

Apoyo al aislamiento y multiplicación de *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et. al. y *Phytophthora* sp. del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros en San Vicente de Chucurí.

Danilo Santos Alvear

Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Agrarias
Ingeniería Agronómica
Pamplona
2020

Apoyo al aislamiento y multiplicación de *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et. al. y *Phytophthora* sp. del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros en San Vicente de Chucurí

Danilo Santos Alvear Cód. 1050555022

Proyecto de grado presentado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo

Director

Leónides Castellanos González

Ingeniero Agrónomo

MSc. Ciencias Agrícolas

Ph D. Ciencias Agrícolas

Codirector

Diannefair Duarte

Ingeniero Agrónomo

Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería Agronómica

Pamplona

2020

Dedicatoria:

Principalmente a Dios, por permitirme haber llegado a este punto de mi carrera lleno de mucha sabiduría, conocimiento y dedicación para superar cada una de las situaciones presentadas.

A mis padres Dauded Aquiles Santos Zambrano y Arelis Alvear del Villar por todo el apoyo brindado a lo largo de este proceso, por la confianza depositada en mí, los valores y principios que me han llevado a ser una persona de bien. Por todo el ejemplo de pujanza y superación que han depositado en mí a lo largo de la vida y especialmente por todo el amor y cariño brindado.

A mi familia, amigos y demás personas que me acompañaron a lo largo de este proceso académico, por cada colaboración, cada granito de arena aportado para que esto pueda ser posible.

DANILO SANTOS ALVEAR

Agradecimientos:

Principalmente a mi Tutor y compañero Dr. Leónides Castellano González por aceptar ser mi guía en esta práctica empresarial, por cada consejo e idea brindada para mejorar cada día en mi proceso de aprendizaje y en especial por el tiempo brindado en cada momento requerido hasta lograr culminar este proceso.

A la Universidad de Pamplona, a los jurados de tesis y a cada docente que a lo largo de mi paso por la Unipamplona fueron partícipes de aportar conocimientos nuevos en mi proceso universitario.

A la Federación Nacional de Cacaoteros y a todo su equipo del programa de investigación, en especial a la ingeniera Diannefair Duarte por todos los conocimientos brindados a lo largo de la práctica empresarial y toda su disposición para mí.

A todos mis compañeros y amigos que me brindaron su apoyo y ayuda para que la realización de esta práctica empresarial fuera posible.

DANILO SANTOS ALVEAR

Tabla de Contenido

Capítulo 1	12
1. Introducción	12
2. Problema	14
2.1. Planteamiento del problema	14
2.2. Justificación	16
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos específicos	17
Capítulo 2	18
4. Marco contextual	18
4.1. Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO)	18
5. Marco teórico	19
5.1 Importancia del cacao.	19
5.2 El cultivo de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L).	20
5.2.1. Clasificación taxonómica	20
5.2.2. Requerimientos del cultivo	20
5.2.3. Enfermedades del cultivo de Cacao	23
6. Marco Legal	29
Capítulo 3.	30
7. Metodología	30
Descripción del área de estudio	30
7.1 Aislamiento de cepas de <i>M. roleri</i> y <i>Phytophthora</i> sp. en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros.	31
7.2. Multiplicación de aislados de <i>M. roleri</i> y <i>Phytophthora</i> sp. en condiciones de laboratorio.	33

Agar papa dextrosa (PDA).....	35
Agar Nutritivo con extracto de zanahoria.	35
7.3. Colaborar con otras tareas en el laboratorio de sanidad vegetal y en actividades de campo a solicitud de la federación nacional de cacaoteros.....	36
Apoyo a la redacción del manual de procesos del laboratorio de sanidad vegetal de la federación nacional de cacaoteros.	36
Construcción de artículo para el periódico Colombia Cacaotera.	37
Capítulo 4	37
8. Resultados.....	37
8.1. Aislamiento de cepas de <i>M. roreri</i> y <i>Rosellinia</i> sp. en laboratorio de sanidad vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros	37
8.2. Multiplicación de aislados de <i>M. roreri</i> y <i>Phytophthora</i> sp. en condiciones de laboratorio	38
<i>Phytophthora</i> sp.	38
<i>M. roreri</i>	44
8.3. Colaborar con otras tareas en el laboratorio de sanidad vegetal y en actividades de campo a solicitud de la federación nacional de cacaoteros.....	46
Apoyo técnico a actividades de campo.	46
Apoyo a la redacción del manual de procesos del laboratorio de sanidad vegetal de la federación nacional de cacaoteros.	48
Construcción de artículo para el periódico Colombia Cacaotera.	49
9. Conclusiones	51
10. Recomendaciones.....	52
11. Referencias bibliografía.....	53
12. Anexos.	58

Lista de figuras.

Figura 1. Caja madre con presencia y cortes de <i>Phytophthora</i> sp. (A); Pase de fragmento con muestra de <i>Phytophthora</i> sp. a nuevo medio Agar Nutritivo con Extracto de Zanahoria (B).	34
Figura 2. Crecimiento y presencia de <i>Rosellinia</i> sp. de R32 en caja (A); Crecimiento y presencia de <i>Rosellinia</i> sp. de R33 en caja (B); Ausencia de <i>Rosellinia</i> sp. de R34 en caja (C).....	38
Figura 3. Multiplicación de PS-36 contaminada para volver a realizar pases (A); Multiplicación de PR-64 para descarte por contaminación (B); Multiplicación efectiva de PF-29, PS-32 (C) Y (D).	44
Figura 4. Caja madre de <i>M. roreri</i> M-194 (A); Caja multiplicación efectiva <i>M. roreri</i> M-194 (B).	45
Figura 5. Selección y cosecha de frutos de variedades pertenecientes al FEDECACAO para montaje de ensayos.	47
Figura 6. Apoyo a la toma de datos en vivero de FEDECACAO.	48
Figura 7. Artículo referente a moniliasis del cacao para periódico Colombia cacaotera.....	50

Listado de Tablas

Tabla 1. Recepción de muestras de <i>Rosellinia</i> sp. e información de cada muestra con su código asignado.....	37
Tabla 2. Número de muestras de <i>Phytophthora</i> sp. multiplicadas para el mes de febrero del 2020.	39
Tabla 3. Balance muestras de <i>Phytophthora</i> sp. multiplicadas en mes de febrero del 2020.....	40
Tabla 4. Número de muestras de <i>Phytophthora</i> sp. multiplicadas para el mes de marzo del 2020	41
Tabla 5. Balance muestras de <i>Phytophthora</i> sp. multiplicadas en mes de marzo del 2020.	42
Tabla 6. Número de muestras de <i>Phytophthora</i> sp. multiplicadas para el mes de abril del 2020	44
Tabla 7. Balance muestras de <i>Phytophthora</i> sp. multiplicadas en mes de abril del 2020.	44
Tabla 8. Multiplicaciones de <i>M. roreri</i>	45
Tabla 9. Índice de los aspectos contemplados en el manual de Procedimientos que se elaboró...49	

Lista de Anexos

Anexo 1. Preparación de medios y multiplicación de <i>Phytophthora</i> sp.	58
Anexo 2. Cortes en caja madre de <i>Phytophthora</i> sp. y pase a caja nueva.	58
Anexo 3. Cortes de fragmento de raíz y lavado con agua ozonizada para aislamientos de <i>Rosellinia</i> sp.....	59
Anexo 4. Preparación y ajuste de pH de Agar Nutritivo con Extracto de Zanahoria y agar PDA.	59
Anexo 5. Preparación y auto clavado de agar PDA.....	60
Anexo 6. Multiplicaciones diarias de <i>Phytophthora</i> sp.	60
Anexo 7. Incubadoras con multiplicaciones de <i>M. royeri</i> y <i>Phytophthora</i> sp.....	61
Anexo 8. Apoyo a cosechas y selección de materiales para montajes de ensayos de vivero.....	61
Anexo 9. Multiplicación efectiva de <i>M. royeri</i> con código M-256 y M-212.	62
Anexo 10. Empaque y esterilización de vidriería de trabajo para aislamientos.	62
Anexo 11. Manual de procesos del Laboratorio de Sanidad Vegetal.	63

Resumen

Esta práctica empresarial tuvo como objetivo general apoyar al aislamiento y multiplicación de *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et. al. y *Phytophthora* sp. del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros en San Vicente de Chucurí. El primer objetivo se llevó a cabo con tres muestras de posible *Rosellinia* sp. dos de estas provenientes del municipio de Rionegro Santander y una del municipio de San Vicente del Chucurí. Estas muestras fueron procesadas en el laboratorio de sanidad vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros, a las cuales se les realizó un procedimiento de aislamiento directo a un medio de cultivo Agar Nutritivo con extracto de zanahoria, partir de segmentos de muestras de raíz con posible presencia del patógeno. Los aislamientos fueron codificados según los datos de procedencia de cada muestra, R32, R33 Y R34, para las cuales R32 y R33 dieron positivo para la presencia de *Rosellinia* sp. y R34 no presentó la presencia del patógeno. Para el segundo objetivo se realizó multiplicación de *Phytophthora* sp. y *M. roreri*. Se utilizó agar PDA para multiplicación de *M. roreri* y Agar Nutritivo con extracto de zanahoria para *Phytophthora* sp. Para el caso de *M. roreri* se realizaron multiplicaciones de 6 cepas diferentes que existían en el laboratorio, de las cuales a cada muestra se les sacó 10 copias para un total de 60 multiplicaciones y de estas el 56,6% fueron multiplicaciones efectivas. Para el caso de *Phytophthora* sp. se trabajó en el mes de febrero con 57 cepas diferentes a las cuales se les realizó 10 multiplicaciones para un total de 570 multiplicaciones entre todas las cepas, de estas se obtuvo un 50,8% de efectividad, en marzo se trabajó con 57 cepas y 5 multiplicaciones por cada una y se obtuvo un total de 54,38% de efectividad, en abril se trabajaron 36 cepas con 5 copias por cada cepa y se obtuvo una efectividad de 61,11%. El tercer objetivo se llevó a cabo en el vivero de Fedecacao y la Granja

Villa Mónica, en los cuales se brindó apoyo a labores como toma de datos de ensayos de campo, actividades de cosecha y montaje de ensayos. Al igual que la construcción desde casa del manual de los procesos que se llevan a cabo en el Laboratorio de Sanidad Vegetal y el diseño y construcción de un artículo referente a la moniliasis del cultivo de cacao para el periódico Colombia Cacaotera.

Capítulo 1

1. Introducción

En Colombia, el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), va tomando fuerza año tras año, se espera que la producción en el país aumente significativamente en el mediano plazo, es uno de los sistemas productivos con mayor proyección en el país, es una fuente de generación de nuevas oportunidades para los campesinos y está siendo utilizado para sustituir cultivos ilícitos, además es amigable con el medio ambiente y encaja muy bien en programas de establecimiento y protección de bosques tropicales (Gómez & Martínez, 2017).

Los departamentos que representan la mayor cantidad de área sembrada en el país se encuentran distribuidos así Primer lugar Santander con 51.500 hectáreas, con un 31,6%; seguido de Nariño con 14.400 y el 8,7%; y Norte de Santander con 13.300 hectáreas y el 8,2%. El cultivo de cacao tiene como principales productores los departamentos de Santander con 22,424 toneladas, Arauca 5,629 toneladas, Huila 3,787 toneladas, Antioquia 4,391 toneladas, Tolima 3,547 toneladas, Nariño 2,876 toneladas y Norte de Santander 1,814 toneladas, siendo Santander el mayor productor a nivel nacional (Federación Nacional de Cacaoteros, 2017).

El cultivo de cacao en Colombia cuenta con una serie de limitantes que no permiten el correcto desarrollo de este, dentro de estas limitantes encontramos la aparición de enfermedades, en las cuales se encuentran la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif. Y Par.) Evans et. al., la mazorca negra (*Phytophthora* sp.) y la escoba de bruja (*M. pernisi*), entre otras. La posible presencia solo de moniliasis puede llegar a generar pérdidas de hasta un 40% aunque esto va relacionado con las características agroecológicas de la zona en donde se tenga sembrado el cacao, la incidencia de la enfermedad y el mal manejo de las plantaciones pueden generar

pérdidas de un 100%. Por esto en Colombia se considera la más importante de las enfermedades (Suárez & Hernández, 2010).

Para el aislamiento de *M. royeri*, se utilizan fragmentos de mazorcas que presentan síntomas y signos de la enfermedad. Sin embargo, debido a la presencia de infecciones mixtas en ocasiones se detectan microorganismos contaminantes que limitan la eficiencia del aislamiento. Evans (1981), describió un procedimiento para lograr el aislamiento directo de *M. royeri* a partir de conidios localizados en la superficie de las lesiones de frutos enfermos. De igual forma, otros autores como Evans et al. (2003) mencionan el aislamiento a partir de colocar fragmentos de frutos directamente en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Sin embargo, estos autores no describen un protocolo detallado que defina las variedades de cacao, los síntomas y signos que deben seleccionarse, las condiciones necesarias para lograr el aislamiento monospórico, las condiciones de incubación para el crecimiento y conservación de los aislados ni definen las aplicaciones de su propuesta (Carrera, Mosquera, & Leiva, 2014).

Capítulo 2

2. Problema

2.1. Planteamiento del problema

En Colombia, el cultivo de cacao ha venido tomando importancia desde los factores económicos, social y ambiental. Cerca de unas 25.000 familias se han visto beneficiadas gracias al cultivo de cacao y la mayoría de estas llevan la cadena productiva como un proceso de economía campesina. Algunos factores de manejo del cultivo como lo son la siembra, manejo de enfermedades y en especial la moniliasis causada por *M. rozeri*, podrían generar pérdidas que varían entre un 40% y 100%, por lo cual la ubica como el factor limitante más importante dentro del cultivo. La presencia de esta enfermedad dentro de las plantaciones, ha hecho que las producciones de cacao en los últimos 10 años presenten disminuciones significativas para los productores y que para el año 2010 el país colombiano perdió cerca del 40% de sus producciones anuales, lo que para ese entonces equivaldría a unas 28.000 toneladas de grano comercial y por ello Colombia se vio en la necesidad de realizar importaciones de cacao desde otros países como Ecuador (Federación Nacional de Cacaoteros, 2010).

Dentro del cultivo de cacao, la moniliasis puede llegar a afectar solo el fruto y *Phytophthora* sp. puede llegar a afectar todos los órganos de la planta, aunque es en el fruto que tiene mayor importancia económica y productiva. El proceso de infección de *M. rozeri* dentro del fruto se puede dar cualquier momento del desarrollo de este, desde pepinos hasta mazorcas grandes, pero es en los pepinos que se encuentran en etapa inicial que se presentan con mayor frecuencia la aparición de la enfermedad. La sintomatología que se evidencia por fuera de los frutos se puede conocer por la observar la presencia de puntos aceitosos pequeños y circulares y deformaciones en los frutos pequeños denominadas “Gibas” (Jaimes & Aranzazu, 2010).

El departamento de Santander es el más productivo a nivel nacional con 51.500 hectáreas sembradas y una producción anual de 22.424 toneladas (Federación Nacional de Cacaoteros, 2016).

El municipio de San Vicente del Chucurí es el más productor en el país colombiano, por tal motivo nace la necesidad de la federación nacional de cacaoteros de crear un espacio en el cual se puedan aislar y multiplicar los principales patógenos que causan pérdidas económicas del cultivo de cacao, con el fin de buscar alternativas de control contra estas problemáticas que se presentan en gran parte del territorio nacional. Este proyecto propone principalmente apoyar técnicamente a FEDECACAO en el aislamiento y la multiplicación cepas de *M. royeri* y *Phytophthora* sp. patógenos que afectan el cultivo de cacao en las diferentes zonas del país, con el fin de crear un banco de cepas de estos microorganismos y a partir de estas mismas empezar a realizar estudios en laboratorio de sanidad vegetal de la federación nacional de cacaoteros en el municipio de San Vicente del Chucurí con el fin de buscar alternativas de control ante estas enfermedades que causan grandes pérdidas económicas y productivas en los cacaoteros del país.

2.2. Justificación

El aislamiento y multiplicación de las cepas de *M. roleri* y *Phytophthora* sp. patógenos que afectan el cultivo de cacao en las distintas zonas productivas a nivel nacional, permitirá realizar estudios de identificación de estos patógenos y a su vez empezar a trabajar en la posibilidad de desarrollar algunas alternativas de control para mitigar los problemas fitosanitarios que estas causan en los cultivos de cacao.

Merchán (1981), señala que hasta el momento el manejo de la moniliasis y otras enfermedades que afectan al cultivo de cacao ha sido principalmente por métodos genéticos con variedades que sean tolerantes a las enfermedades y por medio químico, aparte de las labores culturales del cultivo, por lo tanto, hay que buscar otras alternativas como un control biológico.

El aislamiento de las cepas de estos hongos causantes de enfermedades en los cultivos de cacao del país, permitirá dar un aporte científico sobre la diversidad de cepas presentes en el país, a su vez permitirá el inicio de programas y ensayos de campo que permitan buscar alternativas de control contra estas enfermedades que causan grandes pérdidas económicas a los productores.

Capítulo 3

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Apoyar técnicamente procesos de aislamiento y multiplicación de *M. roreri* y *Phytophthora* sp. del cultivo de cacao en instalaciones del laboratorio de sanidad vegetal, así como otras tareas de la Federación Nacional de Cacaoteros.

3.2. Objetivos específicos

- Aislar cepas de *M. roreri* y *Phytophthora* sp. en el laboratorio de sanidad vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros.
- Multiplicar aislados de *M. roreri* y *Phytophthora* sp. en condiciones de laboratorio.
- Colaborar con otras tareas en el laboratorio de sanidad vegetal y en actividades de campo a solicitud de la federación nacional de cacaoteros.

Capítulo 4

4. Marco contextual

4.1. Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO)

La Federación Nacional de Cacaoteros es una entidad que su principal dedicación es la transferencia de tecnología, la comercialización y procesos de investigación con el fin de optimizar las producciones del cultivo de cacao y con ello las condiciones de vida de los productores. La oficina central de esta organización se encuentra en la ciudad de Bogotá departamento Cundinamarca (Sociedad de Agricultores de Colombia SAC, 2013).

Esta organización tiene como fin satisfacer necesidades de la comunidad CACAOTERA mediante el desarrollo de servicios, productos y proyectos para el desarrollo productivo y social del CACAOCULTOR y la protección del medio ambiente.

El desarrollo de esta práctica empresarial se llevó a cabo en el departamento de Santander, municipio de San Vicente De Chucurí, donde se contó con el apoyo de la Federación Nacional de Cacaoteros.

Puntualmente esta práctica empresarial se desarrolló en el departamento de Santander, municipio de San Vicente de Chucurí, Carr. 13 No. 11 - 71 Barrio el Centro, en las instalaciones de FEDECACAO, en la cual se encuentra el laboratorio de sanidad vegetal, ubicado en el casco urbano del municipio.

Capítulo 5

5. Marco teórico

5.1 Importancia del cacao.

En Colombia, el cultivo de cacao normalmente se implementa en parcelas pequeñas o medianas, en las cuales se tienen en promedio 3,3 ha por cada agricultor, este cultivo de cacao se ha convertido en su principal fuente de subsistencia del cual este recibe cerca del 75% de sus ingresos. A pesar de todo esto el cultivo de cacao necesita de buena mano de obra por parte de los agricultores y se estima que de la producción de cacao viven cerca de 35.000 familias (SIC, 2011).

Colombia, cuenta con 4 regiones en las cuales se puede llevar a cabo la producción de cacao, estas tienen características agroecológicas diferentes entre ellas y se han nombrado así: Zona de bosque húmedo tropical (BTH) comprendida por los departamentos Arauca, Meta, Casanare, costa Pacífica Nariñense, Urabá, y Bajo Cauca. Valles interandinos secos (VIS) en los cuales están el departamento del Huila, valle del cauca, algunas zonas de valle del Zulia, Tolima y la costa atlántica. Zona andina (ZA) en la cual están los departamentos de Santander, Cundinamarca, Antioquia, Quindío, Caldas, Risaralda y Boyacá, donde se concentra cerca del 50% de las unidades productivas, donde el cultivo de cacao posee alto impacto social (Federación Nacional de Cacaoteros, 2016).

El departamento de Santander cuenta con varios municipios que se dedican a la producción de cacao, en donde los principales productores son San Vicente del Chucurí y Carmen de Chucurí, en los cuales se presentan características agroclimáticas que favorecen un buen desarrollo de las plantaciones de cacao y por ende obtener muy buenas producciones. (Oliveros, 2013).

5.2 El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L).

El árbol de cacao es perenne y este se puede encontrar de manera natural en algunos bosques ubicados en América del Sur, en algunas regiones del Amazonas y Orinoco. Algunas tribus indígenas pertenecientes al sur y centro de América tenían conocimiento del cacao antes de que llegaran los españoles al continente y estos lo utilizaban con varios fines para su beneficio y por el gran valor que tenía en la época era utilizado por tribus como las Chichimecas, Toltecas y Aztecas como moneda de cambio (Rojas & Sancristan, 2013).

El cacao se constituye como el alimento más completo por su poder energético, su aporte de minerales, vitaminas, fibra, sustancias estimulantes. En países desarrollados, hace parte de la dieta cotidiana familiar al lado de frutas, carnes, cereales y verduras. Los mayores niveles de producción del cacao se van hacia las empresas de chocolatería la cual cuenta como materia prima y esto ayuda a una gran generación de empleos en el país, así como también la industrialización del cacao (Federación Nacional de Cacaoteros, 2017).

5.2.1. Clasificación taxonómica.

El cultivo de cacao se encuentra dentro del reino vegetal, pertenece a la división Magnoliophyta y a la clase Magnoliopsida, pertenece al orden de las Malvales y se encuentra dentro de las plantas pertenecientes a la familia Malvaceae, su género es *Theobroma* y se conoce con el nombre científico de *Theobroma cacao* L (1953).

5.2.2. Requerimientos del cultivo

Las condiciones climáticas más importantes para tener en cuenta al momento de sembrar cacao son la temperatura y la lluvia, como también disponibilidad de luz y el viento. El cultivo de cacao normalmente se desarrolla muy bien en condiciones de sombreado y esto hace que la humedad relativa dentro del cultivo también sea de vital importancia ya que está relacionada

directamente con dar las condiciones favorables para aparición de algunas enfermedades limitantes del cultivo (Ortiz, 2013).

Al factor temperatura se le debe dar mucha importancia ya que este va relacionado directamente con todos los procesos productivos como la floración, desarrollo y fructificación de los frutos. Se estima que la temperatura media a lo largo del año debe ser de aproximadamente 25°C y que si se tienen bajas temperaturas se ven afectados procesos de crecimiento vegetativo, desarrollo de los frutos y disminuye la capacidad de producción de flores, al igual la temperatura ayuda a que las raíces tengan mejor rendimiento y una buena generación de brotes nuevos por parte de las plantas de cacao. La temperatura óptima para el cultivo debe ser como mínimo 23°C y máximo 32°C (Paredes, 2003).

El cultivo de cacao requiere cantidades de agua que van entre los 1500 a 2500 mm en las zonas bajas y cálidas, de 1000 a 1500 mm en las zonas más altas o frescas. Normalmente se tienen en la mayoría de zonas productoras de cacao en el mundo que las precipitaciones son mayores a la evapotranspiración que se ejerce por el cultivo y por ello se hace necesario que los suelos cuenten con un sistema de drenaje bueno para evacuar los excesos de agua (Federación Nacional de Cacaoteros, 2016)

También hay que tener en cuenta como están distribuidas las lluvias durante los meses del año, ya que esto puede influir en caso tal de que haya mucha o poca cantidad de agua. Ejemplo, en caso tal de que una época seca sea constante, esto podría generar que la cosecha se de en periodos cortos, pero si el cultivo se encuentra en zonas donde las lluvias son frecuentes se pueden tener cosechas constantes durante el año, pero con dos o tres picos de producción sin que estos sean tan altos (Johnson, Bonilla, & Castillo, 2008).

Un correcto sombrío sobre el cultivo es otro factor importante, ya que se estima que el nivel de sombrío adecuado para el buen desarrollo de las plantaciones de cacao van entre los 50 y 70% en estado de plántulas, pero en las plantas adultas y cacaotales grandes se cree que las cantidades de sombrío necesarias para el buen desarrollo del cultivo va entre el 25% y 35% (Johnson, Bonilla, & Castillo, 2008).

Las especies más empleadas para el sombrío transitorio en el cultivo de cacao son las musáceas (plátano, banano) y las guabas (Ingas) para sombras permanentes. Actualmente en los nuevos establecimientos de cacaotales nuevos se está buscando implementar la utilización de nuevos árboles maderables que le suministren el sombrío a las plantas de cacao, entre estos están (laurel, cedro, cenízaro y terminalia) y/o frutales (cítricos, aguacate, zapote, árbol del pan, palmera datilera, etc.) (Zorrilla & Perez, 2017).

El tipo de suelo y las características físicas y químicas de donde se tienen las plantaciones también juegan un papel importante sobre el cultivo, ya que en momentos de altas precipitaciones se puede generar escorrentía y generar erosión del suelo por la corriente de aguas y a su vez dejando al descubierto las raíces y ocasionando problemas sanitarios para estas, lo que conlleva al mal desarrollo y crecimiento de las plantas. Para que el cultivo de cacao presente buenos rendimientos se recomienda que las características de suelo sean las siguientes:

- 60 cm de profundidad mínima y hasta 1,8m.
- Francos, franco-arenoso, franco-arcilloso.
- 10%-60% de porosidad.
- pH de 6-7.
- MO > 3%
- Relación C/N mínimo 9. (IICA, 2017).

5.2.3. Enfermedades del cultivo de Cacao

5.2.3.1. Moniliasis del cacao: La moniliasis del cacao es una enfermedad de importancia económica en el cultivo, su agente causal es *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et. al. y es conocida en el mundo con numerosos nombres, que en su mayoría rinden alusión a la sintomatología externa e interna que muestran los frutos: “Pudrición Acuosa”, “Helada”, “Mancha ceniza”, “Mal de nievas”, “Enfermedad de Quevedo” en referencia a su lugar de aparición (Evans, 1986).

M. roreri es un hongo que se encuentra dentro del reino Fungi, Filo Basidiomycota, Clase Agarycomicetes, Orden Agaricales, Familia Marasmiaceae, género *Moniliophthora* y especie *Moniliophthora roreri*. La capacidad de invadir nuevas áreas de *M. roreri*, ha generado que se detecte la presencia en 13 de los 21 países del mundo que cultivan cacao, todos ubicados sobre la franja ecuatorial tropical, a diferencia de zonas como la región nororiental de Venezuela y Brasil (Martinez, 2015).

La moniliasis apareció a comienzos de siglo en la parte norte de América del Sur. Fue descubierta en Surinam en 1915 y en la provincia Los Ríos (Ecuador) en 1916. En 1978 apareció en Costa Rica en la zona atlántica. En Colombia en 1917, parte de Venezuela en 1941, Panamá 1956, Nicaragua 1980, Honduras 1997, Guatemala en 2002, México (Chiapas – Tabasco) y Belice 2004 (Phillips & Mora, 1986).

5.2.3.2. Morfología y fisiología. Martínez (2015), argumenta que *M. roreri*, es un hongo hemibiótrofo, debido a que posee una etapa biótrofa y una necrotrofica. Evans (1978), mencionan posibles estados anamorfo y teleomorfo del hongo, basados en sus asociaciones como *C. pernicioso*, ahora llamada *M. pernicioso*, sin embargo, recientemente se han reportado evidencias del estado meiótico de las esporas de *Moniliophthora roreri* Evans et. al.,

proponiendo una fase sexual producto de una división meiótica durante la fase de formación de esporas y germinación, dando lugar a hifas infectivas monocarióticas durante la etapa intercelular y biotrófica, donde seguramente una señal no identificada asociada con la edad del fruto, estimula la transición a la fase diploide necrotrófica del hongo, la cual induce los síntomas de mancha característicos de los frutos de cacao.

5.2.3.3. Ciclo de vida de *M. royeri*. El hongo empieza su ciclo de vida generalmente en época seca, cuando los frutos esporulados dan inicio a la propagación de las estructuras reproductivas del hongo (esporas), esto gracias al viento, movimientos del árbol a causa de acciones de poda o cosecha de frutos. Normalmente no son tan necesarias para que el inóculo de inicio al proceso de infección, las esporas solo con un poco de rocío o humedad del ambiente tienen para que pueda darse la infección, por esto en algunos países que sus épocas de sequía durante el año son constantes se dan estos procesos infecciosos por parte del hongo (Evans, 1981).

El proceso de infección solo lo producen las estructuras reproductivas del hongo (conidios), ya que el micelio no posee esta capacidad. la germinación se inicia al cabo de dos y se completa entre seis y siete horas después (Merchan, 1981).

Phillips-Mora (1986), indica que *M. royeri* no tiene la necesidad de que haya heridas ya sean producidas por insectos o heridas mecánicas en las mazorcas para poder iniciar su proceso de infección. Suárez (1972), afirma que la infección del hongo sobre los frutos se puede realizar en cualquier edad de estos, pero los frutos jóvenes son los que son más propensos a los ataques. Los primeros síntomas de la enfermedad sobre los frutos son muy variables y esto depende principalmente por la edad que presentan los frutos dentro de un mismo cultivar.

Aránzazu y Cubillos (1977) Obtuvieron que, cuando se realiza inoculación a frutos con edades distintas, la aparición de los primeros síntomas se evidencia entre los 54 y 78 días después de haber realizado la inoculación.

Evans (1986), dice que el periodo de tiempo que pasa cuando la espora del hongo se posesiona sobre la superficie del fruto, hasta que se evidencie las primeras necrosis es de entre 45 a 90 días.

Chagua (1997), determino que el periodo de tiempo que transcurre desde que la espora del hongo inocula a la mazorca, hasta que se evidencian las primeras manchas necróticas varía entre 47 a 76 días y que esta variación de tiempo en la aparición de la mancha necrótica se debe principalmente a la edad que tenga el fruto infectado.

Para que pueda aparecer el estroma del patógeno, se tienen que dar entre 1 a 4 días y la visibilidad de la esporulación entre 2 a 7 días (Chagua, 1997); en contraste Sotomayor (1965), menciona que el micelio se observó entre los 3 y 9 días después del primer síntoma de necrosis, y la esporulación entre los 3 y 4 días después del micelio. El periodo vegetativo de la moniliasis es un tema de mucha controversia entre los diferentes estudiosos, que realizan sus ensayos bajos distintos sistemas agroecológicos y con diferentes estructuras poblacionales del patógeno (Sotomayor, 1965).

5.2.3.4. Mazorca parda: Es una enfermedad causada por el patógeno *Phytophthora* sp., este es uno de los patógenos que más limita la producción de cacao en algunas zonas del mundo, debido a las considerables pérdidas que origina en el rendimiento del grano en zonas de gran producción como el centro y occidente de África, principales productores del 70 % de la producción mundial de cacao. Este impacto negativo en las principales regiones productoras del mundo origina pérdidas en todo el mundo de un 30 % y hasta el 10% de árboles muertos,

mermas que se pueden incrementar en presencia de factores como la alta humedad en el suelo y en el ambiente (Gregory & Madisson, 1981).

Phytophthora sp. comprende un grupo de patógenos que pueden llegar a afectar el cultivo de cacao. El género *Phytophthora* pertenece al Reino Chromista, División Oomycota, Clase Phycomycetes, Subclase Oomycetes, Orden Peronosporales, Familia *Pythiaceae*. El nombre del patógeno causante de esta enfermedad es *P. palmivora*, debido a su distribución a nivel mundial, aunque muchas son las especies del patógeno identificadas que causan la enfermedad en diferentes regiones productoras en el mundo. Es así como *P. megakarya* es considerada la especie más destructiva y está limitada al continente africano; *P. capsici* y *P. citrophthora* están presentes en América Central y Suramérica. No obstante, *P. capsici* también ha sido encontrada en Camerún (África); *P. citrophthora* existe en Brasil ; *P. hevea* en Malasia y México; *P. megasperma* en Venezuela y Cuba y *P. arecae* en Asia (India y Sri Lanka) (Kellam & Zentmyer, 1981).

Son un grupo de organismos miceliales pertenecientes al reino Chromista, según Dick (2001) son un grupo aparte de los hongos verdaderos y tienen una línea evolutiva diferente y única que los caracteriza y diferencia de los hongos normales. El carácter unificador del reino Chromista es el flagelo anterior de tipo oropel, el cual porta dos filas de vellosidades tubulares tripartitas y que está presente en el aparato flagelar heteroconto de las zoosporas (Dick, 2001).

La infección por *Phytophthora* sp. puede ocurrir en cualquier parte del fruto y en cualquier etapa de su desarrollo, aunque normalmente se observa en las partes extremas de los frutos, que son las zonas en donde poseen más agua estos, y en frutos maduros, que son los más susceptibles. Los primeros síntomas de la enfermedad se desarrollan bajo condiciones de alta humedad y se manifiestan aproximadamente después de pasadas 30 horas desde que se dio el

proceso infeccioso, como pequeñas manchas en la superficie de los frutos de apariencia acuosa. Las lesiones necróticas de color café (pardo) se desarrollan rápidamente y en condiciones de alta humedad entre 3 y 5 días después la aparición de los primeros síntomas. Sobre la superficie de la lesión se puede observar la presencia de un crecimiento pulverulento de poca densidad a causa del micelio y los esporangios del patógeno. Por dentro del fruto la velocidad de avance de la enfermedad es la misma que se evidencia en la parte de afuera o externa. La lesión crece rápidamente y llega a cubrir la totalidad de la superficie del fruto y los tejidos internos, incluyendo los granos, en un periodo aproximado de 10 a 14 días. El borde de la lesión avanza aproximadamente 12 mm por día y se caracteriza por tener límites bien definidos. En frutos de más de tres meses, las infecciones generalmente inician en la punta o en el pedúnculo de la mazorca; y al ser infectada, también se asocia con un fuerte olor a pescado (Drenth & Guest, 2014).

Las mazorcas enfermas permanecen en el árbol y continúan produciendo inóculo, por un tiempo de más o menos tres años, hasta su completa momificación (pérdida de agua en los tejidos). En condiciones de alta humedad, una mazorca enferma puede llegar a producir hasta cuatro millones de esporangios. (Dick, 2001).

En Colombia aún no se tienen reportes claros de la identificación de cuál o cuáles son las especies causantes de la enfermedad. A la fecha, aún se desconocen aspectos relacionados con la diversidad genética, biología, fisiología, así como con la epidemiología, que permitan en un futuro contar con el conocimiento necesario para generar diferentes estrategias de control que puedan ser incorporadas dentro de un programa de manejo integrado de la enfermedad, a fin de incrementar la eficiencia del control y la rentabilidad del cultivo de cacao en el país (CORPOICA, 2015).

5.2.3.5. Llaga estrellada. La llaga estrellada es una enfermedad que afecta las plantas de cacao, principalmente en su sistema radicular. El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Rosellinia pepo* Pat. El patógeno causa la muerte de los árboles en su etapa productiva, ocasionando pérdidas económicas para el productor y dejando áreas improductivas por largo tiempo (Villegas, 1996).

La enfermedad se desarrolla en forma de focos, tomando primero un pequeño número de árboles. El hongo se establece inicialmente en las raíces secundarias, razón por la cual la invasión del sistema radical es lenta pero progresiva. Una vez el hongo se establece en los tejidos del cuello del árbol, se presenta un debilitamiento y posterior amarillamiento del follaje y una ausencia de emisión de brotes nuevos; después de algunas semanas el árbol muere. Las hojas se tornan de un color rojizo y quedan adheridas por varias semanas (Villegas, 1996).

Para hacer un buen y correcto diagnóstico para la presencia de la enfermedad hay que tener en cuenta las características que presenten los signos del hongo en las raíces de los árboles, los cuales se presentan como cordones miceliales o rizomorfos. Las características conocidas del patógeno, tales como, fácil diseminación, el amplio rango de hospedantes, y el escaso conocimiento acerca de las características biológicas y bioquímicas, hacen que esta enfermedad sea difícil de manejar. Por tanto, es necesario generar información acerca de algunos aspectos biológicos y morfológicos que permitan de una forma acertada y confiable diseñar estrategias para un control (Salazar & Aranzazu, 1998).

Capítulo 6

6. Marco Legal

Las siguientes son las normas ambientales específicas que se tendrán en cuenta en esta pasantía de investigación:

- Resolución ICA No. 00003973 de (14/04/2016) por la cual se reglamenta la Licencia Fitosanitaria para la Movilización de Material Vegetal en el territorio nacional.
- RESOLUCIÓN No. 00150 (21 ENE 2003) Por la cual se adopta el Reglamento Técnico de Fertilizantes y Acondicionador es de Suelos para Colombia.
- Decreto 775 del 16 de abril de 1990 del Ministerio de salud Por el cual se reglamentan parcialmente sobre uso y manejo de plaguicidas.
- RESOLUCIÓN No. 03759 (16 diciembre de 2003) Por la cual se dictan disposiciones sobre el Registro y Control de los Plaguicidas Químicos de uso Agrícola.
- Artículo 2: Régimen Aplicable al Uso y Manejo de Plaguicidas. El uso y manejo de Plaguicidas estarán sujetos a las disposiciones contenidas en la Ley 09 de 1979, el Decreto 2811 de 1974, Reglamento Sanitario Internacional, las demás normas complementarias previstas en el presente Decreto y las que dicten los Ministerios de Salud y de Agricultura o sus institutos adscritos

ACUERDO No. 186 Que compila y actualiza el reglamento académico estudiantil de pregrado de la Universidad de Pamplona.

Capítulo VI. TRABAJO DE GRADO

ARTÍCULO 36.- Modalidades de Trabajo de Grado: El Trabajo de Grado, puede desarrollarse en:

- **Práctica Empresarial:** comprende el ejercicio de una labor profesional del estudiante en una empresa, durante un período de tiempo. Cuando el estudiante seleccione esta modalidad, deberá presentar al Director de Departamento el anteproyecto, que debe contener: nombre de la empresa, descripción de las características de la empresa, objetivos de la práctica, tipo de práctica a desarrollar, tutor responsable de la práctica en la empresa, cronograma de la práctica, presupuesto (si los hubiere) y copia del convenio interinstitucional Universidad – Empresa o carta de aceptación de la empresa. Convenio de cooperación para el desarrollo de prácticas profesionales No. 0209 de 2018 celebrado entre la Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO) y la Universidad de Pamplona.

Capítulo 7.

7. Metodología

Para lograr los objetivos de esta Práctica Empresarial, que tuvo como fin apoyar técnicamente al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros ubicado en el casco urbano del municipio de San Vicente del Chucurí, se establecieron actividades para dar respuesta a cada uno de los objetivos específicos.

Descripción del área de estudio

San Vicente de Chucurí cuenta con una extensión territorial de 1.195.41Km cuadrados; con latitud norte de 6°52'7", longitud oeste de 73°24'46"; Hace parte de la provincia de Mares del departamento de Santander, presenta una altura de 692 MSNM y un clima promedio entre los 13 y 27°. Geográficamente limita por el Norte con Barrancabermeja y Betulia; por el Oriente con

Zapatoca, Galán y Hato, por el Sur con Simacota y por el Occidente con Simacota y Barrancabermeja.

Esta práctica empresarial, se llevó a cabo en el transcurso de los meses de enero hasta mediados de mayo en las instalaciones del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros, en el cual existen los equipos y materiales de laboratorios aptos para que se pudiera desarrollar exitosamente la práctica. Se realizó un recorrido por las instalaciones del laboratorio en el cual se pudo identificar las instalaciones y equipos con los que cuenta el laboratorio, al igual se recibió por parte de la encargada del programa de investigación de FEDECACAO una inducción en la cual se dieron a conocer todos los procesos que allí se llevaban a cabo.

7.1 Aislamiento de cepas de *M. royeri* y *Phytophthora* sp. en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros.

7.1.1. Recepción de muestras de campo.

Se recibieron 3 muestras de material vegetal proveniente de varios sectores del país productores de cacao, las cuales se les realizó un marcaje de acuerdo a:

- Fecha de recolección en campo que traían en la etiqueta.
- Fecha de ingreso al laboratorio.
- Nombre de la finca en que se realizó la toma.
- Metros sobre el nivel del mar (msnm)
- Nombre del posible patógeno que esté afectando.
- Nombre del dueño de la finca.
- Enumeración de la muestra.

Se llevó un registro con un balance mensual de las muestras recibidas, de las procesadas.

7.1.2. Procesamiento de las muestras.

El procesamiento de las muestras recibidas de campo se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros, en el cual se llevaron a cabo los procedimientos y preparación de medios de cultivo correspondientes para lograr aislar cada patógeno.

Para el aislamiento *M. roreri* y para *Rosellinia* sp. se siguió el mismo procedimiento el cual consistió en:

1. Se obtuvieron pequeños segmentos del fruto de cacao para el caso de *M. roreri* y segmentos pequeños de raíz para el caso de *Rosellinia* sp. con parte enferma y sana mediante la utilización de cuchillas y sacabocados.
2. Estos segmentos se lavaron con agua corriente y jabón durante 15 minutos.
3. Se tomaron los fragmentos de tejido y luego se colocaron en un erlenmeyer de 100 mL de capacidad con aproximadamente 80 mL de agua ozonizada. Se agitó vigorosamente durante 5 minutos y luego se decantó.
4. Se repitió durante 3 veces el paso anterior con el fin de generar una mejor asepsia de los fragmentos.
5. Los fragmentos se desinfectaron con alcohol al 70% durante 2 minutos, para otros casos se utilizó hipoclorito durante el mismo tiempo.
6. Para algunos casos se volvieron a lavar los fragmentos nuevamente con agua ozonizada con el fin de eliminar excesos de alcohol o hipoclorito, para otros casos no.
7. Luego se colocaron los fragmentos en papel filtro para eliminar los excesos de humedad, esto dentro de la cabina de flujo laminar.

8. Para los pocos aislamientos realizados no se realizaron cámaras húmedas, sino, que se realizó la siembra directa de tejido (fragmentos) en los medios de cultivos ya preparados.
9. Para los dos patógenos se realizó la siembra directa en el mismo tipo de medio de cultivo (PDA).
10. Las cajas de Petri una vez selladas se les asignó un código de una letra y número que correspondía con los datos de la muestra (finca, número de la muestra y la fecha de la recolección).
11. Las cajas de Petri enmarcadas se colocaron en diferentes incubadoras a unos 28°C que les suministraban las condiciones para el crecimiento del patógeno.
12. Visualmente después de una semana se procedió a realizar un análisis de las cajas sembradas, las que presentaban grandes contaminaciones fueron descartadas.

Se llevó un registro con un balance mensual de las muestras recibidas y de las que fueron procesadas.

7.2. Multiplicación de aislados de *M. roleri* y *Phytophthora* sp. en condiciones de laboratorio

La multiplicación de estos patógenos se realizó mediante “pases”, los cuales consistieron en pasar de una caja con medio de cultivo y presencia del patógeno y baja contaminación, a otra caja con medio de cultivo nuevo. Esto se realizó utilizando cajas de Petri con el patógeno que tuvieran contaminación baja, de estas cajas con un pitillo ya esterilizado se realizaron perforaciones a las zonas donde no se evidenciara la contaminación pero si la presencia del patógeno, luego con un palillo se tomaron estos fragmentos de medio de cultivo con el patógeno y se pasaban al medio de cultivo nuevo, para el caso de *Phytophthora* sp., se utilizó Agar

Nutritivo con Extracto de Zanahoria y para *M. royeri* se utilizó el agar PDA. Este proceso se realizó en la cabina de flujo laminar y con la ayuda de un mechero de alcohol, una vez hecho el pase las cajas se sellaron con vinipel y se les codificó con el código de la caja madre de donde se obtuvo la muestra inicial.

Se realizó un balance mensual de los aislados de *Phytophthora* sp. a los que se realizó multiplicación con el fin de obtener cajas puras de estas muestras. Para el caso de *Phytophthora* sp. se utilizó un medio de cultivo específico que se maneja en el laboratorio para este patógeno y fue el Agar Nutritivo con Extracto de Zanahoria, ya que a lo largo del tiempo es el que ha funcionado bien para multiplicaciones de *Phytophthora* sp.

Para la multiplicación de estos patógenos se llevó a cabo la preparación de dos medios de cultivos con los cuales trabaja principalmente la Federación Nacional de Cacaoteros.

A

B



Figura 1. Caja madre con presencia y cortes de *Phytophthora* sp. (A); Pase de fragmento con muestra de *Phytophthora* sp. a nuevo medio Agar Nutritivo con Extracto de Zanahoria (B).

Fuente: Santos, 2020.

7.2.1. Agar papa dextrosa (PDA).

Se colocó a calentar en un erlenmeyer 0,8 L de agua destilada, una vez el agua destilada estaba a una temperatura media se agregaron 39 gramos de agar Potato Dextrose Agar (PDA) y se agregaron 0,2 L de agua para completar el litro de agua para los 39g del PDA. Se siguió calentando y agitando en una plancha calentadora hasta que la solución alcanzara el punto de ebullición, se dejó en ese punto por unos 30 segundos y se pasó a la autoclave para ser esterilizado a 121°C (1.0207 Atm) durante un tiempo de 15 minutos. Se dejó enfriar la solución a unos 45°C y se llevó a la cabina de flujo laminar en la cual con la ayuda del mechero se procedió a servir el medio en las cajas de Petri estériles.

7.2.2. Agar Nutritivo con extracto de zanahoria.

Para la preparación del agar nutritivo con extracto de zanahoria, inicialmente se pesaron 200 gramos de zanahoria y se licuaron con 0,8 L de agua destilada, esta solución se colocó a calentar en la plancha calentadora hasta alcanzar una temperatura media, una vez estaba tibia la solución se le agregaron 28 gramos de Agar Nutritivo y 0,2 L de agua para completar los 28g/L de agua, este litro de solución se llevó a un pH de 5.4 con ácido láctico al 20% y se siguió calentando y agitando en una plancha calentadora hasta que la solución alcanzara el punto de ebullición, se dejó en ese punto por unos 30 segundos y se pasó a la autoclave para ser esterilizado a 121°C (1.0207 Atm) durante un tiempo de 15 minutos. Se dejó enfriar la solución a unos 45°C y se llevó a la cabina de flujo laminar en la cual se agregaron una serie de inhibidores para evitar el crecimiento de hongos y bacterias, esto solo se realizaba para procesos de aislamiento y multiplicación de *Phytophthora* sp. ya que este patógeno no es un hongo y estos inhibidores nos ayudaron a obtener mejores resultados en las multiplicaciones de aislados de *Phytophthora* sp. se agregaron Rifampicina que es un antibiótico al igual la Nistatina, Benlate y

Metil Tiofanato son fungicidas que interfieren la síntesis de DNA y la mitosis de los hongos que puedan generar contaminación y Pentachloronitrobenzene, una vez se agregaron todos los inhibidores se procedió a servir en las cajas de Petri ya esterilizadas con la ayuda de un mechero. Para el caso de refrescamientos de *M. royeri* con el fin de no perder la viabilidad de algunas cepas no se realizaron las aplicaciones de los inhibidores.

7.3. Colaboración con otras tareas en el laboratorio de sanidad vegetal y en actividades de campo a solicitud de la Federación Nacional de Cacaoteros

7.3.1. Apoyo técnico a actividades de campo.

Durante el transcurso de la práctica se brindó apoyo técnico a actividades de campo en las cuales la federación nacional de cacaoteros lo considero necesario.

- Toma de datos en campo.
- Apoyo técnico en Vivero.
- Otras.

7.3.2. Apoyo a la redacción del manual de procesos del laboratorio de sanidad vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros.

Algunas de las actividades no se pudieron llevar a cabo de manera normal por razones de salud públicas y ordenes de la presidencia a causa de la pandemia del Covid-19, por esta razón se programó trabajar desde casa 4 de los 5 días laborales en los cuales se procedió a la realización propia del manual de procesos del laboratorio de sanidad vegetal de la federación nacional de cacaoteros, sin dejar 100% de lado los procesos de multiplicación de *Phytophthora* sp.

7.3.3. Construcción de artículo divulgativo para el periódico Colombia Cacaotera.

La Federación Nacional de Cacaoteros cuenta con un periódico o boletín informativo el cual busca brindar información de interés a todos los cacaocultores colombianos. Se realizó la construcción de un “artículo” divulgativo monográfico referente a la moniliasis sobre el cultivo de cacao en el transcurso de tiempo de la cuarentena y aislamiento obligatorio emitido por el estado. Este “artículo” se elaboró desde casa, el cual cuya construcción se basó principalmente en entregar información detallada y de maneja comprensible para los cacaocultores, haciendo de manera ilustrativa y textual un fácil entendimiento y comprensión.

Capítulo 8

8. Resultados

8.1. Aislamiento de cepas de *M. roreri* y *Rosellinia* sp. en laboratorio de sanidad vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros

Para el caso de R32 y R33 se detectó la presencia de *Rosellinia* sp. en las muestras procesadas, mientras que para el caso de R34 no se presentó crecimiento del patógeno en los aislamientos por lo que se concluyó que el lote del que se tomaron las muestra está libre del patógeno.

Tabla 1. Recepción de muestras de *Rosellinia* sp. e información de cada muestra con su código asignado.

	R32	R33	R34
Fecha	17/02/2020	11/03/2020	11/03/2020
Finca	Samanes	Villa Luz	La Fortuna
msnm	1050	1258	956
Vereda	El Centro	San Pablo	La Colorada
Propietario	Eli Hernandez	Luis Montoya	Alejandro Barajas
Municipio	San Vicente	Rionegro	Rionegro
<i>Rosellinia</i> sp.	Si	Si	No

Fuente: Autor

Para el caso de R32, R identifica el patógeno *Rosellinia* sp. y 32 es el número de la muestra de dicho patógeno que ha ingresado al laboratorio, por lo que la muestra proveniente del municipio de San Vicente fue la primera recibida en el desarrollo de la práctica, pero la número 32 en el laboratorio de la Federación. Así mismo se codificaron R33 y R34 en las cuales R identifica a *Rosellinia* sp. y 33 y 34 la consecución en la recepción de las muestras.

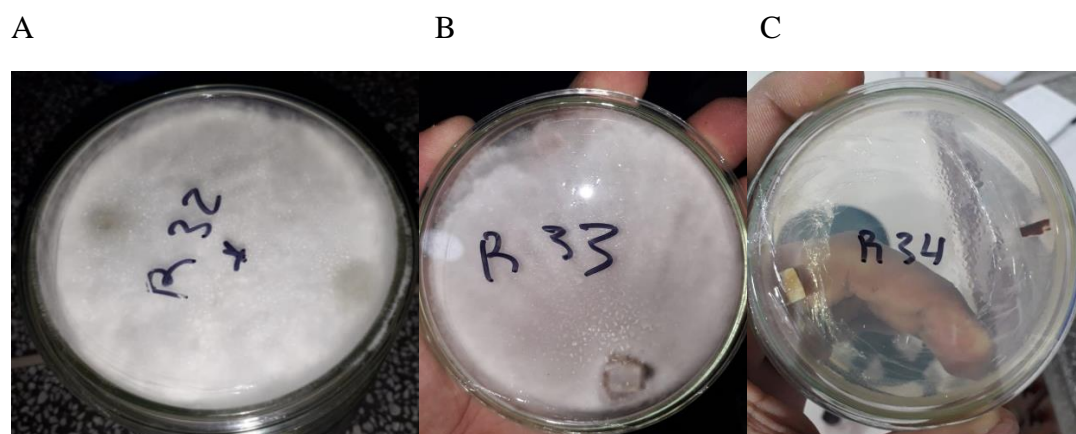


Figure 2. Crecimiento y presencia de *Rosellinia* sp. de R32 en caja (A); Crecimiento y presencia de *Rosellinia* sp. de R33 en caja (B); Ausencia de *Rosellinia* sp. de R34 en caja (C).

Fuente: Santos, 2020.

No se recibieron muestras de *M. roreri* ni de *Phytophthora* sp. en el transcurso de la práctica, por tanto, no hubo necesidad de realizar aislamientos para estos dos patógenos.

8.2. Multiplicación de aislados de *M. roreri* y *Phytophthora* sp. en condiciones de laboratorio

Phytophthora sp.

- PF: *Phytophthora* Fruto.
- PR: *Phytophthora* Raíz.
- PS: *Phytophthora* Suelo.
- PT: *Phytophthora* Tallo.

- PH: *Phytophthora* Hoja.

Durante el mes de febrero, se realizaron multiplicaciones a 57 aislados de diferentes códigos (Tabla 2) con 10 cajas de Petri copia para cada uno. Las letras de cada código de las cajas madres identifican el patógeno a multiplicar y de donde se realizó su aislamiento y el número significa el código de llegada de las muestras al laboratorio.

Tabla 2. Número de muestras de *Phytophthora* sp. multiplicadas para el mes de febrero del 2020.

feb-2020					
Código	# cajas	Código	# cajas	Código	# cajas
PR 42	10	PH 42	10	PF 68	10
PS 51	10	PF 55	10	PF 26	10
PH 44	10	PF 59	10	PF 64	10
PR 76	10	PS 38	10	PF 04	10
PS 29	10	PS 51	10	PF 15	10
PH 59	10	PS 80	10	PT 80	10
PF 58	10	PS 63	10	PR 72	10
PS 26	10	PF 28	10	PF 05	10
PR 46	10	PF 38	10	PF 49	10
PT 91	10	PS 43	10	PF 68	10
PT 42	10	PR 49	10	PR 64	10
PT 72	10	PH 57	10	PS 45	10
PR 88	10	PF 93	10	PT 11	10
PS 75	10	PF 63	10	PF 99	10
PF 31	10	PF 29	10	PR 67	10
PH 40	10	PF 50	10	PF 32	10
PS 79	10	PT 69	10	PF 87	10
PT 73	10	PF 37	10	PF 52	10
PH 41	10	PH 52	10	PT 59	10

PF: *Phytophthora* sp. fruto; PH: *Phytophthora* sp. hoja; PT: *Phytophthora* sp. tallo; PS: *Phytophthora* sp. suelo; PR: *Phytophthora* sp. raíz.

Fuente: Autor.

De las 570 cajas que fueron multiplicadas en el mes de febrero en total se descartaron 280 cajas que presentaban un nivel de contaminación alto, las 290 cajas restante fueron clasificadas, las que no presentaban contaminación se almacenaron en incubadoras y las que presentaron un nivel de contaminación bajo se utilizaban para seguir realizando proceso de multiplicación en el mes siguiente (Tabla3). Esto representó un 50,8 % de eficiencia en el trabajo de multiplicación, la cual se determinó teniendo en cuenta las multiplicaciones efectivas en comparación a las multiplicaciones descartadas, lo cual no pudo compararse con la calidad media del laboratorio por no llevarse un histórico estadístico de esta actividad.

Tabla 3. Balance muestras de Phytophthora sp. multiplicadas en mes de febrero del 2020.

Código	Total muestras	Total cajas	Multiplicación efectiva	Total descartadas
PR	8	80	35	45
PH	7	70	40	30
PS	11	110	55	55
PF	23	230	125	105
PT	8	80	35	45
Total	57	570	290	280

PF: *Phytophthora* sp. fruto; PH: *Phytophthora* sp. hoja; PT: *Phytophthora* sp. tallo; PS: *Phytophthora* sp. suelo; PR: *Phytophthora* sp. raíz.

Fuente: Autor.

En marzo también se multiplicaron 57 aislados, sin embargo, el número de copias por cada caja madre disminuyó a 5 ya que con los aislados que se lograron obtener en el mes de febrero suplían la necesidad de y no era necesario obtener un número mayor de copias por caja madre, lo que arrojó un total de 285 cajas multiplicadas (Tabla 4). Los códigos de cajas madre que se repiten eran del mismo aislado pero las cajas madres de las cuales se obtuvieron eran diferentes.

Tabla 4. Número de muestras de *Phytophthora* sp. multiplicadas para el mes de marzo del 2020

mar-20					
Código	# cajas	Código	# cajas	Código	# cajas
PH 40	5	PH 57	5	PR 42	5
PS 51	5	PR 42	5	PS 26	5
PF 69	5	PF 58	5	PF 28	5
PR 76	5	PH 44	5	PT 11	5
PF 93	5	PH 52	5	PS 75	5
PS 29	5	PS 75	5	PH 44	5
PS 45	5	PT 72	5	PF 58	5
PF 43	5	PF 52	5	PF 93	5
PS 63	5	PS 26	5	PF 63	5
PT 42	5	PS 38	5	PH 57	5
PR 49	5	PF 31	5	PT 73	5
PF 29	5	PF 38	5	PS 45	5
PR 88	5	PR 67	5	PF 38	5
PF 29	5	PH 40	5	PF 68	5
PF 49	5	PS 29	5	PS 26	5
PT 73	5	PT 72	5	PF 59	5
PH 59	5	PR 67	5	PF 99	5
PF 99	5	PH 59	5	PH 52	5
PS 80	5	PS 80	5	PS 63	5

PF: *Phytophthora* sp. fruto; PH: *Phytophthora* sp. hoja; PT: *Phytophthora* sp. tallo; PS: *Phytophthora* sp. suelo; PR: *Phytophthora* sp. raíz.

Fuente: Autor.

En marzo el número de cajas descartadas fue de 155 para un 54,38 % de eficacia (Tabla 5), a pesar de que las cajas madres utilizadas para estas multiplicaciones presentaban contaminación y por ende el proceso fue más dificultoso al momento de obtener cajas puras.

Tabla 5. Balance muestras de *Phytophthora* sp. multiplicadas en mes de marzo del 2020.

Código	Total muestras	Total cajas	Multiplicación efectiva	Total descartadas
PR	7	35	20	15
PH	10	50	30	20
PS	15	75	40	35
PF	19	95	50	45
PT	6	30	15	15
Total	57	285	155	130

PF: *Phytophthora* sp. fruto; PH: *Phytophthora* sp. hoja; PT: *Phytophthora* sp. tallo; PS: *Phytophthora* sp. suelo; PR: *Phytophthora* sp. raíz.

Fuente: Autor.

En el mes de abril del 2020, el número de cepas de aislados que se trabajaron para la realización de multiplicaciones disminuyó a 36, de las cuales a cada cepa se le procedió a sacar 5 cajas copia para obtener un total de 180 cajas copias en totales (Tabla 6). También se decidió sacar 5 copias por aislado. El número de cepas trabajadas, al igual que el número de copias obtenidas para cada cepa disminuyó en comparación a los otros meses debido que no se estaba laborando de manera normal a diario en el laboratorio por los lineamientos impuestos por el gobierno nacional, pero se siguió trabajando desde casa en otras actividades requeridas por la Federación Nacional de Cacaoteros.

Tabla 6. Número de muestras de *Phytophthora* sp. multiplicadas para el mes de abril del 2020

abr-20					
Código	# cajas	Código	# cajas	Código	# cajas
PR 49	5	PR 67	5	PS 80	5
PF 31	5	PH 40	5	PS 29	5
PS 51	5	PH 59	5	PF 68	5
PS 45	5	PS 80	5	PF 31	5
PT 73	5	PT 11	5	PS 95	5

PT 69	5	PS 26	5	PF 29	5
PF 26	5	PS 63	5	PS 80	5
PS 79	5	PR 38	5	PF 40	5
PH 44	5	PF 49	5	PR 38	5
PR 64	5	PS 36	5	PF 68	5
PF 87	5	PF 40	5	PT 32	5
PF 38	5	PS 44	5	PS 63	5

PF: *Phytophthora* sp. fruto; PH: *Phytophthora* sp. hoja; PT: *Phytophthora* sp. tallo; PS: *Phytophthora* sp. suelo; PR: *Phytophthora* sp. raíz.

Fuente: Autor.

De las 180 cajas copias obtenidas en el mes de abril, 110 fueron multiplicaciones efectivas para un 61,11% y 70 fueron cajas copias descartadas por contaminación (Tabla7). Como se observa el nivel de eficacia aumento con la experiencia y también con el menor nivel de multiplicación.

Tabla 7. Balance muestras de *Phytophthora* sp. multiplicadas en mes de abril del 2020.

Código	Total muestras	Total cajas	Multiplicacion efectiva	Total descartadas
PR	5	25	15	10
PH	3	15	5	10
PS	13	65	35	30
PF	11	55	40	15
PT	4	20	15	5
Total	57	180	110	70

PF: *Phytophthora* sp. fruto; PH: *Phytophthora* sp. hoja; PT: *Phytophthora* sp. tallo; PS: *Phytophthora* sp. suelo; PR: *Phytophthora* sp. raíz.

Fuente: Autor.

Durante la práctica fue importante el entrenamiento para reconocimiento de las contaminaciones en las cajas madres y también en las nuevas cajas multiplicadas. En la figura 3 se muestra el poco crecimiento cuando una placa multiplicada estaba contaminada en relación a

placas que cubrían toda la caja y estaban puras, o sea, libres de contaminación por otro microorganismo

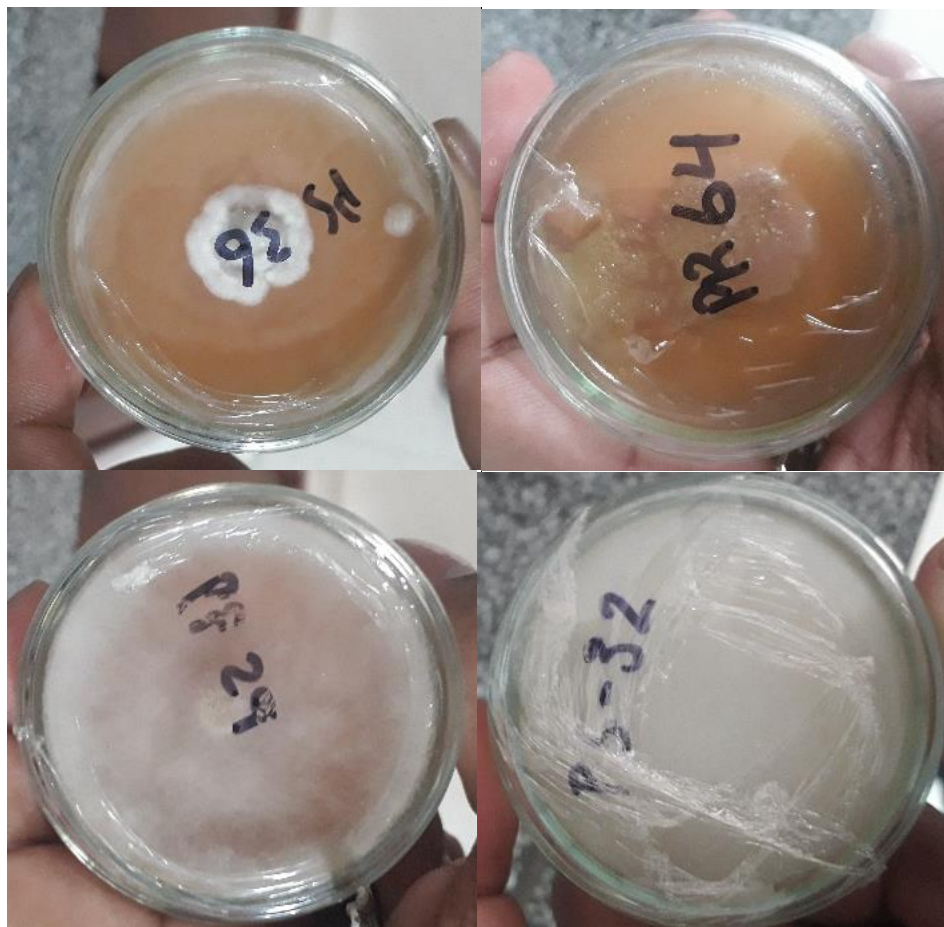


Figura 3. Multiplicación de PS-36 contaminada para volver a realizar pases (A); Multiplicación de PR-64 para descarte por contaminación (B); Multiplicación efectiva de PF-29, PS-32 (C) Y (D).

Fuente: Santos, 2020.

M. roreri.

Durante el desarrollo de la práctica empresarial, se realizaron multiplicaciones o refrescamientos de varias cepas de *M. roreri* con el fin de recuperar la viabilidad de estas cepas para futuros ensayos de campo en busca de alternativas de manejo para esta enfermedad. Se realizó refrescamiento a 6 cepas de *M. roreri* pertenecientes al Laboratorio de Sanidad Vegetal

de Fedecacao. A cada cepa se le sacaron un total de 10 copias para un total de 60 multiplicaciones entre todas las cepas, de las cuales 34 fueron multiplicaciones eficientes (56,6 %) y las otras 26 fueron descartadas por contaminación (Tabla 8).

Tabla 8. Multiplicaciones de *M. royeri*.

Codigo	Total muestras	Total Cajas	Multiplicación efectiva	Total Descartadas
M 194	1	10	7	3
M 212	1	10	8	2
M 256	1	10	6	4
M 232	1	10	5	5
M 105	1	10	5	5
M 231	1	10	3	7

M#: *M. royeri* y número de secuencia de llegada al laboratorio.

Fuente: Autor.

En la figura 4 se muestra una caja madre de *M. royeri* con un crecimiento escaso del hongo, sin embargo, se logró obtener placas con un crecimiento profuso durante la multiplicación.

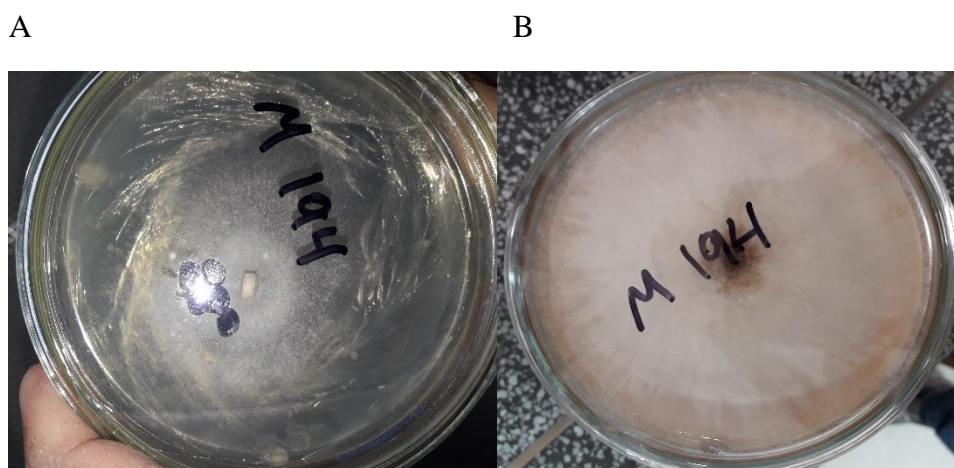


Figura 4. Caja madre de *M. royeri* M-194 (A); Caja multiplicación efectiva *M. royeri* M-194 (B).

Fuente: Autor.

8.3. Colaboración con otras tareas en el laboratorio de sanidad vegetal y en actividades de campo a solicitud de la federación nacional de cacaoteros

8.3.1. Apoyo técnico a actividades de campo.

Durante el desarrollo de la práctica empresarial la Federación Nacional de Cacaoteros requirió del apoyo a distintas labores y actividades de campo junto a los técnicos pertenecientes a la federación. Dentro de estas actividades a las cuales se brindó apoyo se encuentran:

- Apoyo técnico en campo, en el cual se brindó apoyo a la preparación y montaje de ensayos en los cuales se busca evaluar la resistencia, tolerancia y/o susceptibilidad de distintos materiales genéticos pertenecientes a FEDECACAO, a enfermedades como *Phytophthora* sp. y *Rosellinia* sp. para el montaje de estos ensayos.

Inicialmente se realizó un proceso de selección de 15 frutos maduros de 10 materiales pertenecientes a Fedecacao (Figura 5). Después se realizó un proceso de desengrullado y lavado de semilla para su posterior siembra en vivero y montaje de bloques del ensayo.



Figura 5. Selección y cosecha de frutos de variedades pertenecientes al FEDECACAO para montaje de ensayos.

Fuente: Santos, 2020.

- Apoyo técnico en vivero: se brindó apoyo técnico a actividades de vivero (Figura 6) en las cuales se realizó la toma de datos de ensayos de campo de pruebas de tolerancia y/o resistencia a déficit hídrico y excesos de humedad a distintos materiales pertenecientes a la Federación Nacional de Cacaoteros.



Figure 6. Apoyo a la toma de datos en vivero de FEDECACAO.

Fuente: Archivo autor, 2020.

8.3.2. Apoyo a la redacción del manual de procesos del laboratorio de sanidad vegetal de la federación nacional de cacaoteros.

En el tiempo establecido para trabajo en casa en el periodo de cuarentena, se realizó la construcción del manual de procesos del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros (Anexo 11). Dentro del manual se realizó la descripción paso a paso de procesos. La parte del Manual elaborada consta del índice que está en la tabla 9:

Tabla 9. Índice de los aspectos contemplados en el manual de Procedimientos que se elaboró

INDICE
<ul style="list-style-type: none"> • Preparación de cortes a mano alzada para observación al microscopio.
<ul style="list-style-type: none"> • Montaje de improntas para observación al microscopio.
<ul style="list-style-type: none"> • Montaje al microscopio con técnica de raspado de tejidos.

<ul style="list-style-type: none"> • Procedimiento para el aislamiento de hongos a partir de tejido vegetal por medio de Cámaras Húmedas y siembra directa en medios de cultivo.
<ul style="list-style-type: none"> • Preparación de Agar Nutritivo con Extracto de Zanahoria.
<ul style="list-style-type: none"> • Preparación de Agar PDA.
<ul style="list-style-type: none"> • Obtención de cultivos monospóricos a partir de esporas.
<ul style="list-style-type: none"> • Obtención de cultivos monospóricos a partir de crecimiento micelial.
<ul style="list-style-type: none"> • Montaje de placas con azul de lactofenol.

Fuente: Autor

En el manual se redactó paso a paso el procedimiento para cada uno de estos procesos que se llevan a cabo dentro del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación, quedó como un PNO (Procedimiento Normalizativo de Operaciones), producto tangible de la Práctica Empresarial realizada que es una contribución al mejoramiento del sistema de calidad del Laboratorio, el cual podrán usarlo los trabajadores de la entidad y otros pasantes del programa de Ingeniería Agronómica que se inserten en la misma.

8.3.3. Construcción de artículo para el periódico Colombia Cacaotera.

Se realizó la construcción de un “artículo” divulgativo monográfico con énfasis en el manejo de la moniliasis en el cultivo de cacao titulado: “Si menos moniliasis quieres tener, lo siguiente debes hacer” (Anexo 12), este “artículo” divulgativo monográfico se construyó para el periódico o boletín informativo Colombia Cacaotera perteneciente a la Federación Nacional de Cacaoteros y fue dirigido principalmente a los cacaocultores colombianos. Se realizó con el

apoyo de la ingeniera Diannefair Duarte del programa de investigación de Fedecacao, el “artículo” comprende una página del periódico Colombia Cacaotera de la Federación Nacional de Cacaoteros. Dentro del artículo se lograron explicar de manera fácil para la comprensión del agricultor puntos específicos sobre la moniliasis como los síntomas en etapa inicial de la enfermedad y como se puede evidenciar la aparición de la enfermedad, cuál es el agente causal de la enfermedad y cuáles son los principales Tips a tener en cuenta para evitar la aparición y presencia de la enfermedad en los cultivos de cacao, así como cuales son las medidas sanitarias a tener en cuenta para disminuir la incidencia de la enfermedad en los cacaotales en caso tal de que se llegue a presentar la presencia del patógeno.

6
Investigación

Periódico de Fedecacao
Fondo Nacional del Cacao - No. 53

Si menos moniliasis quieres tener, lo siguiente debes hacer...

Daniilo Santos Alvear
Pasante de ingeniería agrónoma - UNISUMPS-UNA

Diannefair Duarte Hernández
Profesional de apoyo, FEDECACAO-FNC
Grupo de Investigación e Innovación en cacao GRC

E

s cierto que no estamos diciendo nada nuevo, pero sabemos que algunas veces olvidamos que aquellos que causan enfermedades, tampoco duermen!, por eso, poniendo en práctica estas recomendaciones lograremos cultivos con frutos más sanos e incrementaremos la productividad de nuestro cacaotal.

La moniliasis es una enfermedad fúngica causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, una espora de 7 micras (es decir la milésima parte de un milímetro), que es capaz de volar y pegarse a pequeñas gotas de agua hasta llegar a ese fruto que usted tanto quiere cuidar, y en menos de ocho a doce horas, la enfermedad habrá comenzado a penetrar la epidermis de la mazorca, ocasionando infección.

TIPS para tener una
plantación más sana:

- ▶ **Podas de mantenimiento:** consiste en crear dentro de la plantación un ambiente que favorezca las etapas vegetativas, reproductivas y de cosecha, minimizando las condiciones para el desarrollo de los organismos que afectan el cultivo y su producción.
- ▶ **Podas sanitarias:** eliminar del árbol los frutos y las ramas enfermas.
- ▶ **Podas de sombro de cultivos permanentes:** las especies usadas como sombro deben revisarse periódicamente con el fin de adecuar sus copas, permitiendo la entrada de luz regulada al cultivo.
- ▶ **Construcción y mantenimiento de drenajes:** deben hacerse de acuerdo con la necesidad particular de cada lote. Esto debe ocurrir antes de la temporada de lluvias, en suelos que no poseen las condiciones para eliminar los volúmenes de agua sobrantes de manera rápida.
- ▶ **Momento de cosecha:** recolecta oportunamente las mazorcas maduras.
- ▶ **Control de malezas:** es importante eliminar las malezas para disminuir la humedad relativa al interior del cultivo y evitar la competencia por agua y nutrientes.
- ▶ **Material genético:** modernizar nuestros cacaotales con el establecimiento de clones más tolerantes y productivos.
- ▶ **Distancia de siembra:** planificar la distancia de siembra para el sombro y el establecimiento del cacao, esto evitará condiciones ideales para las enfermedades.
- ▶ **Fertilizar:** de acuerdo a las necesidades nutricionales requeridas por su cultivo, para un buen desarrollo y productividad.

Amigo cacaocultor, el uso de estas prácticas, complementadas con buena nutrición, contribuye a la disminución de incidencia de enfermedades, permitiendo obtener plantaciones más sanas y productivas, lo cual se verá reflejado en el bienestar de las familias cacaoteras aumentando sus ingresos.

Está enfermo en nuestro cacaotal:

- Frutos y pepinos con síntomas cuando tienen una edad menor a un mes, presentan maduración prematura.
- Deformaciones en los frutos, principalmente en los jóvenes (1-3 meses) estas deformaciones comúnmente se les conoce como "Gibas".
- Las mazorcas afectadas cuando tienen de 2 a 3 meses de edad presentan puntitos de color verde oscuro o deformaciones.
- Mazorcas enfermas de más de 3 meses presentan puntitos aceitosos, las amarillentas o maduración parca.
- Aparición de manchas irregulares de coloración café.
- Aparición de micelio en estas manchas.
- Aparición de esporas.

Si su cacaotal presenta alguno de estos síntomas, el control cultural debe realizarse. Con estas prácticas controlará la enfermedad y las pérdidas, por lo que podrá incrementar su producción.

La monilia causa pérdidas de dinero, por ello, se debe realizar el RE-SE, es decir recolectar y quemar las mazorcas enfermas antes de que esporeen.

Figura 7. Artículo referente a moniliasis del cacao para periódico Colombia cacaotera.

Fuente: Periódico Colombia Cacaotera, 2020

9. Conclusiones

1. Se logró realizar el procedimiento de aislamientos de muestras con posibles *Rosellinia* sp. proveniente del municipio de San Vicente del Chucurí y del municipio de Rionegro Santander con un 66 % de eficacia teniendo en cuenta el número de multiplicaciones efectivas en comparación con el número de muestras contaminadas.
2. Las multiplicaciones de *Phytophthora* sp. fueron incrementándose en el transcurso de la practica en comparación con las *M. roreri*, ya que la cantidad de cepas existentes de *Phytophthora* sp. dentro del laboratorio son mayores y el tiempo de viabilidad de los aislados es menor en comparación con *M. rorei*.
3. Se logró un incrementó en el tiempo en el porcentaje de eficacia en la multiplicación de *Phytophthora* sp., desde 50 % en febrero hasta 61,11 %, en abril, teniendo en cuenta el número de multiplicaciones efectivas en comparación con el número de muestras contaminadas.
4. Se realizó el refrescamiento a 6 cepas de *M. roreri* de las cuales se obtuvieron de manera efectiva 7 cajas copias puras para M-194, 8 para M-212, 6 para M-256, 5 para M-232, 5 para M-105 y 3 para M-231, representando una eficacia de 54,38 %.
5. Se brindó el apoyo técnico en otras actividades que la Federación Nacional de Cacaoteros requería, como lo fue la redacción del manual propio de procesos del laboratorio de sanidad, la redacción de un artículo referente a la moniliasis del cacao para el periódico Colombia Cacaotera de la Federación y apoyo técnico a actividades de campo como lo fueron la toma de datos en vivero, acompañamiento a los técnicos en labores de cosecha y montaje de ensayos del programa de investigación.

10. Recomendaciones

1. Buscar y probar metodologías y medios de cultivos alternativos a los que se manejan actualmente en el laboratorio, con el fin de mejorar la eficacia de los procesos realizados, tanto de multiplicación como refrescamiento.
2. Dar a conocer a los municipios y propietarios de las fincas de las cuales llegan las muestras que se procesan dentro del laboratorio un plan de manejo o recomendaciones respecto al control de las enfermedades que se puedan confirmar su presencia en los aislamientos.
3. Aprovechar la disponibilidad y viabilidad de las cepas de los patógenos que afectan el cultivo de cacao, en el Laboratorio de Sanidad presente en San Vicente del Chucurí para generar muchos más ensayos de campo con el fin de buscar alternativas de control sobre estas enfermedades y brindar mejores alternativas a los agricultores.
4. Perfeccionar el manual de procesos del laboratorio con el fin que quede registro del paso a paso de cada proceso que se lleve a cabo dentro del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Federación Nacional de Cacaoteros, lo que sin dudas ayudará a mejorar el sistema de gestión de la calidad

11. Referencias bibliográficas

- Aránzazu, E., & Cubillos, G. (1977). Observaciones sobre el control y sintomatología de *Moniliophthora roreri* Cif. y Par. En la zona de Urabá, Colombia. *Cacaotero Colombiano*(2), págs. 24-25.
- Carrera, K., Mosquera, L., & Leiva, M. (2014). *Protocolo para el aislamiento de Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en frutos de cacao cv. 'Nacional' de la Amazonía ecuatoriana. Ecuador.
- Chagua, E. S. (1997). *Ciclo de la Moniliasis del cacao causado por Moniliophthora roreri* (Cif & Par.) Evans et al., en *Tingo María*. . Peru.
- CORPOICA. (2015). *Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (Phytophthora sp.) en cacao*. Bogota. Recuperado el Marzo de 2020, de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13138>
- Dick, M. (2001). *Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms*. .
- Drenth, A., & Guest, D. (2014). *Diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research. Australia. Recuperado el 11 de Marzo de 2020, de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13138>
- Durán, E., & Dobon, A. (2016). *Tipos genéticos de cacao y distribución geográfica*. Obtenido de http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/guia_tipos_geneticos_de_cacao_y_distribucion_geografica_en_honduras.pdf

- Evans. (1986). Resseement of moniliophthora (Moniliasis) pod rot of cocoa. *Revista Cocoa Grower´s Bulletin*.
- Evans, H. (1978). *On the Taxonomy of Monilia roreri an import phatogen of cacao in South America. Canadian Journal of Botany*.
- Evans, H. (1981). *Pod rot of cacao caused by Moniliophthora roreri Commonwealth Mycological Institute. Phytopatological Papers. Londres .*
- Federación Nacional de Cacaoteros. (2010). *Estadísticas de la producción nacional registrada de cacao en grano*. Obtenido de <http://www.fedecacao.com.co/cw/index.php?secinfo=15>
- Federación Nacional de Cacaoteros. (2016). *Guía técnica para el cultivo de cacao* (Sexta Edición ed.).
- Federación Nacional de Cacaoteros. (2017). *Guía técnica para el cultivo de cacao; séptima edición* (Septima Edición ed.). Bogota.
- Gómez, g., & Martínez, W. (2017). *Manual para el mejoramiento de practicas de beneficio y calidad de cacao*.
- Gregory, P., & Madisson, A. (1981). *pidemiology of Phytophthora on Cocoa in Nigeria. Londres: Commonwealth Mycological Institute*.
- IICA. (2017). *Manual tecnico del cultivo de cacao practicas latinoamericanas*. San Jose, Costa Rica . Obtenido de <http://www.iica.int/sites/default/files/publications/files/2017/BVE17089191e.pdf>.

- Jaimés, Y., & Aranzazu, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Bogotá.
- Johnson, J., Bonilla, J., & Castillo, L. (2008). *manual de manejo y producción del cacao*. Obtenido de <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENF01J71.pdf>.
- Johnson, J., Bonilla, J., & Castillo, L. (2008). *Manual y Manejo de producción del cacao*. Obtenido de <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENF01J71.pdf>.
- Kellam, M., & Zentmyer, G. (1981). *Isolation of Phytophthora citrophthora from cocoa in Brazil*. Brasil.
- Martínez, D. (2015). *Caracterización de cultivares de cacao (Theobroma cacao L.) por su respuesta de defensa a Moniliophthora roreri y su polimorfismo de SSRs*. Bogotá, Colombia.
- Massola, N., & Krugner, T. (2011). *Fungos fitopatogênicos*. São Paulo: anual de fitopatologia: princípios e conceitos. Recuperado el 11 de Marzo de 2020
- Merchan, V. M. (1981). *Avances de Investigación de la Moniliasis del cacao en Colombia In, La Moniliasis del cacao*. Bogotá.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural . (2012). *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural* . Obtenido de <file:///C:/Users/User/Downloads/ANUARIO%20ESTADISTICO%20DE%20FRUTAS%20Y%20HORTALIZAS%202011.pdf>

- Ortiz, V. (2013). *Morfología y taxonomía del cacao* . Obtenido de <https://es.scribd.com/document/154494737/MORFOLOGIA-Y-TAXONOMIA-del-cacao>.
- Paredes, M. (2003). *Manual tecnico del cacao*. Obtenido de <http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/215.pdf>
- Phiillips, & Mora, W. (1986). *Evaluación de la resistencia de cultivares de cacao (Theobroma cacao L.) a Moniliophthora roreri (Cif. y Par.)*. Costa Rica.
- Rojas, F., & Sancristan, E. (2013). *Guia ambiental para el cultivo de cacao*. Obtenido de https://www.fedecacao.com.co/portal/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_05B.pdf.
- Salazar, M., & Aranzazu, F. (1998). *Metodologia Empleada Para Aislar Rosellinia pepo*. Corpoica , Manizales.
- Sánchez, J. A. (1982). *Reacción de cultivares de cacao a la inoculación artificial con Monilia roreri*. Costa Rica .
- SIC. (2011). *Cadena productiva del cacao diagnostico libre de competencia*. Obtenido de http://www.sic.gov.co/recursos_user/documentos/promocion_competencia/Estudios_Económicos/Cacao.pdf.
- Sociedad de Agricultores de Colombia SAC. (2013). Obtenido de <https://www.sac.org.co/es/quienes-somos/nuestros-afiliados/72-afiliado-25.html>.
- Sotomayor, F. (1965). *Estudios preliminares sobre la resistencia de algunos clones de cacao a la moniliasis provocada por la inoculación artificial*. Guayaquil, Ecuador.

- Suárez, Y. J., & Hernández, F. A. (2010). *MANEJO DE LAS ENFERMEDADES DEL CACAO (Theobroma cacao L.) EN COLOMBIA, CON ÉNFASIS EN (Moniliophthora roreri)*.
- Suárez, C. (1972). *Mecanismos de penetración y proceso de infección de Monilia roreri (Cif. y Par.) en frutos de cacao (Theobroma cacao L.)*. Trinidad y Tobago.
- Universidad mayor de San Marcos . (2009). *Caracterización genética y molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 Árboles clonales e híbridos de cacao (Theobroma cacao L.) de la UNAS, Tingo María. Lima, Peru* .
- Villegas, G. (1996). Enfermedades de Macadamia en la Zona Cafetera Central. *Avances tecnicos Cenicafe*(228), 1-7.
- Zorrilla, J., & Perez, E. (2017). *Biofungicidas para el control de Moniliasis en el cultivo de Theobroma cacao L. Clon 575 en la ESPAM MFL (Bachelor's thesis, Calceta: ESPAM)*.

12. Anexos.



Anexo 1. Preparación de medios y multiplicación de Phytophthora sp.



Anexo 2. Cortes en caja madre de Phytophthora sp. y pase a caja nueva.



Anexo 3. Cortes de fragmento de raíz y lavado con agua ozonizada para aislamientos de Rosellinia sp.



Anexo 4. Preparación y ajuste de pH de Agar Nutritivo con Extracto de Zanahoria y agar PDA.



Anexo 5. Preparación y auto clavado de agar PDA.



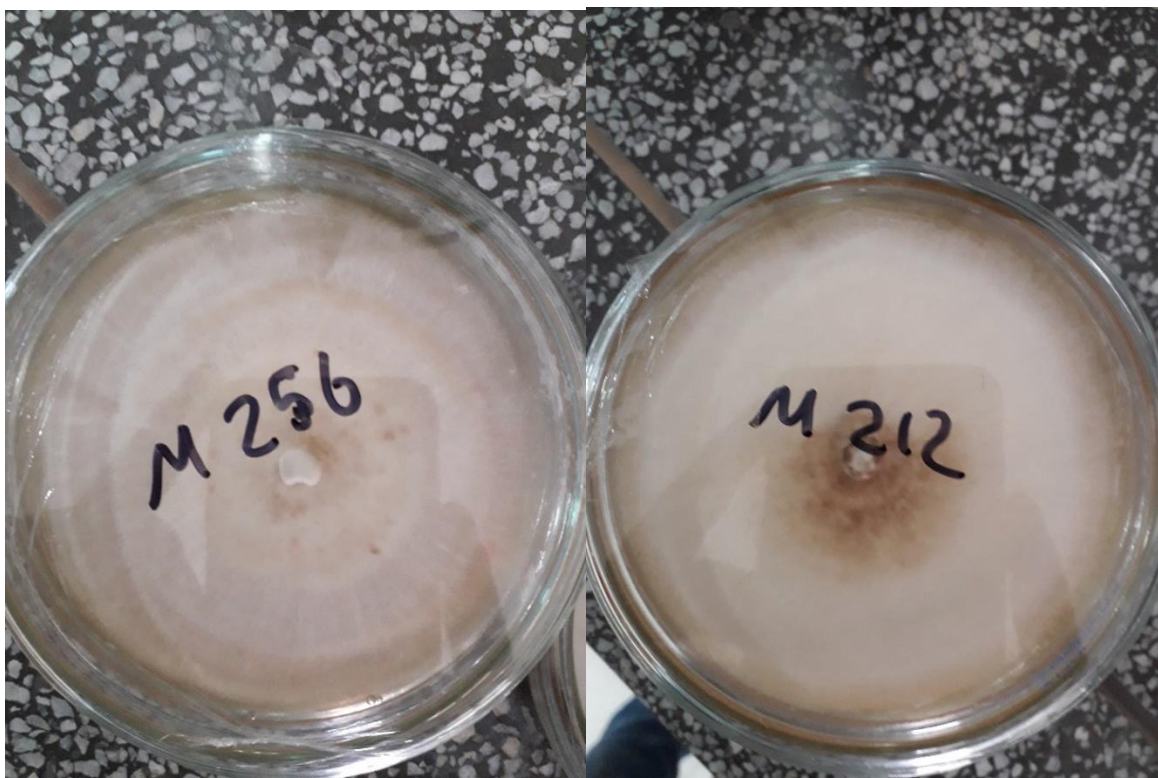
Anexo 6. Multiplicaciones diarias de Phytophthora sp.



*Anexo 7. Incubadoras con multiplicaciones de *M. roleri* y *Phytophthora* sp.*



Anexo 8. Apoyo a cosechas y selección de materiales para montajes de ensayos de vivero.



*Anexo 9. Multiplicación efectiva de *M. roleri* con código M-256 y M-212.*



Anexo 10. Empaque y esterilización de vidriería de trabajo para aislamientos.

Anexo 11. Manual de procesos del Laboratorio de Sanidad Vegetal.

<p>Apoyo A La Redacción De Manual De Procesos Laboratorio De Sanidad Vegetal</p> <p>Federación Nacional De Cacaoteros</p> <p>DANILO SANTOS ALVEAR</p> <p>Pasante Investigación</p> <p>C.C. 1050555022</p> <p>Federación Nacional De Cacaoteros</p> <p>San Vicente del Chucurí</p> <p>2020</p>	<p>INDICE</p> <p>1. Preparación de montajes para observaciones al microscopio..... 3</p> <p>1.1. Cortes a mano alzada..... 3</p> <p>1.2. Montaje por improntas..... 4</p> <p>1.3. Raspado de tejidos..... 5</p> <p>2. Procedimiento para el aislamiento de hongos a partir de tejido vegetal..... 6</p> <p>2.1. Preparación de Cámaras Húmedas..... 6</p> <p>2.2. Siembra directa en medios de cultivo..... 7</p> <p>2.3. Preparación de medios de cultivo..... 8</p> <p>2.3.1. Agar papa dextrosa (PDA)..... 9</p> <p>2.3.2. Agar nutritivo con extracto de zanahoria..... 9</p> <p>3. Obtención de cultivos monospóricos a partir de esporas..... 10</p> <p>Características de los cultivos puros:..... 10</p> <p>Montaje de Placas de hongos con azul de lactofenol..... 11</p>
---	---

<p>1. Preparación de montajes para observaciones al microscopio</p> <p>1.1. Cortes a mano alzada.</p> <p>La técnica de cortes a mano alzada es un proceso que consiste en realizar cortes de tejidos a mano alzada de forma transversal o longitudinal con el fin de poder observar las estructuras internas de los tejidos vegetales, en caso tal de que se quiera ver la infección de algún patógeno permite observar la forma y ubicación interna de las esporas, esto con la ayuda de un colorante como lo es el Azul de lactofenol.</p> <p>Procedimiento:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Se lava toda la parte del material vegetal al cual se le quiere hacer la respectiva observación. 2. Realizar cortes sobre el tejido de manera transversal o longitudinal, como se requiera bajo el estereoscopio para lograr una mejor precisión en los cortes. 3. Tratar de mantener húmeda la muestra con un poco de agua destilada mientras se realiza el corte ya que la luz del estereoscopio hace que la muestra se vaya deshidratando y se queme. 4. una vez realizado el corte, proceder a teñir con Safranina, Azul de metileno, Azul de lactofenol y dejar actuar el colorante durante 1 minuto. 5. Pasado el minuto de la coloración lavar cuidadosamente con agua destilada para quitar el exceso de colorante 6. Una vez retirado el exceso de colorante, secar con una toallita de papel el exceso de agua, añadir 1 gota de glicerina. 7. Cuando ya tenga glicerina la muestra, cubrir con cubreobjetos y observar al microscopio 	<p>1.2. Montaje por improntas.</p> <p>El montaje por improntas consiste en preparar una impresión directa de una muestra sobre un portaobjetos o sobre un material adherente, La impronta es una técnica que permite obtener estructuras reproductivas de los hongos filamentosos, así como las hifas para poder observarlas al microscopio sin dañarlos.</p> <p>Para realizar el montaje por improntas se necesita:</p> <table border="1"> <tr> <td>Portaobjetos</td> <td>cubreobjetos</td> <td>Cinta adhesiva transparente</td> <td>Colorante (Azul de lactofenol)</td> </tr> <tr> <td>Aza micológica</td> <td>Puente de vidrio</td> <td>Mechero</td> <td>Muestra con el patógeno</td> </tr> </table> <p>Procedimiento</p>	Portaobjetos	cubreobjetos	Cinta adhesiva transparente	Colorante (Azul de lactofenol)	Aza micológica	Puente de vidrio	Mechero	Muestra con el patógeno
Portaobjetos	cubreobjetos	Cinta adhesiva transparente	Colorante (Azul de lactofenol)						
Aza micológica	Puente de vidrio	Mechero	Muestra con el patógeno						

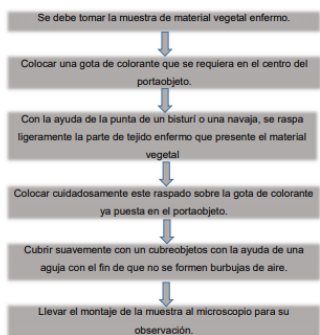
1.3. Raspado de tejidos.

La técnica de montaje al microscopio por medio de raspado de tejido es muy sencilla y permite la observación directa de estructuras del patógeno que esté afectando al tejido vegetal que se quiere observar. Para esto el material vegetal debe presentar un aspecto algodonoso o indicios de estructuras del patógeno (signos) visibles a simple vista.

Para realizar el montaje por medio de raspado de tejidos se necesita:

- Material vegetal afectado con indicios de estructuras del patógeno o aspecto algodonoso.
- Portaobjeto
- Cubreobjetos
- Colorante (Azul de lactofenol o el que se requiera)
- Navaja o cuchilla de bisturí.

Procedimiento:

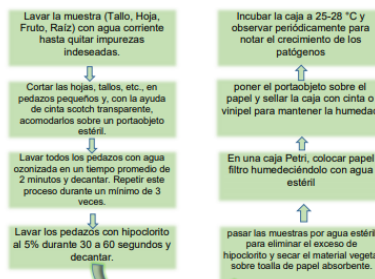


2. Procedimiento para el aislamiento de hongos a partir de tejido vegetal.

2.1. Preparación de Cámaras Húmedas.

En la fitopatología y métodos de aislamiento de hongo, la cámara húmeda se considera muy importante ya que por este método se pueden obtener rápidamente esporulación del hongo que se quiere aislar y así mismo darle identificación a estos patógenos para saber la causante de dicha sintomatología.

Procedimiento:



Antes de realizar la cámara húmeda se debe tener en cuenta que algunos patógenos presentan cierta sensibilidad a los procesos de esterilización y por ello algunos trozos de tejido no se les hace este procedimiento. Lo mejor sería seleccionar partes del tejido que no presenten tantos daños o lesiones muy grandes, así se evita la presencia de agentes contaminantes.

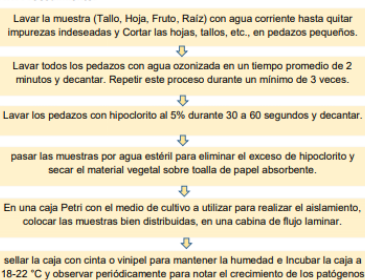
2.2. Siembra directa en medios de cultivo.

La siembra directa en medios de cultivo consiste en repetir algunos de los pasos del procedimiento anterior, a diferencia de que, en lugar de colocar los cortes sobre un portaobjeto en cámara húmeda, se van a colocar directamente en un medio de cultivo para permitir su crecimiento en este. Normalmente en estas siembras directas de cortes sobre medios de cultivo se produce contaminación, pero se pueden realizar pases de sectores de la caja de Petri que estén más limpios a otras cajas con medio de cultivos nuevos, esto permite que la contaminación presentada inicialmente se vaya eliminando e ir purificando las cajas con el patógeno que se quiere aislar y obtener cultivos monospóricos.

Las siembras en medios de cultivo también se pueden realizar a partir de las cámaras húmedas, una vez en las cámaras húmedas descritas anteriormente se presente crecimiento de los patógenos, se pueden realizar pases de las estructuras reproductivas de estos a los medios de cultivo producidos en el laboratorio con el fin de tenerlos aislados en estas cajas de Petri y tener cultivos monospóricos de todos los patógenos que están causando anomalías en el cultivo de Cacao.

Todos los pasos finales se tienen que llevar a cabo en una cabina de flujo laminar con el fin de lograr mejores resultados en los procesos.

1.4.1. Procedimiento.



2.3. Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo están conformados por una serie de nutrientes y otros factores que les suministran a los microorganismos las condiciones necesarias para su desarrollo. Los microorganismos tienen una gran diversidad metabólica, tanto así que existen una gran variedad de medios.

Al momento de iniciar la preparación de un medio de cultivo, hay que tener en cuenta algunas cosas para que su trabajo sea más fácil. Conviene, por ejemplo, tomar la precaución de ocupar sólo la mitad de la capacidad del Erlenmeyer, para evitar que el contenido, salte en el interior durante la esterilización o se derrame. La boca del Erlenmeyer se cubre con un tapón de algodón o papel aluminio, o bien con ambos (Gilchrist, S, y otros, 2005).



Imagen2. Forma de vaciar un medio de cultivo para evitar la condensación. Obtenida de Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada.

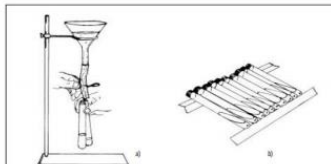


Imagen3. Llenado de tubos de ensayo con medios de cultivo en posición inclinada. Obtenida de Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada.

2.3.1. Agar papa dextrosa (PDA).

1. Se colocará en una plancha calentadora un Erlenmeyer con 0,8 L de agua destilada, una vez este tibio el agua se procederá a agregar 39 gramos del agar correspondientes a la dosis que viene en la etiqueta.
2. Agregar 0,2 L de agua destilada para completar el litro.
3. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.
5. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar de acuerdo a la técnica a seguir en cajas de Petri estériles o tubos de ensayo, en una cabina de flujo laminar.

2.3.2. Agar nutritivo con extracto de zanahoria.

1. Por cada litro de agua destilada se necesitarán 200 g de zanahoria y 28 g de agar nutritivo.
2. se toman 0,8 L de agua destilada y se licúan con los 200 g de zanahoria y posteriormente se pasará la solución por un colador de tela.
3. Se coloca a calentar la solución de agua destilada y zanahoria hasta estar a temperatura media y se agregan los 28 g de agar nutritivo.
4. Se agregan 0,2 L de agua destilada y se agregan inhibidores si se requiere, con el fin de evitar el crecimiento microbiano y fúngico que para la práctica no se requiere.
5. Se ajusta el pH 5,4 y se lleva la solución hasta punto de ebullición durante un tiempo promedio de 1 minuto para disolverlo por completo.
6. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.
7. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar de acuerdo a la técnica a seguir en cajas de Petri estériles o tubos de ensayo, en una cabina de flujo laminar.

3. Obtención de cultivos monospóricos a partir de esporas

Los cultivos monospóricos son aquellos que están conformados por una sola especie o tipo de microorganismo. Para lograr obtener estos cultivos monospóricos se deben tener colonias aisladas de un solo microorganismo.

Características de los cultivos puros:

- Deben ser bioquímica y fisiológicamente iguales.
- Al microscopio deben tener un aspecto común.
- Tienen que tener iguales propiedades tintoriales.
- Deben ser iguales en forma, tamaño y color.

Procedimiento:

Hay que realizar una preparación de agua estéril en la cual haya una pequeña concentración de conidios del patógeno.



se deben tomar aproximadamente unos 0,4 ml de la solución obtenida anteriormente y colocarla en una caja de Petri con medio de cultivo específico para el patógeno y después se dispersa con una varilla de vidrio esterilizada



Estar pendiente con el paso de los días la germinación de los conidios puestos en el medio.



Una vez germinados los conidios, se debe tomar una aguja previamente esterilizada al calor y se ubican los conidios en forma aislada para tomar el trozo de agar donde estos se encuentran



realizar un pase de cada conidio en germinación a cajas Petri individuales que ya contengan el medio de cultivo específico para el patógeno que se quiere aislar.



Continuar monitoreando constantemente el crecimiento de los conidios aislados.

Montaje de Placas de hongos con azul de lactofenol.

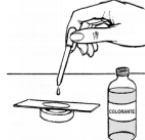
La técnica de montaje con azul de lactofenol, es utilizada principalmente para la observación de hongos, esta es una tinción simple ya que solo requiere de un solo colorante y su característica principal es la afinidad que tiene con las estructuras de los hongos como las hifas. Existen 3 características que hacen que el azul de lactofenol sea especial para que se puedan ver las estructuras de los hongos.

Estas características son:

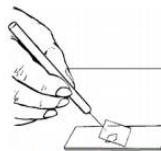
1. El fenol ayuda a eliminar los agentes contaminantes que puedan llegar a crecer con los hongos.
2. El ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al crear, por decirlo de algún modo, una película que las protege, provocado por un cambio de gradiente osmótico entre el interior y el exterior de dicha estructura.
3. El azul de algodón tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios de los hongos microscópicos.

Procedimiento

1. En una lámina portaobjetos, colocar una gota de azul de lactofenol u otro colorante que se quiera utilizar para dicho montaje.



2. Con una aguja entomológica se debe tomar una parte pequeña que contenga tejido hifal, luego se dispersa en el portaobjetos donde ya se ha colocado una gota de colorante, posterior a esto se pone sobre la muestra un cubreobjetos.



3. Aparte de esto se puede realizar con una cinta adhesiva transparente, la cual se pasa con suavidad sobre la muestra y luego se coloca en un portaobjetos con una gota de colorante.



4. Observar al microscopio plano con aceite de inmersión, cuando las estructuras son muy pequeñas.

Anexo 12. Artículo divulgativo monográfico con énfasis en moniliasis del cacao

Si menos moniliasis quieres tener, lo siguiente debes hacer...

Redacto: Danilo Santos Alvear.
Pasante investigación

La moniliasis es una enfermedad fungica que ataca el cultivo de cacao, causada por un Basidiomycete llamado *Moniliophthora roreri*. Este está presente en la mayoría de países latinoamericanos y se adapta a una gran diversidad de ambientes

Síntomas de la enfermedad en el cultivo de cacao.

- Se pueden observar deformaciones en los jóvenes, principalmente en los jóvenes, estas deformaciones comúnmente se les conoce como "Gibas".
- Se puede producir la maduración prematura de frutos y aparición de puntos acelosos en los mismos.
- Aparición de manchas irregulares de coloración café.
- Aparición de micelio polvoso en estas manchas de color café, en el cual se encuentran las estructuras reproductivas del hongo que pueden diseminarse fácilmente.

Estrategias de control contra la enfermedad.

Existen diversas técnicas de manejo que permiten tener un control preventivo de la enfermedad y otras estrategias de control correctivo o parcial de esta, todas estas tienen como fin evitar grades perdidas productivas a causa del hongo. Entre estas estrategias de control podemos encontrar:

- Preventivas.**

Dentro de estas acciones de carácter preventivo podemos encontrar:

PODAS

Mantenimiento

Reguladoras de sombríos.

Las podas de mantenimiento consisten en básicamente mantener el árbol de cacao con las condiciones sanitarias, forma arquitectónica del árbol, altura, etc., adecuadas, esto ayuda a que la humedad relativa dentro del cultivo no sea tan alta y favorezca la aparición y desarrollo de la enfermedad, además ayuda a una mejor aireación y temperatura optima dentro de las plantaciones.

Las podas reguladoras de sombrío, como su nombre lo indica, busca principalmente controlar los excesos de sombra dentro del cultivo y así evitar excesos de humedad dentro de las plantaciones, tener la cantidad de luz óptima para un buen desarrollo de las plantas y evitar las condiciones favorables para la aparición de la enfermedad.

Dentro de las estrategias de manejo preventiva también podemos encontrar el **manejo correcto de los drenajes** que busca evacuar excesos de agua dentro del cultivo. Las **Cosechas oportunas** para evitar sobre maduración de frutos, **Control de malezas** quienes compiten por nutrientes con el cultivo, además de aumentar las condiciones de humedad.

Aparte de estas estrategias de manejo preventivo para la enfermedad también hay que tener en cuenta la planificación de siembras, en la cual es importante escoger un buen material que presente características de resistencia y/o tolerancia a la moniliasis, para que el patógeno no tenga fácil entrada a los frutos del cacao, la correcta planificación de las distancias de siembra entre plantas para evitar sobrepoblación de árboles por hectáreas.

- Correctivas.**

Dentro de las estrategias de control correctivas para la enfermedad, que hace referencia a las acciones que se deben tomar para bajar la incidencia de la enfermedad una vez esta esté presente en las plantaciones de cacao, cabe adarar que la medida principal de control son las **Podas Sanitarias**, las cuales consisten en realizar un monitoreo constante dentro de las plantaciones con el fin de encontrar material enfermo y eliminarlo.

Las podas sanitarias contra la moniliasis consisten principalmente en encontrar frutos con los síntomas de la enfermedad, cortarlos y dejarlos sobre la superficie del suelo, los microorganismos presentes en el suelo se encargan de combatir y eliminar este hongo.



Imagen 7. Síntomas de Monilía en Fruto de cacao. Obtenido de <http://www.mnutagropecuaria.com/ambiente/moniliasis-del-cacao-hongo-mortal/>