

Efecto de preparados minerales sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans*

Effect of mineral preparations on growth and *in vitro* development of *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans

Lyda Esperanza Ochoa Fonseca¹, Sandra Isabel Ramírez González^{2§}, Orlando López Báez³, José Luis Moreno Martínez¹ y Saúl Espinosa Zaragoza⁵

¹Universidad Autónoma de Chiapas- Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV. Entronque Carretera Costera y Estación Huehuetán, C. P. 30660. Tel: 964 6270128. (lyda.ochoa.23@gmail.com; jolumo@gmail.com). ²Universidad Autónoma de Chiapas-Laboratorio de Agrotecnologías, AUDES Cacao-Chocolate. Campus Ciudad Universitaria, km 8 carretera Terán-Ejido Emiliano Zapata. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel: 961 6178000 ext. 1725 y 1722. ³Universidad Autónoma de Chiapas, México. Laboratorio de Agrotecnologías, AUDES Cacao-Chocolate. Campus Ciudad Universitaria, km 8 carretera Terán-Ejido Emiliano Zapata. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel: 961 6178000 ext. 1725 y 1722. (olopez@unach.mx). ⁵Universidad Autónoma de Chiapas, México. Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV. Entronque Carretera Costera y Estación Huehuetán, C. P. 30660. Tel: 964 6270128. (saulez1@gmail.com). [§]Autora para correspondencia: sanirg@yahoo.com.

Resumen

El presente estudio se desarrolló con el objetivo de evaluar en condiciones de laboratorio, la actividad fungicida sobre *Moniliophthora roreri* de los preparados minerales: caldo visosa (CV), caldo bordelés más permanganato de potasio (CBP), caldo bordelés más sulfato de zinc y sulfato de magnesio (CBS), caldo de bicarbonato de sodio (BiS), caldo silicosulfocálcico (SSC) y polisulfuro de calcio (PC). Se realizaron dos bioensayos. En el primero, el efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo se evaluó mediante la técnica de difusión en agar, los compuestos fueron probados en cinco concentraciones (50, 40, 30, 20 y 10% v/v). En el segundo, mediante la técnica de cultivo en medio líquido en tubos de ensayo se determinó el efecto sobre la formación y germinación de esporas del hongo; el medio de cultivo consistió de una solución de agua más extracto de cacao (1:1 v/v) a la cual se adicionaron esporas del hongo y 50% (v/v) de cada preparado mineral. Con excepción del BiS al 10%, el crecimiento micelial fue inhibido total o parcialmente por los demás preparados minerales, presentando diferencias estadísticamente significativas con el testigo. Los preparados SSC y PC fueron los más eficaces inhibiendo 100% de

Abstract

The present study was developed with the aim to evaluate the fungicidal activity of mineral preparations on *Moniliophthora roreri* under laboratory conditions: broth visosa (CV), Bordeaux mixture plus potassium permanganate (CBP), Bordeaux mixture plus zinc sulfate and sulfate magnesium (CBS), broth sodium bicarbonate (BiS), broth silicosulfocálcico (SSC) and calcium polysulfide (PC). Two bioassays were performed; in the first, the inhibitory effect on fungal growth was assessed by the agar diffusion method, the compounds were tested at five concentrations (50, 40, 30, 20 and 10% v / v). In the second, through the cultivation technique cultivation in liquid medium in test tubes, the effect on formation and germination of fungus spores was determined; The culture medium consisted of a solution of cocoa extract plus water (1:1 v / v) to which fungus spores and 50% (v / v) of each mineral preparation were added. With the exception of BiS at 10%, mycelial growth was inhibited completely or partially by the other mineral preparations, showing statistically significant differences with control. SSC and PC preparations were the most effective in inhibiting 100% mycelial growth even at 10% concentration. The test

crecimiento micelial aún en la concentración de 10%. La prueba en medio líquido mostró que a las 96 horas los preparados SSC y PC fueron los más eficaces, llegando a reducir el número de esporas en 98.2 y 79.9% respectivamente; solo se presentó germinación de esporas en el tratamiento testigo. Se observó la formación de esporas en los tratamientos BiS en todas las concentraciones y en el testigo, pero ningún preparado mineral permitió la germinación de esporas.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., Moniliasis, agricultura orgánica.

Introducción

La moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans es una de las enfermedades que generan mayores pérdidas en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), llegando a ser hasta de 100% si las condiciones climáticas son favorables y los árboles son altamente susceptibles a la enfermedad (Phillips *et al.*, 2005; López *et al.*, 2006). En las regiones productoras de México el manejo de este fitopatógeno es básicamente de tipo cultural, a través de la poda de los árboles y la remoción de frutos enfermos. Si se aplica de forma rigurosa, el manejo cultural ha demostrado ser una alternativa efectiva en otros países (Soberanis *et al.*, 1999; Krauss *et al.*, 2003; Jaimes y Aranzazu, 2010); sin embargo, factores como el costo o la escasez de mano de obra para realizar estas prácticas y la existencia de plantaciones de avanzada edad con árboles de porte alto, hacen que se requiera de nuevas alternativas complementarias para mejorar la eficiencia tanto en protección del cultivo, como en términos económicos.

Desde hace más de un siglo se conoce el efecto positivo que tienen diferentes productos a base de sales inorgánicas y otros compuestos de origen natural (aquí se denominan preparados minerales) en el control de numerosos problemas fitosanitarios (Deliopoulos *et al.*, 2010). Reuveni y Reuveni (1995) señalan algunas ventajas de estos productos como su bajo costo, la baja toxicidad para mamíferos y en general, un buen perfil de seguridad para el hombre y el ambiente; además es importante señalar que el uso de estos preparados minerales es aceptado en el marco de las normas de producción orgánica (Reglamento (CE) núm. 834/2007 y USDA-NOP).

Uno de los preparados minerales más conocidos es el caldo bordelés, que se ha empleado con éxito para controlar *Phytophthora palmivora* en el cacao (Hislop, 1963;

showed that in liquid medium at 96 hours the SSC and PC preparations were the most effective, reducing up to 98.2 and 79.9% of spores respectively; spore germination was only present in control treatment. Spore formation in BiS treatments at all concentrations and in control was observed, but no mineral preparations allowed spore germination.

Keywords: *Theobroma cacao* L., Moniliasis, organic agriculture.

Introduction

Moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans is a disease that generates great losses in cacao (*Theobroma cacao* L.), reaching up of 100% if weather conditions are favorable and trees are highly susceptible to the disease (Phillips *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2006). In producing regions of Mexico the management of this pathogen is basically cultural, through pruning trees and removal of diseased fruits. If applied rigorously, cultural management has proven to be an effective alternative in other countries (Soberanis *et al.*, 1999; Krauss *et al.*, 2003; Jaimes and Aranzazu, 2010); however, factors such as cost and labor scarcity to perform these practices and the existence of old plantations with high bearing trees, requires of new complementary alternatives to improve efficiency both in crop protection, and in economic terms.

For more than a century has been known the positive effect that different products based on inorganic salts and other compounds of natural origin have (here called mineral preparations) in the control of numerous phytosanitary problems (Deliopoulos *et al.*, 2010). Reuveni and Reuveni (1995) point out some advantages of these products as its low cost, low toxicity to mammals and in general, good safety profile for man and the environment; it is also important to note that the use of these mineral preparations are accepted under organic production rules (Regulation (EC) no. 834/2007 and USDA-NOP).

One of the best known minerals is Bordeaux mixture, which has been used successfully to control *Phytophthora palmivora* in cocoa (Hislop, 1963; Adejumo, 2005) also have shown good results on different pathogens with other products such as sodium bicarbonate (Dik *et al.*, 2003; Dessalegn *et al.*, 2013) and calcium polysulfide (Holb and Schnabel, 2008; Jamar *et al.*, 2010); the latter was tested to control of *M. roreri*, finding that *in vitro* reduced the number of conidia by up to 74% and

Adejumo, 2005), además se han obtenido buenos resultados sobre diferentes fitopatógenos con otros productos, como el bicarbonato de sodio (Dik *et al.*, 2003; Dessalegn *et al.*, 2013) y el polisulfuro de calcio (Holb y Schnabel, 2008; Jamar *et al.*, 2010); este último fue probado para el control de *M. roreri*, encontrándose que *in vitro* redujo el número de conidias hasta 74% y en campo logró bajar la incidencia a 0.53%, frente a 21% en el tratamiento con manejo cultural y 69.6% en el testigo sin manejo (Ramírez *et al.*, 2011a).

Actualmente hay un incremento sostenido en la demanda de cacao orgánico, sin embargo la oferta es insuficiente (The International Cocoa Organization, 2006; Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 2010), lo cual plantea la necesidad de desarrollar alternativas para el control de la moniliasis, aceptadas dentro de la normatividad de producción orgánica y que presenten una buena relación beneficio/costo para el productor. En este sentido, preparados a base de minerales pueden ser una opción promisoriosa, por lo cual el presente estudio se planteó como objetivo evaluar la efectividad de seis preparados minerales para inhibir el crecimiento micelial, la formación y la germinación de esporas de *M. roreri*, en condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Los ensayos fueron conducidos en el Laboratorio de Agrotecnologías de la Agencia Universitaria para el Desarrollo -AUDES Cacao- Chocolate, ubicado en Ciudad Universitaria de la Universidad Autónoma de Chiapas, en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Los preparados minerales evaluados fueron: caldo visosa (CV); caldo bordelés más permanganato de potasio (CBP); caldo bordelés más sulfato de zinc y sulfato de magnesio (CBS); caldo de bicarbonato de sodio (BiS); caldo silicosulfocálcico (SSC) y polisulfuro de calcio (PC). Los cinco primeros se elaboraron siguiendo la composición y procedimientos descritos por Restrepo (2007) y para el PC, se aplicó el procedimiento descrito por Ramírez *et al.* (2011a); se utilizaron elementos y compuestos grado analítico.

El hongo se aisló de un fruto de cacao infectado en estado de mancha chocolate procedente del municipio de Tecpatán, Chiapas, México y se mantuvo en medio de cultivo compuesto por extracto de cacao, agar y agua destilada, a una temperatura de 26 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

on field managed to lower the incidence to 0.53%, versus 21% in the treatment with cultural management and 69.6% in the untreated control (Ramírez *et al.*, 2011a).

Currently there is a sustained demand for organic cocoa, however supply is insufficient (The International Cocoa Organization, 2006; Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 2010), which raises the need to develop alternatives to control moniliasis, accepted within the regulations for organic production and with a good benefit / cost ratio for the producer. In this regard, mineral preparations can be a promising option, so this study aimed to evaluate the effectiveness of six mineral preparations to inhibit mycelial growth, formation and germination of spores of *M. roreri*, under laboratory conditions.

Material and methods

The trials were conducted at the Agro-technology Laboratory of Agencia Universitaria for the Desarrollo-AUDES Cacao-Chocolate, located in Ciudad Universitaria at the Universidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico.

The mineral preparations evaluated were: broth visosa (CV); Bordeaux mixture plus potassium permanganate (CBP); Bordeaux mixture plus zinc sulfate and magnesium sulfate (CBS); broth sodium bicarbonate (BiS); broth silicosulfocálcico (SSC) and calcium polysulfide (PC). The first five were prepared following the composition and procedures described by Restrepo (2007) and for PC the method described by Ramírez *et al.* (2011a) was applied; analytical grade elements and compounds were used.

The fungus was isolated from a cacao fruit infected, of a chocolate canker spot from the municipality of Tecpatán, Chiapas, Mexico and maintained in culture medium consisting of cocoa extract, agar and distilled water at 26 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

To determine the effect of mineral preparations on the pathogen, two trials were performed one by agar diffusion test and another in liquid medium.

Agar diffusion test. The culture medium was prepared according to the above composition to maintain the fungus, but a part of the distilled water was replaced with the corresponding volume of mineral preparation, depending on the concentration to be evaluated: 50, 40, 30, 20 and 10% (v/v), except control

Para determinar el efecto de los preparados minerales sobre el patógeno se realizaron dos ensayos, uno mediante la técnica de difusión en agar y otro en medio líquido.

Prueba de difusión en agar. Se preparó el medio de cultivo según la composición indicada anteriormente para el mantenimiento del hongo, pero se reemplazó una parte del agua destilada por el correspondiente volumen de preparado mineral, dependiendo de la concentración a evaluar: 50, 40, 30, 20 y 10% (v/v), excepto en el testigo (TES) sin preparado. Una vez solidificado el medio, se realizó la siembra de *M. roreri* procedente de un cultivo de 12 días de edad, para lo cual se usó un sacabocado y se depositó el inóculo en el centro de cada caja Petri de 50 mm. Cada 24 h durante 12 días se midió el diámetro de crecimiento micelial (mm); el día 13, con una cámara de Neubauer se realizó el conteo del número de esporas formadas y germinadas, para lo cual se hizo un raspado del crecimiento fúngico de cada caja Petri y se diluyó con agua destilada. El diseño experimental fue completamente al azar con siete tratamientos consistentes en los seis preparados minerales más un testigo únicamente con el medio de cultivo y cinco repeticiones, la unidad experimental consistió de una caja Petri.

Prueba en medio líquido. Se preparó una solución madre con esporas obtenidas de un cultivo de 12 días de sembrado, para lo cual se realizó un raspado superficial del contenido de siete cajas Petri de 50 mm en un Erlenmeyer, se agregaron 117 mL de extracto de cacao, 117 mL de agua destilada y dos gotas de Tween 80, esta solución se sometió a agitación en vortex por una hora. Se marcaron 15 tubos de ensayo (repeticiones) por tratamiento y en cada uno se agregaron 5 mL de solución madre y 5 mL del preparado mineral a evaluar; en el tratamiento testigo se agregó agua destilada en vez de preparado mineral. Los tubos de ensayo se agitaron hasta homogenizar la solución y se incubaron en oscuridad a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Cada 24 h y hasta las 96 h después de inoculación se realizó el conteo del número de esporas totales y germinadas en cámara de Neubauer. En cada momento de conteo se evaluaron tres tubos por tratamiento realizando tres lecturas en cada tubo. Se usó un diseño completamente al azar con siete tratamientos y 15 repeticiones por tratamiento.

A los datos obtenidos en las dos pruebas se les realizó análisis de varianza y comparación de medias a través de la prueba de Tukey. El análisis estadístico se realizó con el programa Statistical Analysis System (SAS)[®] versión 9.1 para Windows.

(TES) without mineral preparation. Once solidified the medium, it was proceeded to spread *M. roreri* from a crop 12 days old, for which a cork borer was used and the inoculum was placed in the center of each Petri dish of 50 mm. Every 24 h for 12 days mycelial growth diameter (mm) was measured; at 13th day, with a Neubauer chamber counted the number of formed and germinated spores, for which a scraping of fungal growth of each Petri dish was performed and diluted with distilled water. The experimental design was completely randomized with seven treatments consisting of six mineral preparations plus a control prepared with culture medium and five replications, the experimental unit consisted of a Petri dish.

Liquid medium test. A stock solution with spores obtained from a 12 days culture, for which a superficial scrape was performed from the content of seven Petri dishes of 50 mm in an Erlenmeyer, added 117 mL of cocoa extract, 117 mL of distilled water and two drops of Tween 80, this solution was agitated in a vortex for one hour. 15 test tubes (replicates) were scored for each treatment and added 5 mL of stock solution and 5 mL of mineral preparation; to the control treatment added distilled water instead of mineral preparation. The test tubes were shaken to homogenize the solution and incubated in the dark at $26 \pm 2^\circ\text{C}$; every 24 h till 96 h after inoculation, total number of spores and germinated were counted in a Neubauer chamber. At each counting the three tubes per treatment were evaluated by performing three readings in each tube. A completely randomized design with seven treatments and 15 replicates per treatment was used.

The data from the two trials was subjected to a variance analysis and comparison of means by Tukey test. Statistical analysis was performed with the Statistical Analysis System[®] (SAS) program for Windows version 9.1.

Results and discussion

a) Agar diffusion test.

Table 1 shows the results of the mycelial growth diameter from *M. roreri*, 12 days after spread (das) and exposure to mineral preparations; Tukey test showed that there were significant differences among the treatments and control (TES). Figure 1 shows the appearance of colonies in the Petri plates; the color of the medium in SSC and PC treatments is due to its composition.

Resultados y discusión

a) Prueba de difusión en agar

En el Cuadro 1 se presentan los resultados del diámetro de crecimiento micelial de *M. roreri*, 12 días después de la siembra (dds) y exposición a los preparados minerales; la prueba de Tukey mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos y el testigo (TES). En la Figura 1 se aprecia el aspecto de las colonias en las cajas Petri; el color del medio en los tratamientos SSC y PC se debe a su composición.

Cuadro 1. Crecimiento micelial (mm) de *M. roreri* en presencia de preparados minerales 12 dds, prueba de difusión en agar.
Table 1. Mycelial growth (mm) of *M. roreri* in presence of mineral preparations 12 das: agar diffusion test.

Tratamiento	Concentración del preparado mineral				
	50% (x ± S.E)	40% (x ± S.E)	30% (x ± S.E)	20% (x ± S.E)	10% (x ± S.E)
PC	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0
SSC	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0
CV	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	9.6 ^j ± 0.9	32.8 ^{ed} ± 1.0
BiS	17.4 ^g ± 0.9	14.4 ^{hi} ± 1.3	28.8 ^f ± 1.2	43 ^c ± 0.6	51 ^a ± 0
CBP	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	15.8 ^{hg} ± 0.2	35.4 ^d ± 0.4
CBS	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	0 ^k ± 0	12.6 ⁱ ± 0.7	30.8 ^{ef} ± 0.7
TES		46.6 ^b ± 0.9			

Promedios con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). SE= error estándar.

Los mejores resultados se obtuvieron con el SSC y el PC, ya que en todas las concentraciones el crecimiento micelial fue nulo. Estos resultados coinciden con los reportados por Ramírez *et al.* (2011a) para el PC y demuestran mayor eficacia que productos de síntesis química como el Clorotalonil y Azoxystrobin en los estudios realizados por Torres *et al.* (2013) y Quevedo (2012). El primero de estos autores encontró una inhibición de 96% en el crecimiento micelial con Azoxystrobin (1 250 mg/L) y el segundo reportó valores de 67% para Clorotalonil y 78% para Azoxystrobin (dosis de 1 000 mg/L).

En los tratamientos CV, CBP y CBS la inhibición del crecimiento micelial incrementó a medida que la concentración del preparado mineral fue mayor; en concentraciones de 50 al 30% lograron inhibir completamente el crecimiento micelial y al 20% ejercieron una inhibición de más de 60% por lo cual se consideran productos con potencial para el control de *M. roreri*. Por su parte, el BiS en todas las concentraciones ejerció el menor efecto inhibitorio sobre el hongo y a la concentración más

The best results were with SSC and PC, since in all concentrations mycelial growth was zero. These results agree with those reported by Ramírez *et al.* (2011a) for PC and prove greater efficacy than synthetic products such as chlorothalonil and Azoxystrobin in studies by Torres *et al.* (2013) and Quevedo (2012). The first of these authors found 96% inhibition in mycelial growth with Azoxystrobin (1250 mg / L) and the second reported values of 67% and 78% for Chlorothalonil and Azoxystrobin respectively (dose of 1000 mg / L).

In CV, CBP and CBS treatments, mycelial growth inhibition increased as the concentration of mineral preparation was higher; in concentrations 50 to 30% managed to completely

inhibit mycelial growth and at 20% inhibition was more than 60%, therefore considered with potential to control *M. roreri*. BiS at all concentrations had the least inhibitory effect on the fungus and the lowest concentration (10%) promoted its growth excelling the control; a similar effect was reported by Mills *et al.* (2004), who found that sodium bicarbonate stimulated mycelial growth of *Verticillium albo-atrum*.

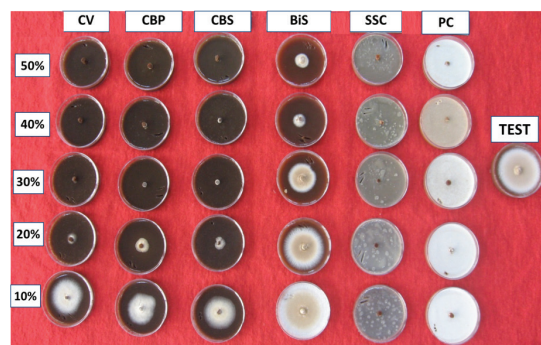


Figura 1. Aspecto del crecimiento micelial de *M. roreri* bajo el efecto de preparados minerales, 12 dds.

Figure 1. Appearance of mycelial growth of *M. roreri* under the effect of mineral preparations 12 das.

baja (10%) promovió su crecimiento superando al testigo; un efecto similar fue reportado por Mills *et al.* (2004), quienes encontraron que el bicarbonato de sodio estimuló el crecimiento micelial de *Verticillium albo-atrum*.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados del número de esporas formadas; se puede observar que con excepción de los tratamientos BiS y testigo, los demás inhibieron totalmente la formación de éstas estructuras. En el tratamiento BiS el número de esporas mL^{-1} se incrementó a medida que disminuyó la concentración del preparado y al 10% superó ligeramente al testigo, sin presentar diferencia estadísticamente significativa con éste. En los tratamientos CV, CBP y CBS aunque se observó formación de micelio a concentraciones de 10 y 20% (Cuadro 1), no se presentó formación de esporas; este efecto antiesporulante es muy importante ya que las esporas son las únicas estructuras del patógeno que pueden causar infección de los frutos.

Table 2 shows the results of the number of spores formed; can be seen that with the exception of BiS and control, the rest of the treatments inhibited the formation of these structures. In the BiS treatments the number of spores mL^{-1} increased as the concentration of mineral preparation decreased and at 10% slightly exceeded the control, not showing any statistical significant difference with this one. In CV, CBP and CBS although there was mycelium formation at concentrations of 10 and 20% (Table 1), there was no spore formation; this anti-sporulant effect is very important since spores are the only structures of the pathogen that can cause infection of the fruit.

In the five concentrations all mineral preparations inhibited spore germination appearing only in control with an average 3.27×10^5 germinated spore mL^{-1} , corresponding to 0.28% of the total. In *in vitro* studies, total inhibition on the germination of *M. royeri*, has been reported for a few products, including Azoxystrobin (450 ppm) a

Cuadro 2. Formación de estructuras reproductivas (esporas $\text{mL}^{-1} \times 10^6$) de *M. royeri* 13 dds, prueba de difusión en agar.
Table 2. Formation of reproductive structures (spores $\text{mL}^{-1} \times 10^6$) of *M. royeri* 13 das, agar diffusion test.

Tratamiento	Concentración del preparado mineral (v/v)				
	50% ($\bar{x} \pm \text{S.E}$)	40% ($\bar{x} \pm \text{S.E}$)	30% ($\bar{x} \pm \text{S.E}$)	20% ($\bar{x} \pm \text{S.E}$)	10% ($\bar{x} \pm \text{S.E}$)
PC	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$
SSC	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$
CV	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$
BiS	$6.4^d \pm 0.72$	$5.9^d \pm 0.3$	$40.5^c \pm 4.4$	$85.8^b \pm 2.9$	$122.6^a \pm 6.9$
CBP	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$
CBS	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$	$0^d \pm 0$
TES	$115.5^a \pm 11.3$				

Promedios con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). S.E= error estándar.

En las cinco concentraciones todos los preparados minerales inhibieron la germinación de esporas, ésta solo se presentó en el testigo con un promedio de 3.27×10^5 esporas germinadas mL^{-1} , que corresponden al 0.28% del total. En estudios *in vitro*, esta inhibición total sobre la germinación de *M. royeri*, ha sido reportada para pocos productos, entre ellos el fungicida de síntesis química Azoxystrobin (450 ppm) (Torres *et al.*, 2013) y aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Lippia citriodora* y *Lippia alba* en concentraciones de 600 a $1\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Lozada *et al.*, 2012). Dado que el tubo germinativo es la estructura encargada de penetrar e iniciar la infección del fruto, la inhibición de la germinación de las esporas es un mecanismo de acción indispensable en los productos para el control de *M. royeri*, pues impiden que las esporas depositadas en la superficie

synthetic fungicide (Torres *et al.*, 2013) and essential oils of *Lippia origanoides*, *Lippia citriodora* and *Lippia alba* in concentrations $600\text{-}1\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Lozada *et al.*, 2012). Since the germ tube is the structure responsible to penetrate and initiate infection of the fruit, the inhibition of spore germination is an essential mechanism of action on the products to control *M. royeri*, as they prevent spores in fruit to conduct the infection. Statistically there was a significant and positive correlation ($r=0.77$) between mycelial growth and spore number variables, but not between these two variables and the number of germinated spores.

Liquid medium test. The objective of this test was to establish and to prevent germination; mineral preparations are able to cause mortality to formed spores. Table 3 shows the

del fruto lleven a cabo la infección. Estadísticamente hubo una correlación positiva y significativa ($r=0.77$) entre las variables crecimiento micelial y número de esporas, pero no entre estas dos variables y el número de esporas germinadas.

Prueba en medio líquido. El objetivo de esta prueba fue establecer si además de impedir la germinación, los preparados minerales tienen la capacidad de causar mortalidad a esporas ya formadas. En el Cuadro 3 se presentan los resultados del número de esporas contabilizadas en los tubos de ensayo a las 0, 24, 48, 72 y 96 h después de inoculación. En los tratamientos SSC, PC, CBS y CBP se observó reducción en el número de esporas a medida que transcurrió el tiempo. Desde el primer conteo (hora 0) los preparados SSC y PC indujeron mortalidad de esporas, presentando diferencia estadísticamente significativa con el testigo. Esta tendencia se mantuvo en todas las horas de evaluación, llegando a ocasionar la muerte de 98.2 y 79.9% de las esporas respectivamente, a las 96 h; un valor similar es reportado por Ramírez *et al.* (2011a) para el PC que en condiciones *in vitro* redujo el número de esporas en 74.7% a las 72 h.

results of number of spores counted in the test tubes at 0, 24, 48, 72 and 96 h after inoculation. In SSC, PC, CBS and CBP treatments showed a reduction in the number of spores as time passed. From the first count (time 0) SSC and PC induced spore mortality, showing statistically significant difference to control. This trend continued at all hours, reaching 98.2 and 79.9% dead of the spores respectively, at 96 h; a similar value was reported by Ramírez *et al.* (2011a) for PC where *in vitro* conditions reduced the number of spores by 74.7% at 72 h.

CBP and CBS treatments showed an intermediate efficiency with a reduction of 45.5 and 42.8% in number of spores respectively, at 96 h; except for 0 h, on the other counts there were statistically significant difference with control. According to the results of other studies, the components of these two mineral preparations have induced the development of resistance to various fungal diseases in different crops (Tomlinson and Hunt, 1987; Huber and Wilhelm, 1988; Rouxel *et al.*, 1990) and can increase yield since these improve their nutrition. The latter effect was

Cuadro 3. Efecto de los preparados minerales sobre el número de esporas mL⁻¹ (x 10⁶) en medio líquido, en cinco momentos de observación.

Table 3. Effect of mineral preparations on the number of spore mL⁻¹ (x 10⁶) in liquid medium during five observation times.

Tratamiento	Hora de observación				
	0 h ($\bar{x} \pm S.E$)	24 h ($\bar{x} \pm S.E$)	48 h ($\bar{x} \pm S.E$)	72 h ($\bar{x} \pm S.E$)	96 h ($\bar{x} \pm S.E$)
PC	14.3 ^a ± 0.9	10.3 ^b ± 0.7	5.0 ^a ± 0.7	4.6 ^a ± 0.4	5.2 ^b ± 0.3
SSC	12.8 ^a ± 0.4	6.1 ^a ± 0.7	2.5 ^a ± 0.2	0.7 ^a ± 0.0	0.5 ^a ± 0.0
CV	24.0 ^b ± 0.6	20.8 ^{cde} ± 1.3	26.0 ^c ± 1.7	26.7 ^c ± 2.0	24.3 ^d ± 1.8
BiS	22.6 ^b ± 0.3	22.3 ^{de} ± 0.9	22.8 ^c ± 1.6	26.9 ^c ± 0.6	25.1 ^d ± 0.3
CBP	23.9 ^b ± 0.5	19.1 ^{cd} ± 0.4	15.4 ^b ± 0.3	15.0 ^b ± 0.2	14.0 ^c ± 0.3
CBS	23.0 ^b ± 0.6	18.1 ^c ± 0.4	17.0 ^b ± 0.2	18.8 ^b ± 0.4	14.7 ^c ± 0.2
TES	23.4 ^b ± 0.2	23.7 ^c ± 0.5	24.2 ^c ± 0.4	25.7 ^c ± 0.3	25.7 ^d ± 0.1

Promedios con la misma letra en la misma columna, no presentan diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). SE= error estándar.

Los tratamientos CBP y CBS mostraron una eficacia intermedia, llegando a reducir el número de esporas en 45.5 y 42.8% respectivamente, a las 96 h; con excepción de las 0 h, en los demás conteos presentaron diferencia estadísticamente significativa con el testigo. De acuerdo con los resultados de otros estudios, los componentes de estos dos preparados minerales han inducido el desarrollo de resistencia hacia varias enfermedades fungosas en diferentes cultivos (Tomlinson y Hunt, 1987; Huber y Wilhelm, 1988; Rouxel *et al.*, 1990) y pueden incrementar el rendimiento pues mejoran su nutrición. Este último efecto fue reportado por Siller (1958), en un estudio sobre control

reported by Siller (1958), in a study of disease control in cacao indicating that the application of Bordeaux mixture had on average 53 healthy fruit per tree per year, whereas when added zinc sulphate this number increased to 61 fruits, attributing the increase to correction in a deficiency of zinc. Considering these results it is suggested to evaluate CBP and CBS against *M. roreri* under field conditions.

The BiS and CV treatments showed a very low or no effect or even in a few hours the number of spores was slightly higher than control but without statistical significant differences with it. These results along with those from the agar diffusion

de enfermedades en cacao indica que con la aplicación de caldo bordelés se obtuvo un promedio de 53 frutos sanos por árbol al año, mientras que al adicionarle sulfato de zinc este número se elevó a 61 frutos, atribuyendo dicho incremento a la corrección de una deficiencia de zinc. Tomando en cuenta estos resultados se sugiere evaluar el CBP y CBS contra *M. royeri* en condiciones de campo.

Los tratamientos BiS y CV mostraron un efecto muy bajo o nulo e incluso en algunas horas el número de esporas fue ligeramente superior al testigo, aunque sin presentar diferencias estadísticamente significativas con éste. Estos resultados en conjunto con los de la prueba de difusión en agar indicarían un efecto fungistático más no fungicida por parte de estos dos preparados minerales. En relación con el número de esporas germinadas, solo se presentaron en el testigo, alcanzando un valor máximo de 14.2×10^4 a las 48 h. Se ratifican así los resultados obtenidos en la prueba de difusión en agar, respecto a la inhibición total que ejercen los cinco preparados sobre la germinación de las esporas.

Acerca de los mecanismos de acción de los preparados minerales sobre el patógeno, complementario a la inhibición de la esporulación y formación de micelio que se observó en la prueba de difusión en agar, durante la prueba en medio líquido fue posible observar inhibición de la germinación de esporas y muerte causada por el rompimiento de las paredes celulares (Figura 2a) y deshidratación (Figura 2b). A nivel *in vitro* y en campo se han documentado estos mismos efectos sobre diferentes fitopatógenos para varios de los elementos y compuestos que componen los seis preparados minerales: bicarbonato de sodio (Yildirim *et al.*, 2002), azufre (Khan y Kulshrestha, 1991; Williams *et al.*, 2002; Williams y Cooper, 2004), polisulfuro de calcio (Montag *et al.*, 2005; Holb y Schnabel, 2008; Ramírez *et al.*, 2011a) y sulfato de cobre (Mills *et al.*, 2004; Montag *et al.*, 2006), entre otros. Por otra parte, es conocido que algunos de estos minerales inducen resistencia en las plantas, lo cual puede reducir la incidencia y severidad del daño en campo. En el caso del caldo silicosulfocálcico, uno de sus componentes es la ceniza vegetal que contiene cantidades variables de silicio, la inducción de resistencia por este elemento ha sido ampliamente documentada en diversos cultivos (Chérif *et al.*, 1994; Fauteux *et al.*, 2005; Qin y Tian, 2005).

La moniliasis constituye el principal problema fitosanitario que enfrenta la producción de cacao en Centro y Sur América, causando un alto impacto socioeconómico y ambiental; atendiendo al hecho de que en esta región se encuentran

test would indicate a fungistatic effect but not fungicidal on behalf of these two mineral preparations. Regarding the number of germinated spores, only in the control was present, reaching a maximum value of 14.2×10^4 at 48 h. The results obtained in the agar diffusion test are ratified, regarding to the total inhibition that five mineral preparations exert on spores germination.

About the mechanisms of action of mineral preparations on the pathogen, complementary to the inhibition of sporulation and mycelial formation that was observed in the agar diffusion test, during the liquid medium test it was possible to observe inhibition of spore germination and death caused by the breaking of cell walls (Figure 2a) and/or dehydration (Figure 2b). *In vitro* and field level have been documented the same effects on different phytopathogenic for various elements and compounds that compose the six mineral preparations: Sodium bicarbonate (Yildirim *et al.*, 2002), sulfur (Khan and Kulshrestha, 1991; Williams *et al.*, 2002; Williams and Cooper, 2004), calcium polysulfide (Montag *et al.*, 2005; Holb and Schnabel, 2008; Ramirez *et al.*, 2011a) and copper sulfate (Mills *et al.*, 2004; Montag *et al.*, 2006), among others. Moreover, it is known that some of these minerals induce resistance in plants, which can reduce the incidence and severity of damage in the field. In the case of broth silicosulfocalcico, one of its components is vegetable ash containing variable amounts of silicon the induction of resistance by this element has been extensively documented in different crops (Cherif *et al.*, 1994; Fauteux *et al.*, 2005; Qin and Tian, 2005).

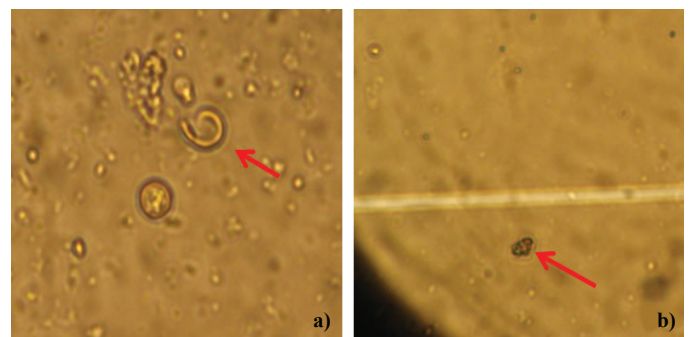


Figura 2. Dos de los efectos ejercidos por los preparados minerales sobre esporas de *M. royeri*. a) Degradación de la pared celular, causada por el SSC a las 48 h.; y b) Espora deshidratada, 48 h después de su exposición al tratamiento CBP.

Figure 2. Two of the exerted effects by mineral preparations on *M. royeri* spores. a) Degradation of the cell wall caused by SSC at 48 h; and b) dehydrated spore, 48 h after exposure to CBP treatment.

los materiales genéticos de mayor calidad para la industria chocolatera, es muy importante desarrollar una oferta tecnológica de bajo impacto ambiental para el manejo de esta enfermedad. El uso de fungicidas de síntesis química no ha mostrado resultados contundentes, en algunos casos atribuibles al escaso control del hongo y en otros a una relación beneficio/costo desfavorable para el productor, sobre todo en plantaciones con baja productividad; a lo anterior se suma la contaminación ambiental que estos productos ocasionan, por lo cual no son permitidos dentro de los sistemas de producción orgánica.

A causa de esta situación y teniendo en cuenta el incremento en la demanda de cacao orgánico, en años recientes se viene enfatizando la búsqueda de alternativas de bajo impacto ambiental, tales como el uso de organismos antagonistas (Bailey *et al.*, 2008; Melnick *et al.*, 2011), extractos vegetales (Ramírez *et al.*, 2011b; Lozada *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2013) y en menor medida, aunque no de menor potencial, los preparados a base de minerales (Krauss *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2011a).

La eficacia de estos últimos sobre diversos patógenos motivó su evaluación para el control de la moniliasis y los resultados presentados demuestran que el PC y el SSC son productos promisorios, que requieren ser validados en condiciones de campo. Es de resaltar que estos dos productos se elaboran con materiales accesibles y de bajo costo: cal y azufre y ceniza vegetal, lo cual incrementa las posibilidades de adopción de estas tecnologías por parte de pequeños cacaocultores.

Conclusiones

El caldo silicosulfocálcico y el polisulfuro de calcio causaron la mayor mortalidad de esporas e inhibición del crecimiento micelial y de la formación y germinación de esporas de *M. roreri in vitro*, superando resultados obtenidos con productos de síntesis química en otros estudios.

El caldo bordelés complementado con permanganato de sodio o con sulfato de zinc y sulfato de magnesio, aunque inferiores en eficacia al caldo silicosulfocálcico y al polisulfuro de calcio, ejercen inhibición sobre el crecimiento, esporulación y germinación de esporas de *M. roreri in vitro*.

Thrush is the main phytosanitary problem facing cocoa production in Central and South America, causing a high socioeconomic and environmental impact; considering the fact that in this region are the genetic materials of higher quality for chocolate industry, is very important to develop a technology with low environmental impact to control this disease. The use of synthetic fungicides has not shown dramatic results, in some cases attributable to poor control of fungus and other cases to an unfavorable benefit/cost ratio to the producer, especially in plantations with low productivity; added to these are environmental contamination that these products cause, so they are not allowed in organic production systems.

Due to this situation and taking into account the increased demand for organic cocoa in recent years has been emphasized the need to search for alternatives with low environmental impact, such as the use of antagonistic organisms (Bailey *et al.*, 2008; Melnick *et al.*, 2011), plant extracts (Ramírez *et al.*, 2011b; Lozada *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2013) and to a lesser extent, but not with least potential, mineral preparations (Krauss *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2011a).

The effectiveness of the latter on various pathogens motivated its evaluation to control thrush and the results show that PC and SSC are promising products that need to be validated under field conditions. It is noteworthy that these two products are elaborated with accessible and inexpensive materials: lime sulfur and ash plant, which increases the probabilities of adoption of these technologies by smallholder cocoa farmers.

Conclusions

The broth silicosulfocalcico and calcium polysulfide caused the highest mortality of spores and inhibition of mycelial growth and spore formation and spore germination of *in vitro M. roreri*, surpassing results obtained with synthetic products in other studies.

Bordeaux mixture supplemented with sodium permanganate or zinc sulfate and magnesium sulfate, although inferior in effectiveness to broth silicosulfocalcico and calcium polysulfide, exert inhibition on growth, sporulation and spore germination of *in vitro M. roreri*.

Se observaron cuatro mecanismos de acción antifúngica de los preparados minerales sobre *M. roreri*: a) inhibición de la formación y crecimiento de micelio; b) inhibición de la formación de esporas; c) inhibición de la germinación de esporas; y d) muerte de las esporas ocasionada por deshidratación y degradación de la membrana celular, con la consecuente lisis.

Four antifungal mechanisms of action were observed in the mineral preparations on *M. roreri*: a) inhibition of mycelium formation and growth; b) inhibition of spore formation; c) inhibition of spore germination; and d) spore death caused by dehydration and degradation of cell membrane, with consequent lysis.

End of the English version



Literatura citada

- Adejumo, T. 2005. Crop protection strategies for major diseases of cocoa, coffee and cashew in Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 4(2):143-150.
- Bailey, B.; Bae, H.; Strem, M.; Crozier, J.; Thomas, S.; Samuels, G.; Vinyard, B. and Holmes, K. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control.* 46:24-35.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 2010. Estudio de mercado cacao amigable con la biodiversidad de Centroamérica. Costa Rica. 198 p.
- Chérif, M.; Asselin, A. and Bélanger, R. 1994. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Phytophthora* spp. *Mol. Plant Pathol.* 84(3):236-242.
- Deliopoulos, T.; Kettlewell, P. and Hare, M. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. *Crop Protection.* 29:1059-1075.
- Dessalegn, Y.; Ayalew, A. and Woldetsadik K. 2013. Integrating plant defense inducing chemical, inorganic salt and hot water treatments for the management of postharvest mango anthracnose. *Postharvest Biol. Technol.* 85:83-88.
- Dik, A.; van der Gaag, D. and van Slooten, M. 2003. Efficacy of salts against fungal diseases in glasshouse crops. *Comm. Agric. Appl. Biol. Sci.* 68(4):475-485.
- Fauteux, F.; Rémus, W.; Menzies, J. and Bélanger, R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters.* 249(1):1-6.
- Hislop, E. 1963. Studies on the chemical control of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. on *Theobroma cacao* L. in Nigeria. *Ann. Appl. Biol.* 52(3):465-480.
- Holb, I. and Schnabel, G. 2008. A detached fruit study on the post-inoculation activity of lime sulfur against brown rot of peach (*Monilinia fructicola*). *Australasian Plant Pathol.* 37:454-459.
- Huber, D. and Wilhelm, N. 1988. The role of manganese in resistance to plant diseases. *In: manganese in soils and plants.* Graham, R.; Hannam, R. and Uren, N. (Eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 155-173 pp.
- Jaimes, Y. y Aranzazu, F. 2010. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Colombia. 90 p.
- Jamar, L.; Cavelier, M. and Lateur, M. 2010. Primary scab control using a "during-infection" spray timing and the effect on fruit quality and yield in organic apple production. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(3):423-439.
- Khan, M. and Kulshrestha, M. 1991. Impact of sulphur dioxide exposure on conidial germination of powdery mildew fungi. *Environ. Pollution.* 70(1):81-88.
- Krauss, U.; Hoopen, M.; Hidalgo, E.; Martínez, A.; Arroyo, C.; García, J.; Portuquez, A. y Sánchez, V. 2003. Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas.* 10(37-38):52-58.
- Krauss, U.; Hidalgo, E.; Bateman, R.; Adonijah, V.; Arroyo, C.; García, J.; Crozier, J.; Brown, N.; ten Hoopen, M. and Holmes, K. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biological Control.* 54:230-240.
- López, O.; Ramírez, S.; González, O.; Ramírez, M., Lee, V.; Méndez, J.; Alvarado, A. y Gehrke, M. 2006. Diagnóstico y técnicas para el manejo de la moniliasis del cacao. Universidad Autónoma de Chiapas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Fundación Produce Chiapas. 40 p.
- Lozada, B.; Herrera, L.; Perea, J.; Stashenko, E. y Escobar, P. 2012. Efecto *in vitro* de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.*, agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agron.* 61(2):102-110.
- Melnick, R.; Suárez, C.; Bailey, B. and Backman, P. 2011. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biol. Control.* 57:236-245.
- Mills, A.; Platt, H. and Hurt, R. 2004. Effect of salt compounds on mycelial growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. *Postharvest Biol. Technol.* 34:341-350.
- Montag, J.; Schreiber, L. and Schönherr, J. 2005. An *in vitro* study on the postinfection activities of hydrated lime and lime sulphur against apple scab (*Venturia inaequalis*). *J. Phytopathol.* 153(7-8):485-491.
- Montag, J.; Schreiber, L. and Schönherr, J. 2006. An *in vitro* study of the nature of protective activities of copper sulphate, copper hydroxide and copper oxide against conidia of *Venturia inaequalis*. *J. Phytopathol.* 154(7-8):474-481.
- Phillips, W.; Castillo, J.; Krauss, U.; Rodríguez, E. and Wilkinson, M. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathol.* 54:483-490.
- Qin, G. and Tian, S. 2005. Enhancement of biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* by silicon and the possible mechanisms involved. *Biol. Control.* 95(1):69-75.

- Quevedo, I. 2012. Evaluación de fungicidas sistémicos y de contacto en el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados, México. 72 p.
- Ramírez, S.; López O.; Guzmán, T.; Munguía, S. y Moreno, J. 2011a. El polisulfuro de calcio en el manejo de la moniliasis *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans *et al.* del cacao *Theobroma cacao* L. *Tecnología en Marcha*. 24(4):10-18.
- Ramírez, S.; López, O.; Guzmán, T.; Munguía, S. y Espinosa, S. 2011b. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans *et al.* *Tecnología en Marcha*. 24(2):3-17.
- Ramírez, S.; López, O.; Guzmán, T.; Munguía, S.; Moreno, J. y Espinosa, S. 2013. Biofungicidas de origen vegetal una alternativa para el manejo de la moniliasis del cacao en México. *In: Memorias VII Congreso de la Red Latinoamericana de Ciencias Ambientales*. San Carlos, Costa Rica. 46 p.
- Reglamento (CE). 2007. Número 834-2007 del consejo, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos. Consejo de la Unión Europea. Diario Oficial de la Unión Europea. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/es/all/?uri=celex:32007r0834>.
- Restrepo, J. 2007. Manual práctico el A, B, C de la agricultura orgánica y harina de rocas. 1ª (Ed.). Servicio de Información Mesoamericano sobre Agricultura Sostenible -SIMAS. Nicaragua. 262 p.
- Reuveni, M. and Reuveni, R. 1995. Efficacy of foliar application of phosphates in controlling powdery mildew fungus on field-grown winegrapes: effects on cluster yield and peroxidase activity in berries. *J. Phytopathol.* 143:21-25.
- Rouxel, T.; Kollmann, A. and Bousquet, J. 1990. Zinc suppresses sirodesmin PL toxicity and protects *Brassica napus* plants against the blackleg disease caused by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Sci.* 68(1):77-86.
- Siller, L. 1958. Effect on cacao of urea, zinc and bordeaux mixture foliar sprays. The 7th Inter-American Cacao Conference. Colombia. 187-91 pp.
- Soberanis, W.; Ríos, R.; Arevalo, E.; Zuñiga, L.; Cabezas, O. and Krauss, U. 1999. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. *Crop Protection*. 18:677- 685.
- The International Cocoa Organization (ICCO). 2006. A study on the market for organic cocoa. Executive committee. One hundred and thirtieth meeting, London. 12 p.
- Tomlinson, J. and Hunt, J. 1987. Studies on watercress chlorotic leaf spot virus and on the control of the fungus vector (*Spongospora subterranea*) with zinc. *Ann. Appl. Biol.* 110(1):75-88.
- Torres, M.; Ortiz, C.; Téliz, D.; Mora, A. y Nava, C. 2013. Efecto del Azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la Moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Rev. Mex. Fitopatol.* 31(1):65-69.
- USDA-NOP. 2014. The National Organic Program standards of the United States Department of Agriculture. <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=497deb86f6aac6df9cf42574955a1cfb&node=7:3.1.1.9.32&rgn=div5>.
- Williams, J.; Hall, S.; Hawkesford, M.; Beale, M. and Cooper R. 2002. Elemental sulfur and thiol accumulation in Tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiol.* 128(1):150-159.
- Williams, J. and Cooper, R. 2004. The oldest fungicide and newest phytoalexin –a reappraisal of the fungitoxicity of elemental sulphur. *Plant Pathol.* 53:263-279.
- Yildirim, I.; Onogur, E. and Irshad, M. 2002. Investigations on the efficacy of some natural chemicals against Powdery Mildew [*Uncinula necator* (Schw.) Burr.] of Grape. *J. Phytopathol.* 150(11-12):697-702.