

ESTUDIO DEL PROCESO INFECTIVO DE *Moniliophthora roreri*
(MARASMIACEAE) EN FRUTOS DE LOS CLONES DE CACAO ICS 95 Y TSH
565: ESTRUCTURA, ULTRAESTRUCTURA Y ASPECTOS
HISTOPATOLÓGICOS.

ANA MARIANY GUTIERREZ RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2013

ESTUDIO DEL PROCESO INFECTIVO DE *Moniliophthora roreri*
(MARASMIACEAE) EN FRUTOS DE LOS CLONES DE CACAO ICS 95 Y TSH
565: ESTRUCTURA, ULTRAESTRUCTURA Y ASPECTOS
HISTOPATOLÓGICOS.

ANA MARIANY GUTIERREZ RODRIGUEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

DIRECTOR
HERMINSUL DE JESÚS CANO
CODIRECTOR
HUMBERTO EMILIO GARCÍA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA

2013

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	9
1. MATERIALES Y MÉTODOS	11
1.1 Obtención de las muestras	11
1.2 Material de estudio.....	11
1.3 Procesamiento histológico	11
1.4 Descripción morfológica de <i>M. roreri</i>	12
1.5 Observaciones histológicas	12
2. RESULTADOS.....	12
2.1 Observaciones histológicas	13
2.1.1 Frutos sanos	13
2.1.2 Frutos infectados	13
2.1.2.1 Síntoma Puntos aceitosos	13
2.1.2.2 Síntoma Mancha café	14
2.1.2.3 signo Micelio superficial	15
2.2 Descripción morfológica de <i>M. roreri</i>	16
3. DISCUSION.....	17
4. CONCLUSIONES.....	20
BIBLIOGRAFIA.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Síntoma Puntos aceitosos.	14
Figura 2. Síntoma Mancha café.	15
Figura 3. Signo Micelio superficial.....	16
Figura 4. Morfología de <i>M. roreri</i>	17

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL PROCESO INFECTIVO DE *Moniliophthora roreri* (MARASMIACEAE) EN FRUTOS DE LOS CLONES DE CACAO ICS 95 Y TSH 565: ESTRUCTURA, ULTRAESTRUCTURA Y ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS*.

AUTOR:

GUTIERREZ RODRIGUEZ ANA MARIANY**

PALABRAS CLAVE: moniliasis, cacao, ICS 95, TSH 565, histología, Microscopía

Los aspectos estructurales y ultraestructurales de *Moniliophthora roreri* así como el procesamiento histológico para determinar su localización y los daños que ocasiona son poco conocidos. Se estableció un protocolo para corte y tinción de tejidos de los frutos de *Theobroma cacao* y se usaron herramientas como microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y microscopía electrónica de barrido (MEB) para describir la morfología y ultraestructura del patógeno y los cambios causados por la infección en mazorcas de los clones ICS 95 (moderadamente resistente) y TSH 565(susceptible). El mejor protocolo histológico fue la fijación en FAA, ablandamiento con una mezcla de glicerol-alcohol y ácido fluorhídrico, deshidratación en una serie ascendente de etanoles y coloración con safranina-fastgreen. Histológicamente se observaron características similares en ambos clones, a diferencia de la estructura del parénquima y de la cantidad de sustancias posiblemente polifenólicas acumuladas; lo que podría explicar en parte la diferencia de resistencia entre estos. En los frutos infectados se ve un mayor daño en mazorcas de TSH 565, tanto en el exocarpo como en las semillas, culminando con la destrucción total de estas cuando se presentó el signo de micelio superficial. Morfológicamente *M. roreri* mostró un estroma con hifas septadas densamente unidas y esporas ovaladas unidas en etapas inmaduras, internamente solo se observaron esporas redondeadas invadiendo los cotiledones.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Hermínsul Cano, Ph. D. & Codirector: Humberto García, Biólogo.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF *Moniliophthora roreri* (MARASMIACEAE) INFECTIOUS PROCESS IN THE COCOA CLONES THS 565 AND ICS 95 PODS: STRUCTURE, ULTRASTRUCTURE AND HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS*.

AUTHOR:

GUTIERREZ RODRIGUEZ ANA MARIANY**

KEY WORDS: moniliasis, cocoa, ICS 95, THS 565, histology, Microscopy.

The structural and ultrastructural *M. roreri* aspects and the histological processing to determinate its location and the damage caused are poorly understood. A protocol for cutting and staining of *T. cacao* pods tissue was established, and tools like high resolution optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM) were used to describe the pathogen's morphology, ultrastructure and the changes caused by the infection in fruits of clones ICS 95 (moderately resistant) and TSH 565 (susceptible). The best histological procedure was a fixation in FAA, softening with a mixture of glycerol-alcohol and hydrofluoric acid, dehydration in an ascending series of ethanol and staining with safranin-fastgreen. Similar histological features were observed in both clones, except in the structure of parenchyma and the amount of accumulated polyphenolic substances; which could partly explain the difference of resistance among the clones. In infected pods a stronger damage is observed in TSH 565, both the exocarpo and seeds, culminating with the destruction of these when the superficial mycelium was exposed. Morphologically *M. roreri* showed a stroma with septate hyphae and oval spores connected in immature stages, internally, rounded spores were observed only invading the fruits cotyledons of both clones.

* Thesis

**Universidad Industrial de Santander, Science Faculty, Biology School. Tutor: Hermínsul Cano, Ph. D. & Co-tutor: Humberto García, Biologist.

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.: *Malvaceae*) es uno de los cultivos tropicales con mayor relevancia económica, social, cultural y ambiental a nivel mundial y nacional (Whitlock et al. 2001, Jaimes y Aranzazu 2010). En nuestro país su importancia está representada en aproximadamente 86.000 hectáreas en 23 departamentos con una cosecha anual de 49.000 toneladas, siendo Santander uno de los principales cultivadores al aportar cerca del 50% de la cosecha nacional (Monsalve et al. 2005, Rodríguez 2005, Jaimes y Aranzazu 2010). Varios factores afectan la producción de cacao; entre estos el más limitante es la infección ocasionada por el patógeno *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis, helada o pudrición acuosa; una plaga fitosanitaria que en Colombia puede causar grandes pérdidas que varían desde el 25% hasta la totalidad de la cosecha según la región y las técnicas de plantación usadas (Bowers et al. 2001, Sánchez et al. 2003, Jaimes y Aranzazu 2010).

M. roreri es un microhongo fitopatógeno biótrofo distribuido en el norte de Suramérica y Centroamérica (Holliday 1970, Evans et al. 1978), este afecta principalmente a cultivos de cacao (Jaimes y Aranzazu 2010), pero también se ha reportado en otras especies de *Theobroma* y algunas del género *Herrania* (Rodríguez et al. 2005), este patógeno ataca exclusivamente al fruto y la sintomatología varía dependiendo de la edad en la que este es infectado; en pepinos de menos de tres semanas, se observa marchitamiento y detención del crecimiento, de tres a cinco semanas se producen abultamientos o “gibas” y en mazorcas de más de dos meses aparecen puntos aceitosos que posteriormente se unen para formar una mancha café, la cual en pocos días y dependiendo de las condiciones ambientales se cubre de micelio y esporas (Rodríguez et al. 2005, Jaimes y Aranzazu 2010).

Los avances para controlar la enfermedad, se centran en el manejo cultural (Bravo y Victoria 1981, Parra y Sánchez 2005, Castellano et al 2007, Mejía et al. 2008,

Jaimes y Aranzazu 2010) la aspersión química (Sánchez et al. 2003, Parra y Sánchez 2005, Mejía et al. 2008), el control biológico (Krauss et al. 2003, Mora y Garcés 2012) y en el mejoramiento genético de los clones de cacao (Bravo y Victoria 1981, Parra y Sánchez 2005, Jaimes y Aranzazu 2010), siendo este último, el método más efectivo, económico y amigable con el medio ambiente.

Desafortunadamente, son pocos los estudios de tipo histopatológico que se han realizado (Suarez 1971, Amaya et al.1976, Flores 1989), desconociéndose así parte de la compleja relación hospedero- hongo, cuyo entendimiento podría generar nuevas alternativas para el manejo de la enfermedad, lo cual motivo la realización de este estudio cuyos objetivos son establecer el método de histotecnica más adecuado para el procesamiento de las muestras y realizar una descripción de las estructuras del patógeno y de los cambios histológicos asociados con la infección en dos clones de cacao con diferentes grados de resistencia.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Obtención de las muestras

El material de *T. cacao* fue recolectado en la finca experimental de inductores de resistencia en campo de FEDECACAO “El Porvenir”, propiedad del señor Jaime Moreno, ubicada en la vereda Mérida del Municipio de San Vicente del Chucurí (Santander, Colombia).

1.2 Material de estudio

Para este estudio se usaron los clones THS 565 (susceptible) e ICS95 (moderadamente resistente) (Rodríguez et al. 2005). Se tomaron mazorcas de aproximadamente cuatro meses sanas e inoculadas artificialmente con *M. royeri*, (polinizadas a los 70 días de edad), la colecta se realizó luego de ocho semanas de la inoculación teniendo en cuenta seleccionar frutos de cada clon que mostraran diferentes fases de la enfermedad (puntos aceitosos, mancha café y micelio).

1.3 Procesamiento histológico

Para determinar el procedimiento de microtecnica más apropiado se usaron dos protocolos diferentes; en estos se varió el ablandamiento mientras que la técnica de fijación, deshidratación, corte y tinción fue la misma.

Protocolo 1. Se fijaron muestras en FAA (Ruzin 1999) por 24 horas, seguidamente se realizó un ablandamiento con glicerol-alcohol (Amaya et al.1976).

Protocolo 2. Luego de la fijación, las muestras se ablandaron en glicerol- alcohol y ácido fluorhídrico (Foster y Gifford 1947) con modificaciones propuestas por los autores.

Posteriormente el material se deshidrató en series graduales de etanol (70%, 80%, 90%,95% y 100%) por 5 horas en cada cambio y por 12 horas más en etanol al

100%, luego se aclaró con dos cambios en xilol de 4 y 12 horas respectivamente y se infiltró en Paraplast (Mc Cormick®) por 12 horas, finalmente se seccionó a 5-7 µm de grosor con un micrótomo rotatorio 820 Spencer.

1.4 Descripción morfológica de *M. royeri*

Para la descripción morfológica del patógeno, se realizó un cultivo in vitro según (Barros y Sánchez 1979), y se analizó con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), también se usaron los montajes permanentes realizados con las técnicas anteriormente descritas.

1.5 Observaciones histológicas

Para la diferenciación de los tejidos y la descripción del daño histopatológico, las secciones en parafina se colorearon con la técnica safranina-fastgreen (Johansen 1940, Ruzin 1999). La observación se efectuó mediante un microscopio Carl Zeiss Jena equipado con una cámara digital GenlCam y las fotomicrografías se tomaron con el software uEye Camera Manager.

El procesamiento del material para la obtención de los montajes permanentes se realizó en el laboratorio de Histotecnica de la Escuela de Biología y la fotodocumentación se efectuó en el Laboratorio de Óptica y Tratamiento de Señales de la Escuela de Física de la Universidad Industrial de Santander.

Los procedimientos de MEB se realizaron en el laboratorio de Microscopía del parque tecnológico Guatiguará, Universidad Industrial de Santander.

2. RESULTADOS

Para las muestras de mazorcas de cacao de los clones ICS 95 y THS 565 se determinó que el mejor protocolo histológico fue la fijación en FAA y el ablandamiento con una mezcla de glicerol- alcohol al 70% (en proporción 1:3) y ácido fluorhídrico (90 ml de alcohol-glicerol y 10 ml de ácido), la serie ascendente

de alcoholes permitió una correcta deshidratación y removió el exceso de mucílago, mientras que la técnica de coloración safranina-fastgreen dio excelentes resultados permitiendo diferenciar los tejidos del fruto y las estructuras propias del patógeno.

2.1. Observaciones histológicas

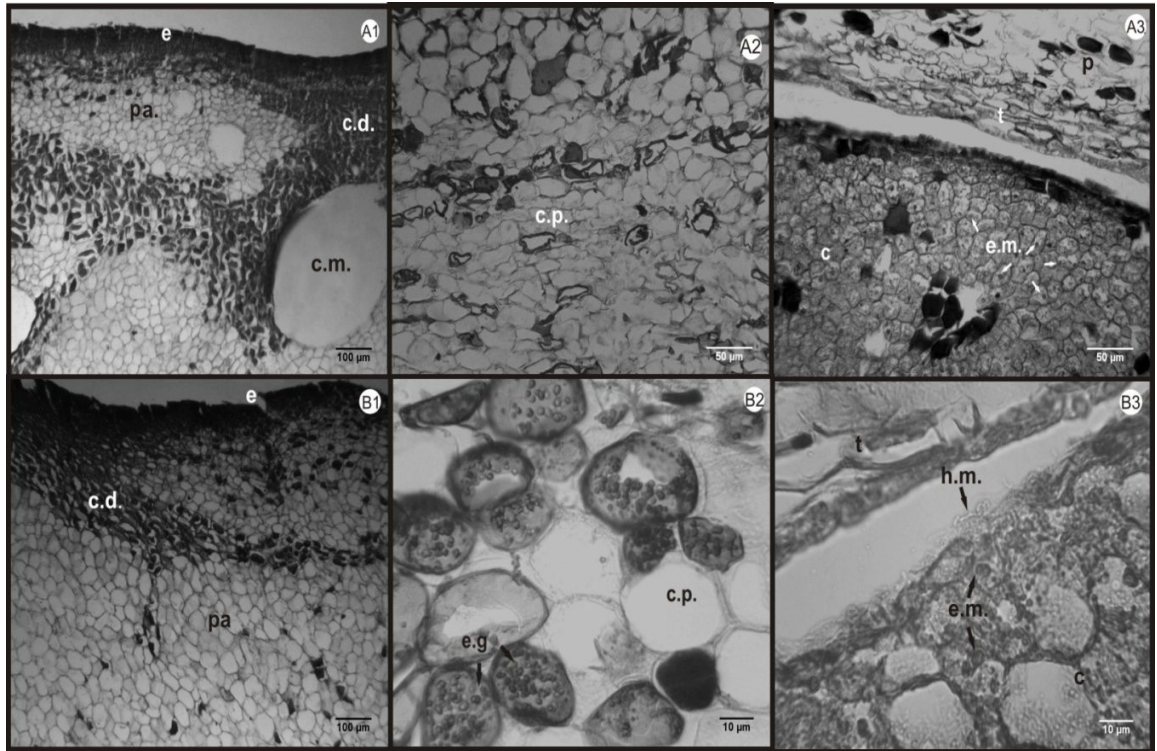
2.1.1 Frutos sanos. Las observaciones microscópicas en ambos clones mostraron una fina cutícula y epidermis monoestratificada compuesta por células rectangulares, tanto estas como las células del parénquima subepidérmico contenían depósitos de una sustancia oscura. En el clon ICS 95 se observó una mayor concentración de la sustancia anteriormente nombrada y un parénquima más compacto que el visto en TSH 565, cuyo arreglo celular fue más laxo, en ambos casos se observó la presencia de canales de mucílago distribuidos en el tejido así como haces vasculares colaterales, En la semilla se vieron cotiledones envueltos en el tegumento compuesto por varias capas celulares y rodeados por la pulpa.

2.1.2 Frutos infectados

2.1.2.1 Síntoma Puntos aceitosos

En los frutos de ambos clones se observó un aumento en la deposición de la sustancia oscura tanto en la epidermis como en el parénquima; el clon ICS 95 mostró una mayor cantidad de células parenquimáticas llenas de dicha sustancia, el tejido de ambos clones mostró espacios llenos de estructuras globosas de coloración rojiza. A nivel de la semilla se observó que tanto los cotiledones como el tegumento y pulpa de ambos clones también presentaban células con dicha sustancia; el clon ICS 95 mostró cotiledones y demás tejidos sin daño pero con presencia de esporas de *M. royeri* mientras que en TSH 565 se vio la destrucción de las células que conforman los cotiledones mostrando también esporas e hifas del patógeno.

Figura 1. Síntoma Puntos aceitosos.



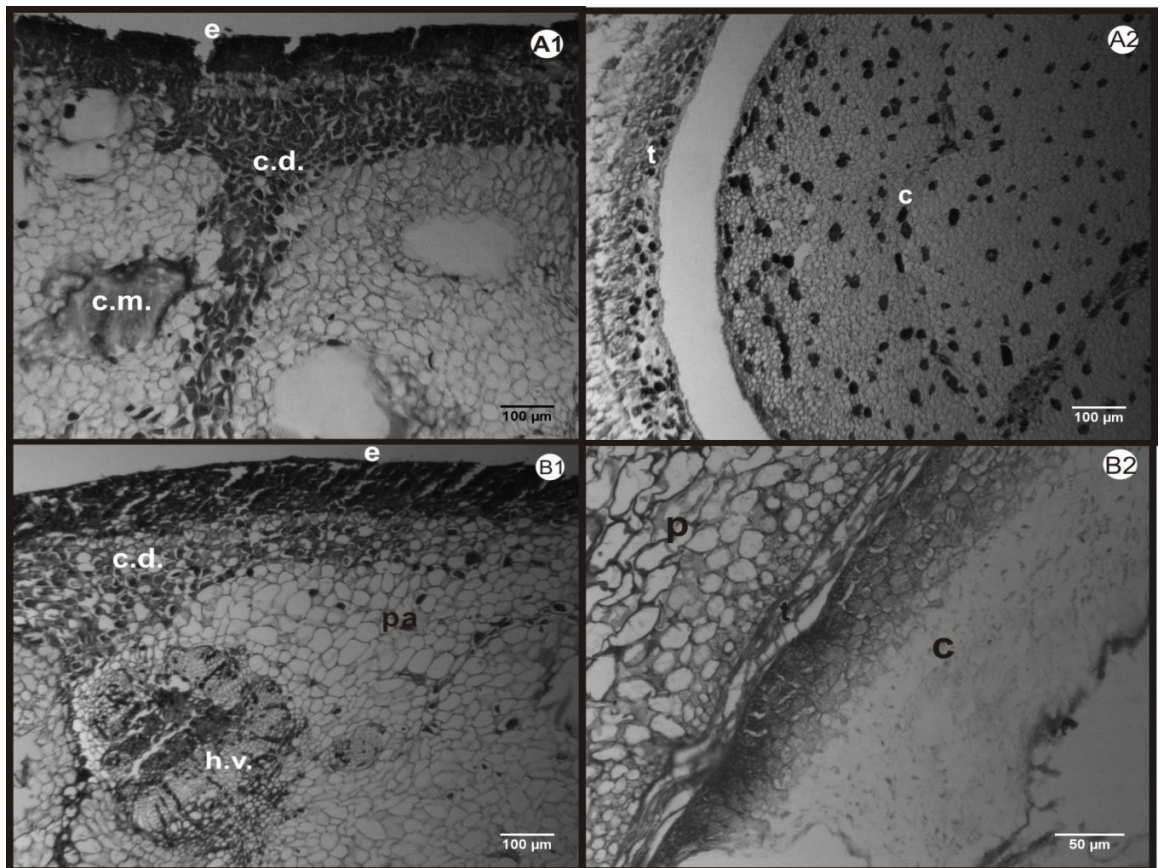
A) ICS 95, B) TSH 565. A1, B1. Parénquima mostrando células que contienen acumulación de sustancias posiblemente polifenólicas. A2, B2. Presencia de estructuras globosas intracelulares. A3, B3. Esporas dentro del cotiledón. c: cotiledón, c.d.: células con deposiciones. c.p.: célula parenquimática, e: epidermis, c.m.: canal mucilaginoso, e.g.: estructuras globosas, e.m.: espora de *M. royeri*, h.m.: hifas, p: pulpa, t: tegumento.

2.1.2.2 Síntoma Mancha café

Los frutos de ICS 95 y TSH 565 mostraron daño en la epidermis y células llenas de la sustancia en capas más profundas del tejido, también se vio la presencia de dicha sustancia en los haces vasculares. En mazorcas de TSH 565 el daño epidérmico fue más extendido y se observó la destrucción de las primeras capas del parénquima, en ambos clones se constató la presencia de espacios llenos de las estructuras citadas anteriormente aumentando la cantidad de estas en el tejido de TSH 565. En la semilla de ICS 95 los cotiledones se mantuvieron estables

pero empezaron a mostrar cambios celulares, también se vio aumento de esporas, mientras que de los cotiledones de TSH 565 solo se observaron fragmentos llenos de hifas y esporas.

Figura 2. Síntoma Mancha café.



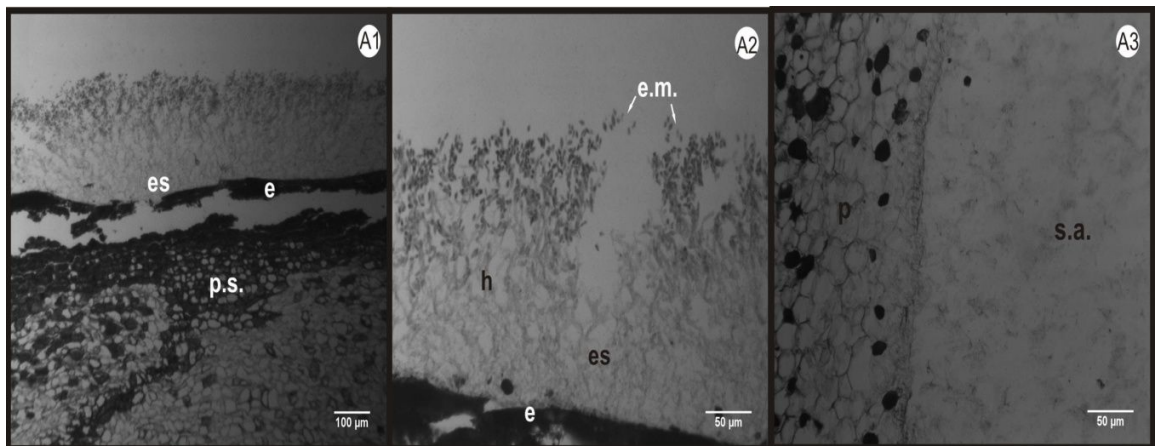
A) ICS 95, B) TSH 565. A1, B1. Daño tisular y aumento de células que contienen las sustancias polifenólicas. A2, B2. Cambios en los cotiledones. c: cotiledón, c.d.: células con deposiciones polifenólicas. c.m.: canal mucilaginoso, e: epidermis, h.v.: haz vascular, p: pulpa, pa: parénquima, t: tegumento.

2.1.2.3 Signo Micelio superficial

Solo se dio su inicio en frutos de TSH 565. Se observó un estroma compuesto por hifas y esporas inmaduras sobre la mazorca; el daño superficial fue mayor encontrándose solo fragmentos de la epidermis, esta junto los restos de parénquima subepidérmico mostraron gran cantidad de hifas de *M. rozeri*, también

se apreció daño en las capas más profundas del parénquima y en los haces vasculares así como el aumento de células con la sustancia nombrada anteriormente. En la semilla no se observaron cotiledones, solo la pulpa rodeando una sustancia acuosa.

Figura 3. Signo Micelio superficial.

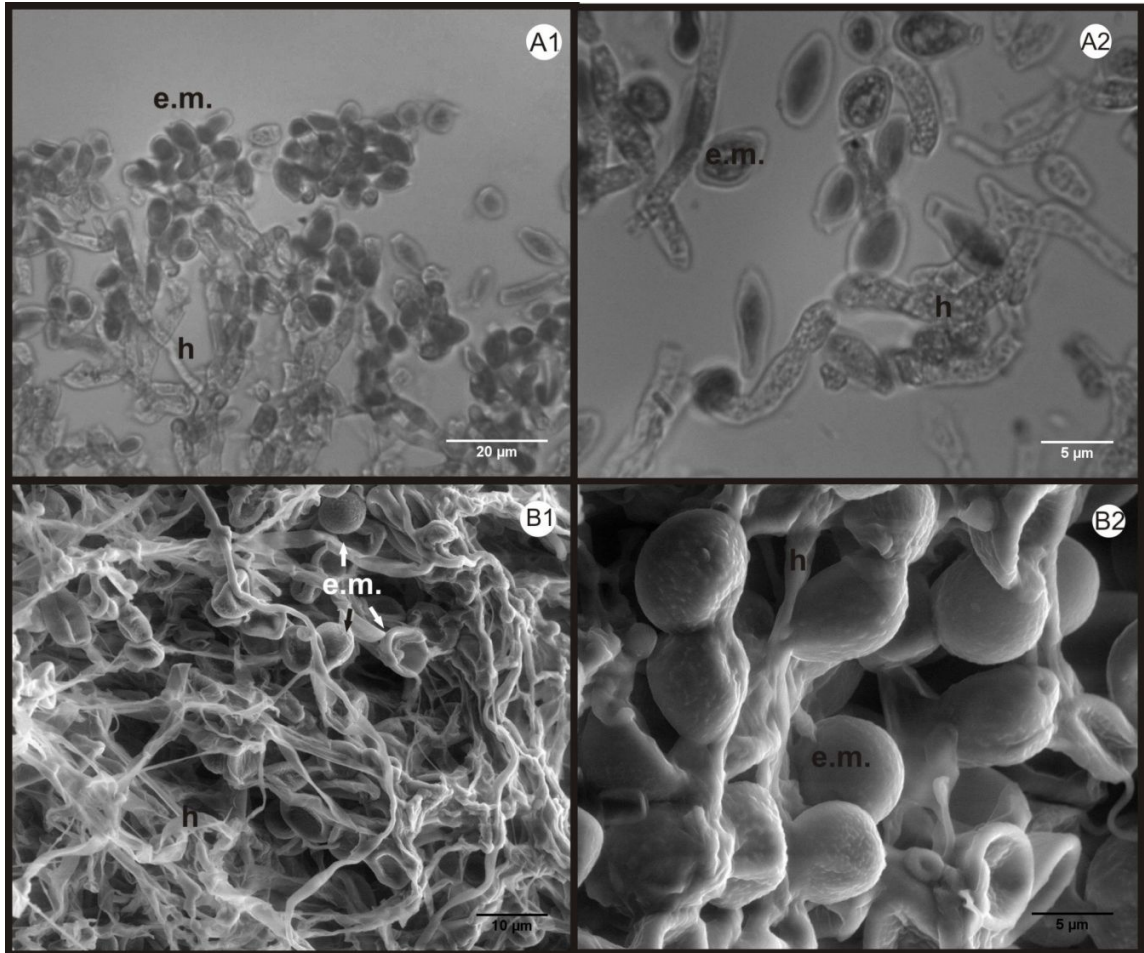


A) TSH 565, A1. Tejido con indicio de necrosis, obsérvese el daño en la epidermis y parénquima subepidérmico. A2. Estroma mostrando hifas y esporas A3. Destrucción del cotiledón. e: epidermis, h: hifas, p: pulpa, p.s.: parénquima subepidérmico, es: estroma, s.a.: sustancia acuosa.

2.1.3 Descripción morfológica de *M. roreri*

Sobre el fruto se observó un estroma compuesto por una masa de hifas hialinas septadas; en el extremo de estas se observaron esporas ovaladas de aproximadamente $7.2 \times 4.5 \mu\text{m}$, con MEB se constató que estas están unidas a la pared celular de la hifa en etapas iniciales, posteriormente desarrollan una pared con ornamentación rugosa y son liberadas. Las esporas observadas en los cotiledones se caracterizaron por ser redondas ($4.2 \mu\text{m}$), estas no se observaron en ningún otro tejido del fruto.

Figura 4. Morfología de *M. royeri*.



A) Montajes permanentes teñidos con safranina-fastgreen. A1. Hifas y esporas en aumento de 40x. A2. Aumento de 100x B) Fotomicrografías tomadas con microscopía Electrónica de Barrido (MEB). B1. Hifas. B2. Esporas inmaduras adheridas a la hifa. e.m.: espora de *M. royeri*, h: hifa.

3. DISCUSIÓN

Histológicamente se presentó dificultad para procesar las muestras debido a la dureza del pericarpio y al proceso de momificación propio de los frutos infectados; en todos los casos, el ablandamiento con glicerol-alcohol más ácido fluorhídrico

(Foster y Gifford 1947) dio los mejores resultados, a este protocolo se le realizaron modificaciones variando la concentración de etanol del 95% al 70%, esto para poder iniciar posteriormente el proceso de deshidratación. La coloración safranina-fastgreen diferencio muy bien el parénquima y los tejidos del fruto y las esporas e hifas de *M. roseri*, esto concuerda con lo hallado por Amaya et al. (1976), quienes consideran esta tinción una de las mejores para el estudio de los tejidos contaminados con moniliasis.

Las observaciones microscópicas realizadas en los montajes de tejido sano mostraron en ambos clones la presencia de una sustancia oscura en las células de la epidermis y parénquima subepidérmico, esto es similar a lo encontrado por Flores (1989), Kalvatchev et al. (1998) y Franco et al. (2010) quienes concluyeron que dicho componente era un tanino o alguna sustancia polifenólica que se encontraba naturalmente en la corteza del fruto de cacao.

En general, los tejidos de las mazorcas de ICS95 y THS 565 no mostraron grandes diferencias a excepción del arreglo de las células de parénquima y la cantidad de sustancias polifenólicas; esto coincide con el estudio de Flores (1989), quien evaluó tres clones diferentes y sugirió que estas características juegan un papel importante en el grado de resistencia, siendo los tejidos del clon resistente quienes tenían un arreglo celular más denso y una mayor cantidad de polifenoles, esto también fue señalado por Rocha y Jiménez (1966) quienes además consideraron que la variación en la estructura química de estos polifenoles era lo que ocasionaba las diferencias en resistencia.

Los estudios de tejido enfermo muestran que cuando se presentó el síntoma puntos aceitosos, el número de células del mesófilo con depósitos de polifenoles aumentó, siendo esto más visible en ICS 95. Este fenómeno ya había sido descrito por Flores (1989), quien sugirió que a mayores cantidades de esta sustancia mayor era el poder fungistático de los tejidos.

Los cuerpos globosos encontrados en el parénquima ya habían sido reconocidos por Suarez (1971) quien los denominó “tilidoides”; según el mismo autor, estas estructuras son un indicio del daño protoplasmático dado antes de la muerte y desorganización tisular y que se deben principalmente a diferencias en la presión celular ocasionadas por la presencia del patógeno.

Los frutos con el síntoma mancha café mostraron aumento en el número de células con polifenoles y su profundización en capas más internas del parénquima, dándose en mayor proporción en el clon ICS 95; esto podría explicar la resistencia de sus tejidos a la invasión por moniliasis, pues estas sustancias polifenólicas posiblemente son usadas para fabricar lignina, componente que refuerza las paredes celulares impidiendo la penetración del hongo y aislando el tejido enfermo (Flores 1989)

En estas mazorcas también se vio daño epidérmico, pero este fue más extendido en TSH 565 donde también aumentó la cantidad de células llenas de “tilidoides”, estas dos características hacen parte de los daños tisulares ocasionados por la presencia de *M. rozeri* y pueden deberse a actividad enzimática del hongo.

El signo micelio superficial solo se encontró en mazorcas de TSH 565, en estas se vio desorganización celular y daño en los tejidos, no pudiendo controlarse la pérdida de la humedad y estabilidad del mesocarpo, permitiendo así el surgimiento del estroma que dará origen a la esporulación (Suarez 1971). El micelio no se observó en frutos de ICS 95 probablemente porque el patógeno tarda más días en completar su ciclo vital en clones resistentes (Jaimes y Aranzazu 2010).

En las semillas, se observó un mayor daño en el clon TSH 565, mostrando deterioro desde el síntoma mancha café y culminando con la destrucción total de estas cuando se presenta el micelio, quedando solo una masa acuosa rodeada por la pulpa. Las semillas de ICS 95 mostraron desorganización del celular y

presencia de esporas e hifas de monilia pero en general estaban en buenas condiciones.

La forma variable de las esporas de *M. roseri* ya había sido reportada por Evans (1978), Holiday (1970), Flores (1989) y Villavicencio y Jiménez (2010) quienes describen la forma de las esporas de *M. roseri* como globosas, subglobosas y elipsoidales. No se observó la presencia de esporas en el resto de los tejidos porque posiblemente fueron removidas durante el procesamiento histológico.

4. CONCLUSIONES

Para realizar estudios con montajes permanentes de mazorcas de cacao se requiere de un ablandamiento previo a la deshidratación.

El clon ICS 95 mostró más resistencia histológica al avance de la infección causada por el patógeno; factores como la cantidad de polifenoles acumulados y la organización del parénquima pueden explicar parte de esa resistencia.

El daño en las semillas fue total cuando apareció el estroma en frutos de THS 565, en este punto también inició la momificación del fruto. Esto no se observó en ICS 95 posiblemente por ser el periodo de incubación más largo en clones resistentes.

M. roseri forma un estroma compuesto por hifas y esporas inmaduras, en etapas posteriores se observan masas de esporas color crema que son liberadas y dan inicio de nuevo al ciclo de vida del patógeno.

Las mazorcas de ambos clones mostraron esporas de *M. roseri* invadiendo los cotiledones pero no se observaron en otro tejido posiblemente por remoción durante el procesamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Amaya, L.M., Bustamante E., Navarro R., Hernández A. 1976. Estudio histopatológico de mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.) infectadas con el hongo *Monilia roreri*. Cif et Par. Noticias Fitopatológicas, 5(2): 97-98.

Barros, N.O., Sánchez J.A. 1979. Un método de aislamiento del hongo *Monilia roreri* Cif & Par. El Cacaotero Colombiano, 11: 27-40.

Bowers, J.H., Bailey, B.A., Hebbar, P.K., Sanogo, S., Lumsden, R.D. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. Plant Health Progress.

Bravo, N., Victoria, J. 1981. Posibilidades del control biológico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Evans) del cacao (*Theobroma cacao* L.). Acta Agronómica, 31 (1/4): 133-141.

Castellano, G., Rumbos, R., Moya, A., Gómez, C., Quevedo, H. 2007. Control cultural de la moniliasis del cacao en una plantación de la zona sur del lago de Maracaibo. Venezuela, INIA Divulga, p. 9-10.

Evans, H.C., Stalpers, J.A., Sampson, R.A., Benny, G.L. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany, 56:2528-2532.

Flores, D.M., 1989. Estudio ultramicroscópico del proceso de infección de *Moniliophthora roreri* en frutos de cacao. Tesis de Maestría en ciencias. Universidad de Costa Rica. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE). Departamento de Producción Vegetal. Turrialba, Costa Rica, 84p.

Foster, A.S., Grifford, E.M. 1947. Improvements in the Paraffin Method. Biotechnic & Histochemistry, 22(2): 129-131.

Franco, M., Ramírez, M., García, R.S., Bernal, M., Espinoza, B., Solís, J.A., Durán, C. 2010. Reaprovechamiento integral de residuos agroindustriales: cáscara y

pulpa de cacao para la producción de pectinas. México D.F, Revista Latinoamericana del ambiente y las ciencias, 1(2): 45-66.

Holliday, P. 1970. *Monilia roreri*. C.M.I. Londres. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Common Wealth Agricultural Bureau, 226:1-2.

Jaimes, Y., Aranzazu, F. 2010. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Corpoica. 90 p.

Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. Nueva York, EEUU. McGraw Hill.

Kalvathev, Z., Garzaro, D., Guerra, F. 1998. *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. Mérida, Venezuela. Revista Agroalimentaria, 4(6): 23-25.

Krauss, U., Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, J., Portuguez, A., Sánchez V. 2003. Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca, Costa Rica. Agroforestería en las Américas, 10:52-58.

Maddison, A.C., Macías, G., Moreira, C., Arias, R., Neira, R. 1995. Cocoa production in Ecuador in relation to dry-season escape from pod rot caused by *Crinipellis pernisiosa* y *Monillioptora roreri*. Plant Pathology, 44: 982-998.

Mejía, L., Rojas, E., Maynard, Z., Bael. S., Arnold, E., Hebbar, P., Samuels, G., Robbins, N., Herre. E. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. Biological Control, 46: 4-14.

Monsalve, L.S., García C.Y., Sigarroa, A.K. 2005. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el departamento Norte de Santander, Colombia. Revista de la Universidad Francisco de Paula Santander, 1: 21-30.

Mora, F.D., Garcés, F.R. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. 2012. Scientia Agropecuaria, 3: 249-258.

Parra D., Sánchez, L. 2005. El control de la Moniliasis de cacao. INIA Divulga, 6: 23-26.

Rocha, H., Jiménez, E., 1966. Importancia de las sustancias polifenólicas en el mecanismo fisiológico de la resistencia de cacao (*Theobroma cacao* L.) a *Phytophthora palmivora* (Butl.). Turrialba, Costa rica. 16(4):319-329.

Rodríguez, E., Mujica, J., Cubillos, G. 2005. Manejo integrado de la moniliasis en el cultivo de cacao. Bucaramanga. Colombia: Corpoica. p. 6-13.

Ruzin, SE. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University, Nueva York, EEUU.

Sánchez, L., Gamboa, E., Rincón, J. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif. y Par.) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. Revista de la Facultad de Agronomía LUZ, 20: 188-194.

Suarez, C.C. 1971. Estudio de mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri* (Cif & Par) en frutos de cacao (*Theobroma cacao*). Tesis Ingeniería Agrónoma, Guayaquil, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad de Guayaquil Ecuador, 59p.

Villavicencio, M., Jiménez, M., 2010. Caracterización morfológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la costa Ecuatoriana. Guayaquil, Ecuador. CICYT –ESPOL, 10p.