

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE
EXTRACTOS DEL GÉNERO *Piper* CONTRA *Moniliophthora
perniciosa*, AGENTE CAUSAL DE ESCOBA DE BRUJA EN CACAO**



NATALY ALEXANDRA REYES SANABRIA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar por el título de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.**

2019

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DEL GÉNERO
Piper CONTRA *Moniliophthora perniciosa*, AGENTE CAUSAL DE ESCOBA DE BRUJA EN
CACAO**

NATALY ALEXANDRA REYES SANABRIA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar por el título de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**Dra. Concepción Puerta B, PhD.
Decana Facultad de Ciencias**

**Dra. Marcela Franco Correa, PhD.
Directora Carrera de Microbiología
Industrial**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.**

2019

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DEL GÉNERO
Piper CONTRA *Moniliophthora perniciosa*, AGENTE CAUSAL DE ESCOBA DE BRUJA EN
CACAO**

NATALY ALEXANDRA REYES SANABRIA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar por el título de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

Juliet Angélica Prieto Rodríguez, PhD.
Directora

María Ximena Rodríguez Bocanegra, PhD.
Codirectora

Ludy Cristina Pabon Baquero
Jurado

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.**

2019

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer inmensamente a mis padres y familiares por brindarme su apoyo incondicional y compañía constante llenándome de amor y fortaleza durante todo este proceso.

Agradezco también a las profesoras Juliet Prieto y María Ximena Rodríguez por aceptarme, confiar en mis capacidades para realizar este trabajo bajo su dirección y sobre todo por darme la oportunidad de aprender compartiendo sus conocimientos.

A los integrantes de los laboratorios de Fitoquímica y Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana por ofrecerme amablemente toda su colaboración en el desarrollo práctico de este proyecto.

Y finalmente agradezco a mis compañeros y amigos por ser parte de esta experiencia que significó la culminación de mi carrera universitaria.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN Y PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	8
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. MARCO TEÓRICO	10
4.1. Importancia del cacao en Colombia y en el mundo	10
4.2. Enfermedades fúngicas que afectan al cacao	11
4.3. <i>Moniliophthora perniciosa</i>	12
4.4. Métodos de control de <i>M. perniciosa</i>	13
4.5. Potencialidad del género <i>Piper</i> como fuente de sustancias antifúngicas	15
5. OBJETIVOS	17
5.1. Objetivo general	17
5.2. Objetivos específicos	17
6. METODOLOGÍA	18
6.1 Obtención de aislamientos fúngicos	18
6.1.1. Colecta de material infectado	18
6.1.2. Aislamiento de hongos y caracterización	18
6.1.3. Extracción de ADN – Identificación	19
6.2. Actividad antifúngica	20
6.2.1. Colecta de material vegetal	20
6.2.2. Preparación de extractos	20
6.2.3. Determinación de inhibición de crecimiento micelar	20
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1. Aislamiento de morfotipos fúngicos	22
7.2. Identificación molecular	27
7.3. Evaluación de condiciones de crecimiento	28
7.4. Recuento de conidios.....	31
7.5. Actividad antifúngica	33
8. CONCLUSIONES	37
9. RECOMENDACIONES.....	38
10. BIBLIOGRAFÍA	39

1. RESUMEN

Colombia ocupa el puesto 10 como uno de los mayores productores de cacao a nivel mundial, que junto con otros cultivos tropicales es de gran importancia en el sector agrícola y económico por sus numerosas características organolépticas y medicinales; sin embargo, estos cultivos se han afectado en razón a las malas prácticas agrícolas, lo cual ha contribuido a la aparición y expansión de enfermedades producidas por hongos, dentro de las cuales la Escoba de Bruja, generada por *Moniliophthora perniciosa*, ha sido una de las más incidentes en el país. El objetivo de este trabajo fue ofrecer una alternativa a esta problemática, contribuyendo en la búsqueda de agentes fitosanitarios para el control de *M. perniciosa* a partir de extractos obtenidos de especies del género *Piper*, considerado un género potencial con actividad antifúngica. Para ello, se realizó aislamiento y purificación en varios medios de cultivo (PDA, PDA ½, extracto de malta, avena, V8 y Zanahoria) de morfotipos fúngicos asociados a la enfermedad a partir de muestras vegetales con síntomas colectadas en el municipio de Otanche, Boyacá. También se buscó determinar la temperatura y medio cultivo que estimularan el crecimiento y conidiogénesis del posible aislamiento de *M. perniciosa* y un aislamiento de *M. roreri* evaluando el desarrollo de las colonias durante 34 días. A pesar de no lograr la producción de conidios se optó por realizar el ensayo de inhibición de crecimiento micelial por el método de dilución en agar en cajas de 12 pozos con *M. roreri*, esto se hizo evaluando 11 especies de *Piper* dentro de las cuales se destacaron *P. asperiusculum*, *P. grande*, *P. statarium*, *P. artanthe* y *P. nigrum* por inhibir el crecimiento del patógeno en porcentajes superiores al 50%, con lo cual se demostró el gran potencial y las propiedades biológicas de estas especies como sustancias antifúngicas.

2. INTRODUCCIÓN Y PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La agricultura es considerada como una de las actividades económicas, sociales y ambientales más esenciales a nivel mundial y sobre todo en Colombia, debido a su ubicación geográfica estratégica al interior del trópico, que favorece la obtención de productos como el café, arroz, caña de azúcar, maíz y cacao (*Theobroma cacao*), siendo este último uno de los más importantes en la actualidad ya que tiene potencial proyección económica debido a su alta demanda y su alta calidad. En Colombia, el Plan Nacional de Desarrollo 2014-2018, destacó la importancia la actividad agrícola, dando particular relevancia al cacao pues es uno de los cultivos para los que la producción aumentó en un 32,6% [1]. Sin embargo, a pesar de esto, gran parte de los cultivos de cacao han sufrido pérdidas considerables debido a operaciones de cosecha y poscosecha con mínimo control de calidad, lo cual ha contribuido a la expansión de enfermedades producidas por hongos generando restricciones en la producción comercial.

La “escoba de bruja” producida por el hongo *Monilophthora perniciosa* es una de las enfermedades endémicas que se encuentra ampliamente distribuida en los países cacaoteros suramericanos de Ecuador, Venezuela, Perú, Surinam, Trinidad y Tobago y Colombia, esto debido a su origen en el valle alto del Amazonas [2]. Este patógeno causa alteraciones en el balance hormonal de la planta como hipertrofia e hiperplasia en los distintos órganos y posteriormente necrosis, ocasionando pudrición en las semillas cuando la infección ocurre en el fruto [3].

Para el control de la “escoba de bruja” se emplean métodos físicos, biológicos y químicos, siendo estos últimos los más utilizados. Sin embargo, a pesar de la efectividad del control químico, ha demostrado ser la estrategia de control más perjudicial para el medio ambiente y la salud humana por ser poco selectiva y acumularse en los ecosistemas [4], además promueve la resistencia de microorganismos fitopatógenos más agresivos, como ha ocurrido en el caso de *M. perniciosa*. Adicionalmente, uno de los mayores obstáculos para el estudio e investigación de alternativas para el manejo de este hongo se debe a la escasa información en la literatura respecto a su aislamiento y conservación en el laboratorio a partir de plantas enfermas, lo cual ha dificultado su recuperación *in vitro* y por lo tanto la búsqueda de nuevos tratamientos más eficaces y específicos contra el microorganismo.

3. JUSTIFICACIÓN

Se pone en manifiesto la necesidad de encontrar nuevas alternativas eficaces y amigables con el medio ambiente para el control de *M. pernicioso*, por lo cual en la búsqueda de sustancias con aplicación a nivel agrícola para el control de hongos fitopatógenos, las plantas pueden ser una fuente potencial para emprender investigaciones, dado que suelen producir una gran diversidad de metabolitos secundarios para su interacción con el ecosistema, y que solo alrededor de un 20% de las especies reportadas en el planeta han sido sometidas a investigaciones. El género *Piper*, perteneciente a la familia Piperaceae, es reconocido a nivel mundial por sus aplicaciones a nivel terapéutico, alimenticio y agrícola. A nivel agrícola se destacan sus aplicaciones como antifúngico [5, 6], sin embargo, son pocas las investigaciones desarrolladas con especies de este género enfocadas en la búsqueda de sustancias que permitan controlar agentes fitopatógenos asociados al cultivo del cacao. Colombia al ser uno de los países con mayor biodiversidad es un lugar atractivo para emprender estudios enfocados en el desarrollo de nuevas sustancias funcionales que permitan valorar la biodiversidad para usarla a favor de la sociedad y del planeta de forma sostenible.

Por lo tanto, esta propuesta pretende contribuir al conocimiento del comportamiento *in vitro* de *M. pernicioso* mediante el análisis de diversas condiciones para el aislamiento y cultivo del microorganismo, así como aportar en la búsqueda de soluciones al efecto perjudicial del uso indiscriminado de productos químicos para el tratamiento y control de *M. pernicioso* sobre el cacao a través del aprovechamiento de extractos de especies del género *Piper*, pues éstas ofrecen una alternativa interesante y prometedora en la búsqueda de agentes fitosanitarios a raíz del hallazgo de varios reportes que destacan y sugieren su potencial para el control de hongos fitopatógenos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Importancia del cacao en el mundo y en Colombia

La producción a nivel mundial durante el año cacaotero 2016/2017, creció en 740.000 toneladas con respecto al año inmediatamente anterior, lo que se traduce en un incremento del 19%. La producción se halla representada principalmente por África y América, en concreto, Costa de Marfil es el primer productor con una participación del 42,7% del mercado mundial, seguido por Ghana con una participación del 20,5%, Ecuador ocupa el quinto lugar con una participación del 5% y Colombia el décimo lugar con una participación del 1,2% [7].

El sistema de producción de cacao en Colombia tradicionalmente ha sido una explotación de economía campesina, generando alrededor de 160 mil empleos, vinculando cerca de 38 mil familias. Su importancia económica también radica en el gran consumo de la materia prima para la elaboración principalmente del chocolate de mesa, componente básico de la canasta familiar, de productos manufacturados en confitería y algunos excedentes exportables originando divisas para el país [8]. En nuestro país el departamento de Santander es el principal productor con una participación del 40% del total de la producción nacional, seguido por Arauca con el 11%, Antioquia con 9% Huila 7%, Tolima 6% y Cundinamarca 4% [9, 10, 11].

Para establecer un cultivo de cacao se deben tener en cuenta varios aspectos tales como condiciones climáticas, la topografía del terreno, las propiedades del suelo y que el material a sembrar sea el adecuado. El cacao es un cultivo que se puede establecer en superficies planas y onduladas entre los 0 y 1.000 msnm, con una temperatura entre 23 – 30 °C, una precipitación entre 1.500 y 2.500 mm, una humedad relativa entre 75 – 85 %. El suelo debe tener un pH entre 4,5 – 6,8, con terrenos franco arcillosos – arenoso granular y un nivel freático mayor de 1 metro [12].

Sin embargo, a pesar del conocimiento de las condiciones óptimas de los cultivos la realidad es que a menudo el cultivo del cacao es descrito como un “cultivo huérfano”, debido a que su explotación no está respaldada con adecuados soportes técnico–científicos. Aunque la producción de cacao en el país se ha incrementado en los últimos años, reportándose para el 2017 un aumento del 6,6% respecto al 2016 [13], los rendimientos de cultivo están por debajo

del promedio mundial debido a que existen debilidades que promueven la aparición y expansión de enfermedades que lo afectan e impactan negativamente la producción mundial, causando pérdidas considerables que pueden llegar a ser del 30% o más del potencial productivo [14].

4.2 Enfermedades fúngicas que afectan al cacao

Las mayores pérdidas económicas que se presentan en el cultivo de cacao se deben a las enfermedades fúngicas que reducen en forma considerable la calidad, el valor comercial, la viabilidad del fruto y la vida de la planta. Algunas enfermedades del cacao corresponden a las producidas por especies fúngicas como la moniliasis causada por el hongo *Moniliophthora roreri* originario de Colombia, “escoba de bruja” producida por *M. pernicioso* (conocido anteriormente como *Crinipellis pernicioso*), el mal del machete o ceratocystis originado por el hongo *Ceratocystis fimbriata* y, por otro lado está el mal de mazorca negra causada por especies patógenas del Oomycete *Phytophthora* spp. Todas las anteriores son enfermedades presentes únicamente en Suramérica, a excepción de la última que se encuentra también en África. Se estima que la reducción de la producción anual de cacao en el mundo es de 450.000, 250.000, 30.000 y 20.000 toneladas a causa de *Phytophthora* spp, *M. pernicioso*, *M. roreri* y *C. fimbriata*, respectivamente [15].

De acuerdo a lo anterior, la escoba de bruja en especial, genera un impacto considerable teniendo en cuenta que ha sido considerada la segunda enfermedad más grave para el cacao a pesar de poseer un rango geográfico limitado en cuanto a su distribución, y es por esto que ha sido preocupante su diseminación, ya que la introducción del patógeno a países productores donde aún no se ha presentado podría desequilibrar la economía del cultivo. En especial para África sería una gran amenaza ya que aproximadamente el 70% de la producción mundial viene de esa región [16].

Actualmente la escoba de bruja está presente en 10 países productores de Latinoamérica, pero con el tiempo y la expansión de las plantaciones se ha diseminado rápidamente. Hasta ahora se encuentra confinada principalmente a las zonas productoras de cacao en Suramérica, Trinidad y Tobago, y Granada [17]. En Colombia se registró por primera vez en Tumaco en

1923 y hasta la fecha se ha propagado hacia Caquetá, Meta, Huila, Valle, Chocó, Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Santander [2].

Se ha descrito que esta enfermedad afecta los tejidos en crecimiento de la planta, la cual presenta diferentes síntomas dependiendo de la parte afectada y de su estado de desarrollo. Las escobas en ramas son las más importantes, porque constituyen el mayor potencial de fuente de inóculo o fuente de propagación de la enfermedad. En orden de importancia, los síntomas más frecuentes aparecen en los puntos de crecimiento de ramas, cojines florales y frutos. Las escobas de ramas presentan inicialmente un desarrollo vigoroso y excesivo, con acortamiento de entrenudos, y las hojas parecen normales excepto por el grosor del pecíolo. Cuando los cojines florales son atacados por esta enfermedad, no nacen mazorcas sino brotes vegetativos a manera de ramas, con apariencia de escoba [18]. Por otro lado, los frutos afectados por la enfermedad presentan diferentes síntomas; esto depende del estado de desarrollo cuando son atacados, pueden tomar forma de chirimoyas, fresas o zanahorias. Todo lo anterior ocasiona hipertrofia, hiperplasia y la pérdida de dominancia apical de los tejidos, con proliferación de los brotes auxiliares y la formación de tallos anormales; estas estructuras son similares a una escoba, de ahí su denominación [19].

4.3 Moniliophthora perniciosa

M. perniciosa, anteriormente llamado *Crinipellis perniciosa*, es el agente causal de la escoba de bruja y se presume que es el mayor patógeno que se desarrolla análogamente con *Theobroma cacao* [20]. Es un hongo perteneciente al filum Basidiomycota, del orden Agaricales. Tiene un ciclo de vida paralelo con los síntomas de la enfermedad en la planta. El ciclo inicia con las basidiosporas, consideradas como los únicos propágulos del hongo capaces de infectar los tejidos meristemáticos del cacao y son estructuras hialinas, ovales que provienen de un basidio modificado, con un estroma. A partir de ellas se forma el micelio biotrófico monocariótico, sin conexiones de gancho [21]. Este micelio infecta los cojines florales, los frutos en desarrollo y los brotes vegetativos. Luego de uno o dos meses de presentarse estas alteraciones, se da la fase necrótica donde el hongo adquiere unas características distintas como un micelio dicariótico saprofito/ necrótico, en el cual se observan las conexiones de gancho. A diferencia de la fase biotrófica, el micelio saprofito

crece vigorosamente, colonizando rápidamente el material vegetal infectado [20]. Durante esta fase, después de alternar periodos húmedos y secos, tiene lugar la formación de los basidiocarpos, de los cuales se desprenden las basidiosporas y el ciclo vuelve a iniciar.

A partir de observaciones y análisis realizados en algunos estudios [22], se cree que la baja concentración de nutrientes en el apoplasto puede ser la clave para la fase biotrófica de este patógeno. A pesar de ello, después de estos síntomas, la hifa biotrófica de *M. pernicioso* se encuentra en bajas densidades y no produce haustorio; sólo se limita a ocupar el espacio apoplástico y presenta un crecimiento lento. Se ha demostrado que el micelio biotrófico se puede mantener viable en condiciones *in vitro*, si se ponen a crecer las esporas en un medio de cultivo carente de nutrientes, pero con glicerol como única fuente de carbono.

Las condiciones ambientales requeridas para la liberación de las basidiosporas es la humedad relativa próxima a la saturación (es decir cercana al 100%), la oscuridad y las temperaturas entre 20° a 30° C [23]. La liberación nocturna garantiza la supervivencia de estos propágulos por más tiempo. En condiciones de campo, en Trinidad y en Ecuador, la mayor liberación de basidiosporas ocurre entre 10 p.m. y 4 a.m., con una humedad relativa mayor al 95% y temperaturas entre 20° a 24° C [24]. Una vez liberadas, las basidiosporas tienen un periodo de viabilidad corto, debido a su sensibilidad a la luz y al secamiento.

4.4 Métodos de control de *M. pernicioso*

Desde que empezó a realizarse investigaciones en cacao sobre el control de la enfermedad causada por *M. pernicioso*, hace más de 100 años, se han definido hasta ahora cuatro estrategias principales: sanidad y control cultural, el control químico, la resistencia genética y el control biológico.

Como control cultural, teniendo en cuenta la forma de infección del hongo y los factores ambientales que favorecen su desarrollo y multiplicación, generalmente se lleva a cabo remoción de todas las escobas y mazorcas infectadas quemándolas para evitar la germinación de más esporas [25]; además se puede regular la sombra y el drenaje a fin de disminuir la humedad dentro del cacaotal y permitir mayor entrada de luz y aire a las plantas. Sin embargo, estas prácticas hoy en día son tediosas y costosas [26].

El control químico de la escoba de bruja se basa en el empleo de fungicidas protectantes que funcionan en base a las particularidades parásito-hospedero. De esta manera el control puede estar dirigido a: la interferencia del desarrollo micelial de infecciones causadas sobre tejido vivo (escoba verde); a la interrupción del proceso de dicarriotización y de reproducción del parásito en tejido muerto (escobas secas), y a la protección de tejidos meristemáticos contra la infección (yemas) mediante el empleo de fungicidas sistémicos aplicados preferencialmente a la raíz; y otra medida es afectar directamente la esporulación [27]. Algunos de estos fungicidas contra *M. pernicioso* son: Flutolanil, Triadimenol, Hexaconazoleel, Tebucozanol, Mancozeb y Ziproconazol. No obstante, estas técnicas son las menos recomendables porque el empleo de fungicidas protectantes y sistémicos conllevan a altos costos y a los riesgos asociados con la contaminación del grano, la salud de los trabajadores y la conservación del medio ambiente [28].

En cuanto al control biológico, implica el uso de organismos vivos para reducir el inóculo del patógeno. Un ejemplo de este método es el empleo de plantas trampa y el uso de organismos antagonistas. Se ha prestado atención en identificación de algunos organismos que impidan el desarrollo de *M. pernicioso*. Por ejemplo en un estudio se identificó que un aislamiento de *Cladobotrium amazonense* producía metabolitos que presentaban una micotoxina que inhibían la germinación de las esporas del patógeno en gran medida durante la cosecha de cacao [29].

Por otro lado, en el control genético existe un número de accesiones tanto de cacaos silvestres como aquellos seleccionados por los agricultores según su resistencia a *M. pernicioso*. Hay nuevos híbridos con alta resistencia producidos en Trinidad [30]. Entre los materiales considerados altamente resistentes se encuentran los scavina SCA 6 y SCA 12. La resistencia de los clones SCA parece ser de mayor durabilidad, según observaciones realizadas en Trinidad durante cincuenta años. Sin embargo, también existe un fuerte efecto de la localidad o zona sobre los clones SCA y la progenie derivada de éstos. Se ha observado que los clones resistentes en Brasil y Trinidad son susceptibles en Ecuador [31], lo que sugiere que el mejoramiento de materiales de cacao se debe realizar teniendo en cuenta las variaciones geográficas entre los aislados del patógeno.

4.5 Potencialidad del género *Piper* como fuente de sustancias antifúngicas

Los estudios de bioprospección sobre la flora colombiana representan para el país una alternativa de crecimiento sostenible con beneficios económicos y sociales claramente medibles, debido a que es un país megadiverso que alberga aproximadamente una tercera parte de las especies de plantas existentes. En el país crecen diferentes especies vegetales entre las que podemos mencionar por su potencial uso a nivel agrícola, a las pertenecientes al género *Piper* (Piperaceae), ya que para muchas de sus especies y sustancias derivadas se ha reportado aplicabilidad en el control de hongos fitopatógenos [4, 5, 32].

El género *Piper*, comprende alrededor de 2500 especies, las cuales se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 3600 msnm, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del planeta. El hábito de crecimiento de las especies de este género comprende generalmente, arbustos, subarbustos, hierbas y/o enredaderas, conocidos popularmente como “cordoncillos”, debido a la presencia de diminutas flores agrupadas en una inflorescencia en forma de espiga o en racimos. Estas especies están bien representadas en el territorio colombiano, y se encuentran principalmente en relictos de bosques ricos en fuentes hídricas [5, 33, 34].

Entre las especies más representativas a nivel mundial del género *Piper* están *P. nigrum*, *P. methysticum* y *P. aduncum*, debido a las múltiples aplicaciones que tienen a nivel terapéutico, agrícola y culinario [35, 36, 37]. En Colombia algunas especies se utilizan de forma tradicional, por ejemplo, en el departamento del Cauca suelen usarse las hojas secas y trituradas de la especie *P. tuberculatum* para eliminar los piojos, en el municipio de Urabá (Choco) los indígenas Katíos consumen tallos de *P. marginatum* y *P. erytroxyloides* se usa como dentífrico eficaz contra enfermedades dentales [38].

Estudios químicos realizados sobre especies del género *Piper* han permitido el aislamiento e identificación de un gran número de compuestos estructuralmente diversos. Entre los constituyentes químicos más comunes en especies de *Piper* están amidas, flavonoides, terpenos, esteroides, lignanos, neolignanos, alquilfenoles, fenilpropanoides, kawalactonas y derivados de ácido benzoico y cinámico [5, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45].

La mayoría de las investigaciones en búsqueda de antifúngicos provenientes del género *Piper* se han enfocado en el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia económica, entre los que se destacan hongos de los géneros *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* y *Fusarium* [26, 46, 47, 48, 49]. Principalmente se han empleado los métodos de microdilución, difusión en disco y agar, y bioautografía para adelantar los estudios de actividad antifúngica. En los estudios realizados sobre el género se han encontrado extractos, fracciones, aceites esenciales y compuestos puros con potencial para ser utilizados en el control de hongos fitopatógenos. De los compuestos aislados de especies del género *Piper* con actividad antifúngica se destacan amidas, flavonoides, alquifenoles, fenilpropanoides, derivados prenilados de ácido benzoico y/o cinámico, kawalactonas y butenólidos [6].

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Contribuir en la búsqueda de agentes fitosanitarios para el control de *Moniliophthora perniciosa* a partir de extractos obtenidos de especies del género *Piper*.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1** Caracterizar e identificar algunos aislamientos fúngicos asociados a la escoba de bruja en el cacao.
- 5.2.2** Determinar la actividad antifúngica de por lo menos 10 extractos etanólicos obtenidos de especies del género *Piper* sobre *Moniliophthora* spp.

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención de aislamientos fúngicos

6.1.1 Colecta de material infectado

La recolección se realizó en un cultivo de cacao ubicado en el corregimiento de Betania (Latitud: 5.82417; Longitud: -74.2214), municipio de Otanche (Boyacá) en base a la identificación de síntomas característicos asociados a la escoba de bruja a partir de lesiones en las fases inicial (sobrebrotamiento de ramas y de tejidos en desarrollo y presencia de escobas), media (iniciación de necrosis desde el interior en tallos y ramas) y avanzada (necrosamiento de hojas y gran parte de los tejidos secos) de la enfermedad. Las muestras colectadas se guardaron en bolsas de papel para ser llevadas al laboratorio.

6.1.2 Aislamiento de hongos y caracterización.

El material colectado se sometió a un proceso de lavado con agua corriente durante 15 minutos, y posteriormente se sometió a un proceso de desinfección superficial empleando agua estéril, hipoclorito de sodio 1,5% y etanol 70%. Para el aislamiento de los hongos asociados a la enfermedad se realizaron cortes en medio de las lesiones y se sembraron los trozos de tejido desinfectado en medios de cultivo agar papa dextrosa (PDA), agar-malta (AM), agar-avena (AA) y agar-jugo de tomate (V-8), contenidos en cajas de Petri de 9 cm, siguiendo la metodología descrita por Carrera et al, 2014 y Suárez, 2015 [50]. Todos los medios fueron suplementados con cloranfenicol. Las cajas se llevaron a incubación a 25°C en condiciones de aerobiosis. Para la purificación de los morfotipos se realizó una serie de repiques cada 8 días en los medios de cultivo que evidenciaron mayor promoción de crecimiento de las colonias. Luego, se realizó la respectiva caracterización macroscópica y microscópica.

NOTA: Al no obtener cultivos con presencia de propágulos se realizó una comparación del presunto morfotipo de *M. pernicioso* junto con aislamientos de *Moniliophthora roreri* los cuales provenían del mismo cultivo de este estudio y además ya estaban previamente purificados en el laboratorio y con evidencia de producción de propágulos.

Después de obtener un morfotipo con características y estructuras reproductivas típicas del género *Moniliophthora* (*M. perniciosa* y *M. roreri*) se determinó en cuál de los seis medios de cultivo se promovía más el crecimiento, esto se realizó en función del área de crecimiento radial de las colonias a 25°C y 20°C durante un periodo de 34 días, tomando medidas de las áreas cada 48 horas para los dos hongos.

Finalmente, para los cultivos de cada uno de los medios de *M. roreri*, se realizó el recuento de conidios en cámara de Neubauer realizando diluciones de 10^{-1} - 10^{-2} con solución salina al 0,85% (p/v) y Tween 80 al 0,1% (v/v) a partir de las cajas con biomasa desarrollada.

6.1.3 Extracción de ADN - Identificación

Para la extracción de ADN genómico de ambos hongos, se realizó producción de biomasa en cajas Petri de 5cm de diámetro con caldo GYEP (glucosa 2%, extracto de levadura 0,3%, triptona 1%) y caldo extracto de malta, los cuales fueron inoculados con 100µL de una suspensión de los microorganismos obtenida a partir de crecimiento en PDA, e incubados a 25°C. El micelio producido luego de 15 días de incubación fue filtrado al vacío y se llevó a secado en horno de convección a 40°C durante una noche (Thermo Scientific Precision). Una vez seco, el micelio fue transferido a tubos Falcon de 15mL, los cuales contenían 5 perlas de vidrio; los tubos fueron sumergidos durante 30 segundos en nitrógeno líquido y agitados en vortex hasta pulverizar el micelio, con el que se comenzó la extracción [51].

La lisis celular se realizó mezclando el micelio pulverizado con 800µL de buffer de lisis (Tris-HCl 0,2M, NaCl 0,5M, EDTA 10mM, SDS 1%) y posteriormente se agregó un volumen de fenol: cloroformo: isoamil alcohol (25:24:1). Una vez homogénea, la mezcla se centrifugó a 10000rpm durante 15 minutos (Thermo Scientific Expresso Centrifuge) y el sobrenadante (fase acuosa) se lavó con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y con la fase acuosa se realizó la precipitación de los ácidos nucleicos adicionando 0,6 volúmenes de isopropanol frío (-20°C) y posteriormente se incubó durante 30 minutos a -20 C, para luego centrifugar a 10000rpm durante 15 minutos. El precipitado se lavó con 300µL de etanol al 70% frío (-20°C), se

centrifugó a 10000rpm durante 10 minutos y el precipitado obtenido fue resuspendido en 50µL de agua desionizada y almacenado a -20°C [51].

Posteriormente se realizó el tratamiento con ARNasa para eliminar el ARN contaminante y se enviaron las muestras para amplificar y secuenciar al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia – sede Bogotá.

6.2 Actividad antifúngica

6.2.1 Colecta de material vegetal

Se realizó la colecta de inflorescencias y partes aéreas de 11 especies del género *Piper* en los departamentos de Santander y Boyacá. Un espécimen de cada muestra colectada fue enviado al Herbario de la Universidad de Antioquia para su determinación y clasificación.

6.2.2 Preparación de Extractos

Las inflorescencias y partes aéreas se secaron a la sombra y posteriormente se trituraron con ayuda de un molino. Al material vegetal seco y molido se le realizó una extracción por maceración con etanol al 96% a temperatura ambiente. El solvente fue removido mediante destilación a presión reducida (rotavapor).

6.2.3 Determinación de inhibición de crecimiento micelial

La actividad antifúngica de los extractos se determinó frente a *M. roreri* usando el ensayo de inhibición de crecimiento micelial siguiendo la metodología propuesta por Cosoveanu y colaboradores con algunas modificaciones [52]. Los extractos disueltos en etanol se incorporaron al medio PDA en una concentración de 1000 ppm, junto con MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) en una concentración de 25 µg/mL, antes de verterse en las cajas de 12 pozos. La concentración final de etanol en el medio de cultivo fue del 2%. Se prepararon 2 mL de solución de cada muestra a evaluar, se distribuyeron 500

μL por pozo y se dejó solidificar el medio de cultivo, obteniendo de esta manera 4 repeticiones por muestra. Una vez solidificado el medio, se colocaron, en el centro del pozo, discos de micelio de 2 mm de diámetro (proveniente de un cultivo sembrado con 10 días de anterioridad). En paralelo, se prepararon pozos de blanco, en los que se sembró el medio de cultivo con una concentración de 2% de etanol y MTT a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y todo se incubó a 25°C. Pasados 8 días de incubación, las placas se escanearon y el crecimiento radial del micelio se midió con el programa de procesamiento de imágenes IMAGE J. Se utilizó como control positivo el producto comercial Mancozeb a una concentración de 1000 ppm. El parámetro utilizado para determinar la actividad de los extractos fue el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial, que se calcula al comparar el diámetro de las colonias tratadas con las del blanco con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(C - T) / C] \times 100$$

Donde C = Crecimiento radial del hongo en el control (Sin tratamiento), T = Crecimiento radial del hongo con el tratamiento.

A los extractos que causaron un porcentaje de inhibición mayor al 50% cuando fueron evaluados a 1000 ppm, se les determinó la actividad antifúngica a concentraciones menores (500, 250 y 125 ppm). La Concentración Inhibitoria 50 (CI50) se calculó mediante una curva de regresión con ayuda del software Stargraphics.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento de morfotipos fúngicos y caracterización macroscópica y microscópica

A partir del material colectado asociado a la escoba de bruja se obtuvieron muestras de tres estados de desarrollo de la enfermedad (**figura 1**), de las cuales se escogieron porciones de tejido relacionados al sistema vascular de la planta debido a la característica propia de *M. pernicioso* de propagarse a nivel sistémico.



Figura 1. Material vegetal infectado con escoba de bruja en tres estados de desarrollo.

A: Estado inicial, B: Estado medio, C: Estado avanzado

Posterior a la realización de las siembras en cada uno de los medios de cultivo, se obtuvo gran cantidad de hongos asociados a la enfermedad, de los cuales se fueron recuperando y purificando, por medio de repiques sucesivos y análisis macroscópicos y microscópicos, aquellos que evidenciaron estructuras reproductivas características para llegar a una identificación de género. Los hongos identificados fueron: *Colletotrichum*, *Acremonium* y *Pestalotia* (**figura 2**).

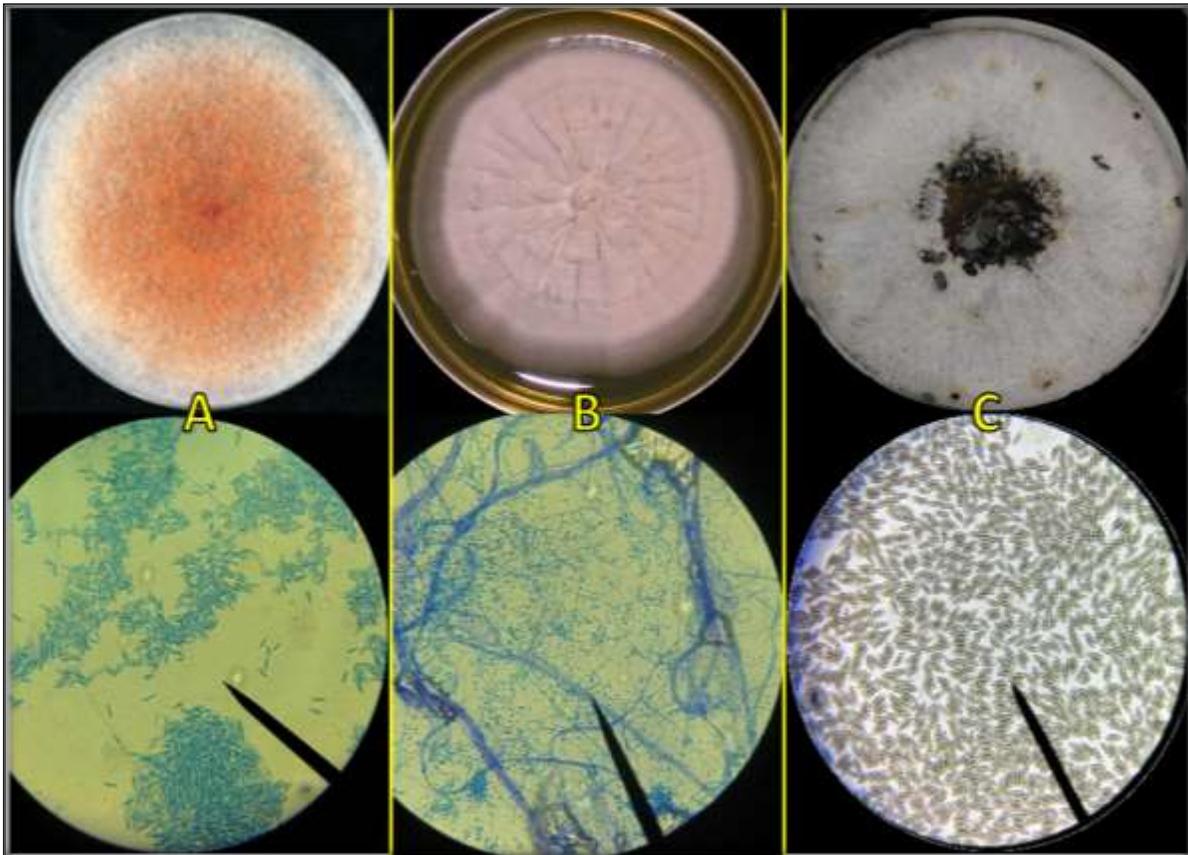


Figura 2. Morfotipos aislados asociados a escoba de bruja, macroscopía y microscopía (40X). A: *Colletotrichum*, B: *Acremonium*, C: *Pestalotia*.

Se ha reportado desde hace varios años que *Colletotrichum gloesporioides* es el agente causal de la antracnosis foliar del cacao, esta es una enfermedad caracterizada por causar necrosis en las hojas la cual se inicia en forma de lesiones de color café oscuro localizadas sobre las nervaduras [53]. El hongo puede afectar también ramas, tallos, flores y frutos de cacao, su presencia tiene consecuencias graves sobre los rendimientos, al disminuir la capacidad fotosintética de las plantas y destruir las futuras cosechas, al necrosar gran cantidad de frutos pequeños [54]. Sin embargo, en Colombia, la antracnosis en el cacao no es una enfermedad limitante, ya que hasta el momento *Colletotrichum* es considerado únicamente un patógeno oportunista y ha tenido baja incidencia en los cultivos ya que su desarrollo se asocia a condiciones de sombra y oscuridad, lo cual ha sido un factor sencillo de controlar.

Debido a lo anterior y a que este hongo se obtuvo a partir de síntomas de escoba de bruja, es probable que no se trate de la especie *Colletotrichum gloesporioides*, ya que existen otras especies asociadas también a enfermedades en otros cultivos tropicales como lo son el mango y la guayaba. Sin embargo, es importante resaltar la identificación de este género, ya que de acuerdo a la literatura, presenta colonias usualmente blancas en sus inicios y de manera posterior se cubre con masas conidiales de coloración roja a naranja y los cultivos puros de algunos hospederos son altamente cromogénicos y excretan pigmentos rojos y rosados dentro de los medios de cultivo. Todo lo anterior se relaciona a lo observado en el aislamiento, donde a partir de los medios PDA, PDA ½ y Agar Extracto de Malta, se obtuvieron colonias algodonosas blancas con centro de color rojo-salmón presentando en estas zonas pigmentadas la presencia de conidios característicos de este género. Los conidios hialinos, ovoides u oblongos se forman en acérvulos subepidérmicos cuando el patógeno coloniza las plantas, pero en medio de cultivo los conidios se forman en conidióforos simples y elongados. Los conidios se agrupan en masas de color salmón [55].

Por otro lado, *Pestalotia* presenta acérvulos negros, discoides o pulvinados, subepidérmicos; conidióforos cortos y simples; conidios oscuros, de varias células (la apical y basal puntiagudas e hialinas), elipsoides a fusiformes, con dos o más apéndices apicales [56]. En el morfotipo aislado, se observaron gran cantidad de propágulos típicos de este género, los cuales era fragmentados y dematiáceos con un apéndice en un extremo y dos apéndices en el otro, la hifas se observaron hialinas, delgadas y septadas, algunas melanizadas y formando clamidiosporas. En la literatura se mencionan varias especies de este género como causantes de manchas foliares o lesiones cancrosas en frutos de plantas tropicales. Las más comunes son: *P. palmarum*, *P. macrotricha*, *P. rhododendri*, *P. theae*, *P. psidii*, *P. mangiferae*, *P. versicolor*. Entre las plantas más afectadas se han reportado la palma de coco, la guayaba y el cacao, aunque este último con menos incidencia [57].

Respecto a *Acremonium*, se observó micelio hialino y septado del cual surgen conidióforos y fiálides delgadas, hialinas, conidios hialinos, ovalados, puntiagudos en uno o en ambos extremos y unicelulares. *Acremonium* sp. se ha reportado como un hongo endófito del cacao, es decir, es un organismo que vive asintóticamente dentro de tejidos aéreos vivos de la

planta, e incluso en las raíces [58], por lo que es común identificarlo en estos cultivos al ser además saprófito del suelo y materiales vegetales.

Por otra parte, se logró identificar en medio PDA otro morfotipo asociado a la enfermedad, el cual presentó en su microscopía la presencia de fíbulas (**figura 3**), una estructura característica de los hongos *Basidiomycota*, filo al que pertenece *M. pernicioso*. Debido a esto, quizá este morfotipo corresponde al agente causal de la escoba de bruja en el cacao, aislado de las muestras de la planta que se encontraban en el estadio medio de la enfermedad (tallos con necrosis vascular).

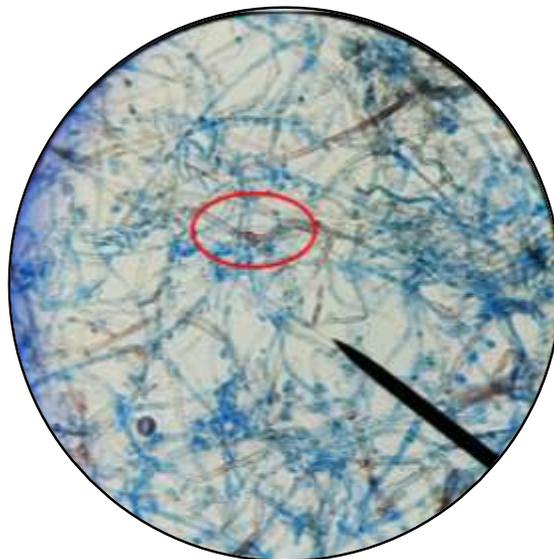


Figura 3. Microscopía de presunto *M. pernicioso* (100X). La estructura señalada en una fíbula.

Con la caracterización macroscópica (**figura 4**) se determinó que presenta en el anverso un micelio blanco, algodonoso que al cabo de 20 días de incubación a 25°C presenta pigmentos marrones o púrpuras, y finalmente, el reverso de la colonia es color crema, con centro marrón y rojizo. En la literatura no hay reportes claros acerca de las características macroscópicas ni microscópicas de *M. pernicioso* debido a que es un hongo muy difícil de aislar *in vitro*. En este caso, para este morfotipo, no se lograron identificar células conidiogénicas por lo que es aún más difícil determinar si se trata del patógeno en cuestión.

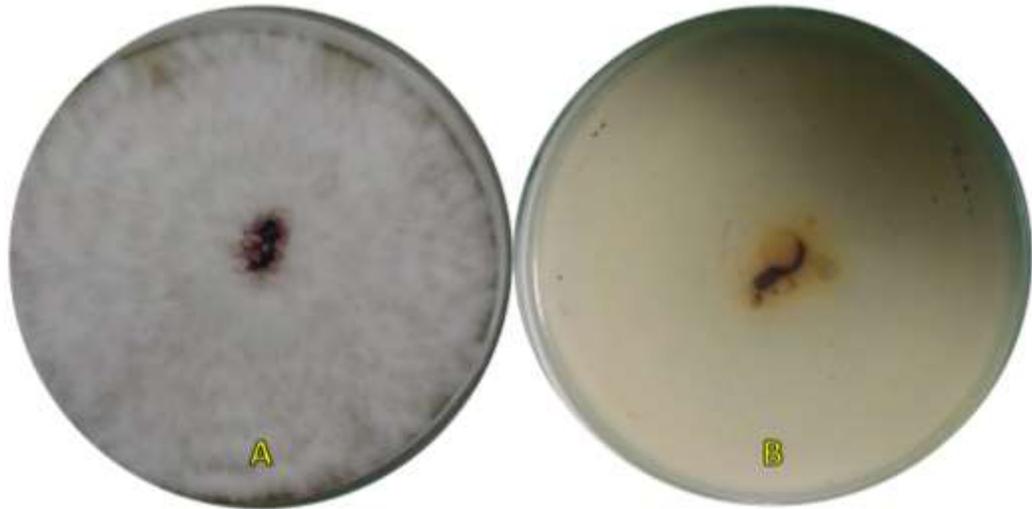


Figura 4. Microscopía de presunto *M. perniciosus* en PDA. A: anverso, B: reverso.

A pesar de no haber observado conidios en este aislamiento, la presencia de fíbulas demostró que el aislamiento pertenece al filo *Basidiomycota*. Esta estructura constituye un mecanismo que asegura que los núcleos hermanos que surgen de una división conjugada de un micelio diacariótico se separen en dos células hijas [59]. Cuando la célula binucleada está a punto de dividirse, aparece una rama corta entre los núcleos, la fíbula, que adquiere aspecto de gancho oblicuo (**figura 5**) formando un puente a través del cual el núcleo pasa al otro extremo de la célula.

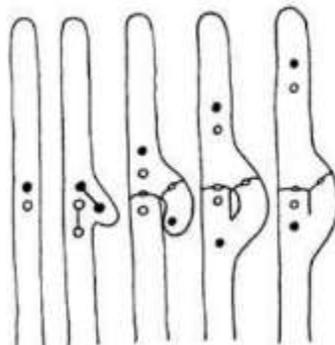


Figura 5. Formación y desarrollo de una fíbula. [59]

A pesar de lo anterior, en este estudio se partió de lo reportado acerca de *M. roreri* para hacer una comparación aproximada de las características macroscópicas y microscópicas. De este modo, se evidenció la presencia de hifas hialinas, septadas, delgadas, algunas un poco más gruesas y fíbulas. Para *M. roreri* se reportan las mismas estructuras vegetativas mencionadas anteriormente, aunque no es común observar la presencia de fíbulas, pero si son característicos los conidios, lo cuales se forman en las mazorcas infectadas como un signo superficial de la enfermedad, estas células son hialinas, globosas y ovoides y almendradas con paredes gruesas y formando cadenas (**figura 6**).

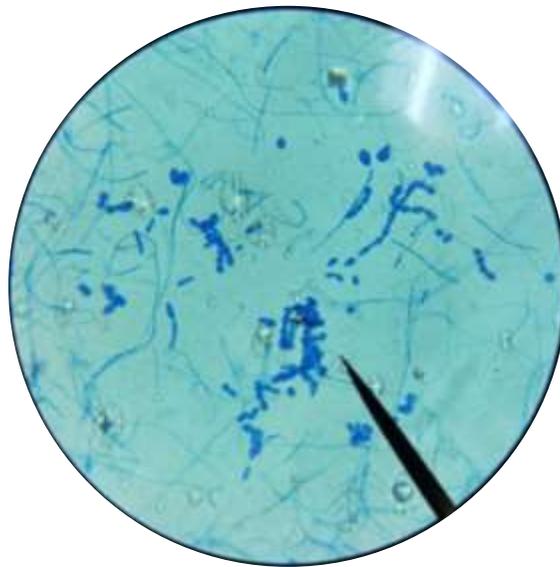


Figura 6. Microscopía de *M. roreri* a 40X.

7.2 Identificación molecular

Teniendo en cuenta que el aislamiento presunto de ser *M. pernicioso* no produjo conidios que permitieran su identificación morfológica, se procedió a realizar la extracción de ADN. También se extrajo ADN de los aislamientos identificados como *M. roreri*. El resultado de la electroforesis del ADN se observa en la **figura 7**.

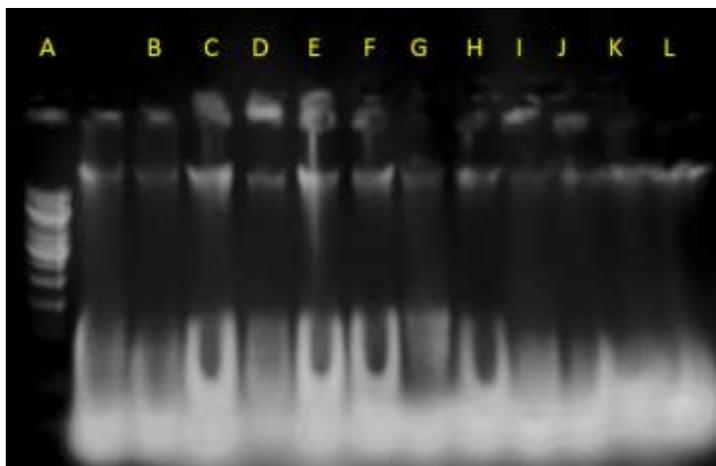


Figura 7. Electroforesis de extracción de DNA total de morfotipos asociados a enfermedades en el cacao. A: Marcador de peso molecular. B-G: *M. roreri*, H-L: presunto *M. pernicioso*.

Se evidencia alta contaminación de ARN en todas las muestras por lo que se procedió a realizar tratamiento con ARNasa y estas muestras se dejaron almacenadas a -20°C para dejar pendiente la correspondiente secuenciación y amplificación.

Adicionalmente, se observa una relación entre los carriles con ADN de *M. roreri* y del presunto *M. pernicioso* ya que en ambos casos las bandas están alineadas y poseen pesos similares lo cual se debe a que comparten características moleculares por pertenecer al mismo género.

7.3 Evaluación de condiciones de crecimiento

Para el presunto *M. pernicioso* se identificó que bajo una incubación de 25°C el medio en el que se observó el mejor desarrollo de las colonias fue PDA, el microorganismo evidenció crecimiento a partir de los 15 días de incubación y se alcanzó el diámetro total de la caja de Petri al cabo de los 30 días, mientras que en el resto de los medios las colonias se desarrollaron sólo después de los 20-26 días (**figura 8**). Además, fue en PDA en donde se identificó la presencia de fíbulas al cabo de los 34 días de cultivo. En la literatura se reporta el crecimiento de *M. pernicioso*, en donde se han observado además estructuras reproductivas, sin embargo, todos los estudios que se han hecho acerca del aislamiento de esta especie han sido a partir de basidiocarpos obtenidos directamente de las plantas de cacao

en campo y realizando descarga de las basidiosporas sobre el medio de cultivo, así se ha observado hifas primarias derivadas de las basidiosporas, septadas y con células uninucleadas, donde la aparición posterior de un micelio denso, septado binucleado con fíbulas, sugiere que el hongo es homotálico [60]. En ese mismo estudio se menciona además que las artrosporas que se formaron a partir de aislamientos en cultivo en medio de agar malta y PDA obtenidos de escobas de Ecuador y Perú son binucleadas, pero no son infectivas. En Colombia también hay reportes de aislamientos de *M. pernicioso* hecho a partir de basidiocarpos mantenidos en cámara húmeda [61]

Por lo tanto, este estudio es quizá uno de los pocos en los que se ha buscado obtener y aislar a *M. pernicioso* desde los síntomas de la enfermedad y no desde signos de la presencia de basidiocarpos.

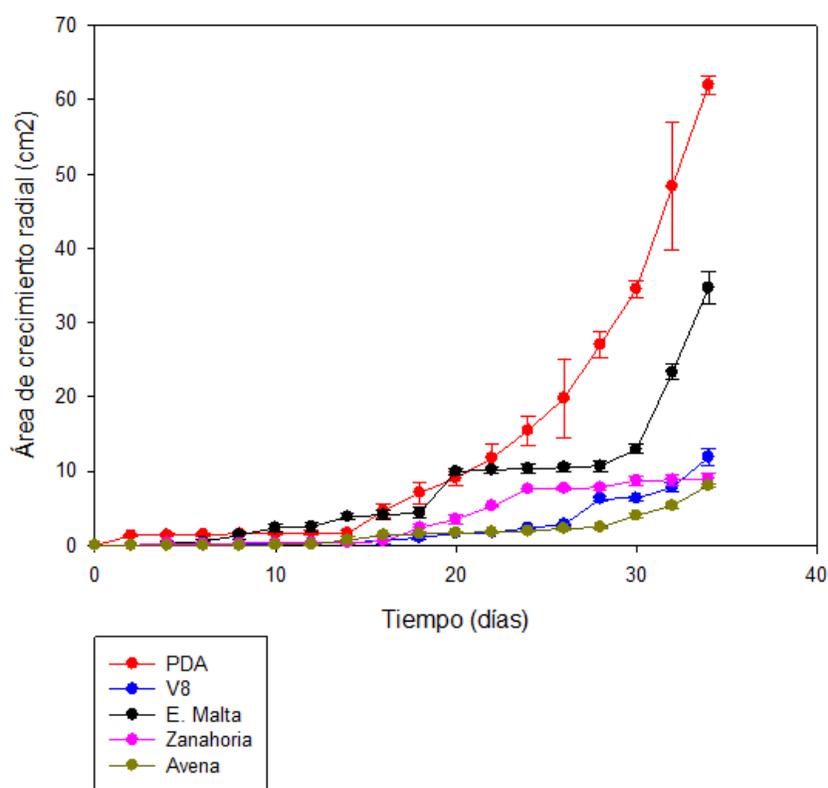


Figura 8. Curvas de crecimiento de presunto *Moniliophthora pernicioso* a 25°C en medios PDA, Extracto de malta, V8, Zanahoria y Avena

En el caso de *M. royeri* se determinó 25°C como la mejor temperatura para el desarrollo de las colonias, bajo 20°C las colonias presentaron un menor crecimiento radial y no produjeron propágulos, sin embargo para este caso el mejor medio en términos de tamaño de área de crecimiento radial en menor tiempo fue PDA, seguido por Extracto de Malta (**figura 9**).

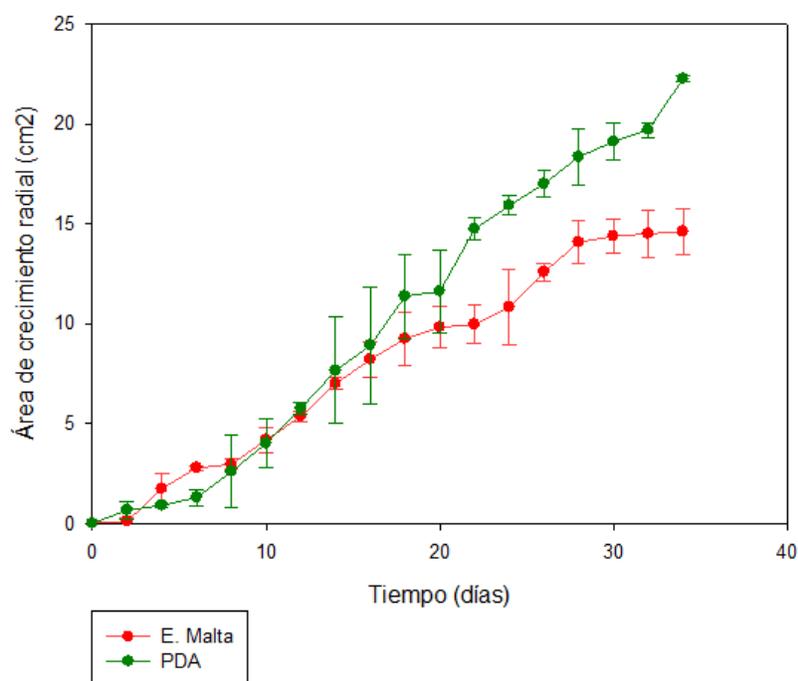


Figura 9. Curva de crecimiento de *Moniliophthora royeri* a 20°C en PDA y Extracto de malta.

Lo anterior se compara con lo observado a 25°C (**figura 10**) donde el mejor medio para el crecimiento de las colonias fue Extracto de malta y con alta producción de propágulos. Esto coincide con otros reportes en donde también se han comparado los mismo medios de cultivo y se obtuvieron diferencias significativas, ya que 21 días después de la inoculación los aislados de *M. royeri* a partir de *Theobroma Cacao L.* en Agar Extracto de Malta presentaron un rango de crecimiento radial entre 4.2 y 5.0 cm y en PDA entre 3.7 y 4.5 cm [62], lo cual coincide con los resultados de este estudio.

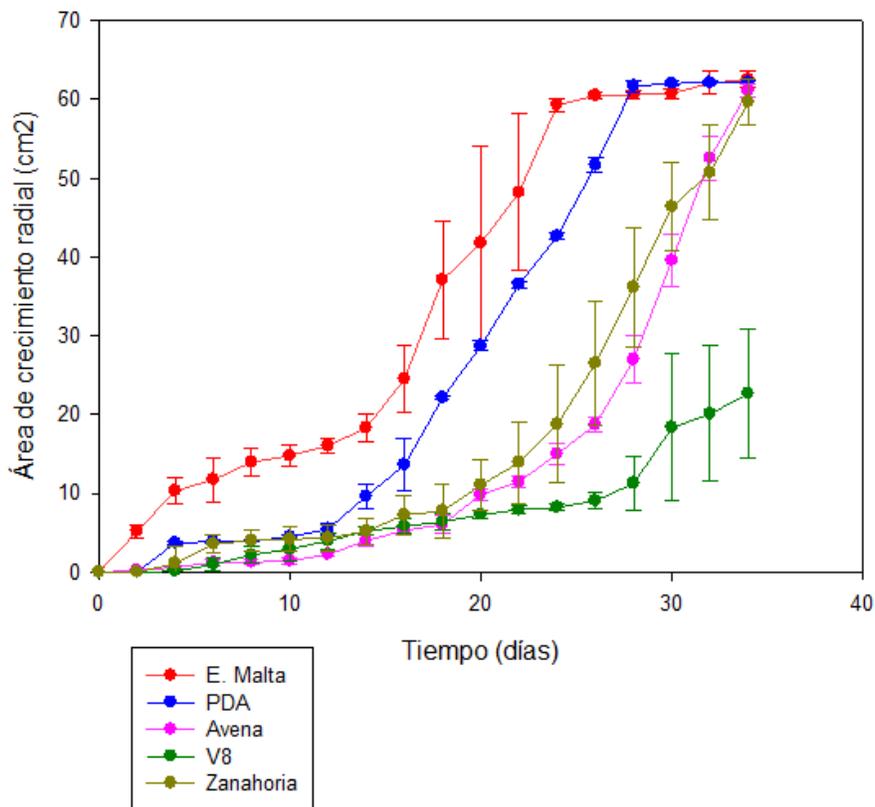


Figura 10. Curvas de crecimiento de *Moniliophthora roreri* a 25°C en Extracto de malta, PDA, V8, Zanahoria y Avena.

Se realizó en análisis estadístico a partir las áreas bajo la curva para cada tratamiento (*M. roreri* a 20°C, *M. roreri* a 25°C y *M. pernicioso* a 25°C) el cual se encuentra en ANEXOS

7.4 Recuento de conidios

El recuento de conidios para *M. roreri* de cada uno de los seis medios de cultivo evaluados bajo una temperatura de 25°C (**figura 11**) permitió confirmar que el agar Extracto de Malta, es el mejor medio, entre los evaluados, para el crecimiento y producción de células conidiogénicas (**figura 12**), ya que allí se obtuvo el recuento más alto, seguido por V8, PDA, Zanahoria, PDA ½ y finalmente Avena, en donde sólo se desarrolló micelio..

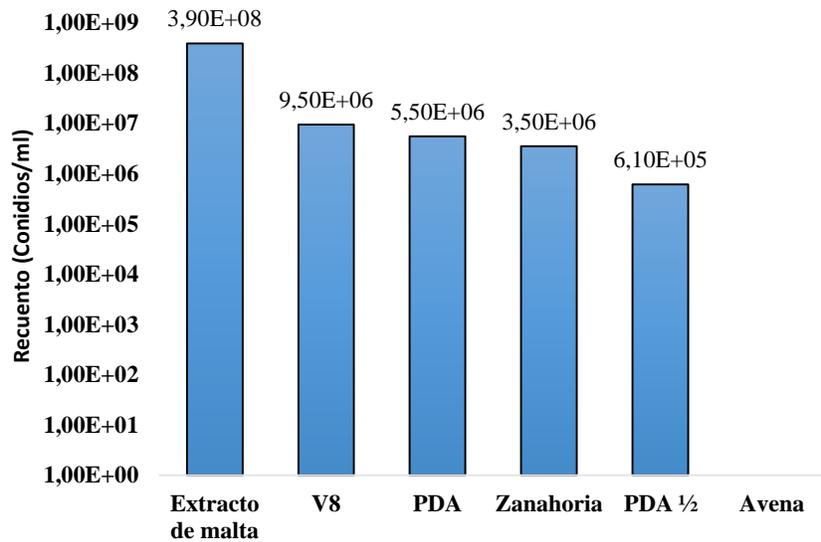


Figura 12. Recuento de conidios de *Moniliophthora roreri* en cada uno de los medios de cultivo evaluados al cabo de 34 días de incubación a 25°C.

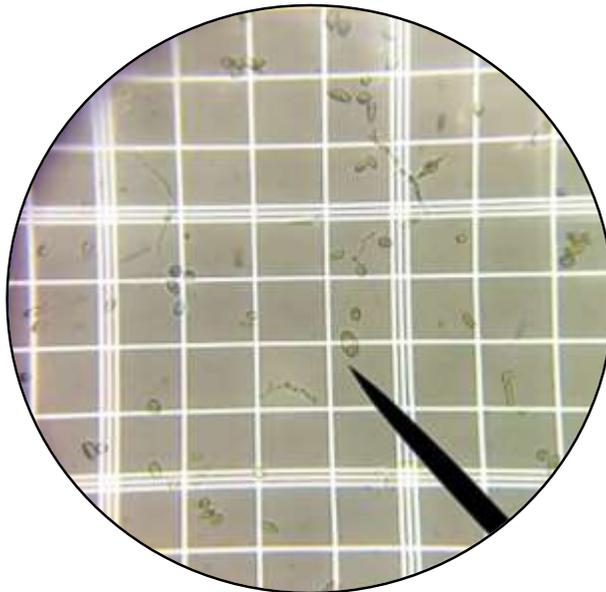


Figura 11. Conidios de *Moniliophthora roreri* (40X) obtenidos de Extracto de malta

En otros estudios se ha evaluado la producción de conidios de *M. roreri* bajo distintas condiciones nutricionales y se halló que al igual que este caso, son los medios V8+20% agar y Extracto de malta+10% agar son en los que se da la mayor producción de conidios. También

se encontró que la adición de maltosa y asparagina favorece significativamente el desarrollo de estas estructuras [63].

7.5 Actividad antifúngica

Para el estudio de la actividad antifúngica de especies del género *Piper*, se colectaron inflorescencias de 11 especies del este género y partes aéreas de una de las especies. En la **Tabla 1** se presentan los nombres de las especies y los órganos que fueron empleados para obtener los extractos etanólicos.

Tabla 1. Especies de *Piper* empleadas en el estudio de actividad antifúngica.

Código Extracto	Especie*	Órgano
1	<i>Piper eriopodon</i>	Inflorescencias
2	<i>Piper falcifolium</i>	Inflorescencias
3	<i>Piper haughtii</i>	Inflorescencias
4	<i>Piper pertomentellum</i>	Inflorescencias
5	<i>Piper asperiusculum</i>	Inflorescencias
6	<i>Piper grande</i>	Inflorescencias
7	<i>Piper lanceifolium</i>	Inflorescencias
8	<i>Piper statarium</i>	Inflorescencias
9	<i>Piper artanthe</i>	Inflorescencias
10	<i>Piper statarium</i>	Partes aéreas
11	<i>Piper nigrum</i>	Inflorescencias
12	<i>Piper protracticuspidatum</i>	Inflorescencias

* Las especies fueron determinadas en el Herbario de la Universidad de Antioquia, pero actualmente no se les ha asignado número de colección (HUA) debido a que están en proceso de ingreso al herbario.

Cada uno de los extractos obtenidos fue evaluado a una concentración de 1000 µg/mL de sobre *Moniliophthora roreri*. Los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial de cada tratamiento se muestran en la **figura 13**, en donde se evidencia que seis de los doce extractos mostraron una importante actividad antifúngica con un porcentaje de inhibición por encima

del 50%, los cuales hacen parte de las especies: *P. asperiusculum*, *P. grande*, *P. statarium*, *P. artanthe* y *P. nigrum*.

Este es el primer reporte acerca de la actividad antifúngica sobre *M. roreri* por todos los extractos empleados, lo cual contribuye al conocimiento de las propiedades biológicas de las especies de *Piper* incluidas en el estudio

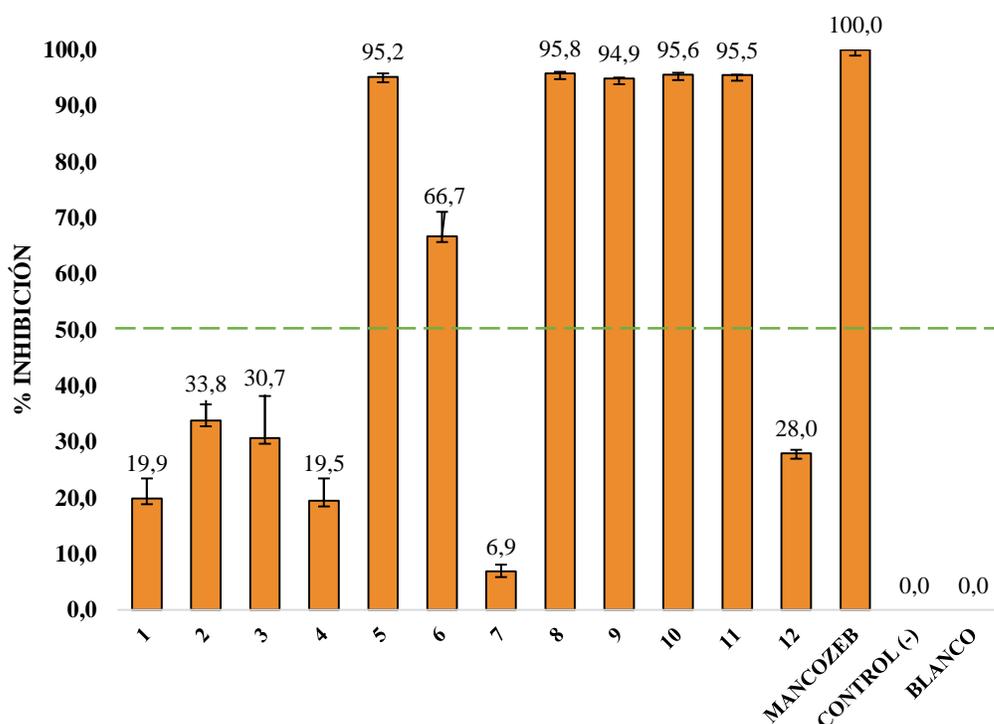


Figura 13. Porcentajes de inhibición de las sustancias evaluadas: Extractos vegetales (1-12), Mancozeb (control positivo), control negativo (Medio PDA + hongo), blanco de reactivos (Etanol). *Los números corresponden a la codificación de la tabla 1.

Debido a que varios de los extractos alcanzaron porcentajes de inhibición cercanos a 100%, se decidió disminuir la concentración para poder determinar el efecto que causan sobre el hongo a concentraciones más bajas, con miras a establecer su CI50 (Concentración inhibitoria 50). Se probaron así concentraciones de: 1000, 500, 250 y 125 $\mu\text{g/ml}$ de los seis extractos promisorios. Los resultados se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Porcentajes de inhibición a diferentes concentraciones y CI50 para los extractos de *Piper* promisorios

Extracto	% Inhibición				CI50 (ppm) (Límite de confianza 95%)
	1000 ppm	500 ppm	250 ppm	125 ppm	
5	95,2 ± 0,7	93,4 ± 2,6	35,5 ± 11,9	0	356,5 (151,4 – 629,1)
6	66,7 ± 4,4	47,1 ± 4,7	23,0 ± 1,1	8,4 ± 0,8	691,6 (568,8 – 868,8)
8	95,8 ± 0,3	41,3 ± 0,9	16,6 ± 5,9	10,1 ± 1,0	554,5 (508,9 – 606,5)
9	94,9 ± 0,2	87,0 ± 1,9	13,8 ± 2,7	0	429,7 (275,6 – 673,0)
10	95,6 ± 0,2	95,0 ± 0,1	88,0 ± 2,7	86,7 ± 4,5	< 125
11	95,5 ± 0,1	92,4 ± 2,9	88,9 ± 4,0	82,0 ± 12,0	< 125

En la tabla se puede observar que los extractos con mayor actividad antifúngica para este ensayo fueron los extractos 10 y 11 (*P. statarium* y *P. nigrum*, respectivamente), porque aun a una concentración de 125 µg/ml no se les logró determinar la CI50, estos extractos corresponden al de partes aéreas de *P. statarium* e inflorescencias de *P. nigrum*.

Para estas dos especies aún no se han reportado estudios acerca de su actividad sobre *M. roreri* ni sobre *M. perniciosa*; sin embargo, con extractos obtenidos de raíces de *P. nigrum* se han realizado ensayos en medio acuoso y con etanol con los métodos de difusión en disco y en agar, en los que se ha encontrado que presentan actividad antifúngica sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium solani* y *Macrophomina phaseolina* [64]. Respecto a *P. statarium*, no encuentran aún estudios fitoquímicos relevantes de la especie, y por lo tanto tampoco hay reporte alguno de su actividad antimicrobiana. Sin embargo, en este ensayo, *P. statarium* fue la especie empleada para dos de los extractos a evaluar y en ambos casos se obtuvo una inhibición cercana al 100% sobre *M. roreri*.

Al comparar los resultados de inhibición de crecimiento fúngico, el extracto de partes aéreas presenta mayor actividad antifúngica que el obtenido de inflorescencias. Este hecho puede deberse a que en las hojas y tallos de esta especie hay otros metabolitos secundarios que tienen la capacidad de afectar el crecimiento de *M. roreri*, y que posiblemente están ausentes en las inflorescencias, o también puede deberse a efectos sinérgicos [65], es decir, que la

actividad antifúngica se favorece gracias a la presencia de varios compuestos provenientes de distintas partes de la planta que ejercen un espectro de acción más amplio afectando distintas funciones metabólicas o estructurales del hongo [66].

Finalmente se destaca también el gran potencial de la utilización de extractos vegetales para este tipo de ensayos, ya que por ejemplo, el uso de compuestos puros podría provocar los mismos resultados negativos de los fungicidas convencionales, favoreciendo la resistencia por parte del hongo a los mismos y generando efectos tóxicos en el ambiente [67].

8. CONCLUSIONES

El aislamiento del presunto *M. pernicioso* se logró a partir de muestras con síntomas de escoba de bruja en el estado medio de la enfermedad.

Los medios de cultivo que inducen mayormente el crecimiento de *M. pernicioso* y de *M. roreri* son PDA y Extracto de malta y la temperatura ideal de incubación para el desarrollo de las colonias en ambos casos es de 25°C.

La inducción de formación y desarrollo de propágulos para *M. roreri* se logró en el medio extracto de Malta bajo una temperatura de 25°C.

Se obtuvieron seis extractos de *Piper* provenientes de inflorescencias y partes aéreas con actividad antifúngica alcanzando más del 50% de inhibición sobre *M. roreri*, los cuales hacen parte de las especies: *P. asperiusculum*, *P. grande*, *P. statarium*, *P. artanthe* y *P. nigrum*, dentro de estas se destacaron *P. statarium* y *P. nigrum* por mostrar una actividad antifúngica por encima del 50% a una concentración de 125 µg/ml.

9. RECOMENDACIONES

El aislamiento y purificación de *M. pernicioso* en condiciones *in vitro* es muy complicado por lo que vale la pena continuar ensayando, en primera instancia, diferentes métodos de muestreo desde el cultivo de cacao para recuperar el hongo a partir de los síntomas de escoba bruja, más no desde cuerpos fructíferos (basidiocarpos) que ya han sido estudiados pero que no deben ser el único enfoque ya que esta enfermedad afecta a la planta porque el hongo internaliza los tejidos vegetales.

Por otro lado, se pueden ensayar otras condiciones para inducir la formación de propágulos y otras estructuras reproductivas como la variación de fotoperiodos y temperaturas más altas de las evaluadas en este estudio, o incluso otro tipo de medios de cultivo con componentes nutricionales del cacao y suplementados con maltosa y asparagina.

Se recomienda repetir los ensayos de inhibición de crecimiento micelial con los extractos de las especies *Piper nigrum* y *Piper statarium* sobre *M. roreri* a concentraciones por debajo de 125 µg/mL para determinar una CI50 en cada caso.

Finalmente, con la confirmación certera de *M. pernicioso* se recomienda realizar los ensayos de inhibición de crecimiento micelial y de inhibición germinación de conidios sobre éste con todos los extractos de *Piper* obtenidos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Benalcázar M, Carrión D. Análisis de la cadena de valor del cacao y su relación con la aplicación del Proyecto de Reactivación de la Producción del cacao nacional fino y de aroma, caso de estudio: Kallari Tena. 2016.
2. Tovar G. La investigación sobre la epidemiología de la escoba de bruja del cacao [*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer] en el Piedemonte Llanero de Colombia: consideraciones generales. *Agronomía Colombiana*, 1991, vol. 8, no 1, p. 31-57.
3. Meinhardt W, Rincones J, Bailey B, Aime M, Griffith G, Zhang D, Pereira G. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe?. *Molecular plant pathology*, 2008, vol. 9, no 5, p. 577-588.
4. Alécio AC. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *Journal of Natural Products*, 1998, vol. 61, no 5, p. 637-639.
5. Celis Á, Mendoza C, Pachón M, Cardona J, Delgado W, Cuca LE. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*. 2008, vol. 26, no 1, p. 97-106.
6. Ladino C. Potencialidad del género *Piper* como fuente de sustancias para el control de hongos fitopatógenos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. 2018, p 28-57.
7. Granados W, Muñoz C. Cadena de cacao, indicadores e instrumentos. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Colombia. 2018.
8. Aranzazu F, Rincón D. Cacao: manejo del recurso genético para incrementar la producción y productividad del sistema de cacao en Colombia. Unión temporal cacao de Colombia UNO. 2009.
9. FEDECACAO. En 2017 Colombia alcanzó Nuevo record en la producción de cacao; 2017 [Consultado en Febrero 18 de 2018] Disponible en: <http://cu5.io/8nMpGkOp>
10. DANE. Encuesta nacional agropecuaria ENA – 2016; 2016 [Consultado el 2 de Mayo del 2018] Disponible en: <http://cu5.io/e17Iy>
11. Cámara de comercio de Bogotá; Cámara de Comercio de Bogotá impulsa el desarrollo agroindustrial en la región; 2015 [Consultado en Abril 12 de 2018] Disponible en: <https://bit.ly/313303o>
12. Nacional de Chocolates S.A.S. El Cultivo de Cacao. Fomento Empresarial Agrícola, 1, 4, 5. 2012.
13. AGRONET; 2018. [Consultado en Abril 18 de 2018] Disponible en: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>.
14. FEDECACAO. En 2017 Colombia alcanzó Nuevo record en la producción de cacao; 2017 [Consultado en Febrero 18 de 2018] Disponible en: <http://cu5.io/i19Old7o>
15. Bowers J, Bailey B, Hebbar P, Sanogo S, Lumsden R. The impact of plant diseases on world chocolate production. *Plant Health Progress*, 2001, vol. 10.
16. Jaimes Y, Aranzazu F. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). *Corpoica*. 2010. 90 p.
17. Holliday P. *Crinipellis perniciosa*. CMI descripción de pathogenic fungi and bacteria. London: Commonw. Mycol. Inst. 1970.
18. Evans C. Witches' Broom Disease (*Moniliophthora perniciosa*): History and Biology. En *Cacao Diseases*. Springer, Cham, 2016. p. 137-177.
19. Meinhardt L, Rincones J, Bailey B, Aime M, Griffith G, Zhang D, Pereira G. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe?. *Molecular plant pathology*, 2008, vol. 9, no 5, p. 577-588.
20. Purdy L, Schmidt R. STATUS OF CACAO WITCHES'BROOM: Biology, Epidemiology, and Management. *Annual review of phytopathology*, 1996, vol. 34, no 1, p. 573-594.
21. Scarpari L, Meinhardt L, Mazzafera P, Pomella A, Schiavinato M, Cascardo J, Pereira G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of

- cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. Journal of Experimental Botany, 2005, vol. 56, no 413, p. 865-877.
22. Do Rio C, De Oliveira B, Tomazella D, Fracassi J, Pereira G. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. Current microbiology, 2008, vol. 56, no 4, p. 363.
 23. Rocha H, Wheeler B. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). Plant Pathology, 1985, vol. 34, no 3, p. 319-328.
 24. Evans H, Solórzano G. Witches' broom disease: wrong experiment right result. In: de Laforest J (ed) 8th International Cocoa Research Conference, Cartagena, Colombia. 1982, p. 415-418.
 25. Estrada W, Romero X, Moreno J. Guía técnica del cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas; 2011 [Consultado en Febrero 18 de 2018] Disponible en: http://biblioteca.catie.ac.cr/descargas/Estrada_et_al_Guia_Tecnica_Cacao.pdf, 2011.
 26. Agrios G. Introduction to plant pathology. Elsevier Academic Press Publication, 2005, 922 p 23-37.
 27. Laker, H. Evaluation of systemic fungicides for control of witches' broom disease of cocoa in Trinidad. Tropical agriculture, 1991, vol. 68, no 2, p. 119-124.
 28. Hebbar, P. Cacao diseases: a global perspective from an industry point of view. Phytopathology, 2007. 97:1658-1663.
 29. Bastos C, Evans H, Samson R. A new hyperparasitic fungus, *Cladobotryum amazonense*, with potential for control of fungal pathogens of cocoa. Transactions of the British Mycological Society, 1981, vol. 77, no 2, p. 273-278.
 30. Barros O. Cacao. Manual de Asistencia Técnica Agropecuaria, No 23. Bogotá. ICA. P, 1981, p. 210-216.
 31. Sánchez F, Medina S, Díaz G, Ramos R, Vera J, Vásquez V, Onofre R. Potencial sanitario y productivo de 12 clones de cacao en Ecuador. Revista fitotecnica mexicana, 2015, vol. 38, no 3, p. 265-274.
 32. Celis Á, Mendoza C, Pachón M, Cardona J, Delgado W, Cuca L. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. Agronomía Colombiana, 2008, vol. 26, no 1, p. 97-106.
 33. Callejas R, Betancur J. Especies nuevas de Piperaceae de los Andes al sur de Colombia. Novon, 1997, p. 17-24.
 34. Dyer L, Palmer A. Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution. New York: Kluwer academic/Plenum publishers, 2004.
 35. Siddiqui B, Gulzar T, Begum S, Afshan F, Sattar F. Insecticidal amides from fruits of *Piper nigrum* Linn. Natural product research, 2005, vol. 19, no 2, p. 143-150.
 36. Singh Y, Singh N. Therapeutic potential of kava in the treatment of anxiety disorders. CNS drugs, 2002, vol. 16, no 11, p. 731-743.
 37. Barbosa D, Lenardon L, Partata A. Kava-kava (*Piper methysticum*): uma revisão geral. Rev. Cien. ITPAC, 2013, vol. 6, no 3, p. 1-19.
 38. García B. Flora medicinal de Colombia Botánica médica. Tercer Mundo, 1992.
 39. Parmar V, Jain S, Bisht K, Jain R, Taneja P, Jha A, Olsen C. Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry, 1997, 46(4), 597-673.
 40. Parra J, Delgado W, Cuca L. Cumanensic acid, a new chromene isolated from Piper cf. cumanense Kunth. (Piperaceae). Phytochemistry Letters, 2011, vol. 4, no 3, p. 280-282.
 41. Parra J, Patiño O, Prieto J, Delgado W, Cuca L. A new benzoic acid derivative isolated from Piper cf. cumanense Kunth (Piperaceae). Phytochemistry Letters, 2013, vol. 6, no 4, p. 590-592.
 42. Xu W, Li X. Antifungal compounds from Piper species. Current bioactive compounds, 2011, vol. 7, no 4, p. 262-267.

43. Naz T, Mosaddik A, Rahman M, Muhammad I, Haque M, Cho S. Antimicrobial, antileishmanial and cytotoxic compounds from Piper chaba. Natural product research, 2012, vol. 26, no 11, p. 979-986.
44. Marques J, Oliveira A, Raggi L, Young M, Kato M. Antifungal activity of natural and synthetic amides from *Piper* species. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2010, vol. 21, no 10, p. 1807-1813.
45. Avila M, Patiño O, Prieto J, Delgado W, Cuca L. Flavonoides con Actividad Antifúngica Aislados de *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC.(Piperaceae). Revista Colombiana de Química, 2011, vol. 40, no 1, p. 25-33.
46. Dean R, Van J, Pretorius Z, Hammond K, Di Pietro A, Spanu P, Foster G. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular plant pathology, 2012, vol. 13, no 4, p. 414-430.
47. Nascimento S, Araujo E, Da Silva J, Ramos C. Chemical study and antimicrobial activities of *Piper arboreum* (Piperaceae). Journal of the Chilean Chemical Society, 2015, vol. 60, no 1, p. 2837-2839.
48. Prakash B, Shukla R, Singh P, Kumar A, Mishra P, Dubey N. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. International Journal of Food Microbiology, 2010, vol. 142, no 1-2, p. 114-119.
49. Soidrou S, Farah A, Satrani B, Ghanmi M, Jennan S, Hassane S, Bousta D. Fungicidal activity of four essential oils from *Piper capense*, *Piper borbonense* and *Vetiveria zizanioides* growing in Comoros against fungi decay wood. Journal of essential oil research, 2013, vol. 25, no 3, p. 216-223.
50. Carrera K, Paredes L, Leiva M. Protocolo para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en frutos de cacao cv.Nacional de la Amazonía ecuatoriana. Biotecnología Vegetal, 2014, vol. 14, no 3.
51. Alvarado Fernandez, A. M. Caracterización molecular por AFLP y evaluación de factores de patogenicidad de *Fusarium* spp. Aislados de humanos, animales y plantas como herramientas para el planteamiento de un modelo multihospedero. Trabajo de grado Maestría ciencias biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. 2014. P 33-34.
52. Cosoveanu, A., Hernandez, M., Iacomi-Vasilescu, B., Zhang, X., Shu, S., Wang, M., & Cabrera, R.. Fungi as endophytes in Chinese Artemisia spp: Juxtaposed elements of phylogeny, diversity and bioactivity. Mycosphere, 2016 7(2), 102-117.
53. Rojas, E. I., Rehner, S. A., Samuels, G. J., Van Bael, S. A., Herre, E. A., Cannon, P. & Peng, Y. Q. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. Mycologia. 2010. 102(6), 1318-1338.
54. Lima, N. B., Batista, M. V. D. A., De Moraes, M. A., Barbosa, M. A., Michereff, S. J., Hyde, K. D., & Câmara, M. P. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. Fungal Diversity. 2013. 61(1), 75-88.
55. Noireung, P., Phoulivong, S., Liu, F., Cai, L., McKenzie, E. H., Chukeatirote, E., ... & Hyde, K. D. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. Cryptogamie, Mycologie. 2012. 33(3), 347-363.
56. Rahman, S., Adhikary, S. K., Sultana, S., Yesmin, S., & Jahan, N. In vitro evaluation of some selected fungicides against *Pestalotia palmarum* (Cooke.) causal agent of grey leaf spot of coconut. J Plant Pathol Microb. 2013. 4, 197.
57. Peredo, H. L., & Valenzuela, E. Nuevas determinaciones de hongos patógenos forestales en Chile. *Boletín Micológico*. 2019 3(4).
58. Trizelia, T, and Winarto. W. Diversity of endophytic entomopathogenic fungus from cacao (*Theobroma cacao*). Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia. 2016. Vol. 2. No. 2.

59. Vasco-Palacios, A. M., & Franco-Molano, A. E. Diversity of Colombian macrofungi (Ascomycota-Basidiomycota). *Mycotaxon*. 2013. 121(1), 100-158.
60. Pérez-Vicente, L. *Moniliophthora roreri* HC Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. *Revista de Protección Vegetal*. 2018. 33(1).
61. Tirado-Gallego, P. A., Lopera-Álvarez, A., & Ríos-Osorio, L. A. Strategies for Control of *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa* in *Theobroma cacao* L.: A Systematic Review. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2016. 17(3), 417-430.
62. Lozada, B. S., Viviana Herrera, L., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia sobre Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 2012. 61(2).
63. Carrera Sánchez, K. M. E. Caracterización de *Moniliophthora roreri* Evans et al. y evaluación de alternativas de control biológico en cacao, para la Amazonía ecuatoriana, Doctoral dissertation, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía. 2016.
64. Dawar, S., Abbas, S., Tariq, M., & Zaki, M. In vitro fungicidal activity of spices against root infecting fungi. *Pakistan Journal of Botany*. 2008 40(1), 433.
65. Koroishi, A. M., Foss, S. R., Cortez, D. A., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of ethnopharmacology*. 2008. 117(2), 270-277.
66. Magro, A., Bastos, M., Carolino, M., & Mexia, A. Antifungal activity of plant extracts. *IOBC WPRS BULLETIN*. 2007. 30(2), 291.
67. Kim, B. S., & Hwang, B. K. Microbial fungicides in the control of plant diseases. *Journal of Phytopathology*, 155(11-12). 2007. 641-653.

ANEXOS

M. pernicioso a 25°C (PDA, E. malta, V8, Zanahoria, Avena)

ANOVA

ABC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	304848,111	4	76212,028	317,712	,000
Dentro de grupos	2398,777	10	239,878		
Total	307246,887	14			

*ABC (área bajo la curva)

M. royeri a 20°C (PDA y E. malta)

ANOVA

ABC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7639,802	1	7639,802	27,896	,006
Dentro de grupos	1095,467	4	273,867		
Total	8735,268	5			

*ABC (área bajo la curva)

M. royeri a 25°C (E. malta, PDA, V8, Zanahoria, Avena)

ANOVA

ABC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1469310,709	4	367327,677	67,197	,000
Dentro de grupos	54664,640	10	5466,464		
Total	1523975,349	14			

*ABC (área bajo la curva)