Ec037	<i>Colletotrichum spp..</i>		x
Ec038	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	x	
Ec039	<i>Xylaria venosula</i>		x
Ec065	<i>Colletotrichum spp.</i>		x
Ec066	<i>Colletotrichum spp.</i>		x
Ec075	<i>Colletotrichum spp.</i>		x
Ec076	<i>Psathyrella sp</i>	x	x
Ec081	<i>Colletotrichum spp..</i>		x
Ec090	<i>Fusarium solani</i>		x
Ec091	<i>Didymosphaeria futilis</i>		x
Ec095	<i>Fusarium decemcellulare</i>		x
Ec108	<i>Colletotrichum spp.</i>		x
Ec109	<i>Colletotrichum spp.</i>		x
Ec110	<i>N.I</i>	x	
Ec116	<i>Phomopsis sp</i>	x	
Ec124	<i>Nigrospora sphaerica</i>	x	
Ec133	<i>Colletotrichum spp.</i>		x
Ec135	<i>Nectria pseudotrachia</i>		x
Ec139	<i>Nectria pseudotrachia</i>		x
Ec146	<i>Colletotrichum spp.</i>		x
Ec156	<i>Ceriporia lacerata</i>		x
Ec160	<i>Colletotrichum spp.</i>		x
Ec163	<i>Colletotrichum spp.</i>		x
Ec168	<i>Fusarium decemcellulare</i>		x
Ec196	<i>Fusarium decemcellulare</i>		x
Ec205	<i>Pestalotiopsis microspora</i>		x
	Total	6	26

Anexo 8. Cepas pre-seleccionadas de acuerdo a su mayor PIC presentado para ambos patógenos evaluados y ausencia de síntomas en las hojas y frutos después de la inoculación.

Aislado	Especie	Actividad Antagonista	
		MR	MP
Ec008	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec027	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec035	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec059	<i>Xylaria feejeensis</i>	Neutral ^b	Neutral ^b
Ec060	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec067	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec069	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Neutral	Neutral ^a
Ec071	<i>Colletotrichum</i> spp.	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec084	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec098	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec099	<i>Xylaria</i> sp	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec107	<i>Colletotrichum</i> spp.	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec113	<i>Hypoxylon investiens</i>	Neutral ^a	Gana
Ec120	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec129	<i>Nigrospora sphaerica</i>	Neutral	Neutral ^b
Ec151	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Neutral ^a	Neutral ^a
Ec157	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Gana	Neutral ^a

^a Contacto de micelio, sin sobrecrecimiento.

^b Antibiosis

Anexo 9. Comparación de medias de los PICs de los extractos fúngicos evaluados contra *M. royeri*.

Tratamientos	Concentración (%)	Medias	
Ec084	50	-13,87	A
Ec008	50	-4,61	A B
Ec069	50	-5,61	A B
Ec107	50	-0,97	A B C
Ec059	50	1,66	A B C D
Ec084	75	1,46	A B C D
Ec113	75	2,36	A B C D E
Ec060	50	1,64	A B C D E F
Ec157	50	4,08	B C D E F G
Ec099	50	5,29	B C D E F G
Ec059	75	4,27	B C D E F G H
Ec098	50	5,61	B C D E F G H I
Ec129	50	5,29	B C D E F G H I
Ec035	50	12,86	B C D E F G H I
Ec099	75	7,6	B C D E F G H I J
Ec113	50	9,24	C D E F G H I J K
Ec098	75	12,89	C D E F G H I J K
Ec067	50	10,58	C D E F G H I J K
Ec151	50	13,21	D E F G H I J K L
Ec120	50	13,21	D E F G H I J K L
Ec071	50	14,86	D E F G H I J K L
Ec071	75	14,83	E F G H I J K L
Ec008	75	15,62	F G H I J K L
Ec027	50	14,88	G H I J K L
Ec069	75	20,16	G H I J K L
Ec151	75	16,52	G H I J K L
Ec157	75	16,98	H I J K L
Ec129	75	17,83	H I J K L
Ec060	75	17,84	I J K L
Ec120	75	25,08	J K L
Ec027	75	20,46	K L M
Ec067	75	28,71	L M
Ec035	75	37,76	L M
Ec107	75	59,07	M

Anexo 10. Comparación de las medias de los PIC de los extractos fúngicos endófitos contra *M. pernicioso*. Prueba Kruskal wallis ($P < 0.05$).

Tratamientos	Concentración (%)	Medias	
Ec129	75	-33,33	A
Ec107	50	-24,76	A
Ec129	50	-23,76	A B
Ec084	50	-20,72	A B C
Ec008	75	-21,59	A B C
Ec008	50	-22,71	A B C
Ec060	50	-22,22	A B C D
Ec060	75	-14,65	A B C D E
Ec069	50	-10,61	A B C D E F
Ec099	75	-13,63	A B C D E F
Ec084	75	-10,1	A B C D E F G
Ec069	75	-7,58	B C D E F G
Ec113	75	-7,58	B C D E F G
Ec107	75	-7,57	B C D E F G H
Ec059	50	-5,54	C D E F G H I
Ec099	50	1,02	D E F G H I J
Ec113	50	1,49	E F G H I J K
Ec157	75	0,51	E F G H I J K
Ec157	50	2,53	F G H I J K L
Ec059	75	1,01	F G H I J K L
Ec027	75	2,53	F G H I J K L
Ec027	50	2,52	F G H I J K L M
Ec067	50	4,02	G H I J K L M
Ec067	75	4,04	G H I J K L M
Ec151	50	5,31	G H I J K L M
Ec120	75	5,81	G H I J K L M
Ec120	50	10,09	H I J K L M N
Ec071	50	10,11	I J K L M N
Ec035	50	14,5	J K L M N
Ec151	75	14,65	K L M N
Ec098	50	21,72	L M N
Ec098	75	21,21	M N
Ec071	75	20,71	M N
Ec035	75	46,97	N

Anexo 11. Porcentaje de colonización del re-aislamiento de las cepas inoculadas en hojas sanas de cacao a 26°C/oscuridad, 100% de humedad relativa después de siete días, con respecto al control.

