



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA AGRONOMÍA**

**“CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS FÚNGICOS  
ASOCIADOS A FRUTOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN  
TRES LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DE ORELLANA”**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTORA:**

**DAYSE MARITZA QUITIO LLAGSHA**

**Riobamba – Ecuador**

**2022**



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA AGRONOMÍA**

**“CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS FÚNGICOS  
ASOCIADOS A FRUTOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN  
TRES LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DE ORELLANA”**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTORA:** DAYSE MARITZA QUITIO LLAGSHA

**DIRECTOR:** Ing. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO Ph.D

**Riobamba – Ecuador**

**2022**

© 2022, Dayse Maritza Quitio Llagsha

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, DAYSE MARITZA QUITIO LLAGSHA, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 08 de diciembre de 2022



---

**Dayse Maritza Quitio Llagsha**

**070694305-7**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA AGRONOMÍA**

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, **CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS FÚNGICOS ASOCIADOS A FRUTOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN TRES LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DE ORELLANA**, realizado por la señorita: **DAYSE MARITZA QUITIO LLAGSHA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing, Víctor Alberto Lindao Cordova Ph. D. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2022-12-08
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero Ph. D. <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2022-12-08
Ing. Fernando José Rivas Figueroa Ph. D. <b>ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2022-12-08

## DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico de manera muy especial a mis queridos padres: **Marcelo Quitio** y **Sara Llagsha**, a mi hermanita **Katherine Quitio**, a mi hermanito **Cristhian Quitio** y a mi pequeño **Santy**, quienes son la razón de mi vida, los cuales me han apoyado siempre y no han dejado de confiar en mí. Su cariño siempre ha sido mi razón de seguir adelante y sin ellos no hubiese sido posible realizar este trabajo, sus sonrisas siempre me han animado y han dado razones para nunca rendirme.

De igual forma no puedo dejar de mencionar a mis abuelitos, mis tíos, mis tías, y queridos primos, a los cuales quiero y siempre llevo presente.

*Dayse*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco de manera especial al **Ing. Pablo Álvarez** por darme la oportunidad de realizar este trabajo integración curricular y por guiarme durante la realización del mismo.

De igual manera al **Ing. Fernando Rivas**, por su disposición para ayudarme en la resolución de cualquier duda que se presentó durante la realización de este trabajo.

A la par agradezco de manera muy especial al **Ing. Álvaro Rivera**, al **Ing. Hamilton Intriago** y al **Ing. Juan Guerra** por apoyarme y guiarme desde el primer día hasta la culminación de este trabajo.

De manera muy especial agradezco a todos mis compañeros del laboratorio que con sus consejos y ocurrencias me ayudaron siempre, especialmente a **Daniela, F** y **Yalic, Y**.

Y no puedo dejar de agradecer a la persona que siempre ha estado ahí para mí, que me apoyo y se quedó a mi lado a pesar de las dificultades que se presentaron durante todo este tiempo, mi querido **Walter, P** gracias por ser aparecer en mi vida y ser parte ella.

*Dayse*

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	x
INDICE DE ABREVIATURAS.....	xiii
INDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1

### CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Planteamiento del Problema.....	3
1.2. Limitaciones y delimitaciones.....	3
1.3. Problema general.....	3
1.4. Problemas específicos.....	3
1.5. Objetivos.....	4
1.5.1. <i>Objetivo general</i> .....	4
1.5.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	4
1.6. Justificación.....	4
1.6.1. <i>Justificación teórica</i> .....	4
1.6.2. <i>Justificación metodológica</i> .....	4
1.6.3. <i>Justificación práctica</i> .....	4
1.7. Hipótesis.....	5
1.7.1. <i>Nula</i> .....	5
1.7.2. <i>Alterna</i> .....	5

### CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Antecedentes de investigación.....	6
2.2. Referencias Teóricas.....	7
2.2.1. <i>Métodos de caracterización de microorganismos fúngicos</i> .....	7

2.2.1.1.	<b>Métodos morfológicos</b> .....	7
2.2.1.2.	<i>Métodos moleculares</i> .....	8
2.2.3.	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>)</b> .....	9
2.2.3.1.	<i>Origen</i> .....	9
2.2.3.2.	<i>Historia</i> .....	10
2.2.3.3.	<i>Taxonomía del cacao</i> .....	11
2.2.3.4.	<i>Descripción morfológica</i> .....	12
2.2.3.5.	<i>Importancia del cacao en el Ecuador</i> .....	13
2.2.3.6.	<i>Variedades de cacao en el Ecuador</i> .....	13
2.2.3.7.	<i>Enfermedades del cacao</i> .....	14

### CAPÍTULO III

3.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	16
3.1.	<b>Enfoque de investigación</b> .....	16
3.2.	<b>Nivel de investigación</b> .....	16
3.3.	<b>Diseño de investigación</b> .....	16
3.3.1.	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i> .....	16
3.3.2.	<i>Según las intervenciones en el trabajo de campo</i> .....	16
3.4.	<b>Tipo de estudio</b> .....	16
3.5.	<b>Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra</b> .....	17
3.6.	<b>Métodos, técnicas e instrumentos de investigación</b> .....	17
3.6.3.	<b>Características del lugar</b> .....	17
3.6.3.1.	<i>Localidades en campo</i> .....	17
3.6.3.2.	<i>Ubicación geográfica del área de estudio</i> .....	17
3.6.3.3.	<i>Condiciones climáticas</i> .....	18
3.6.3.4.	<i>Localización del laboratorio</i> .....	18
3.6.4.	<b>Materiales y equipos</b> .....	18
3.6.4.1.	<i>De campo</i> .....	18
3.6.4.2.	<i>De escritorio</i> .....	18
3.6.4.3.	<i>De laboratorio</i> .....	19
3.6.5.	<b>Metodología</b> .....	20
3.6.5.1.	<i>Obtención de las muestras de cacao de las tres localidades de la Provincia de Orellana</i> .....	20
3.6.5.2.	<i>Aislamientos de microorganismos asociados a los frutos de cacao</i> .....	20

3.6.5.3.	<i>Caracterización morfológica y cultural</i> .....	22
3.6.5.4.	<i>Caracterización molecular</i> .....	23
3.6.5.5.	<i>Preservación de cultivos fúngicos puros mediante el método de Castellani</i> .....	27
3.6.5.6.	<i>Método de evaluación y registro de datos</i> .....	27

## CAPÍTULO IV

4.	<b>MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	29
4.1.	<b>Caracterización cultural y morfológica de los microorganismos fúngicos</b> .....	29
4.2.	<b>Análisis de la diversidad fúngica asociada a los frutos de cacao.</b> .....	69
4.2.1.	<i>Abundancia relativa a nivel de filo, clase, orden, familia y género en relación a las tres localidades.</i> .....	70
4.2.2.	<i>Diversidad de los microorganismos fúngicos asociados a los frutos de cacao en relación a las tres localidades.</i> .....	79
4.2.2.1.	<i>Índice de Riqueza de especies</i> .....	79
4.2.2.2.	<i>Índice de Shannon</i> .....	81
4.2.2.3.	<i>Índice de Simpson</i> .....	82
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	88
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	89
	<b>GLOSARIO</b>	
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-3:</b> Número de muestras por ubicación. ....	17
<b>Tabla 2-3:</b> Ubicación geográfica de las tres localidades de estudio de la Provincia de Orellana.....	17
<b>Tabla 3-3:</b> Condiciones climáticas de las tres localidades de estudio de la Provincia de Orellana.....	18
<b>Tabla 4-3:</b> Primers usados para las PCR.....	25
<b>Tabla 5-3:</b> Conjuntos de primers utilizados en PCR para <i>Moniliophthora</i> sp. ....	25
<b>Tabla 6-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Penicillium</i> sp. ....	29
<b>Tabla 7-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Trichoderma</i> sp. ....	32
<b>Tabla 8-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Lasidiplodia</i> sp. ....	34
<b>Tabla 9-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Epicoccum</i> sp. ....	37
<b>Tabla 10-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Clonostachys</i> sp. ....	41
<b>Tabla 11-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Fusarium</i> sp. ....	44
<b>Tabla 12-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Alternaria</i> sp. ....	46
<b>Tabla 13-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Diaporthe</i> sp. ....	49
<b>Tabla 14-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados a <i>Neopestalotiopsis</i> sp. ....	51
<b>Tabla 15-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados a la familia <i>Xylariaceae</i> . ....	53
<b>Tabla 16-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Daldinia</i> sp. ....	55
<b>Tabla 17-4:</b> Características culturales de los morfotipos aislados del género <i>Nigrospora</i> sp. ....	57
<b>Tabla 18-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Purpureocillium</i> sp. ....	59
<b>Tabla 19-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Coniochaeta</i> sp. ....	62
<b>Tabla 20-4:</b> Características culturales del aislado del aislado asociado a <i>Geotrichum</i> sp. ....	64
<b>Tabla 21-4:</b> Características culturales de los morfotipos asociados al género <i>Moniliophthora</i> sp. ....	66
<b>Tabla 22-4:</b> Porcentaje de microorganismo aislados de los frutos de cacao. ....	69
<b>Tabla 23-4:</b> Riqueza de especies de las diferentes localidades. ....	79
<b>Tabla 24-4:</b> Índice de Shannon de las diferentes localidades. ....	81
<b>Tabla 25-4:</b> Índice de Simpson de las diferentes localidades. ....	83

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1-1:</b>	Características morfológicas de las colonias. ....	8
<b>Ilustración 2-4:</b>	Características culturales de <i>Penicillium</i> sp., cultivado en medio PDA. ....	30
<b>Ilustración 3-4:</b>	Características morfológicas de <i>Penicillium</i> sp., cultivado en medio PDA. 1a) Conidióforo penicilado 2a) ameroconidio/hialino .....	30
<b>Ilustración 4-4:</b>	Características culturales de <i>Trichoderma</i> sp., cultivado en medio PDA.....	32
<b>Ilustración 5-4:</b>	Características morfológicas de <i>Trichoderma</i> sp., cultivado en medio PDA. 1a) conidióforos verticilados.....	33
<b>Ilustración 6-4:</b>	Características culturales de <i>Lasiodiplodia</i> sp., cultivado en medio PDA. ...	35
<b>Ilustración 7-4:</b>	Características morfológicas de <i>Lasiodiplodia</i> sp., cultivado en medio Agar- avena al 4%. 1a) ameroconidio subhialino/borde negro (inmaduros).....	35
<b>Ilustración 8-4:</b>	Características culturales de <i>Epicoccum</i> sp., cultivado en medio PDA.....	38
<b>Ilustración 9-4:</b>	Características morfológicas de <i>Epicoccum</i> sp., cultivado en medio SNA con acículas de pino. 1a) Dictioconidio/café. ....	39
<b>Ilustración 10-4:</b>	Características culturales de <i>Clonostachys</i> sp., cultivado en medio PDA. ....	41
<b>Ilustración 11-4:</b>	Características morfológicas de <i>Clonostachys</i> sp., cultivado en medio Agar- avena. 1a) Conidióforo penicilado 2a) Conidióforo verticilado.....	42
<b>Ilustración 12-4:</b>	Características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp., cultivado en medio PDA.....	44
<b>Ilustración 13-4:</b>	Características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp., cultivado en medio PDA. 1a) Conidióforo con monofialide, 2b) Macroconidios (Fragmoconidio) hialino 3b) Ameroconidio hialino. ....	45
<b>Ilustración 14-4:</b>	Características culturales de <i>Alternaria</i> sp., cultivado en medio PDA.....	47
<b>Ilustración 15-4:</b>	Conidios septados pertenecientes a <i>Alternaria</i> sp., crecidos en medio Agar- avena al 4%. 1a) y 2b) Dictioconidia/melanizados: café. ....	47
<b>Ilustración 16-4:</b>	Características culturales de <i>Diaporthe</i> sp., cultivado en medio PDA. ....	49
<b>Ilustración 17-4:</b>	Características morfológicas de <i>Diaporthe</i> sp., cultivado en medio SNA.1a) Ameroconidio/hialiano (Conidios alpha). ....	50
<b>Ilustración 18-4:</b>	Características culturales <i>Neopestalotiopsis</i> sp., cultivado en medio PDA. ...	52
<b>Ilustración 19-4:</b>	Características morfológicas de <i>Neopestalotiopsis</i> sp., cultivado en medio PDA. 1a) Fragmoconidia/café y negro 2ª) Apéndices hialinos.....	52
<b>Ilustración 20-4:</b>	Características culturales de <i>Xylariaceae</i> , cultivado en medio PDA.....	54
<b>Ilustración 21-4:</b>	Características morfológicas de <i>Xylariaceae</i> , cultivado en medio PDA. 1a) Ameroconidia inmaduro/hialino.....	54
<b>Ilustración 22-4:</b>	Características culturales <i>Daldinia</i> sp., cultivado en medio PDA. ....	55

<b>Ilustración 23-4:</b> Características morfológicas de <i>Daldinia</i> sp., cultivado en medio PDA. 1a) Conidióforo penicilado 2a) ameroconidio inmaduro/hialino. ....	56
<b>Ilustración 24-4:</b> Características culturales <i>Nigrospora</i> sp., cultivado en medio PDA. ....	58
<b>Ilustración 25-4:</b> Características culturales <i>Nigrospora</i> sp., cultivado en medio PDA. 1a) Ameroconidia/negro. ....	58
<b>Ilustración 26-4:</b> Características culturales <i>Purpureocillium</i> sp., cultivado en medio PDA. ....	60
<b>Ilustración 27-4:</b> Características morfológicas de <i>Purpureocillium</i> sp., cultivado en medio PDA. 1a) Fiálides 2a) Conidióforos penicilado, 3b) ameroconidia en cadenas divergentes.. ....	60
<b>Ilustración 28-4:</b> Características culturales de <i>Coniochaeta</i> sp., cultivado en medio PDA. ....	62
<b>Ilustración 29-4:</b> Características morfológicas de <i>Coniochaeta</i> sp, cultivado en medio PDA. 1a) Ameroconidia/café. ....	62
<b>Ilustración 30-4:</b> Características culturales de <i>Uncultured eukaryote</i> , cultivado en medio PDA. ....	64
<b>Ilustración 31-4:</b> Características morfológicas de <i>Geotrichum</i> sp., cultivado en medio PDA. 1a) Artroconidio/hialino .....	65
<b>Ilustración 32-4:</b> Características culturales de <i>Moniliophthora</i> sp., cultivado en medio V8. ...	67
<b>Ilustración 33-4:</b> Características morfológicas de <i>Moniliophthora</i> sp., cultivado en medio V8. 1a) cadena de ameroconidia/subhialino/café.....	68
<b>Ilustración 34-4:</b> Abundancia relativa a nivel de filo de los microorganismos fúngicos aislados de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.....	70
<b>Ilustración 35-4:</b> Abundancia relativa a nivel de clase de los microorganismos fúngicos aislados de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.....	71
<b>Ilustración 36-4:</b> Abundancia relativa a nivel de orden de los microorganismos fúngicos aislado de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.....	72
<b>Ilustración 37-4:</b> Abundancia relativa a nivel de orden de los microorganismos fúngicos aislados de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.....	75
<b>Ilustración 38-4:</b> Abundancia relativa a nivel de orden de los microorganismos fúngicos aislados de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.....	78
<b>Ilustración 39-4:</b> Riqueza de especies de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.....	80
<b>Ilustración 40-4:</b> Riqueza de especies de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.....	80
<b>Ilustración 41-4:</b> Índice de Shannon de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.....	81
<b>Ilustración 42-4:</b> Índice de Shannon de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.....	82

<b>Ilustración 43-4:</b> Índice de Simpson de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.....	83
<b>Ilustración 44-4:</b> Índice de Simpson de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.....	84

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Agar Avena
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ITS</b>	Espaciador transcrito interno
<b>ITIS</b>	Integrated Taxonomic Information System
<b>NCIB</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar
<b>SNA</b>	Spezieller Nährstoffarmer Agar

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

- ANEXO A:** PREPARACIÓN DEL MEDIO AGAR AVENA
- ANEXO B:** PREPARACIÓN DEL MEDIO SNA
- ANEXO C:** PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO V8
- ANEXO D:** RESULTADO DEL ANÁLISIS BLAST
- ANEXO E:** RESULTADOS DEL ANÁLISIS BLAS: FILO, CLASE, ORDEN, FAMILIA, GÉNERO Y ESPECIE SUGERIDA
- ANEXO F:** AISLAMIENTO INDIRECTO Y CULTIVO MONOSPÓRICO
- ANEXO G:** CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA
- ANEXO H:** CONSERVACIÓN DE LOS MORFOTIPOS FÚNGICOS AISLADOS
- ANEXO I:** EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS FÍSICA)
- ANEXO J:** EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS QUÍMICA)
- ANEXO K:** PCR y electroforesis
- ANEXO L:** Gel de agarosa revelado

## RESUMEN

La presente investigación tuvo por objetivo principal, caracterizar los microorganismos fúngicos asociados a frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en tres localidades de la provincia de Orellana. Se procesaron muestras provenientes de las localidades La Paz, Bajo Huino (Loreto), La Belleza (Francisco de Orellana), INIAP-EECA, San Jacinto y La Calumeña (La Joya de los Sachas). Se realizaron aislamientos indirectos a las muestras, que fueron agrupados en morfotipos. En la caracterización cultural se tomaron en cuenta los aspectos de las colonias: color, forma, elevación, borde y superficie, las características morfológicas se determinaron haciendo uso de placas con cinta adhesiva y microcultivos, la información corroboró con las claves de identificación. En cuanto a la caracterización molecular se utilizó la técnica de ampliación de la cadena de ADN con los iniciadores ITS1 e ITS4 y los productos de las PCR realizados fueron secuenciados en la empresa MACROGEN KOREA, con el programa Chromas Technelysium Pty Ltd versión 2.6.6 se visualizaron los electroferogramas y con la herramienta Blast del NCBI se compararon las secuencias obtenidas con el banco de datos. Se analizó la diversidad fúngica a través de la abundancia relativa y con el programa R 4.2, se estimó la riqueza de especies, índice de Shannon y Simpson. La diversidad fúngica entre las localidades fue diferente, mostrando la localidad INIAP-EECA una mayor riqueza de especies, en cuanto a la diversidad de Shannon y Simpson fue mayor en la localidad La Calumeña. La menor riqueza de especies, índice de Shannon y Simpson se presentó en la localidad Bajo Huino. Se aislaron un total de 14 géneros fúngicos, siendo los más abundantes: *Penicillium* sp, *Epicoccum* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp. Se recomienda realizar pruebas de antagonismo con los hongos antagonistas: *Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp. y *Purpureocillium* sp. para el control de *M. royeri*.

**Palabras clave:** <CARACTERIZACIÓN>, <CACAO (*Theobroma cacao* L)>, <AISLAMIENTO>, <MICROORGANISMOS FÚNGICOS>, <DIVERSIDAD>, <ORELLANA>.

  
DBRA  
Ing. Cristian Castillo



2444-DBRA-UPT-2022

## ABSTRACT

The investigation aimed to characterize the fungal microorganisms associated with cocoa fruits (*Theobroma cacao* L.) in three places of Orellana province. Samples from *La Paz*, *Bajo Huino* (Loreto), *La Belleza* (Francisco de Orellana), *INIAP-EECA*, *San Jacinto* and *La Calumeña* (*La Joya de los Sachas*) were processed. Indirect isolations were made from the samples, which were grouped into morphotypes. In the cultural characterization, the aspects of the colonies such as color, shape, elevation, edge and surface were considered. The morphological characteristics were determined using plates with adhesive tape and microcultures, the information was confirmed with the identification keys. As for the molecular characterization, the DNA chain amplification technique was used with the primers ITS1 and ITS4 and the PCR products were sequenced in the company MACROGEN KOREA, with the program Chromas Technelysium Pty Ltd version 2.6.6.6 the electropherograms were visualized and with the Blast tool of the NCBI the sequences obtained were compared with the data bank. Fungal diversity was analyzed through relative abundance and with the R 4.2 program, species richness, Shannon and Simpson index were estimated. The fungal diversity among the localities was different, with the INIAP-EECA locality showing a higher species richness, and the Shannon and Simpson diversity was higher in the *La Calumeña* locality. The lowest species richness, Shannon and Simpson index was found at the *Bajo Huino* locality. A total of 14 fungal genera were isolated, the most abundant being: *Penicillium* sp, *Epicoccum* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Trichoderma* sp. and *Fusarium* sp. Antagonism tests with the antagonistic fungi: *Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp. and *Purpureocillium* sp. are recommended for the control of *M. royeri*.

**Key words:** <CHARACTERIZATION>, <COCOA (*Theobroma cacao* L)>, <ISOLATION>, <FUNGIC MICROORGANISMS>, <DIVERSITY>, <ORELLANA>.



**Esthela Isabel Colcha Guashpa**

0603020678

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una de las frutas que posee mayor demanda a nivel mundial debido a su gran valor de exportación, su importancia se ve reflejada en las 1,8 millones de hectáreas que están destinadas para su producción, esta superficie ha tenido un crecimiento constante desde el 2006 lo que se traduce en un incremento de la producción y por lo tanto en un incremento de la oferta de sus productos, como consecuencias de las perspectivas del aumento de consumo de chocolate a nivel mundial (Durango, 2019). A pesar de ser nativa de América, los principales productores de esta fruta son los países africanos, perteneciendo al continente africano 4 de los 6 principales países. El Ecuador es a nivel mundial el cuarto productor de cacao y el primero en América Latina, es de gran importancia esta fruta para el país ya que es el sexto producto de exportación que representa el 3,2 % del total de sus exportaciones (Zabala, 2019 p. 04).

En la historia del Ecuador el cacao siempre ha tenido un puesto importante dentro de los productos preferidos para sembrar y comercializar. Empezó a tomar fuerzas desde que este producto comenzó a generar beneficios y cuando los productores se dieron cuenta de las características especiales con las que crece el cacao en el Ecuador (Velastegui, 2019: p. 04). Las provincias de Orellana, Sucumbíos y Napo, se estima que en los últimos años la superficie sembrada se ha incrementado en 20.000 ha de cacao de tipo Nacional, constituyéndose esta zona, en el transcurso de dos o tres años, en uno de los principales proveedores de cacao para la exportación; por otra parte, la zona sur oriental, en particular en la provincia de Zamora Chinchipe, poco a poco ingresa en el mapa productor del cacao Fino de Aroma y CCN51 (López, 2017: p. 18).

El cultivo de cacao se ve afectado por una gran variedad de microorganismos, siendo los microorganismos fúngicos los que mayor daño provocan. Según Agrios (2008, 2010, p. 05) existen más de 8.000 especies fúngicas que producen diversas enfermedades en las plantas, las cuales solo pueden desarrollarse y reproducirse únicamente en asociación con una planta que sirva como su hospedante. Entre las enfermedades más importantes ocasionadas por los hongos, se encuentran: moniliasis (*Moniliophthora roreri*), escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y la muerte descendente (*Phytophthora palmivora*). Estas enfermedades llegan a causar hasta el 60 % de pérdidas de la producción, lo cual representa un gran problema para los agricultores (Quiroz y Amores, 2002, p. 80).

Esta investigación tuvo como objetivo principal de caracterizar los microorganismos fúngicos asociados a los frutos de cacao, provenientes de tres localidades las cuales fueron; los cantones Loreto, Francisco de Orellana y La Joya de los Sachas pertenecientes a la provincia de Orellana. Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes: identificar los microorganismos

fúngicos asociados a los frutos del cacao en tres localidades de la provincia de Orellana, caracterizar morfológica y molecularmente los microorganismos fúngicos asociados a los frutos de cacao y comparar la diversidad fúngica de frutos de cacao. Este fue un estudio de tipo exploratorio, en el cual las muestras analizadas proceden de diferentes localidades con plantaciones ya establecidas y para su selección se tomó en cuenta la presencia de síntomas provocados por patógenos, tales como, lesiones, necrosis, aparición de micelio y una deficiencia en el tamaño.

Se realizó un aislamiento indirecto de las muestras de cacao para evitar que algún microorganismo fúngico contaminante sea caracterizado. Los microorganismos fúngicos aislados crecieron en medio PDA, a una temperatura de 26° C, en condiciones de oscuridad. Estos aislados puros se los paso a aislados monospóricos, para caracterizarlos de forma morfológica y molecular. La caracterización morfológica se realizó mediante el uso microcultivos y el método placa con cinta adhesiva. En cuanto a la caracterización molecular se realizó la extracción de ADN mediante el uso del kit de extracción PROMEGA Wizard® Genomic DNA, se realizaron PCR y sus productos se enviaron a analizar en la empresa MACROGEN COREA. La diversidad de los aislados caracterizados se analizó mediante el uso del Índice de riqueza, Índice de Shannon e Índice de Simpson. En los capítulos que conforman este trabajo de investigación primero se da a conocer el problema de investigación, en el segundo capítulo se encuentra el marco metodológico, en el tercero esta la metodología aplicada en este estudio, en el cuarto capítulo se dan a conocer los resultados obtenidos, y en el último capítulo se encuentran las conclusiones y recomendación a las se llegaron al realizar este estudio. Este estudio es un gran aporte para los productores de cacao en la provincia de Orellana y para los del país en general, ya que se logró conocer que microorganismos fúngicos que están presentes en los frutos del cacao, entre los cuales se encuentran microorganismos patógenos como benéficos, con esta información es posible realizar estudios de sensibilidad, lo que permitirá contrarrestar o erradicar los síntomas de las enfermedades causadas por estos patógenos.

## CAPÍTULO I

### 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1. Planteamiento del Problema

En los cantones Loreto, Francisco de Orellana y La joya de los Sachas pertenecientes a la provincia de Orellana, no se han realizados estudios acerca de la microbiota presente en los frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Al ser el Ecuador el centro de origen del cacao este alberga una gran diversidad genética y variabilidad fenotípica del fruto de cacao, este posee una gran importancia tanto cultural como económica en la soberanía alimentaria del país.

#### 1.2. Limitaciones y delimitaciones

Este trabajo se realizó para conocer y caracterizar los microorganismos fúngicos presentes en los frutos de cacao de tres localidades de la Provincia de Orellana, las cuales son: El cantón Loreto, Francisco de Orellana y La joya de los Sachas.

#### 1.3. Problema general

No se ha realizado una caracterización de los microorganismos fúngicos asociados a los frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en tres localidades de la provincia de Orellana.

#### 1.4. Problemas específicos

- No se ha identificado los microorganismos fúngicos asociados a los frutos del cacao en tres localidades de la provincia de Orellana.
- No se ha caracterizado morfológica y molecularmente los microorganismos fúngicos asociados a los frutos de cacao en tres localidades de la provincia de Orellana.
- Se desconoce la diversidad fúngica de frutos de cacao en tres localidades de la provincia de Orellana.

## **1.5. Objetivos**

### ***1.5.1. Objetivo general***

Caracterizar los microorganismos fúngicos asociados a frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en tres localidades de la provincia de Orellana.

### ***1.5.2. Objetivos específicos***

- Identificar los microorganismos fúngicos asociados a los frutos del cacao en tres localidades de la provincia de Orellana.
- Caracterizar morfológica y molecularmente los microorganismos fúngicos asociados a los frutos de cacao en tres localidades de la provincia de Orellana.
- Comparar la diversidad fúngica de frutos de cacao en tres localidades de la provincia de Orellana.

## **1.6. Justificación**

### ***1.6.1. Justificación teórica***

Actualmente, la falta de información sobre la biología y la epidemiología de los microorganismos fúngicos presente en los frutos en los diferentes genotipos de cacao limita el desarrollo de mecanismos eficientes para el manejo de las enfermedades que atacan al fruto.

### ***1.6.2. Justificación metodológica***

La metodología empleada para la realización de este trabajo de integración curricular, no aporta ninguna metodología novedosa, en vista de que los métodos aplicados ya estaban establecidos y han sido usados con anterioridad.

### ***1.6.3. Justificación práctica***

El cacao es de importancia relevante en la economía del Ecuador, por ser un producto de exportación y por constituir una fuente de empleo para un alto porcentaje de habitantes de los sectores rurales y urbano. Esta especie representa uno de los rubros más importantes para el país

(Sánchez Mora & Garcés Fiallos, 2012: p. 25). Entre los distintos riesgos que corre el productor cacaotero en la región, es el ataque de enfermedades y plagas a las plantaciones lo que resulta en pérdidas considerables. Esta investigación tiene por objetivo caracterizar los microorganismos fúngicos presentes en los frutos, logrando establecer el papel de desenvuelven estos microorganismos y su potencial uso.

## **1.7. Hipótesis**

### **1.7.1. Nula**

La diversidad fúngica asociada a los frutos de cacao no difiere en las tres localidades de la provincia de Orellana.

### **1.7.2. Alterna**

La diversidad fúngica asociada a los frutos de cacao difiere en al menos una de las tres localidades de la provincia de Orellana.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de investigación

Se han realizados estudios con anterioridad acerca de los organismos fúngicos presentes en cacao (*Theobroma cacao* L.) tanto dentro como fuera del país. En México Sandoval et al. (2020, p. 02), menciona que un suelo con una alta presencia de cadmio influye en la diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares, Rivas y Domenico (2018, p. 06) estudiaron en concreto la presencia de *Trichoderma* sp., en las plantaciones de cacao con el objetivo de usarlo como alternativa de control para la enfermedad de la escoba de bruja. En el Ecuador, Astudillo et al. (2021, p. 04), menciona que en las regiones costa, sierra y oriente existe una gran diversidad de hongos micorrizos arbusculares asociados al cacao y esta diversidad posee una alta dependencia de la rizosfera. Entre la diversidad existente, también se han encontrado especies antagonistas tales como *Beauveria bassiana*, *Trichoderma yunnanense* y *Purpureocillium lilacinus*, los cuales poseen un gran potencial para ejercer actividad antagonista contra un amplio rango de patógenos (López, 2021, p 05).

En cuanto a la importancia de cacao (*Theobroma cacao* L.) Muller et al. (2021, p. 03) menciona que es uno de los árboles tropicales con mayor importancia económica, el cual es la fuente de chocolate, es uno de los cultivos que a través de su producción proporciona sustento a muchas familias de pequeños agricultores alrededor del mundo. Ploetz (2016, pp. 33-39) menciona que *Theobroma cacao* es un cultivo comercial y es la única fuente de granos de cacao de los cuales se derivan los principales ingredientes para la producción de chocolate y sus derivados, como los son el cacao en polvo y la manteca de cacao. Debido a que cumple un papel único y primordial en la industria para la fabricación de chocolate, lo cual convierte en un cultivo importante de exportación para los países en desarrollo como lo son: América Central y del Sur, África y el sur de Asia, lugares donde el cultivo de cacao es predominante. Sin embargo, el cultivo de cacao posee muchas limitantes para su producción, entre los cuales se encuentran las enfermedades fúngicas, oomicetes y virales, las cuales llegan a causar a nivel mundial pérdidas de hasta el 20 y 30%. Estas pérdidas las cuales son significativas y son producidas por patógenos, resultan en investigaciones de los microorganismos causales de estas enfermedades se realicen y se busque el mejoramiento de la resistencia de estas enfermedades cruciales junto con el mejoramiento de la calidad del producto, para la sostenibilidad del cultivo y por ende mejorar la calidad de vida de los agricultores (Gutiérrez, 2016, p. 567).

## **2.2. Referencias Teóricas**

### **2.2.1. *Métodos de caracterización de microorganismos fúngicos***

Existen varios métodos en los que se pueden caracterizar e identificar los aislamientos purificados de hongos:

#### **2.2.1.1. *Métodos morfológicos***

##### **Microscopia de luz**

Vizcarrondo y Gutiérrez (2008: p. 28), comenta que la microscopia de luz permite realizar la descripción morfológica mediante la observación de estructuras fúngicas, mediante el uso del microscopio óptico que están provistos de lentes objetivos de 10X, 40X y 100X (inmersión en aceite) a través del análisis de la muestra usada para el montaje y la tinción, con las que se establece el tamaño y la forma de las esporas.

##### **Caracterización macroscópica**

Según Pinto (2017: p. 08), esta caracterización se realiza mediante una “macrocolonia” que se obtiene sembrando la especie fúngica a estudiar en la parte central de una placa con medio de cultivo. Para esto se emplea una aguja aplanada en uno de sus extremos en forma de espátula. A continuación, las placas son incubadas a temperatura ambiente (entre 20 y 30°C), por un periodo de 3 a 15 días con observaciones diarias.

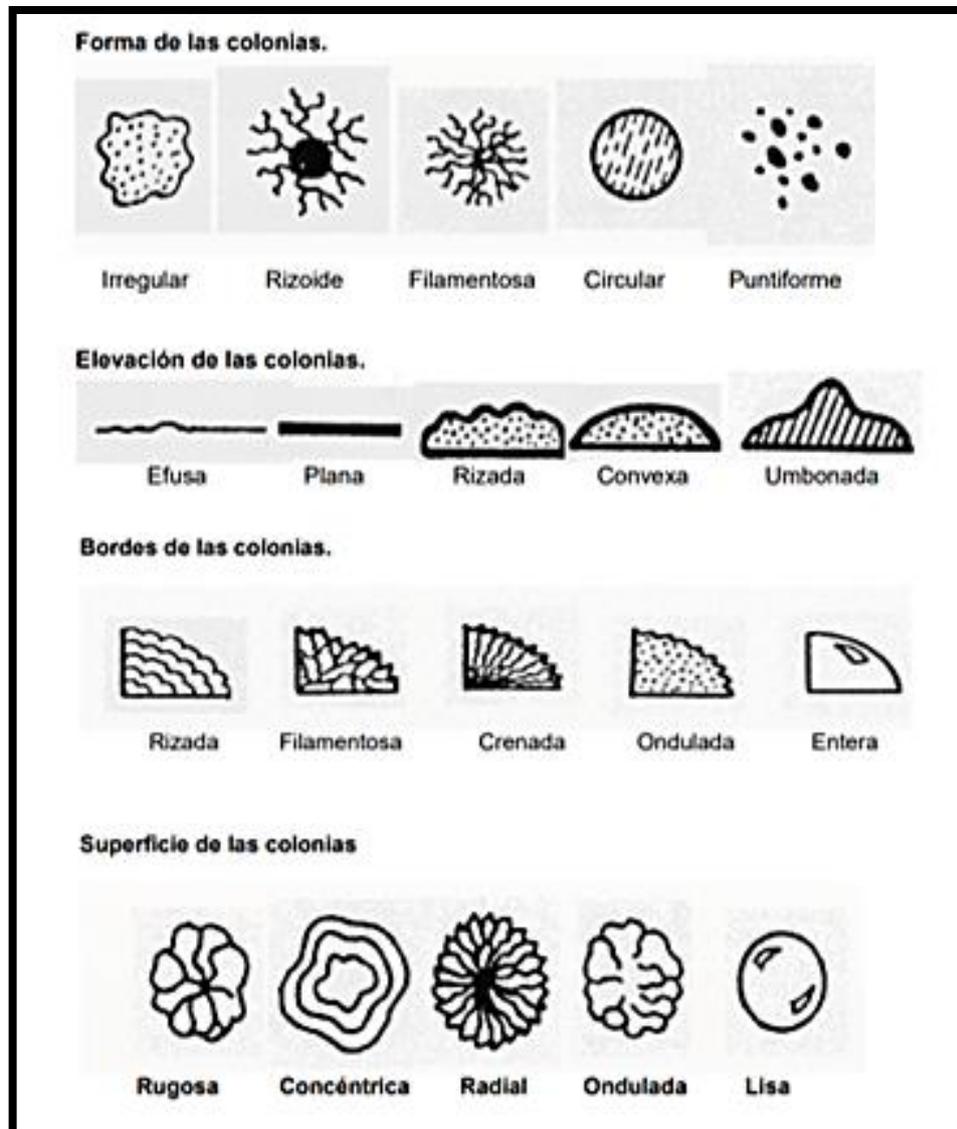
De la colonia se obtienen las siguientes descripciones:

##### **➤ Topografía de la colonia:**

- Forma: circular, irregular, filamentosa.
- Elevación: plana y extendida, elevada y limitada, umbilicada.
- Margen: entero, lobulado, desflecado, rizoide.
- Superficie: plegada, con surcos radiados, cerebriforme.

##### **➤ Pigmentación en anverso y reverso de la colonia o pigmento difusible en el medio.**

- **Textura:** granulosa, pulverulenta, vellosa, aterciopelada, algodonosa.
- **Tamaño:** crecimiento limitado o crecimiento invasivo.



**Ilustración 1-1.** Características morfológicas de las colonias.

Fuente: Lescano, Alfonso et al., 2015.

#### 2.2.1.2. Métodos moleculares

#### Reacción polimerasa: PCR

Una de las características de esta técnica innovadora es la alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, es capaz de ofrecer resultados confiables en poco tiempo que resultan fáciles de analizar. La reacción en cadena de la polimerasa se entiende como una reacción enzimática *in*

*vitro* que permite la amplificación una secuencia específica de ADN millones de veces durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanca es copiada. Esto se da debido al aprovechamiento de la actividad de la enzima ADN polimerasa que posee la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN de las células (Tamay, 2013: p. 71).

Mas (2016: p. 02) menciona, que la reacción se basa en la repetición de un ciclo que está conformado por tres etapas, las cuales son:

- La **desnaturalización**, es donde la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para que esto se dé, es necesario realizar una incubación de las muestras a temperaturas de 93 a 97°C. Cuando la temperatura disminuya se producirá la renaturalización.
- La **hibridación** se produce cuando los cebadores se unen en las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que se desea amplificar. Esto se da debido al descenso de la temperatura a los 50 y 65°C.
- La **extensión** es producto de la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' → 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incluye a los deoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

## **Región ITS**

Para los microorganismos fúngicos las secuencias ITS presentan dos separadores internos transcritos conocidos como ITS1 e ITS2. Lo más destacado de la secuencia ITS es que en la región no existen los genes insertados, debido a lo que están se desarrollan sin ningún tipo de restricciones por lo cual cambian muy rápidamente. Es esta propiedad lo que permite usar el ITS para distinguir diferentes especies de hongos. A pesar de esto existen especies, algunas incluso relacionadas estrechamente, las cuales poseen regiones ITS1 diferentes (Consejos Superior de Investigación Científica, 2016, parr. 05).

### **2.2.3. Cacao (*Theobroma cacao* L.)**

#### **2.2.3.1. Origen**

*Theobroma cacao* L es una especie perteneciente a la familia Malvaceae, aunque el término *Theobroma* fue acuñado por la ciencia, su descubrimiento, su valor natural, religioso, medicinal

e inclusive su valor económico ya estaban presentes en la cosmovisión mesoamericana, antes de su estudio y descubrimiento. El cultivo del cacao tiene su origen en América sin embargo no se sabe con precisión el lugar exacto donde se originó. Actualmente continúa siendo razón de discusión. Algunos autores indican que el cultivo del cacao se inició en México y América Central y los españoles indican que no lo vieron cultivado en América del Sur cuando estos arribaron al continente, aunque lo encontraron creciendo en forma natural en muchos bosques a lo largo de los ríos Amazonas y Orinoco y sus afluentes, donde aún hoy existen tipos genéticos de mucho valor (Batista, 2009: p. 10).

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que al menos una variedad de cacao tiene su origen en la alta Amazonia en donde ha sido utilizada por más de 5000 años. En el Ecuador la cultura del cacao es antigua, ya que se sabe por los españoles que a su llegada en la costa del Pacífico fueron observados grandes árboles de cacao lo que comprueba que antes de la llegada de los europeos ya se tenía conocimiento sobre el uso que se le podía dar a esta especie en la región costera (ANECACAO, 2015: p. 05).

#### *2.2.3.2. Historia*

Espinosa y ANECACAO (2012 y 2015), mencionan que mucho antes del descubrimiento del continente americano, las culturas Toltecas, Mayas y Aztecas ya lo cultivaban. Fue Cristóbal Colón el primer europeo en descubrir los granos de cacao al llegar a Nicaragua durante su cuarto viaje, aunque no tuvo una buena recepción en europea debido a su sabor amargo. En 1519 Hernán Cortés desembarcó en las tierras de Montezuma quién era el emperador de los aztecas en ese tiempo y quedó impresionado al ver el comercio que tenía el cacao para los indígenas, ya que estos le otorgaban un valor comercial, usando su sentido de negocio Cortés intercambió el cacao por oro, ya que este metal carecía de valor para los indígenas. Cuando se les ocurrió endulzar las bebidas chocolatadas con azúcar, el cacao partió a Europa en 1528 cuando Cortés volvió a España con un gran cargamento de cacao, los materiales y las recetas necesarias para la preparación del chocolate. Las vainas del cacao eran fermentadas, secadas al sol, tostadas y presadas entre dos piedras calientes hasta obtener una pasta aromática moldeada en forma de barras o panes luego se le agregaba agua, azúcar o miel y especias a elección. La bebida tuvo una gran recepción en Europa lo que llevó incluso a que la consideraran un medicamento o incluso una bebida afrodisíaca, conforme pasó el tiempo las recetas fueron mejorando (Espinosa, 2012: p. 18).

Durante mucho tiempo el chocolate era de exclusividad española y reservada para la alta sociedad, sin embargo, el contrabando, los atracos a las naves que llegaban de México a Europa, las vistas de la corte española y los intercambios con los conventos dio como resultado la distribución de chocolate a todo el continente europeo (Espinosa, 2012: p. 18). En el año 1615 se introdujo en Francia

y simultáneamente apareció en el resto de países, en Italia apareció en 1606 y en Alemania en 1646, sin embargo, el chocolate estaba sujeto a grandes impuestos lo que dificultaba su consumo en aquel país. A Inglaterra llegó en 1657 donde se abrieron salones de degustación uno de ellos fue el “Cacao Tree”. En 1697 llegó a Suiza gracias a un ciudadano que probó la bebida en Bélgica. Fue el naturalista Charles Linné quien le dio el nombre de “*Theobroma*” palabra del latín cuyo significado es “Alimento de los dioses” (Espinosa, 2012: p. 18).

España dominaba el mercado, el cual era muy rentable hasta mediados del siglo XVI, lo que provocó que el cultivo de cacao se potenciara en la costa ecuatoriana, ya que el cacao ecuatoriano poseía un gran prestigio por su aroma, esta variedad es la que se conoce actualmente como Aroma Nacional o Sabor Arriba. La cedula real obtuvo el permiso de exportar cacao desde Guayaquil. En los inicios del siglo XIX, más de la mitad de la producción de cacao se daba en Venezuela. Para la década de 1820, el cacao fue introducido en Ghana junto con otros países del centro de África por los portugueses, durante ese mismo siglo se expandió en Brasil. Durante el final del siglo XIX, Suiza produjo el primer chocolate en leche, a partir de ese momento los chocolates suizos gozan de un gran prestigio a nivel mundial, el cual conserva a día de hoy (ANECACAO, 2015: p. 08).

Fue en 1830, al declararse la fundación del Ecuador que muchas familias adineradas se dedicaron a cultivar el cacao, estas estaban ubicadas en su mayoría en Vinces y en otros cantones de Los Ríos. Para 1880 la producción se duplica en 15000 TM, a continuación, se triplica a 40000 TM. Ecuador se convierte en el mayor exportador mundial de cacao en la década de 1890, cabe mencionar que fue gracias al cacao que fungió como motor económico que se abrieron los primeros bancos en el país. La aparición y el esparcimiento de las enfermedades Monilla y Escoba de Bruja en 1920 provocó que la producción del país bajase al 30%, a lo cual se le suma la falta de mercados debido a la Primera Guerra Mundial provocando una gran crisis económica. Actualmente las variedades más producidas en el Ecuador son el resultado de una mezcla del cacao Nacional y Trinitario ya que estos fueron introducidos debido a su resistencia a las enfermedades, aunque el sabor de la variedad Nacional prevalece (ANECACAO, 2015: p. 11).

### 2.2.3.3. *Taxonomía del cacao*

Integrated Taxonomic Information System, (2021), aporta la siguiente clasificación taxonómica:

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Malvales  
**Familia:** Malvaceae  
**Subfamilia:** Byttnerioideae  
**Tribu:** *Theobroma*  
**Género:** *Theobroma cacao* L.

#### 2.2.3.4. Descripción morfológica

Es una especie perenne, arbórea cuyo tamaño va de 5 a 8m, sin embargo, es capaz de alcanzar una altura de hasta 20m cuando su crecimiento se da bajo una sombra intensa. Su corona posee un diámetro de 7 a 9m, esta es densa y redondeada (Anecafe, 2004, p. 04).

**Raíz:** el sistema radical está compuesto por una raíz pivotante de la cual se desprende varias raíces secundarias, que se encuentran a los primeros 30 cm del suelo (Anecafe, 2004, p. 03).

**Tallo:** es recto, posee una altura de entre 1m a 1,5m, de este emergen las ramas de 3 a 5 que forman la horqueta. Una vez que la horqueta se ha formado se elimina la yema terminal, el siguiente crecimiento vertical se da por un chupón que se da de la parte inferior de la horqueta y asciende para repetir el mismo proceso, pero centímetros más arriba, se forma un segundo estrato de la ramificación del tallo principal (Torres, 2012, p. 13).

**Hojas:** cuando estas son jóvenes son muy delicadas por lo que resultan muy apetecibles para las plagas y el viento también llega a dañarlas, en esta etapa posee un color verde pálido al alcanzar la madurez su color cambia a verde, de lámina simple, con una forma lanceolada o casi ovalada, con nervadura pinnada con ambas superficies glabras (Estrada, 2011, p. 04).

**Flores:** brotan en las partes más viejas de la planta como el tronco y ramas que no poseen hojas, estas salen de donde antes había hojas. Las flores son hermafroditas, posee 5 sépalos, 5 pétalos, 10 estambres en 2 verticilos siendo solo uno de ellos fértil y posee un ovario superior de 5 carpelos fundidos (Estrada, 2011: p. 04).

**Fruto:** es una baya cuyo tamaño, color y forma varían, sin embargo, generalmente poseen forma de baya con unos 30 cm de largo y 10 cm de diámetro, siendo acostillados o lisos, con una forma elíptica de color café, rojo, amarillo y morado. Interiormente se divide en 5 celdas. Su pulpa es de color rosada o café con un sabor que va de ácido a dulce aromático (Anecafe, 2004: p. 04).

**Semillas:** cada baya posee de entre 20 a 40 semillas, aunque esto dependerá de la variedad, con una forma plana y redondas, son de color blanco, café o morado (Anecafe, 2004: p. 04).

#### *2.2.3.5. Importancia del cacao en el Ecuador*

El cacao fino y de aroma tiene características distintivas de aroma y sabor buscadas por los fabricantes de chocolate. Representa únicamente 5% de la producción mundial de cacao. Ecuador, por sus condiciones geográficas y su riqueza en recursos biológicos, es el productor por excelencia de Cacao Arriba fino y de aroma (63% de la producción mundial) proveniente de la variedad Nacional cuyo sabor ha sido reconocido durante siglos en el mercado internacional. Este tipo de grano es utilizado en todos los chocolates refinados. Sin embargo, lo que muchos no saben que el chocolate fino se distingue por su pureza, específicamente, el sabor y fragancia que el cacao tiene (ANECACAO, 2015: p. 05).

El cacao en el Ecuador es un producto de los más significativos símbolos del país, antes del boom petrolero durante casi un siglo, la principal fuente económico y social ecuatoriano se desarrollaba en gran medida alrededor del mercado internacional del cacao, en la actualidad es el quinto producto más exportado dentro de las exportaciones no petroleras y es el principal exportador mundial del cacao fino y de aroma (PROECUADOR, 2013: p. 03). La región costa tiene una mayor participación en la superficie cosechada del cacao, en el Ecuador. Según la Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, 2013, indica que en el año 2009 la superficie cosechada en la Región Costa registro el 80% de la superficie total a nivel Nacional. Las provincias que cuentan con una mayor superficie cosechada de Cacao son Manabí, Los Ríos y Guayas, también tiene una participación Esmeraldas, el Nororiente, de El Oro. Las principales provincias de la Región Sierra que cultivan el cacao son Cotopaxi, Bolívar, Cañar (López, 2017: p. 18).

#### *2.2.3.6. Variedades de cacao en el Ecuador*

En el Ecuador son dos variedades las variedades más conocidas:

- **Súper árbol**

Es un tipo de cacao identificado en la Amazonía Ecuatoriana, que ha manifestado una fuerte resistencia a enfermedades, lo que deriva en una buena producción con alto rendimiento y calidad del fruto (Calva y Ramírez, 2016, p. 05).

- **Sabor arriba**

También llamado Fino y de Aroma. Gracias a su sabor frutal y fragancias, es conocido a nivel mundial lo que hizo que también se lo conociera como Cacao Arriba. Debido a su calidad organoléptica posee un valor agregado muy reconocido por la industria de la confitería (López, 2017: p. 18).

- **CCN-51**

Esta variedad es originaria del Ecuador, tiene una gran adaptabilidad a diferentes pisos climáticos, con una alta productividad y es resistente a plagas y enfermedades (Gonzales, 2019: p. 02).

- **Tipo Nacional**

Posee un gran perfil organoléptico, su reconocimiento a nivel mundial es de fino o de aroma. Es un tipo de cacao único en el mundo (CEFA, 2021).

#### 2.2.3.7. *Enfermedades del cacao*

- **Moniliasis**

Su agente causal es *Moniliophthora rorei*, posee un largo periodo de incubación que puede ser de 3 a 8 semanas dependiendo de la edad del fruto, la severidad del ataque, la susceptibilidad del fruto y principalmente del clima, ya que, las lluvias son un factor clave para su desarrollo. En sus primeras etapas de desarrollo (menores de 3 meses), los frutos de cacao son más susceptibles a la infección y progresivamente se hacen más resistentes a medida que avanza su crecimiento. En los frutos menores de 2 meses la infección aparece primero como pequeños abultamientos o gibas en la superficie de la mazorca, incluso esa área se decolora. Después de que emerge la giba, surge una mancha de color café que se va extendiendo y sobre la misma empieza a aparecer una felpa blanca que corresponde al micelio del hongo, y sobre éste, luego de 3 a 7 días empiezan a emerger las esporas del tipo conidio de color crema, que son liberadas y dispersadas por la acción del viento, principalmente. En los frutos adultos (mayores de 3 meses) el síntoma más común es una mancha de color café, que puede extenderse hasta cubrir todo el fruto. En frutos infectados a mitad de su desarrollo, la enfermedad aparece primero en forma de pequeños puntos aceitosos (translúcidos). En muy corto tiempo esos puntos se unen formando una mancha café. A los pocos días sobre la mancha café aparece el micelio y luego sobre el mismo aparecen abundantes esporas

de color crema. También como síntoma es común una apariencia de madurez prematura (PROCACAO, 2017: p. 03).

- **Mal de machete**

Causado por *Ceratocystis cacaofunesta*, afecta a árboles de cualquier edad, provocándoles inicialmente marchitez y eventualmente rápida muerte. Las pérdidas debidas a la muerte de plantas pueden ser muy altas especialmente cuando el material sembrado es genéticamente muy homogéneo y susceptible. El ataque del hongo está asociado comúnmente con insectos generalmente del género *Xyleborus*. El escarabajo perfora el tronco lo cual se nota por la acumulación de aserrín fino en los orificios que hace al penetrar el tronco. Al penetrar el tronco el insecto acarrea esporas del hongo, las que introduce en la planta, induciendo una infección que mata el árbol. El escarabajo no se alimenta de ninguna parte de la planta, él se alimenta de las estructuras del hongo que crecen en el tejido de la planta y hace túneles que le sirven de refugio y sitio de alimentación para los estados inmaduros (PROCACAO, 2016: p. 02).

- **La mazorca negra**

Es causada por *Phytophthora*, es la enfermedad que más pérdidas de cosecha causa nivel mundial. A pesar de que el hongo puede atacar plántulas y distintas partes del árbol, como botones florales, chupones, hojas, brotes, ramas, tronco y raíces, el principal daño se lo llevan las mazorcas. Los síntomas aparecen como manchas pardas, oscuras casi circulares, que inmediatamente se agrandan y cubren toda la superficie de la mazorca. Las almendras se infectan y en un plazo de 10 a 15 días la mazorca se vuelve inservible (Anecafe, 2004: p. 03).

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Enfoque de investigación

Es una investigación propuesta para dar respuesta a problemas que presentan los productores.

#### 3.2. Nivel de investigación

En una investigación básica de tercer nivel para la obtención de título de pregrado.

#### 3.3. Diseño de investigación

Este estudio es de tipo exploratorio a nivel de plantaciones ya establecidas de cacao, para determinar las muestras con las que se realizaría el estudio, se tomaron en cuenta frutos que presentaron síntomas de enfermedad, tales como; lesiones, necrosis, bajo crecimiento y aparición de micelio.

##### *3.3.1. Según la manipulación o no de la variable independiente*

Es una investigación de tipo exploratorio con muestras obtenidas de distintas localidades de la Provincia de Orellana.

##### *3.3.2. Según las intervenciones en el trabajo de campo*

La investigación tendrá una intervención de tipo longitudinal.

#### 3.4. Tipo de estudio

Este estudio se realizó en el a nivel laboratorio. Mediante el proceso de frutos de cacao recolectadas plantaciones ya establecidas, las cuales están ubicadas en el cantón Loreto, Francisco de Orellana y La Joya de los Sachas pertenecientes a la provincia de Orellana, como se especifica en la Tabla 1-3.

### 3.5. Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra

Se procesaron un total de 59 muestras de cacao.

**Tabla 1-3:** Número de muestras por ubicación.

<b>Cantón</b>	<b>Comunidad</b>	<b>Muestras</b>
<b>Loreto</b>	La Paz	6
	Bajo Huino	6
<b>Francisco de Orellana</b>	La Belleza	9
<b>Joya de los Sachas</b>	INIAP-EECA	24
	San Jacinto	4
	La Calumeña	10

Realizado por: Quitio, 2022.

### 3.6. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

#### 3.6.3. Características del lugar

##### 3.6.3.1. Localidades en campo

La investigación se realizó con muestras obtenidas de tres localidades de la provincia de Orellana, ubicadas en los cantones de Loreto, Francisco de Orellana y La Joya de los Sachas, lugares en donde existen cultivos de cacao.

##### 3.6.3.2. Ubicación geográfica del área de estudio

**Tabla 2-3:** Ubicación geográfica de las tres localidades de estudio de la Provincia de Orellana.

<b>LOCALIDAD</b>	<b>LATITUD</b>	<b>LONGITUD</b>	<b>ALTITUD</b>
Loreto	0°47'28"S	77°22'19"O	373 m.s.n.m
Francisco de Orellana	0°37'36"S	77°07'40"O	292 m.s.n.m
La Joya de los Sachas	0°45'41"S	77°05'01"O	330 m.s.n.m

Fuente: Google EARTH.

Realizado por: Quitio, 2022.

### 3.6.3.3. Condiciones climáticas

**Tabla 3-3:** Condiciones climáticas de las tres localidades de estudio de la Provincia de Orellana.

<b>LOCALIDAD</b>	<b>Temperatura promedio</b> °C	<b>Humedad relativa</b> %	<b>Precipitación anual</b> mm
Loreto	23,6	81 – 89	2516
Francisco de Orellana	26	86 – 89	2800 - 4500
La Joya de los Sachas	25	90	4534

**Fuente:** CLIMATE-DATA.PRG

**Realizado por:** Quitio, 2021.

### 3.6.3.4. Localización del laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Politécnica Superior del Chimborazo (ESPOCH), ubicado en la Panamericana Sur km 1 1/2, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, Ecuador.

## 3.6.4. Materiales y equipos

### 3.6.4.1. De campo

#### **Materiales**

Fundas ziploc, marcadores y machete.

#### **Equipos**

GPS y cámara fotográfica.

### 3.6.4.2. De escritorio

#### **Materiales**

Libreta, esferos, lápices, borrador y marcadores.

## **Equipos**

Laptop, calculadora, impresora e internet.

### *3.6.4.3. De laboratorio*

## **Material biológico**

Muestras de fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.)

## **Materiales**

Cajas Petri (90 mm Ø), cuchillo, pinzas, papel toalla, frascos autoclave (500 mL y 1000 mL), vasos de precipitación (50 mL y 100 mL), probetas plásticas (500 mL y 1000 mL), pipetas, micropipetas, microtubos (1,5 mL y 200 µL), cajas para microtubos, papel aluminio, fundas plásticas transparente, fundas zipper, sobres manila, cinta adhesiva, tarrinas, jeringas, filtros de jeringa estéril, cubre y porta objetos, morteros, pistilos, cucharas plásticas, palillos, sorbetes, papel film, asas, puntas plásticas para micropipetas (10 µL, 100 µL y 1 mL), bisturí y porta bisturí.

## **Reactivos**

Etanol, alcohol (70%), hipoclorito de sodio (2%), agua destilada estéril, sulfato de estreptomicina, chloramphenicol, agua ultrapura estéril, avena, agar-avena (AV), nitrato de potasio 99% (LOBAL Chemie), sulfato de magnesio heptahidratado 99,5% AR/ACS (LOBAL Chemie), sucrosa D (+) Saccharose, Sugar (LOBAL Chemie), glucosa, cloruro de potássio, sulfato de potasio 99% (LOBAL Chemie), spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA), potato Dextrose Agar al 3.9% (PDA Difco™), bacto-Agar al 2.8% (Difco™), jugo de verduras V8-agar (V8), jugo vegetal V8, asparangina, extracto de malta, carbonato de calcio, nitrógeno líquido, lactoglicerol, lactofenol, cloroformo alcohol isoamílico (24:1), isopropanol frio, master Mix, 2X (Go Taq® Green), DNA Ladder Bench Top 100 pb (PROMEGA), agua ultrapura estéril, Kit de extracción de ADN (PROMEGA Wizard® Genomic DNA), LE Agarosa (Clever Scientific CSL-AG 100), 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen). primers (EXXTEND), Nuclei Acid Staining Solution (UniSafe Dye) y Tris-Borate-EDTA Buffer (SIGMA)

## **Equipos**

Balanza de precisión (RADWAG AS220.R2), secador de vidrio (SELECTA 200038),

refrigeradora (Durex), ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450), microondas (Panasonic 900w), incubadora, destilador de agua (BOECO WS 8000), cámara de flujo laminar vertical (BIOBASE BSC-1500IIA2-X), cámara de esporulación, mechero de Bunsen, autoclave (BIOBASE BKQ-B100II) estereoscopio (COMECTA – IVYMEN 5313309), microscopio óptico (LEICA DM 150), cámara fotográfica (CANNON), adaptador de cámara fotográfica a microscopio (CANON SLR/DSLR), baño María (CENCO 97013-16), vortex (QILINBEIER QL-901), centrifuga (EPPENDORF 5424), biospectrofotómetro (EPPENDORF Basic), termociclador (EPPENDORF Vapo.protect), cuba electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB-SB-710), fuente de poder para electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB300) y transiluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A)

### **3.6.5. Metodología**

#### *3.6.5.1. Obtención de las muestras de cacao de las tres localidades de la Provincia de Orellana.*

Las muestras de cacao se obtuvieron de plantaciones ya establecidas ubicadas en el cantón Loreto, Francisco de Orellana y La Joya de los Sachas pertenecientes a la Provincia de Orellana. Se tuvo en cuenta para la selección de los frutos, que estos presentaran sintomatología provocada por algún patógeno.

#### *3.6.5.2. Aislamientos de microorganismos asociados a los frutos de cacao.*

Para lograr el aislamiento de microorganismos fúngicos presentes en los frutos de cacao se utilizó el método de aislamiento indirecto propuesta por Alfnas y Mafia (2016). Este fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Politécnica Superior del Chimborazo.

#### **Aislamiento indirecto**

Se siguió la metodología descrita por Alfnas y Mafia (2016) con ciertas modificaciones para el aislamiento indirecto de tejidos fungosos.

El aislamiento consistió en realizar cuatro pequeños cortes de aproximadamente 8 mm por muestra de cacao con un cuchillo previamente desinfectado, en los tejidos que presentaban alguna sintomatología, teniendo constancia de que los cortes realizados posean un 50% de tejido sano y el otro 50% de tejido enfermo. Los cortes se colocaron sobre papel toalla previamente desinfectado y a continuación bajo la cámara de flujo laminar, se realizó un proceso de

desinfección que consistió en colocar los cortes obtenidos en alcohol al 70 % por 30 s, luego en hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min e inmediatamente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, cada uno con una duración de 30 s, los cortes se procedieron a secar sobre papel toalla esterilizado. Finalizada la desinfección con la ayuda de pinzas previamente desinfectadas, se trasladaron los tejidos a cajas Petri con medio de cultivo PDA Agar + Chloramphenicol y Streptomina, estas cajas se etiquetaron, se sellaron con papel parafilm y se incubaron a una temperatura de 26 °C por un periodo de dos a quince días, para promover el desarrollo de los microorganismos fúngicos.

### **Cultivos puros**

Las colonias que se presentaron fueron trasladadas a cajas Petri con medio PDA Agar al 3.9% + Chloramphenicol y Streptomina, estas cajas Petri fueron debidamente etiquetadas y selladas con la ayuda de papel parafilm, para ser incubadas a 26 °C durante 15 días, en posición invertida y en condiciones de oscuridad. Esto se realizó mediante la extracción de una porción de micelio que fue colocado en el medio logrando así la obtención de cultivos puros.

### **Cultivos monospóricos**

El punto de partida para los cultivos monospóricos son los cultivos puros. Los cultivos monospóricos se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Branner, et al., (2013, p.34), aplicando ciertas modificaciones.

Para empezar, se colocaron 10 mL de agua destilada estéril en tubos de ensayo, a continuación, se colocó una pequeña porción de micelio con la ayuda de un palillo esterilizado con la que se raspo parte del micelio obtenido de los cultivos puros, después se agitaron los tubos mediante el uso del vortex durante 10 s, luego se vertió la suspensión obtenida en una caja Petri con medio de cultivo SNA + Streptomina y Chloramphenicol, e inmediatamente el exceso de agua fue descartado, estas cajas fueron etiquetadas, selladas y se incubaron en posición lateral, a una temperatura de 26 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, con la ayuda de un estereoscopio se observaron las esporas que habían germinado, con el uso de un bisturí se extrajo una única espora, la cual fue colocada en una caja Petri con medio PDA + Streptomina y Chloramphenicol, una vez que estas cajas fueron debidamente selladas y etiquetadas, estas fueron incubadas a una temperatura de 26 °C y diariamente se constató que exista un crecimiento de los aislados fúngicos.

### *3.6.5.3. Caracterización morfológica y cultural*

Se usaron las siguientes técnicas para la caracterización morfológica:

#### **Placa realizada con cinta adhesiva**

Se siguió la metodología mencionada por Franco (2015, p. 05), para la realización de placas con cinta adhesiva con diversas modificaciones:

Primero se debe colocar una gota de lactoglicerol sobre un portaobjetos, a continuación, se debe adherir la cinta adhesiva transparente sobre la colonia fúngica, obteniendo así una porción de micelio, luego se debe colocar la cinta sobre el portaobjetos con cuidado para evitar la formación de burbujas. Una vez realizado el procedimiento se observó en el microscopio las estructuras de los hongos.

#### **Microcultivos**

Para la preparación de microcultivos se siguió lo estipulado por Frey, Fran (2019) aplicando distintas modificaciones:

En una caja Petri esterilizada se colocó en papel toalla previamente esterilizado el cual se humedeció con no más de 2,5 mL de agua destilada estéril, después se dispuso dentro de la caja un sorbete estéril con forma de V que sirvió como soporte para un portaobjetos, el cual fue sumergido en medio SNA + Streptomina + Chloramphenicol, a contracción, se limpió un lado del portaobjetos. Mediante el uso de un palillo previamente esterilizado se recolecto una pequeña porción de micelio de los aislados monospóricos y se colocó en ambos extremos, a continuación, se dispuso un cubreobjetos sobre las partes inoculadas. Finalmente, se etiqueto la caja Petri sin sellar y se incubo a una temperatura de 26 °C por 24h, después se procedió a observar el portaobjetos en el microscopio y a tomar fotografías de las estructuras que fueron observadas.

Siguiendo la metodología estipulada por Fernando et al., (2000), se realizó la caracterización cultural de las colonias fúngicas obtenidas describiendo el color del micelio tanto del anverso como el reverso, la forma del margen, superficie de las colonias, elevación de las colonias y el borde de las colonias. Usando la escala Pantone descrita en (Pantone Coated Color Reference, 2012) se valoró el color del micelio de las colonias.

Para la caracterización morfológica se usaron las claves taxonómicas descritas por Barnett y Hunter (1972). En cuanto al género *Trichoderma*, estas claves fueron tomadas del trabajo de Samuels et al. (1999) y para *M. roreri* fueron usadas las claves descritas en el trabajo de Villavicencio (2010, p. 10). Para la descripción de los tipos de conidios uso la clasificación propuesta por Saccardo (1886).

#### 3.6.5.4. Caracterización molecular

El ADN genómico fue extraído del micelio de los cultivos. Los Primers de la región ITS (Espaciador transcrito interno) fueron utilizados para la caracterización molecular a partir del ADN genómico. Los productos de PCR de la región fueron secuenciados, y las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del NCBI.

Se utilizó la siguiente metodología para lograr la caracterización molecular:

#### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se dividió en dos partes: Lisis física y Lisis química.

Para la extracción del ADN fue necesario repicar los hongos obtenidos de los cultivos monospóricos a cajas Petri con medio PDA + Streptomycina y Chloramphenicol e incubarlos hasta que haya crecido suficiente micelio, sin embargo, el tiempo de incubación no fue mayor a 15 días.

Dentro de la cabina de flujo laminar se cosecho el micelio con la ayuda de una paleta previamente esterilizada, se colocó el micelio sobre papel bond esterilizado y se dejó secar por aproximadamente 30 min, el papel se etiquetó y se cubrió con papel aluminio, se colocó dentro de un sobre manila y se lo selló dentro de una funda ziploc, la cual se colocó en el ultracongelador a una temperatura de -40 °C hasta el día siguiente.

La lisis física se inició colocando el micelio dentro de un mortero previamente esterilizado y agregando nitrógeno líquido, a continuación, con el pistilo igualmente esterilizado se procedió a macerar el micelio, obteniendo un polvo fino, el cual se colocó dentro de un microtubo de 1,5 mL estéril, inmediatamente este se almacenó en el ultracongelador a una temperatura de -40 °C.

La lisis química, se dio con el uso del kit de extracción PROMEGA Wizard® Genomic DNA, se realizaron los pasos propuestos por el fabricante con ciertas modificaciones:

1. Se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de solución de lisis de núcleos en los microtubos con el micelio macerado, después se colocaron los microtubos en el vortex por 3 s, a continuación, se incubaron en el baño maría a 65 °C por 15 min y cada 5 min se invirtieron los microtubos.
2. Luego se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de precipitación de proteínas, y se llevaron los microtubos al vortex por 20 s, a continuación, fueron centrifugados a 14000 rpm durante 10 min, lo que provoco que el precipitado de proteínas formara un pellet, inmediatamente el sobrenadante de aproximadamente 600  $\mu\text{L}$  se trasladó a un nuevo microtubo en el cual se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1), que fue sacudido en el vortex por 20 s y centrifugado durante 10 min a 1400 rpm. Finalmente se traspasó el sobrenadante que es el que contiene el ADN, el cual es de aproximadamente 600  $\mu\text{L}$  hacia un nuevo microtubo de 1,5 mL.
3. A continuación, se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de Isopropanol frío, se mezcló la solución invirtiendo los microtubos de forma cuidadosa, una vez terminada la acción se colocaron los microtubos en el ultracongelador durante 10 min para después se centrifugarlos a 14000 rpm por 10 min.
4. Después se observó si hubo la formación del pellet en el fondo de los microtubos, posteriormente se descartó el sobrenadante de manera muy cuidadosa para evitar que el pellet se pierda, luego el realizaron dos lavados, cada uno adicionando 600  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % frío y se los centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos.
5. Seguido a este paso se descartó el etanol y para el secado del pellet se colocaron los microtubos sobre bandejas limpias cubiertas con papel toalla estéril en posición horizontal con la tapa abierta durante 12 h.
6. Por último, una vez transcurridas las 12 h se resuspendió el pellet agregando 50  $\mu\text{L}$  de TE y 2  $\mu\text{L}$  de RNasa en cada microtubo, después fueron incubados en el baño maría por 3h a una temperatura de 37°C, concluido este tiempo se procedió a guardar los microtubos en el congelador hasta el momento de su uso.

## PCR

Se utilizó la metodología de ampliación en cadena del ADN con los iniciadores ITS1 e ITS4 (**Tabla 4-3**), para la identificación molecular de los morfotipos hallados.

**Tabla 4-3.** Primers usados para las PCR

Código	Secuencia
ITS <sub>1</sub> F (Forward)	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA- 3'
ITS <sub>4</sub> R (Reverse)	3'-TCCTCCGTTATTGATATGC- 5'

Fuente: White, T. J. et al., 1990

Realizado por: Quitio, Dayse, 2022.

#### Reactivos usados para la reacción de PCR:

- 12,5 µL de Master Mix, 2X Go Taq® Green
- 2 µL (1 pmol) primer Forward (ITS 1)
- 2 µL (1 pmol) primer Reverse (ITS 4)
- 4,5 µL de agua ultrapura estéril
- 4 µL (ng / µL) de ADN

Dando un volumen total de 25 µL.

- **Programa usado para la amplificación por PCR**

Desnaturalización inicial 95 °C durante 5 min, y 40 ciclos de las condiciones, 95 °C durante 60 s (desnaturalización), 51 a 54 °C durante 60 s (anelamiento), 72 °C durante 60 s (extensión) y finalmente se realizó una última extensión a 72 °C durante 5 min, en el termociclador.

#### PCR para el género *Moniliophthora* sp.

En cuanto al género *Moniliophthora* se utilizó la técnica de amplificación en cadena del ADN, con diferentes indicadores que permitieron establecer la especie de *Moniliophthora* de los aislados obtenidos.

**Tabla 5-3:** Conjuntos de primers utilizados en PCR para *Moniliophthora* sp.

Código	Secuencia
ITS5(Forward)	5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
ITS4 (Reverse)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Fuente: Zhou et al., 2021: p.5; Prabhakaran et al., 2014: p.4

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.

- **Programa usado para la amplificación por PCR para el género *Moniliophthora* sp.**

Desnaturalización inicial a 94 °C por 1 min y 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 45 s (anelamiento) y 72 °C por 1 min (extensión) y un ciclo final de 72 °C por 7 min.

### **Electroforesis**

La forma de comprobar si existió la amplificación de los productos de PCR fue realizando electroforesis. El gel para la electroforesis fue preparado con 0,6 g agarosa y 60 ml de agua destilada, al gel se le adiciono 2,5 µL de un agente intercalante (Nuclei Acid Staining Solution UniSafe Dye), colocado el gel en la cuba electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB-SB-710) e inmediatamente se añadieron los peines para formar los pocillos, una vez que se gelifico el gel se retiraron los peines y se adiciona a la cuba un volumen de 300 mL aproximadamente de Tris borato EDTA Buffer (TBE) a una concentración del 10%.

Sobre una cinta parafilm se colocaron 1,5 µL buffer de carga (10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer), más 1 µL de agua ultrapura estéril y 2,5 µL de los productos de PCR, estas muestras fueron colocadas en los pocillos y se corrió la electroforesis con un voltaje de 80 voltios durante 60 min. Terminada la electroforesis el gel fue colocado sobre el transluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A) y se procedió a observar si se amplificó el ADN.

*Nota:* en el primer pocillo se colocó una muestra de control para confirmar que el AND realmente se amplificó

### **Secuenciación**

Las muestras fueron secuenciadas con la tecnología SANGER en la empresa MACROGEN COREA.

### **Análisis de las muestras secuenciadas**

Con el programa Chromas Technelysium Pty Ltd versión 2.6.6 se visualizaron los electrofotogramas y se omitieron las partes de mala calidad, a continuación, las secuencias se exportaron al formato FASTA, las cuales con el uso de BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information) se realizaron las comparaciones de las secuencias mediante el % de identidad, % de cobertura, e-value, obtenidas con la de los bancos de datos.

### *3.6.5.5. Preservación de cultivos fúngicos puros mediante el método de Castellani*

Para la conservación se utilizó la metodología propuesta por Castellani, (1967: p. 181), a la cual se le realizaron ciertas modificaciones. La conservación se realizó cortando discos con un diámetro de 5 mm a los cultivos monospóricos, estos cortes se realizaron con la ayuda de fragmentos de sorbetes estériles. Con la ayuda de palillos estériles los discos se colocaron en microtubos de 2 mL previamente esterilizados, los cuales contenían agua destilada estéril con un volumen de 1,5 mL, la cantidad de discos colocados fueron de 5 a 8. Los microtubos debidamente etiquetados se almacenaron en cajas y se las almacenaron en el congelador.

### *3.6.5.6. Método de evaluación y registro de datos*

#### **Número de frutos o muestras**

Se elaboró una matriz de los frutos enviados para analizar, en los cuales se tomó en cuenta los siguientes parámetros: procedencia (cantón, parroquia, comunidad y propietario), fenotipo y número de frutos.

#### **Localidades**

Los datos climáticos requeridos se obtuvieron de la página web NASA-POWER, que proporciona datos meteorológicos de investigación de la NASA mediante satélites y la ubicación de las localidades altitud y las coordenadas geográficas (latitud y longitud) fueron tomadas como la ayuda de un Sistema de Posicionamiento Global (GPS).

#### **Análisis de diversidad fúngica asociada a los frutos de cacao.**

Las colonias fúngicas caracterizadas morfológicamente, cultural y molecularmente e identificadas fueron utilizados para el análisis de diversidad fúngica asociada a frutos de cacao, usando una matriz de abundancia relativa de géneros, posteriormente fueron agrupados en OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales). Los gráficos con la composición taxonómica de los géneros fueron realizados utilizando el programa R 4.1 (R Development Core Team) y las librerías ggplot. Los análisis de diversidad de hongos fueron calculados utilizando los Índices de Diversidad (ID). La diversidad Alfa (la diversidad que existe dentro de cada muestra) fue calculada utilizando la serie de Hill, que lleva en consideración el número efectivo de OTUs para calcular la riqueza ( $q=0$ ), diversidad de Shannon ( $q=1$ ) y la diversidad de Simpson ( $q=2$ ) usando la librería iNEXT en el programa R 3.6. La diversidad entre las diferentes localidades, fueron

analizadas posteriormente utilizando: estadística descriptiva, donde se utilizará descriptores como: media y mediana; y estos datos se compararon mediante gráficos de barras, y estadística no paramétrica.

## CAPÍTULO IV

### 4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1. Caracterización cultural y morfológica de los microorganismos fúngicos

**Morfotipo P:** *Penicillium* sp.

Los aislados del morfotipo de *Penicillium* sp. desarrollados en medio de cultivo PDA incubados en condiciones de oscuridad a 26°C por 14 días. Las colonias mostraron forma circular e irregular, elevación plana y rizada, el borde fue entero y crenado; mientras la superficie varió de rugosa a lisa. La coloración en el anverso fue verde oscuro y en el reverso varió de naranja a gris (**Tabla 6-4**) (**Ilustración 2-3**).

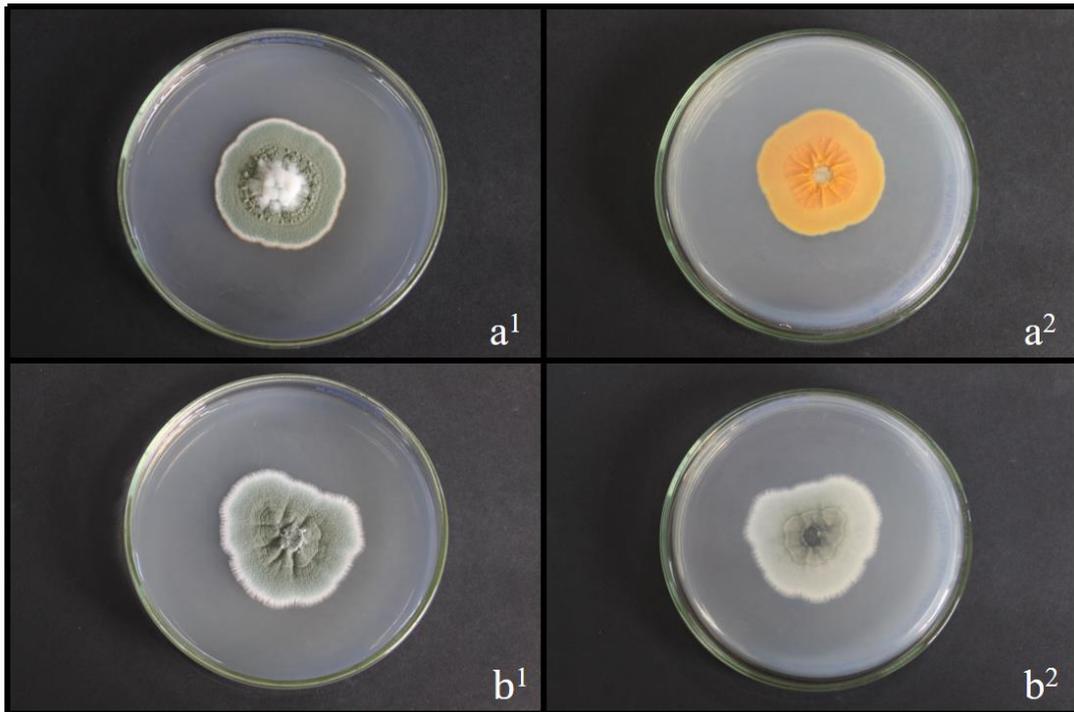
Las estructuras microscópicas observadas de los **Morfotipos P**, coinciden con las características presentadas para el género *Penicillium* sp. Los morfotipos presentaron hifas muy ramificadas con conidióforos ramificados biverticilados, estípites de paredes lisas, con forma de cepillo largo las cuales producen fiálidas de cuello estrecho y corto. Los conidios mostraron forma globosa y elipsoidal, con paredes lisas, unicelulares, las cuales se encontraban dispuestas en cadenas largas con un tamaño de 3,5 de 3,5  $\mu\text{m}$  x 3,25  $\mu\text{m}$  (**Ilustración 3-3**).

La caracterización molecular presentó los siguientes datos: el producto de PCR del morfotipo P1 tuvo un tamaño de 378 bp (pares de bases), el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 98,41%, con la accesión MK805460.1, que corresponde a el género *Penicillium* sp. El morfotipo P2 presentó un tamaño de 356 bp porcentaje de identidad del 99,72% con la accesión MT606192.1, que corresponde al género *Penicillium* sp. y como especie sugerida *Penicillium roqueforti* (**ANEXO D**).

**Tabla 6-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Penicillium* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de esporas ( $\mu\text{m}$ )	
							L	A
M.P1	Irregular	Plana	Entero	Rugosa	Verde oscuro	Naranja	4,75	4,35
M.P2	Circular	Rizada	Crenado	Lisa	Verde oscuro	Gris	3,5	3,25

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 2-4.** Características culturales de *Penicillium* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 3-4.** Características morfológicas de *Penicillium* sp., cultivado en medio PDA.

1a) Conidióforo penicilado 2a) ameroconidio/hialino

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Andrade (2021, p.07) menciona que el género *Penicillium* sp. presenta colonias de color verde grisáceo con bordes de color marrón claro y blanco en el frente y en el reverso una tonalidad marrón claro. Microscópicamente presentan conidióforos con ramas monoverticilados y biverticilados, cada rama produce de 2 a 4 fiálidas. Conidios catenulados, subglobosos o fuertemente elipsoidales, hialinos, lisos con  $1.5-3.0 \times 2.0-3.0 \mu\text{m}$  de tamaño, lo cual coincide con las características microscópicas observados en los Morfotipos P (**Ilustración 4-3**). Estas características también coinciden con lo expresado por Park (2020, p. 13) el cual menciona que *Penicillium* sp. posee conidióforos monoverticilados y biverticilados; estípites de paredes lisas, fiálides ampuliformes con conidios de paredes lisas, subglobosas hasta ampliamente elipsoidales.

El género *Penicillium* sp. está conformado por una abundante cantidad de especies, aproximadamente 200 lo cual lo convierte en uno de los grupos fúngicos más bastos, es mayormente reconocido por ser una fuente de antibióticos. Sin embargo, hay reportes de que *Penicillium* endófito coloniza sus nichos ecológicos y protege a su planta hospedera contra múltiples estreses al exhibir diversas funciones biológicas que pueden explotarse para innumerables aplicaciones, incluidas las agrícolas, biotecnológicas y farmacéuticas. Durante las últimas 2 décadas, las especies endófitas de *Penicillium* se han investigado más allá de su potencial antibiótico y se han informado numerosas aplicaciones. Se han informado efectos antifibróticos, neuroprotectores y actividades insecticidas y de biocontrol. Además, varios *Penicillium* sp. endófitos se han caracterizado como biocatalizadores, promotores del crecimiento vegetal, fitorremediadores y productores de enzimas (Toghueo y Boyom, 2020, p.106).

**Morfotipo T:** *Trichoderma* sp.

Los aislados de **Morfotipo T**, los cuales fueron cultivados en medio PDA con una temperatura de 26°C, incubados en oscuridad durante 14 días, presentaron colonias de forma irregular, elevación efusa y rizada, con una superficie concéntrica. La coloración que se observó fue desde verde oscuro a blanco en el anverso; mientras que, el reverso presentó colores que fueron de amarillo oro, blanco hueso y amarillo limón (**Tabla 7-4**) (**Ilustración 4-4**).

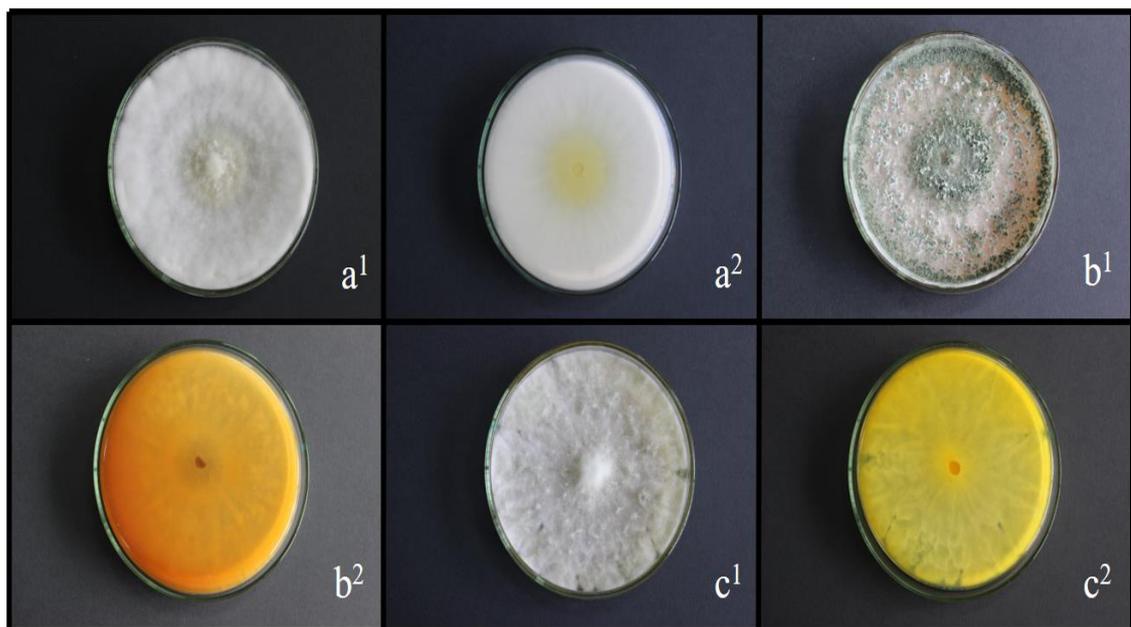
Las colonias del Morfotipo T, demostraron un rápido y abundante crecimiento micelial que en su mayoría es de color blanco e incluso amarillo, cuando las esporas aparecen denotan un color verde oscuro y verde amarillo. Microscópicamente se observaron hifas hialinas septadas, sus conidióforos fueron hialinos no verticilados, las fiálides eran singulares o en grupos mientras que sus conidios eran de forma ovalada, de color cerde oliva. El tamaño que presentaron las esporas fue de  $2,7 - 3,5 \mu\text{m} \times 2,7 - 2,8 \mu\text{m}$ . Estas características fueron similares a los que presentan las especies del género *Trichoderma* sp. (**Ilustración 5-4**).

La caracterización molecular presentó los siguientes datos: el producto de PCR del morfotipo T1 presentó un tamaño de 389 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100% con la accesión KJ783298.1 que corresponde al género *Trichoderma* sp. teniendo como especie sugerida *Trichoderma stilbohypoxyli*. El morfotipo T2 presentó un tamaño de 501 bp y un porcentaje de identidad del 100% con la accesión ON705517.1 que corresponde al género *Trichoderma* sp., y como especie sugerida está *Trichoderma harzianum*. El producto de PCR del morfotipo T5 presentó un tamaño de 575 bp y el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100% con la accesión KJ783298.1 que correspondió al género *Trichoderma* sp., teniendo como especie sugerida *Trichoderma harzianum* (ANEXO D).

**Tabla 7-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Trichoderma* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
M.T1	Irregular	Efusa	Filamentosa	Concéntrica	Verde oscuro	Amarillo oro	2,7	2,7
M.T2	Irregular	Rizada	Rizada	Concéntrica	Blanco	Blanco hueso	2,7	2,5
M.T5	Irregular	Rizada	Filamentosa	Concéntrica	Blanco	Amarillo limón	3,5	2,8

Realizado por: Quito, Dayse 2022.



**Ilustración 4-4.** Características culturales de *Trichoderma* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quito, D. 2022.



**Ilustración 5-4.** Características morfológicas de *Trichoderma* sp., cultivado en medio PDA. 1a) conidióforos verticilados.

**Realizado por:** Quitio, D. 2022.

Romero et al (2009, p. 12) menciona que la temperatura óptima para el crecimiento adecuado de *Trichoderma* sp. es de 20 a 28 °C. La colonia posee una superficie blanca en el anverso y en su reverso posee un color violeta, el poco crecimiento del micelio aéreo denota una superficie dura y áspera; sin embargo, con el pasar del tiempo el centro de la colonia se torna algodonoso, estas características coinciden con las observadas en las colonias asociadas a los morfotipos T (**Ilustración 5-3**). Los conidióforos al no poseer una etapa sexual poseen conidios asexuales y estos son producidos en grandes cantidades, poseen formas cilíndricas, subglobosas y cilíndricas, con paredes poco ásperas, y su tamaño es de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, estas se forman de células conidiógenas y fiálides. Estos hongos llegan a producir clamidosporas, con un tamaño de 15  $\mu\text{m}$ , de diámetro y adquieren una coloración verde (Martínez et al., 2015, p. 03).

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* sp., se encuentran distribuidas en una gran gama de ambientes y poseen diversas actividades biológicas. Estos hongos desempeñan un papel muy importante como descomponedores de materia orgánica, micoparásitos de patógenos y endófitos de plantas leñosas. La interacción endófitica que mantienen *Trichoderma* y su planta hospedante resulta compleja, ya que involucra demasiados pasos desde que entran en contacto hasta la colonización de los tejidos internos de la planta. En esta interacción el hongo puede comportarse como un agente inocuo o llegar a ser un simbiote ya que puede estimular el sistema

de defensa de la planta, lo que induce la resistencia de esta ante plagas y enfermedades, logra fomentar el crecimiento junto con la capacidad fotosintética y contribuir a la solubilidad de los nutrientes presentes en el suelo para la planta. Con el pasar de los años se han realizado varias investigaciones acerca de la diversidad y la taxonomía *Trichoderma*, lo que ha dado como resultado el descubrimiento de muchas especies nuevas (Vinale F, et al., 2008, p.04). Estudios han demostrado que especies del género *Trichoderma*: *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* aisladas en el hábitat donde se desarrollan las enfermedades del cacao, se presentan in vitro como supresores de la Moniliasis y Escoba de bruja (Souza, et al., 2006, p. 67).

**Morfotipo 1:** *Lasiodiplodia* sp.

Los aislados del Morfotipo 1 fueron sembrados en cultivos de medio PDA incubados en condiciones de oscuridad a una temperatura de 26°C y presentaron abundante micelio aéreo de rápido crecimiento, con forma filamentosa, elevación rizada, superficie radial y coloración tanto gris como blanco en el anverso y en el reverso un color negro y blanco lino (**Tabla 8-4**) (**Ilustración 6-4**).

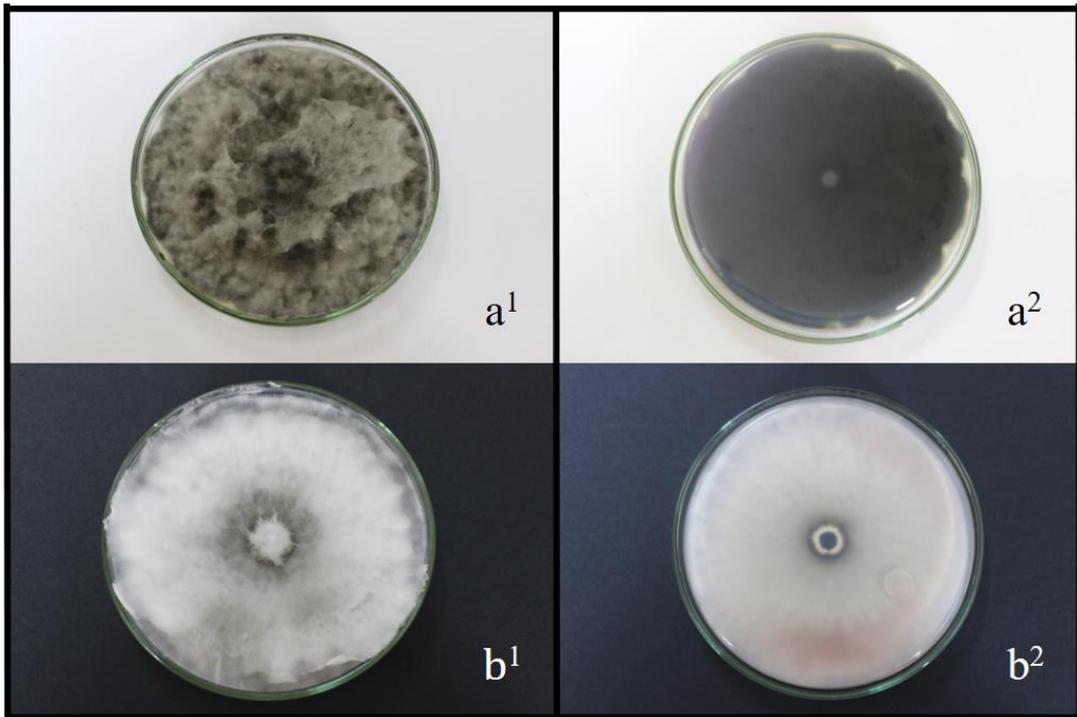
Se observaron hifas septadas de color café y se lograron observar conidios inmaduros. Estos conidios inmaduros en un inicio fueron hialinos, de doble capa, unicelulares, estos poseían una forma subovoide y elipsoide, con su ápice redondeado y su base truncada, con un tamaño de 5,7 µm de largo x 2,68 µm ancho. (**Ilustración 7-4**).

El producto de PCR del morfotipo M.1 presentó un tamaño de 382 bp y el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 99,84% con la accesión MN249167.1 que corresponde a el género *Lasiodiplodia* sp. No se realizó caracterización molecular del morfotipo con el código M.2 (**ANEXO D**).

**Tabla 8-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Lasiodiplodia* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
M.1	Filamentosa	Rizada	Filamentosa	Radial	Gris	Negro	-	-
M.2	Filamentosa	Rizada	Filamentosa	Radial	Blanco	Blanco lino	5,7	2,68

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 6-4.** Características culturales de *Lasiodiplodia* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 7-4.** Características morfológicas de *Lasiodiplodia* sp., cultivado en medio Agar-avena al 4%. 1a) ameroconidio subhialino/borde negro (inmaduros).

Realizado por: Quitio, D. 2022.

En medio de cultivo PDA las especies del género *Lasiodiplodia* sp. son capaces de crecer en temperaturas mínimas de 10°C hasta una máxima de 40°C, siendo la óptima de 25 a 35°C en condiciones de oscuridad, mostrando micelio aéreo que a medida que crece este pasa de moderado a denso, cuyo color va cambiando de blanco a gris humo tanto en el anverso y en el reverso, como se observó en el morfotipo 2 (**Ilustración 6-4**). En el estado asexual el *Lasiodiplodia* presenta conidiomas de 2 mm de diámetro, picnidios globosos, solitarios, separados, uniloculados, cubiertos de hifas negras, sumergidos a semisumergidos. Conidióforos hialinos, lisos, holoblásticos con un tamaño promedio de  $11 \times 3,7 \mu\text{m}$ , formando conidios en sus puntas. Los conidios son hialinos, con paredes gruesas, con forma ovoide redondeado en sus extremos, con el pasar del tiempo estos conidios maduran por lo que presentan un color marrón pálido, septados con tamaño promedio de  $31,3 \times 16,4 \mu\text{m}$  (Meng et al, 2021, p. 09).

Félix et al (2019, p. 21) comenta que el género fúngico *Lasiodiplodia* sp. son patógenos fúngicos de gran importancia económica ya que resultan muy destructivos. Son endófitos y patógenos latentes que residen dentro de los tejidos vasculares de las plantas sin denotar ningún síntoma a menos que existan las condiciones apropiadas para su desarrollo. De al existir las condiciones apropiadas dentro o fuera de la planta hospedera, este pasa de endófito a patógeno, por lo cual las especies de este género reciben la denominación de patógenos fúngicos oportunistas. Marsberg et al (2017, p. 17) menciona que entre los síntomas causados por las especies de este género se encuentran: el apareamiento de varios chancros, muerte regresiva y pudriciones de fruta y raíces, llegando a afectar a nivel mundial más de 500 especies de plantas, por ejemplo: cacao, mango papaya, pitahaya, entre otras (Úrbez et al, 2016, p 31).

### **Morfotipo 3: *Epicoccum* sp.**

Los aislados del morfotipo 3, presentaron características similares al género *Epicoccum* sp., estas colonias crecieron en un medio de cultivo PDA, a una temperatura de 26°C, en condiciones de oscuridad. Las colonias presentaron un crecimiento de forma irregular, con elevación rizada y efusa, con bordes filamentosos, rizados y ondulados y con superficies rugosas y onduladas. Poseen una coloración en el anverso que va desde amarillo oro, amarillo, café blanco crema y beige claro; mientras que, en el reverso poseen una coloración de rojo caoba, amarillo y negro. (**Tabla 9-4**) (**Ilustración 8-4**).

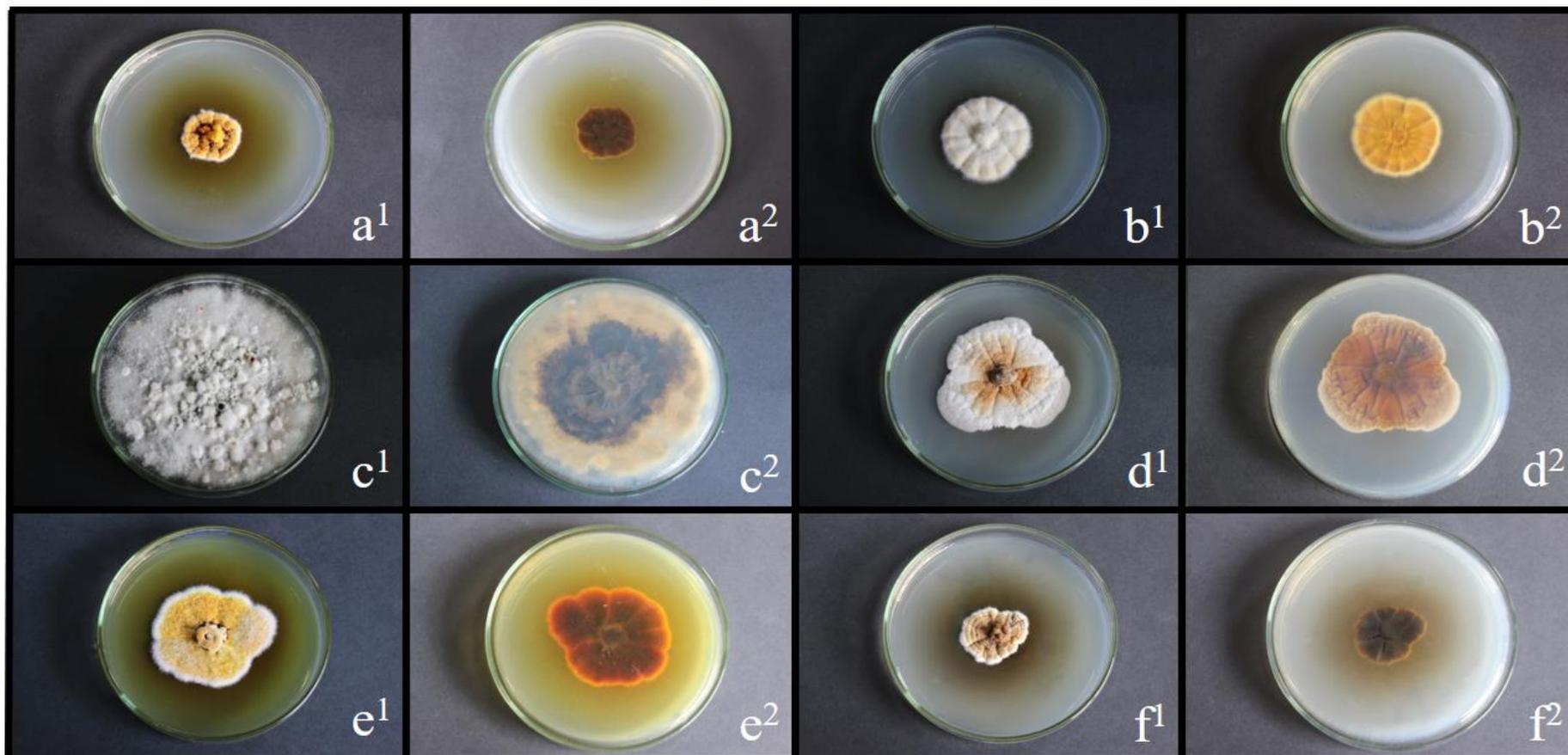
Presentaron conidióforos cortos. Los conidios poseen una forma muriforme, cuya pigmentación es amarillo oscuro, con un tamaño que va desde  $12,5 - 15,25 \mu\text{m}$  de largo x  $10 - 13,25 \mu\text{m}$  de ancho. Estas características concuerdan con las que presentan las especies de género *Epicoccum* (**Ilustración 9-4**).

La caracterización molecular presentó los siguientes datos: El producto de PCR del morfotipo M.9 tuvo un tamaño de 362 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100%, con la accesión MH397098.1, que corresponde al género *Epicoccum* sp. y la especie sugerida fue *Epicoccum nigrum*. Del morfotipo M.15, el tamaño del producto PCR fue 470 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 99,79%, con la accesión MG832438.1, que corresponde a el género *Epicoccum* sp. En cuanto al morfotipo M.7, mostró un tamaño de 450 bp, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad del 100%, con la accesión MG832438.1, que corresponde al género *Epicoccum* sp. El producto de PCR del morfotipo M.4 tuvo un tamaño de 517 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 99%, con la accesión MG832438.1 que pertenece al género *Epicoccum* sp. El morfotipo M.5 presentó un tamaño de 403 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 99,26%, con la accesión MG832438.1, que corresponde al género *Epicoccum* sp. Finalmente el producto de PCR del morfotipo M.11 tuvo un tamaño de 364 bp, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad del 98,9% con la accesión MG832438.1, que corresponde al género *Epicoccum* sp. (ANEXO D).

**Tabla 9-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Epicoccum* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de esporas (µm)	
							L	A
M.9	Irregular	Rizada	Filamentoso	Rugosa	Amarillo oro	Rojo caoba	-	-
M.15	Irregular	Rizada	Rizada	Ondulada	Amarillo	Amarillo	-	-
M.7	Irregular	Rizada	Rizada	Ondulada	Blanco crema	Negro (int) Crema (ext)	-	-
M.4	Irregular	Rizada	Rizada	Rugosa	Beige claro	Café	-	-
M.5	Irregular	Efusa	Ondulada	Ondulada	Amarillo oro	Rojo caoba	12,5	10
M.11	Irregular	Rizada	Rizada	Ondulada	Café	Negro	-	-

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 8-4.** Características culturales de *Epicoccum* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 9-4.** Características morfológicas de *Epicoccum* sp., cultivado en medio SNA con acículas de pino. 1a) Dictioconidio/café.

**Realizado por:** Quitio, D. 2022.

De Lima et al. (2011, p.02) menciona que las especies pertenecientes al género *Epicoccum* sp., crecidas en medio de cultivo PDA presentan un crecimiento micelial aéreo moderado, cuyos márgenes son irregulares con colores que van desde color naranja intenso a blanco, café y negro en su anverso y en el reverso denota un color que va desde naranja a rojo oscuro. Las colonias forman conidióforos en esporodocios. Conidios con tamaños de 17,69 a 26,69  $\mu\text{m}$  de largo y 12,81 a 20,13  $\mu\text{m}$  de ancho, lo cual coincide con los dictioconidios observados del morfotipo 5 (**Ilustración 9-4**).

*Epicoccum* sp. es un género perteneciente a la división de ascomycetos, se encuentra en el suelo, la filosfera y en la madera. Este género es especialmente saprofito, los cuales se aíslan de casi todos los posibles sustratos terrestres y marinos alrededor del mundo (Peng et al., 2012, pp. 247-257). De Lima et al (2012, p.07) corrobora este concepto mencionando que *Epicoccum* sp. es un género de hongos distribuidos en todo el mundo. Estos son posibles endófitos que habitan en la caña de azúcar, frijoles, papas, guisantes y duraznos. Este género es conocido también por su actividad de biocontrol contra patógenos de su plantas, especialmente en el girasol, manzana, algodón y melocotón.

Se ha caracterizado de forma química un pigmento amarillo soluble en agua el cual demuestra una fuerte actividad antifúngica y es creado por *E. nigrum* (Kiruma y Furui, 2002, p. 28). Se sabe que *E. nigrum* llega a producir varios metabolitos secundarios que poseen actividad antifúngica, lo

que ha llevado a que se intenten desarrollar productos de control biológico derivados de esta especie. Varios de los metabolitos producidos por *E. nigrum* ya han sido caracterizados, siendo la flavipina (3,4,5-trihidroxi-6-metil-O-ftalaldehído), la cual presenta una fuerte actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias, junto a flavipina también tenemos las; epicoccins, epicorazines y epirodin los cuales igualmente presentan actividad antimicrobiana. Por otro lado, tiorcina y epicoccamidas son reportadas como poseedoras de propiedades antitumorales (Bell y Karuso, 2003, p. 125).

**Morfotipo 16:** *Clonostachys* sp.

Las colonias que pertenecen al morfotipo 16, presentaron características que coinciden con las del género *Clonostachys* sp., estas colonias fueron incubadas a 26°C, en condiciones de oscuridad, durante 15 días y crecieron en medio de cultivo PDA. Presentaron en la mayoría de morfotipos un micelio de coloración amarillenta con aspecto granuloso en el anverso y en el reverso se observó una coloración blanca y café oscura. Las formas de estas colonias fueron irregulares, circular y rizoide, la elevación fue rizada, mientras el borde de las colonias fue tanto rizada, crenada y convexa, además su superficie fue concéntrica (**Tabla 10-4**) (**Ilustración 10-4**).

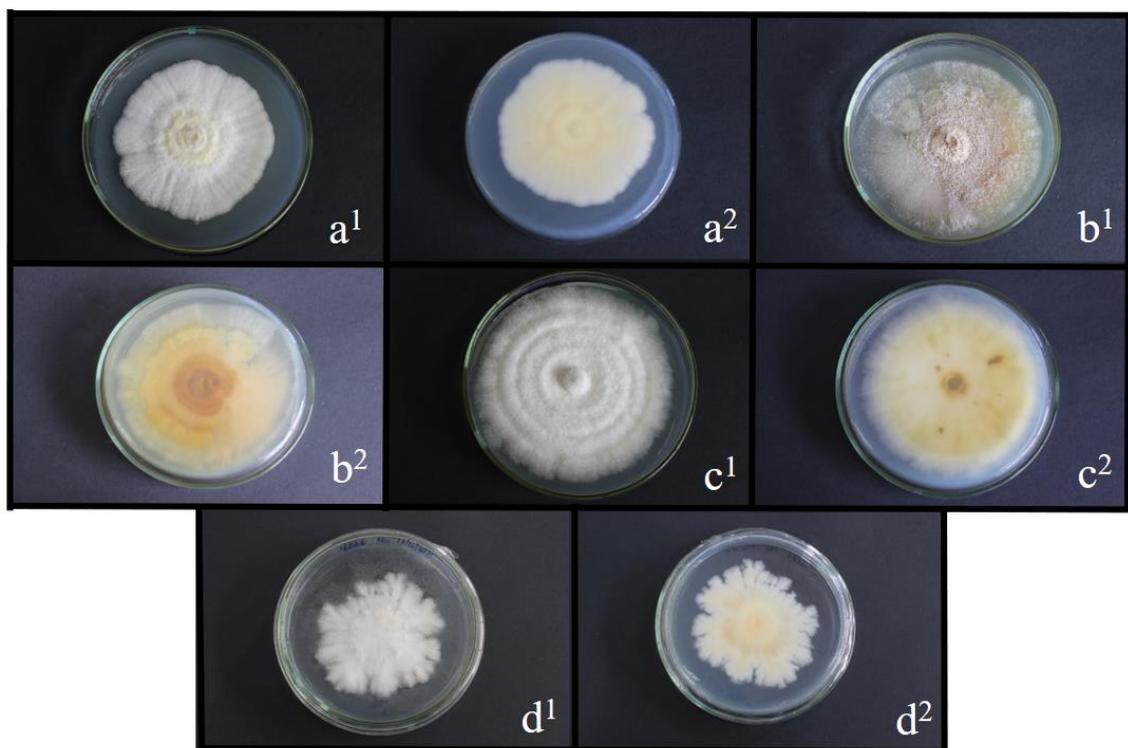
A través del microscopio se observaron fiálides alargadas, las cuales en su ápice formaron los conidióforos verticilados y penicilados. Los conidios cuya forma varió de subglobosos a elipsoidales, poseen un tamaño de 7,78 – 6,31 µm de largo x 4,38 – 2,9 µm de ancho (**Ilustración 11-4**). Estas características coinciden con el género *Clonostachys* sp.

La caracterización molecular mostró que el producto PCR del morfotipo M.16 tuvo un tamaño de 461 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad de 99,57% con la accesión MT448899.1, que corresponde al género *Clonostachys* sp. y la especie sugerida fue *C. rosea*. El morfotipo M.17 tuvo un tamaño de 378 bp del producto PCR, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad del 99,47% con la accesión KY413696.1 que corresponde al género *Clonostachys* sp. El producto de PCR del morfotipo M.21 tuvo un tamaño de 384 bp el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 99,74% con la accesión NR\_168235.1, que pertenece a el género *Clonostachys* sp. y la especie sugerida fue *C. eriocamporesiana*. El morfotipo M.18 no fue caracterizado molecularmente (**ANEXO D**).

**Tabla 10-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Clonostachys* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de esporas (µm)	
							L	A
M.16	Irregular	Rizada	Rizada	Concéntrica	Blanco	Amarillo narciso	6,5	3
M.17	Circular	Rizada	Crenada	Concéntrica	Café claro	Amarillo oro	7,78	4,38
M.18	Circular	Rizada	Convexa	Concéntrica	Blanco	Amarillo rubio	7,18	2,83
M.21	Rizoide	Rizada	Rizada	Concéntrica	Blanco	Blanco	6,31	2,9

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 10-4.** Características culturales de *Clonostachys* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 11-4.** Características morfológicas de *Clonostachys* sp., cultivado en medio Agar-avena. 1a) Conidióforo penicilado 2a) Conidióforo verticilado.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Las especies pertenecientes al género *Clonostachys* sp., muestran un crecimiento adecuado en medio PDA a una temperatura óptima de 24 a 26°C en oscuridad continua, las colonias poseen un color blanco a azafrán en la superficie, como se observa en los morfotipos asociados al género *Clonostachys* (**Ilustración 10-4**). Presentan hifas hialinas, células conidiógenas fiálides, las cuales en su mayoría son solitarias, fiálides de un tamaño de 19 – 48 x 1-2 µm, las cuales se van estrechando en el ápice hasta alcanzar un tamaño de 1µm. Los conidios se producen de manera individual en las puntas de las fiálides y se agrupan en cabezas viscosas (**Ilustración 11-3**), con forma cilíndrica que en sus extremos son redondeados, estas poseen un tamaño que va desde 3 – 7 µm de largo x 1 – 2 µm de ancho (Ebrahimi, 2016, p. 29). Perdonomo et al., (2011, p.11) comenta que se forman clamidosporas unicelulares y adelofiálides, estas se llegan a formar individualmente; sin embargo, en ocasiones se dan en cadenas cortas, estas presentan un tamaño de 4–7 × 3–6 µm.

Schroers (2001, p. 21) indica que *Clonostachys* sp., es un género que se encuentra comúnmente en hábitat de regiones tropicales y subtropicales, y son muy reconocidos como habitantes del suelo, descomponedores de plantas y endófitos. Debido a la capacidad que posee de suprimir la esporulación de hongos fitopatógenos, colonizar tejidos senescentes o muertos, promover el crecimiento de las plantas y lograr inducir resistencia en estas, *Clonostachys* es reconocido como un importante agente de control biológico. Zhao et al (2021, p. 10), corrobora este concepto mencionado que el género *Clonostachys* sp., comprende a hongos micoparásitos los cuales

contribuyen al control biológico de enfermedades fúngicas de plantas y nematodos. Estos habitan en regiones tropicales y templadas, en el suelo, hongos y árboles agónicos u hojas podridas, también, aunque en menor parte son parásitos mixomicetos, nematodos, garrapatas, moluscos y arañas. En este género se han caracterizado aproximadamente unas 92 especies. Algunas especies de este género han sido desarrolladas comercialmente para lograr un control biológico de los patógenos en las plantas, en especial la especie más reconocida es para este fin es *C. rosea*.

Los hongos del género *Clonostachys* producen metabolitos secundarios muy diversos con actividades biológicas que son aplicables para la obtención de productos agroquímicos, se conocen al menos 229 metabolitos secundarios producidos por este género incluidos principalmente 84 metabolitos que contienen nitrógeno, 85 policétidos, 40 terpenoides y otros 20 metabolitos, muchos de estos metabolitos denotan actividades biológicas, tales como: antimicrobianas, insecticidas, nematocidas, antiparasitarias, fitotóxicas y citotóxicas (Han et al, 2020, p. 229).

**Morfotipo 22:** *Fusarium* sp.

Los aislados del morfotipo 22, fueron cultivadas en medio PDA, en condiciones de oscuridad a una temperatura de 26°C, estos aislados poseen una forma circular e irregular, con una elevación rizada y efusa, un borde crenado y con superficies rugosas y crenadas. Presentaron tonalidades blancas, rosadas y amarillas en el anverso y en el reverso presentaron una tonalidad que varía de negra, café, rosada y amarilla. (**Tabla 11-4**) (**Ilustración 12-4**).

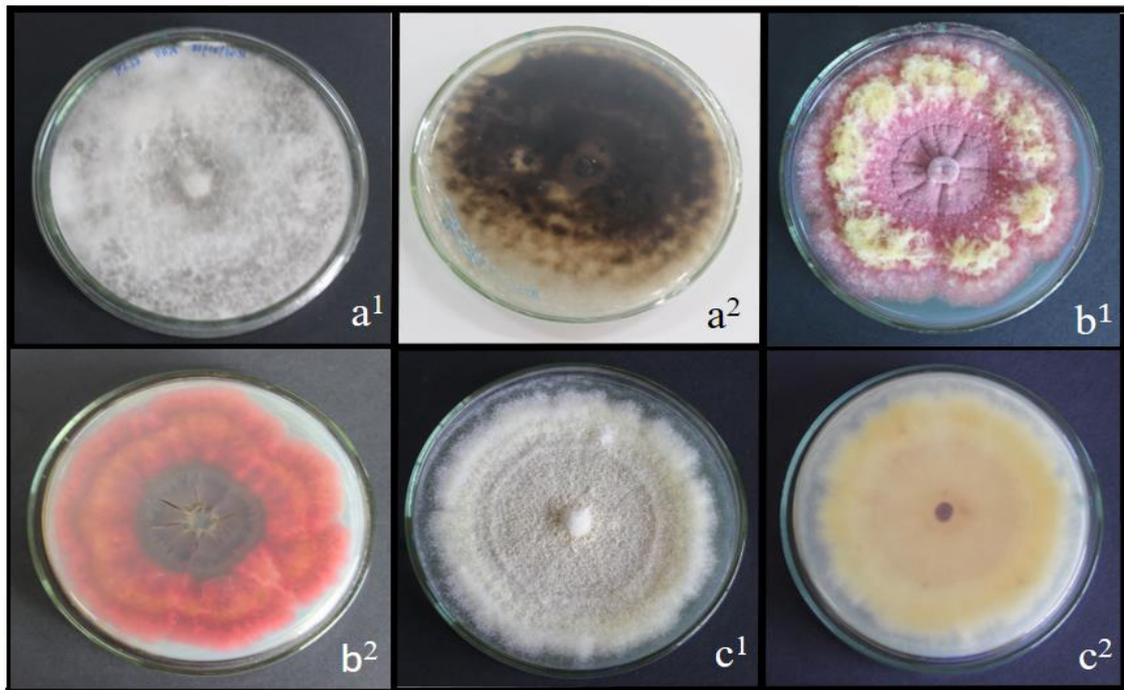
Las colonias del morfotipo 22, mostraron fialídes simples con forma de botella, mono-fialídica, finas y largas. Los macroconidios poseen una forma de medialuna, visiblemente septados, hialinos, con un tamaño de 20 µm de largo x 5,1 µm de ancho. Los microconidios poseen forma fusiforme y su tamaño es de 7,78 µm de largo x 3,1 µm de ancho. (**Ilustración 13-4**). Estas características concuerdan con el género *Fusarium* sp.

La caracterización molecular presento los siguientes datos; el producto de PCR del morfotipo M.22 presentó un tamaño de 450 bp el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100%, con la accesión MN602837.1 que corresponde al género *Fusarium* sp. El morfotipo M.23 tuvo un tamaño de 465 bp del producto PCR, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad del 100% con la accesión MT603307 que corresponde al género *Fusarium* sp., siendo la especie sugerida *Fusarium fujikuroi*. El producto de PCR del morfotipo M.27 tuvo un tamaño de 514 bp el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100% con la accesión MN602837.1 que pertenece al género *Fusarium* sp. (**ANEXO D**).

**Tabla 11-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Fusarium* sp.

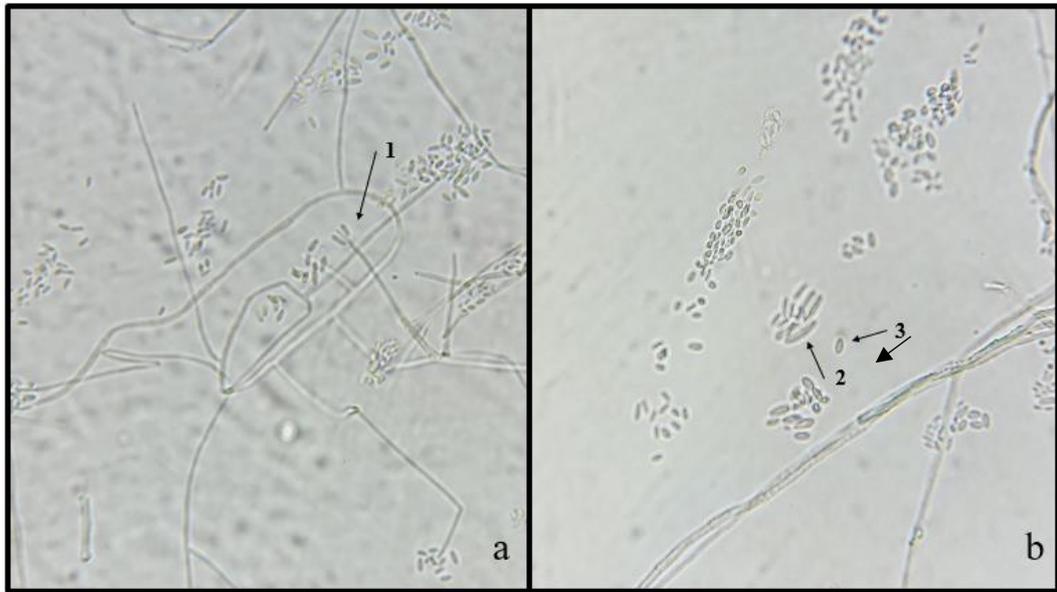
Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de esporas (µm)	
							L	A
M.22	Circular	Rizada	Crenada	Rugosa	Blanco	Negro	-	-
M.23	Irregular	Rizada	Crenada	Rugosa	Rosado	Café y Rosado	-	-
M.27	Circular	Efusa	Crenada	Crenada	Amarillo y Blanco	Amarillo	7,78	3,1

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 12-4.** Características morfológicas de *Fusarium* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 13-4.** Características morfológicas de *Fusarium* sp., cultivado en medio PDA.

1a) Conidióforo con monofialide, 2b) Macroconidios (Fragmoconidio) hialino 3b) Ameroconidio hialino.

**Realizado por:** Quitio, D. 2022.

Monzón y Rodríguez (2003, p.03) comentan que las colonias de este género poseen un crecimiento rápido, el micelio aéreo generalmente es abundante, con aspecto algodonoso y que dependiendo de la especie los colores que estas manifiesten serán muy diferentes, los colores pueden variar de púrpura, rojo, crema, blanco, entre otros, en el estudio realizados se observaron colonias con las mismas tonalidades descritas (**Ilustración 12-4**). Tapia y Amaro (2014, p.86), mencionan que *Fusarium* sp, presentan fiálides con forma de botella, las cuales son finas y pueden estar ramificadas o simples, cortas o largas. También se observan macroconidios con formas de medialuna, septados e hialinos, para conseguir una clasificación adecuada es necesario conocer el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides y detalles de las células de los extremos. Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), en cadenas largas o corta. Estas descripciones son corroboradas por Del Ponte et al., (2017: pp.69-75), y Balmas et al., (2000: pp.16-22,36). Las especies del género *Fusarium* son de particular importancia ya que pueden propagarse de manera eficiente a lo largo de las rotaciones de cultivos y, a menudo, infectan una amplia gama de plantas en diversas condiciones ambientales. La prevalencia, el dominio y la importancia de los patógenos individuales pueden variar mucho según la ubicación, el clima y la práctica agrícola (Finckh, 2015, pp. 29-31).

**Morfotipo 28:** *Alternaria* sp.

Los aislados del morfotipo\_28, presentaron características similares al género *Alternaria* sp., los cuales crecieron en medio PDA por 20 días, a una temperatura de 26°C, en condiciones de oscuridad. Las colonias presentaron forma circular, una elevación rizada y efusa, un borde ondulado y rizado, la superficie fue concéntrica y lisa, coloración gris y negra en el anverso, y en su reverso poseen una coloración negra y gris. Los conidios mostraron un tamaño de 41,33 µm x 10 µm. (Tabla 12-4) (Ilustración 14-4).

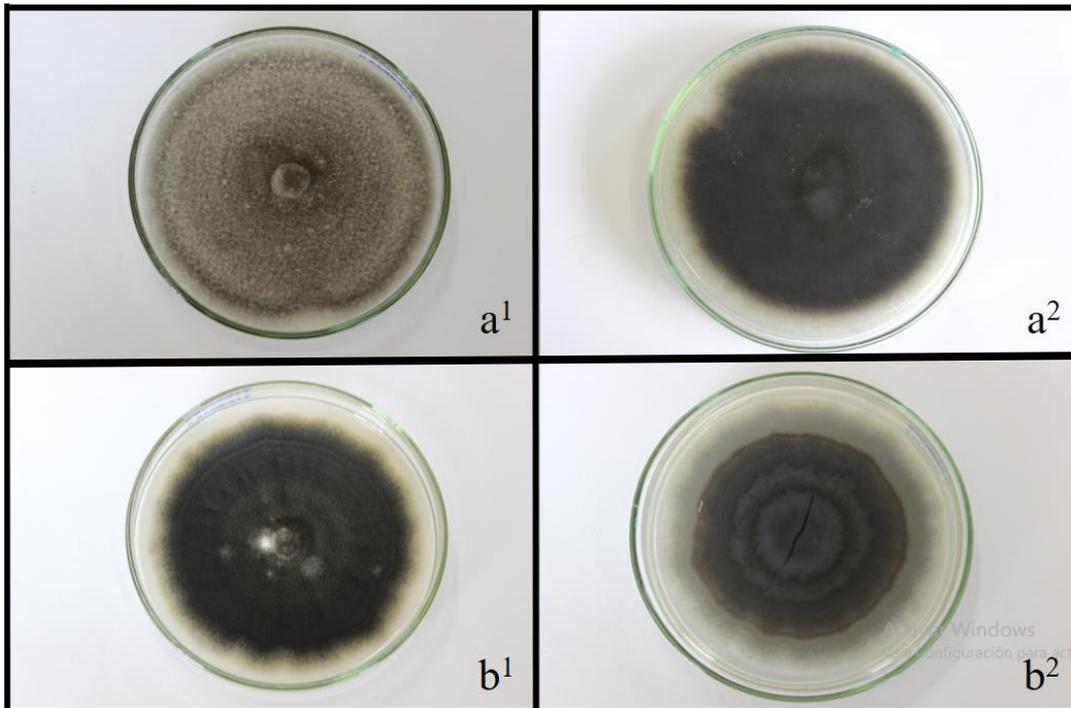
En los aislados del morfotipo 28, se observaron conidióforos septados con paredes lisas. Dictioconidios melanizados con color café, únicos con forma ovoide y obclavada que se van estrechando hacia el ápice, estos se encuentra septados verticalmente y transversalmente. Estas características son comunes del género *Alternaria* sp. (Ilustración 15-4).

El producto de PCR del morfotipo M.28 presentó un tamaño de 491 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100%, con la accesión OW986459.1, que corresponde al género *Alternaria* sp. y la especie sugerida fue *Alternaria alternata*. En cuanto al morfotipo M.29, el producto del PCR tuvo un tamaño de 399 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100%, con la accesión MT636979.1, que corresponde al género *Alternaria* sp (ANEXO D).

**Tabla 12-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Alternaria* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
M.28	Circular	Rizada	Ondulada	Concéntrica	Gris	Negro	-	-
M.29	Circular	Efusa	Rizada	Lisa	Negro	Gris	41,33	10

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 14-4.** Características culturales de *Alternaria* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 15-4.** Conidios septados pertenecientes a *Alternaria* sp., crecidos en medio Agar-avena al 4%. 1a) y 2b) Dictioconidia/melanizados: café.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Rivas (2014, p. 605) menciona que el género *Alternaria* sp, presenta conidios únicos o en cadenas acropétalas con forma ovoide u obclavada, septados longitudinalmente y transversalmente. El conidióforo es redondo y se estrecha hacia el ápice, estas descripciones coinciden con la aportada por Fabrega (2002, p. 357), donde comenta que los conidios del género *Alternaria* sp, se caracterizan

por tener una forma oblonga y ovoide, septados longitudinal y transversalmente, estas características coinciden con las observadas en el morfotipo 29 (**Ilustración 15-4**).

Las especies pertenecientes al género *Alternaria* sp, son hongos ubicuos y saprófitos, de gran importancia en la agricultura ya que es responsable de graves enfermedades en varios cultivos de gran importancia económica; debido a su adaptabilidad ambiental, en particular a su tolerancia a las bajas temperaturas y las condiciones de estrés hídrico, estas especies generalmente provocan enfermedades de manchas foliares, especialmente en vegetales y flores ornamentales (Nishikawa, 2015, pp. 141-149). Estas especies producen un cóctel de metabolitos secundarios y hasta el momento se han caracterizado más de 70 toxinas, estas toxinas pertenecen al grupo de las llamadas micotoxinas “emergentes”. Son compuestos de preocupación debido a su abundancia, presencia o toxicidad, pero los datos disponibles limitados no permiten una evaluación de riesgos exhaustiva con un grado aceptable de certeza (Berthiller et al, 2013, p.16).

**Morfotipo 31:** *Diaporthe* sp.

Las colonias del morfotipo 31, fueron cultivadas en medio PDA, incubadas en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 26°C durante 20 días. Las formas que estas colonias presentaron fueron circulares e irregulares, elevación rizada, borde rizado, superficies concéntricas, onduladas y radiales. El color de las colonias en su anverso fue blanco, y en el reverso la tonalidad varía de blanco, negro y naranja. El tamaño de los conidios fue de 13,5 µm de largo x 5,7 µm de ancho (**Tabla 13-4**) (**Ilustración 16-4**).

Los aislados del morfotipo 31, cultivados en medio SNA, incubados a 26°C, en condiciones de oscuridad, presentaron micelio aéreo blanco, esponjoso y denso; sin embargo, con el pasar del tiempo se tornó marrón en el centro donde se formaron los conidiomas picnidiales, solitarios o agrupados, globosas. A los 20 días de incubación se observaron en el microscopio conidios alfa; elipsoidales, redondeados en los extremos, hialinos, la base y el ápice se observaron gúttulas, el tamaño que mostraron los conidios fue de 13,5 µm x 5,7 µm. No se observaron conidios beta (**Ilustración 17-4**).

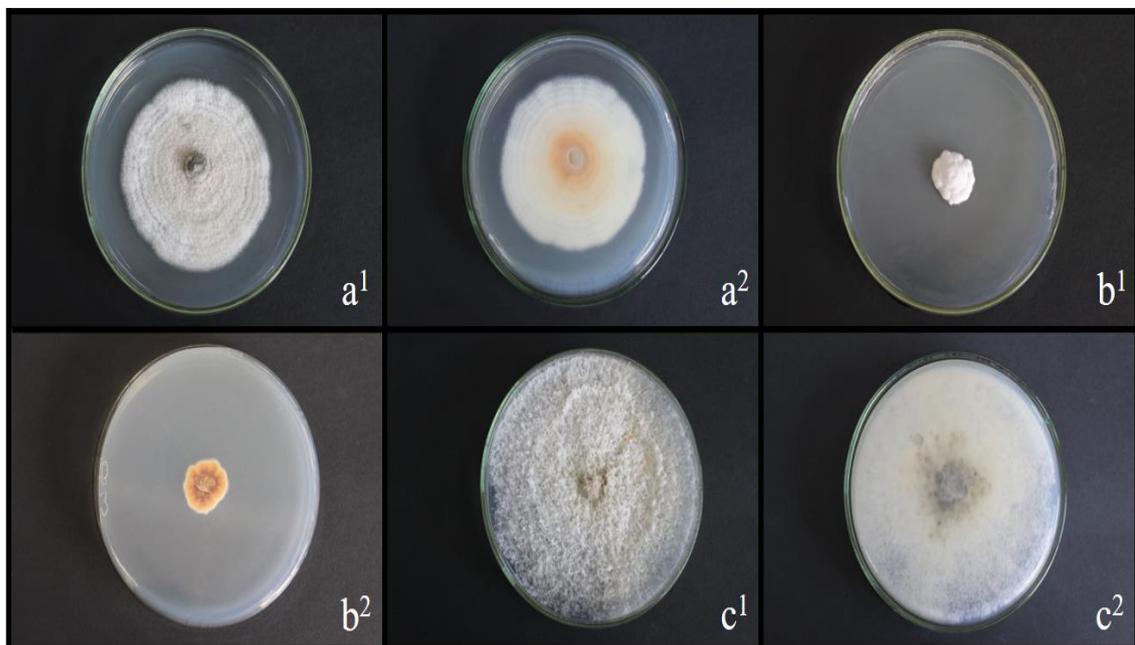
La caracterización molecular presentó los siguientes datos: el producto de PCR del morfotipo M.31 presentó un tamaño de 410 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100% con la accesión MT611201.1 que corresponde al género *Diaporthe*. El morfotipo con el código M.32 presentó un tamaño de 428 bp y un porcentaje de identidad del 99,77% con la accesión KM266297.1 que corresponde al género *Diaporthe*. El producto de PCR del morfotipo

M.34 presentó un tamaño de 403 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad de 98,14%, con la accesión KU977877.1 que corresponde al género *Diaporthe* (ANEXO D).

**Tabla 13-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Diaporthe* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de esporas (µm)	
							L	A
M.31	Circular	Rizada	Rizada	Concéntrica	Blanco	Blanco	13,5	5,7
M.32	Irregular	Rizada	Rizada	Ondulada	Blanco	Naranja	-	-
M.34	Irregular	Rizada	Rizada	Radial	Blanco	Blanco-negro interior	9,5	4,5

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 16-4.** Características culturales de *Diaporthe* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 17-4.** Características morfológicas de *Diaporthe* sp., cultivado en medio SNA 1a) Ameroconidio/hialiano (Conidios alfa).

**Realizado por:** Quitio, D. 2022.

El género *Diaporthe* sp., presenta picnidios superficiales en PDA, dispersos, de color marrón oscuro a negro, globosos, solitarios o agrupados en grupos de 3–5 picnidios. Conidios alfa bigutulados, hialinos, fusiformes u ovalados, ambos extremos obtusos  $6,8 \times 2,5 \mu\text{m}$ , como los que se observaron del morfotipo 34 (**Ilustración 17-4**). Los Beta conidios aseptados, hialinos, ganchosos, filiformes, gutulados, estrechándose hacia ambos extremos  $20\text{--}32 \times 1\text{--}1,5 \mu\text{m}$  (Mena et al., 2019, p.20).

Las especies pertenecientes al género *Diaporthe* y su forma asexual *Phomopsis* son endófitas, patógenas y saprobias en una amplia gama de hospederos en todo el mundo. Son patógenos bien conocidos en cultivos económicamente importantes. Son las causantes de varias enfermedades comunes, entre ellos: la muerte regresiva de los árboles forestales, manchas en las hojas de té, tizón de las hojas y las vainas, la pudrición de las semillas de la soja, melanosis, pudrición del extremo del tallo y gomosis en *Citrus* sp. y cancro del tallo del girasol (Yang et al., 2018, p.08). El género *Diaporthe* sp. y sus anamorfos *Phomopsis* están constituidos tanto por especies patógenas como endófitas pero algunos reportes muestran su participación en la promoción del crecimiento vegetal. Estudios demostraron que una cepa de *Diaporthe* aislada de las raíces de un pasto halófito promueve el crecimiento de dos pastos agrícolas, el tritordeum y el raigrás perenne aumentando la absorción de nutrientes y debido a la producción del ácido indol 3-acético. La mejora del crecimiento y la absorción de nutrientes podría deberse al hecho de que *Diaporthe* produce varias

enzimas extracelulares capaces de degradar las reservas de nutrientes orgánicos y sideróforos que mejoran la absorción del hierro (Toghueo, Rufin M. K. et al., 2022, p. 11).

**Morfotipo 36:** *Neopestalotiopsis* sp.

La colonia del morfotipo 36 presentan características similares al género *Neopestalotiopsis* sp. Este aislado creció en medio PDA por 20 días en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 26°C, posee una coloración blanca con tonalidades amarillas en el anverso y un color amarillo oro en el reverso. La forma de la colonia fue irregular, con una elevación efusa, cuyo borde fue crenado y su superficie fue concéntrica. El tamaño de los conidios fue de 16,8 µm x 6,8 µm (**Tabla 14-4**) (**Ilustración 18-4**).

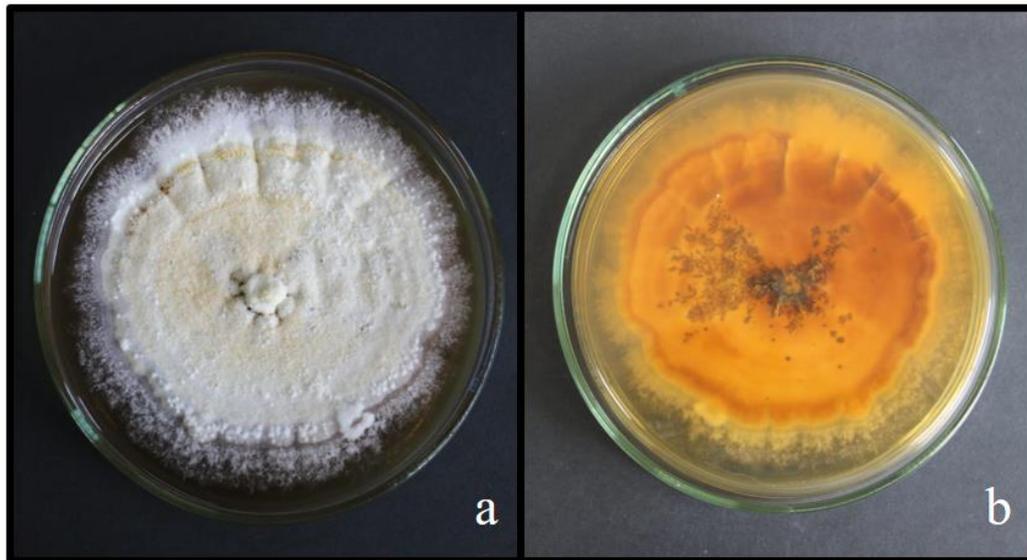
El aislado de *Neopestalotiopsis* sp, presentó conidios septados de forma elipsoidal, con apéndices hialinos tanto en la base como en el ápice, el color de los septos vario de tonos café a negros. Los conidios poseen un tamaño es de 16,8 µm de largo x 6,8 µm de ancho µm (**Ilustración 19-4**)

La caracterización molecular mostró que el producto de PCR del morfotipo M.36 tuvo un tamaño de 376 bp, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad del 100% con la accesión ON791162.1 que corresponde al género *Neopestalotiopsis* (**ANEXO D**).

**Tabla 14-4:** Características culturales de los morfotipos asociados a *Neopestalotiopsis* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de esporas (µm)	
							L	A
M.36	Irregular	Rizada	Crenada	Concéntrica	Blanco con tonalidades amarillas	Amarillo oro	16,8	6,8

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 18-4.** Características culturales *Neopestalotiopsis* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 19-4.** Características morfológicas de *Neopestalotiopsis* sp., cultivado en medio PDA. 1a) Fructoconidia/café y negro 2ª) Apéndices hialinos.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

López (2021, p. 36) indica que el crecimiento de este género es irregular, con elevación plana o irregular, el micelio presenta color blanco o marrón y con el pasar del tiempo este se torna

amarillo. Hidrobo (2020, p.35) mencionan que los conidios de *Neopestalotiopsis* sp son de forma elipsoidal, multiseptados, con apéndices en los extremos, estos son hialinos y los septos centrales muestran un color café o verde oliva, con un tamaño promedio de 29,60  $\mu\text{m}$  x 5,65  $\mu\text{m}$ , lo cual es corroborado por Zambrano (2017, p. 49). Estas características coinciden con las observados en las colonias del morfotipo\_36 (**Ilustración 19-4**), con lo cual se puede garantizar que esta pertenece al género *Neopestalotiopsis* sp.

Las especies del género *Neopestalotiopsis* sp, son patógenos de gran importancia en la agronomía; pues, producen tizón en las hojas de diversas plantas y poscosecha provoca pudrición en los frutos (Ruvishika et al., 2016, p. 64). Los síntomas comunes de estos patógenos incluyen la pudrición de la fruta, el tizón de la hoja, la mancha de la hoja, la pudrición del tallo, el tizón gris, el cancro costroso y la pudrición poscosecha. Ejemplos de importantes especies fitopatógenas son; *N. piceana* y *N. samarangensis*. La pudrición de la raíz de la fresa es causada por *Neopestalotiopsis* sp. (Darapanit et al, 2021, p.03).

#### **Morfotipo 39:** Xylariaceae

El aislado del morfotipo 39, fue cultivado en medio PDA, a una temperatura de 26°C, en condiciones de oscuridad durante 20 días. Este aislado presentó una forma de crecimiento irregular, cuya elevación fue rizada, el borde fue filamentosos, con una superficie concéntrica. El color en el anverso fue café y en su reverso el color fue rojo caoba. El tamaño de los conidios fue de 5  $\mu\text{m}$  x 3,74  $\mu\text{m}$ . (**Ilustración 20-4**) (**Tabla 15-4**).

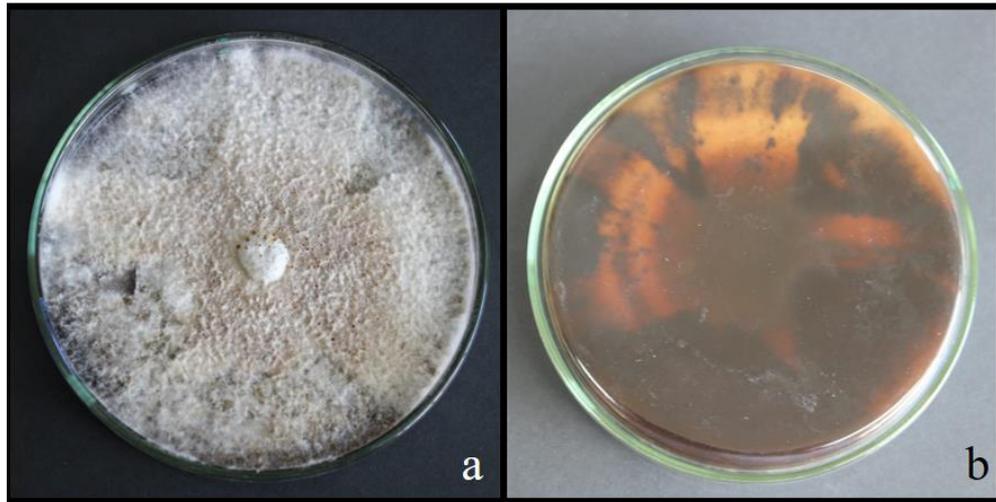
El aislado del morfotipo 39, presentó ameroconidios subhialinos; de color marrón, con forma elipsoidal siendo en los extremos estrechamente redondeadas, con un tamaño de 5  $\mu\text{m}$  de largo x 3,75  $\mu\text{m}$  de ancho, estas características coinciden con familia Xylariaceae. (**Ilustración 21-4**).

La caracterización molecular presentó que el producto de PCR del morfotipo M.39 tuvo un tamaño de 476 bp, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad del 99,79% con la accesión MT261908.1 que corresponde a la familia Xylariaceae (**ANEXO D**).

**Tabla 15-4:** Características culturales de los morfotipos asociados a la familia *Xylariaceae*.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de espora ( $\mu\text{m}$ )	
					Color del Anverso		L	A
M.39	Irregular	Rizada	Filamentosa	Concéntrica	Café	Rojo caoba	5	3,75

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 20-4.** Características culturales de *Xylariaceae*, cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 21-4.** Características morfológicas de *Xylariaceae*, cultivado en medio PDA. 1a) Ameroconidia inmaduro/hialino.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Medina (2020, p. 10) menciona que las características de esta familia presentan conidios de color castaño oscuro, de paredes lisas, cilíndricas pero asimétricas, algo curvadas y con los extremos estrechos y redondeados, como se observó en la colonia asociada al morfotipo 39 (**Ilustración 21-4**). *Xylariaceae* es la familia más grande del orden *Xylariales*, a pesar de que su distribución es cosmopolita, la mayor diversidad de esta familia se encuentra en la regiones tropicales y subtropicales (Torta et al, 2022, p. 02). Las especies de esta familia comúnmente se encuentran sobre la madera, semillas, frutos, u hojas de plantas, algunos están asociados con nidos de insectos.

**Morfotipo 40:** *Daldinia* sp.

El aislado del morfotipo 40, se cultivó en medio PDA, en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 26°C por 20 días, el aislado presentó una forma rizoide, con una elevación efusa, borde filamentoso, superficie concéntrica. El micelio fue abundante, de crecimiento aéreo y presentó en el anverso un color blanco con tonalidades verdes y en el reverso adquirió un color blanco y tonalidades de color negro. El tamaño de los conidios fue de 5,63 µm de largo x 2,81 µm de ancho (**Tabla 16-4**) (**Ilustración 22-4**).

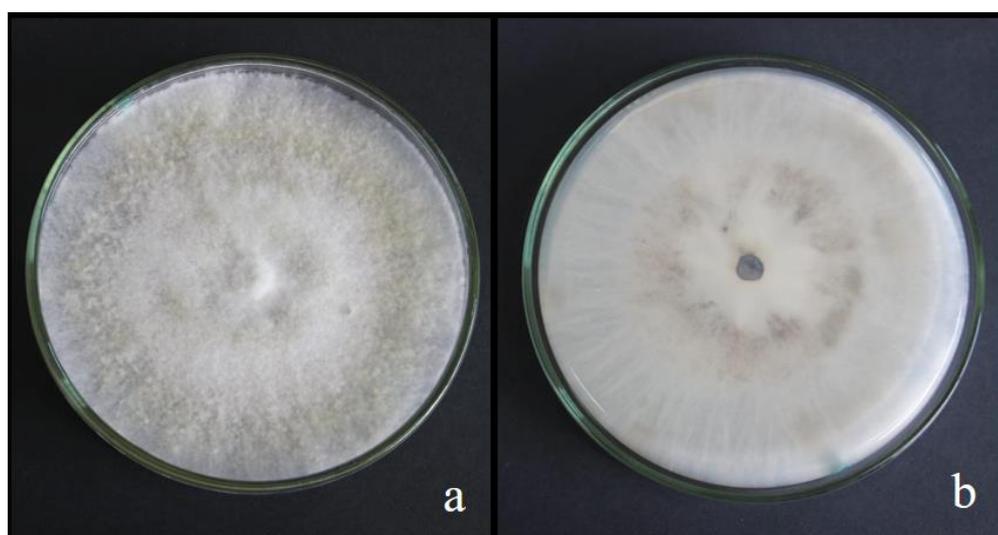
Mostró conidióforos penicilados hialinos, septados, en cuyos extremos se originaban de una a tres células conidiógenas, hialinas y cilíndricas. En el ápice de las células conidiógenas se produjeron ameroconidios holoblásticamente en secuencia simpodial los cuales son hialinos, con forma elipsoidal con una base atenuada, de tamaño 5,63 µm x 2,81 µm (**Ilustración 23-4**).

La caracterización molecular presentó que el producto de PCR del morfotipo M.40 tuvo un tamaño de 403 bp, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad del 100%, con la accesión MK026993.1 que corresponde al género *Daldinia*. (**ANEXO D**).

**Tabla 16-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Daldinia* sp.

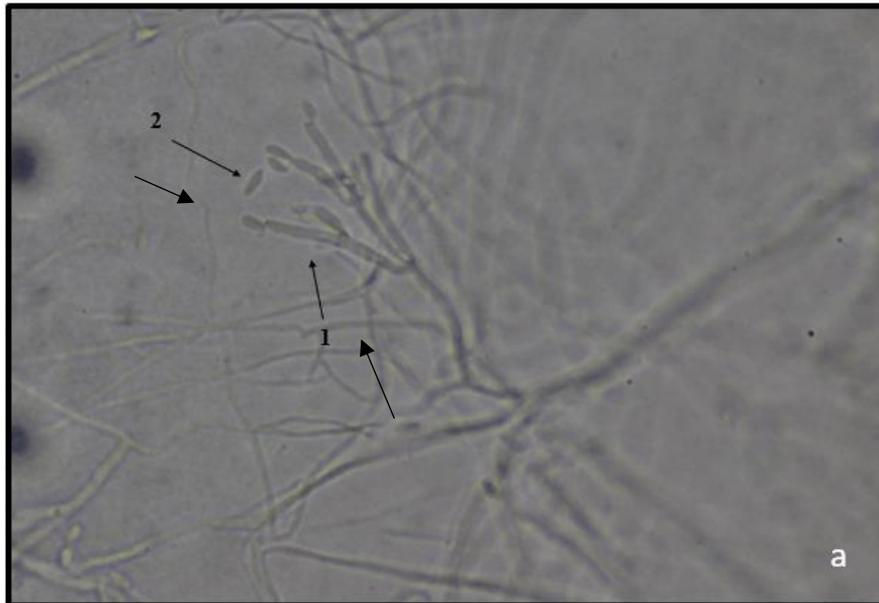
Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de esporas (µm)	
							L	A
M.40	Rizoide	Efusa	Filamentosa	Radial	Blanco	Blanco	5,63	2,81

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 22-4.** Características culturales *Daldinia* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 23-4.** Características morfológicas de *Daldinia* sp., cultivado en medio PDA. 1a) Conidióforo penicilado 2a) ameroconidio inmaduro/hialino.

**Realizado por:** Quitio, D. 2022.

Chan et al (2016, p. 07), informa que los conidióforos septados se ramifican irregularmente en estructuras mononematosas, dicotómicas o tricotómicas con una a tres células conidiógenas que se originan en el extremo, estos son hialinos y negros con exudados pigmentados ocasionales, los conidios fueron hialinos y elipsoides con una base atenuada, como se observó en el morfotipo 40 (**Ilustración 23-4**). Características similares son reportadas por Mishra et al (2020, p. 07) al igual que por Wutthiwong et al (2021, p.03).

Las especies que pertenecen al género *Daldinia* son reconocidas como colonizadoras, debido a que los estromas a menudo se forman inmediatamente después de que sus hospederos han sido estresados o dañados. Estas especies son endófitas, en vista de que poseen la capacidad de mantenerse en el tejido del hospedero durante un largo tiempo sin causar ningún síntoma o daño evidente. Dichos hongos se hospedan en tejidos sanos, conducen a cabo su periodo y fructifican una vez que la planta hospedera es sometida a un disturbio. Las fases asexual y sexual es posible que lleguen o no a coincidir en el tiempo, o incluso pueden desarrollarse sobre sustratos diferentes como organismos supuestamente distintos (Barbosa-Reséndiz et al, 2020, p 02). Las especies de *Daldinia* generalmente se encuentran en maderas en descomposición también se pueden encontrar como endófitos en orquídeas y en insectos (Ngeow et al, 2012, p. 03). *Daldinia eschscholzii* es un endófito invasivo que se encuentra más comúnmente en tejidos vegetales ricos en metabolitos secundarios, este hongo que habita en la madera y recientemente se descubrió que produce

dalesconol A y B y nuevos policétidos utilizados en agentes inmunosupresores (Barnes et al, 2016, p. 02).

**Morfotipo 43:** *Nigrospora* sp.

La colonia del morfotipo 43, fue cultivada en medio PDA, incubada a 26°C, en condiciones de oscuridad durante 25 días. La colonia presentó las siguientes características culturales: forma filamentosa, elevación razada, borde filamentoso, superficie radial, el micelio es abundante y aéreo, de color blanco en el anverso y amarillo crema en el reverso (**Tabla 17-4**) (**Ilustración 24-4**).

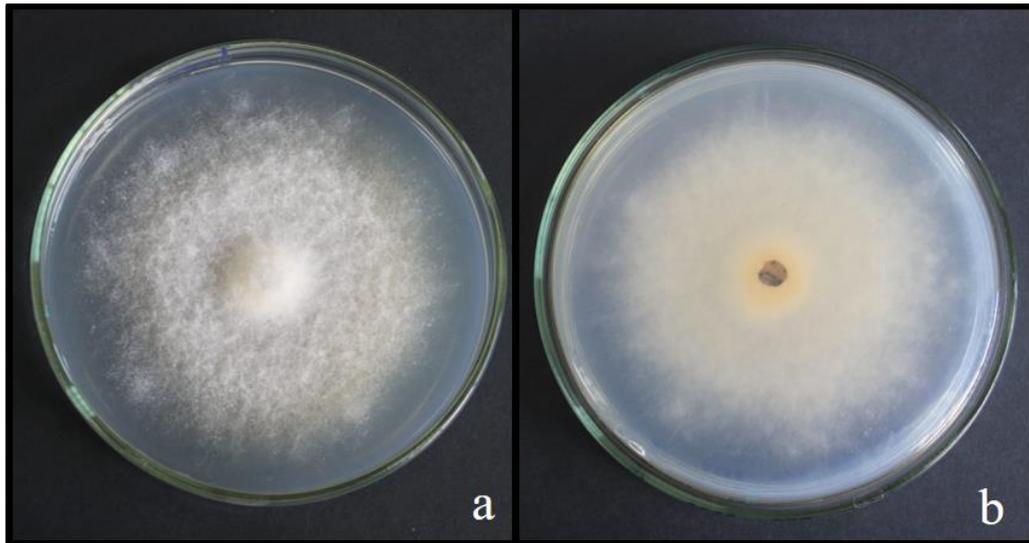
Se observaron conidióforos reducidos a células conidiógenas, que están dispersos en hifas con un color marrón pálido, monoblásticas, solitarias, con forma ovoide y ampuliforme. Los ameroconidios poseen forma en su mayoría elipsoidal, liso, de color negro brillante, con un tamaño de 19,38 µm x 2,81 µm. Estas características son similares a las que presenta el género *Nigrospora* sp. (**Ilustración 25-4**).

La caracterización molecular presentó que el producto de PCR del morfotipo M.43 tuvo un tamaño de 443 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100%, con la accesión MK834676.1 que corresponde al género *Nigrospora* y la especie sugerida fue *Nigrospora sphaerica* (**ANEXO D**).

**Tabla 17-4:** Características culturales de los morfotipos aislados del género *Nigrospora* sp.

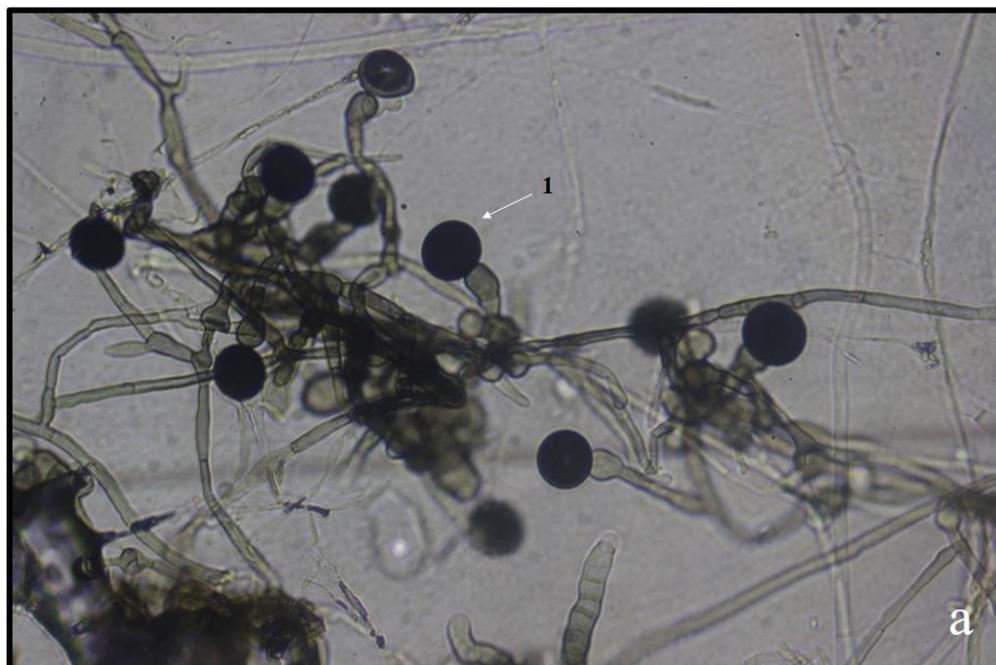
Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
M.43	Filamentosa	Rizada	Filamentosa	Radial	Blanco	Amarillo Crema	19,38	16,87

**Realizado por:** Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 24-4.** Características culturales *Nigrospora* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 25-4.** Características culturales *Nigrospora* sp., cultivado en medio PDA. 1a) Ameroconidia/negro.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Wang y Liu (2017, pp. 126-140) describieron las siguientes características del género *Nigrospora* sp: conidióforos que se reducen a células conidiógenas, hialinas, de forma globosa, ampuliformes o claviformes, de color marrón, las cuales generalmente aparecen como protuberancias directamente del micelio, los conidios son solitarios de forma elipsoidal o esférica, de color negro, liso, aseptados, con un tamaño de 13–18  $\mu\text{m}$  de diámetro y en forma elipsoidal, 12–18  $\times$  9–14,5

µm., como se observó en el morfotipo 43 (**Ilustración 25-4**). Ramesha et al (2020, p. 05) al igual que Boonmee et al (2021, p. 202), mencionaron iguales características para el género *Nigrospora* sp.

Las especies pertenecientes al género *Nigrospora* son generalmente patógenos de plantas, endófitos o saprobios. Infechan una gran variedad de variedad de cultivos, entre los cuales se encuentra el arroz, sorgo, maíz, algodón, entre otros. (Fakhrunnisa y Ghaffar, 2006, p. 185). Estas especies son extremadamente interesantes para el descubrimiento de nuevos metabolitos; Metwaly et al (2014, p. 04), aisló de *N. sphaerica* un nuevo derivado de isocromeno, junto a diecinueve compuestos conocidos del hongo endófito de los cuales cuatro de estos compuestos mostraron una buena actividad antileucémica y un compuesto mostró una buena actividad antifúngica.

**Morfotipo 45:** *Purpureocillium* sp.

El aislado del morfotipo 45, fue cultivado en medio PDA por 14 días, a una temperatura de 26°C en condiciones de oscuridad. Las características culturales que presentaron fueron: forma circular, elevación efusa, borde rizado, superficie lisa, coloración blanca que con el pasar de los días se tornó violácea en el anverso; mientras, en el reverso su coloración fue de un blanco lino, Las características concuerdan con el género *Purpureocillium* sp. (**Ilustración 26-4**) (**Tabla 18-4**).

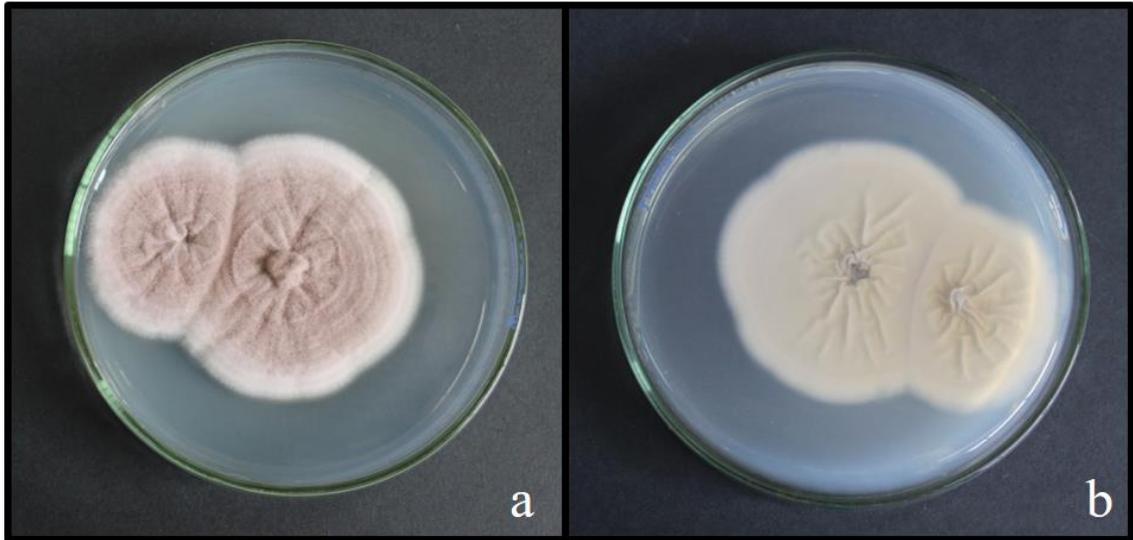
Las características morfológicas fueron las siguientes: conidióforos verticilados que de dos a cuatro fiálides con una porción basal hinchada que va estrechándose en un cuello corto y distintivo. Los conidios fueron hialinos, dispuestos en cadenas divergentes, de forma elipsoidales y fusiforme. Los conidios presentaron un diámetro que va de 3,75 µm a 2,5 µm. (**Ilustración 27-4**).

La caracterización molecular mostró que el producto de PCR del morfotipo M.45 tuvo un tamaño de 370 bp, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad del 100%, con la accesión MK026993.1 que corresponde al género *Purpureocillium* (**ANEXO D**).

**Tabla 18-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Purpureocillium* sp.

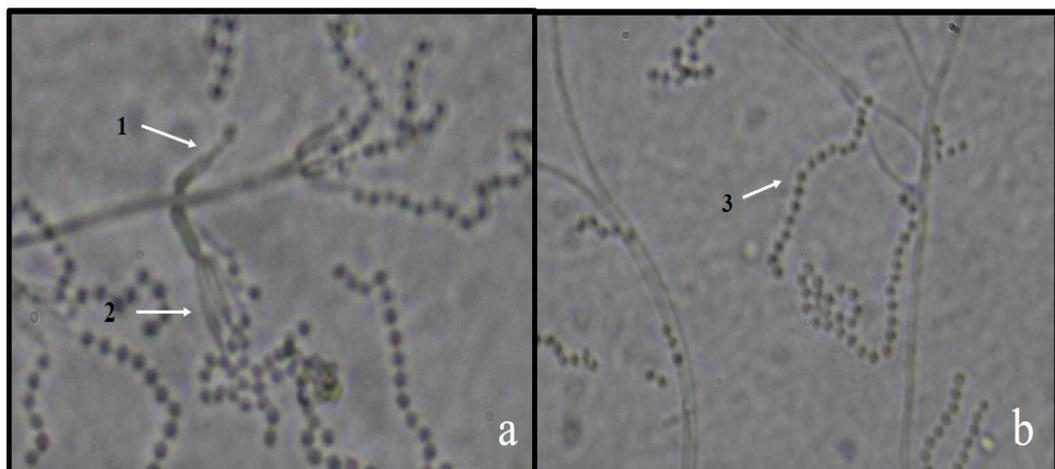
Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de espora (µm)
							D
M.45	Circular	Rizada	Rizada	Lisa	Violáceo	Blanco lino	3,75

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 26-4.** Características culturales *Purpureocillium* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 27-4.** Características morfológicas de *Purpureocillium* sp., cultivado en medio PDA. 1a) Fiálides 2a) Conidióforos penicilado, 3b) ameroconidia en cadenas divergentes.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Gong et al (2017, p. 531) menciona el género *Purpureocillium* sp presentó micelio con un color blanco que se torna rosa o lila en el inicio de la esporulación, como se observó en el morfotipo 45 (**Ilustración 26-4**), a través del microscopio se observan fiálides erectas y largas, densamente agrupadas. Los conidióforos emergen del micelio superficial, son mononematosos, rígidos, penicilados. Contreras y Bustillo (2020, p. 03) proporcionan descripciones similares a las dadas por Gong.

*Purpureocillium* es un género con distribución ambiental ubicua que puede manifestarse en muestras de suelo y material en descomposición alrededor del mundo. Es un hongo endófito con capacidad para colonizar plantas. Por lo tanto, estos hongos pueden establecer diferentes interacciones con las plantas para beneficiarse a sí mismos y a su hospedero (Tian et al, 2004, p. 303). Se utiliza como agente de biocontrol contra los nematodos agalladores de las raíces de las plantas, los cuales causan daños importantes a una variedad de especies de cultivos en todo el mundo (Moens y Perry, 2009, pp. 313–332). *Purpureocillium lilacinum* se encuentra comúnmente en el suelo, es un bioagente fúngico usado para el manejo sostenible de nematodos fitoparásitos y debido a su potencial como nematicida es uno de los hongos más estudiado, ya que estos pueden llegar a remplazar a los nematicidas químicos. Actualmente en Brasil se utiliza como pesticida microbiano contra nematodos. (Kiriga et al, 2018, p. 27). Este hongo puede producir y secretar enzimas hidrolíticas extracelulares involucradas en el proceso de colonización de hembras maduras, quistes y masas de huevos de los nematodos parásitos de plantas sedentarias. Aparte de su papel como bionematicidas; también, ha demostrado actividades insecticidas y acaricidas, induce a la resistencia y la tolerancia al estrés biótico y abiótico al modular las fitohormonas de la planta hospedera, las respuestas bioquímicas de defensa contra el ataque de plagas y patógenos de las plantas, y el alivio del estrés abiótico y la facilitación de la absorción de nutrientes por parte de las plantas huésped colonizadas (Maciá et al, p. 390). Sin embargo, cabe recalcar que su uso es limitado debido a que está relacionado con infecciones oculares, con frecuencia graves, que conducen a la pérdida del ojo (Kiriga et al, 2018, p. 27).

**Morfotipo 50:** *Coniochaeta* sp.

El aislado del morfotipo\_54, fue cultivado en medio PDA, en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 26°C por 20 días. Las características culturales fueron: forma circular, elevación rizada, borde entero, superficie fue rugosa, el color en el anverso fue café, al igual que en el reverso. El tamaño de los conidios fue de 5,25 µm x 2,81 µm (**Tabla 19-4**) (**Ilustración 28-4**).

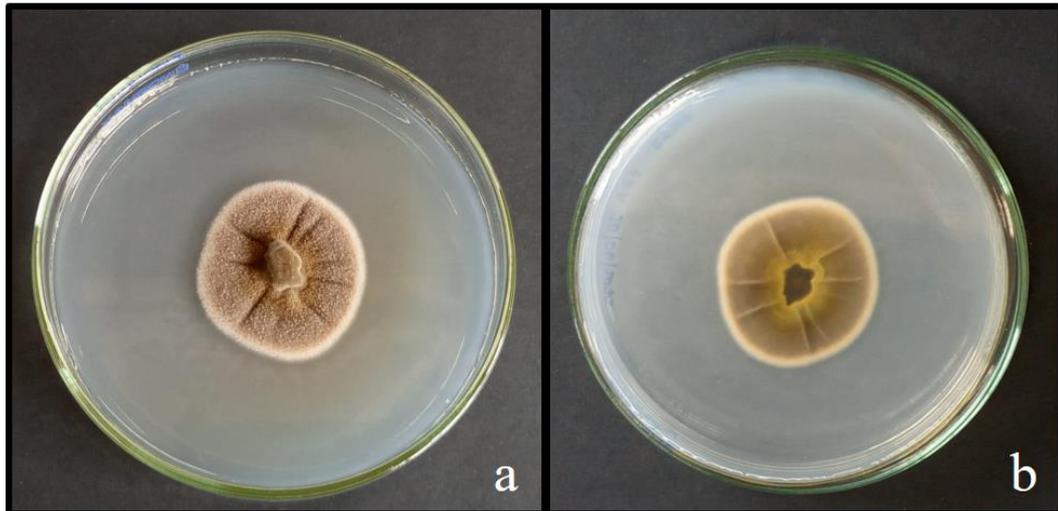
Las características morfológicas fueron: hifas hialinas, septadas, de paredes lisas, los conidióforos son cortos; las células conidiógenas son de forma hialina, fialídica u ovalada, se encuentran en racimos sobre ramas laterales cortas o en solitario. Los conidios fueron unicelulares, hialinos, de forma oblonga y elipsoidal, con un tamaño promedio de 5,25 µm x 2,81 µm. (**Ilustración 29-4**). Estas características son similares a las que presentan el género *Coniochaeta* sp.

La caracterización molecular; presentó, que el producto PCR del morfotipo M.54 tuvo un tamaño de 515 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 99,61% con la accesión MN264616.1 que corresponde al género *Coniochaeta* (**ANEXO D**).

**Tabla 19-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Coniochaeta* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de espora ( $\mu\text{m}$ )	
							L	A
M.50	Circular	Rizada	Entero	Rugosa	Café	Café	5,25	4

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 28-4.** Características culturales de *Coniochaeta* sp., cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 29-4.** Características morfológicas de *Coniochaeta* sp, cultivado en medio PDA. 1a) Ameroconidia/café.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Las características observadas y descritas, coinciden con las manifestadas por Si et al (2021, p. 113), Damm et al (2010, p. 60) y Forin et al (2021, pp. 13-14), informaron que este género presentó hifas hialinas, multiguturales, septadas, de paredes lisas; conidióforos cortos; células conidiógenas de forma hialina, fialídica u ovalada, solitarias o en racimos sobre ramas laterales cortas, presentan dos tipos de conidios: los conidios hinchados eran hialinos, unicelulares, en forma de campana, con hifas, las cuales emergen de ambos extremos, el otro tipo de conidio es oblongos, hialinos, unicelulares, los cuales comúnmente poseen forma oblonga a elipsoidal, estas características son similares a las que presentó el morfotipo 54 (**Ilustración 29-4**).

*Coniochaeta* es un género de levaduras con diversas formas y se encuentran distribuidas en todo el mundo. Han sido aislado de diferentes sustratos, como mantequilla, heces, madera, suelo, aguas residuales de uranio, plantas y líquenes (Harrington et al, 2019, pp. 65-79). Según García et al (2006, p. 110), este género posee un estado asexual y sexual en su ciclo de vida. El estado sexual de *Coniochaeta* se caracteriza por ascomas de color marrón oscuro a negro con setas; mientras, el estado asexual de *Coniochaeta* tiene colonias distintivas de color rosa salmón a marrón oscuro que producen células fialídicas conidiógenas. Los miembros del género son fuentes potenciales de enzimas hidrolíticas funcionan en la bioconversión de compuestos furánicos y tienen capacidad para producir metabolitos secundarios (Hirokawa et al, 2003, p. 104). Jimenez et al (2014, p. 98) informa que la cepa 2T2.1 de *Coniochaeta* sp. es de las más relevantes para la degradación de la biomasa lignocelulósica.

**Morfotipo 50:** *Geotrichum* sp.

La colonia perteneciente al morfotipo 54, fue cultivada en medio PDA durante 14 días, incubadas a 26°C, en condiciones de oscuridad. Presento las siguientes características culturales: forma circular, elevación plana, borde crenado y superficie lisa. En el anverso y en el reverso el color de la colonia fue blanco. El tamaño de las esporas fueron de 11,25 µm x 4,58 µm. (**Tabla 20-4**) (**Ilustración 30-4**).

Las características morfológicas que se observara de esta colonia fue: conidios unicelulares, de forma elipsoidal y cilíndrica, con tonalidad oscura (**Ilustración 31-4**).

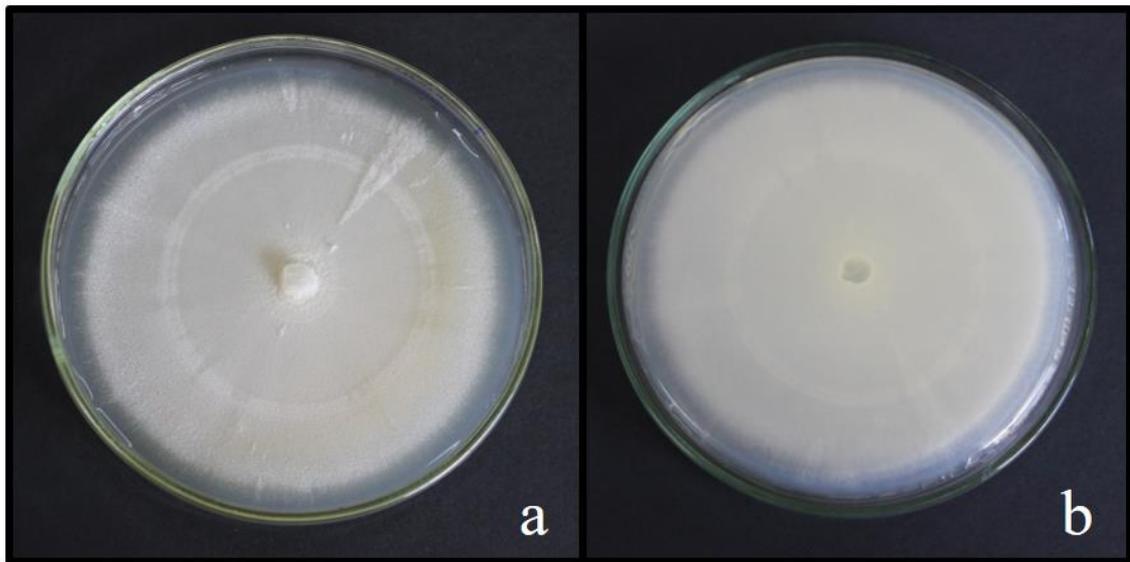
La caracterización molecular; presentó, que el producto de PCR del morfotipo M.50 tuvo un tamaño de 349 bp, el análisis BLAST manifestó un porcentaje de identidad del 100%, con accesión KY092542.1 que corresponde al nombre Uncultured eukaryote. En la base de datos del NCBI no se encontró mayor información de esta colonia, por lo cual es necesario realizar una investigación más profunda sobre este aislado. Sin embargo, a pesar no haber sido posible

caracterizarlo molecularmente, es probable que este aislado pertenezca al género *Geotrichum* sp, ya que al observar las características morfológicas estas se asemejan a las descritas por Larone (2011) y Arenas (2008).

**Tabla 20-4:** Características culturales del aislado asociado a *Geotrichum* sp

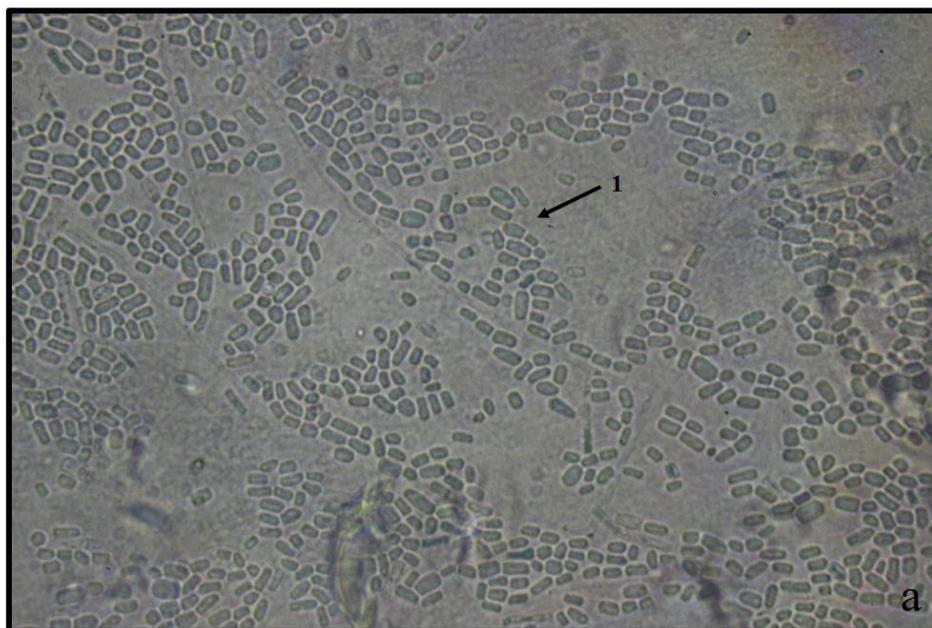
Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
M.50	Circular	Plana	Crenado	Lisa	Blanco	Blanco	11,25	4,58

Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 30-4.** Características culturales de *Uncultured eukaryote*, cultivado en medio PDA.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 31-4.** Características morfológicas de *Geotrichum* sp., cultivado en medio PDA. 1a) Artroconidio/hialino

Realizado por: Quitío, D. 2022.

#### **Morfotipo C:** *Moniliophthora* sp.

Las colonias pertenecientes al morfotipo\_C, crecieron en medio V8, incubadas a una temperatura de 26°C, en condiciones de oscuridad, durante 20 días. Se observaron las siguientes características culturales: formas circulares, con elevación rizada y efusa, todas con un borde crenado, de superficie concéntrica, un color beige y blanco hueso en el anverso y en el reverso todas presentaron un color crema. Los conidios fueron un tamaño de 11,07 – 14,5  $\mu\text{m}$  x 5 - 10  $\mu\text{m}$  (**Ilustración 32-4**) (**Tabla 21-4**).

Las características morfológicas observadas de las colonias del morfotipos C, fueron: hifas septadas, con paredes finas, las cuales son irregulares, estas se encuentran ramificadas, lo que da a lugar a cadenas maduras de esporas, Los conidios poseen formas elípticas, redondas y subglobosas, con un tamaño promedio de 12,74  $\mu\text{m}$  de largo x 7,58  $\mu\text{m}$  de ancho (**Ilustración 33-4**).

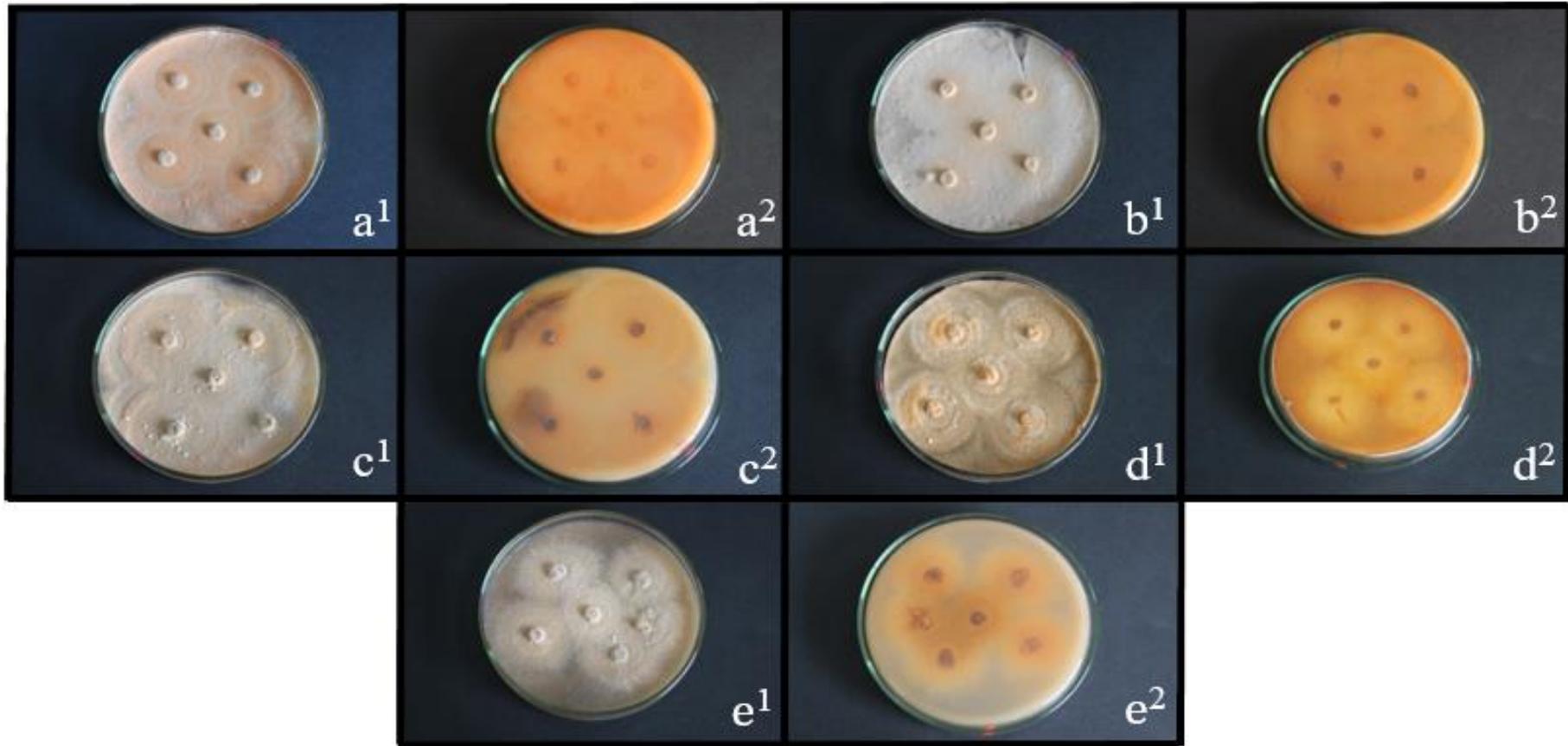
La caracterización molecular presentó los siguientes datos para los aislados del morfotipo C: El producto PCR del morfotipo M.C1 tuvo un tamaño de 263 bp, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad del 99,24%, con la accesión MW898108.1. El morfotipo M.C4 mostró un tamaño de 585 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 99,49% con la accesión MW898108.1. El morfotipo M.C5 presentó un tamaño de 609 bp, el análisis BLAST

mostró 99,51% de porcentaje de identidad con la accesión MW898108.1. El producto de PCR del morfotipo M.C6 tuvo un tamaño de 634 bp, el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 99,53%, con la accesión MH861051.1. Finalmente, el producto de PCR del morfotipo M.C7 tuvo un tamaño de 673 bp, el análisis BLAST presentó un porcentaje de identidad de 99,55%, con la accesión MH861051.1. Todos los morfotipos correspondieron al género *Moniliophthora*, teniendo como especie sugerida *Moniliophthora roreri* (ANEXO D).

**Tabla 21-4:** Características culturales de los morfotipos asociados al género *Moniliophthora* sp.

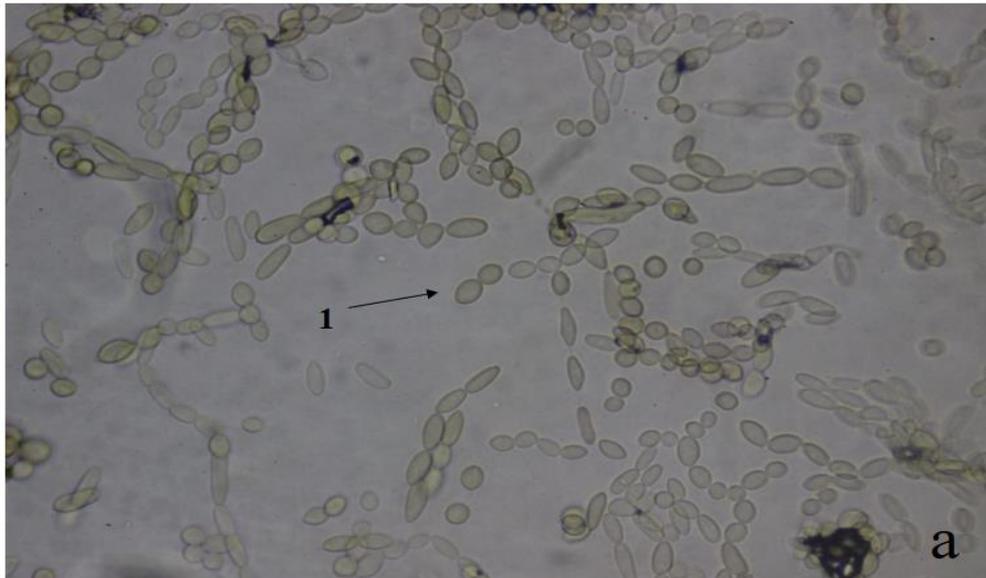
Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del Anverso	Color del Reverso	Tamaño de espora ( $\mu\text{m}$ )	
							L	A
M.C1	Circular	Rizada	Crenado	Concéntrica	Beige	Crema	11,67	5
M.C4	Circular	Efuso	Crenado	Concéntrica	Blanco hueso	Crema	11,07	7,5
M.C5	Circular	Plana	Crenado	Concéntrica	Blanco hueso	Crema	13,68	10
M.C6	Circular	Efuso	Crenado	Concéntrica	Beige	Crema	14,5	9,5
M.C7	Circular	Efuso	Crenado	Concéntrica	Blanco hueso	Crema	11,25	6,75

Realizado por: Quitío, Dayse 2022.



**Ilustración 32-4.** Características culturales de *Moniliophthora* sp., cultivado en medio V8.

Realizado por: Quitio, D. 2022.



**Ilustración 33-4.** Características morfológicas de *Moniliophthora* sp., cultivado en medio V8. 1a) cadena de ameroconidia/subhialino/café.

**Realizado por:** Quitio, D. 2022.

Phillips et al (2006, p. 55-58) junto con Villavicencio (2010, pp. 43-44) coincidieron al describir las características morfológicas del género *Moniliophthora* sp. de colonias crecidas en medio V8 al igual que en la caracterización cultural que comprende el borde, la forma, elevación y color. Sin embargo, también coincidieron en que la caracterización cultural no son los suficientes para garantizar que el género al que pertenecen los aislados sea *Moniliophthora* sp, por lo cual es de suma importancia observar las estructuras microscópicas. En cuanto a las características morfológicas, Suarez (2006, p. 59), Villavicencio (2010, p. 22) y Phillips-Mora et al. (2015, p. 55), coinciden al mencionar que, las formas de los conidios varían de globosas, subglobosas y elipsoidales, en lo referente al tamaño de los conidios, los observados de las colonias del morfotipo C (**Ilustración 33-3**), estuvieron dentro del rango del tamaño descrito que es de 8  $\mu\text{m}$  x 15  $\mu\text{m}$ .

Las especies *M. roreri* y *M. perniciosa*, causantes de la enfermedad de la pudrición helada de la vaina y la escoba de bruja en cacao respectivamente. *M. perniciosa* posee una gran gama de hospederos e infecta una variedad de tejidos meristemáticos en las plantas de cacao; mientras que, *M. roreri* infecta solo las vainas de los géneros *Theobroma* y *Herrania* (Barbosa et al, 2018, p. 02). Según Meinhardt et al (2014, p. 23), la patogenómica comparativa de estos hongos es esencial para comprender las estrategias de infección por *Moniliophthora*, debido a lo cual la detección y la caracterización funcional in silico de los candidatos efectores son pasos importantes para comprender mejor su patogenicidad.

#### 4.2. Análisis de la diversidad fúngica asociada a los frutos de cacao.

A partir de los aislados fúngicos obtenidos de los frutos de cacao, se identificaron 13 géneros en totalidad, de los cuales *Penicillium* sp. fue el de mayor frecuencia con 27,8%, le siguieron *Epicoccum* sp. (20,47%), *Lasiodiplodia* sp. (10,13%), *Trichoderma* sp. (9,91) y *Fusarium* sp. (9,70%). En menor frecuencia aparecieron *Nigrospora* sp. (5,39%), *Clonostachys* sp. (3,66%), *Diaporthe* sp. (3,45%), *Daldinia* sp. (2,37%), *Neopestalotiopsis* sp. (2,37%), *Alternaria* sp. (1,29%), *Purpureocillium* sp. (0,86%) y finalmente *Coniochaeta* sp. (0,86%) que presentó menor abundancia. Los aislados de los cuales no se lograron identificar sus géneros representaron el 1,73% de abundancia (Tabla 22-4).

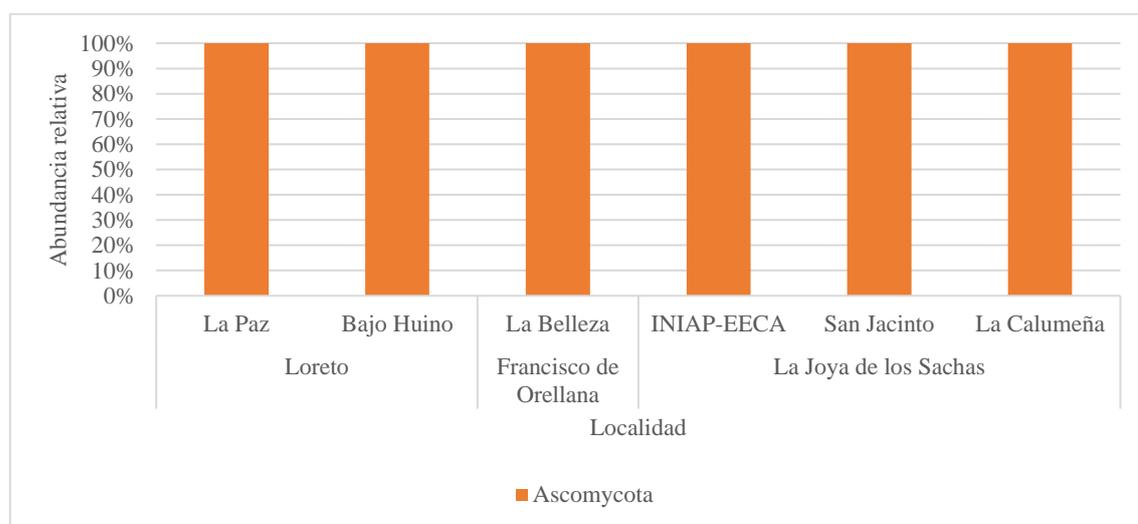
**Tabla 22-4:** Porcentaje de microorganismo aislados de los frutos de cacao.

Microorganismos aislados	Número de aislados	Porcentaje %	Órgano del cual fueron aislados
<i>Penicillium</i>	129	27,80	Fruto
<i>Epicoccum</i>	95	20,47	Fruto
<i>Lasiodiplodia</i>	47	10,13	Fruto
<i>Trichoderma</i>	46	9,91	Fruto
<i>Fusarium</i>	45	9,70	Fruto
<i>Nigrospora</i>	25	5,39	Fruto
<i>Clonostachys</i>	17	3,66	Fruto
<i>Diaporthe</i>	16	3,45	Fruto
<i>Daldinia</i>	11	2,37	Fruto
<i>Neopestalotiopsis</i>	11	2,37	Fruto
<i>Alternaria</i>	6	1,29	Fruto
<i>Purpureocillium</i>	4	0,86	Fruto
<i>Coniochaeta</i>	4	0,86	Fruto
<i>Geotrichum</i>	2	0,55	Fruto
Desconocido	6	1,06	Fruto

Realizado por: Quitio, Dayse. 2022.

#### 4.2.1. Abundancia relativa a nivel de filo, clase, orden, familia y género en relación a las tres localidades.

Los tres cantones en estudio fueron: el cantón Loreto que comprende a las localidades; La Paz y Bajo Huino, el cantón Francisco de Orellana, comprende a la localidad La Belleza y el cantón La Joya de los Sachas comprende a las localidades; INIAP-EECA, San Jacinto y La Calumeña. En estas localidades se presentó un único filo fúngico: Ascomycota con un 100% de frecuencia. (Ilustración 34-4).



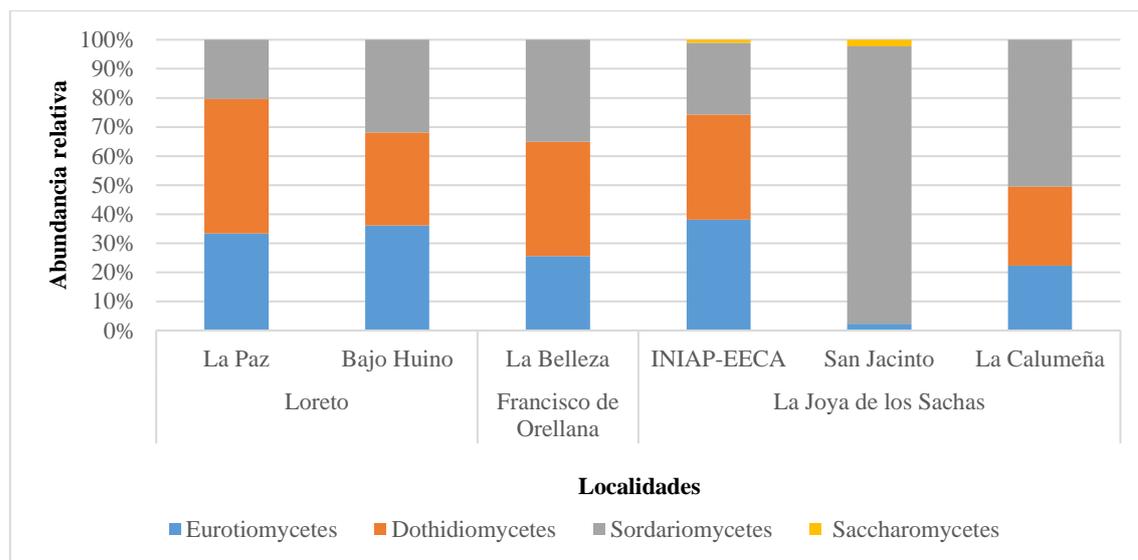
**Ilustración 34-4.** Abundancia relativa a nivel de filo de los microorganismos fúngicos aislados de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.

**Realizado por:** Quitio, D. 2022.

A nivel de clase, se lograron identificar tres, las cuales son; Sordariomycetes (39,85%), Dothidiomycetes (31,89%) y Eurotiomycetes (27,8%), siendo todas pertenecientes al filo Ascomycota. Los aislados no identificados de los cuales no se logró identificar a nivel de clase es del 0,43% (Ilustración 35-4).

En el cantón Loreto se encuentran ubicadas las localidades La Paz y Bajo Huino, en el cantón Francisco de Orellana se encuentra la localidad La Belleza y en el cantón La Joya de los Sachas están las localidades INIAP-EECA, San Jacinto y La Calumeña. La clase con mayor presencia fue Sordariomycetes (39,85%), con mayor presencia en la localidad San Jacinto (95,46%), en menor proporción se encuentran las localidades de La Calumeña (50,49%), La Belleza (35,11%), Bajo Huino (31,94%), INIAP-EECA (24,74) y la localidad La Paz (20,37%). La clase Dothidiomycetes (31,95%) fue la segunda de mayor abundancia (31,95%), con mayor presencia en la localidad La Paz (46,3%), seguidas por La Belleza (39,09%), INIAP-EECA (36,09%), Bajo

Huino (31,94%), siendo La Calumeña (27,18%) la que presentó menor abundancia de esta clase; mientras que, en la localidad de San Jacinto no hubo presencia. La clase Eurotiomycetes (27,77%) presentó mayor abundancia en la localidad INIAP-ECCA (38,14%), le siguieron las localidades de Bajo Huino (36,12%), La Paz (33,33%), La Belleza (25,53%), La Calumeña (22,33%) y San Jacinto (2,27%) que fue la localidad con menor abundancia de esta clase. En cuanto a los aislados de la clase Saccharomycetes, estos solo se presentaron en las localidades de San Jacinto (2,27%) e INIAP-EECCA (1,03%).



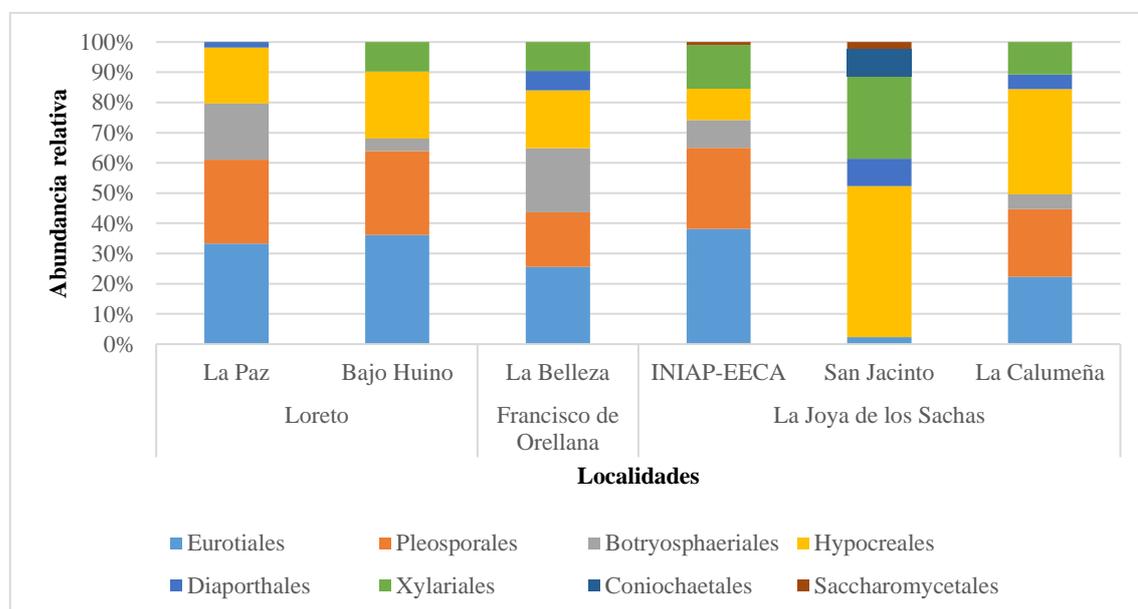
**Ilustración 35-4.** Abundancia relativa a nivel de clase de los microorganismos fúngicos aislados de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

La abundancia de los microorganismos fúngicos a nivel de orden fue muy variada en las diferentes localidades, como se observa en la **Ilustración 36-4**. Se lograron clasificar siete ordenes en totalidad, de los cuales el orden con mayor abundancia fue Eurotiales (26,29), seguido por Hypocreales (25,86%), Pleosporales (20,46%), Xylariales (11,95%), Botryosphaeriales (9,68%), Diaporthales (3,70%), Coniochaetales (1,52%) y Saccharomycetales (0,55%) que fue el orden con menor presencia, todos los órdenes identificados pertenecen al filo Ascomycota.

El orden Eurotiales (26,29%), más abundante, tuvo mayor presencia en la localidad INIAP-EECA (38,14%), le siguieron las localidades; Bajo Huino (36,11%), La Paz (33,33%), La Belleza (25,53%), La Calumeña (22,33%) y la que menor presencia mostró fue la localidad San Jacinto (2,27%). Mientras que, el orden Hypocreales (25,86%) presentó los siguientes valores de abundancia; existió mayor presencia de este orden en la localidad San Jacinto (50,0%), continuando con La Calumeña (34,96%), Bajo Huino (22,22%), La Belleza (19,16%), La Paz

(18,52%) y finalizando con INIAP-EECA (10,32%). En cuanto al orden Pleosporales (20,46%), se presentaron tanto en la localidad La Paz (27,68) como Bajo Huino (27,78) el mismo porcentaje de abundancia, siendo estos los más altos, le siguieron las localidades de La Calumeña (22,33%), INIAP-EECA (26,8%), culminando con La Belleza (18,08%); mientras que, en la localidad San Jacinto no hubo presencia de este orden. Los valores de abundancia del orden Xylariales (11,95%) fueron los siguientes: en la localidad de San Jacinto (34,95%) se presentó el valor más alto, seguido por INIAP-EECA (14,44%), La Calumeña (10,68%), Bajo Huino (9,72%) y el menor valor se presentó en La Belleza (9,57%); mientras, que en La Paz no se presentó este orden. El orden Botryosphaeriales (9,68%), demostró una mayor presencia en la localidad La Belleza (21,28%), en menor medida están las localidades de La Paz (18,52%), INIAP-EECA (9,27%), La Calumeña (4,85%) y Bajo Huino (4,17%), en cuanto a la localidad San Jacinto no se evidenció presencia de este orden. En lo referente al orden Diaporthales (3,70%) hubo más presencia en la localidad de San Jacinto (9,1%), seguida por La Belleza (6,38%), La Calumeña (4,85%) y la menor presencia se registró en La Paz (1,85), en cuanto a las localidades de Bajo Huino e INIAP-EECA no hubo presencia de este orden. El orden Coniochaetales (9,09%) solo se registró en la localidad de San Jacinto (9,09%). Mientras que, los aislados del orden Saccharomycetales representan el 0,55%, se encontraron únicamente en San Jacinto (2,27%) e INIAP-EECA (1,03%).



**Ilustración 36-4.** Abundancia relativa a nivel de orden de los microorganismos fúngicos aislado de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

En el cantón Loreto se encuentran ubicadas las localidades La Paz y Bajo Huino, en el cantón Francisco de Orellana se encuentra la localidad La Belleza y en el cantón La Joya de los Sachas están las localidades INIAP-EECA, San Jacinto y La Calumeña.

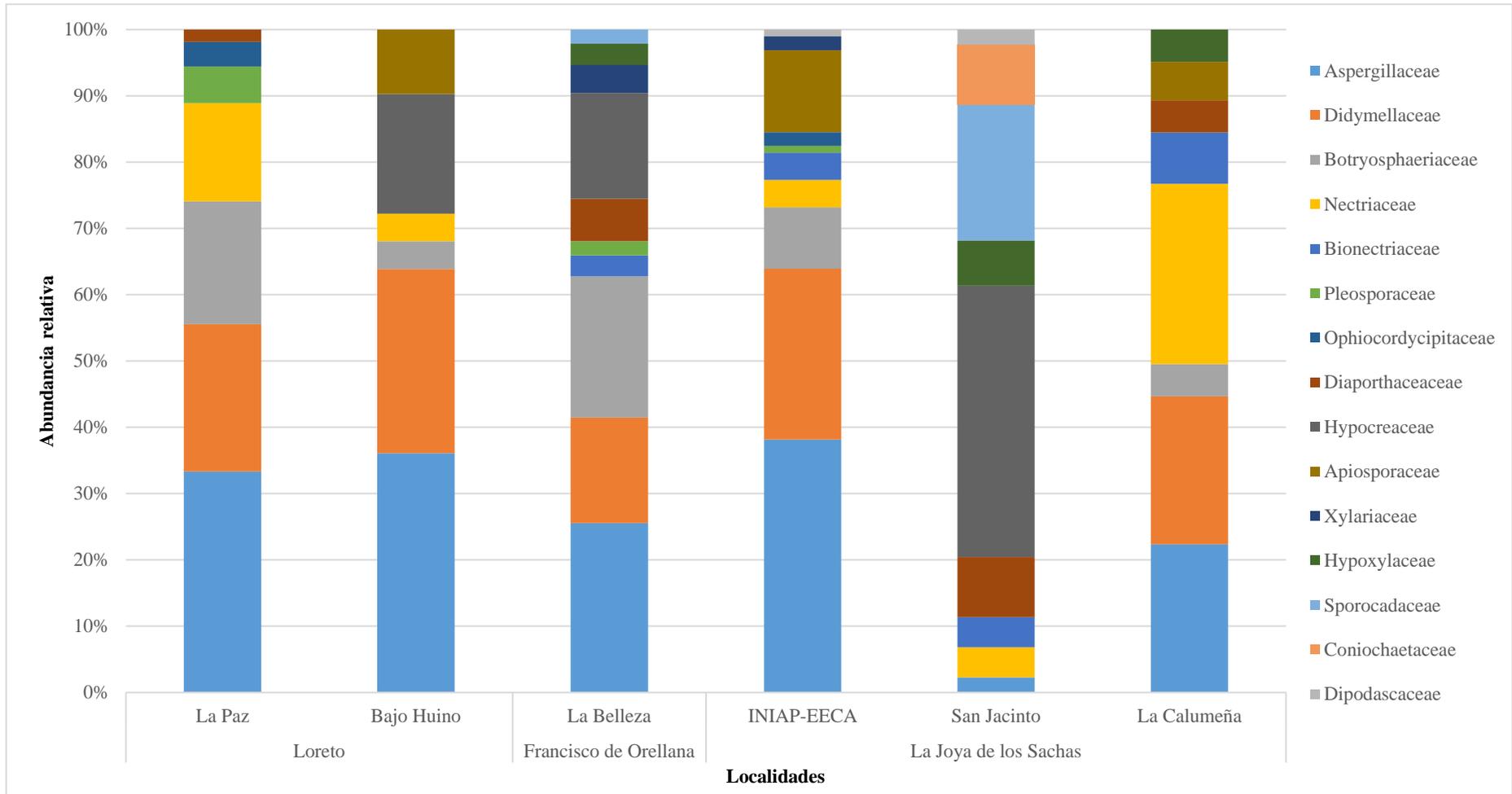
Los valores de abundancia a nivel de familia se observan en la **Ilustración 37-4**, donde se demuestra la existencia de diversos perfiles de composición fúngica a nivel de familia en las localidades estudiadas. Se logró clasificar un total de 14 familias, de las cuales, la que presentó mayor abundancia fue Aspergillaceae (26,28%), en menor medida se presentaron: Didymellaceae (19,01%), Hypocreaceae (12,49%), Botryosphaeriaceae (9,68%), Nectriaceae (9,13%), Apiosporaceae (4,65%), Sporocadaceae (3,76%), Diaporthaceaceae (3,7%), Bionectriaceae (3,27%), Hypoxylaceae (2,48%), Plesporaceae (1,46%), Coniochaetaceae (1,52%), Xylariaceae (1,06%), Ophiocordycipitaceae (0,96%) y Dipodascaceae (0,55%) la que presentó menor abundancia.

La familia que mayor abundancia presentó fue Aspergillaceae (26,28%) con mayor presencia en la localidad INIAP-EECA (38,14%), seguidas por Bajo Huino (36,11%), La Paz (33,33%), La Belleza (25,53%), La Calumeña (22,34%) y San Jacinto (2,27%). La familia Didymellaceae (19,01%), presentó los siguientes valores en las diversas localidades: Bajo Huino (27,78%), INIAP-EECA (25,77%), La Calumeña (22,34%), La Paz (22,22%) y La Belleza (15,95%); mientras, la localidad San Jacinto no hubo presencia de esta familia. En cuanto a la familia Hypocreaceae (12,49%) se registró mayor presencia en la localidad San Jacinto (40,91%), seguida por la localidad de Bajo Huino (18,05%) y La Belleza (15,96%), mientras que, en las localidades de La Paz, INIAP-EECA y La Calumeña no se registró la presencia de esta familia. En lo referente a la familia Botryosphaeriaceae (9,68%), presentaron los siguientes valores: La Belleza (15,95%), La Paz (21,28%), INIAP-EECA (9,27%), La Calumeña (4,85%), Bajo Huino (4,17%), no hubo presencia de esta familia en la localidad San Jacinto. La familia Nectriaceae (9,13%) tuvo mayor presencia en La Calumeña (27,18%), las de menor abundancia fueron La Paz (14,81%), San Jacinto (4,55%), Bajo Huino (4,17%) e INIAP-EECA (4,12%); mientras, que en la localidad La Belleza no hubo presencia de esta familia.

La mayor abundancia que presentó la familia Apiosporaceae (4,65%) fue en la localidad INIAP-EECA (12,37%), seguida por Bajo Huino (9,72%) y La Calumeña (5,82%), en las localidades San Jacinto, La Belleza y La Paz no existió presencia de esta familia. En tanto la familia Sporocadaceae (3,76%), registró los siguientes valores: en San Jacinto (20,45%) y en La Belleza (2,13%), en cuanto a las localidades La Paz, Bajo Huino, INIAP-EECA y La Calumeña no hubo presencia de esta familia. Para la familia Diaporthaceaceae (3,7%) la localidad que presentó mayor abundancia fue San Jacinto (9,09%), continuando con La Belleza (6,38%), La Calumeña

(4,85%) y La Paz (1,86%), las localidades Bajo Huino e INIAP-EECA no manifestaron presencia de esta familia. Los valores de la familia Bionectriaceae (3,27%) fueron los siguientes: La Calumeña (7,77%), San Jacinto (4,55%), INIAP-EECA (4,12%) y La Belleza (3,19%); mientras, en La Paz y Bajo Huino no se registraron valores para esta familia.

La abundancia de Hypoxylaceae (2,48%) fue superior en la localidad San Jacinto (6,28%), le siguieron La Calumeña (4,85%) y La Belleza (3,19%), no hubo presencia de esta familia en las localidades La Paz, Bajo Huino e INIAP-EECA. Lo referente a la familia Plesporaceae (1,46%), la localidad con mayor abundancia de esta familia fue La Paz (5,56%), las de menor abundancia fueron La Belleza (2,13%) e INIAP-EECA (1,04%), no hubo presencia de esta familia en Bajo Huino, San Jacinto y La Calumeña. Únicamente en la localidad de San Jacinto (9,09%) constó la presencia de la familia Coniochaetaceae (1,52%). Se registraron los siguientes valores para Xylariaceae (1,06%): La Belleza (4,26%) e INIAP-EECA (2,07%), en el resto de las siguientes localidades no hubo presencia de esta familia. En cuanto a Ophiocordycipitaceae (0,96%), esta familia solo se mostró en La Paz (3,7%) e INIAP-EECA (2,06%). La familia que menor abundancia presentó fue Dipodascaceae (0,55%) que se presentaron en las localidades San Jacinto (2,27%) e INIAP-EECA (1,04%).



**Ilustración 37-4.** Abundancia relativa a nivel de orden de los microorganismos fúngicos aislados de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Como se muestra en la **Ilustración 38-4** se presentaron diferentes perfiles de composición fúngica a nivel de género, estos se clasificaron en un total de 13, siendo *Penicillium* sp. (26,27%) el de mayor abundancia, le siguieron los géneros; *Epicoccum* sp. (19,01%), *Trichoderma* sp. (12,49%), *Lasiodiplodia* sp. (9,68%), *Fusarium* sp. (9,14%), *Nigrospora* sp. (4,65%), *Neopestalotiopsis* sp. (3,76%), *Diaporthe* sp. (3,7%), *Clonotachys* sp. (3,27%), *Daldinia* sp. (2,48%), *Alternaria* sp. (1,46%), *Coniochaeta* sp. (1,52%), *Purpureocillium* sp. (0,97%) y finalmente fue el género *Geotrichum* sp. (0,55%) que presentó menor abundancia. Los aislados de los cuales no fue posible clasificar a nivel de género representaron el 1,6%.

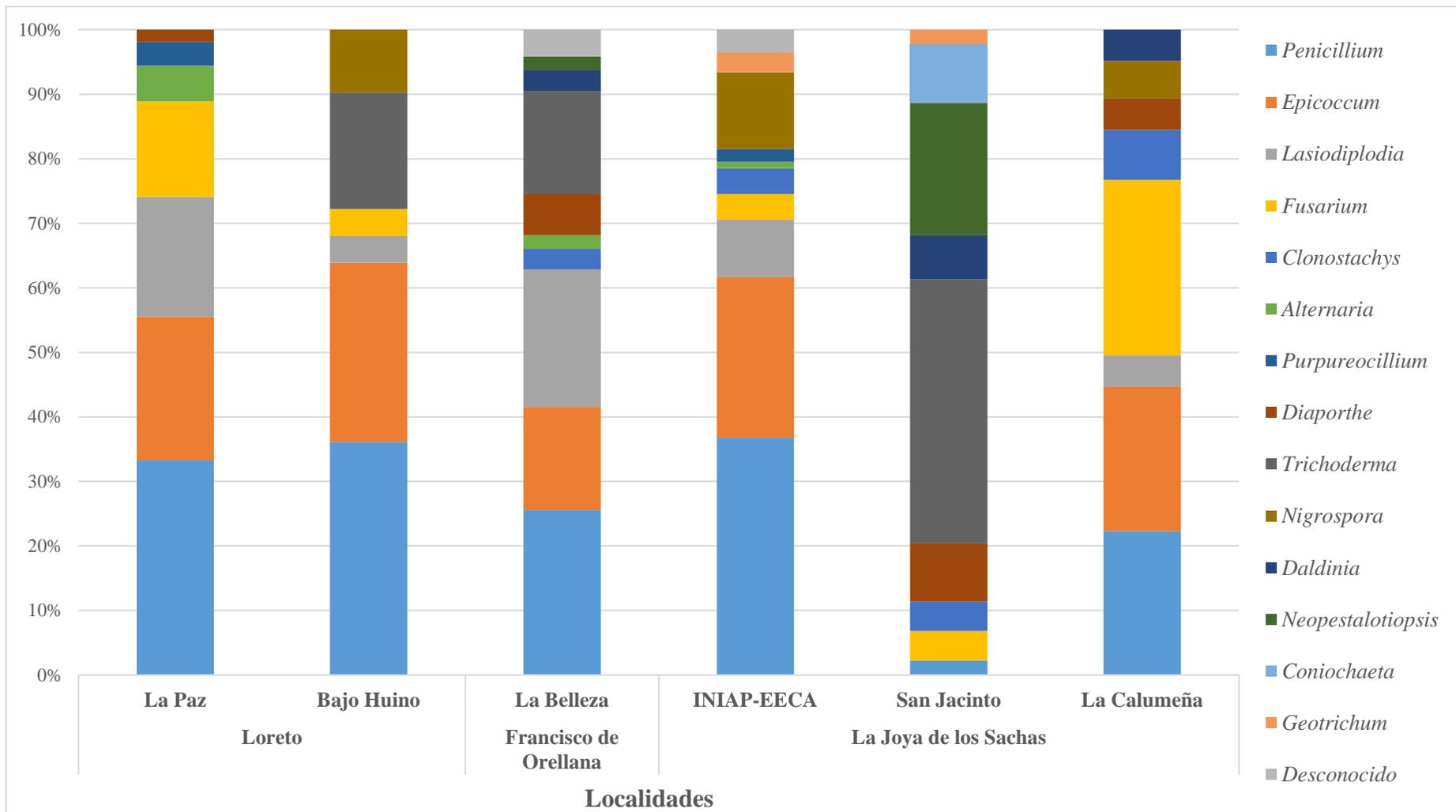
En el cantón Loreto se encuentran ubicadas las localidades La Paz y Bajo Huino, en el cantón Francisco de Orellana se encuentra la localidad La Belleza y en el cantón La Joya de los Sachas están las localidades INIAP-EECA, San Jacinto y La Calumeña.

El género de mayor abundancia fue *Penicillium* sp. (26,27%), el cual registró una mayor presencia en la localidad INIAP-EECA (38,14%), seguidas por Bajo Huino (36,6,11%), La Paz (33,33%), La Belleza (25,53%), La Calumeña (22,334%) y la de menor abundancia fue San Jacinto (2,27%). En cuanto al género *Epicoccum* sp. (19,01%), existió mayor abundancia en la localidad Bajo Huino (27,78%), en menor medida están las localidades INIAP-ECCA (25,77%), La Calumeña (22,34%), La Paz (22,22%), siendo La Belleza (15,95%) la de menor abundancia; mientras, en San Jacinto no hubo presencia de este género. *Trichoderma* sp. mostró los siguientes valores en las distintas localidades: San Jacinto (40,91%), Bajo Huino (18,05%) y La Belleza (15,96%), no hubo presencia de este género en las localidades de La Paz, INIAP-ECCA y La Calumeña. Referente al género *Lasiodiplodia* sp. (9,68%), la localidad con mayor abundancia de este género fue La Belleza (21,28%), a continuación, está La Paz (18,52%), INIAP-EECA (9,27%), La Calumeña (4,85%) y Bajo Huino (4,175), no se registró presencia de este género en San Jacinto.

Lo que respecta a *Fusarium* sp. (9,14%) la localidad con mayor abundancia fue La Calumeña (27,18%), en menor medida están las localidades de La Paz (14,81%), San Jacinto (4,55%), Bajo Huino (4,17%) y la más baja fue INIAP-EECA (4,12%), La Belleza presentó este género. Los valores de abundancia de *Nigrospora* sp. (4,65%), solo se registraron en las localidades INIAP-EECA (12,37%), Bajo Huino (9,72%) y La Calumeña (5,822%). Por otro lado, *Neopestalotiopsis* sp. (3,76%), se registró solo en las localidades de San Jacinto (20,14%) y en La Belleza (2,13%). El género *Diaporthe* sp. (3,7%) mostró mayor abundancia en la localidad San Jacinto (9,09%), en menor medida se encuentran las localidades de La Belleza (6,38%), La Calumeña (4,85%), siendo La Paz (1,86%) la de menor abundancia; mientras, en las localidades Bajo Huino y INIAP-EECA no hubo presencia de este género. En tanto *Clonotachys* sp. (3,27%), registró los siguientes

valores: La Calumeña (7,77%), San Jacinto (4,55%), INIAP-EECA (4,12%) y La Belleza (3,19%), no se registraron valores para La Paz y Bajo Huino.

El género *Daldinia* sp. (2,48%) se presentó en las localidades San Jacinto (6,28%), La Calumeña (4,85%) y La Belleza (3,19%), en cuanto a las localidades La Paz, Bajo Huino e INIAP-EECA no presentaron valores de abundancia de este género. En lo referente a *Alternaria* sp. (1,46%), existió mayor abundancia en la localidad La Paz (5,56%), en menor proporción están las localidades La Belleza (2,13%) e INIAP-EECA (1,04%), en las localidades Bajo Huino, San Jacinto y La Calumeña no se registraron valores de abundancia. Solo en la localidad de San Jacinto (9,095) se registró la presencia del género *Coniochaeta* sp. (1,52%). En cuanto al género *Purpureocillium* sp. (0,97%), se presentó únicamente en las siguientes localidades La Paz (3,7%) e INIAP-EECA (2,6%). El género *Geotrichum* sp. (0,55%) se presentó en las localidades INIAP-EECA (1,04%) y San Jacinto (2,27%). En cuanto a los aislados que no fueron clasificados a nivel de género (1,6%), se registraron en las localidades de La Belleza (4,26%) e INIAP-EECA (2,07%).



**Ilustración 38-4.** Abundancia relativa a nivel de orden de los microorganismos fúngicos aislados de los frutos de cacao de las localidades de Orellana.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

#### 4.2.2. *Diversidad de los microorganismos fúngicos asociados a los frutos de cacao en relación a las tres localidades.*

La diversidad fúngica asociada a los frutos de cacao de los cantones Loreto, Francisco de Orellana y La Joya de los Sachas-Provincia de Orellana se calculó a través de los índices de Diversidad (ID). La  $\alpha$ -diversidad fue calculada por localidad mediante el uso de la riqueza de especies, la diversidad de Shannon y la diversidad de Simpson con base en el número de Hill.

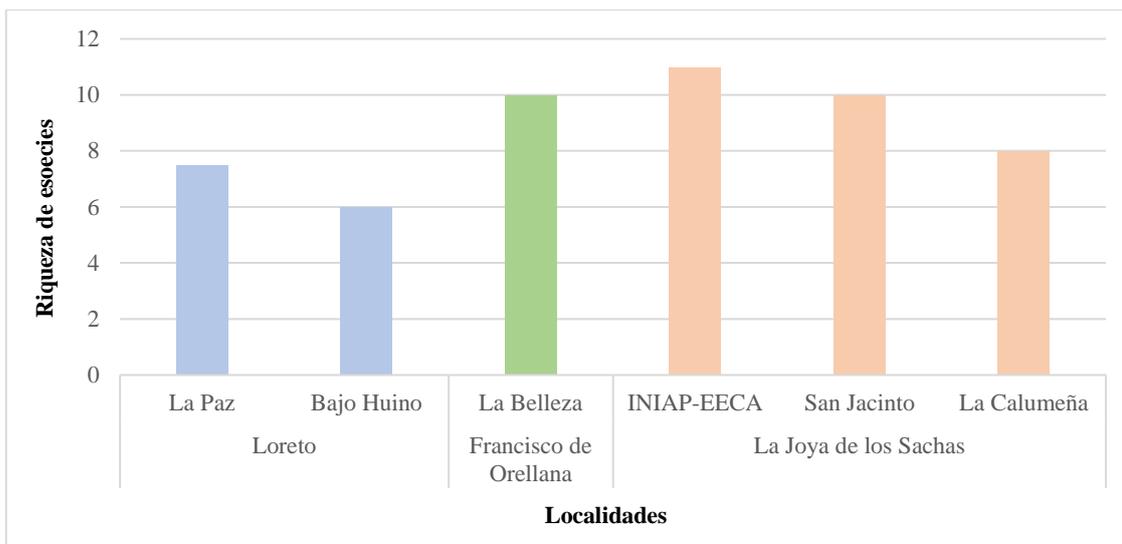
##### 4.2.2.1. *Índice de Riqueza de especies*

La riqueza de especies para los microorganismos fúngicos asociados a los frutos de cacao de tres localidades de la Provincia de Orellana, reflejo que la localidad INIAP-EECA perteneciente al cantón La Joya de los Sachas presento una mayor riqueza de especies (RS), este registro un valor de 10,99., la localidad San Jacinto registro una RS de 9,977 y la localidad La Calumeña presento un valor de RS 8, ambas localidades pertenecen al cantón anteriormente mencionado. El cantón Francisco de Orellana el cual comprende a la localidad La Belleza presento un valor de 10,99 de RS, lo que resulta en que este cantón sea el segundo con mayor índice de riqueza. Por último, el cantón Loreto presento un la más bajo RS, este cantón comprende a la localidad La Paz el cual posee un 7,491 de RS y a la localidad Bajo Huino que posee un 6 de RS (**Tabla 23-4**) (**Ilustración 39-4**).

**Tabla 23-4:** Riqueza de especies de las diferentes localidades.

<b>Riqueza de especies</b>		
<b>Localidad</b>		<b>Estimado</b>
<b>Loreto</b>	La Paz	5,571
	Bajo Huino	4,759
<b>Francisco de Orellana</b>	La Belleza	7,442
<b>La Joya de los Sachas</b>	INIAP-EECA	5,873
	San Jacinto	6,532
	La Calumeña	6,444

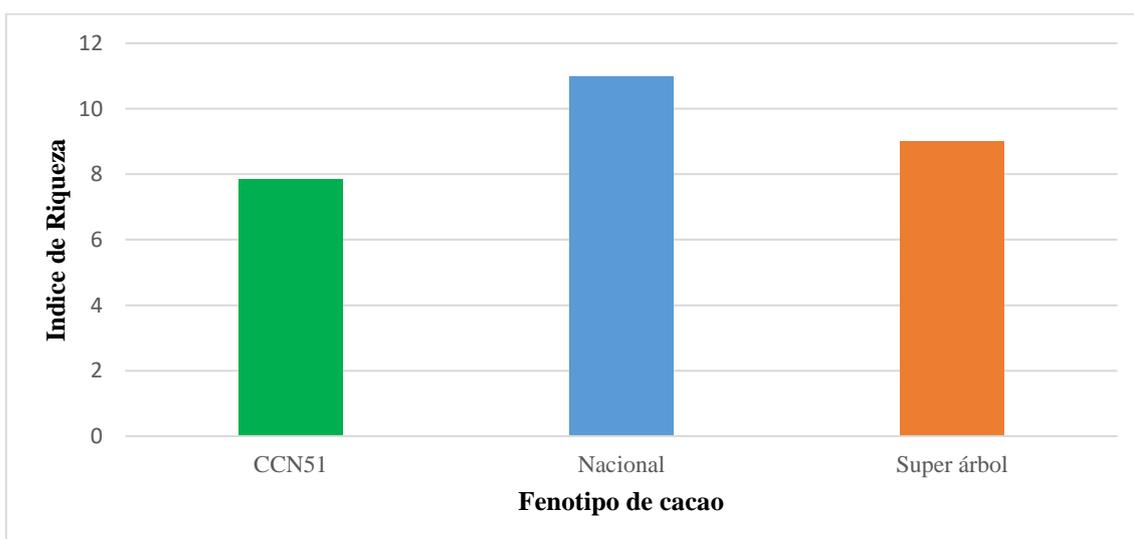
Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 39-4.** Riqueza de especies de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Se encontró una mayor riqueza de especies en la variedad Nacional con un valor de 10,99, está especialmente ubicada en la localidad INIAP-EECA, en el cantón Joya de Los Sachas, le siguieron la variedad Súper árbol con un valor de 8,99, este fenotipo se cultiva en la localidad San Jacinto y La Calumeña pertenecientes al cantón La Joya de los Sachas. Por último, el fenotipo que presento menor diversidad de especies fue CCN51, con un 7,83 valor, estos fenotipos se encuentran en la localidad La Paz, Bajo Huino ubicadas en el cantón Loreto, también está presente en la localidad La Belleza que se encuentra en el cantón Francisco de Orellana.



**Ilustración 40-4.** Riqueza de especies de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

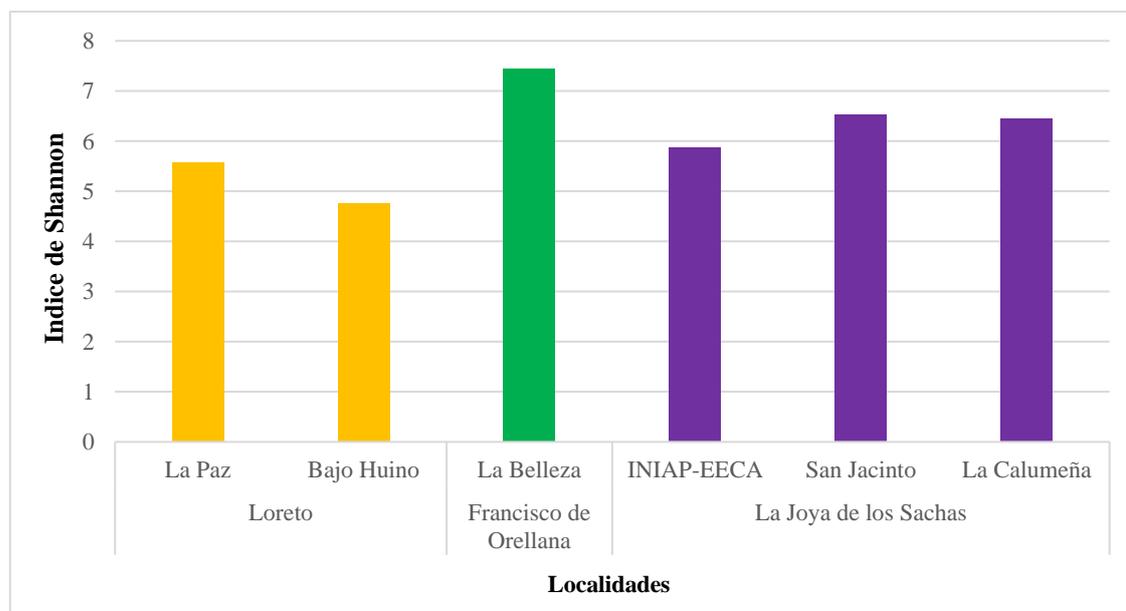
#### 4.2.2.2. Índice de Shannon

La diversidad de Shannon ( $H'$ ) la cual fue calculada por localidad, presento que el cantón Francisco de Orellana, el cual comprende a la localidad La Belleza posee la más alta diversidad ( $H'$ ) fúngica con un valor de 7,442. En lo referente al cantón La Joya de los Sachas presento el segundo valor más alto en la diversidad ( $H'$ ), mostrando los siguientes valores: San Jacinto con 6,532 de diversidad ( $H'$ ), La Calumeña con 6,44 de diversidad ( $H'$ ) e INIAP-EECA con 5,873 de diversidad ( $H'$ ). El cantón Loreto presento la menor diversidad ( $H'$ ), las localidades; La Paz registro un valor de 5,571 de diversidad ( $H'$ ) y en Bajo Huino el valor fue de 4,759 de diversidad ( $H'$ ) (Tabla 24-4) (Ilustración 40-4).

**Tabla 24-4.** Índice de Shannon de las diferentes localidades.

Localidad	Estimado	
<b>Loreto</b>	La Paz	5,571
	Bajo Huino	4,759
<b>Francisco de Orellana</b>	La Belleza	7,442
<b>La Joya de los Sachas</b>	INIAP-EECA	5,873
	San Jacinto	6,532
	La Calumeña	6,444

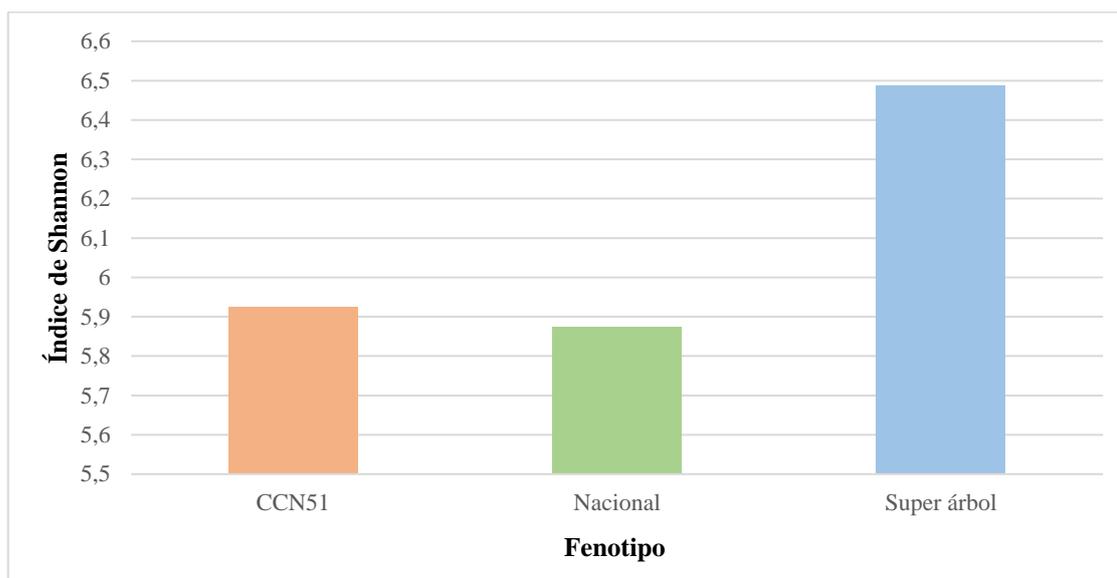
Realizado por: Quito, Dayse 2022.



**Ilustración 41-4.** Índice de Shannon de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.

Realizado por: Quito, D. 2022.

El fenotipo con mayor Índice de Shannon, fue Súper árbol con 6,488 de diversidad ( $H'$ ) que se cultiva en las localidades San Jacinto y La Calumeña (La Joya de los Sachas), le siguió CCN51 con diversidad Shannon de 5,924 la cual se cultiva en las localidades La Paz, Bajo Huino (Loreto) y La Belleza (Francisco de Orellana). La que menor valor de diversidad ( $H'$ ) presento fue Nacional con 5,873 las cuales se producen en la localidad INIAP-EECA (La Joya de los Sachas) **(Ilustración 42-4)**.



**Ilustración 42-4.** Índice de Shannon de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.

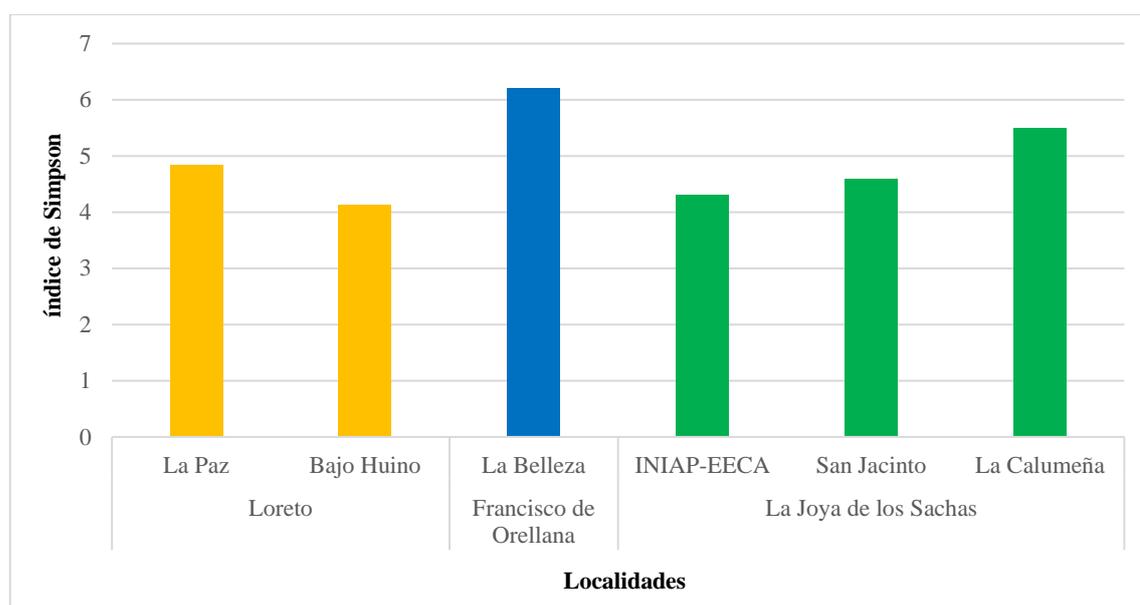
#### 4.2.2.3. Índice de Simpson

La diversidad de Simpson ( $D$ ), resulta más sensible a los microorganismos dominantes o usuales dentro de la comunidad, esta diversidad se calculó para cada localidad, dando como resultado los siguientes valores: En el cantón Francisco de Orellana donde está ubicada la localidad La Belleza existió una mayor diversidad ( $D$ ) con 6,2 de valor. En cuanto al cantón La Joya de los Sacha, se presentaron los siguientes datos; en La Calumeña hubo un valor de 5,489 de diversidad ( $D$ ), en la localidad San Jacinto el valor fue de 4,592 en diversidad ( $D$ ) y en INIAP-EECA el valor de diversidad ( $D$ ) fue de 4,303. Por último, el cantón Loreto fue el que menos diversidad ( $D$ ) mostro, registrando en La Paz un valor de 4,834 de diversidad ( $D$ ) y Bajo Huino mostro un valor de diversidad ( $D$ ) de 4,123 **(Tabla 25-4) (Ilustración 43-4)**.

**Tabla 25-4:** Índice de Simpson de las diferentes localidades.

Localidad		Estimado
Loreto	La Paz	4,834
	Bajo Huino	4,123
Francisco de Orellana	La Belleza	6,2
La Joya de los Sachas	INIAP-EECA	4,303
	San Jacinto	4,592
	La Calumeña	5,489

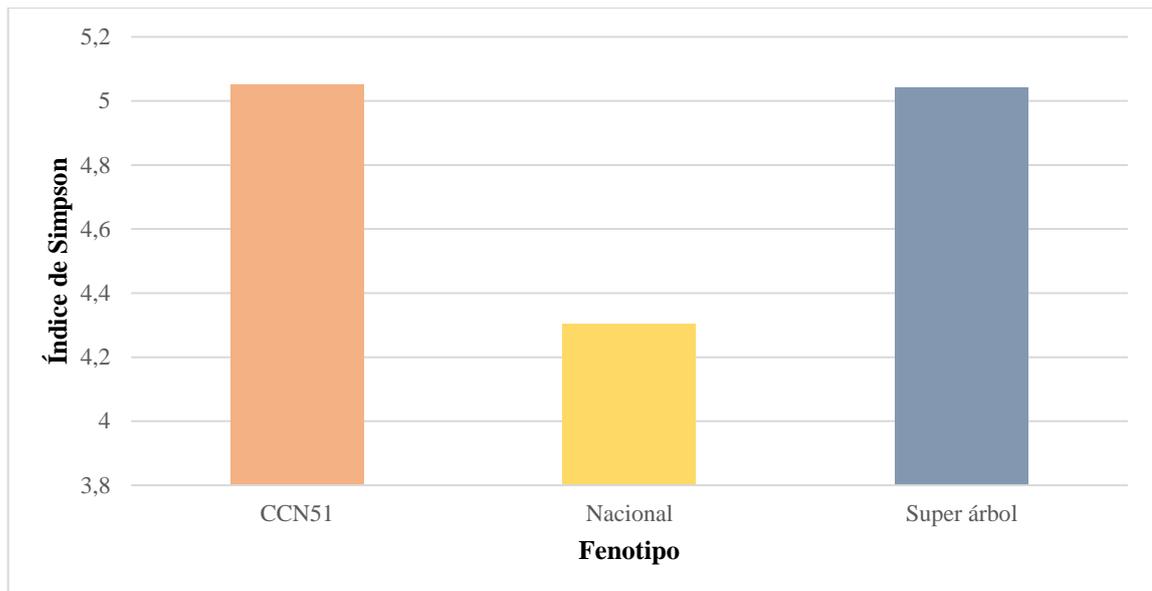
Realizado por: Quitio, Dayse 2022.



**Ilustración 43-4.** Índice de Simpson de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.

Realizado por: Quitio, D. 2022.

Como se observa en la **Ilustración 44-4**, el fenotipo con mayor diversidad ( $D$ ) es CCN5, que se cultivan en las localidades La Paz, Bajo Huino (Loreto) y La Belleza (Francisco de Orellana), mientras que el de menor diversidad ( $D$ ) es Nacional el cual se produce en la localidad INIAP-EECA (La Joya de los Sachas). Por último está la variedad Súper árbol cultivados en la localidad San Jacinto y La Calumeña (La Joya de los Sachas).



**Ilustración 44-4.** Índice de Simpson de los microorganismos fúngicos aislados de frutos de cacao de localidades de la Provincia de Orellana.

**Realizado por:** Quitio, D. 2022.

Este estudio que se desarrollo es acerca de la diversidad fúngica asociada a los frutos de cacao de diferentes localidades de la provincia de Orellana, estos frutos presentaron sintomatología de diversas enfermedades, tales como necrosis, pudrición, micelio blanco, entre otras. Se logró aislar un total de 464 colonias fúngicas, de las cuales se obtuvieron 56 distintos morfotipos. Los cuales se lograron clasificar un total de 13 géneros, todos pertenecientes al filo Ascomycota. De todos los géneros obtenidos los más representativos fueron: *Penicillium* sp., (27,80%), *Epicoccum* sp., (20,47%), *Lasiodiplodia* sp., (10,13%), *Trichoderma* sp., (9,91%) y *Fusarium* sp., (9,70%).

El filo Ascomycota abarca la mayor cantidad de hongos y de los que más se han realizado estudios, este comprende a tres subfilos, los cuales son: Saccharomycotina que engloba a levaduras en ciernes, Pezizomycotina, que comprende a los hongos filamentosos y Taphrinomycotina que entiende a las levaduras de fisión (Shen et al, 2020, p. 02). Schoch et al (2009, p. 224) menciona que los hongos de este filo son ubicuos y en los ambientes en los que habitan poseen un papel importante en el reciclaje de materia orgánica, en gran parte son saprofitos por ende resultan ser beneficiosos a excepción de cuando descomponen los productos en postcosecha. A pesar de esto Martens y Demain (2017, p. 14) indican que también son reconocidos por poseer un potencial patogénico en personas, animales y plantas, sin embargo, muchos de los pertenecientes a este filo son usados por sus propiedades comerciales e industriales. Varios de estos productos son fundamentales en procesos de fermentación y producción de alimentos, biocombustibles, productos orgánicos, enzimas y antibióticos.

El género de *Penicillium* sp. el cual fue el más abundante, es uno de los géneros fúngicos más comunes que se encuentran en una amplia gama de hábitats, tiene una distribución mundial y un gran impacto económico en la salud humana (Hajj et al., 2020, p.02). Son los hongos patógenos de plantas postcosecha más destructivos que provocan moho azul en frutas y verduras acumuladas en todo el mundo. Este grupo de hongos causa pérdidas en cultivos de alto valor como manzanas, peras y membrillos y contribuye a la acumulación de micotoxinas (patulina) en productos de frutas procesadas. El control se logra utilizando múltiples aplicaciones de fungicidas poscosecha y no hay resistencia basada en el huésped al moho azul en los cultivares comerciales de manzana (Lichtner et al., 2020, p.03). Algunas especies de *Penicillium* son los patógenos de plantas más importantes responsables de enfermedades poscosecha. Por ejemplo, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium expansum* causan pérdidas de hasta el 10% de los cultivos cosechados. De estas especies, *P. italicum* y *P. digitatum* infectan únicamente los cítricos, aunque *P. expansum* puede infectar diversos cultivos de frutas y hortalizas (Gong et al, 2020b, p. 03).

Los microorganismos fúngicos que fueron caracterizados como *Epicoccum* sp., Chen et al (2017, pp. 105.159), describe a este género como microorganismos que habitan en una gran variedad de ecosistemas, llegando a colonizar el agua dulce, ambientes marinos, gran cantidad de sustratos y plantas. Muchas de las especies pertenecientes a este género, mantienen una forma de vida endófito en los tejidos internos de muchas plantas hospedantes (Schulz y Boyle, 2005, p. 05). Los hongos endófitos que pertenecen a este género producen compuestos bioactivos que les permiten tener un uso viable como agentes de biocontrol contra patógenos como: *Botrytis cinérea*, *Claviceps africana*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum falcatum*, *Ceratocystis paradoxa* y *Xanthomonas albilineans* (Fávaro et al, 2012, p. 10).

En cuanto al género *Lasiodiplodia* sp. son especies fúngicas cosmopolitas que habitan en regiones tropicales y subtropicales, que tienen como huéspedes a especies monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas. Mantienen un estilo de vida como endófito, que pueden habitar en tejidos sin que estos presenten síntomas, también patógeno causando varias enfermedades, al igual que saprofito que se encuentran normalmente en plantas leñosas muertas (Da Silva, 2019, p. 02). La presencia de paráfisis de picnidios y estrías longitudinales en los conidios maduros son las principales características que diferencian a este género de otros géneros (Abdollahzadeh et al, 2010, p.03). Huda et al (2020, p. 01) y Salvatore et al (2020, p. 03) mencionan que *Lasiodiplodia theobromae* es el agente causal del tizón de la hoja, el cancro del tallo y la pudrición de la vaina de *T. cacao*, al igual que el responsable de la pudrición en mango. Este hongo produce metabolitos con gran diversidad estructural pertenecientes a diferentes clases de productos naturales, entre los que se encuentran dicetopiperazinas, jasmonatos, lactonas, melleínas y otros.

Entre los otros géneros encontrados es *Fusarium* sp. que son hongos patógenos que causan enfermedades a los cultivos durante la producción y también provocan el deterioro de productos agrícolas, generalmente dan como resultado la contaminación de los alimentos y la pérdida de rendimiento (Seepe et al, 2021, p. 03). Según Ferrigo, Raiola y Causin (2016, p. 02) las especies de este género provocan en los cereales de grano pequeño y el maíz provocando importantes pérdidas de rendimiento en todo el mundo. Las infecciones de este género dan como resultado una reducción del rendimiento del grano y la contaminación con micotoxinas, algunas de las cuales tienen un impacto notable en la salud humana y animal (Logrieso et al, 2002, p.03). Produce síntomas como lesiones hundidas de coloración negra hasta marrón que se producen en la base de los tallos, junto a estos síntomas también se presentan en los peciolos cercanos a la copa de manchas con una tonalidad rojiza, en ocasiones en la base de los esquejes de la planta se observan masas de micelio de tonalidades blancas o rosa (Buechel, 2018),

En el estudio realizado también se encontraron y caracterizaron hongos antagonistas, entre los que está el género *Trichoderma* sp. del cual Druzhinana et al (2018, p. 03) comenta que estos hongos son diferentes a otros hongos, estos resultan ser parásitos agresivos con otros microorganismos fúngicos, también son descomponedores eficaces de la biomasa vegetal. Los hongos de este género denotan una versatilidad nutricional única debido a que logran desarrollar interacciones biotróficas con sus similares, animales y plantas (Kubicek et al, 2014, p. 42). También pueden ser microfagos y fitófagos. Muchas es las especies de este género se utilizan para desarrollar biofungicidas, una alternativa atractiva y un complemento a los pesticidas químicos, un ejemplo de esto es *T reesei*, se utiliza comercialmente para la producción de enzimas celulolíticas necesarias para producir biocombustibles. Muchas especies poseen una gran actividad celulolítica y son parásitos asintomáticos de las plantas es decir endófitos (Jaklitsch, 2009, p.91).

Por otro lado, tenemos a *Clonostachys* sp, el cual también es muy considerado por su gran potencial de agente de biocontrol. Son micoparásitos que pueden alimentarse fuentes, son micoparásitos agresivos necrotróficos que abarca una amplia gama de huéspedes (Broberg et al, 2020, p. 02). *Clonostachys rosea* es una especie cosmopolita, su infección empieza cuando las hifas penetran y destruyen la de los otros hongos (Gams, 2004, p.03). Muchas de las cepas de *C. rosea* se usan de manera comercial como agentes de biocontrol fúngicos para especies de plantas (Broberg et al, 2020, p. 02). Gimeno et al. (2019, p. 02) y Demissie et al. (2018, p. 04). mencionan que, este hongo es un agente de control biológico contra diversos patógenos de plantas, incluidos *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Botrytis cinera*, *Pythium tracheiphilum* y nematodos. En contra de *F. graminearum*. puede secretar inhibidores de su crecimiento.

Otro de los antagonistas encontrados es *Purpureocillium* sp., gran parte interés por los hongos dentro del género es en parte a que presenta actividad antagónica en los huevos y hembras de nematodos, especialmente a los nematodos agalladores de la raíz que afectan a una gran diversidad de plantas, lo que provoca pérdidas muy grandes en la productividad de los cultivos (Lamovsek et al., 2013, p. 23). El método de parasitar los nematodos empieza con las hifas que invaden la superficie de los huevos y a continuación se producen apresorios, que empieza la infección después de la adsorción, durante este proceso se secretan enzimas como la proteasa, quitinasa y serina (Jiang et al, 2021). Prasad et al. (2015, p. 10) menciona que *Purpureocillium lilacinum* es un hongo endófito que se viven en hábitat terrestres y estuarinos, poseen un potencial muy grande como agente de biocontrol para nematodos que parasitan a varios cultivos. Tienen una gran tolerancia a los metales pesados Gong et al. (2017 p. 53) ha indicado que protege la planta de mangle (*Kandelia candel*) bajo estrés por cobre. Se ha comprobado que el filtrado de fermentación de *P. lilacinum* consigue inhabilitar el desarrollo micelial de los hongos patógenos, como; *Helminthosporium maydis* y *F. graminearum* y mantienen un efecto inhibitor en la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* (Jiang et al, 2021).

Se encontró una mayor riqueza de especies en la localidad INIAP.EECA ubicado en el cantón La Joya de los Sachas, mientras que en la menor riqueza se presentó en la localidad Bajo Huino, la cual se encuentra en el cantón Loreto. En lo referente a la mayor riqueza de especies por fenotipo, fue la variedad Nacional la que obtuvo un mayor valor con 10,99. El fenotipo Súper árbol fue el de menor valor con 8,99. Probablemente esto se debe al tipo de manejo que se da en las plantaciones para el control de plagas y enfermedades, el uso de agroquímicos merma la diversidad de especies, lo que reduce el potencial que fomenta una agricultura sostenible y evita una mayor seguridad alimentaria. No fue posible aislar el género *Moniliophthora* sp. debido a que para su aislamiento es necesario realizar un aislamiento directo, sin embargo, si se caracterizó de forma morfológica y molecular cepas pertenecientes a este género, estas cepas fueron aislados de los frutos procedentes de las mismas localidades.

## CONCLUSIONES

- Se aislaron en totalidad 464 microorganismos fúngicos, estos se clasificaron en 56 distintos morfotipos y se agruparon en 14 géneros.
- Este es uno de los primeros estudios moleculares realizados sobre diversidad microbiana de frutos de cacao en el Ecuador aplicando biología molecular y mostrando potenciales microorganismo de uso en biotecnología y aplicación agrícola en cacao, como: *Epicoccum* sp., *Purpureocillium* sp. y *Trichoderma* sp. Adicionalmente este estudio permitió detectar un posible patógeno emergente, el cual fue *Lasiodiplodia*.
- Los aislados de *Moniliophthora* asociados a los frutos de cacao de las localidades de La Belleza, INIAP-EECA, San Jacinto y La Calumeña y asociados a los genotipos CCN51, Nacional, y Súper árbol, correspondieron a la especie *M. roreri* según los análisis moleculares y estos mostraron similitud genética con aislados de *M. roreri* obtenidos de cacao de Colombia y Ecuador.
- Los microorganismos aislados de los frutos de cacao provenientes de las tres localidades de la Provincia de Orellana, se identificaron y caracterizaron tanto morfológica, cultural y molecularmente, como resultado se agruparon en los siguientes géneros con distintos valores de abundancia: *Penicillium* sp. (27,8%), *Epicoccum* sp. (20,47%), *Lasiodiplodia* sp. (10,13%), *Trichoderma* sp. (9,91%), *Fusarium* sp. (9,70%), *Nigrospora* sp. (5,39%), *Clonostachys* sp. (3,66%), *Diaporthe* sp. (3,45%), *Daldinia* sp. (2,37%), *Neopestalotiopsis* sp. (2,37%), *Alternaria* sp. (1,29%), *Purpureocillium* sp. (0,86%), *Coniochaeta* sp. (0,86%), *Geotrichum* sp. (0,55%) y uno que no se logró identificar perteneciente a la familia Xylariaceae (1,06%).
- En cuanto a la diversidad fúngica, se encontró una mayor riqueza de especies en la localidad INIAP-EECA perteneciente al cantón La Joya de los Sachas. En lo referente al índice de Simpson y Shannon, estos obtuvieron un mayor valor en el cantón Francisco de Orellana en la localidad La Belleza. La localidad con menor valor en riqueza de especies, índice de Simpson e índice de Shannon fue Loreto en la localidad Bajo Huino. El fenotipo con mayor riqueza de especies fue Nacional, el de mayor índice de Shannon fue Súper árbol y mayor índice de Simpson fue CCN51, mientras que el de menor riqueza de especies fue CCN51, menor índice de Shannon y Simpson fue Nacional.

## RECOMENDACIONES

- Caracterizar los aislados que no lograron ser identificados para determinar el papel que desempeñan en los cultivos de cacao.
- Realizar pruebas de antagonismo con los hongos antagonistas: *Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp. y *Purpureocillium* sp. para el control de *M. roreri*.
- Probar nuevos protocolos para la realización de PCR para la identificación de microorganismos fúngicos, en vista de que no todos requieren de las iguales condiciones en cuanto al anelamiento y desnaturalización.
- Investigar cuales son los factores que determinan la diversidad en las distintas localidades de la provincia de Orellana.

## GLOSARIO

**Aislamiento:** Proceso el cual se sigue con la finalidad de obtener un hongo u otro organismo en cultivo puro (Ulloa et al., 2006: p.14).

**Antagonismo:** Es la relación que involucra a dos especies de organismos contrarios, en la cual uno de los dos, afecta la vida del otro, ya sea inhibiendo parcialmente o totalmente su crecimiento o incluso matándolo (Ulloa et al., 2006: p.26).

**Biverticilado:** Ramificado en dos niveles, es decir, con mótulas y fiálides, como los conidióforos de algunas especies de *Penicillium* (Ulloa et al., 2006: p.61).

**Biótrofo/fa:** Parásito que puede crecer y esporular solo a expensas de las células vivas del hospedante (Ulloa et al., 2006: p.58).

**Caracterización:** Es un tipo de descripción cualitativa que puede recurrir a datos o a lo cuantitativo con la finalidad de adquirir mayor conocimiento sobre algo. Para cualificar ese algo previamente se deben identificar y organizar los datos; y a partir de ellos, describir de una forma estructurada; y posteriormente, establecer su significado (Sánchez, 2011: p.189).

**Célula conidiógena:** En los hongos conidiales se refiere a una célula fértil, especializada en la producción de conidios (Ulloa et al., 2006: p.87-88).

**Cepa:** Cultivo que consiste en células diploides, comúnmente fibroblásticas, que pueden volverse a dispersar y cultivar un número finito de veces. (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125)

**Clamidosporas:** Conidios que se desarrollan dentro de la hifa (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Conidio:** Conidios Cuerpos reproductivos asexuales micóticos parecidos a esporas (Ryan y Ray, 2017, pp.80-125)

**Conidióforo:** Hifa simple o ramificada, que esta morfológicamente y/o fisiológicamente diferenciada de una hifa somática para producir y portar conidios; estos generalmente se encuentran sobre células conidiógenas especializadas, las cuales se pueden disponer de diversas maneras (Ulloa et al., 2006: p.121).

**Corteza:** Capa externa de un órgano (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Divergente:** Es un tipo de rama himeniífera en el que hay una zona central de hifas (capa media) de la que divergen oblicuamente dos hileras de células (Ulloa et al., 2006: p.164).

**Desinfección:** Que desinfecta o es capaz de desinfectar. Agente químico o físico que destruye los microorganismos infecciosos o patógenos (Ulloa et al., 2006: p.152).

**Electroforesis:** Procedimiento para separar partículas cargadas según sus diferencias de migración en un campo eléctrico (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Endémica:** Enfermedad continuamente presente a niveles cerca de epidémicos en una región, localidad o grupo particular (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Endófito/ta:** Hongo que vive dentro de tejidos vegetales sin mostrar signos externos de su presencia, como ciertos parásitos fúngicos de pastos, los cuales son tóxicos para los animales que se alimentan (Ulloa et al., 2006: p.77).

**Epidermis:** La capa superficial de las células de las hojas y otras partes de la planta (D'Arcy et al., 2001: p.2).

**Especie:** Es la limitación de lo genérico en un ámbito morfológicamente concreto. La determinación de los límites específicos es puramente subjetiva y, por tanto, expuesta a las modalidades de la interpretación personal (Pío Font Quer, 2010: p.405).

**Espora:** Forma microbiana especializada que facilita su supervivencia y diseminación (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Fenotipo** Propiedades expresadas por el genoma completo en condiciones particulares (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Esporulación:** Una célula bacteriana forma una espora bajo circunstancias adversas (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Eucariota:** Organismo comprendido por una o más células que contienen núcleos verdaderos y orgánulos citoplásmicos (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Fermentación:** Proceso metabólico productor de energía que utiliza un aceptor endógeno de electrones, por lo general, piruvato (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Fialide:** Tipo de célula conidiógena, con forma de botella que producen conidios blásticos (fialoconidios o fialosporas) en sucesión basípeta a partir de un locus (monofialide; con una abertura) o varios loci (polifialide) sin que haya aumento de la longitud de la fialide misma (Ulloa et al., 2006: p.236).

**Filamento:** Estructura que consiste en moléculas polimerizadas de una sola especie de proteína denominada flagelina (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Fusiforme:** Que se reduce gradualmente a ambos extremos (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Gel de agarosa:** Agar altamente purificado (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Gen:** Secuencia de DNA que codifica para un polipéptido o molécula de RNA (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Género:** Grupo bien definido de especies que se distingue claramente de otros microorganismos (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Hialino:** Transparente o casi; translúcido; utilizado a menudo en el sentido de incoloro (D'Arcy et al., 2001: p.2).

**Hifa:** Filamento tubular que representa la unidad estructural (Talo) de la mayoría de los hongos (Ulloa et al., 2006: p.286).

**Holoblástico:** Pertenciente o relativo a blástico. Tipo de desarrollo conidial a partir de una porción de célula conidiógena en el que el primordio del conidio sufre un notorio agrandamiento antes que dicho primordio sea delimitado por un septo (Ulloa et al., 2006: p.298).

**In vitro:** Que sucede dentro de un tubo de ensayo (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Incidencia:** El número de casos nuevos de una enfermedad dentro de un periodo especificado (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Levadura:** Célula fúngica simple que se reproduce por gemación (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Macroconidios:** Conidio o espora de reproducción asexual, encorvado y sigmoide, que se distingue del microconidio tanto por su mayor tamaño como por ser multicelular (Ulloa et al., 2006: p.352).

**Métula:** Ramita del conidióforo que origina fiálides o células conidiógenas, como se presentan en los géneros *Penicillium* y *Gliocladium*. También denomina profiálide, puesto que se halla debajo de la fiálide (Ulloa et al., 2006: p.363)

**Micelio:** Masa de hifas fúngicas (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Microconidos:** Conidio pequeño, generalmente unicelular. En los hongos conidiales los conidios cuales nacen directamente del pedicelo; muy raramente las fiálides nacen de métulas en algunas funcionan como esporas asexuales (Ulloa et al., 2006: p.376).

**Moho:** Una fina capa de crecimiento micelial y esporas en la superficie de las partes de la planta infectadas (D'Arcy et al., 2001: p.3).

**Monofialídico/ca:** Se aplica a una fiálide (célula conidiógena) que tiene un solo sitio o locus a través del cual se producen los conidios (Ulloa et al., 2006: p.352).

**Monoverticilado:** Conidióforo que estricta o predominantemente tiene un solo punto de ramificación entre el pedicelo y la cadena de conidios, es decir porta un verticilo de fiálides, las especies (Ulloa et al., 2006: p.388).

**Necrosis:** Muerte del tejido (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Parásito:** Organismo que vive en y a expensas de otro organismo (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Patogénico:** Capaz de ocasionar enfermedad (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Polifiálide:** Célula conidiógena, en forma de botella, que produce fialoconidos (fialospora) a través de varias aberturas que se forman en sucesión sincrónica o simpodial irregular en la pared celular (Ulloa et al., 2006: p.451).

**Quitina:** Polisacárido que forma los exoesqueletos de algunos insectos o de las paredes celulares de los hongos (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Raza:** En su sentido corriente, los descendientes de un antepasado común, los del mismo linaje (Pío Font Quer, 2010: p.933).

**Saprófito:** Organismo que vive de la materia orgánica muerta en el ambiente (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

**Síntoma:** Reacciones o alteraciones internas o externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad (Peña et al., 2015: p.11).

**Sintomatología:** Parte de la patología vegetal que estudia los síntomas de las enfermedades, así como la etiología estudia sus causas (Pío Font Quer, 2010: p.1003)

**Talo:** Cuerpo vegetativo o soma de un hongo. El talo puede ser unicelular, multicelular, o dimórfico, según las especies o las fases del ciclo de vida y las condiciones en el medio que se desarrolle (Ulloa et al., 2006: p.525).

**Terverticilado:** También llamado triverticilado; se dice de un penicilo que tiene una ramificación en tres niveles, decir, que su fiálides siempre nacen de métulas, u las métulas nacen generalmente de ramas terminales de conidióforo bien definido (Ulloa et al., 2006: p.531).

**Verticilado/da:** Es un tipo de ramificación en el que las ramas (pedicelos, métulas, fiálides, etc.) nacen un mismo nivel en la hifa o soporte (esporangióforo, conidióforo, etc.) y crecen oblicuamente hacia arriba con respecto al eje central (Ulloa et al., 2006: p.352).

## BIBLIOGRAFÍA

**ABDOLLAHZADEH et al.** “Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran”. *Persoonia*. (2010). p. 03. [Consulta: 25 de julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3028508/>

**AGRIOS, G.** “Enfermedades de las plantas causadas por hongos: Introducción”. Limusa [en línea]. (2008). México. 2(1). p. 05. [Consulta: 08 de agosto de 2022]. Disponible en: [http://redbiblio.unne.edu.ar/pdf/0603-002323\\_i.pdf](http://redbiblio.unne.edu.ar/pdf/0603-002323_i.pdf)

**AGUDELO, et al.** *El control biológico: base de la agricultura sostenible*. [Material gráfico proyectable]. 1a ed. Antioquia: Colegio Mayor de Antioquia, [2019]. 30. Control biológico. [Consulta: 13 de junio de 2022]. Disponible en: [https://www.colmayor.edu.co/wp-content/uploads/2019/10/217\\_el\\_control\\_biol\\_gico\\_bas\\_qne3ly\\_.pdf](https://www.colmayor.edu.co/wp-content/uploads/2019/10/217_el_control_biol_gico_bas_qne3ly_.pdf)

**ALFENAS, A.C; & MAFIA, R.G.** *Métodos de Fitopatología*. 2a Ed. Universidad Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil: Editora UFV, 2016, pp. 59-63

**ANACAFE.** *Cultivo de Cacao. Programa de diversificación de Ingresos en la Empresa Cafetalera* [en línea]. Bogota-Colombia: Asociación Nacional del Cacao, 2004. [Consulta: 19 octubre 2021]. Disponible en: <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/05/Cultivo-de-Cacao.pdf>

**Andrade, Kellen CR et al.** “Secuenciación y caracterización de un gen de L-asparaginasa de una nueva especie de *Penicillium* sección *Citrina* aislada de Cerrado.” *Informes científicos* [en línea] Estados Unidos. vol. 11(1) (2021). p. 07 [Consulta: 23 junio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8429440/>

**ANECACAO.** *Cacao Nacioonal* [en línea]. Los Rios-Ecuador: Anecacao, 2015. [Consulta: 15 octubre 2021]. Disponible en: <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>

**ASTUDILLO et al.** “Descubriendo la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares autóctonos asociados a cacao (*Theobroma cacao*), cedro (*Cedrela montana*) y guayusa (*Ilex guayusa*): un primer paso hacia la obtención de biofertilizantes y el desarrollo sustentable de la agroforestería”. *CEDIA*. 2021. (Ecuador) 2(1), p. 04. [Consulta: 17 julio 2020]. Disponible en: <https://ticec2021.cedia.edu.ec/dmdocuments/Posters/Diversidad%20de%20Endomicorizas.pdf>

**Balmas, V; et al.** “*Le specie di Fusarium più comuni in Italia*”. *Suggerimenti per il loro riconoscimento*. Vol. 10, n° 1. Italia, 2000 pp.60.

**Barbosa et al.** Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations. *BMC Genomics* [en línea]. (2018). vol 19(1). p. 02. [Consulta: 17 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6029071/>

**Barsottini et al.** “Biochemical characterization and inhibition of the alternative oxidase enzyme from the fungal phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*”. *Commun Biol* [en línea]. (2020) vol. 3(1). p. 01. [Consulta: 17 julio 2022]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248098/pdf/42003\\_2020\\_Article\\_981.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248098/pdf/42003_2020_Article_981.pdf)

**Barbosa-Reséndiz et al.** “El género *Daldinia* (Sordariomycetes, Ascomycota) en México”. *Acta botánica mexicana* [en línea]. (2020). p. 02. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/339760684\\_El\\_genero\\_Daldinia\\_Sordariomycetes\\_Ascomycota\\_en\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/339760684_El_genero_Daldinia_Sordariomycetes_Ascomycota_en_Mexico)

**Barnes et al.** Daldionin, un derivado de binaftilo sin precedentes y diversos congéneres de policétidos de un endófito de orquídea fúngica. *Química: una revista europea*. (2016) vol 22. p.02.

**Batista, L.** *Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana* [en línea]. Santo Domingo-República Dominicana: CEDAF, 2009. [Consulta: 15 octubre 2021]. Disponible en: <http://www.cedaf.org.do/publicaciones/guias/download/cacao.pdf>

**Berthiller et al.** “Micotoxinas enmascaradas”. *Nutrición Alimentos Res.* (2013) vol 57 p. 16. doi: 10.1002/mnfr.201100764

**Bell P.J.L., Karuso P.** “Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*” *J. Am. Chem. Soc.* (2003), p. 125

**BOONMEE et al.** Fungal diversity notes 1387-1511: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. *Fungal Divers.* (2021). vol 111(1). p. 202. [Consulta: 16 julio 2022]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8648402/pdf/13225\\_2021\\_Article\\_489.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8648402/pdf/13225_2021_Article_489.pdf)

**Branner, Carolina et al. 2013.** Obtención y caracterización de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales : Clavicipitaceae) para genotipificación. [En línea] 2013. [file:///C:/Users/Profesional/Downloads/doc02662220151111151531%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Profesional/Downloads/doc02662220151111151531%20(1).pdf).

BARNETT, H.L.; & HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 a Ed. Saint Paul, Minnesota-United States of America: The American Phytopathological Society, 1998. ISBN: 0890541922. pp.1-237

**BROBERG et al.** “Comparative genomics highlights the importance of drug efflux transporters during evolution of mycoparasitism in *Clonostachys* subgenus *Bionectria* (Fungi, Ascomycota, Hypocreales)”. *Evol Appl* [en línea]. 2020. 14(2), p. 02. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7896725/>

**CABRERA, Dagoberto.** Manejo Integrado del Barrenador del Cacao (*Theobroma cacao* L.) [en línea]. El Salvador: Alianza cacao, 2019. [Consulta: 21 octubre 2021]. Disponible en: <http://sicacao.info/wp-content/uploads/2019/08/Manual-del-manejo-del-barrenador-final.pdf>

**CALVA, A y RAMÍREZ, P.** “Guía técnica para el establecimiento y manejo del cacao súper árbol”. GIZ [en línea]. (2016). Quito-Ecuador, p. 05. [https://www.bivica.org/files/6054\\_Cacao\\_Guia\\_tecnica\\_final\\_18\\_10\\_16.pdf](https://www.bivica.org/files/6054_Cacao_Guia_tecnica_final_18_10_16.pdf)

**Castellani, A.** *Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water.* *Mycopathol et Mycol Appl*, 1963. pp. 1-6.

**Castellani, A.** “*Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water*”. *Further researches.* *J Trop Med Hyg*, 1967, pp. 70.

**CEFA. Cacao.** [en línea]. Quito-Ecuador: CEFA, la semilla de la solidaridad, 2021. [Consulta: 19 octubre 2021]. Disponible en: <https://cefaecuador.org/productos/cacao/>

**CEPAL, Diagnóstico de la Cadena Productiva del Cacao en el Ecuador** [en línea]. Quito-Ecuador: Comisión Económica para América Latina y el Caribe, 2015. [Consulta: 20 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.vicepresidencia.gob.ec/wp-content/uploads/2015/07/Resumen-Cadena-de-Cacao-rev.pdf>

**Chan et al.** “Identification and characterization of *Daldinia eschscholtzii* isolated from skin scrapings, nails, and blood”. PeerJ [en línea]. (2016) p. 07. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5178343/pdf/peerj-04-2637.pdf>

**Chen et al.** “Didymellaceae revisitada”. Semental [en línea]. Mycol. (2017). Vol. 87(1). pp. 105-159. [Consulta: 17 julio 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.06.002>

**Chtioui, et al.** [Bioprospecting Phenols as Inhibitors of Trichothecene-Producing Fusarium: Sustainable Approaches to the Management of Wheat Pathogens](#) [en línea]. [Toxins \(Basel\)](#). (2022). vol 14(2):72. doi: 10.3390 [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8875213/>

**CORDERO, M y DOMENICO, P.** “Diversidad de *Trichoderma* sp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *crinipellis pernicios* (stahel) singer”. *INERCIENCIA*. 2010, (Venezuela) 35(10), p. 06. [Consulta: 17 julio 2020]. Disponible en: <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2018/01/777-c-PAVONE-7.pdf>

**CONTRERAS, L y BUSTILLO, A.** “Caracterización morfológica de cepas de hongos entomopatógenos de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps* sp., *Metarhizium* sp. y *Purpureocillium lilacinum*”. CENIPALMA. (2020). p. 03. [Consulta: 16 julio 2022]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/338925257\\_Caracterizacion\\_morfologica\\_de\\_cepas\\_de\\_hongos\\_entomopatogenos\\_de\\_Beauveria\\_bassiana\\_Cordyceps\\_sp\\_Metarhizium\\_sp\\_y\\_Purpureocillium\\_lilacinum](https://www.researchgate.net/publication/338925257_Caracterizacion_morfologica_de_cepas_de_hongos_entomopatogenos_de_Beauveria_bassiana_Cordyceps_sp_Metarhizium_sp_y_Purpureocillium_lilacinum)

**D'ARCY, C. J.; EASTBURN, D. M.; & SCHUMANN, G. L.** “Illustrated Glossary of Plant Pathology”. The Plant Health Instructor. The American Phytopathological Society (APS).2001, pp.1-6. [Consulta: 26 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/illglossary/Pages/default.asp>

**Darapanit et al.** “Identification, pathogenicity and effects of plant extracts on *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis* causing fruit diseases”. Sci Rep [en línea]. 2021, vol, 11(1) p. 03. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8604934/>

**Damm et al.** *Coniochaeta* (Lecythophora), *Collophora* gen. nov. y especies de *Phaeomoniella* asociadas con necrosis de madera de árboles de *Prunus*. Persononia 2010. Vol. 24. p. 60.

**Da Silva et al.** “Phylogeny and morphology of Lasiodiplodia species associated with Magnolia forest plants”. Sci Rep [en línea]. (2019). vol. 9(1). p. 02. [Consulta: 25 de julio 2022]. Disponible en:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6778208/pdf/41598\\_2019\\_Article\\_50804.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6778208/pdf/41598_2019_Article_50804.pdf)

**De Lima Favaro et al.** “Epicoccum nigrum P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth” PLoS ONE. (2012), p. 07

**DEL PONTE, E.M.; PFENNING, L.H.; & ABREU, L.M.** Tropical Fusarium Workshop Viçosa 2017. Viçosa-Brasil:

Tropical Fusarium Workshop, 2017, pp. 13-75

**DEMISSIE et al.** “Profiling of the Transcriptomic Responses of *Clonostachys rosea* Upon Treatment With Fusarium graminearum Secretome”. Front Microbiol [en línea]. (2018) 9(1). [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5999785/>

**Durango, W.** *La Cadena de Valor del Cacao en América Latina y El Caribe* [en línea]. Quito-Ecuador: FONTAGRO, 2019. [Consulta: 20 octubre 2021]. Disponible en: [https://www.fontagro.org/new/uploads/adjuntos/Informe\\_CACAO\\_linea\\_base.pdf](https://www.fontagro.org/new/uploads/adjuntos/Informe_CACAO_linea_base.pdf)

**DRUZHININA et al.** “Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus Trichoderma from its plant-associated hosts”. PLoS Genet [en línea]. (2018). vol. 14(4). p. 02. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908196/>

**EBRAHIMI, L.** “Identification of some fungi accompanying the scab symptoms in Iran”. Mycologia Iranica [en línea]. Tehran-Iran. Vol. 3(1). p. 29. [Consulta: 30 junio 2022]. Disponible en:

[https://www.researchgate.net/publication/324965732\\_Identification\\_of\\_some\\_fungi\\_accompanying\\_the\\_scab\\_symptoms\\_in\\_Iran](https://www.researchgate.net/publication/324965732_Identification_of_some_fungi_accompanying_the_scab_symptoms_in_Iran)

**Ekos** [en línea]. Zabala, 2019 [Consulta: 20 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.ekosnegocios.com/articulo/ecuador-es-el-cuarto-productor-mundial-de-cacao-y-el-numero-1-en-latinoamerica>

**ESPINOSA ESCOBAR, Carla Patricia & MOSQUERA NARVÁEZ, David Ricardo.** Estudio de factibilidad para la producción de cacao en el Cantón San Lorenzo, Provincia de Esmeraldas [En línea] (Trabajo de titulación) (Ingeniería). Universidad Central del Ecuador. Esmeraldas-Ecuador. 2012, pp. 32-35. [Consulta: 15 octubre 2021]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1559/1/T-UCE-0005-181.pdf>

**Estrada, W.** *Guía Técnica del Cultivo de Cacao Manejado con Técnicas Agroecológicas* [en línea]. San Salvador-El Salvador: CATIE, 2011. [Consulta: 19 octubre 2021]. Disponible en: [http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/01/Estrada\\_et\\_al\\_Guia\\_Tecnica\\_Cacao.pdf](http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/01/Estrada_et_al_Guia_Tecnica_Cacao.pdf)

**FABREGA, A.** “El género *Alternaria*: características morfológicas y capacidad de producción de micotoxinas [En línea]” *Anales de la Real Academia de Doctores.* (2002). vol 6. p. 357. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://www.radoctores.es/doc/1V6N2-calvo-generoalternaria.pdf>

**FAKHRUNNISA, M y GHAFAR, A.** Micoflora transmitida por semillas de trigo, sorgo y cebada. *Pak. J.Bot.* (2006). vol 38. p. 185.

**Fávaro et al.** “Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species” [En línea]. *PLoS One.* (2011). vol 6(8). p. 02 [Consulta: 29 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3154903/pdf/pone.0014828.pdf>

**Franco, L.** *Observación de hongos de interés industrial* [en línea]. Granada-España: Universidad de Granada, 2015. pp. 07. [Consulta: 19 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.ugr.es/~cjl/hongos>

**Fávaro et al.** “*Epicoccum nigrum* P16, un endófito de la caña de azúcar, produce compuestos antifúngicos e induce el crecimiento de las raíces”. *PLoS Uno* [en línea]. (2012) [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036826> Referencia cruzada

**Félix C, et al.** “Un análisis multiómico del patógeno de la vid *Lasioidiplodia theobromae* revela que la temperatura afecta la expresión de genes relacionados con la virulencia y la patogenicidad”. *Ciencia Rep.* (2019). Vol. 9(13). p.21

Han P, Zhang X, Xu D, Zhang B, Lai D, Zhou L. Metabolites from *Clonostachys Fungi* and Their Biological Activities. *J Fungi (Basel).* 2020 Oct 16;6(4):229. doi: 10.3390/jof6040229. PMID: 33081356; PMCID: PMC7712584.

**FERRIGO D, RAIOLA A y CAUSIN R.** “Fusarium Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management”. *Molecules* [en línea]. (2016). vol 21(5). p.02. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6274039/>

**Finckh et al.** “Manejo orgánico de enfermedades de leguminosas templadas”. *Enfermedades de las plantas y su manejo en la agricultura orgánica*, Saint Paul, Minnesota, EE. UU.: APS press; (2015) pp. 29–31

**Forin et al.** “Taxonomic Re-Examination of Nine *Rosellinia* Types (Ascomycota, Xylariales) Stored in the Saccardo Mycological Collection”. *Microorganisms* [en línea]. (2021). Vol 9(3). pp. 13-14. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8005106/pdf/microorganisms-09-00666.pdf>

**GAMS, W.** “Hongos Fungicolas Polífagos”. *Micología* [en línea]. (2004), 10(1), p. 02. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/clonostachys>

**García et al.** *Molecular phylogeny of Coniochaetales*. *Investigación micológica* (2006). p. 110

**GIMENO et al.** “TaqMan qPCR for Quantification of *Clonostachys rosea* Used as a Biological Control Agent Against *Fusarium graminearum*”. *Front Microbiol* [en línea]. (2019), 10(1). [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7896725/>

**Gong et al.** “Endophytic fungus *Purpureocillium* sp. A5 protect mangrove plant *Kandelia candel* under copper stress”. *Braz J Microbiol* [en línea]. (2017) vol 48(3) p. 531. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498457/pdf/main.pdf>

**Gong et al.** “New insights into the evolution of host specificity of three *Penicillium* species and the pathogenicity of *P. Italicum* involving the infection of Valencia orange (*Citrus sinensis*)”. *Virulence* [en línea]. (2020). vol, 11(1) p. 03. [Consulta: 24 de julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7549954/>

**GONG et al.** “Hongo endófito *Purpureocillium* sp. A5 proteger la planta de mangle *Kandelia candel* bajo estrés por cobre”. *Braz J Microbiol*. (2017), vol. 48(1). p. 53.

**GUTIÉRREZ, O.** “Cacao Mejoramiento para Resistencia a Enfermedades en Cacao”. Springer. (2016). p. 567.

**Hajj et al.** “Regulation of Secondary Metabolism in the Penicillium Genus”. Int J Mol Sci [en línea]. (2020) vol. 21(24), p. 02. [Consulta: 16 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7763326/>

**Han et al.** “Metabolites from Clonostachys Fungi and Their Biological Activities”. J Fungi (Basel). (2020) Vol. 6(4) p. 229. doi: 10.3390/jof6040229.

**Harrington et al.** *Coniochaetaendophytica* sp. nov., un endófito foliar asociado con tejido fotosintético sano de *Platyclusus orientalis* (Cupressaceae). Plant and Fungal Systematics. (2019). vol 64. pp. 65–79.

**HERNÁNDEZ et al.** “Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla* (teleomorfo desconocido: Diaporthales) de la región templada y subtropical de Argentina”. Revista de biología tropical. (2015). vol 63(3). p. 05.

**HIDROBO CHÁVEZ, Joussy Anahi.** Evaluación morfológica y de patogenicidad del hongo *Neopestalotiopsis* como agente causal de la pudrición de corona en frutillas (*Fragaria x ananassa*) variedad Albión. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. 2020. p. 36. [Consulta: 2022-06-13]. Disponible en: <http://biblioteca.esPOCH.edu.ec/Tutoriales/Norma%20ISO%20690.pdf>

**Hirokawa et al.** “Molecular cloning and expression of novel fructosyl peptide oxidases and their application for the measurement of glycated protein”. Biochem Biophys Res Commun (2003). Vol. 7 p. 104.

**Huda et al.** “*Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia”. Sci Rep [en línea]. (2022). vol. 12(1). p. 01. [Consulta: 25 de julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9142511/>

**JAKLITSCH, W.** “Especies europeas de *Hypocrea* Parte I. Las especies de esporas verdes”. Estudios en Micología [en línea]. (2009). vol. 63(1). p. 91. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: 10.3114/sim.2009.63.01

**Jiménez et al.** “Novel multispecies microbial consortia involved in lignocellulose and 5-hydroxymethylfurfural bioconversion”. *Appl Microbiol Biotechnol* (2014). p. 98.

**Jiang et al.** “Efficacy of a Chitin-Based Water-Soluble Derivative in Inducing *Purpureocillium lilacinum* against Nematode Disease. *Meloidogyne incognita* [En línea]. (2021). [Consulta: 26 julio 2022]. Disponible en: [chrome-extension://dagcmkpagjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fmdpi-res.com%2Fd\\_attachment%2Fijms%2Fijms-22-06870%2Farticle\\_deploy%2Fijms-22-06870-v3.pdf](chrome-extension://dagcmkpagjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fmdpi-res.com%2Fd_attachment%2Fijms%2Fijms-22-06870%2Farticle_deploy%2Fijms-22-06870-v3.pdf).

**Kimura J y Furui M., Kanda.** Inhibidor de la telomerasa. 2002047281A. Patente JP. (2002), p. 28

**KIRIGA et al.** “Efecto de *Trichoderma arena* *Purpureocillium lilacinum* en *Meloidogyne javanica* en la producción comercial de piña en Kenia”. *Biol. Control.* (2018). vol 18. p. 27

**Kubicek et al.** “Enzimas que degradan la pared celular vegetal y su secreción en hongos fitopatógenos”. *Revista Anual de Fitopatología* [en línea]. (2014). vol. 52(1). p.42. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: 10.1146/annurev-phyto-102313-045831

**LAMOVSEK, J.** “Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.): Microbes against the pests”. *Acta Agriculturae Slovenica.* (2013). 101, p. 23.

**Lichtner et al.** “Global transcriptomic responses orchestrate difenoconazole resistance in *Penicillium* sp. causing blue mold of stored apple fruit”. *BMC Genomics* [en línea]. (2020) vol 21(1) p. 03. [Consulta: 24 de julio 2022]. Disponible en: <http://biblioteca.esepoch.edu.ec/Tutoriales/Norma%20ISO%20690.pdf>

**Linneo, C.** *Species Plantarum* [en línea]. Suecia: Laurentii Salvil, 1753. [Consulta: 19 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/84235#page/5/mode/1up>

**Logrieco et al.** A. Especies toxigénicas de *Fusarium* y micotoxinas asociadas con la pudrición de la mazorca del maíz en Europa. *Plant Pathol* [en línea]. (2002) vol. 10(1). p. 03. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: 10.1023/A:1020679029993

**López, A.** *Producción y Comercialización de Cacao Fino de Aroma en el Ecuador* [en línea]. Guayaquil-Ecuador: Superintendencia de Control del Poder de Mercado, 2017. [Consulta: 20

octubre 2021]. Disponible en: <https://www.scpm.gob.ec/sitio/wp-content/uploads/2019/03/ESTUDIO-DEL-CACAO-IZ7-version-publica-ultima.pdf>

**LÓPEZ, G.** “Análisis molecular de hongos antagonistas aislados de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*) de Norte de Santander”. *Ingeniería y competitividad*. 2021. (Colombia) 23(2). p. 05. [Consulta: 17 julio 2022]. ISSN 2027-8284. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-30332021000200215](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-30332021000200215)

**Ma et al,** “Four New Pale-Spored Species of Xylaria (Xylariaceae, Xylariales) with a Key to Worldwide Species on Fallen Fruits and Seeds”. *Biology* (Basel). 2022 vol. 11(6). p.08

**Maciá et al.** “Colonización de raíces de cebada por *Fusarium equiseti* y *Pochonia chlamydosporia* endófitas: efectos sobre el crecimiento y la enfermedad de las plantas”. *Aplicación Biol.* 2009; p. 390.

**Manawasinghe, Ishara S et al.** "High Genetic Diversity and Species Complexity of Diaporthe Associated With Grapevine Dieback in China." *Frontiers in microbiology* [en línea], vol. 10 (1936). (2019), (United State of America). p. 20. [Consulta: 20 junio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6732904/pdf/fmicb-10-01936.pdf>

**Marsberg A., et al.** *Botryosphaeria dothidea*: un patógeno latente de importancia mundial para la salud de las plantas leñosas. *mol. Patol de plantas*. (2017). 18 (477). p. 17

**MARTENS, E y DEMAIN, A.** “Una descripción general de los aspectos industriales del descubrimiento de antibióticos”. *Recursos microbianos*. (2017). (Londres, Reino Unido. 1(1), p. 149

**Mas, Eva, et al.** Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*, 2016, no 15. pp. 01-02. [Consulta: 19 noviembre 2021]. Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/139/128>

**MEDINA, P.** “Hongos degradadores de madera *Xylaria telfairii*”. *CONICET* [en línea]. (2020) vol 1(1). Argentina. p. 10. [Consulta: 26 junio 2022]. Disponible en: [http://www.lillo.org.ar/revis/universo-tucumano/2020/2020-fml-ut-v61-xylaria\\_telfairii.pdf](http://www.lillo.org.ar/revis/universo-tucumano/2020/2020-fml-ut-v61-xylaria_telfairii.pdf)

**Meinhardt et al.** “Análisis del genoma y secretoma del hongo patógeno hemibiotrófico, *Moniliophthora roreri*, causante de la pudrición helada del cacao: mecanismos de las fases biotrófica y necrotrófica”. BMC. (2014). vol 15(1). p. 23

**Meng, Chao-Rong et al.** “*Lasiodiplodia syzygii* sp. nov. (Botryosphaeriaceae) causing post-harvest water-soaked brown lesions on *Syzygium samarangense* in Chiang Rai, Thailand.” Biodiversity data journal [en línea]. (2021). vol. 9(06). p.09. [Consulta: 26 junio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7809010/>

**MENDEL, R.** “Las especies de Xylaria (Ascomycota, Xylariaceae) conocidas de Veracruz, México y discusión de nuevos registros”. Revista Mexicana de Micobiología [en línea]. (2008). Xalapa (México) vol 28(1). p. 12. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802008000300013](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000300013)

**Metwaly et al.** “Nigrosphaerin A a new isochromene derivative from the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*”. Phytochemistry Letters [en línea]. vol. 07. (2014). p. 04. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390013001596>

**Ministerio de Agricultura y Ganadería** [en línea]. Gonzalez, 2019. [Consulta: 20 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.agricultura.gob.ec/cacao-hibrido-ccn-51-cuenta-con-certificacion-de-calidad/>

**Mishra et al.** “2,4-Di-Tert-Butylphenol Isolated From an Endophytic Fungus, *Daldinia eschscholtzii*, Reduces Virulence and Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*”. Front Microbiol [en línea]. 2020. vol 11(1). p. 07. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7418596/pdf/fmicb-11-01668.pdf>

**MOENS, M Y PERRY, R.** “Migratory plant endoparasitic nematodes: a group rich in contrasts and divergence”. Ann. Rev. Phytopathol. (2009). vol. 47. pp. 313–332

**Muller et al.** “Identification and distribution of novel badnaviral sequences integrated in the genome of cacao (*Theobroma cacao*)”. Sci Rep [en línea]. (2021) vol. 11(1) p. 03. [Consulta: 24 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8050207/>

**NaturalistEc.** “Familia Xylariaceae”. 2022. parr. 01 [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/48806-Xylariaceae>

**Ngeow et al.** Draft genome sequence of *Daldinia eschscholzii* isolated from blood culture. Eukaryot Cell [en línea]. (2012) vol. 11(5). p. 03. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5173030/>

**NISHIKAWA C.** Variación morfológica y rango de hospedantes experimentales de *Alternaria cinerariae*. Micociencia (2015). vol. 56. pp 141–149.

**Park, Myung Soo et al.** “Penicillium from Rhizosphere Soil in Terrestrial and Coastal Environments in South Korea.” Mycobiology [en línea] vol. 48(6). -82020 p. 13. Consulta: 23 junio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7717687/>

**Peng et al.** Pyronepolyene C-glucósidos con actividades inhibitoras de NF-κB y anti-influenza A viral (H1N1) del hongo asociado a esponjas *Epicoccum* sp. JJY40. Bioorg. Medicina. química Letón. (2012) 22 :3188–3190. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.03.044.

**PEÑA et al.** Glosario General: Fitopatología [blog]. Tunja, Boyacá–Colombia: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 2015, pp.1-15. [Consulta: 26 julio 2022]. Disponible en: <https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/glosario.pdf>

**Pinto, J.** *Micología: Microbiología ambiental* [en línea]. Guatemala: Universidad de Galileo, 2017, pp. 08-09. [Consulta: 20 octubre 2021]. Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microambiental/wp-content/uploads/2016/08/TP-8-Micolog%C3%ADa.pdf>

**PÍO FONT QUER.** Diccionario de Botánica. 2a Ed. Balderas, México D.F.: Ediciones Península S.A., 2010. ISBN: 968186283X, pp.1-1124

**PHILLIPS et al.** “First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa”. México. 2006; p. 55-58

**PHILLIPS-MORAW.** “First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora rorerion* cacao in Belize”. 2006; p. 55

**PHILLIPS Y MORA.** Taller Regional Andino de Aplicación Tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo. Los Rios, Ecuador. 2006.- p. 21. [Consulta: 16 marzo 2022]. Disponible en:

<http://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/7403/BVE19039688e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10957/1/Caracterizaci%C3%B3n%20morfol%C3%B3gica%20fisiol%C3%B3gica%20y%20patog%C3%A9nica.pdf>

**PLOETZ, R.** “Enfermedades del cacao. El impacto de las enfermedades en la producción de cacao: una visión global”. Springer. (2016). pp. 33–59.

**Prasad et al.** “Anotación del genoma completo y análisis genómico comparativo del hongo de control biológico *Purpureocillium lilacinum*”. Genoma BMC. (2015), vol. 16, p. 10.

**PROCACAOH.** “*Mal de machete*”, una enfermedad del cacao que no se debe descuidar [en línea]. Honduras: Infocacao, 2016. pp. 02. [Consulta: 21 octubre 2021]. Disponible en: [http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao\\_pdfs/infocacao/infocacao\\_no11\\_dic\\_2016.pdf](http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/infocacao/infocacao_no11_dic_2016.pdf)

**PROCACAOH.** *Control de la moniliasis del cacao a través de prácticas culturales* [en línea]. Honduras: Infocacao, 2017. p. 02. [Consulta: 21 octubre 2021]. Disponible en: [http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao\\_pdfs/infocacao/InfoCacao\\_No12\\_Jul\\_2017.pdf](http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/infocacao/InfoCacao_No12_Jul_2017.pdf)

**QUIROZ, G y AMORES, F.** “Rehabilitación de plantaciones tradicionales de caca en Ecuador: resumen. Manejo Integrado de Plagas”. (2002) Costa Rica. p. 80.

**RAMESHA et al.** Antimicrobial metabolite profiling of *Nigrospora sphaerica* from *Adiantum philippense* L. J Genet Eng Biotechnol. (2020) vol 18(1). p. 05. [Consulta: 15 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7581665/>

**RIVAS FIGUEROA, Fernando.** Etiología y caracterización de la pudrición del cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis Jacq.*) en San Lorenzo, Esmeraldas, Ecuador [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctoral) Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Santa Clara, Cuba. 2015. pp. 36-38. [Consulta: 21 octubre 2021]. Disponible en: <https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/6889/Tesis%20Dr.%20Fernando%20Rivas%20Figueroa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**RIVAS FIGUEROA, Fernando; & HERRERA ISLA, Lidcay.** “Organismos asociados a la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis Jacq*) en San Lorenzo, Ecuador”. Rev. Protección Vegetal [en línea], Cuba, 2015, pp.193-203. [Consulta: 21 octubre 2021], ISSN

1010-2752. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522015000300005&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000300005&lng=es&nrm=iso)

**RIVAS, L.** “*Alternaria* sp.”. Retrato microbiológico [en línea]. (2014). Chile. vol 31(5). p. 605. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n5/art13.pdf>

**Romero et al.** “Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles”. Revista Colombiana de Biotecnología [En línea]. (2009), p. 12. [Consulta: 30 junio 2022], ISSN 0123-3475. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752009000200015#:~:text=Aspectos%20generales%20de%20Trichoderma%20sp.&text=Las%20especies%20de%20Trichoderma%20sp,sp.%2C%20hasta%20la%20fecha](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200015#:~:text=Aspectos%20generales%20de%20Trichoderma%20sp.&text=Las%20especies%20de%20Trichoderma%20sp,sp.%2C%20hasta%20la%20fecha).

**RUVISHIKA et al.** “*Neopestalotiopsis vitis* sp. nov. causing grapevine leaf spot in China”. *Phytotaxa.*, vol. 01, n° 258 (2016), (Nueva Zelanda) p. 64. [Consulta: 13 junio 2022]. ISSN 1179-3155. Disponible en: <file:///C:/Users/ecuador/Downloads/Neopestalotiopsisvitiscausingleafspot-phytotaxa.pdf>

**Ryan, K y Ray, C.** “Sherris. Microbiología médica”, McGraw Hill [en línea] (2017). 6(1) [Consulta: 25 de julio 2022]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169&sectionid=162978735>

**SALVATORE ET AL.** “Secondary Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, Chemical Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence”. *Toxins* (Basel) [en línea]. (2020). vol. 12(7). p. 03. [Consulta: 25 de julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7405015/>

**Sánchez, Fernando David Mora; Garcés, Felipe Rafael Fiallos.** *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*, vol. 3, no 3 (2012), (Ecuador) pp. 249-258. [Consulta: 20 octubre 2021]. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/87/97>

**SÁNCHEZ, Fernando; et al.** “Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro”. *Rev. Iberoam Micol* [en línea], 2000, (España) 17(1), pp 128. [Consulta: 10 de abril 2022]. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/127134.pdf>

**SANDOVAL et al.** “Alta Presencia De Cadmio Resulta En Baja Diversidad De Hongos Formadores De Micorrizas Arbusculares Asociados A Cacao (*Theobroma cacao* L.)”. *Acta Biológica Colombiana* [en línea]. 2020, (México) 25(3), p. 02. [Consulta: 17 julio 2020]. ISSN 0120-548X. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2020000300333](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2020000300333)

**SCHOCH et al.** “El árbol de la vida de Ascomycota: una filogenia de todo el filo aclara el origen y la evolución de los rasgos reproductivos y ecológicos fundamentales”. *Biol.* (2009). Vol.58, p. 224.

**Schroers HJ.** “Una monografía de Bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) y sus anamorfos *Clonostachys*”. *Semental. Mycol.* (2001). Vol. 46 (1). p.21.

**SCHULZ, B. Y BOYLE, C.** El continuo endófito. *Mycol* [en línea]. (2005). p. 10. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>

**SEEPE et al.** “Natural Products from Medicinal Plants against Phytopathogenic Fusarium Species: Current Research Endeavours, Challenges and Prospects”. *Molecules* [en línea]. (2021). vol. 26(21). p. 03. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8587185/>

**SHEN et al.** “Genome-scale phylogeny and contrasting modes of genome evolution in the fungal phylum Ascomycota”. *Sci Adv* [en línea]. (2020). vol. 6(45). p. 02. [Consulta: 19 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7673691/>

**SI et al.** “Phylogenetic and morphological analyses of *Coniochaeta* isolates recovered from Inner Mongolia and Yunnan revealed three new endolichenic fungal species”. *MycKeys* [en línea]. (2021) vol 8(3) p. 113. [Consulta: 10 de abril 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8445908/pdf/mycokeys-83-105.pdf>

**SOUZA et al.** Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches' broom pathogen. *Popul. Biol.* (2006) p. 67. doi: 10.1094/PHYTO-96-0061.

**SUÁREZ, C.** “Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri* Cif & Par. en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.)”. Tesis de grado (Ing. Agrónomo) Guayaquil, Ecuador. 2006; p.59

**Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C.** Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2013, vol. 2, no 2, p. 70-78. [Consulta: 19 noviembre 2021]. Disponible en: [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/52083062/pcr\\_medic\\_graphic-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1637411184&Signature=HITdwFWUVIWMq5CvO4uIzaXV-zuOYmEslPzgO6ZH551M0BshQuzZHUFktD8yhoHvQi5H-Mk3f~kc72hvpBOijAAqeHqZf2AJOavlAS7hw8wfeF~4gtX7Wj~rKcuX81UAwGSIgREzgBJDRAODRImD~gtGo9y5CPUS6p~XNDsvm4w7IeVZw0BnJDaD3uZIwuXLh~7yoaUGdVa74LqYLJXYToSlt~f9Urw3mQBsTj5bt4za-t7Uxfrh0HtEMVZARij-ZN~q8CoSnv8TJwh4mCkeHhZ~6o8pjnaXALnHZEBs3jSxn93zcgL6e91-8HAQxiWBkPHURc3yjpRXugTIL7m5Q\\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/52083062/pcr_medic_graphic-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1637411184&Signature=HITdwFWUVIWMq5CvO4uIzaXV-zuOYmEslPzgO6ZH551M0BshQuzZHUFktD8yhoHvQi5H-Mk3f~kc72hvpBOijAAqeHqZf2AJOavlAS7hw8wfeF~4gtX7Wj~rKcuX81UAwGSIgREzgBJDRAODRImD~gtGo9y5CPUS6p~XNDsvm4w7IeVZw0BnJDaD3uZIwuXLh~7yoaUGdVa74LqYLJXYToSlt~f9Urw3mQBsTj5bt4za-t7Uxfrh0HtEMVZARij-ZN~q8CoSnv8TJwh4mCkeHhZ~6o8pjnaXALnHZEBs3jSxn93zcgL6e91-8HAQxiWBkPHURc3yjpRXugTIL7m5Q_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

**TAPIA, Cecilia & AMARO, José.** “Género Fusarium”. *Retrato microbiológico* [en línea]. vol. 31, n° 1 (2014). (Chile). p. 86. Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n1/art12.pdf>

**Tian et al.** “Estudio de las comunidades de hongos endófitos y actinomicetos endófitos del arroz y sus actividades antipatógenas in vitro”. *Revista mundial de microbiología y biotecnología*. 2004; vol. 20 (3). p. 303.

**Tyśkiewicz, Renata et al.** “Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth.” *International journal of molecular sciences* [en línea]. vol. 23(4) (2022). p. 02. [Consulta: 25 junio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8875981/pdf/ijms-23-02329.pdf>

**Togheo, Rufin MK et al.** "A *Diaporthe* fungal endophyte from a wild grass improves growth and Salinity tolerance of Tritordeum and Perennial ryegrass". *Frontiers in Plant Science*. [en línea], 2022, (United States of America) 13(2) Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9198640/pdf/fpls-13-896755.pdf>

**Toghueo, Rufin Marie Kouipou, and Fabrice Fekam Boyom.** “Endophytic Penicillium species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications.” *3 Biotech* [en línea], 2020, (United States of America) vol. 10(3), p. 106. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7007919/pdf/13205\\_2020\\_Article\\_2081.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7007919/pdf/13205_2020_Article_2081.pdf)

**TORRES GUTIERREZ, Luis Fernando.** Manual de producción de cacao fino de aroma a través de manejo ecológico [En línea] (Trabajo de titulación) (Ingeniería). Universidad de

Cuenca, Cuenca, Ecuador. 2012. pp. 12. [Consulta: 19 octubre 2021]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3250/1/TESIS.pdf>

**Torta et al.** “Cultivable Fungal Endophytes in Roots, Rhizomes and Leaves of *Posidonia oceanica* (L.)” Delile along the Coast of Sicily, Italy. *Plants* (Basel). (2022) vol 11(9). p. 02

**ULLOA, Miguel; & HANLIN, Richard.** [Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología. Saint Paul, Minnesota-United](#)

[States of America: The American Phytopathological Society, 2006. ISBN: 9780890543412, pp.1-237](#)

**ÚRBEZ ET AL.** “Especies de Botryosphaeriaceae asociadas con canchros y síntomas de muerte regresiva de *Acacia Mangium* y *Pinus Caribaea* Var. *Hondurensis*” *Venezuela Planta Dis.* (2016) Vol. 100 (12)

**Valarezo, O.** Artrópodos Asociados al Cultivo de Cacao en Manabi. *La Técnica* [en línea], 2012, (Ecuador), 01(03), pp. 37-40. [Consulta: 21 octubre 2021]. Disponible en: <file:///C:/Users/ecuador/Downloads/Dialnet-ArtrópodosAsociadosAlCultivoDeCacaoEnManabi-6087699.pdf>

**VELASTEGUI RUIZ, Paula Nikole.** Investigación del cacao de Santo Domingo de los Tsáchilas para sus múltiples usos en la gastronomía [En línea] (Trabajo de titulación) (Ingeniería). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. 2019. p. 04. . [Consulta: 19 octubre 2021]. Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/8457/1/143700.pdf>

**VILLAVICENCIO VASQUEZ, Mirian Elizabeth.** *Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana.* 2010. Tesis de Licenciatura.

**Vinale F, et al.** A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* (2008). doi: 10.1016/j. p.05.

**Vizcarrondo, M y Gutiérrez, S.** Uso del microscopio de luz [En línea] (Trabajo de titulación) (Ingeniería) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, México. 2008. pp. 18. [Consulta: 22 octubre 2021]. Disponible en: [http://portal.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_Uso\\_del\\_microscopio\\_de\\_luz.pdf](http://portal.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Uso_del_microscopio_de_luz.pdf)

**WANG, M y LIU F.** “Phylogenetic reassessment of Nigrospora: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens”. *Persoonia* (2017) pp. 126-140. [Consulta: 15 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5832950/>

**Wutthiwong et al.** Daldiniaeschsone A, a Rare Tricyclic Polyketide Having a Chromone Unit Fused to a  $\delta$ -Lactone and Its Symmetrical Biphenyl Dimer, Daldiniaeschsone B, from an Endophytic Fungus *Daldinia eschscholtzii* SDBR-CMUNKC745. *J Fungi* (Basel) [en línea]. (2021). vol 7(5). p. 03. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8147462/pdf/jof-07-00358.pdf>

Yang Q., Fan XL, Guarnaccia V., Tian CM. Alta diversidad de especies de Diaporthe asociadas a doce nuevas especies descritas. (2018) *MycKeys* 39, 97–149. 10.3897/mycokeys.39.26914

**ZAMBRANO, B.** “Diversidad fúngica asociada a raíces de tres especies de árboles del género *Matisia*, que presentan distintos patrones de agregación en el Parque Nacional Yasuní”. Pontificia Universidad Católica del Ecuador [en línea]. (2017). Quito. p. 49. [Consulta: 13 julio 2022]. Disponible en: [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14207/Tesis%20V1%20-%20BRZC\\_FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14207/Tesis%20V1%20-%20BRZC_FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

**ZHAO et al.** Comparative Analysis of Mitochondrial Genome Features among Four *Clonostachys* Species and Insight into Their Systematic Positions in the Order Hypocreales. *Int J Mol Sci*. 2021 May 24;22(11):5530. doi: 10.3390/ijms22115530. p. 10. . [Consulta: 30 junio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8197242/>



## ANEXOS

### ANEXO A: PREPARACIÓN DEL MEDIO AGAR AVENA

Reactivos	Cantidad
Avena	40 g
Agar	25 g
Agua destilada	1000 mL

Fuente: Forest Joseph 2010

### ANEXO B: PREPARACIÓN DEL MEDIO SNA

Reactivos	Cantidades
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{KNO}_3$	1 g
$\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
KCl	0,5 g
Glucosa	0,2 g
Sacarosa	0,2 g
Agar	25 g
Agua destilada	1000 mL

Fuente: May Sara 2015

### ANEXO C: PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO V8

Reactivos	Cantidades
V8	200 mL
Asparagina	1 g
Extracto de malta	10 g
$\text{CaCO}_3$	3 g
Agua destilada	800 mL

Fuente: May Sara 2015

**ANEXO D: RESULTADO DEL ANÁLISIS BLAST.**

Código del morfortipo	Localidad	Max Score	Query	% Ident	E-value	Código de acceso	País de origen	Especie sugerida
			Cover	%				
<b>M3</b>	Loreto	804	98	97,65	0	<u><a href="#">MF435115.1</a></u>	Ecuador	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M4</b>		907	97	99	0	<u><a href="#">MG832438.1</a></u>	China	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M22</b>		832	100	100	0	<u><a href="#">MN602837.1</a></u>	Colombia	<i>Fusarium</i> sp
<b>M28</b>		907	100	100	0	<u><a href="#">OW986459.1</a></u>	Bélgica	<i>Alternaria alternata</i>
<b>M27</b>		712	100	100	0	<u><a href="#">OM662233.1</a></u>	Uganda	<i>Fusarium</i> sp
<b>M5</b>		728	100	99,26	0	<u><a href="#">MG832438.1</a></u>	China	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>MP2</b>		651	100	99,72	0	<u><a href="#">MK805460.1</a></u>	China	<i>Penicillium roqueforti</i>
<b>M18</b>		843	100	100	0	<u><a href="#">OW986319.1</a></u>	Martinica	<i>Fusarium proliferatum</i>
<b>M7</b>		867	99	100	0	<u><a href="#">MT626579.1</a></u>	China	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M24</b>		821	100	99,56	0	<u><a href="#">KY413707.1</a></u>	Panama	<i>Clonostachys</i> sp
<b>M8</b>		669	100	100	0	<u><a href="#">MT626579.1</a></u>	China	<i>Epicoccum layuense</i>
<b>M9</b>		669	100	100	0	<u><a href="#">MH397098.1</a></u>	Malasia	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M68</b>		917	100	100	0	<u><a href="#">OW986459.1</a></u>	Bélgica	<i>Alternaria alternata</i>
<b>M10</b>		651	100	99,72	0	<u><a href="#">MH397098.1</a></u>	Malasia	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>MT4</b>		976	100	100	0	<u><a href="#">GQ219849.1</a></u>	Alemania	<i>Trichoderma</i> sp
<b>MT5</b>		1057	100	0	100	<u><a href="#">MK738147.1</a></u>	***	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>MT2</b>		1057	100	100	0	<u><a href="#">ON705517.1</a></u>	China	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>M29</b>		737	100	100	0	<u><a href="#">MT636979.1</a></u>	Malta	<i>Alternaria</i> sp.

<b>M16</b>	Francisco de	841	100	99,57	0	<u>MT448899.1</u>	***	<i>Clonostachys rosea</i>
<b>M31</b>	Orellana	758	100	100	0	<u>MT611201.1</u>	Guayana F	<i>Diaporthe</i> sp
<b>M36</b>		695	100	100	0	<u>ON791162.1</u>	China	<i>Neopestalotiopsis</i> sp
<b>M39</b>		872	100	99,79	0	<u>MT261908.1</u>	***	<i>Xylariaceae</i> sp
<b>M40</b>		745	100	100	0	<u>MK026993.1</u>	Brasil	<i>Daldinia</i> sp
<b>M11</b>		651	100	98,9	0	<u>MG832438.1</u>	China	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M34</b>		750	98	98,14	0	<u>KU977877.1</u>	Panama	<i>Diaporthe</i> sp.
<b>MT1</b>		719	100	100	0	<u>KJ783298.1</u>	China	<i>Trchoderma stilbohypoxyli</i>
<b>M43</b>	La Joya de los	819	100	100	0	<u>MK834676.1</u>	China	<i>Nigrospora sphaerica</i>
<b>M41</b>	Sachas	699	100	100	0	<u>MN639702.1</u>	Brasil	<i>Daldinia eschscholtzii</i>
<b>M25</b>		874	100	99,79	0	<u>MN602837.1</u>	Colombia	<i>Fusarium</i> sp
<b>M44</b>		741	99	100	0	<u>ON791162.1</u>	China	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
<b>M42</b>		721	100	100	0	<u>MN192994.1</u>	Brasil	<i>Daldinia eschscholtzii</i>
<b>M23</b>		859	100	100	0	<u>MT603307.</u>	***	<i>Fusarium fujikuroi</i>
<b>M22</b>		769	99	98,19	0	<u>OM662233.1</u>	Uganda	<i>Fusarium solani</i>
<b>M19</b>		893	100	100	0	<u>KY413707.1</u>	Panama	<i>Clonostachys</i> sp
<b>M1</b>		693	100	99,48	0	<u>MN249167.1</u>	Brasil	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
<b>M21</b>		704	100	99,74	0	<u>NR_168235.1</u>	Tailandia	<i>Clonostachys eriocamporesiana</i>
<b>MP1</b>		665	100	98,41	0	<u>MT606192.1</u>	México	<i>Penicillium</i> sp.
<b>M14</b>		806	100	99,77	0	<u>MT626579.1</u>	***	<i>Epicoccum layuense</i>
<b>M15</b>		861	100	99,79	0	<u>MG832438.1</u>	China	<i>Epicoccum nigrum</i>

<b>M45</b>		684	100	100	0	<u>MT606206.1</u>	México	<i>Purpureocillium</i> sp.
<b>M17</b>		688	100	99,47	0	<u>KY413696.1</u>	Panama	<i>Clonostachys</i> sp.
<b>M20</b>		743	100	100	0	<u>KY413696.1</u>	Panama	<i>Clonostachys</i> sp.
<b>M32</b>		785	100	99,77	0	<u>KM266297.1</u>	Ecuador	<i>Diaporthe</i> sp.
<b>M50</b>		579	88	100	1,00E-160	<u>KY092542.1</u>	***	<i>Uncultured eukaryote</i>
<b>M27</b>		950	100	100	0	<u>MN602837.1</u>	Colombia	<i>Fusarium</i> sp.
<b>M46</b>		990	100	100	0	<u>MT606206.1</u>	México	<i>Purpuracillium</i> sp.
<b>M54</b>		941	100	99,61	0	<u>MN264616.1</u>	China	<i>Coniochaeta</i> sp.
<b>MT3</b>		1016	100	99,82	0	<u>MT530250.1</u>	***	<i>Trichoderma sulphureum</i>
<b>MC1</b>	Orellana	473	100	99,24	4e-129	<u>MW898108.1</u>	Colombia	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC2</b>		861	100	99,37	0	<u>MH861051.1</u>	Ecuador	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC3</b>		1133	100	99,52	0	<u>MW898108.1</u>	Colombia	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC4</b>		1062	100	99,49	0	<u>MW898108.1</u>	Colombia	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC5</b>		1107	100	99,51	0	<u>MW898108.1</u>	Colombia	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC6</b>		1149	99	99,53	0	<u>MH861051.1</u>	Ecuador	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC7</b>		1223	99	99,55	0	<u>MH861051.1</u>	Ecuador	<i>Moniloptora roreri</i>

Realizado por: Quitio, Dayse. 2022.

**ANEXO E: RESULTADOS DEL ANÁLISIS BLAS: FILO, CLASE, ORDEN, FAMILIA, GÉNERO Y ESPECIE SUGERIDA.**

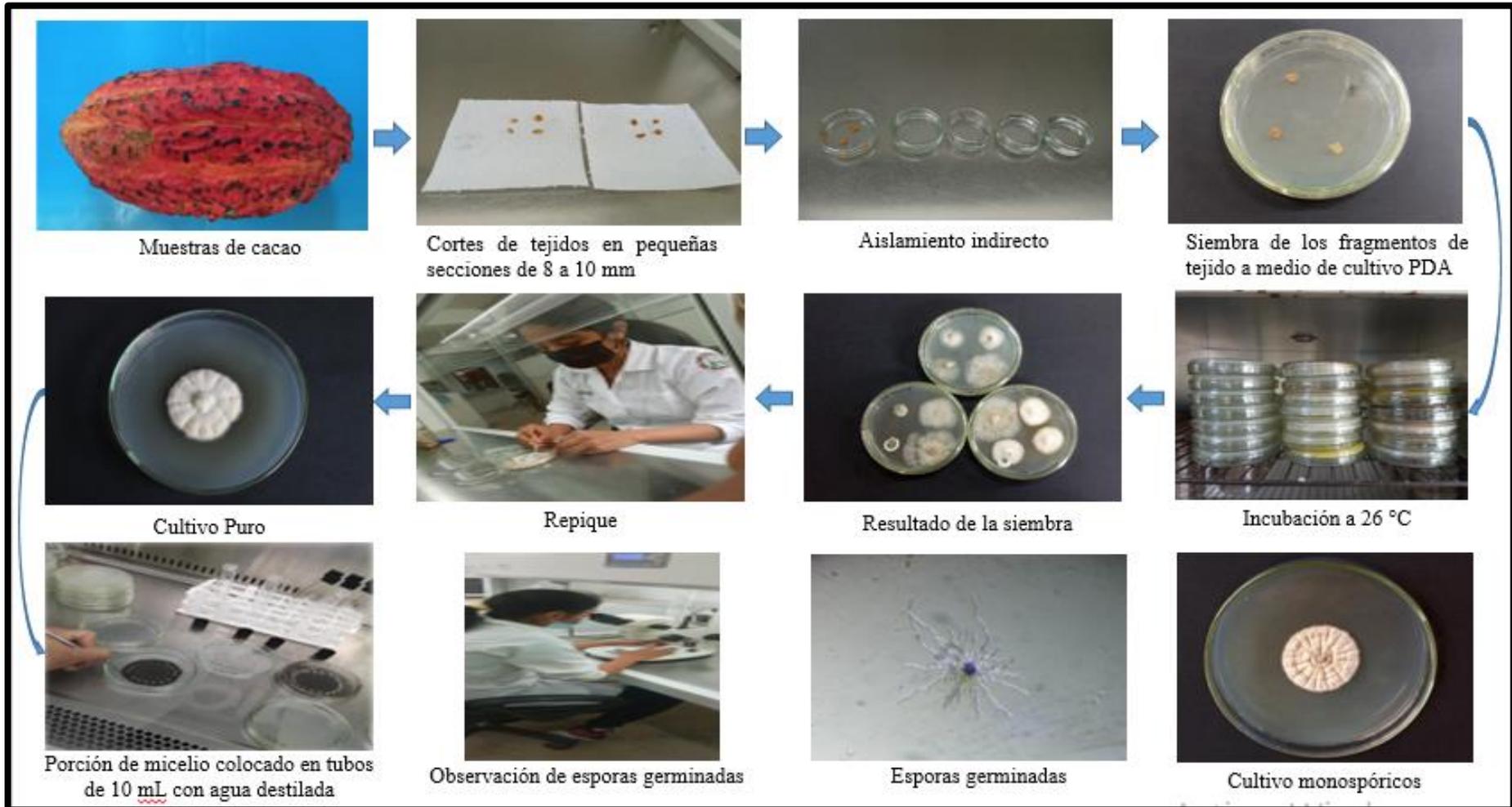
<b>Código del morfotipo</b>	<b>Filo</b>	<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>
<b>M3</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M4</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M22</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp
<b>M28</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<b>M27</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp
<b>M5</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>MP2</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>
<b>M18</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys</i> sp.
<b>M7</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M24</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
<b>M8</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum layuense</i>
<b>M9</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M31</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<b>M10</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>MT4</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypodreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
<b>MT2</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypodreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>M29</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria</i> sp.
<b>M16</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys rosea</i>

<b>M31</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceaceae	<i>Diaporthe</i>	<i>Diaporthe</i> sp.
<b>M36</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Sporocadaceae	<i>Neopestalotiopsis</i>	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
<b>M39</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylariaceae</i>	***
<b>M40</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Hypoxylaceae	<i>Daldinia</i>	<i>Daldinia</i> sp.
<b>M11</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M34</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceaceae	<i>Diaporthe</i>	<i>Diaporthe</i> sp.
<b>MT1</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypodreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trchoderma stilbohypoxyli</i>
<b>M43</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Apiosporaceae	<i>Nigrospora</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i>
<b>M41</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Hypoxylaceae	<i>Daldinia</i>	<i>Daldinia eschscholtzii</i>
<b>M25</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp.
<b>M44</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Sporocadaceae	<i>Neopestalotiopsis</i>	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
<b>M42</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Hypoxylaceae	<i>Daldinia</i>	<i>Daldinia eschscholtzii</i>
<b>M23</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium fujikuroi</i>
<b>M22</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium solani</i>
<b>M19</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys</i> sp.
<b>M1</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
<b>M21</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys eriocamporesiana</i>
<b>MP1</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<b>M14</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum layuense</i>
<b>M15</b>	Ascomycota	Dothidiomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>M45</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Ophiocordycipitaceae	<i>Purpureocillium</i>	<i>Purpureocillium</i> sp.

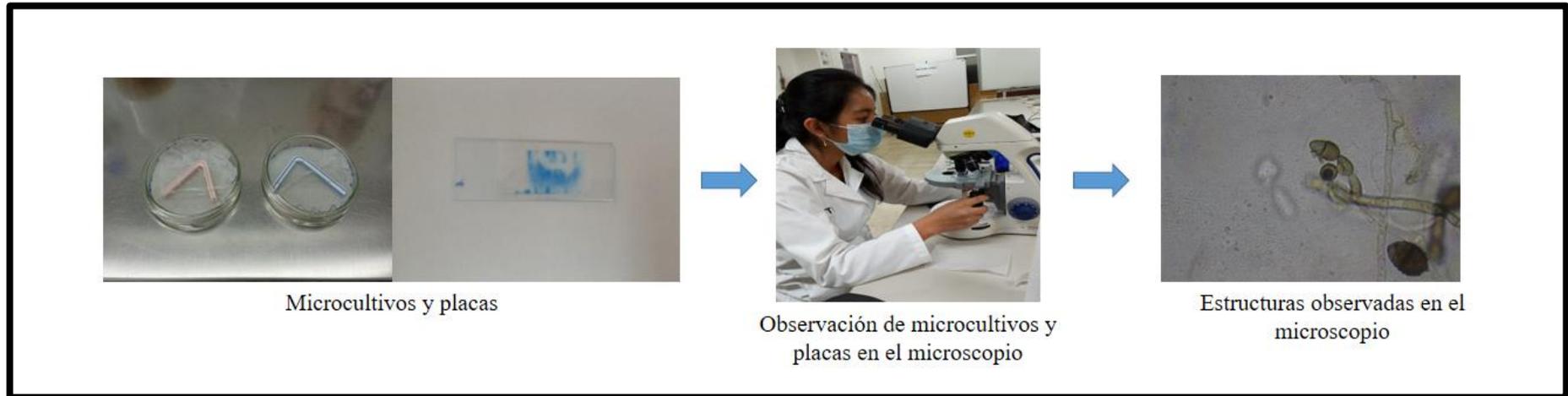
<b>M17</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys</i> sp.
<b>M20</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys</i> sp.
<b>M32</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceaceae	<i>Diaporthe</i>	<i>Diaporthe</i> sp.
<b>M50</b>						<i>Uncultured eukaryote</i>
<b>M27</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp.
<b>M46</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Ophiocordycipitaceae	<i>Purpureocillium</i>	<i>Purpuracillium</i> sp.
<b>M54</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Coniochaetales	Coniochaetaceae	<i>Coniochaeta</i>	<i>Coniochaeta</i> sp.
<b>MT3</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypodreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sulphureum</i>
<b>MC1</b>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Moniliophthora</i>	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC2</b>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Moniliophthora</i>	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC3</b>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Moniliophthora</i>	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC4</b>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Moniliophthora</i>	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC5</b>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Moniliophthora</i>	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC6</b>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Moniliophthora</i>	<i>Moniloptora roreri</i>
<b>MC7</b>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Moniliophthora</i>	<i>Moniloptora roreri</i>

**Realizado por:** Quitio, Dayse. 2022.

ANEXO F: AISLAMIENTO INDIRECTO Y CULTIVO MONOSPÓRICO



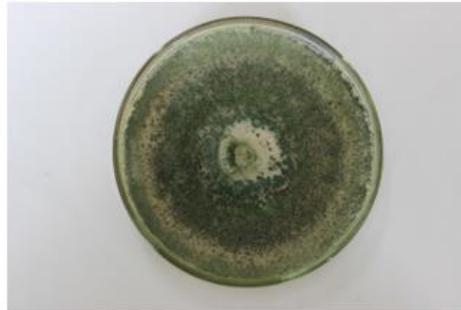
## ANEXO G: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA



## ANEXO H: CONSERVACIÓN DE LOS MORFOTIPOS FÚNGICOS AISLADOS



**ANEXO I: EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS FÍSICA)**



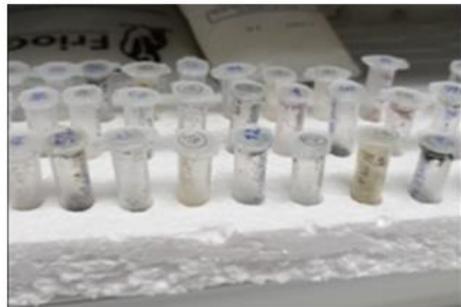
Aislado cultivado en medio PDA



Cosecha de micelio



Micelio colocado en el mortero



Muestras almacenadas a -40°C

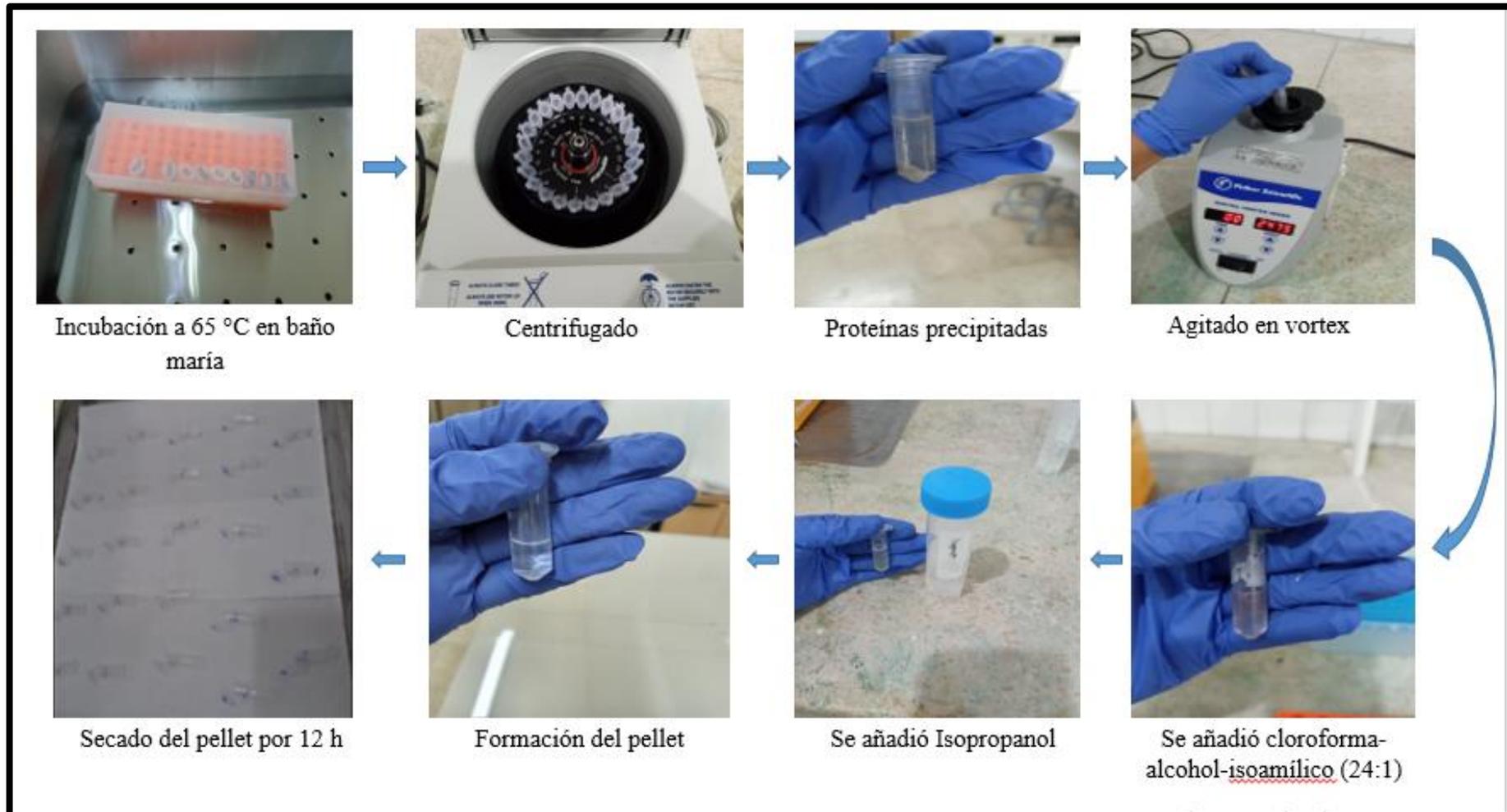


Micelio macerado colocado en tubos de 1,5 mL.

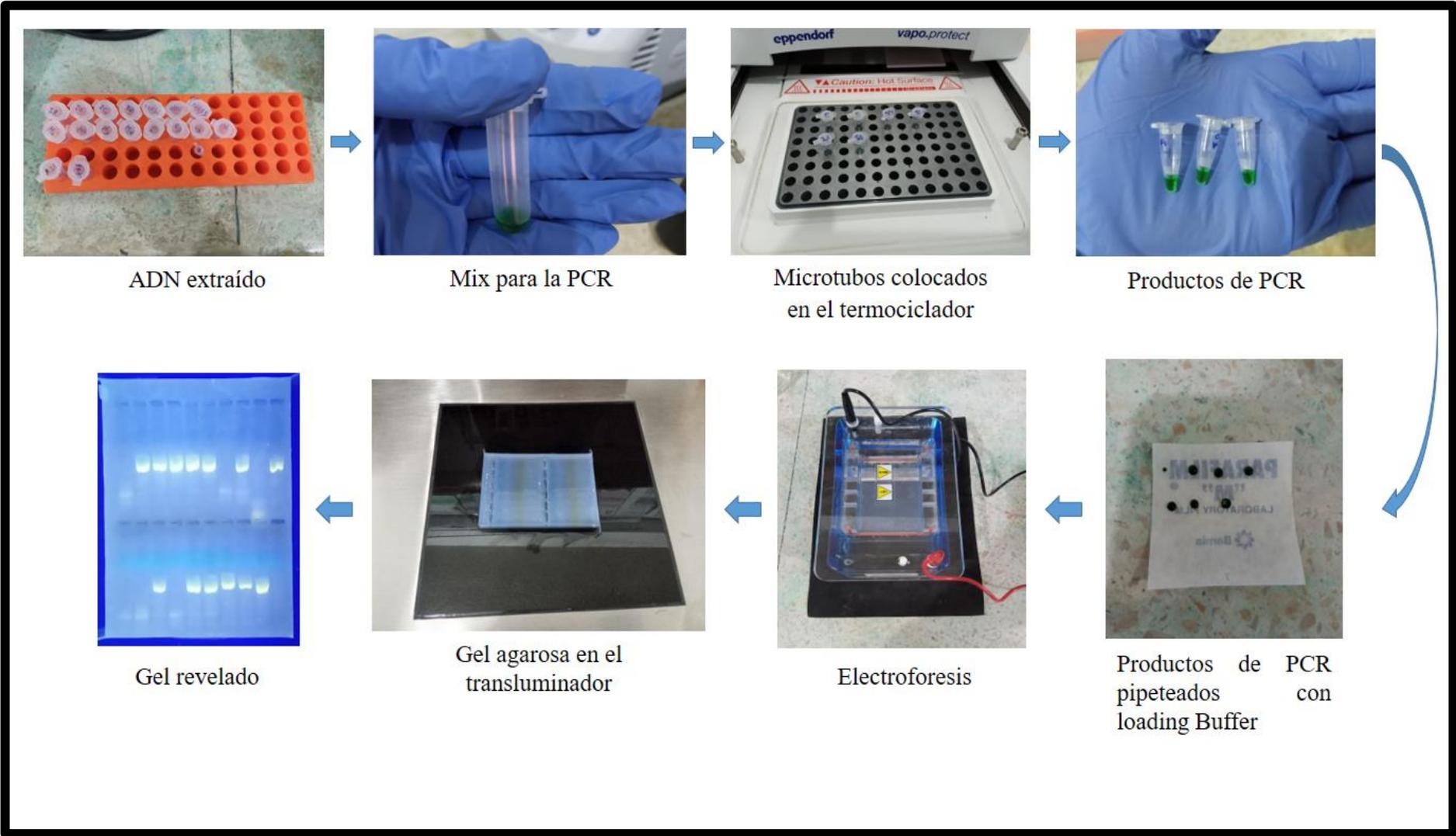


Macerado del micelio con nitrógeno líquido

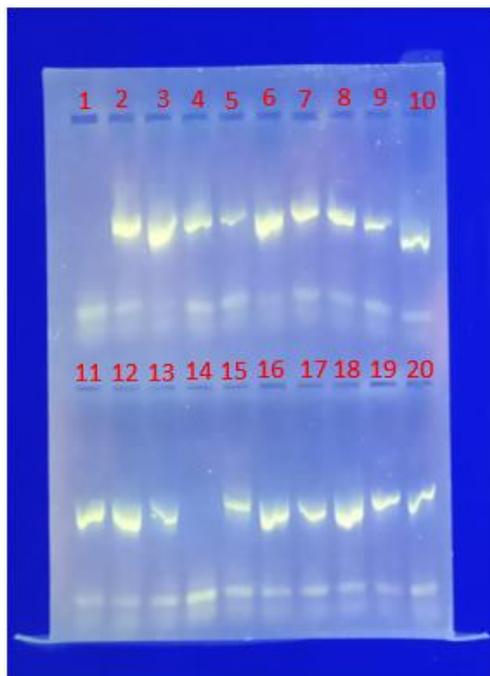
ANEXO J: EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS QUÍMICA)



ANEXO K: PCR y electroforesis



**ANEXO J: Gel de agarosa revelado**



Nº	Código
1	Control
2	2LN
3	3L
4	4L
5	6LD
6	5LD
7	7LD
8	8L
9	12LD
10	13LD
11	14L
12	15L
13	16L
14	18LD
15	1F
16	2F
17	4FD
18	5F
19	7FD
20	8FD

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y  
DOCUMENTAL**

**REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

**Fecha de entrega:** 09 / 01 / 2023

<b>INFORMACIÓN DEL AUTORA</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Dayse Maritza Quitio Llagsha
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Recursos Naturales
<b>Carrera:</b> Agronomía
<b>Título a optar:</b> Ingeniera Agrónoma
<b>f. responsable:</b> Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz

  
DBRA I  
Ing. Cristhian Castillo



2444-DBRA-UTP-2022