COMPARACIÓN DEL EFECTO DE TRES MÉTODOS DE BIOCONTROL SOBRE PATÓGENOS DEL CACAO (*Theobroma cacao)* AISLADOS EN EL DEPARTAMENTO NORTE DE SANTANDER

JESSICA LISETH JAIMES URBINA

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2016

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE TRES MÉTODOS DE BIOCONTROL SOBRE PATÓGENOS DEL CACAO (*Theobroma cacao)* AISLADOS EN EL DEPARTAMENTO NORTE DE SANTANDER

JESSICA LISETH JAIMES

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL

TÍTULO DE MICROBIÓLOGA

Director

Raquel Amanda Villamizar Gallardo, MSc. PhD.

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2016

DEDICATORIA

A Dios.

Porque todo lo que hago, lo hago para el Señor. A El por permitirme alcanzar mis sueños añadiendo sabiduría, e inteligencia, gracias al Todopoderoso porque cuando no tenía fuerzas, me abrió el camino y pasé. ¡Es mejor refugiarse en El que confiar en el hombre!

A mis padres.

Javier Jaimes y Maritza Urbina, por su amor, trabajo y esfuerzos realizados durante todo este tiempo, porque sin ellos no hubiera sido posible este logro, por apoyarme en todo momento, por sus consejos, sus valores, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracteriza; y sobre todo por el valor mostrado para salir adelante que siempre me han infundido.

A mis Tíos

Con todo mi cariño a mis Tíos, Pilar, Magally, Armando, Ruth y Sandra por que han fomentado en mí el deseo de superación y triunfo en la vida, por su aliento para alcanzar los objetivos propuestos, por su constante motivación, y por estar ahí siempre que los he necesitado. Por brindarme su confianza y creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a Dios porque su infinito amor me ha alcanzado y porque me ha permitido alcanzar mis sueños añadiendo sabiduría, inteligencia y la fe para creer lo que por algunos momentos me parecía imposible terminar. Su presencia me ha sostenido y su gracia me ha permitido llegar a este punto. Gracias al todo poderoso porque cuando no tenía fuerzas, me abrió el camino y pasé. *¡Es mejor refugiarse en El, que confiar en el hombre!*

A la Universidad de Pamplona, y al programa de Microbiología por que fue el cimiento para la construcción de mi vida profesional, por brindarme la oportunidad de estudiar y ser un profesional íntegro y con valores.

Agradezco a mi directora de Tesis la Doctora Raquel Amanda Villamizar por su esfuerzo y dedicación, por despertar en mí el espíritu investigador y facilitar este caminar en la dinámica del pensamiento científico, gracias por compartir sus conocimientos, y su experiencia tanto a nivel profesional como personal porque más que las muchas palabras han sido ejemplo de vida para mí.

También agradezco al profesor Enrique Cabeza, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a Él ante la solución de los problemas presentados durante el desarrollo del trabajo, gracias por sus conocimientos por sus consejos, y su enseñanza.

TABLA DE CONTENIDO

Pág

INTRODUCCION
1. OBJETIVOS 12
1.1. Objetivo general 12
1.2. Objetivos Específicos: 12
2. JUSTIFICACION 13
3. MARCO REFERENCIAL 14
3.1 MARCO LEGAL 14
3.1.1. DECRETO 2266 DE 2004. 14
3.1.2. DECRETO 3553 DE 2004. 14
3.1.3. RESOLUCIÓN 5107 de 2005. 14
3.1.4. RESOLUCIÓN 698 de 2011 Instituto Colombiano Agropecuario – ICA. 14
3.1.5. RESOLUCIÓN 2674 DE 2013 14
3.1.6. Protocolo de Cartagena 15
3.1.7. Recomendación de la Comisión de 17 de agosto de 2006 15
3.1.8. Reglamento 1881/2006, de 19 de Diciembre de 2006 15
3.1.9. Reglamento 401/2006, de 23 de Febrero de 2006, ... 15
3.2. MARCO TEÓRICO 15
3.2.1. *Theobroma cacao* 15
3.2.2. Situación actual del cacao en Colombia 17
3.2.3. Enfermedades del cacao 18
3.2.4. Métodos de control 19
3.2.4.1. Control cultural 19
3.2.4.2. Control químico 20
3.2.4.3. Control genético 20
3.2.5. Métodos de control alternativo 20
3.2.5.1. Control biológico 20
3.2.5.2. Aceites esenciales 22
3.2.5.3. Nanomateriales 22
3.3. ANTCEDENTES 23
4. METODOLOGÍA 26
4.1. Aislamientos Fúngicos 26
4.2. ENSAYO INHIBICION BIOCONTROLADORES *T. viridae y B. quercum* 27

4.2.1. Ensayos de inhibición con hongos antagonistas en medio de cultivo ...27
4.2.2. Ensayo de inhibición con hongos antagonistas en planta 27
4.3. ENSAYO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....28
4.3.1. Biosíntesis de verde de AgNPs usando cáscara de cacao. 28
4.3.1.1. Preparación del extracto cáscara de cacao.....28
4.3.1.2. Síntesis de AgNPs a partir de vainas de cacao y caracterización.....28
4.3.2. Ensayos de inhibición con AgNPs en medio de cultivo. 29
4.3.3. Ensayos de inhibición con AgNPs en planta. 29
4.4. ENSAYO CON ACEITES ESENCIALES 29
4.4.1. Obtención de aceites esenciales.....29
4.4.2. Ensayo de inhibición de aceites esenciales en medio de cultivo.....31
4.4.3. Ensayo de inhibición de aceites esenciales en planta.....32
4.4.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para aceites esenciales.....32
4.5. ANÁLISIS ESTADISTICO.....32
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....34
6. RESULTADOS Y DISCUSION 35
6.1. ENSAYO DE INHIBICIÓN CON BIOCONTROLADORES *T. viride* y *B. quercum*.....35
6.1.1. Ensayo de inhibición con biocontroladores en medio de cultivo.....35
6.1.2. Ensayo de inhibición con biocontroladores en planta.....36
6.2. ENSAYO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP) 38
6.2.1. Ensayos de inhibición con AgNPs en medio de cultivo. 39
6.2.2. Ensayos de inhibición con AgNPs en planta. 42
6.3. ENSAYO CON ACEITES ESENCIALES 43
6.3.1. Ensayo de inhibición con AEs en medio de cultivo.....43
6.3.2. Ensayo de inhibición con AEs en planta.....47
6.3.3. Rango de concentraciones para aceites esenciales con mayor actividad fungicida.....50
6.4. ANALISIS ESTADISTICO.....51
7. CONCLUSIONES 56
8. RECOMENDACIONES.....57
9. GLOSARIO 58
10. BIBLIOGRAFIA.....59
11. ANEXOS.....66

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Primer β-tubulina y la región ITS empleados para la caracterización de hongos biocontrol aislados de cultivos de cacao en el suelo. 27
Tabla 2. Aceites esenciales provenientes de plantas y sus compuestos antimicrobianos. 30
Tabla 3. Velocidades de crecimiento para los tres patógenos del cacao bajo tratamiento con nanopartículas de plata en los medios de cultivo PDA y Sabouraud (Sab). 40
Tabla 4. Análisis de Varianza para Vmax en función del medio de cultivo, fitopatógeno y tratamiento.....41
Tabla 5. Velocidad máxima promedio del crecimiento de *M. roreri* en medio PDA y Sabouraud para cada uno de los aceites esenciales que no mostraron actividad fungicida.....44
Tabla 6. Velocidad máxima promedio del crecimiento de *A. flavus* en medio PDA y Sabouraud para cada uno de los aceites esenciales que no mostraron actividad fungicida.....45
Tabla 7. Velocidad máxima promedio del crecimiento de *F. solani* en medio PDA y Sabouraud para cada uno de los aceites esenciales que no mostraron actividad fungicida.....46
Tabla 8. Sensibilidad antifungica ante aceites esenciales de diferentes especias herbáceas y frutales.....50
Tabla 9. Análisis de Varianza para Velmax en función del aceite esencial, fitopatógenos y medio. 51
Tabla 10. Valores medios para velocidad de crecimiento en función de los factores evaluados, con intervalos de confianza del 95% 51
Tabla 11. Ventajas y desventajas del tratamiento con hongos antagonistas, AgNPs, y aceites esenciales como agentes control biológico.....54

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Estadísticas que muestran producción mundial de cacao. 17
Figura 2. Micotoxinas asociadas a fitopatógenos.....22
Figura 3. Colores que toma una suspensión coloidal de nanopartículas de plata de diversos tamaños <30nm y formas (esfera, varilla, triángulo, galleta en diferentes proporciones. 23
Figura 4. Ensayo dual con los biocontroladores *Trichoderma viride* y *Botryosphaeria quercuum* versus patógenos del cacao 35
Figura 5. Pruebas sobre la corteza y el fruto de cacao utilizando hongos antagonistas.....37
Figura 6. Síntesis de nanopartículas de plata a partir de extracto de cacota. Se evidencia el cambio de coloración de la suspensión pasados 50 minutos de reacción de la solución de corteza con AgNO3 a una concentración 1 mM. 38
Figura 7. Espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata obtenidas usando extracto de cacota de cacao como agente reductor. 39
Figura 8. Ensayo de difusión con Nanopartículas de plata en medio PDA 40
Figura 9. Ensayo de inhibición sobre pulpa y corteza de cacao modificada con diferentes concentraciones de AgNPs 42
Figura 10. Ensayo de difusión en placa con aceites esenciales frente a *M. roreri* 44
Figura 11. Ensayo de difusión en placa con aceites esenciales frente a *A. flavus*45
Figura 12. Ensayo de difusión en placa con aceites esenciales frente a *Fusarium solani* 46
Figura 13. Ensayo de inhibición en planta con aceites esenciales frente a *Moniliophthora roreri* sobre corteza de cacao 48
Figura 14. Ensayo de inhibición en planta con aceites esenciales frente a *Aspergillus flavus* sobre corteza de cacao 48
Figura 15. Ensayo de inhibición en planta con aceites esenciales frente a *Fusarium solani* sobre corteza de cacao.....49
Figura 16. Gráfica de medias e intervalos de incertidumbre del 95% de HSD Tukey para la velocidad de crecimiento con cada aceite probado. 52
Figura 17. Gráfica de medias e intervalos de incertidumbre del 95% de HSD Tukey para la velocidad de crecimiento con cada fitopatógenos evaluado.....53
Figura 18. Gráfica de medias e intervalos de incertidumbre del 95% de HSD Turkey para la velocidad de crecimiento en cada medio de cultivo evaluado.....53

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Registro fotográfico de la capacitación a cacaocultores en la Federación Nacional de Cacaoteros FEDECACAO (Cúcuta Norte de Santander).....66

Anexo 2. Socialización de resultados de la Investigación en la III Semana Internacional XI semana de ciencia, tecnología e innovación en la Universidad Francisco de Paula Santander. 67

INTRODUCCION

El cacao (*Theobroma cacao L*.) es un árbol tropical del cual se obtienen las semillas productoras de chocolate y sus derivados, que constituye el tercer producto agrícola más importante en los países tropicales, después del té y el café. El consumo en Colombia principalmente se hace como chocolate de mesa, aunque también es utilizado como materia prima para confitería, productos farmacéuticos y cosméticos (Oliveros *et al*., 2013). Tiene su origen en la cuenca alta del río Amazonas, en un triángulo formado entre Colombia, Ecuador y Perú. Tuvo su apogeo cultural con los aztecas en Centroamérica y posteriormente fue llevado a Europa donde finalmente se masificó su consumo (Valenzuela *et al.*, 2012).

Colombia es un país con condiciones agroecológicas óptimas y excelentes materiales genéticos para la producción de Cacao Fino de Sabor y Aroma (CFA), siendo considerado centro de origen del género *Theobroma cacao L*, una de las bases genéticas más amplias y diversas del mundo (Martinez, 2015). Estas ventajas permitieron que su explotación fuera incluida dentro de los 10 renglones exportables que el gobierno nacional había definido a través del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural para apoyar el desarrollo del campo (FEDECACAO, 2012).

A pesar de la claridad que existe actualmente sobre la competitividad y la generosidad del cultivo del Cacao, su producción ha decaído debido a problemas fitosanitarios, cambios en las condiciones de clima, la poca renovación de plantas, entre otros factores. La Organización Internacional del Cacao (ICCO, 2013) predijo que para el año cacaotero 2015/2016 habría un déficit mundial de 180.000 toneladas y esa tendencia podría mantenerse en los próximos años teniendo en cuenta que la demanda crece a un ritmo mayor que la oferta. En el departamento Norte de Santander específicamente, se presentó una reducción en la producción en un 19 % el último año (FEDECACAO, 2015).

Dentro de los principales problemas fitosanitarios que afectan la productividad del cacao se encuentran la incidencia de hongos patógenos. En el año 2014, el principal problema del cultivo de cacao fue la enfermedad Moniliasis (Reyes, 2016), producida por el hongo *Moniliophthora roreri* reportado en 13 países de las Américas (Phillips *et al*., 2012), con pérdidas estimadas en 80% de la cosecha anual.

Por otra parte, varios estudios han demostrado la presencia de hongos micotoxigénicos los cuales adicional al deterioro que ocasionan a las mazorcas pueden llegar a generar toxinas que permanecen en el producto una vez procesado, convirtiéndose en un problema a nivel de salud pública. En este sentido, una de las

especies más frecuentes es especies de *Aspergillus spp,* el cual puede potencialmente producir ocratoxinas, y aflatoxinas (Amézqueta, 2008), que por su toxicidad pueden tener efecto carcinogéncio (Nguyen, *et al* 2016).

En mazorcas necróticas es común la presencia del hongo *Fusarium spp.* (Maridueña, 2010), el cual se caracteriza por la producción de fumonisinas. Al igual que otros carcinógenos, es casi imposible eliminarlas completamente de los alimentos mediante su procesamiento, por esta razón se sugiere que los niveles en los alimentos sean lo más bajos tecnológicamente posible.

Las alternativas estudiadas para el control de enfermedades están basadas en un manejo cultural, y el control químico (Serna, 2013). Sin embargo, la baja efectividad y las prácticas inadecuadas en manejos agro-culturales por parte de los cacaoteros no han permitido obtener resultados efectivos. Por tal motivo, a la fecha, aún se carece de métodos eficaces de control de patógenos en el cultivo de cacao.

En esta investigación se pretendía comparar la eficiencia de tres métodos diferentes de control antimicrobiano basados en el uso de microrganismos biocontroladores autóctonos del cultivo del cacao (*Trichoderma viride y Botryosphaeria quercuum*), aceites esenciales (productos naturales derivados de plantas), y finalmente el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas biotecnológicamente a partir de cacota de cacao, como estrategias alternativas para controlar el crecimiento de los patógenos *Moniliopthora roreri*, *Aspergillus flavus*, y *Fusarium solani,* patógenos muy frecuentes del cultivo del cacao en el departamento Norte de Santander.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

- ✓ Comparar el efecto de tres métodos de biocontrol sobre hongos patógenos del cacao (*Theobroma cacao*) aislados en el departamento Norte de Santander a nivel *in vitro.*

1.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Evaluar el efecto fungicida de hongos biocontroladores como *Trichoderma viride* y *Botryosphaeria quercuum*, sobre *Monilliophtora roreri*, *Fusarium solani*, y *Aspergillus flavus* nativos del cultivo de cacao.

- ✓ Determinar la efectividad de AgNPs sintetizadas biotecnológicamente en la reducción y/o inhibición del crecimiento de los patógenos ensayados, definiendo su acción fungicida o fungistática a nivel *in vitro*.

- ✓ Identificar la efectividad de aceites esenciales obtenidos de distintas plantas (frutales, herbáceas, y ornamentales) y especias frente a los fitopatógenos ensayados, definiendo su acción fungicida o fungistática a nivel *in vitro*.

- ✓ Establecer rangos de concentración donde los diferentes métodos de control exhiben actividad fungicida.

2. JUSTIFICACION

El cacao es un alimento altamente nutritivo y que se posiciona en el tercer lugar después del azúcar y el café. El cacao colombiano perfila como un producto clave y con una riqueza especial y diversa debido a las condiciones agroecológicas óptimas del país que incluso en el año 2011 fue declarado como fino de sabor y aroma por el International Cocoa Organization (ICCO, 2013). El país cuenta con más de 160 mil hectáreas cultivadas de cacao, localizadas en su mayoría en los departamentos de Santander, Arauca, Antioquia, Huila, Tolima y Meta, las cuales generan unos 80 mil empleos directos (FEDECACAO, 2016)

El 93% de la producción mundial de cacao se concentra en 10 países, siendo Costa de Marfil el mayor productor, aportando el 36.9% del total de producción mundial, seguido de Ghana e Indonesia. Colombia con 47.000 toneladas reportadas en 2014 aporta el 1,12% ocupando la décima posición a nivel mundial, según la Fundación Mundial del Cacao (FMC). En el 2015 según los reportes nacionales Colombia aumentó a más de 54.000 toneladas y el cultivo se consolida como un producto clave de cara al post-conflicto. Debido a la calidad del cacao nacional, en el 2015, cerca de 10.000 toneladas fueron exportadas a países como Bélgica, Suiza, España, Alemania, Estonia, Francia e Italia, (FEDECAOO, 2015). El aumento en el consumo mundial de productos derivados del cacao fino y la creciente producción nacional que hoy en día supera la demanda local, constituyen una oportunidad para los cacaocultores colombianos. De allí radica la necesidad de obtener un producto de buena calidad.

La presencia de fitopatógenos en plantaciones de cacao y la dificultad para lograr un buen control de los mismos, son una problemática real. La moniliasis es una de las principales enfermedades que afectan este cultivo y es producida por un hongo patógeno primario denominado *Moniliophthora roreri*. Además, existen patógenos secundarios, que aprovechan el estado deteriorado de las mazorcas para terminar los procesos de degradación del fruto. Dentro de este grupo se encuentran especies de *Aspergillus y Fusarium.* Estos hongos, adicionalmente, pueden llegar a generar metabolitos secundarios (micotoxinas), los cuales se han logrado identificar en el grano del después del beneficio de las cacotas.

En este sentido, existe una problemática doble asociada a los hongos patógenos del cultivo del cacao. Por una parte, estos microorganismos afectan la calidad y eficiencia del cultivo, lo cual genera grandes pérdidas a pequeñas y medianas familias que viven de su cultivo. Además, puede haber compromisos a nivel de salud pública, cuando la calidad del grano obtenido no es óptima, lo que hace generar la necesidad de encontrar métodos de control efectivo que eliminen la presencia de cualquier patógeno que pueda afectar este tipo de cultivo.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 MARCO LEGAL

3.1.1. DECRETO 2266 DE 2004. «Por el cual se reglamentan los regímenes de registros sanitarios, y de vigilancia y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéuticos».

3.1.2. DECRETO 3553 DE 2004. «Por el cual se modifica el Decreto 2266 de 2004 y se dictan otras disposiciones». Las modificaciones de las que trata la norma se refieren a las farmacopeas y textos de referencia oficialmente aceptados, clasificación de los productos fitoterapéuticos, expedición del Instrumento de Verificación de Cumplimiento de Condiciones Sanitarias por parte del Ministerio de la Protección Social, un plan gradual de cumplimiento que permita la implementación, desarrollo y aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura, BPM, acciones del Invima por incumplimiento de los fabricantes sobre BPM, controles de calidad de los productos fitoterapéuticos, pruebas de eficacia, expendio de productos fitoterapéuticos, autorización del envase, requisitos para la expedición del registro sanitario de los productos fitoterapéuticos de uso tradicional importados y autoridad sanitaria competente.

3.1.3. RESOLUCIÓN 5107 de 2005. «Por la cual se adopta el instrumento de verificación de cumplimiento de condiciones sanitarias para los laboratorios que elaboren productos fitoterapéuticos».

3.1.4. RESOLUCIÓN 698 de 2011 Instituto Colombiano Agropecuario – ICA. El cual posee 19 artículos**,** por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones.

Artículo 1°. Objeto. Establecer los requisitos para el registro y control de las personas que produzcan, produzcan por contrato, importen y/o realicen ensayos de eficacia, así como para el registro de los bioinsumos de uso agrícola.

3.1.5. RESOLUCIÓN 2674 DE 2013 (Julio 22) Por la cual se reglamenta el artículo 126 del Decreto-ley 019 de 2012 y se dictan otras disposiciones**.** El artículo 126 del Decreto-ley 019 de 2012, establece que los alimentos que se fabriquen, envasen o importen para su comercialización en el territorio nacional, requerirán de notificación sanitaria, permiso sanitario o registro sanitario, según el riesgo de estos productos en salud pública, de conformidad con la reglamentación que expida el Ministerio de Salud y Protección Social.

Que conforme con lo anterior, se hace necesario establecer los requisitos y condiciones bajo las cuales el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima), como autoridad sanitaria del orden nacional, deberá expedir los registros, permisos o notificaciones sanitarias. Notificada a la Organización Mundial del Comercio (OMC), mediante los documentos identificados con las signaturas G/SPS/N/COL/249 y G/TBT/N/COL/191 del 19 y 20 de marzo de 2013.

3.1.6. Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica: Adoptado el 29 de enero de 2000 como un acuerdo suplementario del convenio sobre la diversidad biológica y entró en vigor el 11 de septiembre de 2003. De conformidad con el principio de precaución, el protocolo de Cartagena tiene por objeto garantizar que el movimiento transfronterizo de organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna se haga en condiciones seguras para la conservación de la biodiversidad y la salud humana (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica 2000).

3.1.7. Recomendación de la Comisión de 17 de agosto de 2006 sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal. Prevención y la reducción de las toxinas de Fusarium en los cereales y los productos a base de cereales. (Comisión de las comunidades europeas)

3.1.8. Reglamento 1881/2006, de 19 de Diciembre de 2006 de la Comisión Europea, fija el contenido máximo de determinados contaminantes en ciertos productos alimenticios, límites máximos vigentes de aflatoxinas a nivel europeo.

3.1.9. Reglamento 401/2006, de 23 de Febrero de 2006, de la Comisión, establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

3.2. MARCO TEÓRICO

3.2.1. *Theobroma cacao*

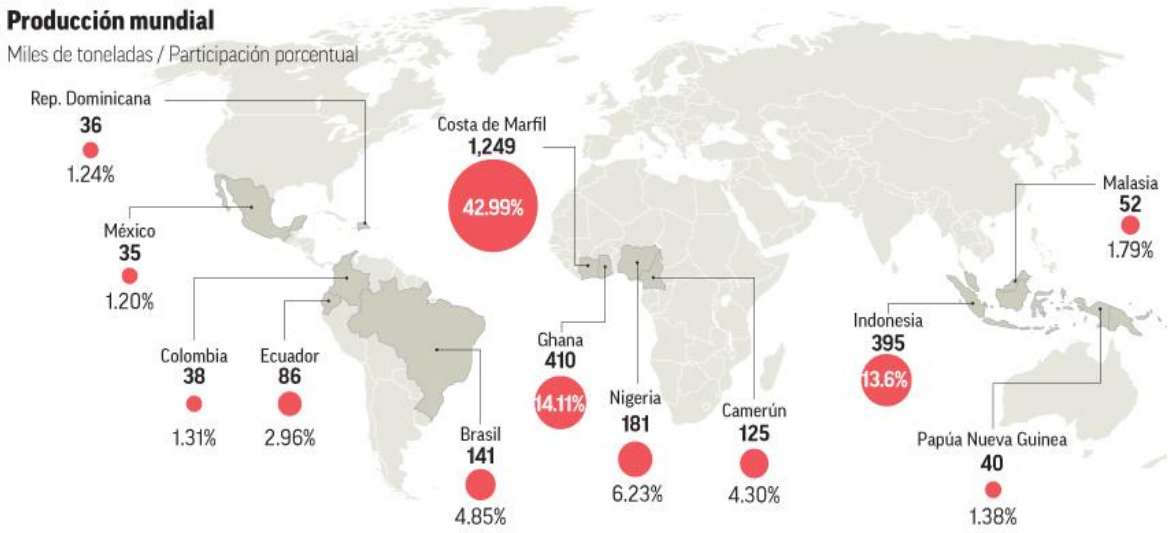
El árbol del cacao (*Theobroma cacao* L.) o cacaotero, es una planta originaria de los trópicos húmedos de América, pertenece al género taxonómico *Theobroma* que en griego significa “Alimento de los Dioses”. Se clasifica en el género *Theobroma* y pertenece a la familia Malvaceae; se han descrito cerca de 22 especies, las cuales están ubicadas principalmente en Suramérica y algunas regiones de Centroamérica. Se encuentran distribuidas hasta México las especies *Theobroma cacao* L. y *T. bicolor* humb. & Bonpl (Gelvez *et al.,* 2016) Es una planta perenne (especie grande y de larga duración que florece y produce semillas más de una vez

en su vida), que rinde varias cosechas al año, a pesar que los frutos maduran a lo largo del año, normalmente se llevan a cabo dos cosechas en un año: la cosecha principal y la cosecha intermedia. La cosecha intermedia es en general menor que la cosecha principal; sin embargo, el tamaño relativo varía dependiendo de cada país según FINAGRO. América tropical, con 12% de la producción mundial, ocupa el tercer lugar después de África (75%) y Asia (13%) en volumen de producción de cacao (Fedecacao, 2014). En Colombia, por lo general el árbol de cacao presenta picos o épocas del año de mayor producción y épocas de baja o ninguna producción, la de mayor producción empieza desde principio de Octubre y va hasta mediados de Enero. En Colombia, el cacao se cultiva en casi todo el territorio nacional, pero su cultivo se concentra básicamente en cuatro zonas agroecológicas: i) Montaña Santandereana, que comprende los departamentos de Santander y Norte de Santander. Valles interandinos secos que comprende los departamentos de Huila, sur del Tolima y norte del Magdalena. iii) Bosque húmedo tropical que comprende las zonas de Urabá, Tumaco, Catatumbo, Arauca, Meta y Magdalena y, iv) Zona Cafetera Marginal Baja: Gran Caldas, suroeste de Antioquia, y norte del Tolima.

El cacao se puede sembrar en zonas en donde las precipitaciones anuales varíen entre 1.500 y 3.800 mm, siendo el rango entre 1.800 y 2.600 mm en donde mejor se desarrolla, el rango moderadamente apto para la siembra está entre los 1.500 a los 1.800 mm y los 2.600 a los 3.200 mm, la temperatura para el cacao se encuentra entre los 18 y 32 °C, en donde las temperaturas más aptas, están entre los 24 a 28 °C y moderadamente aptas se encuentra el rango entre los 20 a 24 °C, y los 28 a 30 °C, las temperaturas menores a 18° y mayores a 32°, dificultan el desarrollo adecuado del cacao. la humedad relativa del aire puede bajar hasta un 40 a 50% sin afectar negativamente a la planta siempre y cuando haya suficiente agua en el suelo (FEDECACO, 2012).

El cacao se cultiva principalmente en África del Oeste, América Central, Sudamérica y Asia. Según la producción anual, recogida por la UNCTAD para el año agrícola 2005/06, los ocho mayores países productores del mundo son (en orden descendente) Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Brasil, Camerún, Ecuador, Malasia, Colombia y México (ver figura 1). Estos países representan el 90% de la producción mundial. Los principales productores son también los mayores exportadores, con excepción de Brasil, Malasia, cuyo consumo interno absorbe la

mayor parte de su producción. En América Latina, por ejemplo, las exportaciones de cacao se dan en Brasil y en República Dominicana.



Fuente: FAO, 2014

Figura 1. Estadísticas que muestran producción mundial de cacao.

3.2.2. Situación actual del cacao en Colombia

En Colombia, la producción de cacao por lo general presenta picos o épocas del año de mayor producción y épocas de baja o ninguna producción. Los departamentos de Santander con 22,5 %, Nariño con 14,4 %, Arauca con 6%, Antioquia con 7,5%, Huila con 5,2% y Tolima con 8,1 % representaban el 64% del área cosechada con cacao en el área rural dispersa censada. Desde hace muchos años los departamentos de Santander, Norte de Santander y el sur de Bolívar, ocupan el primer lugar como productores de cacao a nivel nacional, especialmente en la zona de los municipios de El Carmen y San Vicente de Chucurí, característicos no solo por la cantidad, sino también por la calidad.

Debido a cambios en las condiciones de clima (Fenómeno del niño y la Niña), la producción de cacao en zonas productoras se ha visto afectada (Oliveros *et al.,* 2013). En Colombia se presentó un déficit de cacao de 60.000 toneladas (Fedecacao, 2013) que no abastecieron el consumo nacional. Sin embargo, en los dos últimos años se han venido desarrollando programas de renovación, siembra nueva y planes de fertilización realizados en algunas regiones cacaoteras del país, contribuyendo a un notable crecimiento. En el 2014 se produjeron 48 mil toneladas de cacao y en el 2015 aumentó a más de 54 mil toneladas (Fedecacao, 2016). Por

ello, el cultivo se consolida como un producto clave de cara al post- conflicto el cual puede generar muchos empleos directos e indirectos que en gran medida beneficiará a la comunidad campesina del país (Superintendencia de Industria y Comercio, 2005). Según FEDECACAO 2016, el cultivo de cacao se convierte en un cultivo de economía de subsistencia, del cual el agricultor percibe aproximadamente el 75% de su ingreso.

Con respecto al precio, este producto tiene buen comportamiento y estabilidad ($3.000 el kilo en 2013, y $6.800 en 2015), gracias, entre otros factores, a las exportaciones que se vienen realizando y que llevan a que se demande el grano nacional (Sánchez, 2015).

Por último, el cultivo del cacao se encuentra en un nivel bajo de tecnología 78,27%, alrededor de un 22,87% en nivel medio y menos del 1% en un nivel de tecnología alto. En general, el agricultor solo realiza las labores básicas de recolección, control de malezas y poda (DANE, 2004).

3.2.3. Enfermedades del cacao

Aunque en el país se han ido haciendo esfuerzos por reemplazar los híbridos por clones resistentes a enfermedades. Dentro de clones implementados en plantaciones de cacao son CCN 51, ICS 95, ICS 60, IMC 67 los cuales se caracterizan por su alta tolerancia, resistencia, autocompatibilidad, autoincompatibilidad, color de la mazorca, color de la semilla y origen; ejemplo el clon CCN 51 reconocido por su alta productividad, calidad y tolerancia a las enfermedades (Delgado, 2012). En varias ocasiones los clones útiles en mejoramiento genético son autoincompatibles, incluyendo algunos de los más resistentes a enfermedades, lo cual conlleva al desarrollo de programas para lograr revertir esta situación (López *et al*., 2011).

No obstante, la mayoría de zonas cultivadas en el país presentan un alto porcentaje de híbridos y esto hace que sean más vulnerables a enfermedades ocasionadas por fitopatógenos. Es por ello que Fedecacao ha encontrado que las causas de este bajo rendimiento pueden centrarse en cuatro aspectos: la avanzada edad de las plantaciones sembradas; el tipo de material biológico sembrado, la baja densidad de árboles en producción por hectárea, y las dificultades para que el agricultor pueda poner en práctica las recomendaciones de manejo integral del cultivo (Fedecacao, 2013).

La presencia de fitopatógenos en plantaciones de cacao y la dificultad para lograr un buen control de los mismos, causan una reducción anual en la producción de estimado en más de 700.000 toneladas de grano. Una de las enfermedades más frecuentemente asociadas a este tipo de cultivo es la “Moniliasis”. En una enfermedad causada por el hongo *Monilophthora roreri* que ataca al fruto del cacao

y se caracteriza por la presencia de una mancha oscura y borde irregular en las mazorcas afectadas, que se cubren al principio de una estructura algodonosa blanca que luego se vuelve grisácea, desprendiéndose en forma de polvo. En frutos jóvenes se observan tumores antes de aparecer las manchas y una madurez prematura. Los primeros síntomas aparecen entre los 15 y 30 días después de infectarse el fruto, estos consisten en la aparición de puntos verdes oscuros que se tornan luego en manchas cafés oscuras.

Por otra parte, se muchos estudios han reportado la alta incidencia de hongos micotoxigénicos asociados al cultivo del cacao. Dentro de los hongos comúnmente encontrado se hallan especies de *Aspergillus y Fusarium,* hongos filamentosos, con potencial micotoxigénico que dejan contenidos residuales de estas moléculas incluso en el grano del cacao después del beneficio, siendo resistentes a los procesos de secado (Copetti *et al.,* 2013). Las toxinas fúngicas que más preocupan son producidas por estas especies son la aflatoxina B1 (AFB1), fumonisina B1 (FB1) y la ocratoxina A (OTA). Estas son las más tóxicas para los mamíferos, causando una variedad de efectos tóxicos, incluyendo hepatotoxicidad, teratogenicidad y la mutagenicidad, lo que resulta en enfermedades tales como la hepatitis tóxica, hemorragia, edema, la inmunosupresión, el carcinoma hepático, leucoencefalomalacia equina (LEM), cáncer de esófago e insuficiencia renal (Negedu *et al*., 2011, Anjorin *et al*., 2012).

3.2.4. Métodos de control

3.2.4.1 Control cultural

Siguiendo las recomendaciones del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), consiste en hacer podas de mantenimiento, dos veces al año, justo después de la cosecha, para incrementar el número de flores y frutos en los árboles (Jaimes y Aranzazu, 2010). De igual forma, se sugiera controlar la sombra del cultivo y remover los frutos con síntomas para su posterior incineración. El control se basa en la creación de un ambiente favorable para el árbol de cacao y desfavorable al patógeno. Si la enfermedad se detecta por primera vez en una plantación, es conveniente retirarla inmediatamente, incinerarla o enterrarla e iniciar una vigilancia rigurosa. Regular el sombrío permanente, así se obtiene una apropiada entrada de luz en la plantación y una buena cantidad de aire en circulación, favoreciendo la disminución de la humedad. Mantener un adecuado sistema de drenaje para evitar el encharcamiento del agua de las lluvias y reducir la alta humedad relativa dentro del ambiente de la plantación y mantener el ambiente más seco, evitando la condensación del rocío durante las noches (Agropecuaria, 2012).

3.2.4.2. Control químico

Los métodos tradicionales frecuentemente utilizados en Colombia, para el control de la moniliasis son los productos basados en sulfato de cobre en dosis de 2 kg/ha, lo que muestra una reducción en la incidencia de la enfermedad (Jaimes y Aranzazu, 2010). Se recomienda su aplicación en cultivos con alta densidad, periocidad semanalmente, durante tres meses, e iniciando en los picos más altos de floración. Por otro lado, los fungicidas sistémicos pueden mejorar la eficiencia en el control de *M. roreri*, pero incrementan los costos de producción (Flood y Murphy, 2004). En cultivos de alto rendimiento las aplicaciones de Bayleton en dosis de 60 ml/bomba aspersora (20L) han mostrado buenos resultados.

3.2.4.3. Control genético

La utilización de clones resistentes a enfermedades es otra medida de control muy atractiva para agricultores ya que se han logrado disminuir los costos de producción ya que se reducen el uso de fungicidas químicos contribuyendo adicionalmente con el medio ambiente. Sin embargo, el reemplazo de cultivos se da a largo plazo. Como el cacao es un cultivo perenne, para conseguir su mejoramiento genético se requiere de un tiempo relativamente prolongado, pues un solo ciclo de selección dura más de una década y muchas veces es necesario completar dos o más ciclos antes de poder liberar una nueva variedad, aún para cultivos anuales se estima un tiempo aproximado de 10 a 20 años. Fedecacao señala la selección de nuevas variedades de cacao en diferentes países dentro de proyectos de mejoramiento genético, como estrategia para incrementar la productividad y mejorar la calidad de vida de los productores. Para el 2015 en Santander, se dieron a conocer ocho nuevos materiales de siembra de cacao que son fruto de la investigación de más de diez años en fincas propias y de los agricultores de la región del Oriente Colombiano. Estos materiales tienen una productividad superior a los 1.500 kilos por hectárea, y ofrecen tolerancia a las principales plagas y enfermedades que afectan el cultivo del cacao.

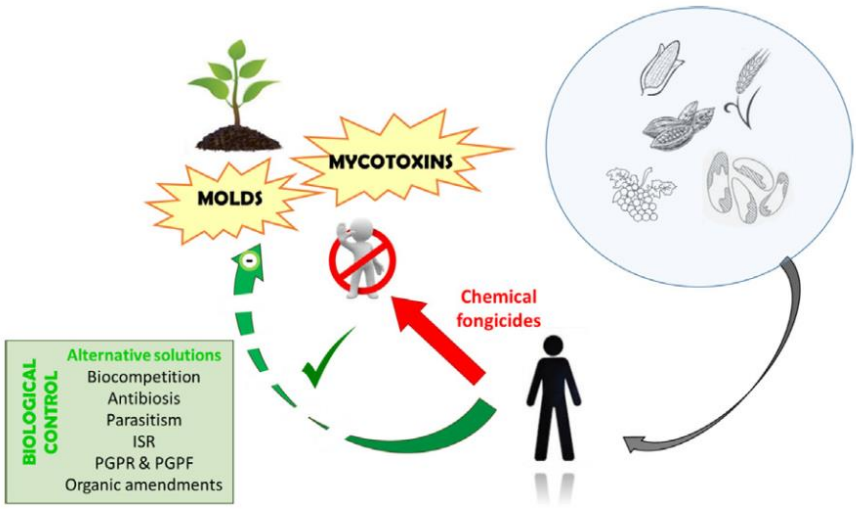
3.2.5. Métodos de control alternativo

3.2.5.1. Control biológico

Tellez y colaboradores (2009) lo define como una práctica agrícola en constante crecimiento, que busca la destrucción total o parcial de patógenos e insectos plaga frecuentemente mediante el uso de sus enemigos naturales. El control biológico con microorganismos antagonistas comenzó a ser investigado de forma constante a partir de los años 80. Dentro de los microorganismos frecuentemente empleados como controladores biológicos se encuentra *Trichoderma spp.* El género fúngico incluye un grupo de hongos que ha sido utilizado por su capacidad de parasitar una

gama amplia de fitopatógenos. Los mecanismos de biocontrol atribuidos a *Trichoderma spp.* son: micoparasitismo, competencia por los nutrientes y antibiosis, siendo el micoparasitismo el principal mecanismo de acción de este hongo. Este biocontrolador cubre al hongo, ataca y penetra en sus células causándole un daño extensivo alterando y degradando la pared celular, causa retracción de la membrana plasmática y desorganización del citoplasma. *Trichoderma spp.* también actúa mediante la producción de antibióticos, por medio de los cuales inhibe el desarrollo de otros hongos o bacterias que compiten por nutrientes y espacio. Su utilización se ve influenciada por factores tales como humedad relativa, temperatura, patogenicidad, virulencia y hospederos a los que infecta activamente. Adicional a los microorganismos antagonistas se encuentran los endófitos, los cuales tienen un potencial ampliamente reconocido como agentes de control biológico, de acuerdo a Backman y Sikora (2008) algunos hogos endófitos ejercen su actividad a través de varios mecanismos. Por ejemplo, pueden inducir resistencia sistémica en las plantas frente a patógenos, promueven la síntesis de compuestos biológicamente activos o cambios en la morfología y/o la fisiología de las plantas, otras estrategias son micoparasitismo, antibiosis, y la competencia por sustrato (Melnick *et al*., 2008). El hongo endofítico *Botryosphaeria spp*. fue uno de los empleados en este estudio. En la literatura se reporta que este tipo de microorganismos ha co-evolucionado con su hospedero, lo que hace que sean altamente efectivos y adaptables a las condiciones edafoclimáticas del cultivo (Peshin y Dhawan, 2009).

Por otro lado, dentro de las diferentes estrategias de control biológico existente también se han investigado para reducir la alta repercusión de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas (ver figura 2).



Fuente: Nguyen *et al.,* 2016

Figura 2. Micotoxinas asociadas a fitopatógenos. El control biológico de estas cepas implica múltiples mecanismos como la biocompeticion, antibiosis, parasitismo, y enmiendas orgánicas, herramientas prometedoras para la agricultura sostenible.

3.2.5.2. Aceites esenciales

Los productos naturales derivados de plantas, entre ellos los aceites esenciales (AE), son productos son mezclas complejas de compuestos orgánicos presentes en diferentes concentraciones y sus compuestos son inocuos para el medio ambiente. Los AE derivados de plantas aromáticas pertenecientes a diferentes familias, especialmente a la familia Lamiaceae, o sus componentes principales han mostrado una buena actividad contra algunas especies de hongos fitopatógenos. Aceites de las plantas de *L. alba* muestran un amplio espectro de actividades biológicas contra bacterias, hongos, parásitos, virus e insectos (Olivero *et al*., 2009).

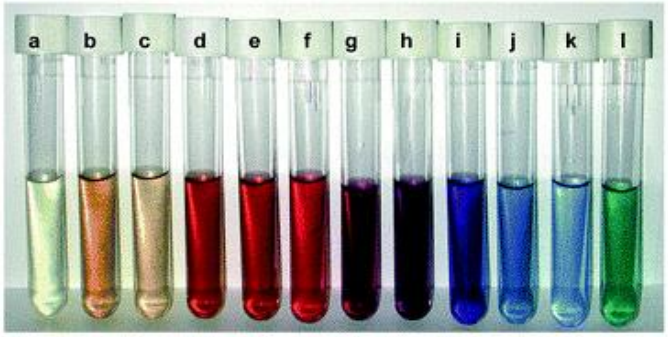
3.2.5.3. Nanomateriales

Los nanomateriales se definen como clúster de átomos con tamaños inferiores a 100 nm, producidos a través de diferentes acercamientos que implican herramientas nanotecnológicas o nanobiotecnológicas. La química verde se ha convertido en un área más amplia de la nanotecnología para una serie de razones que incluyen su bajo costo, naturaleza menos exigente y ecológica que está desprovista de uso de sustancias químicas y procedimientos peligrosos, abriendo de esta forma la posibilidad de utilizar biomoléculas de origen diverso en su síntesis.

Recientemente, se ha explorado por medio de la nanotecnología, nuevas formas para el control de patógenos ya que esta es otra de las herramientas importantes en la agricultura moderna, resaltando las nanopartículas de plata (AgNP) como uno de los pesticidas más frecuentemente utilizados (Pulit *et al.*, 2013) obteniéndose resultados positivos.

Las nanopartículas de plata AgNP se caracterizan por su su baja volatilidad, alta estabilidad, y una amplia actividad antimicrobiana de tal forma que pueden llegar a ser utilizadas en aplicaciones de campo para la protección de las vainas de cacao. Dentro de sus propiedades cabe resaltar que su tamaño depende del método de síntesis empleado siendo la longitud de su polímero, surfactante y solvente orgánico los que modifican la superficie. Gracias a su pequeño tamaño se utilizan por el gran aumento de su área superficial que se expone hacia los microrganismos. El mecanismo de acción antifúngica de estas NPs se debe a que estas partículas se unen a la membrana del hongo modificando su permeabilidad y con ello alterar la viabilidad celular, o bien, pueden penetrar y modificar la capacidad respiratoria, detener su división celular ocasionando así la muerte celular (Villamizar, 2016). De acuerdo a la forma que presenten (esférica, triangular, alargada, en forma de galleta, agregados en diferentes proporciones) y dependiendo del tamaño (1-100

nm), presentan una gama de colores transmitidos. El valor máximo de la longitud de onda de transmisión puede variar dentro de un amplio rango de valores λ=393 nm – 738 nm, variando el color de la suspensión coloidal entre un amarillo claro y un color verde respectivamente (Figura 3).



Fuente: Cornejo, 2015

Figura 3. Colores que toma una suspensión coloidal de nanopartículas de plata de diversos tamaños <30nm y formas (esfera, varilla, triángulo, galleta en diferentes proporciones.

Dentro de sus propiedades cabe resaltar que su tamaño depende del método de síntesis empleado siendo la longitud de su polímero, surfactante y solvente orgánico los que modifican la superficie. Gracias a su pequeño tamaño se utilizan por el gran aumento de su área superficial que se expone hacia los microrganismos. El mecanismo de acción antifúngica de estas NPs se debe a que estas partículas se unen a la membrana del hongo modificando su permeabilidad y con ello alterar la viabilidad celular, o bien, pueden penetrar y modificar la capacidad respiratoria, detener su división celular ocasionando así la muerte celular (Rivera y Ramos, 2014)

3.3. ANTECEDENTES

Varios estudios han sido reportados para el control biológico de patógenos en cultivo de cacao. Mejía y colaboradores, caracterizaron morfológicamente hongos endófitos asociados a cacao para evaluar su capacidad antagónica contra *Moniliophthora perniciosa.* Los autores lograron identificar a *Trichoderma sp.* y *Botryosphaeria sp.* y mostraron potencial bicontrolador (Mejía *et al*., 2008). Villamizar y colaborabores, en contraste mostraron la eficiencia de *Trichoderma spp.* autóctonas del cultivo de cacao para controlar a *M. roreri* bajo condiciones de campo. Los resultados de severidad externa e interna mostraron que respecto al control la disminución del daño en los frutos fue del 28 y 19,5% (Villamil *et al.*, 2016).

En cuanto a los hongos productores de micotoxinas, en un estudio realizado por Nguyen *et al.,* (2017) se consideró la incidencia de géneros *Fusarium, y Aspergillus* y sus micotoxinas en los cultivos y en los productos alimenticios. Los impactos de la contaminación por hongos, los medios de control biológico contra estos patógenos fueron revisados. Entre ellos, enmiendas orgánicas mostraron ser eficaces tanto en la producción de actividades antimicóticos y el refuerzo de la sanidad. Para estos se ha utilizado el control biológico incluyendo bacterias, hongos y levaduras dentro de las bacterias dos aislados de *Bacillus sp.* de soja fermentada en Tailandia, identificados como *B. licheniformis* y *B. subtilis*, podrían inhibir fuertemente el crecimiento de *A. flavus* y disminuir significativamente los niveles de aflatoxina B1 y de ocratoxina A tanto en medio sólidos y líquidos. Se encontró que la destoxificación estaba ligada a la actividad de la carboxipeptidasa que degradaba la ocratoxina A, citado por (Nguyen, Strub, Fontana, & Schorr-Galindo, 2016)

Por otro lado, de acuerdo a lo reportado por Armando *et al*., (2013) la presencia de levadura, provocó la reducción del crecimiento de hongos toxigénicos, logrando inducir algunas tensiones e influir en la producción de micotoxinas. Además, *Trichoderma spp*. ha demostrado su capacidad inhibidora frente a varios hongos patógenos y/o micotoxigénicos, incluidos los *F. graminearum, F. culmorum* (Matarese *et al*., 2012), *F. oxysporum* (Perveen y Bokhari, 2012) y *A. niger* (Gajera y Vakharia, 2010). Por lo tanto, la reducción de la producción de micotoxinas también puede deberse a la disminución de las poblaciones de patógenos. Una cepa de *Trichoderma* aislado de la rizósfera de maíz tuvo la capacidad de inhibir a *A. flavus* utilizando la prueba método de cultivo dual. Los resultados mostraron que *Trichoderma sp*. TKD Aislado de la rizósfera de maíz se identificó como *Trichoderma asperellum* y tuvo el potencial para inhibir el crecimiento de *A. flavus* a 98.849 ± 1.100% (Darmayasa, y Oka, 2016). Asi mismo en otra investigacion redujo significativamente la gravedad de la pudrición de raíces negras en las plántulas de frijol ocasionada por *F. solani* con una reducción de la enfermedad de 64,4 a 74,6% sobre el contro (Belete Eshetu, Ayalew Amare, 2015).

El uso de aceites esenciales también ha sido una estrategia explorada. *Lozada y colaboradores*, determinaron el efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de Lippia sobre *Moniliophthora roreri*. Los autores encontraron que concentraciones de 200 µg/ml fueron los más activos e inhibieron 100% del crecimiento micelial. Los autores lograron concluir que todos los aceites esenciales utilizados mostraron actividad fungicida cuando fueron evaluados en esta concentración, siendo los AE de *L. origanoides* los más activos (Lozada *et al.*, 2014). Así mismo se han utilizado muestras de la especie *Brosimum utile* del cual se determinó la presencia de compuestos grasos, terpenos y/o esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, resinas y saponinas con actividad fungicida sobre *M. roreri* a 2000 (Moreta M, 2015).

Clemencia y colaboradores, estudiaron la actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (Citrus sinensis L.) sobre *Fusarium solani*, y *Aspergillus flavus*, en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Los resultados mostraron que existe un efecto

inhibidor del aceite esencial de naranja (AEN) en el crecimiento micelial de los hongos in vitro, superior al 80% a concentración de AE en concentraciones entre el 1% y 100% (Clemencia *et al*., 2014).

Finalmente, estrategias basadas en el uso de nanopartículas de plata ha sido recientemente reportada por Villamizar y colaboradores. Los autores evaluaron la capacidad antifúngica de nanopartículas de plata a diferentes concentraciones frente a *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani,* nativos del cultivo de cacao de fincas en el Departamento Norte de Santander. A través de la investigación se concluye que concentraciones entre 50 ppm y 80 ppm fueron suficiente para reducir o inhibir su crecimiento en la corteza de cacao (Villamizar *et al.*, 2016). En el mismo año, Agbaje y colaboradores, demostraron que nanopartículas de plata sintetizadas usando la corteza de cacao eran efectivas para frente a diferentes especies de *Aspergillus sp.* inhibiendo completamente su crecimiento (Agbaje *et al.*, 2016).

Tomando como base los anteriores antecedente, en esta investigación se comparó la efectividad de tres métodos de control antimicrobiano basado en el uso de biocontroladores, aceites esenciales y nanopartículas de plata en el control de los patógenos *M. roreri, A. flavus y F. solani* nativos, aislados del cultivo del cacao en el departamento Norte de Santander. Todos los ensayos fueron conducidos a nivel *in vitro* tanto en medio de cultivo como en fruto.

4. METODOLOGÍA

Se probaron tres tipos de tratamientos con hongos antagonistas, aceites esenciales, y nanopartículas de plata. Para los cuales se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo*. El estudio es de tipo exploratorio inductivo. Por esta razón, dichas moléculas pueden ser candidatas para estudios *in vitro* e *in vivo* contra agentes patógenos implicados en enfermedades de cultivos

4.1 Aislamientos Fúngicos

Todas las cepas empleadas en este estudio fueron previamente aisladas y caracterizadas por Villamizar *et al.,* 2016 en el laboratorio de investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible (NANOSOST) de la Universidad de Pamplona. Brevemente, se hace una explicación del procedimiento empleado.

Las muestras fueron obtenidas de una finca ubicada en Bochalema Norte de Santander, cuya temperatura está en un rango de 22ºC a 30ºC (media anual de 28.6ºC), la precipitación presenta una media anual de 1.969,6 mm que clasifica la zona como un bosque tropical húmedo, los suelos predominantes son la textura arenosa, compuesta por un 30% de arena, un 30% de limo y un 40% de arcilla, con pH de 4,9.

Para el caso de los hongos biocontroladores (antagonistas y endofíticos), estos fueron aislados y caracterizados a partir de muestras de suelo y cacotas sanas en agar PDA (Oxoid), mientras que los hongos patógenos primarios como *M. roreri* y los secundarios *A. flavus y F. solani* fueron aislados a partir de cacotas enfermas según como lo describen Suárez y colaboradores con algunas modificaciones (Suárez *et al.*, 2013). Los hongos biocontroladores, así como los secundarios además de la caracterización morfológica fueron caracterizados a nivel molecular. Para tal fin, se llevó a cabo la extracción de DNA, empleando el Kit de (Mo Bio Laboratories) el cual fue preparado según las especificaciones de la casa comercial. El material genético fue amplificado empleando dos marcadores moleculares correspondientes a la región ITS y al gen β-tubulina. Los primers empleados se relacionan en la tabla 1. Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio BIOMA de la Universidad de Antioquia, Medellin/Colombia. El DNA amplificado fue secuenciado por MacroGen (Korea) y analizado a través de la base de datos BLAST (Cuervo *et al*., 2011).

Tabla 1. Primer β-tubulina y la región ITS empleados para la caracterización de hongos biocontrol aislados de cultivos de cacao en el suelo.

Primers β-tub	Bt-Lev	GTG AAC TCC ATC TCG TCC ATA
	Bt-T2M	CAA CTG GGC TAA GGG TCA TT
Primers ITS	PN3	CCG TTG GTG AAC CAG CGG AGG GAT C
	PN16	TCC CTT TCA ACA ATT TCA CG

4.2 ENSAYO INHIBICION BIOCONTROLADORES *T. viride y B. quercum*

4.2.1. Ensayos de inhibición con hongos antagonistas en medio de cultivo

El ensayo Biocontrol se llevó a cabo utilizando el método de cultivo dual reportado por Smitha C y colegios (Smitha *et al*., 2014) y descrito originalmente por Dennis y Webster (1971). Los hongos utilizados como biocontroladores fueron *Trichoderma viride* y *Botryosphaeria quercuum*. Se inocularon placas de Petri que contenían PDA con un disco de agar 5 mm con los respectivos patógenos con un tiempo de cultivo de 7 días. Otro disco de agar de la misma edad y diámetro que contenía el agente de biocontrolador se colocó a una distancia de 3 cm del fitopatógeno, asegurando el mismo espacio de crecimiento para ambos hongos. Los medios de cultivo utilizados PDA y sabouraud se incubaron a 25 °C durante 12 días, tiempo durante el cual se realizó seguimiento diariamente. El proceso se registró fotográficamente con una cámara digital Unnikon 2500 equipado con el establecimiento de un soporte fijo una distancia de 18 cm en todos los casos. No se observaron cambios en el crecimiento significativas tras 7 días, finalmente se calculó el índice de Bio-Control (BI)

$$\text{Indice Biocontrol (BI)} = A/B * 100.$$

Donde A corresponde a la zona del agente de biocontrol, mientras que B es el área total cubierta por el agente de biocontrol + fitopatógeno (adaptado de Szekers *et al*., 2006). Una cepa de *Trichoderma viride* proporcionada por la colección de cultivos de la Universidad de Pamplona (Colombia) se utilizó como control.

4.2.2. Ensayo de inhibición con hongos antagonistas en planta

El ensayo se llevó a cabo en serocluster de 24 pocillos con tapa TC (Cellstar, Sigma Aldrich, EE.UU.). En cada pozo se depositaron trozos de la corteza y de la pulpa de la cacota, con diámetros de 0.5x0.5 cm previamente esterilizados bajo tratamiento con calor húmedo (121°C/15 lb de presión/ 20 min). Cada pozo fue inoculado con 100uL del biocontrolador a una concentración de $1X10^6$ esporas/mL y seguidamente con 100 uL del patógeno empleando la misma concentración. Tres pozos se

marcaron como control positivo, los cuales sólo contenían los trozos de cacota inoculados con el biocontrolador y tres más como control negativo, en los cuales no se realizó ningún tipo de inóculo. Los seroclusters se incubaron a 25°C durante 8 días. El efecto inhibidor fue observado macroscópicamente. La capacidad fungistática fue determinada como aquella capaz de reducir o detener el crecimiento del patógeno, mientras que la actividad fungicida fue calculada como aquella en la cual solo creció el biocontrolador (Villamizar *et al.,* 2016 in press).

4.3. ENSAYO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA

4.3.1. Biosíntesis de verde de AgNPs usando cáscara de cacao.

Utilizando la metodología de Agbaje *et al.,* 2016, se recolectaron frutos frescos de cacao de una finca localizada en el municipio de Bochalema, en el departamento Norte de Santander. La cual tiene un clima cálido y húmedo, cuya temperatura se encuentra en un rango de 22ºC a 30ºC con una media anual de 28.6ºC; la precipitación tiene una media anual de 1.969,6 mm que clasifica la zona como un bosque tropical húmedo; los suelos predominantes son la textura arenosa, con pH de 4,9.

Posteriormente, se llevaron al laboratorio y se lavaron con detergente para eliminar residuos y otras sustancias extrañas. Las cacotas se dividieron por la mitad y se separó la cáscara del fruto contenido en el interior. Se tomó solo la corteza y se cortó en cuadros pequeños, los cuales se secaron a temperatura ambiente durante 7 días. Los chips de cáscara se molieron hasta obtener un macerado con la ayuda de una batidora eléctrica.

4.3.1.1. Preparación del extracto cáscara de cacao.

Se pesaron 0,1 g del macerado obtenido anteriormente y se suspendieron en 10 ml de agua destilada. Posteriormente, se calentó la suspensión a 60 °C durante 1 h. El extracto se filtró usando filtro Whatman No. 1 y después se centrifugó a 4000 rpm. El sobrenadante fue colectada y almacenada a 4°C para su uso posterior (Agbaje *et al*., 2016)

4.3.1.2. Síntesis de AgNPs a partir de vainas de cacao y caracterización.

A 40 mL de nitrato de plata ($AgNO_3$) 1 mM, se le añadió 1 mL del extracto obtenido en el paso anterior. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante algunos minutos, hasta observar un cambio en el color (Agbaje *et al.,* 2016). La presencia de las nanopartículas fue caracterizada a través de UV-VIS, midiendo el espectro de absorbancia en el rango de 200 a 800 nm.

4.3.2. Ensayos de inhibición con AgNPs en medio de cultivo.

En el ensayo *in vitro* se realizó en dos medios de cultivo diferentes (PDA y Saboraud) sobre los cuales se adicionaron cinco mL de AgNPs sintetizadas anteriormente. Los medios que contienen nanopartículas de plata se incubaron a temperatura ambiente. Después de 48 hr de incubación, tapones de agar de tamaño uniforme (diámetro, 8 mm) que contenían los hongos se inocularon simultáneamente en el centro de cada placa de Petri y se dejaron en incubación a 28 ± 2 ° C durante 14 días. Como control negativo se utilizó una caja de Petri sin AgNP y se inocularon con los patógenos (Adaptada por Nasrollahi *et al*., (2011). Todos los ensayos se repitieron por triplicado.

4.3.3. Ensayos de inhibición con AgNPs en planta.

Se emplearon placas estériles con 24 pocillos con tapa TC (Cellstar, Sigma Aldrich, EE.UU.) en cada una de las cuales se colocaron trozos pequeños de 0.5*0.5 cm previamente esterilizados bajo tratamiento con calor húmedo (121°C/15 lb de presión/ 20 min). Seguidamente cada trozo fue modificado con la solución coloidal de AgNPs a diferentes concentraciones (40, 60, 80 y 100 ppm) y se contaminaron artificialmente con 100 uL de los patógenos (*Fusariuam solani, Aspergillus sp, y Moniliophthora roreri)* a una concentración de 10^6 conidias/mL. Las placas se incubaron a 25°C durante 18 días. Como control positivo se inocularon los trozos de cacota sólo con el patógeno, mientras que para el control negativo se dejaron solo los trozos de cacota con AgNP. El efecto inhibidor fue observado macroscópicamente. La capacidad fungistática fue determinada como aquella capaz de reducir o detener el crecimiento del patógeno, mientras que la capacidad fungicida fue calculada como aquella concentración de AgNP en la cual no hubo crecimiento aparente en el trozo de cacota (Villamizar *et al.,* 2016 in press).

4.4. ENSAYO CON ACEITES ESENCIALES

4.4.1. Obtención de aceites esenciales.

Los aceites esenciales relacionados en la tabla 2 fueron provistos por la empresa **PROMITEC** "*Soluciones Biotecnológicas Naturales que brindan bienestar y salud",* ubicada en la ciudad de Bucaramanga, a la cual el laboratorio NANOSOST le ofrece asesorías técnico-científicas.

Tabla 2. Aceites esenciales provenientes de plantas y sus compuestos antimicrobianos.

Nombre vulgar	Nombre científico	Componentes principales	Clase de actividad	USOS/ EFECTO
Orégano	*Lippia origanoides*	Timol y carvacrol	General	Condimentos, sedantes y tónicas nervioso, contra resfrió toses y asma, asimismo tiene efecto diurético, desinfectante.
Pronto alivio	*Lippia alba*	Piperitona Geranial, neral	General	Planta ornamental. Utilizado como sedante, para la diabétes, diaforética, emenagoga, trastornos digestivos y antiespasmódico.
Eugenol	Zyzygium aromaticum (L)	Eugenol, acetil eugenol, beta-cariofileno y vainillina.	General	Propiedades anestésicas, antiagregantes, antiedemicas, antioxidantes, antisépticas, herbicida, pesticida, antivirales, vermifugas. Además elimina el dolor y la inflamación. En alimetos se usa para dar aroma en comidas
Palmarrosa	*Cymbopogon Martini*	Geraniol, farnesol, citronel	Amplio espectro de bacterias y hongos, virus	Cicatrizante, digestivo, hifratante, estimulante digestivo, estimulante circulatorio, tónico.
Anis de estrella	*Illicium verum*	Anetol, estragol	Bacterias, levaduras y hongos.	Se utiliza en pastelería y elaboración de dulces. Usado en fitoterapia. Alivia los cólicos, intestinales y reumáticos.
Mandarina	*Citrus reticulata*	Limoneno, metilantranilo de metilo, geraniol	Bacterias	Piel: pieles grasas, cicatrices, estrías, tonificante. Retención de líquidos, obesidad, problemas digestivos.
Limón	Limón Citrus	Limoneno, permineno, pinenos	Bacterias	Antiséptico, antiespasmódico, antitóxico, astringente, carminativo, cicatrizante, depurativo, diurético
Cúrcuma	*Curcuma longa* L	polifenoles, curcumina, diferuloilmetano	Bacterias patógenas, virus (*Candida albicans*).	Es conocida mundialmente como especia aromática, utilizada en la gastronomía asiática para dar un toque de color y sabor picante a los platos.
Pimientos	*Oleorresina De Capsicum*	Ésteres; terpenos, ceras	Actividad antibacteriana, antiviral o antifúngica	Principios aromatizantes y pigmentantes. Usado en ensaladas sólo o como base para la elaboración de aderezos. Fuente de extractos para fines ambientales y medicinales
Eucaliptus	*Eucalyptus globulus*	Cineol, Taninos Polifenoles	Bacterias, virus, *E. coli, Sporothrix spp*	Planta ornamental por su follaje aromático y hermosas flores, usadas para condimentar las comidas. Medicinalmente tiene propiedades somáticas, sedativas, antidepresivas y analgésicas.

Romero	*Rosmarinus oficinalis*	Pineno, canfeno, limoneno	General	Analgésico, antiséptico, antiespasmódico, astringente, cefálico, cicatrizante, digestivo, diurético, tónico
Ajo	*Allium sativum*	Garlicina o el sulfóxido de alilcisteïna	Hongos, bacterias y virus	Reumatismo, insomnio, tos ferina, manchas, difteria, afecciones cardiovasculares, diabetes.
*General: Actividad sobre varios tipos de microorganismos: bacterias, hongos y protozoarios				

Fuente: Cabeza, 2013

4.4.2 Ensayo de inhibición de aceites esenciales en medio de cultivo.

Se empleó el método de difusión en agar reportado por (Gorantla *et al.,* 2014) con algunas modificaciones utilizando como medios de cultivo agar PDA y agar Sabouraud. Se realizó la siembra por punción de cada uno de los patógenos (*M. rorei*, *A. flavus,* y *F. solani)* en el centro de la caja y se colocó un sensidisco con un diámetro estándar de 0.5cm previamente esterilizado impregnado con una solución concentrada (100%) del aceite esencial en el centro de la caja. Como control positivo, se tomaron cajas inoculadas sólo con los respectivos patógenos, las cuales se incubaron a 25°C por 18 días.

La capacidad de inhibición del aceite esencial se determinó midiendo el crecimiento de cada fitopatógeno a través de cuatro diámetros perpendiculares (8 radios) hasta alcanzar el extremo de la caja de petri utilizando un caliper digital, siguiendo el método reportado por diversos autores (Pardo *et al.*, 2004; Lahlali *et al.*, 2007; García *et al*., 2010; Judet-Correia *et al.*, 2010; Alborch *et al.*, 2011; García *et al*., 2011). La medición se realizó cada dos días y se comparó con el control. Estas pruebas se realizaron por triplicado para cada aceite esencial y para cada hongo. Basados en los resultados obtenidos se calculó la media del crecimiento radial y los valores medios de los duplicados y repeticiones se sometieron a análisis de varianza múltiple (MANOVA) con un nivel de significancia del 95% para probar la existencia de diferencias significativas en los resultados obtenidos. El incremento en el crecimiento radial fue usado para calcular la velocidad de crecimiento (mm/dia) mediante análisis de regresión no lineal, usando como función de ajuste el modelo sigmoidal de Baranyi y Roberts (1994) tal y como ha sido descrito por García *et al*., (2009) empleando el software DMFit, para los tres fitopatógenos evaluados con cada uno de los aceites esenciales utilizados, en cada medio de cultivo. Posteriormente, los resultados fueron clasificados en dos grupos de acuerdo a la sensibilidad o resistencia al aceite.

4.4.3 Ensayo de inhibición de aceites esenciales en planta.

Se realizó directamente sobre la pulpa de cacao y la corteza, para ello se utilizaron placas estériles de 24 pocillos con tapa TC (Cellstar, Sigma Aldrich, EE.UU.) en el cual se colocaron las piezas de 0,5x0,5 cm de pulpa de cacao y la corteza previamente esterilizados bajo tratamiento con calor húmedo (121°C/15 lb de presión / 20 min). A cada pozo se adicionó 100 uL de cada uno de los aceites esenciales y posteriormente se contaminaron artificialmente con una solución que contenía 10^6 conidias/mL. Las placas se incubaron a 25 °C durante 11 días. Como control negativo se emplearon pulpa de cacao o corteza sin inoculo, y como control positivo se inocularon la pulpa de cacao o corteza con los patógenos correspondientes, adaptado de Nasrollahi *et al.,* (2011). El efecto inhibidor fue observado macroscópicamente. La capacidad fungistática fue determinada como aquella capaz de reducir o detener el crecimiento del patógeno.

4.4.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para aceites esenciales.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó para los cinco mejores aceites *L. origanoides*, *L. alba*, eugenol, palmarosa y anise mediante el método de dilución en agar para todas las cepas patógenas siguiendo la metodología reportada por (Hamini-Kadar N, Hamdane F, Boutoutaou R, 2014) con algunas modificaciones. Las placas de PDA se prepararon con diferentes concentraciones de los aceites 25%, 15%, 5% y 1%. A partir de las cepas de *M. roreri*, *A. flavus*, y *F. solani* con 7 días de incubación se inocularon las cajas en el centro con un disco micelial (4 mm) y se incubaron durante 5 días, seguido por la medición del diámetro medio de colonia radial. Se hicieron dos repeticiones para cada tratamiento y el medio con únicamente el patógeno se fijó como control. La placa con menor concentración de aceites esenciales, que no mostró crecimiento visible fue considerada para establecer un rango de la concentración mínima inhibitoria CMI (Rana, Rana, & Rajak, 2011).

4.5. ANÁLISIS ESTADISTICO

Para el desarrollo del presente trabajo, se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones para cada prueba realizada. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y los valores medios de los duplicados y repeticiones se sometieron a análisis de varianza múltiple (MANOVA) con un nivel de significancia del 95% (p-valor < 0,05) para probar la existencia de diferencias significativas en los resultados obtenidos. En caso de encontrar diferencias significativas en los resultados, se aplicó una prueba de múltiples rangos mediante el test HSD de Tukey para separar los grupos

homogéneos. Los análisis fueron ejecutados con el software Statgraphics Centurión XV.II para Windows.

Inicialmente se aplicó un factor discriminante cualitativo para separar los aceites puros en grupos de acuerdo con su efecto anti fúngico al 100 %. Posteriormente, para los aceites puros con acción antifúngica, se realizó un screening al 25%, 15%, 5% y 1% como paso previo a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Para los aceites que no inhibieron el crecimiento de los fitopatógenos, se les realizó una cinética de crecimiento con el fin de encontrar cuál o cuáles de ellos retardan el desarrollo de los hongos del cacao. Los resultados de las velocidades de crecimiento para cada aceite evaluado en los dos medios de cultivo para cada patógeno fueron sometidos a análisis de varianza múltiple (MANOVA) con un nivel de significancia del 95% (p-valor < 0,05) para probar la existencia de diferencias significativas en los resultados obtenidos entre ellos y el control. En caso de encontrar diferencias significativas en los resultados, se aplicó una prueba de múltiples rangos mediante el test HSD de Tukey para separar los grupos homogéneos.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tiempo / Actividad	Agosto Semana				Septiembre Semana				Octubre Semana				Noviembre Semana				Diciembre Semana	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Revisión Bibliográfica y estructuración del anteproyecto.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Repique y mantenimiento de cepas: Antagonistas y Fitopatógenos		X	X															
Toma de muestras: Cacotas de Cacao sanas.			X															
Síntesis de Nanopartículas de Plata a partir de corteza de cacao.				X	X													
Caracterización de AgNPs sintetizadas					X													
Ensayo *in vitro* e *in vivo* con los biocontroladores *T. viride* y *B. quercum*				X	X	X	X	X	X									
Ensayo *in vitro* e *in vivo* con AgNPs						X	X	X	X	X	X							
Ensayo *in vitro* e *in vivo* con aceites esenciales								X	X	X	X	X	X					
Socialización de Resultados III semana de investigación VI semana de Ciencia Tecnología e innovación.												X						
Análisis estadístico de cada uno de los métodos.												X	X	X	X			
Escritura del Proyecto de Investigación y sustentación.															X	X	X	X

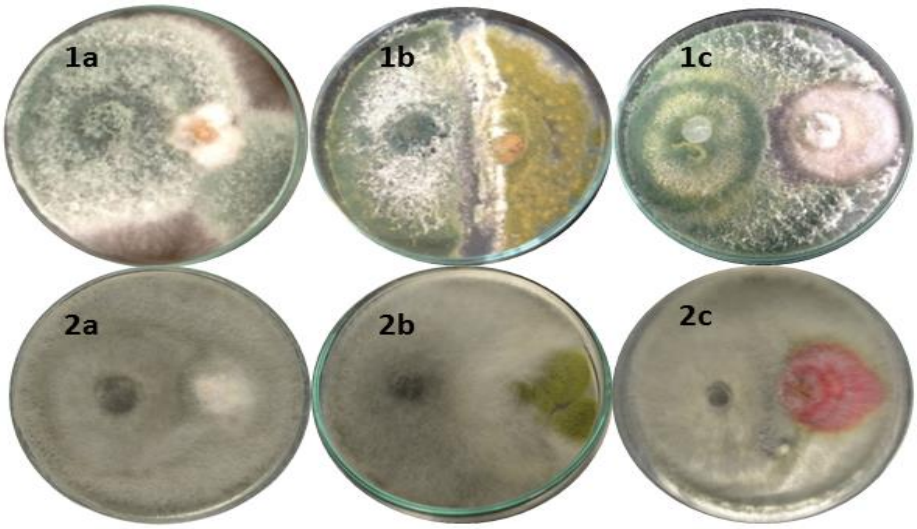
6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. ENSAYO DE INHIBICIÓN CON BIOCONTROLADORES *T. viride* y *B. quercum*

6.1.1. Ensayo de inhibición con biocontroladores en medio de cultivo.

En busca de alternativas de control biológico se ha venido realizando estudios en los que se involucra microorganismos con actividad antagónica para neutralizar enfermedades en diferentes cultivos, se ha despertado especial interés debido a sus potencialidades y a la gravedad de los impactos ecológicos ocasionados por agroquímicos en la naturaleza (Acebo *et al*., 2012; Suárez y Alba, 2013). Ensayos de inhibición con biocontroladores bajo condiciones *in vitro* se han llevado a cabo en diversas investigaciones que permiten demostrar la actividad de microorganismos con potencial para el biocontrol de diversas enfermedades en cultivos. Los hongos antagonistas tienen la capacidad de biocontrolar el crecimiento de otros microorganismos a través de diferentes mecanismos. Entre estos se encuentran la competencia por sustrato (como el carbono, el nitrógeno y el hierro), antibiosis (modificando las condiciones ambientales mediante la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal) o por micoparasitismo.

Las pruebas *in vitro* realizadas en esta investigación, permitieron develar que el hongo endófito *Botryosphaeria quercuum* presenta un mayor índice de biocontrol comparado con *Trichoderma viride* de acuerdo a los porcentajes de inhibición calculados por el ensayo dual, donde se pudo apreciar que el mecanismo de biocontrol imperante es la competencia por sustrato (Figura 4).



Fuente: Autor

Figura 4. Ensayo dual con los biocontroladores *Trichoderma viride y Botryosphaeria quercuum* versus patógenos del cacao **1a.** *T. viride* vs *M. roreri* **1b.** *T. viride* vs *A.*

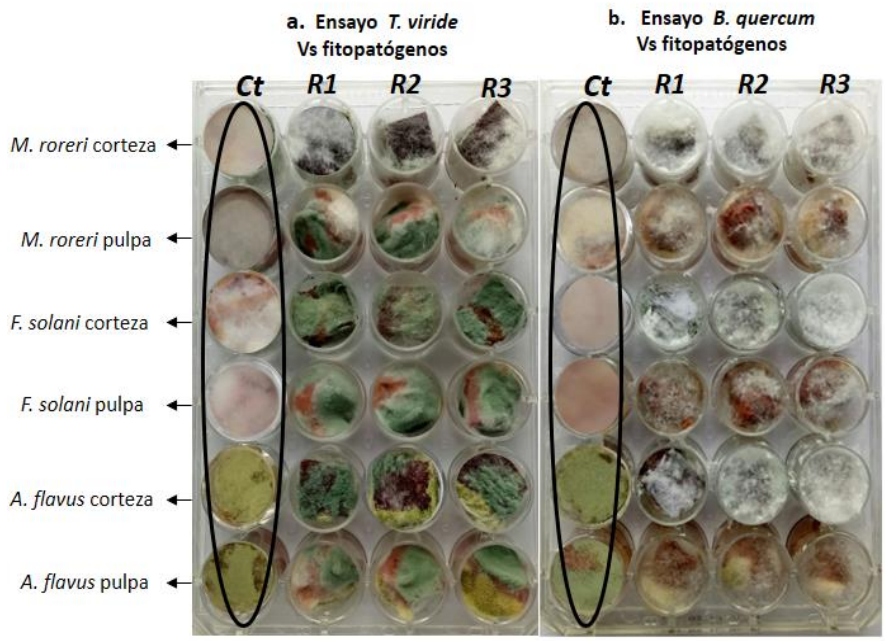
flavus **1c.** *T. viride* vs *F. solani* **2a.** *B. quercum* vs *M. roreri* **2b.** *B. quercum* vs *A. flavus* **2c.** *B. quercum* vs *F. solani*

El índice de biocontrol (IBC) obtenido por *T. viride* frente a *M. roreri, A. flavus y F. solani* fueron del 69%*,* 51% y 64%, respectivamente*.* Mientras que con *B. quercum* se obtuvieron porcentajes del 77%, 65% y del 73% frente a los mismos patógenos. Comparando con otros estudios, en los cuales se ha empleado *Trichoderma* spp como agente biocontrolador, se encontró similitud en los porcentajes de inhibición obtenidos. Suárez y Rangel (2014), reportaron un 60 % de biocontrol frente a 10 aislamientos de *M. roreri* mientras que con *Fusarium solani* el IBC fue alrededor del 64% (Tenorio, y Mollinedo 2016)*.* Esta capacidad proporcioanda por *Trichoderma viride* se debe a la segregación de metabolitos con actividad fungicida que inhiben el crecimiento de patógenos.

El IBC obtenido con *B. quercum* fue mayor en todos los casos, comparado con aquellos obtenidos por *T. viride.* Este hongo endofítico, tiende a habitar en las ramas de los árboles de plátano, convencionalmente usados para dar sombra al de cacao. Por tanto, se hace transferencia horizontal de esporas fúngicas que pueden llegar y alojarse en las hojas así como en frutos de *Theobroma cacao* donde han sido encontrados (Mejia *et al*., 2011). Rodríguez y colaboradores (2011), estudiaron *Botryosphaeria spp.* como un hongo endófito asociado a cacao nativo y su capacidad antagónica para el control de *Moniliophthora.* Los autores reportaron un IBC del 45,2%, significativamente más bajo que el obtenido en esta investigación (77%). Se podría decir que la efectividad en el proceso de biocontrol ejercido por la cepa aislada en este estudio es la procedencia de la cepa, la cual es nativa aislada del mismo cultivo de donde se obtuvo el patógeno, lo que hace que su especificidad aumente. No obstante, este mecanismo de acción debe ser estudiado con mayor profundidad.

6.1.2. Ensayo de inhibición con biocontroladores en planta.

El enfrentamiento del biocontrolador *T. viride* y del endófito *Botryosphaeria quercuum* vs los patógenos del cacao *M. roreri*, *F. solani,* y *A. flavus* se muestra en la figura 5. *T. viride* mostró un rápido desarrollo (pigmentación verde oscuro) en los enfrentamientos hechos con los patógenos secundarios *F. solani* y con *A. flavus* tanto en pulpa y en corteza. Comparando los resultados con otras investigaciones, se ha evidenciado que por ejemplo *Trichoderma asperellum* produce metabolitos secundarios con capacidad de inhibir a *A. flavus*. Este fenómeno se debe a la formación de compuestos activos excretados por *Trichoderma sp*. como enzimas o antibióticos que dañan e interrumpen el proceso fisiológico de *A. flavus* (Darmayasa y Oka, 2016). En contraste, con *M. roreri* el biocontrolador no tuvo un efecto significativo. Se puede observar que el fitopatógeno una vez llega al fruto lo invade rápidamente, logrando crecer tanto en los trozos de corteza como en los trozos de pulpa.



Fuente: Autor

Figura 5. Pruebas sobre la corteza y el fruto de cacao utilizando hongos antagonistas **a.** *Trichoderma viride* **b.** *B. quercum* frente *M. roreri*, *F. solani* y *A. flavus.* **Ct:** Control positivo (hongos fitopatógenos). **R1-R3:** replicas.

En las pruebas realizadas con el endófito *B. quercum*, se pudo determinar que este presenta una mayor velocidad de crecimiento en corteza (color blanco y textura algodonosa), por encima de *M. roreri, F. solani y A. flavus,* mientras que en pulpa los tres fitopatógenos invaden rápidamente el fruto (Figura 5). Especies endófitas comunes en plantas huésped en condiciones naturales a menudo son buenos colonizadores, crecen rápidamente y pueden ejercer su actividad a través de varios mecanismos. Por ejemplo, pueden inducir resistencia sistémica en las plantas frente a patógenos, producen la síntesis de compuestos biológicamente activos o cambios en la morfología y/o la fisiología de las plantas promoviendo su crecimiento (Bailey *et al*., 2006; Melnick *et al*., 2008), y la producción de metabolitos secundarios

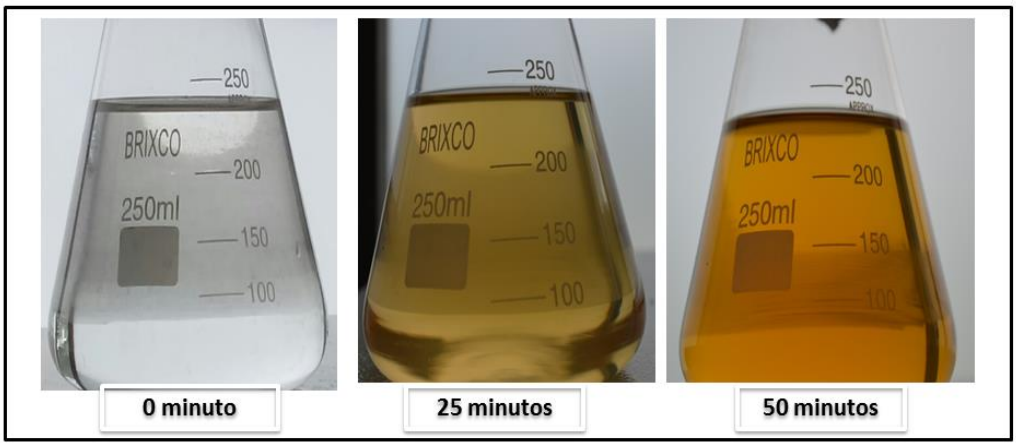
Al respecto, desde hace aproximadamente 15 años se han venido realizando investigaciones en Colombia, Centro América y otros países de Sur América, pero han resultado insuficientes debido a la gran capacidad de adaptación del patógeno a las diferentes condiciones agroecológicas donde se desarrolla el cultivo (Jaimes & Arazuni, 2010); el control biológico no elimina la enfermedad antes bien reduce la incidencia del patógeno (reportado por Krauss *et al*., 2010; citado por Villamil *et al*., 2015). Por ende, la contribución investigativa en este campo requiere ampliar y unir los esfuerzos con el fin de identificar y proporcionar a los productores nuevas y efectivas alternativas de manejo. Es entonces donde la nanotecnología abre campo

en las ciencias biológicas como un método alternativo siendo las nanoparticulas de plata un material apropiado con efectos antimicrobianos.

6.2. ENSAYO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)

El uso de nanopartículas de plata como método de control antimicrobiano radica en su tamaño nanométrico (nm). Esta característica fenomenológica facilita las interacciones biológicas, lo que permite el acceso a la membrana citoplasmática desestabilizándola y produciendo posteriormente daños en la maquinaria de replicación y en la síntesis de proteínas, lo que termina alterando la viabilidad celular.

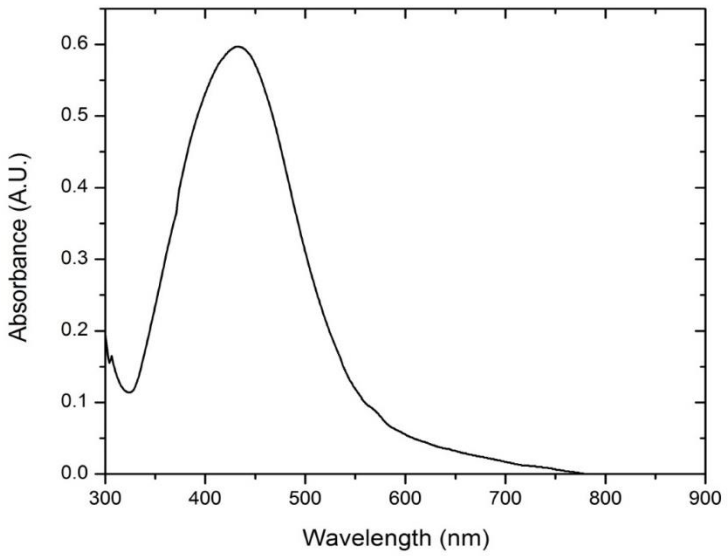
Una de las rutas más amigables de síntesis de nanopartículas de plata es la síntesis verde. En esta investigación, se empleó los extractos de la cáscara de cacao o cacota como los agentes reductores que facilitaron la obtención de la AgNP en tan sólo 50 minutos, tiempo en el cual se observó el cambio de coloración del sustrato ($AgNO_3$) (Figura 6).



Fuente: Autor

Figura 6. Síntesis de nanopartículas de plata a partir de extracto de cacota. Se evidencia el cambio de coloración de la suspensión pasados 50 minutos de reacción de la solución de corteza con AgNO3 a una concentración 1 mM.

Para confirmar la reacción colorimétrica, se procedió a caracterizar mediante espectro UV-Vis la solución coloidal obtenida. La formación de nanopartículas de plata se ve evidenciada por un pico de absorbancia a 420 nm, longuitud de onda a la cual ocurre un fenómeno denominado “Resonancia de Plasmón” en el cual la nube de electrones más superficiales presentes en las nanopartículas se excita y resuenan (Villamizar, 2016).



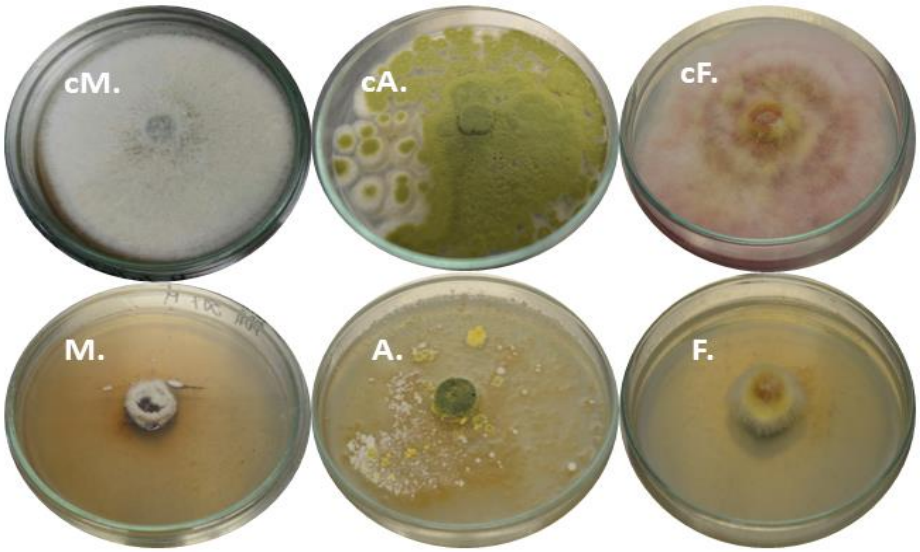
Fuente: Autor

Figura 7. Espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata obtenidas usando extracto de cacota de cacao como agente reductor.

La coloración está dada en función del tamaño y morfología de las nanopartículas. Un color naranja indicaría la presencia de nanopartículas esféricas con un rango de tamaño inferior a 50 nm. Esto, ha sido previamente reportado por Agbaje y colaboradores, quienes empleando las mismas condiciones a las reportadas por este estudio, obtuvieron partículas con morfología esférica con un tamaño que oscila entre 4 y 32 nm (Agbaje *et al*., 2016).

6.2.1. Ensayos de inhibición con AgNPs en medio de cultivo.

Los resultados obtenidos usando medios de cultivo modificados con AgNP permitieron revelar que la acción de estos nanomateriales es netamente fungistático. Se pudo apreciar cómo se detuvo el crecimiento de *M. roreri, A. flavus* y *F. solani,* durante los días de ensayo.



Fuente: Autor

Figura 8. Ensayo de difusión con Nanopartículas de plata en medio PDA **cM.** control *M. roreri* **cA.** control *A. flavus* **cF**. control *F. solani*. **M.** pruebas con AgNPs frente a *M. roreri.* **A.** pruebas con AgNPs frente a *A. flavus.* **F.** pruebas con AgNPs frente *F. solani.*

Teniendo en cuenta que el tratamiento con AgNP no inhibió los hongos patógenos, se procedió a medir el crecimiento miceliar de los mismos comparándolo con un tratamiento control (sin nanoparticulas), para hallar la velocidad máxima de crecimiento (Vmax) para cada tratamiento. Los resultados se aprecian en la siguiente tabla.

Tabla 3. Velocidades de crecimiento para los tres patógenos del cacao bajo tratamiento con nanopartículas de plata en los medios de cultivo PDA y Sabouraud (Sab).

Fitopatógeno	Medio	Vel Máx (AgNPs)	Vel Máx (mm/día)
M. roreri	PDA	0.168 ± 0.0208 ^{aA}	0.425 ± 0.0680 ^{Ba}
M. roreri	Sab	0.371 ± 0.0636 ^{aB}	0.447 ± 0.0707 ^{Bb}
F. solani	PDA	0.258 ± 0.0240 ^{aA}	0.305 ± 0.0439 ^{Ba}
F. solani	Sab	0.434 ± 0.0518 ^{aB}	0.462 ± 0.0486 ^{Bb}
A. flavus	PDA	0.263 ± 0.0302 ^{aA}	0.421 ± 0.0601 ^{Ba}
A. flavus	Sab	0.271 ± 0.0375 ^{aB}	0.470 ± 0.0478 ^{Bb}

Las columnas con letras minúsculas en común, indica la no existencia de diferencias significativas en la velocidad de crecimiento con un valor p <0,05 entre los tratamientos.
Las filas con letras mayúsculas en común, indica la no existencia de diferencias significativas en la velocidad de crecimiento con un valor p <0,05 entre los medios de cultivo.

Para determinar si la variación observada en las velocidades de crecimiento de cada fitopatógeno estaba dada en función del medio de cultivo empleado, se procedió a determinar diferencias significativas, ejecutando un análisis de varianza múltiple con un nivel de significancia del 0.05, el cual se muestra a continuación.

Tabla 4. Análisis de Varianza para Vmax en función del medio de cultivo, fitopatógeno y tratamiento.

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Agar	0,0315187	1	0,0315187	7,21	0,0313
B:Fitopatógeno	0,000304667	2	0,000152333	0,03	0,9659
C:Tratamiento (AgNPs–Control)	0,0487687	1	0,0487687	11,16	0,0124
RESIDUOS	0,0305947	7	0,00437068		
TOTAL (CORREGIDO)	0,111187	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

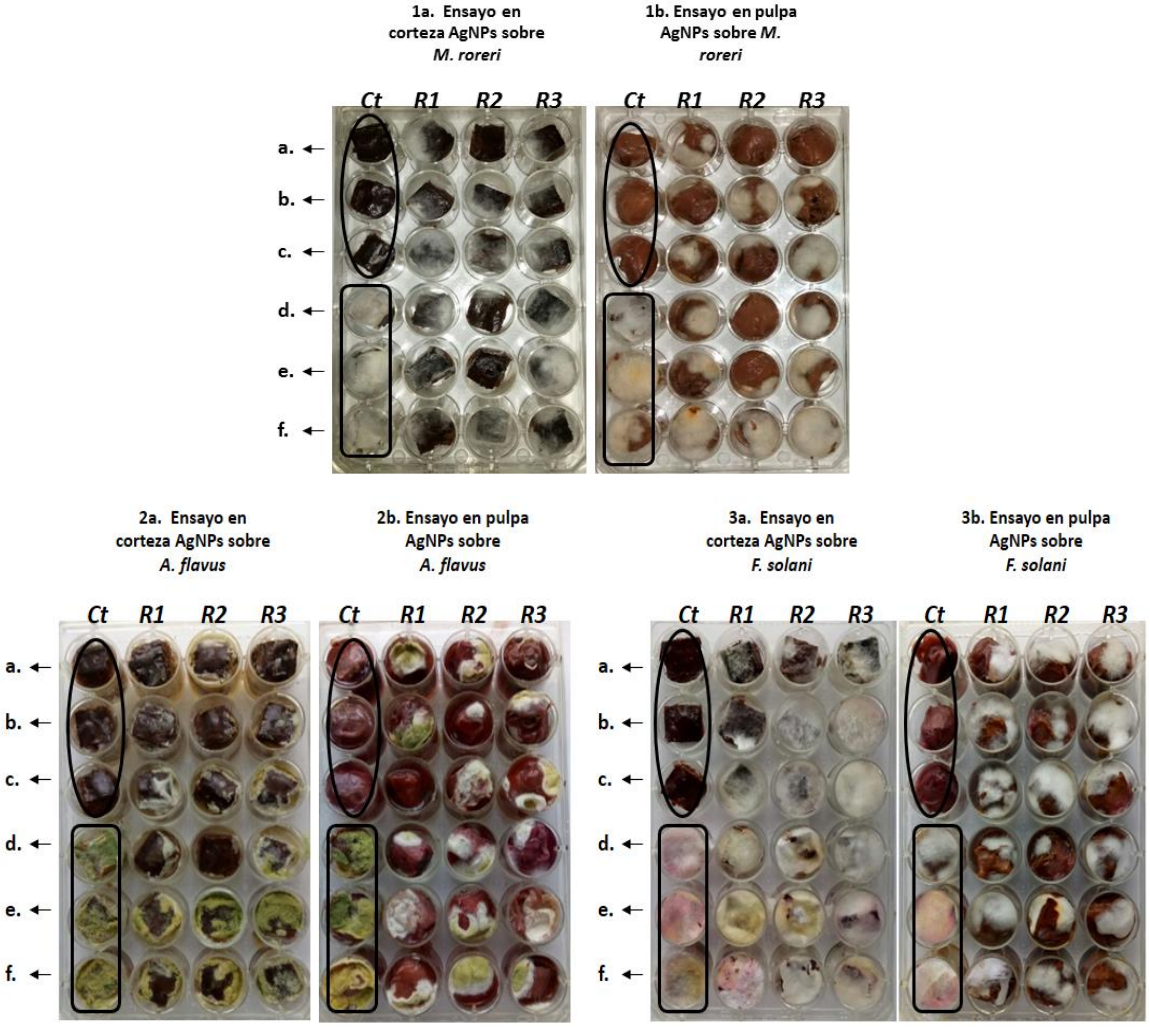
La tabla 4 de varianza anterior descompone la variabilidad observada en la velocidad máxima de crecimiento (Vmáx) debido a tres factores evaluados: medio de cultivo, fitopatógeno y tratamiento. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores frente a la velocidad de crecimiento a un nivel de significancia del 0,05. Puesto que, en este caso los valores-P para el tipo de agar y tratamiento son menores que 0,05, indica que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la Velocidad de crecimiento con un 95,0% de nivel de confianza. Entre tanto, la variación observada en la velocidad de crecimiento entre cada fitopatógeno no fue estadísticamente significativo (valor-P > 0,05).

Se puede concluir sin necesidad de ejecutar una prueba de múltiples rangos que las velocidades de crecimiento de los fitopatógenos se ven afectadas por el tipo de medio, ya que en general se observó un mayor desarrollo en agar Sabouraud que en PDA. Así mismo, se encontró que la velocidad de crecimiento fue menor en general en los medios con nanoparticulas que en el control, por lo tanto, las menores velocidades de crecimiento para los tres patógenos se observaron en agar PDA con AgNP. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento de los patógenos, *Fusarium solani* mostró una menor inhibición presentando una Vmax media de 0,36475 mm/día frente a *M. roreri* (0,35275 mm/día) y *A. flavus* (0,35625 mm/día).

El tratamiento con nanopartículas provoca un daño estructural a nivel microscópico donde se ve alterado el crecimiento micelial y se encuentran rupturas inusuales tanto en la pared celular como en las hifas (Villamizar *et al.,* 2016). Frente a los patógenos secundarios *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* se han desarrollado estudios que reflejan su efectividad. Agbaje *et al*., (2016) reportó excelentes resultados con AgNPs como aditivos antimicrobianos en pintura para aplicaciones en entorno de construcción con alta actividad larvicida, bactericida y fungicida

incluso frente a *A. flavus*. Al-Othman *et al*., (2014) demostró que a una concentración de 150 ppm de AgNPs, se obtiene no solo la reducción del crecimiento de *A. flavus* sino que conjuntamente se logra alcanzar un porcentaje de inhibición del 100% en la producción de aflatoxinas. Las diferencias con lo obtenido en esta investigación se deben a que muy probablemente las cepas de colecciones utilizadas presentan algún tipo de resistencia a las nanopartículas. Pero este aspecto, debe ser estudiado con mayor detalle en posteriores investigaciones.

6.2.2. Ensayos de inhibición con AgNPs en planta.



Fuente: Autor

Figura 9. Ensayo de inhibición sobre pulpa y corteza de cacao modificada con diferentes concentraciones **a.**100% **b.** 90% **c.** 80% **d.** 70% **e.** 60% **f.** 50% frente a **1)** *M. roreri* **2)** *A. flavus* **3)** *F. solani.* **Ct:** Control positivo (trozo de pulpa o corteza inoculado sólo con el fitopatógeno). **R1-R3** (réplicas)

En este ensayo se realizó una medición cualitativa del crecimiento, y basado en ello no se encontró un efecto completamente inhibitorio de la AgNP, ya que como se muestra en la figura 9 en la fila 1 (la cual corresponde a la concentración más alta de AgNPs = 100%) de cada ensayo, en al menos una de las réplicas se presentó crecimiento de los tres patógenos del cacao.

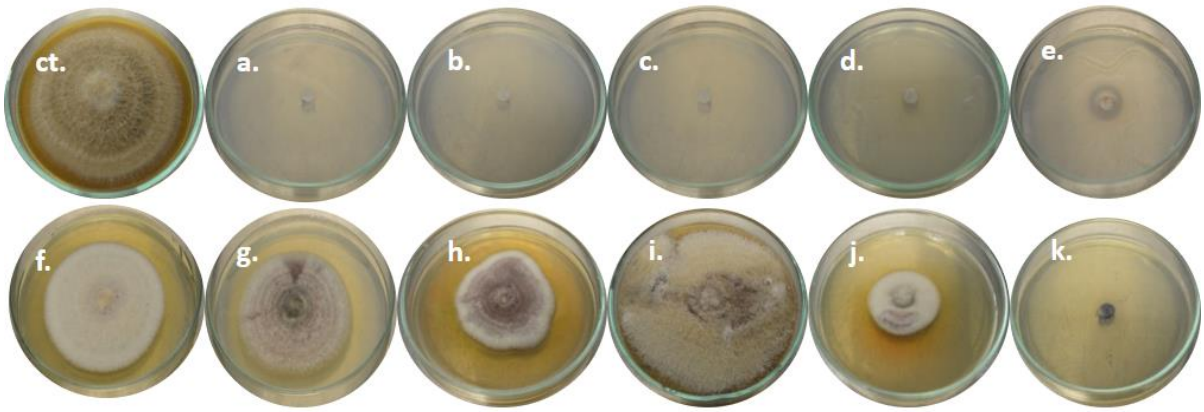
Por otra parte, el patógeno que tuvo mayor resistencia fue *F. solani.* Este hecho, corrobora los resultados vistos en los ensayos *in vitro* donde a pesar de no encontrar diferencias significativas entre las velocidades medias de crecimiento, en general el crecimiento de *F. solani* fue mayor en los dos medios, comparado con los otros dos patógenos. Además, se observó que la corteza modificada con AgNP presenta una mayor resistencia a los patógenos comparado con la pulpa, lo cual se atribuye a la facilidad de acceso por parte de los fitopatógenos a tejido blando, donde su acción enzimática es más efectiva.

6.3. ENSAYO CON ACEITES ESENCIALES

Dentro de los métodos tradicionales para el control de enfermedades se encuentran los fungicidas de síntesis química, ampliamente utilizados, así mismo se han buscado nuevas alternativas de solución dentro de las cuales se encuentran el control cultural, que consiste en la remoción de frutos enfermos, podas sanitarias y remplazo de árboles susceptibles por medio de injertación y clonación, pero con resultados que no son completamente efectivo. Y es allí donde los aceites esenciales demuestran resultados prometedores por la capacidad que poseen las plantas de sintetizar metabolitos secundarios con actividad fungicida.

6.3.1. Ensayo de inhibición con AEs en medio de cultivo.

En la figura 10 se ilustra los resultados del ensayo de difusión en placa de los aceites esenciales ensayados frente a *M. roreri.* Se puede observar que después de 11 días de incubación, la mayoría de los AE ejercieron un efecto inhibitorio sobre el fitopatógeno.



Fuente: Autor

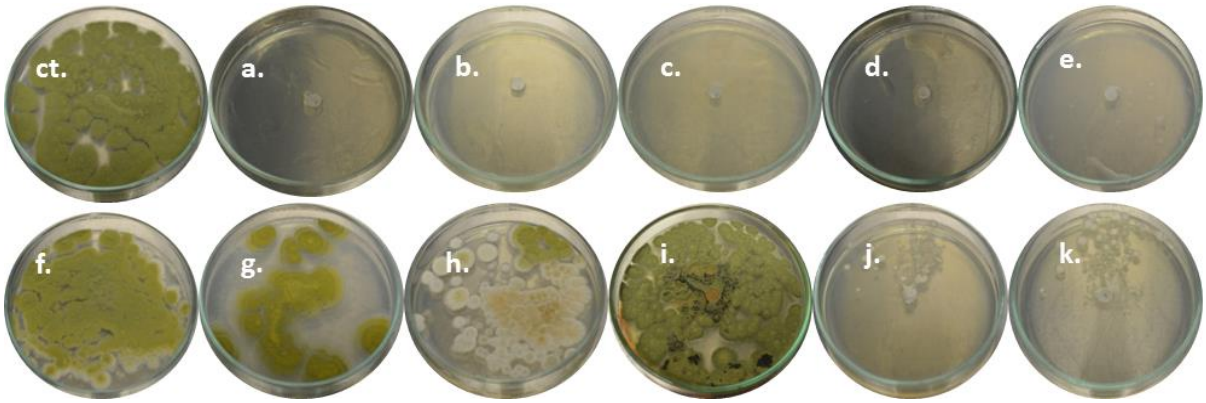
Figura 10. Ensayo de difusión en placa con aceites esenciales frente a *M. roreri* **Ct.** Control **a**. *L. origanoides* **b.** *L. alba* **c.** Eugenol **d.** Palmarrosa **e.** Anise **f.** Mandarina **g.** Limón **h.** Curcuma **i.** Oleorresina de capsicum **j.** Eucalipto **k.** Romero.

Para los aceites que no presentaron crecimiento, de la ***a*** hasta la ***e***, su vel máx es de cero ya que se observó una inhibición total, mientras que para los aceites de la ***f*** hasta la ***k*** en los que hubo crecimiento de *M. roreri*, se tomó el radio promedio del crecimiento micelial (tres repeticiones). Para tal fin, se calculó la velocidad máxima de crecimiento en dos medios de cultivo (PDA y Sabouraud) respectivamente y se observan los resultados (Tabla 5).

Tabla 5. Velocidad máxima promedio del crecimiento de *M. roreri* en medio PDA y Sabouraud para cada uno de los aceites esenciales que no mostraron actividad fungicida.

Aceite Esencial	Medio de Cultivo	Vel Máx (mm/día)
Mandarina	PDA	0.303 ± 0.0576
Mandarina	Sabouraud	0.248 ± 0.0406
Limón	PDA	0.222 ± 0.0231
Limón	Sabouraud	0.232 ± 0.0159
Curcuma	PDA	0.236 ± 0.0428
Curcuma	Sabouraud	0.217 ± 0.0355
Oleorresina de capsicum	PDA	0.32 ± 0.0441
Oleorresina de capsicum	Sabouraud	0.343 ± 0.0567
Eucalipto	PDA	0.13 ± 0.0339
Eucalipto	Sabouraud	0.206 ± 0.028
Romero	PDA	0.0928 ± 0.0326
Romero	Sabouraud	0.104 ± 0.0445
Control	PDA	0.303 ± 0.0413
Control	Sabouraud	0.294 ± 0.0478

De igual forma, se realizaron los ensayos de inhibición con el fitopatógeno *A. flavus* donde puede evidenciarse que los aceites a al e ejercieron un efecto fungicida mientras que del f al k su efecto fue fungistático.



Fuente: Autor

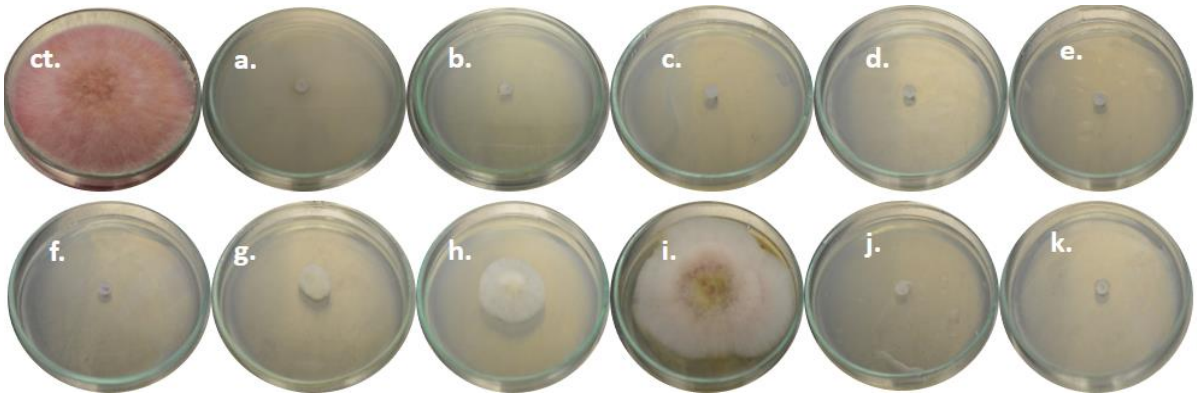
Figura 11. Ensayo de difusión en placa con aceites esenciales frente a *A. flavus* **Ct.** Control **a**. *L. origanoides* **b.** *L. alba* **c.** Eugenol **d.** Palmarrosa **e.** Anise **f.** Mandarina **g.** Limón **h.** Curcuma **i.** Oleorresina de capsicum **j.** Eucalipto **k.** Romero.

Tomando el crecimiento de *A. flavus* también se realizaron los cálculos para hallar la velocidad máxima a la que creció este patógeno en presencia de mandarina, limón, cúrcuma, oleorresina de capsicum, eucalipto y romero. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 6. Velocidad máxima promedio del crecimiento de *A. flavus* en medio PDA y Sabouraud para cada uno de los aceites esenciales que no mostraron actividad fungicida.

Aceite Esencial	Medio de Cultivo	Vel Máx (mm/día)
Mandarina	PDA	0.393 ± 0.0604
Mandarina	Sabouraud	0.421 ± 0.0477
Limón	PDA	0.268 ± 0.0328
Limón	Sabouraud	0.277 ± 0.0194
Curcuma	PDA	0.274 ± 0.0338
Curcuma	Sabouraud	0.38 ± 0.0568
Oleorresina de capsicum	PDA	0.333 ± 0.0528
Oleorresina de capsicum	Sabouraud	0.353 ± 0.0575
Eucalipto	PDA	0.243 ± 0.0414
Eucalipto	Sabouraud	0.22 ± 0.0324
Romero	PDA	0.414 ± 0.127
Romero	Sabouraud	0.338 ± 0.0432
Control	PDA	0.396 ± 0.0649
Control	Sabouraud	0.459 ± 0.0484

Finalmente, se realizaron los ensayos con *F. solani*. Los ensayos de inhibición permitieron concluir que este patógeno fue más sensible que *A. flavus* a los AE, siendo inhibido por 8 de los 11 ensayados (Figura 12).



Fuente: Autor

Figura 12. Ensayo de difusión en placa con aceites esenciales frente a *Fusarium solani*. **Ct.** Control **a**. *L. origanoides* **b.** *L. alba* **c.** Eugenol **d.** Palmarrosa **e.** Anise **f.** Mandarina **g.** Limón **h.** Curcuma **i.** Oleorresina de capsicum **j.** Eucalipto **k.** Romero.

Para el caso de los aceites en los que se presentó una inhibición total (*L. origanoides***,** *L. alba*, eugenol, palmarrosa, anise, mandarina y romero) y en ninguna de las tres repeticiones hubo crecimiento a la concentración del 100%, su velocidad de crecimiento es de cero (0). Con respecto a los demás aceites la velocidad máxima de crecimiento promedio se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Velocidad máxima promedio del crecimiento de *F. solani* en medio PDA y Sabouraud para cada uno de los aceites esenciales que no mostraron actividad fungicida.

Aceite Esencial	Medio de Cultivo	Vel Máx (mm/día)
Limón	PDA	0.173 ± 0.0281
Limón	Sabouraud	0.174 ± 0.0391
Curcuma	PDA	0.201 ± 0.0655
Curcuma	Sabouraud	0.342 ± 0.121
Oleorresina de capsicum	PDA	0.313 ± 0.0436
Oleorresina de capsicum	Sabouraud	0.396 ± 0.0607
Eucalipto	PDA	0.158 ± 0.00976
Eucalipto	Sabouraud	0.168 ± 0.0155
Control	PDA	0.318 ± 0.048
Control	Sabouraud	0.424 ± 0.0524

Los aceites esenciales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos al producir en ellos cambios morfológicos y daño en algunas estructuras celulares. Esto se debe a que las plantas sintetizan metabolitos secundarios como las fitoanticipinas, fitoalexinas, fitodefensinas, para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos entre ellos los hongos.

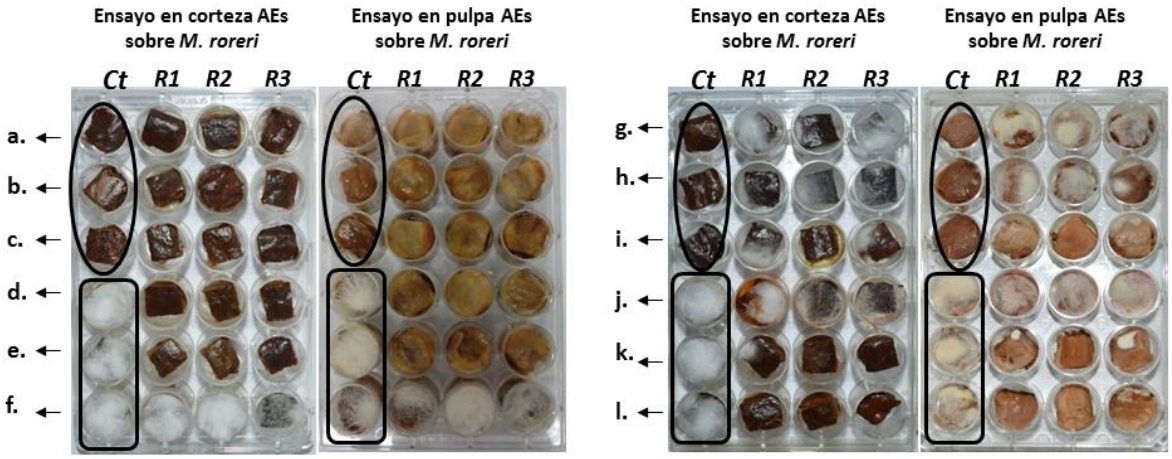
Los aceites obtenidos a partir de especies de *Lippia spp*., Eugenol, Palmarosa y Anise, exhibieron el mejor efecto fungicida frente a *Moniliophthora roreri*, *Aspergillus flavus*, y *Fusarium solani*, inhibiendo totalmente su crecimiento. Los aceites esenciales provenientes de especies de *Lippia spp*. ejercen un efecto antifúngico sobre hongos fitopatógenos del cacao, debido a su composición química timol, carvacrol y p –cimeno (Tabla 2). Un estudio realizado por Lozada *et al*., 2014 reporta resultados similares donde la especie *L. origanoides* a concentración de 200 µg/ml tiene un efecto activo sobre el crecimiento y germinación de *M. roreri*.

Para *Fusarium solani* se observó que todos los aceites ensayados a excepción de oleorresina de capsicum y cúrcuma funcionaron bien. Según Fisher y Phillips (2008) los componentes de los aceites esenciales de naranja, y de limón son efectivos para el control de patógenos en frutos, gracias a la composición química de los mismos, dentro de los cuales se encuentran el limoneno que es un terpeno y el β-pineno. La sensibilidad por parte de *F. solani* se debe a su estructura pues las macroconidias tienen cavidades que les hace que sean más sensibles en comparación con otros fitopatógenos.

De la misma forma que con las pruebas de difusión en agar se muestra que en las muestras inoculadas con el hongo fitopatógeno *A. flavus* en los aceites mandarina, limón, oleorresina de capsicum y cúrcuma no se ningún efecto de inhibición. La evaluación de la actividad fungicida del aceite esencial extraído Oleorresina de capsicum sobre las cepas de los tres fitopatógenos ensayados fue mucho menor si se la compara con la mostrada por los demás aceites, ya que no fueron afectados por los componentes de ese aceite esencial. Por otro lado, los demás aceites esenciales (cúrcuma, limón) ejercieron un efecto fungistático sobre los patógenos cambiando su pigmentación como se puede apreciar en las figuras anteriores.

6.3.2 Ensayo de inhibición con AEs en planta.

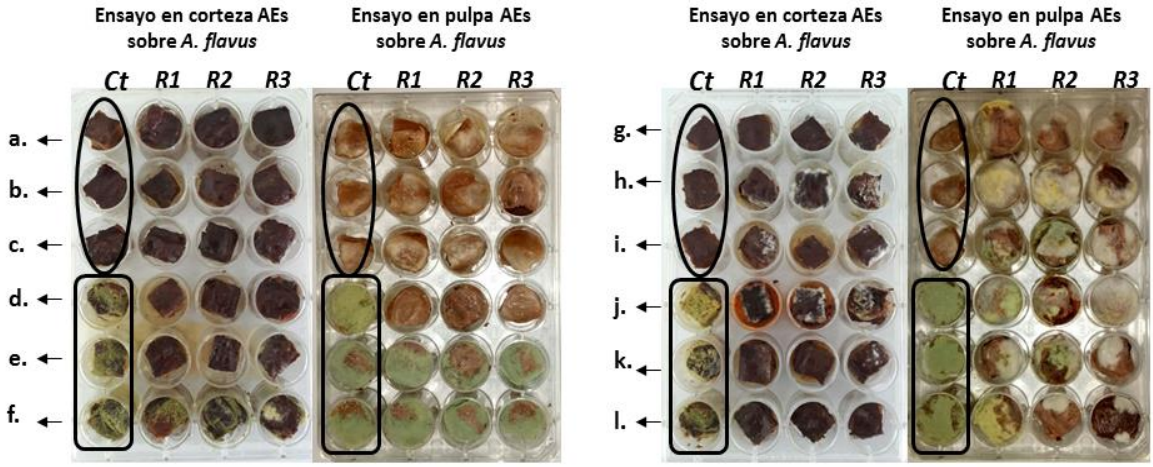
Posteriormente se realizaron las pruebas directamente sobre el cacao, y se ordenaron en los seroclusters de la siguiente forma. Los seis aceites más efectivos se ubicaron primero y se enumeraron con letras de la **a-e,** mientras que los que demostraron ser menos efectivos se ubicaron de último con letras **f-k.** Teniendo en cuenta este mismo orden se ubicaron los aceites para probar su efecto frente a los tres hongos fitopatógenos. Se emplearon tres pocillos que contenían la corteza o la pulpa de cacao inoculados con los patógenos correspondiente como controles positivos, adaptado de Nasrollahi *et al.,* (2011). Y se emplearon como control negativo la corteza y la pulpa de cacao sin inocular ubicado en la parte izquierda de cada ensayo y señalado en la figura 13 para diferenciar.



Fuente: Autor

Figura 13. Ensayo de inhibición en planta con aceites esenciales frente a *Moniliophthora roreri* sobre corteza de cacao **a.** *L* **a.** *L. origanoides* **b.** *L. alba* ***c.*** Eugenol **d.** Palmarrosa **e.** Anise **f.** Ajo **g.** Mandarina **h.** Limón **i.** Curcuma **j.** Oleorresina de capsicum **k.** Eucalipto **l.** Romero.

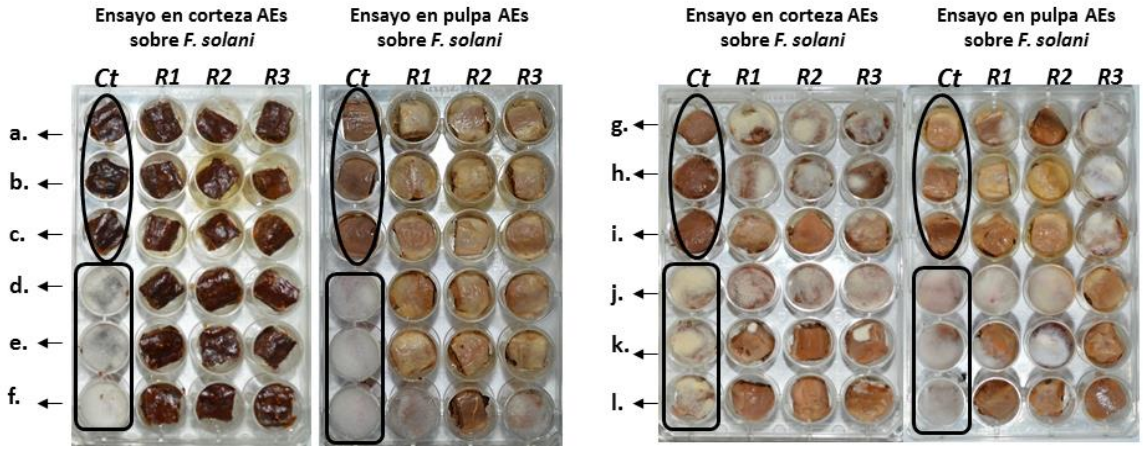
Se pudo evidenciar que no hubo crecimiento ni sobre la corteza ni sobre la pulpa de cacao para los aceites seis primeros aceites correspondientes a *L. origanoides, L. alba*, eugenol, palmarosa, y anise respectivamente, demostrándose un efecto fungicida sobre el patógeno ensayado.



Fuente: Autor

Figura 14. Ensayo de inhibición en planta con aceites esenciales frente a *Aspergillus flavus* sobre corteza de cacao **a.** *L. origanoides* **b.** *L. alba* ***c.*** Eugenol **d.** Palmarrosa **e.** Anise **f.** Ajo **g.** Mandarina **h.** Limón **i.** Curcuma **j.** Oleorresina de capsicum **k.** Eucalipto **l.** Romero.

Con respecto a *Aspergillus flavus* los aceites ***a, b, c, d, e,*** se observa un efecto fungicida, mientras que con los aceites ***g, h, i, j, k,*** tan solo lograron reducir el crecimiento y se demostró un efecto fungistático.



Fuente: Autor

Figura 15. Ensayo de inhibición en planta con aceites esenciales frente a *Fusarium solani* sobre corteza de cacao **a.** *L. origanoides* **b.** *L. alba* ***c.*** Eugenol **d.** Palmarrosa **e.** Anise **f.** Ajo **g.** Mandarina **h.** Limón **i.** Curcuma **j.** Oleorresina de capsicum **k.** Eucalipto **l.** Romero.

El efecto de acción de los aceites esenciales tiene una estrecha relación entre la composición del aceite empleado y la actividad biológica, ya que la composición de volátiles puede variar afectando el grado de actividad observado. La fuerte actividad de aceites esenciales sobre la germinación de las esporas de hongos, posiblemente está relacionada con algunos componentes que afectan principalmente la pared celular de las conidias impidiendo su germinación y crecimiento. Los compuestos carvracol, timol y aldehído cinámico han demostrado una total inhibición del crecimiento micelial a diferentes concentraciones, el timol altera la membrana celular, así como la formación de tubos germinales y apresorios, estructuras indispensables para el inicio de la infección en los tejidos vegetales (reportado por Svircev *et al*., 2007 citado por Lozada *et al.,* 2012).

De acuerdo con los resultados obtenidos frente al efecto antifúngico de los 11 aceites esenciales concentrados puros de distintas plantas (frutales, herbáceas, y ornamentales) y especias, se encontró que un grupo de estos aceites constituidos por *L. origanoides*, *L. alba*, eugenol, palmarosa y anise inhibieron completamente el crecimiento de los tres patógenos del cacao *M. roreri*, *A. flavus*, y *F. solani.* Otro grupo de aceites puros obtenidos de la mandarina y el romero que logro inhibir solamente el crecimiento *F. solani;* y un grupo final que no presentó ninguna actividad frente a los fitopatógenos ensayados.

Teniendo en cuenta los resultados presentados anteriormente, se realizaron las pruebas en medio de cultivo para determinar el rango de concentraciones a los cuales el primer grupo de aceites ejerce su acción fungicida, esto de cara a una potencial aplicación en campo.

6.3.3. Rango de concentraciones para aceites esenciales con mayor actividad fungicida.

Se realizó un previo screening para descartar las concentraciones altas, este permitió establecer el rango de las concentraciones más bajas, bajo los cuales se ejerce actividad inhibitoria frente a los hongos *M. roreri*, *A. flavus*, *F. solani.* Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Sensibilidad fúngica ante aceites esenciales de especias, herbáceas y frutales.

Aceite Esencial	Fitopatógeno	[1%]	[5%]	[15%]	[25%]
Lippia origanoides	*M. roreri*	+	+	-	-
	A. flavus	-	-	-	-
	F. solani	+	-	-	-
Lippia alba	*M. roreri*	+	+	-	-
	A. flavus	+	-	-	-
	F. solani	+	+	+	-
Eugenol	*M. roreri*	+	-	-	-
	A. flavus	+	-	-	-
	F. solani	+	-	-	-
Palmarosa	*M. roreri*	+	+	+	-
	A. flavus	+	+	+	-
	F. solani	+	+	+	-
Anís	*M. roreri*	+	+	-	-
	A. flavus	+	+	-	-
	F. solani	+	+	-	-

"+": Crecimiento del fitopatógeno.
"-" : Ausencia del crecimiento del fitopatógeno.

Se puede establecer que el aceite con mayor actividad anifungica es el eugenol, ya que en este se encontró la concentración más baja (1-5%) con la que hubo inhibición del crecimiento para *M. roreri*, *A. flavus* y *F. solani,* seguido de *Lippia origanoides,* y de *L. alba.* Para el aceite de anís el rango se encuentra entre el 5% y el 15% y para palmarosa 15-25% (rango mayor). El aceite de clavo de olor de donde se obtiene el eugenol ha sido ampliamente investigado debido a su popularidad, vasta disponibilidad y alto rendimiento, incluso, el aceite de esta especia ha sido considerado por sus propiedades antimicrobianas (Aguilar *et al.,* 2013) pero no se ha tenido en cuenta como un posible agente de control para enfermedades en

plantaciones de cacao. En esta investigación se muestra la posibilidad de llevar a cabo ensayos con aceites efectivos a concentraciones relativamente bajas para mejorar el rendimiento y la calidad de cultivos de cacao.

6.4. ANALISIS ESTADISTICO

Para los aceites que mostraron poca o nula actividad antifúngica se llevó a cabo una cinética de crecimiento durante 11 días tanto en agar PDA como saboureaud con el objetivo de determinar cuál o cuáles de ellos pueden retrasar en mayor medida el desarrollo de los hongos probados. A continuación, se muestra el resultado del análisis de varianza Multiple para los aceites que no presentaron inhibición al 100% frente a los distintos fitopatógenos en los dos medios de cultivo.

Tabla 9. Análisis de Varianza para Velmax aceites esenciales en función del aceite esencial, fitopatógenos y medio.

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Aceite	1,27235	6	0,212058	13,63	0,0000
B:Fitopatogeno	0,348969	2	0,174485	11,22	0,0000
C:Medio	0,0000160714	1	0,0000160714	0,00	0,9744
RESIDUOS	1,80449	116	0,0155559		
TOTAL (CORREGIDO)	3,42582	125			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En la tabla MANOVA anterior, la variabilidad observada en la Velocidad máxima de crecimiento de los fitopatógenos se descompone en las contribuciones debidas a los factores: tipo de aceite, fitopatógeno y medio de cultivo, midiendo la contribución de cada factor eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P obtenidos prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. En este caso, 2 de los valores-P fueron menores que 0,05, indicando que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la Velocidad máxima de crecimiento con un 95,0% de nivel de confianza. Dichos factores con efecto significativo fueron el tipo de aceite y el fitopatógeno, indicando que la velocidad de crecimiento se ve afectada principalmente por estos dos factores independientemente del medio de cultivo evaluado.

Tabla 10. Valores medios para velocidad de crecimiento en función de los factores evaluados, con intervalos de confianza del 95%

			Error	*Límite*	*Límite*
Nivel	*Casos*	*Media*	*Est.*	*Inferior*	*Superior*
MEDIA GLOBAL	126	0,253024			
Aceite					
Control	18	0,356889[c]	0,0293976	0,298663	0,415115
Curcuma	18	0,320111[bc]	0,0293976	0,261885	0,378337
Eucalipto	18	0,189[a]	0,0293976	0,130774	0,247226

Limón	18	0,210889[ab]	0,0293976	0,152663	0,269115
Mandarina	18	0,149444[a]	0,0293976	0,0912187	0,20767
Oleorresina	18	0,410333[c]	0,0293976	0,352108	0,468559
Romero	18	0,1345[a]	0,0293976	0,0762743	0,192726
Fitopatógeno					
A. flavus	42	0,326881[a]	0,0192452	0,288763	0,364999
F. solani	42	0,208143[b]	0,0192452	0,170025	0,246261
M. roreri	42	0,224048[b]	0,0192452	0,18593	0,262165
Medio					
PDA	63	0,253381[a]	0,0157137	0,222258	0,284504
SABOUREAUD	63	0,252667[a]	0,0157137	0,221544	0,28379

En cuanto al efecto de los aceites que no presentaron actividad antifúngica al 100% la prueba de múltiples rangos de HDS de tukey identifico 3 grupos homogéneos constituidos de la siguiente forma. Un primer grupo con los aceites romero, mandarina, eucalipto y limón los cuales presentaron la mayor capacidad de retardar el crecimiento, siendo el romero el que tiene el mayor poder "inhibitorio" ya que en general las velocidades medias en este aceite fueron las más bajas (0.1345 mm/día), mientras que el limón obtuvo el menor valor de inhibición dentro de este grupo (0.2109 mm/día). Un segundo grupo constituido por los aceites limón y cúrcuma y finalmente un tercer grupo que reúne a los aceites de cúrcuma, oleorresina de capsicum y el control, en este grupo la oleorresina no demostró capacidad de retardar el crecimiento de los fitopatogenos ya que la velocidad media obtenida fue mayor incluso que la del control (0.4103 mm/día – 0.3569 mm/día, respectivamente).

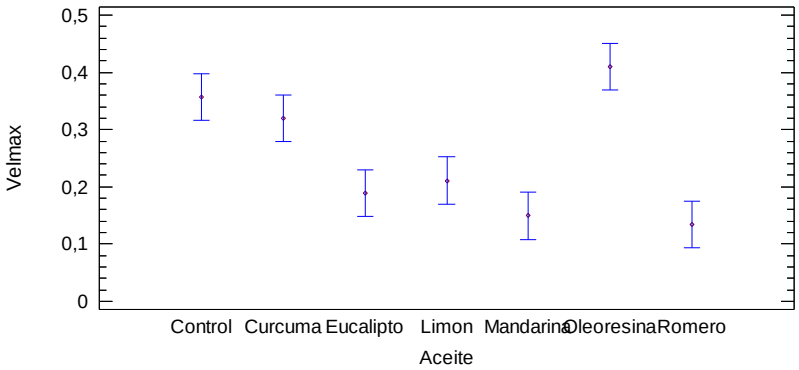


Figura 16. Gráfica de medias e intervalos de incertidumbre del 95% de HSD Tukey para la velocidad de crecimiento con cada aceite probado.

Con respecto a los fitopatógenos, *A. flavus* presento la mayor velocidad de crecimiento con una media 0.3269 frente a *F. solani* y *M. roreri*; los cuales presentaron una velocidad media de 0.2081 mm/día y 0.2240 mm/día respectivamente, indicando que en general *A. flavus* se vio menos afectado por los distintos tipos de aceites que los otros dos patógenos del cacao; en este sentido se pueden encontrar dos grupos homogéneos mediante la prueba HSD de Tukey, un

grupo conformado únicamente por *A. flavus* y un segundo grupo compuesto por los otros dos hongos.

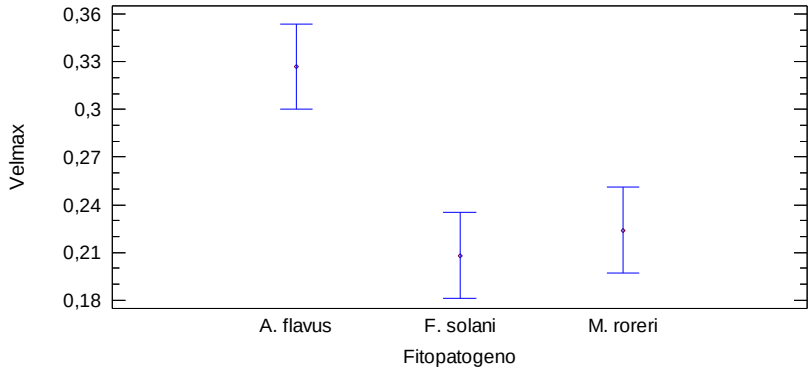


Figura 17. Gráfica de medias e intervalos de incertidumbre del 95% de HSD Tukey para la velocidad de crecimiento con cada fitopatógenos evaluado.

Por otra parte, al analizar si los medios de cultivo evaluados influyen significativamente sobre la velocidad de crecimiento de los fitopatógenos para cada uno de los aceites, no se encontraron diferencias significativas ya que en general las velocidades de crecimiento fueron muy similares para el agar PDA y saboureaud (0.2534 mm/día y 0.2527 mm/día respectivamente). Esto indica que el medio de cultivo no interfiere con el crecimiento de los hongos, pudiendo usarse cualquiera de ellos para llevarse a cabo las determinaciones de CMI para los aceites puros que inhibieron el crecimiento de los hongos.

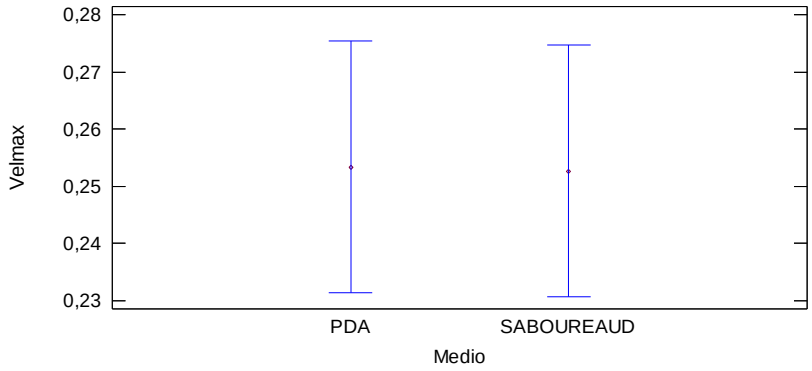


Figura 18. Gráfica de medias e intervalos de incertidumbre del 95% de HSD Turkey para la velocidad de crecimiento en cada medio de cultivo evaluado.

Despues de observar el efecto de los agentes de control estudiados y compararlos de acuerdo a su efectividad, cabe resaltar que cada uno de estos de acuerdo a sus propedades presentan una serie de beneficios y limitaciones en el uso como potenciales fungicidas. Dentro de estas caracteristicas que los hacen dirferentes entre si se encuentra: capacidad de proteger el fruto, efectividad a bajas

concentraciones, inocuidad frente a los mamiferos, baja residualidad, intervencion en los procesos biologicos de la plata, control ejercido frente a cepas resistentes, modo de aplicación, accesibilidad *etc*. Algunas de las ventajas y desventajas mas importantes de los hongos antagonistas, las nanoparticulas de plata y los aceites esenciales se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Ventajas y desventajas del tratamiento con hongos antagonistas, AgNPs, y aceites esenciales como agentes control biológico.

TRATAMIENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Hongos Antagonistas	- Secreta enzimas que disuelven la pared celular y absorbe los nutrientes del interior del hongo huésped. -Estimula el crecimiento de las plantas.	- No hay un fijador, que sea capaz de colocar el hongo antagonista en la parte aérea de la planta. - Podría llegar a ser lento.
Nanopartículas de plata	- La síntesis verde es fácil, rápida económica, y presenta una baja residualidad. - Las NP tienen alta estabilidad que podría proporcionar mayor protección al fruto.	-Se requieren altas concentraciones para aumentar su efecto fungicida. - Podría llegar a ser fitotóxico.
Aceites esenciales	- Sirve como barrera física ante la incidencia de esporas. - No genera residuos químicos y no es perjudicial para la salud. La diversidad de componentes no genera resistencia.	- Un aceite con alta viscosidad forma una panícula que podría alterar la respiración de las plantas. - Alteración del aroma y el sabor del grano expuesto.

La importancia que tiene el desarrollo de esta investigación relacionada con cultivos de cacao se debe a la necesidad de implementar agentes de control biológico que promuevan un desarrollo rentable en el cultivo del departamento Norte de Santander ya que frecuentemente los métodos tradicionales utilizados, el manejo postcosecha inadecuado, y los bajos niveles de tecnificación, conllevan a una disminución de en la producción. A pesar de este tipo de situaciones, las oportunidades en el sector cacaotero del departamento es alta, y la alta demanda de cacao y sus derivados permiten que se impulse la productividad para poder llegar incluso a mercados internacionales (Rodriguez, *et al.* 2016).

Los factores más importantes que intervienen negativamente en la productividad del cacao es la presencia de hongos fitopatógenos, entre estos la especie *M. roreri* ya que este ocasiona una de las enfermedades más relevante del cultivo de cacao, llegando a alcanzar incluso pérdidas de hasta el 100% del cultivo (Álvarez, Martínez, & Coy, 2014). Así mismo, a nivel de fitopatógenos frecuentemente encontrados en cultivos de cacao del departamento Norte de Santander son *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Villamizar *et al.,* 2016 in press) los cuales aprovechan el deterioro de la vaina de cacao causado por patógenos primarios con fuerte actividad enzimática, terminando de invadir la mazorca hasta llegar a su completa degradación (Cuervo *et al.,* 2014), así mismo tienen una alta repercusión en la salud publica ya que una vez estos contaminan el fruto pueden llegar a desarrollar a largo plazo toxicidad crónica en el ser humano al consumir alimentos contaminados con altas concentraciones. Aunque no es un tema muy común y probablemente sea desconocido por las personas, la ocratoxina A (OTA) es una sustancia natural muy tóxica para los riñones y posiblemente cancerígena, producida por especies de *Aspergillus spp.*, su problema radica en que no se elimina durante las diferentes etapas de procesamiento del grano, sino que por el contrario es resistente y en condiciones de almacenamiento factores como la temperatura y la alta humedad aumentan la producción de micotoxinas. La OTA es tan peligrosa que expertos de la FAO y la OMS han establecido un límite máximo tolerable para los humanos de 100 milmillonésimos de gramo por kilogramo de peso corporal a la semana, y a nivel mundial el límite máximo en los cereales y en productos a base de cereales es de 5 ug/kg (FAO - ONU, 2004). Los esfuerzos van enfocados a reducir la presencia de toxinas en los cereales y los productos a base de cereales (Comision de las Comunidades Europeas, 2007), para ello es necesario la implementación Buenas Prácticas Agrícolas durante la primera de trasformación, desde que se realiza la siembra hasta el transporte de los alimentos que han sido cosechados puesto que una vez contaminan el grano es muy difícil de eliminarlas debido a que son termoestables (100-150ºC), por lo que permanecen durante toda la cadena de producción alimentaria (Fundacion Vasca para la seguridad Agroalimentria, 2013),

De allí radica la importancia de obtener mazorcas de cacao sanas y granos de buena calidad libre de microorganismos patógenos y/o productores de micotoxinas. Aunque a la fecha no se cuenta con métodos completamente efectivos, esta investigación demuestra que se pueden explorar nuevos métodos amigables con el ambiente que han demostrado un alto poder de inhibición; a partir de estos resultados se pretenden realizar estudios posteriores dirigidos a aplicaciones de campo para comprobar el efecto de hongos antagonistas, AgNPs y aceites esenciales en condiciones ambientales.

7. CONCLUSIONES

De los hongos antagonistas ensayados *B. quercum* mostró un índice de biocontrol mas alto para los tres patógenos del cacao ensayados con respecto *a T. viride,* sin embargo, en aplicaciones de campo se podrían llegar a utilizar en conjunto para una mayor protección *B. quercum* dirigido en la parte aérea de la planta (hojas y mazorca) mientras que *T. viride* en aplicaciones del suelo.

Las nanopartículas de plata exhiben un efecto fungistático sobre *Monilliophtora roreri*, *Fusarium solani*, y *Aspergillus flavus* nativos del cultivo de cacao reduciendo el crecimiento de los mismos; con respecto a los aceites esenciales eugenol, *L. origanoides, L. alba*, anise y palmarosa se demostró un efecto fungicida, inhibiendo completamente el crecimiento y la esporulación de los hongos, este en conjunto con otras actividades encaminadas a mitigar la incidencia de patógenos de cacao podrían constituir una medida de control en conjunto con la remoción de mazorcas infectadas para la época de invierno y un apropiado manejo integrado del cultivo.

Los aceites esenciales demostraron un mayor efectivo antifúngico a nivel *in vitro* para el control de patógenos del cacao aislados del departamento Norte de Santander, ya que fueron los únicos que presentaron inhibición total de *M. roreri, A. flavus*, y *F. solani* en comparación con el tratamiento con hongos antagonistas y las nanopartículas de plata.

Los rangos de las concentraciones de aceites esenciales requeridas para el control efectivo de los patógenos de cacao encontradas, en orden ascendiente fueron eugenol (5-1%), *L. origanoides, L. alba* y anis (5-15%), y plamarosa (15%-25%). De acuerdo a lo anterior el eugenol es el aceite que tiene capacidad fungicida bajo un rango de concentración más baja que los demás aceites probados.

8. RECOMENDACIONES

Identificar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales, eugenol, *L. origanoides*, *L. alba*, anís y palmarosa ya que demostraron mayor actividad actifúngica a bajas concentraciones.

Llevar a cabo la síntesis química de los aceites esenciales más efectivos de esta investigación para facilitar evaluación *in situ* en plantaciones de cacao del departamento Norte de Santander.

Los principales componentes de los aceites esenciales se caracterizan por su alta volatilidad, esto limita su aplicación como agentes antimicrobianos. Para controlar dicha volatilidad, se propone analizar el potencial de la encapsulación o cargado en materiales porosos para que de esta manera no se reduzca su efectividad y así mismo poder limitar los olores y sabores fuertes de los mismos.

Evaluar el efecto antifúngico de los aceites esenciales en cultivos de cacao bajo diferentes condiciones ambientales, así como en otras localidades con diversos cultivares y en asociación con técnicas de manejo integrado.

Utilizar en conjunto el tratamiento con los hongos antagonistas, a nivel de suelo realizar la aplicación de *Trichoderma viride* para limitar el ingreso de patógenos y así mismo promover el crecimiento y desarrollo de la planta a nivel radicular, y la aplicación de *Botryosphaeria quercuum* dirigida a la parte aérea para proteger de las esporas de patógenos.

Tener en cuenta las buenas prácticas agrícolas y las buenas prácticas de higiene en el manejo de los granos. Proporcionando que la humedad, y la temperatura durante condiciones de almacenamiento para evitar la presencia de hongos micotoxigenicos tales como *A. flavus* y *F. solani* a nivel de post cosecha.

Realizar estudios posteriores a nivel *in vitro* con los tratamientos aquí empleados de biocontroladores, AgNPs y aceites esenciales frente a otros hongos fitopatógenos causantes de daños económicos en el cultivo de cacao como *Phytophthora palmivora* (mancha parda en cacao), y *Moniliophthora perniciosa* (escoba de bruja).

9. GLOSARIO

Aceites esenciales: Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser; Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), Monoterpenos, Sesquiterpenos y Fenilpropanos.

Fitopatógeno: Son organismos que frente a condiciones ambientales favorables ocasionan enfermedades en las plantas. Según Agrios, (2005); Urbina, (2011), los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes.

Fungicida: Un fungicida es un tipo particular de plaguicida que controla enfermedades fúngicas, inhibiendo o eliminando al hongo que causa la enfermedad. Los fungicidas son sustancias tóxicas que se emplean para impedir el crecimiento o para matar los hongos y mohos perjudiciales para las plantas, los animales o el hombre.

Fungistático: Agente que inhibe el crecimiento de los hongos. Dícese de las sustancias que impiden o inhiben la actividad vital de los hongos.

Micotoxinas: Son metabolitos secundarios tóxicos producidos por determinados hongos, cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales (sin excluir las aves) y personas. Las enfermedades que causan se llaman micotoxicosis.

Nanopartículas de plata: Las nanopartículas (Nps) para propósitos farmacéuticos se definen en el Handbook of Pharmaceutical Technology como las partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 1 a 1,000 nm. Consisten de materiales macromoleculares y se pueden usar terapéuticamente también como transportadores de fármacos en los cuales el principio activo (fármaco o material activo biológicamente) está disuelto, entrampado o encapsulado, o en el cual el principio activo está adsorbido o enlazado covalentemente.

10. BIBLIOGRAFIA

Acebo, Y., A. Hernández, M. Heydrich, M. El Jaziri and A.N. Hernández. (2012). Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. Fruits 67(1): 41-48.

Agbaje, L., Musibau, A., Tesleem, B., Asafa, T., Yekeen, A., Akinboro, I., Oladipo, L., Sunday, A., Evariste, B., Lorika, S. (2016). Cocoa pod husk extract-mediated biosynthesis of silver nanoparticles: its antimicrobial, antioxidant and larvicidal activities. J Nanostruct Chem 6:159–169.

Agrocadenas 1991-2005. Documento de trabajo 58. La cadena del cacao en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica. MADR.

Agropecuaria, I. colombiano. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) Medidas para la temporada invernal. Bogota-Colombia. Retrieved from http://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/-nbsp;M;anejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Cacao.aspx

Alborch, L., Bragulat, M.R., Abarca, M.L. Cabañes, F.J. (2011). Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. Int J Food Microbiol; 147: 53-57.

Álvarez, J. C., Martínez, S. C., & Coy, J. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. Acta Agronómica, 63(4), 388–399.

Amézqueta S, González E, Dachoupakan C, Murillo-Arbizu M, López De Cerain A, Guiraud JP. (2008) OTA-producing fungi isolated from stored cocoa beans. Lett Appl Microbiol. 47(3):197–201.

Amézqueta, S.; Gonzalez, E.; Murillo, M.; López de Cerain, A. (2005) Ocurrences of ochratoxin A in cacao beans: effect of shelling. Food Addit Contam A; 22: 590-96.

Amini, J., Farhang, V., Javadi, T., & Nazemi, J. (2016). Antifungal Effect of Plant Essential Oils on Controlling Phytophthora Species. The Plant Pathology Journal, 32(1), 16–24.

Bailey B, Bae H, StremM, Roberts D, Thomas S, Crozier J,Samuels GJ, Choi I-K, Holmes KA, 2006. Fungal and plant gene expression duringthe colonizationof cacao

seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. Planta 224: 1449e1464.

Belayneh, T. (2003) Evaluation of native *Trichoderma* isolates of Ethiopia for biological control of *Fusarium solani* of faba bean. MSc. Thesis Presented to the School of Graduate Studies, Haramaya University. p. 70.

Belete, E.; Ayalew, A. (2015). Evaluation of Local Isolates of *Trichoderma spp*. against Black Root Rot (*Fusarium solani*) on Faba Bean. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 6(6). https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000279.

Cabeza R. (2013). Determinación de la composición química de extractos de Plutarchia coronaria y evaluación de su actividad antimicrobiana sobre algunos microorganismos de interés alimentario. Universidad de Pamplona.

Clemencia, G.; Luis, C.; Laura, A.; José, S.; Carmen, C.; Rafael, O.; Libert, S. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (Citrus sinensis L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). Rev. Soc. Ven. Microbiol., 81–87.

Comisión de las Comunidades Europeas. (2007). Recomendación de la Comisión de 17 de Agosto de 2006 sobre la prevención y la reducción de las toxinas de Fusarium en los cereales y los productos a base de cereales.

Copetti, M.; Iamanaka, B.; Pitt, J.; Taniwaki, M. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. International Journal of Food Microbiology. 2014. 178: 13–20.

Cuervo, J.; Sanchez, T.; Romero, M.; Ramrez, M. (2014). Hypocrea/*Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici.* African Journal of Microbiology Research, 8(16), 1704–1712.

Darmayasa I, & Oka, I. (2016). A Study on Inhibitory Effect of *Trichoderma sp*. TKD on *Aspergillus flavus* FNCC6109 and Its Molecular Identification. International Journal of Pure and Applied Bioscience, 4(2), 103–110.

Djordjevic M, Djordjevic O, Djordjevic R, Mijatovic M, Kostic M, Todorovic G, Ivanovic M (2013) Alternativa Enfoque en el control del patógeno del tomate mediante el uso de aceites esenciales In vitro. Pakistán Journal of Botany.45: 1069-1072.

El Khoury A, Atoui A. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. Toxins 2010; 2(4): 461-93.

Faeth SH, 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? Oikos 98: 25e36.

FAO - ONU. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones. Estudio FAO. Alimentación Y Nutrición, 45.

FAO/OMS (2014). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas. Comisión del Codex Alimentarius, CAC/RCP 51/3: 6.

FAO/OMS (2016). Anteproyecto de anexos al código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas. Roma.

Fedecacao (2012). Guía técnica del cultivo de del Cacao. Federación Nacional de Cacaoteros. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Fedecacao (2015). Cacaoteros de Norte de Santander aspiran a producir 2.000 toneladas para este año. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Fedecacao (2016). El cacaocultor es lo primero. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Fundación Vasca para la seguridad Agroalimentaria. (2013). Fumonisinas (Vol. 1).

Galindo, J. (1986). Identificación de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) EN LA FINCA BULBUXYA, SAN MIGUEL PANAN SUCHITEPÉQUEZ pág 15-1. Seminario taller de fitopatología (1986, Panamá). Memorias del taller de fitopatología. Panamá, AID IROCAP. P. 58-66.

García D., Ramos A.J., Sanchis V., Marín S. (2009). Predicting mycotoxins in foods: a review. Food Microbiol., 26: 757-769.

García D., Ramos A.J., Sanchis V., Marín S. (2010). Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions. Food Microbiol., 27: 909-917.

García D., Ramos A.J., Sanchis V., Marín S. (2011). Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. Food Microbiol., 28: 406-417.

Gelvez M, Reyes R, Avendaño A, Mendoza L, Duez F. (2016) PATAXTE (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.): ESPECIE SUBUTILIZADA EN MÉXICO. Agro Product. 9:41–7.

Gorantla JN, Nishanth Kumar S, Nisha GV, Sumandu AS, Dileep C, Sudaresan A, Sree Kumar MM, Lankalapalli RS & Dileep Kumar BS (2014) Purification and characterization of antifungal phenazines form a fluorescent Pseudomonas Strain FPO4 against medically important fungi. J. Mycol. Medicale. 24:185-192.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. (2004). *Trichoderma* species e opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2: 43e56.

Ica. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) Medidas para la temporada invernal, 5. Retrieved from http://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/-nbsp;M;anejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Cacao.aspx

ICCO (2013) International Cocoa Organization. Quarterly Bulletin of Statistics.

INFANTE D, MARTINEZ G, GONZALEZ N, REYES Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Protección Vegetal, 2.009; 24 (1): 14-21.

Jaimes Suárez Yeirme y Aranzazu Hernández Fabio (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Corpoica. Colombia. 90 p.

Judet-Correia, D., Bollaert, S., Duquenne, A., Charpentier, C., Bensoussan, M., Dantigny, P. (2010). Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. Int J Food Microbiol., 142: 106-113.

Karunaratne, D.N. 2007. Nanotechnology in medicine. J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka, 35: 149-152.

Krauss, U., E. Hidalgo, R. Bateman, V. Adonijah, C. Arroyo, J. García, J. Crozier, N.A. Brown, G. M. ten Hoopen and K. Holmes. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). Biological Control 54(3): 230-240.

Lahlali, R., Serrhini, M.N., Friel, D., Jijakli, M.H. (2007). Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. Int J Food Microbiol., 114: 1-9.

Layani, M., Grouchko, M., Shemesha, S., Magdassi, S. 2012. Conductive patterns on plastic substrates by sequential inkjet printing of silver nanoparticles and electrolyte sintering solutions. J. Mater. Chem., 22: 14349-14352.

Lee, S. O.; Ja, G. K.; Soo, K. J.; Kyoung, H. L.; Yun, K. C.; y Jin Cheol, K. 2007. The antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvestand soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathol. J. 23:97 - 102.

Maine, E., Thomas V.J., Bliemel, M, Murira, A, Utterback, J. 2013. The emergence of the nanobiotechnology industry. Nat Nanotechnol. doi: 10.1038/nnano.2013.288

Maridueña G, Jiménez MI, Peralta E. (2010). Actualización de la Micobiota Patogénica del Cacao (*Theobroma cacao*) presente en la Costa Ecuatoriana. Rev Técnológica ESPOL – RTE. 23:21–6.

Maridueña, G. Jiménez, M.I. Peralta E.L. Actualización de la Micobiota Patogénica del Cacao "arriba" (*Theobroma cacao*) presente en la Costa Ecuatoriana. Guayaquil. Diciembre, 2010 Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador / Ecuador.

Martinez, D. H. (2015). Caracterización de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L) por su respuesta de defensa a *Moniliophthora roreri* y su polimorfismo de SSRs.

Meepagala, K. M.; G. Sturtz and D. E. Wedge. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of Artemisia drancunculus L. var. dracunculus. J. Agric. Food. Chem. 50:6989-6992.

Mejia, L., Rojas, E., Zuleyka, M., Van, S Arnold, A Hebbar, P., Samuels, G., Robbins, N., & Herre, E. (2011). Caracterización morfológica de hongos endófitos asociados a cacao nativo y su capacidad antagónica para el control de *Moniliophthora perniciosa*. ELSEVIER.

Melnick RL, Zidack NK, Bailey BA, Maximova SN, Guiltinan M, Backman PA, 2008. Bacterial endophytes: Bacillus spp. From annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. Biological Control 46: 46e56.

Méndez, A.; Moreno, E. (2009). Las micotoxinas: CONTAMINANTES NATURALES de los alimentos. Comunicaciones libres. Pag. 1, 6.

Mihaliak, C.A.; J. Gershenzo and R. Croteau. 1991. Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants, implication for theories of plant chemical defense. Oecologia 87:373-376.

Moreta M, A. A. (2015). Evaluación de la actividad antifúngica en *Moniliophthora roreri* de frutos de cacao (*Theobroma cacao* l) de extractos de látex de sande de Brosimum utile KUNTH.

Nasrollahi A.; Pourshamsian K.; Mansourkiaee P. (2011) Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. Int J Nano Dimens 1:233-239.

Nguyen P.; Strub, C.; Fontana A.; Schorr-Galindo S. (2017) Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. J Nanostruct Chem (2016) 6:159–169.

Oliveros, D., y Pérez, S. (2013). Medición de la competitividad de los productores de cacao en una región de Santander, Colombia. Revista Lebret (5). Bucaramanga, Colombia: Universidad Santo Tomás, pp 243-267.

Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2004). Prediction on fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. Int J Food Microbiol., 95: 79-88.

Peshin R, Dhawan A. 2009. Integrated Pest Mana- gement: Innovation-Development Process.

Phillips-Mora, W. 2008. Jefe Programa Mejoramiento Genético de Cacao.Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).Apartado 7170, Turrialba, Costa Rica. wphillip@catie.ac.cr

Phillips-Mora, W., Leal A. A., Mata A.Q., Motamayor A.JC. 2012. Catálogo de Clones de Cacao. CATIE. Manual técnico. Turrialba-Costa Rica. No. 155

Rahman, A., Begum, M. F., Rahman, M., Bari, M. a, Ilias, G. N. M., & Alam, M. F. (2011). Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. Turkish Journal of Biology, 35(January), 183–194. https://doi.org/10.3906/biy-0905-8

Reyes, S. (2016). Diario El Comercio. Colombia. La exportación de cacao cayó 14% por plagas. Recuperado de: http://www.elcomercio.com/actualidad/exportacion-cacao-caida-plagas-enfermedades.html.

Rivera L. E., Ramos A.P. (2014) Actividad antimicótica de nanopartículas. 7(12).

Rodríguez, L., López, Y., Vásquez, E. (2016). El cacao en Norte de Santander, oportunidades y retos, 17–32.

Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W. V, Maki, C. S., Araújo, W. L., Dos Santos, D. R., y Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of Crinipellis perniciosa, causal agent of Witches' Broom Disease. International Journal of Biological Sciences, 1(1), 24–33. https://doi.org/10.7150/ijbs.1.24

Rural, M. de A. y D., Colombia, R. de. (2012). Plan de Desarrollo Cacaotero 2012-2021, 30.

Sánchez, C. (2015) La opinión. Cacaoteros aspiran a producir 2.000 toneladas para este año.. Recuperado de: http://www.laopinion.com.co/economia/cacaoteros-aspiran-producir-2000-toneladas-para-este-ano-98417

Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (2000). Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

Serna S, Diaz J, Vargas M, Duran J. (2014) Control químico y biológico de *Fusarium solani* aislado de frutos de calabaza pipiana. Foro Estud sobre Guerr. 1(1):49–51.

Stashenko, E.; Martínez, J. R.; Ruíz, C. A.; Arias, G.; Duran, C.; Salgar, W.; y Cala, M. 2010. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. J. Sep. Sci. 33:93 - 103.

Suárez, L y C. Cabrales. (2008). Identificación de las especies de cepas nativas de *Trichoderma sp*. y *Bacillus sp*. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *M. roreri* en el departamento de Norte de Santander. Universidad Francisco de Paula Santander 13(1): 45-56.

Suárez, L. y R. Alba. (2013). Aislamiento de microorganismos para el control biológico de *Moniliophthora roreri*. Acta Agronómica 62(4): 370-378.

Suárez, L., Rangel, A. L. (2014). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. Acta Agronómica, 62(4), 370–378.

Superintendencia de Industria y Comercio. (2005). Cadena Productiva Del Cacao: Diagnóstico De Libre Competencia, 6.

Szekeres A, Leigeb B, Kredics L, Manczinger L, Vagvolgy C. (2006) A Novel, image analysis based method for the evaluation of in vitro antagonism. Journal of Microbiological Methods. 65 (3): 619-622

Téllez A., Cruz MG., Mercado Y., Torres Asaff A, Arana A. (2009) Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Rev. Mex. Mic. 30: 73-80.

Valenzuela, J., Fernández, J., Restrepo A., Aristizabal, R. (2012) El cultivo de cacao. Paquete tecnológico compañía nacional de chocolates S.A.S. Recuperado dehttps://chocolates.com.co/sites/default/files/default_images/paquete_tecnologico_cacao_cnch_enero_2012.pdf

Villamil, E.; Blanco J.; y Viteri S.; (2012). Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 2012, 65(1): 6305-6315.

11. ANEXOS

Anexo 1. Registro fotográfico de la capacitación a cacaocultores en la Federación Nacional de Cacaoteros FEDECACAO (Cúcuta Norte de Santander).