

Primer informe de *Nodulosporium* (Xylariaceae) en *Theobroma cacao* L. en Chiapas, México y pruebas de patogenicidad

Aidé González Ruiz¹
Abiel Sánchez Arizpe^{1§}
Yisa Maria Ochoa Fuentes¹
Ma. Elizabeth Galindo Cepeda¹
Raúl Rodríguez Guerra²
Lidia Monserrat Flores Torres¹

¹Departamento de Parasitología-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro núm. 1923. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (daryna.85@hotmail.com; yisa8a@yahoo.com; liz16gace@hotmail.com; lidiaf2004@yahoo.com.mx). ²Campo Experimental General Terán-INIFAP. Carretera Montemorelos-China km 31, General Terán, Nuevo León, México. CP. 67400. (raulrdzg@yahoo.com.mx).

§Autor por correspondencia: abielsanchez@hotmail.com.

Resumen

Nodulosporium es un hongo ampliamente distribuido y que se encuentra en zonas tropicales y se ha reportado como fitopatógeno ocasionando muerte descendente, pudriciones y resinosis, también se le considera como un potencial agente de control biológico de otros hongos y oomicetos. El estado teleomorfo se encuentra en estado solitario y en racimos, y se ha reportado como endófito, saprofito o fitopatógeno débil. La variedad criolla de cacao *Theobroma cacao*, es de gran relevancia ecológica, económica y cultural en el estado de Chiapas; sin embargo, presenta alta susceptibilidad a enfermedades a diferencia de otras variedades importantes, afectando la calidad y producción. En Villa de Comaltitlán Chiapas se observaron frutos de cacao con características típicas de síntomas de pudrición. El objetivo fue identificar los hongos asociados a frutos de cacao enfermos con síntomas de pudrición. Se identificaron morfológicamente los hongos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp., y *Nodulosporium* sp. Se informa por primera ocasión la presencia de *Nodulosporium* sp., en frutos de cacao con síntomas de pudrición de Villa de Comaltitlán, Chiapas, México. Se describe las características morfológicas y morfométricas de *Nodulosporium* sp. e *Hypoxyton* sp., y su identificación molecular. Se confirmó la patogenicidad de *Nodulosporium* sp., en follaje del cultivo causando clorosis y deshidratación de la hoja, y se recuperó en forma de picnidios y micelio con conidios, correspondiendo a su teleomorfo, identificado como *Hypoxyton* morfológica y molecularmente con los oligonucleótidos ITS4-ITS5.

Palabras clave: *Hypoxyton*, *Nodulosporium*, cacao, Chiapas, hongos fitopatógenos.

Recibido: marzo de 2019

Aceptado: junio de 2019

Introducción

El cacao *Theobroma cacao* L. (Malvales: Malvaceae), es un cultivo de gran importancia económica, social y ambiental, además de ser una especie primordial en el sistema agroforestal campesino (Jaimes y Aránzazu, 2010).

En México la superficie cosechada del cultivo de cacao para 2017 correspondió a 59 837.8 ha, con una producción de 27 287.25 t, y un valor de la producción nacional de \$1 074 303.38. La producción del cacao está concentrada en los estados de Tabasco, Chiapas y Guerrero con 17 430.21, 9 611.63 y 245.41 t, respectivamente (SAGARPA-SIAP, 2018). En el estado de Chiapas, el cacao se cultiva en cuatro regiones agronómicas: Soconusco, Norte, Centro y Selva Palenque, ocupando el sexto lugar en superficie cultivada, detrás del maíz, café, frijol, palma de aceite y mango. De las variedades mexicanas de cacao, en la región Soconusco se cultiva el criollo, por su agradable sabor y aroma, aunque con mayor susceptibilidad a las enfermedades con respecto a otras variedades importantes como el trinitario y el forastero que cuentan una mejora genética resultado del entrecruzamiento con el criollo (González y Amaya, 2005).

Diversos factores, como la escasa tecnología para el manejo del cultivo, el uso de materiales de baja calidad agronómica y la frecuencia de enfermedades por hongos, insectos, aves y roedores, han afectado la calidad y producción del cultivo, generando una crisis de desabasto, que obliga al país a la importación de semilla (González y Amaya 2005; Hernández *et al.*, 2015). De todos estos factores, las enfermedades son las que provocan pérdidas considerables de 40-100% de la producción (Jaimes y Aránzazu, 2010; Hernández *et al.*, 2015).

En el agroecosistema cacao, la enfermedad con mayor distribución es la mancha negra causada por *Phytophthora palmivora* Butl. /*Phytophthora capsici* Leonian (Peronosporales: Pythiaceae), la escoba de bruja *Moniliophthora perniciosa* (Sthael) y la moniliasis del cacao *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Samson y Benny (Agaricales: Marasmiaceae), siendo estas dos últimas las más destructivas de dicho cultivo, causando pérdidas que oscilan de 50 a 80% de la producción (Aime y Phillips-Mora, 2005). En Villa de Comaltitlán Chiapas, se observaron frutos de cacao con características típicas de pudrición, con esporulación en forma de polvo blanco sobre el tejido, manchas de color café/chocolate, aceitosas/brillosas y con forma de giba. El objetivo fue identificar hongos asociados a frutos de cacao y tejido vegetal con síntomas pudrición.

Materiales y métodos

Recolección de frutos de cacao

Se recolectaron 100 frutos (mazorcas) de 15-20 cm de longitud del cultivo de cacao, con signos típicos de pudrición, en cinco puntos de una parcela no comercial en el municipio de Villa de Comaltitlán, Chiapas (15° 13' 00'' latitud norte 92° 34' 00'' longitud oeste). El material biológico se colocó en bolsas de polietileno transparente estériles con cierre hermético y colocadas a temperatura ambiente (25 °C) en hieleras de poliestireno expandido y trasladado al laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) Saltillo, Coahuila.

Aislamiento y purificación del hongo

El aislamiento del hongo para la obtención de colonias puras, se llevó a cabo por dos vías, la primera consistió en tomar esporas directamente del tejido dañado de la mazorca, utilizando una aguja de disección estéril y sembradas en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Bioxon[®]) y la segunda vía consistió en seccionar tejido vegetal enfermo con un bisturí, el cual se desinfectó con un triple lavado con hipoclorito al 3%, agua destilada estéril (dH₂O), alcohol al 70% y dH₂O y sembrado en medio de cultivo PDA. En ambas vías de aislamiento, se incubaron a 27 ±2 °C en una cámara de crecimiento (Binder[®]).

Identificación morfológica, morfométrica y molecular

La identificación morfológica se realizó mediante montas de estructuras del micelio y sus respectivas conidias y esporas en porta y cubreobjetos, con una solución de lactofenol y azul de algodón (para teñir estructuras hialinas). Con ayuda de un microscopio compuesto se observaron las estructuras a 40 y 100x y se identificaron apoyado de las claves taxonómicas para géneros de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1998).

La evaluación morfométrica se realizó a partir de montas en porta y cubreobjetos de las estructuras del micelio (conidios, hifas, esporas, septos y ramificaciones) en microscopio digital con cámara integrada (AM4023x) y con apoyo del software de medición DinoCapture 2 para la obtención de las dimensiones de las estructuras evaluadas.

La identificación molecular se realizó para el hongo *Nodulosporium* sp., por la poca información en cultivos de importancia y se realizó mediante la extracción y evaluación de ADN del hongo, siguiendo el método de CTAB (Almeyda *et al.*, 2001) y posteriormente el método de PCR, utilizando los iniciadores universales ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White *et al.*, 1990). La amplificación y visualización del producto del PCR se realizó con base en el protocolo de Ahrens y Seemüller (1992), con modificaciones en las reacciones de PCR y cuyo volumen fue de 25 µL [agua ultrapura estéril: 11.9 µL, Buffer 10X (2.5 µL) dNTPs a 10 mM (0.4 µL), iniciadores ITS4 e ITS5 a 5 mM (3 µL de cada uno), ADN polimerasa (Green Taq DNA Polimerase, GenScript[®]) a 1U (0.2 µL) y muestra problema de ADN a 96.7 ng (4 µL)].

Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 s, 35 ciclos de alineamiento a 57 °C por 30 s, 35 ciclos de extensión a 72 °C por 45 s y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de PCR se purificó con el kit de bandas In vitro gen (QuickClean II Gel Extraction Kit [100rxns], GenScript[®]) y el producto purificado se envió para su secuenciación en dos direcciones (5' a 3' y 3' a 5') al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (Lanbama) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC (Ipicyt), el resultado obtenido se comparó con las secuencias en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2018).

Suspensión de esporas

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

Pruebas de patogenicidad

Se recolectaron frutos de 15-20 cm sanos de plantas sin presencia de algún tipo de daño. La inoculación en los frutos se realizó por punción, con aguja de disección colonizada con esporas del hongo *Nodulosporium* cultivado en medio PDA, colocando el inóculo en la parte distal (punta) del fruto. En esta prueba se utilizaron 10 frutos y se realizaron cuatro réplicas, colocadas sobre papel estroza estéril durante el estudio.

La inoculación en follaje se realizó con la técnica de hoja desprendida (Pettitt *et al.*, 2011) sobre una charola plástica de 25 cm, con una suspensión de 1×10^8 esporas mL^{-1} , colocando esta suspensión sobre la superficie adaxial (haz) en un total de 10 hojas, replicado tres veces. En ambas pruebas se consideró un testigo absoluto en el que solo se aplicó agua destilada estéril siguiendo la misma metodología. Las pruebas se desarrollaron bajo condiciones controladas a una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de $70 \pm 5\%$ y 12:12 luz: oscuridad. Además, la prueba con follaje se hidrató con una pequeña torunda de algodón saturada de agua estéril y reponiendo esta humedad cuando fue necesario. Cuando aparecieron síntomas en el tejido inoculado, se re-aisló el patógeno en medio de cultivo PDA y se identificó nuevamente.

Resultados y discusión

Identificación morfológica, morfométrica y molecular

En medio de cultivo PDA se aislaron diversos hongos de esporas del tejido dañado de la mazorca y tejido vegetal enfermo con síntomas de pudrición en cacao. Cada hongo fue purificado e identificado, encontrando *Aspergillus* sp. Micheli (Trichocomaceae), *Penicillium* sp. Link (Trichocomaceae), *Rhizopus* sp. Ehrenb (Mucoraceae), *Trichoderma* sp. Persoon (Hypocreaceae) con una incidencia de 85% y *Nodulosporium* sp. Preuss (Xylariaceae) con 15% de incidencia en los aislados. Se destaca la ausencia del hongo *M. roreri*, el cual es considerado como el agente causal de la pudrición de mazorca o moniliasis en diversas regiones productoras de cacao en México (Phillips-Mora *et al.*, 2006; Phillips-Mora *et al.*, 2007).

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

Nodulosporium sp., presentó un llenado de la caja de Petri (9 cm diámetro) en 7 días, desarrollando al principio una colonia micelial de color blanquecino y de aspecto algodonoso, 5 días después de la siembra se presentó la maduración de conidios, tornándose de color beige (similar a lo observado en el tejido enfermo), posteriormente al séptimo día, las colonias maduras de conidios adquirieron una coloración café-obscura (Figura 1).

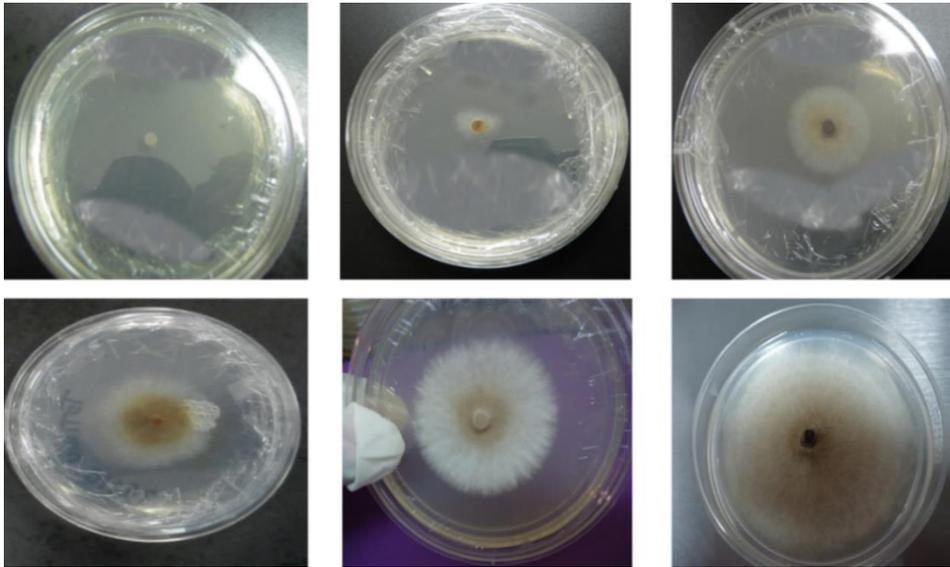


Figura. 1. Crecimiento radial de *Nodulosporium* sp., en caja de Petri a los 7 días.

Nodulosporium sp., presenta hifas poco septadas de color café claro, que se tiñen de color azul claro al centro (efecto del lactofenol y azul de algodón), conidiosporas en el conidióforo de forma sarcinada, hialinas alimonadas, que tomaron un color verde claro (efecto del lactofenol y azul de algodón). La pared o membrana de la espora ligeramente amarilla (Figura 2). Además de presentar un olor característico a musgo.



Figura. 2. Detalle de hifas y esporas de *Nodulosporium* sp., a 40x.

La observación al microscopio digital permitió ver las estructuras del micelio, con un tamaño (L= longitud) de conidios de 117.189-117.589 μm, grosor de hifas de 3.675-3.994 μm, grosor de septos de 0.505 μm, largo de ramificaciones de 34.797-75.848 μm, grosor de ramificaciones de 3.194-3.761 μm, esporas de 13.415-23.273 μm en forma poligonal (la periferia) y un área de 12.816-21.666 μm² (A= área) y un grosor de la membrana de la espora de 1.197-1.249 μm (Figura 2 y 3).

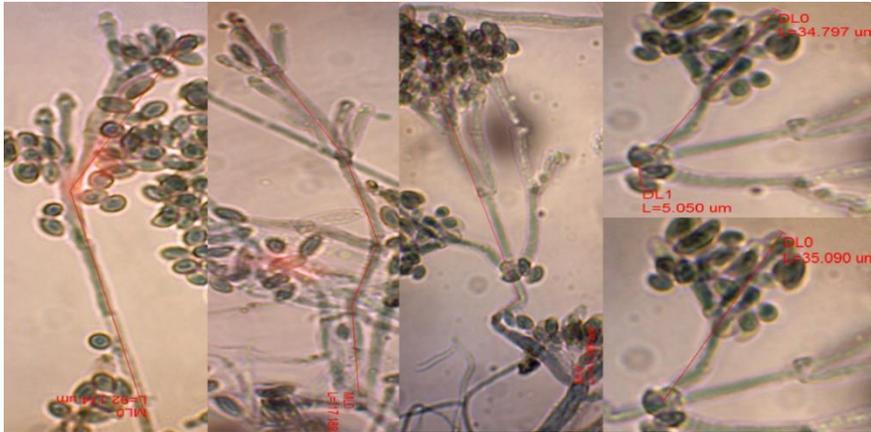


Figura 3. Detalle conidio y ramificaciones de *Nodulosporium* sp., a 40x.

De las pruebas de patogenicidad en follaje se logró recuperar el hongo, el cual fue aislado del tejido y puesto en medio de cultivo PDA, de este solo se obtuvo micelio y conglomerados de hifas (picnidios), con una sustancia gelatinosa (mucosidad) de color naranja-claro sobre y en la periferia del conglomerado (Figura 4).

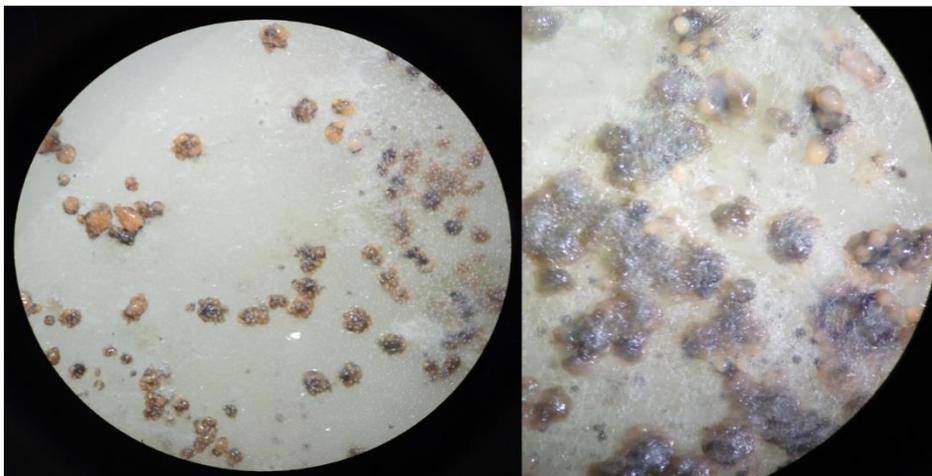


Figura 4. Observación de picnidios de *Hypoxylon* sp., en medios PDA.

Estas estructuras fueron montados en porta y cubreobjetos con solución de lactofenol y azul de algodón, donde se observó la formación de estromas con esporas, las cuales son de color hialino (nunca se tornaron oscuras, incluso ante oscuridad durante un periodo de 24 días), unicelulares, elipsoides-inequilaterales, con extremos ligeramente más redondeados, con abertura germinal alargada (11.5 μm) y con presencia de periespora dehiscente (largo:13.188-14.526 μm ; ancho 4.342-5.427 μm) hialina (Figura 5a, 5b), estructuras características que con base en las claves de Barnett y Hunter (1998), se identifica como el género *Hypoxylon* Bull. (Xylariaceae) teleomorfo de *Nodulosporium*, por lo cual ambos están relacionados; en este sentido Ju y Rogers (1996), reconocen a *Nodulosporium* como anamorfo o fase sexual de varias especies del género *Hypoxylon*.

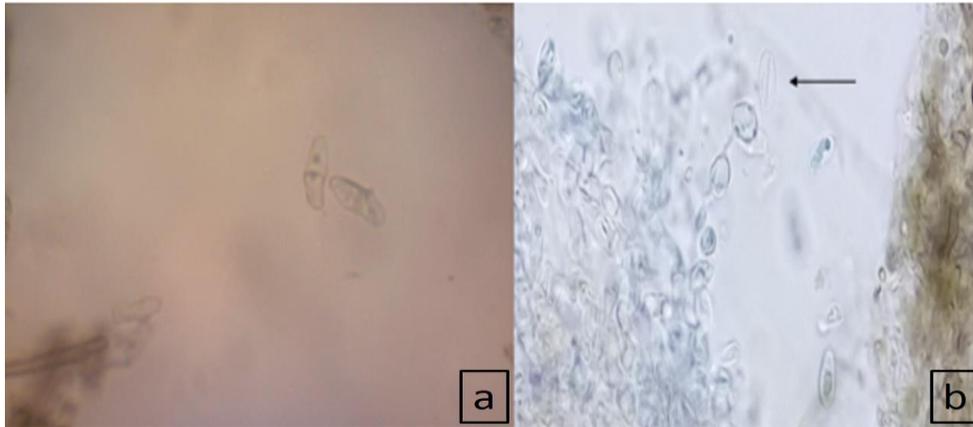


Figura 5. a) estroma de *Hypoxylon* sp., diferenciándose; b) espora hialina sin madurar.

Se obtuvo el producto de PCR del ADN del micelio de *Nodulosporium* y de picnidios de *Hypoxylon*; ambos con un producto de 600 pb con los oligonucleótidos ITS4-ITS5. Se obtuvieron 2 secuencias para *Nodulosporium* y 3 de *Hypoxylon*, para su comparación en la base de datos del banco de genes del algoritmo BLAST (NCBI, 2018). Se confirmó la identidad del hongo aislado de frutos de cacao con pudrición y el recuperado en la prueba de patogenicidad en follaje obtenidas del municipio de Villa de Comaltitlán en el estado de Chiapas, revelando a *Hypoxylon* en las 5 secuencias homólogas en dos aislados en el GenBank, procedentes de Estados Unidos de América (número de acceso: KF496192.1) con una identidad de 100% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de secuencias en el banco de genes del NCBI.

Identificación morfológica	Primer's de secuencia	Total score	Valor E	Identidad (%)	Núm. acceso	Identificación molecular
<i>Hypoxylon</i> sp.	ITS4- ITS5	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.
<i>Nodulosporium</i> sp.	ITS4- ITS5	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.
<i>Nodulosporium</i> sp.	ITS4- ITS5	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.
<i>Hypoxylon</i> sp.	ITS4- ITS5	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.
<i>Hypoxylon</i> sp.	ITS4- ITS5	501	4e-138	100	KF496192.1	<i>Hypoxylon</i> sp.

Pruebas de patogenicidad

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

La prueba de patogenicidad con follaje mostró sensibilidad a las 24 h de la inoculación, observándose clorosis sobre la hoja la cual exhibió a partir del punto de inoculación un proceso de deshidratación (dsecamiento sin perder el color verde totalmente) y posteriormente a las 48 h presentó crecimiento de micelio blanquecino, quedando de esta manera hasta el término de la prueba (7 días en total) (Figura 6). Esta lesión se observó solo en 30% de las muestras inoculadas. En el testigo inoculado con agua destilada estéril no se observó ningún síntoma o lesión alguna de la presencia del patógeno. En las muestras sintomáticas fue re-aislado el hongo, encontrando únicamente al hongo inoculado en forma de picnidios y micelio con conidios, correspondiendo al teleomorfo de *Nodulosporium*, identificado como *Hypoxylon*. Este resultado indica que *Nodulosporium* es levemente patogénico en follaje de cacao, causando clorosis y deshidratación de la hoja.

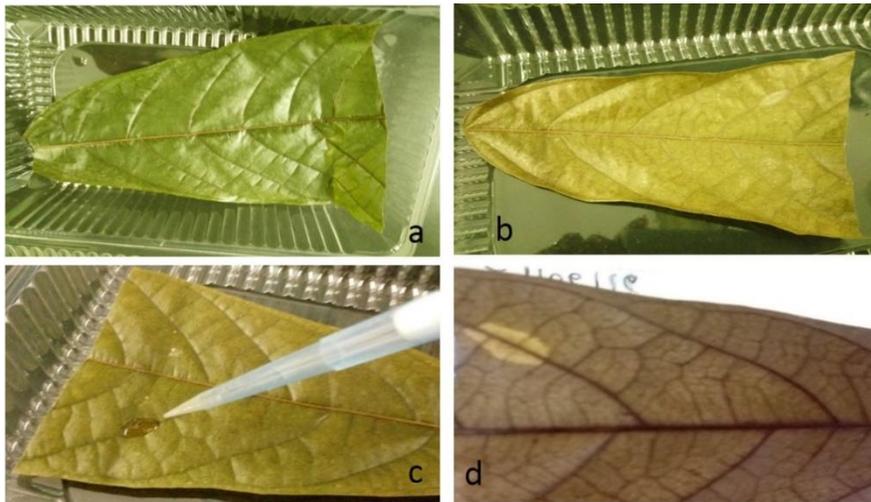


Figura 6. a y b) hoja de cacao sin presencia de daño por *Nodulosporium* sp. (testigo); c y d) presencia de daño por *Nodulosporium* a los 48 h en follaje de cacao.

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

El género *Nodulosporium* se ha asociado como endófito a diversas plantas; Collado *et al.* (2001) lo reportan en corteza del tronco, hojas y ramas sanas y secas de *Quercus ilex* L. (Fagaceae). Salgado y Cepero (2005) lo encontraron en hojas de *Rosa hybrida* L. (Rosaceae), Márquez-Dávila *et al.* (2013) aislado a partir de hojas y tallos de cacao *T. cacao*, Lizarazo-Medina *et al.* (2014) en hojas de dos especies de orquídeas *Cattleya percivaliana* y *Cattleya trianaei* (Orchidaceae) y se aisló también de cacahuananche (*G. sepium*) con potencial como antagonista contra hongos y oomicetos (Sánchez-Fernández, 2016).

Las especies del género *Hypoxylon* se han reportado como endófitos en tejidos de plantas leñosas o herbáceas (Petrini y Petrini, 1985), así como saprofitos o fitopatógenos débiles en madera de árboles de zonas templadas o tropicales (Miller, 1961). Para México, este género es el segundo con

mayor número de especies en la Familia Xylariaceae (San Martín, 1992) con 41 especies identificadas, 14 registradas para el estado de Chiapas en siete municipios, encontradas sobre madera, principalmente en bosque tropical alto perennifolio, bosque tropical mediano subcaducifolio, bosque tropical bajo caducifolio, bosques de pino encino y bosque mesófilo de montaña (San Martín, 1999).

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

Conclusión

Se identifica al hongo *Nodulosporium* sp., aislado de tejido vegetal enfermo con síntomas de pudrición en mazorca de *Theobroma cacao* para el estado de Chiapas y se confirma su teleomorfo identificado como *Hypoxylon*. Asimismo, su patogenicidad sobre follaje de cacao, causa clorosis y deshidratación de la hoja.

Literatura citada

- Ahrens, U. and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA Gene. *Phytopathology*. 82: 828-832.
- Aime, M. C. and Phillips, M. W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (*chocolate*, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 97(5):1012-1022.
- Almeyda, L. I. H.; Rocha, P. M. A.; Piña, R. J. and Martínez, J. P. S. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 19(1):1-9.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect of fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Collado, J.; Platas, G. and Peláez, F. 2001. Identification of an Endophytic *Nodulisporium* sp. from *Quercus ilex* in Central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the Fungus. *Mycologia*. 93(5):875-886
- De La Torre, A. R.; Cota, T. F. M. and San, M. F. 2003. First report of *Hypoxylon diatrypeoides* inducing Dieback and Black Trunk Rot on Mesquite (*Prosopis laevigata*) in Mexico. *Plant Dis.* 87(4):447-453.
- De La Torre, A. R.; Cota, T. F. M.; García, R. J. L.; Campos, J. E. y San, M. F. 2009. Etiología de la muerte descendente del mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biosfera del Valle de Zapotitlán, México. *Agrociencia*. 43(2):197-208.
- González, L. V. W. y Amaya, G. 2005. Cacao en México: competitividad y medio ambiente con alianzas (diagnóstico rápido de producción y mercadeo). INIFAP-USAID-IPRC. México. 80 p.
- Hernández, G. E.; Hernández, M. J.; Avendaño, A. C. H.; López, G. G.; Garrido, R. E. R.; Romeo, N. J. y Nava, D. C. 2015. Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 33(2):232-246.

- Jaimes, S. Y. y Aranzazu, H. F. 2010. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en *Monilia* (*Monilophthora roreri*). Corpoica. Colombia. 91 p.
- Ju, Y. M. and Rogers, J. D. 1996. A Revision of the genus *Hypoxylon*. Mycologia memoir No 20. American Phytopathological Society of America, St. Paul. Minnesota. 107-108 pp.
- Lizarazo, M. P. X.; Mendoza, S. M. M. y Gutiérrez, G. A. I. 2014. Diversidad de la micobiota endófitas de *Cattleya percivaliana* y *Cattleya trianaei* cultivadas en invernadero. Actualidades Biol. 37(102):307-318.
- Márquez, D. K.; Arévalo, E.; León, B.; Cayotopa, J.; Olivera, D. y Samuels, G. J. 2013. Composición de comunidades de hongos endofitos de cacao nativo en cuencas del alto amazonas del Perú. Fitopatología. 45(1):17-24.
- Mestizo, Y. A.; Bandera, G.; Aya H.; Sarria, G.; Varón, F.; Navia, M. y Martínez, G. 2012. Caracterización de síntomas e identificación de microorganismos en palmas de aceite afectadas por la Pudrición basal del estípites. PalmaS. 33(4):13-27.
- Miller, J. H. 1961. A monograph of the world species of *Hypoxylon*. University of Georgia Press. USA. 158 p.
- NCBI. 2018. National Center for Biotechnology Information. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE-TYPE=BlastSearch&LINK-LOC=blasthome>.
- Petrini, L. E. and Petrini, O. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. Sydowia. 38: 216-234.
- Pettitt, T. R.; Wainwright, M. F.; Wakeham, A. J. and White, J. G. 2011. A simple detached leaf assay provides rapid and inexpensive determination of pathogenicity of *Pythium* isolates to 'all year round' (AYR) chrysanthemum roots. Plant Pathology. 60(5):946-956.
- Phillips, M. W.; Aime, M. C. and Wilkinson, M. J. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. Plant Pathology. 56(6):911-922.
- Phillips, M. W.; Cautiño, A.; Ortiz, C. F.; López, A. P.; Hernández, J. and Aime, M. C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. Plant Pathol. 55(4):84-91.
- Ruiz, R. R.; Hernández, M. J.; Ayala, E. V.; Soto, R. L.; Leyva, M. S. G. y Hernández, R. J. 2015. Hongos asociados a cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) deshidratados y almacenados en Guerrero, México. Rev. Mex. Fitopatol. 33(1):12-30.
- SAGARPA-SIAP. 2018. Producción agrícola 2016. <http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola-siap-gb/icultivo/index.jsp>.
- Salgado, S. C y Cepero, M. C. G. 2005. Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. Rev. Iberoam. Micol. 22:99-101.
- San Martín, F. E. 1992. A mycofloristic and cultural study of the Xylariaceae of Mexico. Washington State University. Washington. 1120 p.
- San Martín, F. E.; Ju, Y. y Rogers, J. D. 1999. Algunas especies de *Hypoxylon* (Pyrenomycetes, Xylariaceae) de México. Acta Bot. Mex. 47:31-53.
- Sánchez, F. R. E.; Diaz, D.; Duarte, G.; Lappe, O. P.; Sánchez, S. and Macías, R. M. L. 2016. Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1a: a qualitative change in the intraspecific and interspecific interactions with *Pythium aphanidermatum*. Microbial Ecol. 71(2):347-364.
- White, T. J.; Bruns, S.; Lee, T. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H. Sninsky, J. J. and White, T. J. (Eds.). PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York, USA. 315-322 pp.