

Identificación de hongos endófitos presentes en mazorcas de *Theobroma cacao* de los municipios de Maceo y San Pedro de Urabá, Antioquia

Identification of endophytic fungi present in *Theobroma cacao* pods from the municipalities of Maceo and San Pedro de Urabá, Antioquia

Andrea C. Osorio*, Andrea V. Triana*, Lorena A. Jiménez*

Camilo A. Ramírez+

RESUMEN

Los árboles de cacao constituyen un sistema agroforestal con relevancia económica y social en Colombia, además de ser un amplio reservorio de poblaciones fúngicas con potencial benéfico en el crecimiento, defensa en la planta y síntesis de compuestos bioactivos. No obstante, el conocimiento de la diversidad de hongos endófitos de la mazorca de cacao es limitado debido a que la mayoría de los estudios se centran en otras zonas de la planta; y, las exigencias nutricionales de estos pueden dificultar su aislamiento y crecimiento en condiciones de cultivo *in-vitro*. En este trabajo se identificaron y caracterizaron hongos endófitos presentes en mazorcas sanas de *Theobroma cacao* de los municipios de Maceo y San Pedro de Urabá mediante descripción macroscópica, microscópica y estandarización de medios de cultivo, evaluando PDA, SB, MC y Cacao. Se aislaron 5 morfotipos pertenecientes a los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* y *Phomopsis*, donde el medio PDA favoreció el crecimiento de los hongos aislados, presentando los mayores valores de área bajo la curva (endófito 1: 387 cm², endófito 2: 456,67 cm², endófito 3: 338,92 cm², endófito 4: 536,96 cm², endófito 5: 459,24 cm²). Debido al alcance planteado en este estudio no se puede asegurar que los hongos identificados representan la diversidad de las mazorcas de cacao de los municipios muestreados. Sin embargo, los resultados de esta investigación contribuyen al conocimiento de los géneros fúngicos endófitos de los frutos de cacao y aporta información a estudios futuros que busquen manejar especies fúngicas con posible aplicación en la formulación de alternativas ante problemas agroforestales.

Palabras clave: Caracterización. Estandarización. Hongos endófitos. Mazorca de cacao. *Theobroma cacao*.

ABSTRACT

Cacao trees constitute an agroforestry system with economic and social relevance in Colombia, in addition to being a wide reservoir of fungal populations

which have potential growth and defense benefits in the plant along with the synthesis of bioactive compounds. However, the knowledge of the diversity of endophytic fungi on the cocoa pod is limited because most of the studies have

*Estudiantes de Microbiología Industrial y Ambiental. Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia.
+Docente e investigador del grupo de investigación Bacteriología Agrícola y Ambiental -BA&A-. Instituto de Biología. Universidad de Antioquia.

been focused on other areas of the plant. In addition, the nutritional requirements of fungi makes it difficult to isolate and grow them under *in-vitro* culture conditions. In this work, endophytic fungi present in healthy *Theobroma cacao* pods in the municipalities of Maceo and San Pedro de Urabá were identified and characterized by macroscopic and microscopic description and standardization of culture media, evaluating PDA, SB, MC and Cacao. Five morphotypes belonging to the genera *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* and *Phomopsis* were isolated. According to the results, the growth of the isolated fungi was favored by the PDA medium, presenting the highest values of area under the curve (endophyte 1: 387 cm², endophyte 2: 456.67 cm², endophyte 3: 338.92 cm², endophyte 4: 536.96 cm², endophyte 5: 459.24 cm²). Due to the scope proposed in this research, it cannot be assured that the identified fungi represent the diversity of the cocoa pods of the sampled municipalities. However, the results of this research contribute to the knowledge of the endophytic fungal genera of cocoa fruits and provide information for future studies that seek to manage fungal species with possible application in the formulation of alternatives to agroforestry problems.

Keywords: Characterization. Cocoa pod. Endophytic fungi. Standardization.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao es uno de los sistemas agroforestales con relevancia económica y social en Colombia. Entre el 2015 y 2020, la producción de cacao mostró una pendiente ascendente con un incremento del 15%¹, constituyendo el 6,7% de la producción total agrícola colombiana². El creciente aumento del sector cacaotero y el reconocimiento internacional del cacao colombiano permite proyectar que se demandará mayor cantidad y calidad del grano³.

Para suplir la demanda de cacao y seguir posicionándose en el mercado internacional, es necesario buscar estrategias que solucionen los problemas de las plantaciones de cacao y también, que puedan ser aplicadas en otras especies vegetales³. Uno de los principales causantes de la reducción del rendimiento de cultivos son las enfermedades provocadas por microorganismos patógenos, donde los hongos endófitos pueden representar una solución promisoriosa como agentes de biocontrol y fuente de metabolitos para bioprospección³.

De acuerdo con Hawksworth y Lucking⁴, la diversidad fúngica se estima entre 1,5 y 3,8 millones de especies, donde los

hongos endófitos constituyen un amplio e importante componente, siendo hospederos en aproximadamente 300.000 especies de plantas⁵.

Varios autores han mencionado los beneficios de los hongos endófitos en las plantas^{5,10,11,13}, resaltando la capacidad de potencializar el desarrollo vegetal con la estimulación de altas tasas de germinación, mayor biomasa en los tejidos⁶ y resistencia a enfermedades causadas por otros microorganismos⁷. Adicionalmente, se ha mencionado la capacidad de los hongos endófitos para sintetizar compuestos bioactivos de interés industrial, farmacéutico y agrícola⁷. Un ejemplo es la pestacina (1,3-dihidro-isobenzofurano), un agente antioxidante y antifúngico sintetizado por *Pestalotiopsis microspora*⁸.

En la literatura es ampliamente reportado que los árboles de cacao constituyen un gran reservorio de poblaciones fúngicas endófitas que han destacado por su rol benéfico en el crecimiento y defensa contra estrés biótico y abiótico en la planta^{5,9,10,11}. Sin embargo, el conocimiento de la riqueza y ecología de la micobiota presente en la mazorca de cacao es limitado. Principalmente, a causa de que la mayoría de los estudios realizados se centran en la rizosfera,

hojas y tallo del cacao^{5,6,12,13,14}, siendo escasos los reportes de microorganismos en el fruto de esta planta. Así mismo, los hongos endófitos tienen exigencias nutricionales que dificultan su crecimiento en medios de cultivo sólidos, condicionando la facilidad de aislamiento y desarrollo de las especies fúngicas endófitas bajo condiciones de cultivo *in-vitro*^{9,15}. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar los hongos endófitos cultivables presentes en mazorcas de *Theobroma cacao* provenientes de Maceo y San Pedro de Urabá, Antioquia, abarcando la identificación y estandarización de un medio de cultivo para su crecimiento en condiciones *in-vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Se recolectaron mazorcas sanas de cacao de los municipios de Maceo (Latitud: 6.55138, Longitud: -74.7834 6° 33' 5" N, 74° 47' 0" O) y San Pedro de Urabá (Latitud: 8.283, Longitud: -76.383 8° 16' 59" N, 76° 22' 59" O) en el departamento de Antioquia, con temperaturas promedio anual de 24,8°C y 28,5°C, respectivamente¹⁶.

De cada sitio se seleccionaron 5 mazorcas sanas de manera aleatoria de

árboles con 10 a 12 metros de distancia entre sí. Los frutos tenían 3 meses de desarrollo, no presentaban lesiones en el exocarpo ni deformaciones visibles. Las mazorcas se cubrieron con papel periódico, separadas en bolsas resellables y se transportaron en neveras portátiles con gel refrigerante hasta el Laboratorio de Biocontrol y Microbiología Ambiental (BIOMA) de la Universidad de Antioquia, donde fueron procesados.

Aislamiento e identificación de hongos endófitos

Los hongos endófitos fueron aislados siguiendo una adaptación de la metodología descrita por Amin *et al*¹⁹. Así, a partir de las mazorcas de cacao recolectadas, se tomaron trozos de 2 cm x 2 cm de la zona interna de la cáscara de la mazorca (entre el mesocarpio y endocarpio). El tejido vegetal extraído se sometió a un proceso de desinfección superficial con hipoclorito de sodio al 2% durante 1 minuto y alcohol etílico al 70% durante 1 minuto, finalmente los trozos se lavaron tres veces con agua destilada estéril durante 1 minuto, con el fin de eliminar residuos de los desinfectantes¹⁹. Los fragmentos de mazorca desinfectados se secaron en condiciones asépticas y se sembraron cuatro trozos en cada caja Petri con medio PDA, obteniendo 3 cajas inoculadas por cada

mazorca. Las siembras se incubaron durante 4 días en ausencia de luz a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ para facilitar el desarrollo de los hongos filamentosos¹⁷. Los morfotipos obtenidos se purificaron en PDA para obtener cultivos aislados.

La identificación morfológica de los aislamientos se realizó de manera presuntiva siguiendo las claves taxonómicas de Alexopoulos y Mins¹⁸. Se observaron las características macroscópicas como color, forma, textura, presencia de anillos y características microscópicas como descripción del micelio, estructuras vegetativas y reproductivas.

Estandarización de medios de cultivo

Para estandarizar el crecimiento de los aislados, se realizó una caracterización en diferentes medios de cultivo. Se evaluaron cuatro tratamientos: Agar papa dextrosa (PDA: Dextrosa 20 g/L, extracto de papa 4 g/L, agar 15 g/L), Agar Sabouraud (SB: Glucosa 20 g/L, peptona 10 g/L, agar 17 g/L), Medio completo (MC: Glucosa 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, KH_2PO_4 0,36 g/L, Na_2HPO_4 1,42 g/L, KCl 0,88 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/L, NH_4NO_3 0,7 g/L, agar 18 g/L) y Medio Cacao (Cacao: Extracto de cascara de cacao 1 mL/mL, agar 10 g/L). En cada medio se sembraron los hongos endófitos

aislados por triplicado, tomando la misma dimensión de micelio. Los medios inoculados se incubaron en condiciones de ausencia de luz a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Como parte de la caracterización de los hongos endófitos aislados se describieron las características macroscópicas, microscópicas y tiempo de esporulación en los diferentes medios de cultivo. Para comparar el crecimiento entre los tratamientos se midió como variable de respuesta el diámetro micelial de cada hongo diariamente durante cinco días. A partir de esto se calculó el área bajo la curva del crecimiento de cada cepa utilizando la herramienta estadística R-Studio 1.2.5033. Se realizó una prueba de análisis de varianza -ANOVA- y una prueba de comparaciones múltiples HSD (Tukey) ($P\leq 0,05$) para determinar las

diferencias significativas entre los tratamientos.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de hongos endófitos

Se obtuvieron cinco aislamientos fúngicos endófitos de mazorcas de cacao con características macro y microscópicas diferentes (Figura 1, Tabla 1). Los morfotipos se enumeraron del 1 al 5. Los endófitos 1, 2 y 3 provinieron del municipio de Maceo, mientras que, los endófitos 4 y 5 de San Pedro de Urabá. Los cuatro primeros hongos se identificaron morfológicamente de forma presuntiva, mientras que el endófito 5 se consideró estéril debido a la ausencia de estructuras reproductivas (Tabla 1).

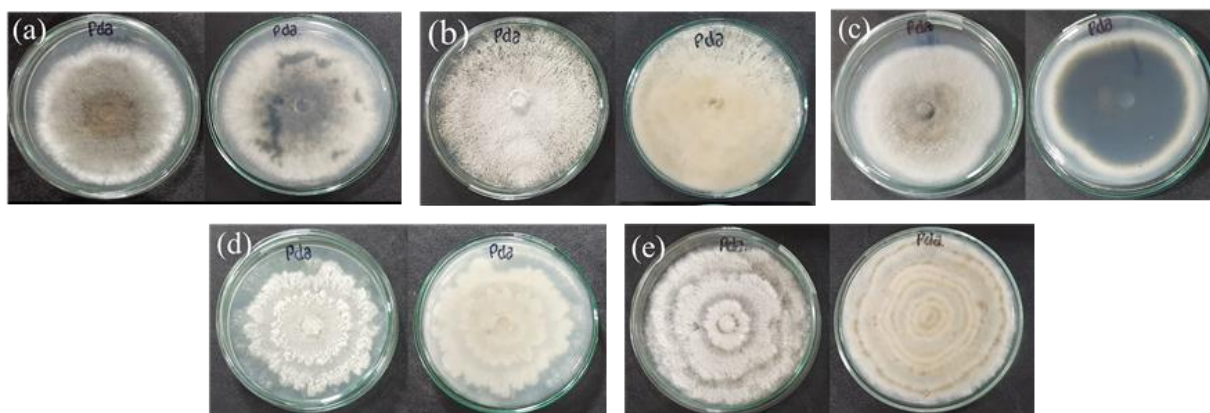


Figura 1. Hongos endófitos aislados de tejido vegetal desinfectado de mazorcas de cacao en medio PDA: (a) Endófito 1, (b) Endófito 2, (c) Endófito 3, (d) Endófito 4, (e) Endófito 5. Imagen a la derecha: reverso de la caja de Petri; imagen a la izquierda: anverso de la caja de Petri.

Estandarización de medios de cultivo

a. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos en diferentes medios de cultivo

Los hongos endófitos aislados presentaron variaciones en las características macro y microscópicas dependiendo del medio de cultivo en el

que se desarrollaron (Tabla 2). Entre los principales cambios macroscópicos se destacan las variaciones en la superficie, color y textura del micelio fúngico. En cuanto a las características microscópicas, únicamente se evidenciaron cambios en la formación de estructuras reproductivas en función del medio de cultivo evaluado.

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos de mazorcas de cacao en Medio PDA. La identificación presuntiva se realizó empleando las claves taxonómicas de Alexopoulos y Mins¹⁸.

Hongos endófitos	Identificación presuntiva	Características macroscópicas	Características microscópicas
Endófito 1 (Figura 1 (a))	<i>Colletotrichum</i> sp.	Anverso con centro color café y borde blanco. Reverso con centro color negro y borde blanco. Superficie opaca, algodonosa y forma regular.	Micelio septado, hialino y ramificado. Conidios unicelulares cilíndricos con extremos redondeados.
Endófito 2 (Figura 1 (b))	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Anverso y reverso color blanco. Superficie opaca, lanosa y forma irregular con presencia de acérvulos.	Micelio septado, hialino y ramificado. Conidios septados con cinco células, fusiformes, oscuros y ápices hialinos puntiagudos.
Endófito 3 (Figura 1 (c))	<i>Colletotrichum</i> sp.	Anverso con centro color café claro y borde blanco. Reverso color negro con borde blanco. Superficie opaca, algodonosa y forma regular.	Micelio septado, hialino y ramificado. Conidios unicelulares cilíndricos con extremos redondeados.
Endófito 4 (Figura 1 (d))	<i>Phomopsis</i> sp.	Anverso y reverso color blanco con anillos apetalados. Superficie opaca, lanosa y forma irregular.	Micelio septado y hialino. Conidios unicelulares, fusiformes y gutulados.
Endófito 5 (Figura 1 (e))	No identificado – Micelio estéril	Anverso y reverso color blanco con anillos apetalados. Superficie opaca, lanosa y forma regular.	Micelio aseptado, hialino y ramificado. Sin presencia de estructuras reproductivas.

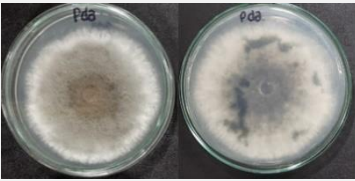

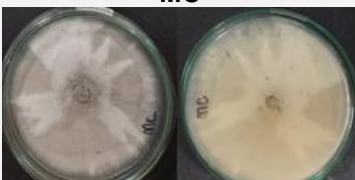
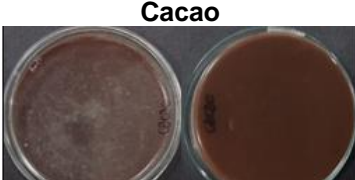
b. Tiempo de esporulación de los hongos endófitos en diferentes medios de cultivo

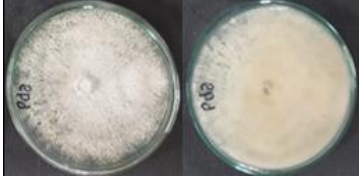


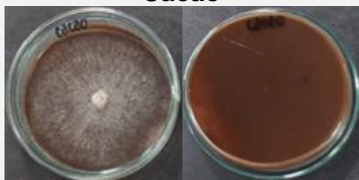
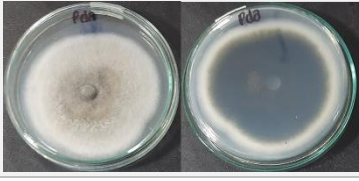
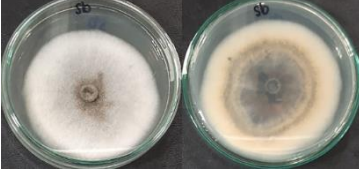
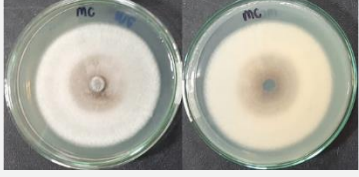
Los hongos endófitos 1, 2 y 3 produjeron estructuras reproductivas durante su crecimiento en medio PDA y SB después de 10, 12 y 8 días de incubación, respectivamente. Así mismo, el endófito 4 mostró desarrollo de conidios en medio

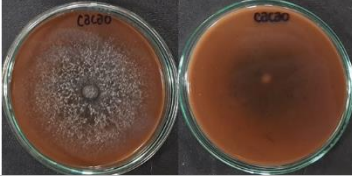
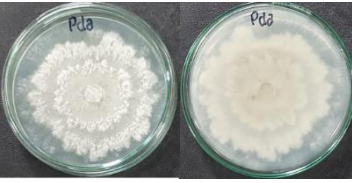

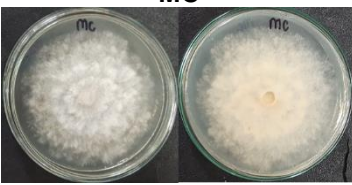


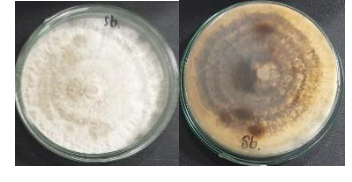
PDA, SB y MC a los 5 días de crecimiento.

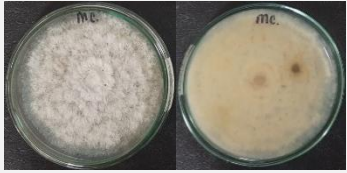
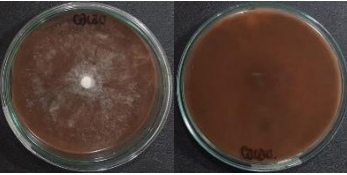
El endófito 5 no mostró formación de estructuras reproductivas en ninguno de los medios evaluados y en medio cacao ninguno de los hongos endófitos presentó producción de conidios.

Tabla 2. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos 1, 2, 3, 4 y 5 en diferentes medios de cultivo: PDA, SB, MC y Cacao. Foto a la derecha: reverso de la caja de Petri. Foto a la izquierda: anverso de la caja de Petri. Indefinido: El color del medio cacao no permite ver la coloración anversa del hongo.

Medio de cultivo	Características Macroscópicas	Características microscópicas
Hongo endófito 1		
<p style="text-align: center;">PDA</p> 	<p>Anverso con centro color café cambiando a gris oscuro y borde blanco. Reverso con centro color negro y borde blanco. Superficie algodonosa y forma regular.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Conidios unicelulares cilíndricos con extremos redondeados.</p>
<p style="text-align: center;">SB</p> 	<p>Anverso y reverso con centro gris, presencia de anillo gris. Superficie algodonosa y forma regular.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Conidios unicelulares cilíndricos con extremos redondeados.</p>
<p style="text-align: center;">MC</p> 	<p>Anverso y reverso color gris con zonas blancas. Forma regular.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>
<p style="text-align: center;">Cacao</p> 	<p>Anverso con centro y borde color blanco. Superficie lanosa con forma irregular y reverso indefinido.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>

Hongo endófito 2		
<p style="text-align: center;">PDA</p> 	<p>Anverso y reverso color blanco. Superficie lanosa, forma regular y presencia de acérvulos.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Conidios septados con cinco células, fusiformes, oscuros y ápices hialinos puntiagudos.</p>
<p style="text-align: center;">SB</p> 	<p>Anverso con centro color blanco. Superficie lanosa, forma irregular y presencia de acérvulos. Reverso con centro negro y zonas café claro.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Conidios septados con cinco células, fusiformes, oscuros y ápices hialinos puntiagudos.</p>
<p style="text-align: center;">MC</p> 	<p>Anverso y reverso color blanco. Superficie opaca, lanosa y forma irregular.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>
<p style="text-align: center;">Cacao</p> 	<p>Anverso con centro y borde color blanco. Superficie lanosa con forma irregular y reverso indefinido.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>
Hongo endófito 3		
<p style="text-align: center;">PDA</p> 	<p>Anverso con centro color café claro y borde blanco. Superficie algodonosa y forma regular. Reverso con centro color negro y borde blanco.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Conidios unicelulares cilíndricos con extremos redondeados.</p>
<p style="text-align: center;">SB</p> 	<p>Anverso con centro color café y borde blanco. Superficie algodonosa y forma regular. Reverso con centro color negro, borde blancuzco y anillo color café.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Conidios unicelulares cilíndricos con extremos redondeados.</p>
<p style="text-align: center;">MC</p> 	<p>Anverso y reverso con centro color café claro y borde blanco. Superficie algodonosa y forma regular.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>

<p style="text-align: center;">Cacao</p> 	<p>Anverso con centro y borde color blanco. Reverso indefinido. Superficie lanosa y forma regular.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>
Hongo endófito 4		
<p style="text-align: center;">PDA</p> 	<p>Anverso y reverso con centro y borde color blanco y anillos color beige. Superficie lanosa y forma irregular.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas. Conidios unicelulares, fusiformes y gutulados.</p>
<p style="text-align: center;">SB</p> 	<p>Anverso con centro y borde color blanco y anillos color beige. Superficie lanosa y forma irregular. Reverso con centro color negro y café con borde blanco.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas. Conidios unicelulares, fusiformes y gutulados.</p>
<p style="text-align: center;">MC</p> 	<p>Anverso y reverso con centro y borde color blanco. Superficie lanosa y forma irregular.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas. Conidios unicelulares, fusiformes y gutulados.</p>
<p style="text-align: center;">Cacao</p> 	<p>Anverso con centro y borde color blanco. Reverso indefinido. Superficie lanosa y forma irregular.</p>	<p>Hifas hialinas, septadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>
Hongo endófito 5		
<p style="text-align: center;">PDA</p> 	<p>Crecimiento apetalado. Anverso y reverso color blanco y beige con formación de anillos concéntricos y ondas lobuladas.</p>	<p>Hifas hialinas, aseptadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>
<p style="text-align: center;">SB</p> 	<p>Anverso color blanco. Superficie algodonosa y forma regular. Reverso color beige con anillos concéntricos color café oscuro.</p>	<p>Hifas hialinas, aseptadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>

<p style="text-align: center;">MC</p> 	<p>Anverso color blanco. Superficie algodonosa y forma rizoide. Reverso color beige.</p>	<p>Hifas hialinas, aseptadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>
<p style="text-align: center;">Cacao</p> 	<p>Anverso color blanco. Superficie algodonosa. Reverso indefinido.</p>	<p>Hifas hialinas, aseptadas y ramificadas. Ausencia de estructuras reproductivas.</p>

c. Área bajo la curva del crecimiento diametral de los hongos endófitos en diferentes medios de cultivo

Según el análisis estadístico del área bajo la curva, los hongos endófitos 1 y 3 no presentaron diferencias significativas en su crecimiento diametral al evaluarse en los cuatro medios de cultivo propuestos (Tabla 3). Por su parte, en el análisis de

los endófitos 2, 4 y 5, se encontró diferencias significativas en el área bajo la curva del desarrollo de cada hongo ($P < 0,05$). En general, el PDA fue el medio de cultivo en el que los cinco endófitos presentaron mayor crecimiento diametral durante el tiempo evaluado, mientras que el crecimiento de los endófitos 2, 4 y 5 en medio Cacao y MC fue el menor con respecto a los demás medios evaluados.

Tabla 3. Área bajo la curva del crecimiento diametral de los hongos endófitos en función de diferentes medios de cultivo: PDA, SB, MC y Cacao. Se realizó una prueba de comparaciones múltiples HSD donde una letra diferente indica diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Hongo endófito	Medio de cultivo	Área bajo la curva del crecimiento diametral (cm ²)
Endófito 1	PDA	387,00 ^a
	SB	347,10 ^a
	MC	367,86 ^a
	CACAO	372,80 ^a
Endófito 2	PDA	456,76 ^a
	SB	424,98 ^b
	MC	323,92 ^d
	CACAO	377,48 ^c
Endófito 3	PDA	338,92 ^a
	SB	273,56 ^a
	MC	329,64 ^a
	CACAO	286,04 ^a

Endófito 4	PDA	536,96 ^a
	SB	499,52 ^b
	MC	456,60 ^c
	CACAO	428,12 ^c
Endófito 5	PDA	459,24 ^a
	SB	442,80 ^a
	MC	399,96 ^b
	CACAO	351,76 ^c

DISCUSIÓN

En este estudio se purificaron 5 morfotipos fúngicos de tejido vegetal de mazorcas de cacao. Cuatro hongos fueron identificados de manera presuntiva correspondiendo a los géneros: *Colletotrichum* sp. (endófito 1 y 3), *Pestalotiopsis* sp. (endófito 4) y *Phomopsis* sp. (endófito 2) (Tabla 1).

El hongo endófito 5 no desarrolló estructuras reproductivas visibles al microscopio durante su crecimiento en los medios de cultivo empleados (Tabla 1 y 2), lo que no permitió su identificación morfológica. Esta situación es comúnmente encontrada en estudios enfocados en la búsqueda de hongos hospederos de *T. cacao*^{9,19,20,21}, por lo que muchos autores han denominado a este tipo de aislados como micelio estéril o morfoespecies²⁰. En estos casos donde no es posible emplear identificación morfológica tradicional, se recomiendan

técnicas moleculares que permitan conocer la riqueza taxonómica del grupo de hongos que no genera estructuras reproductivas²⁰. Sin embargo, los límites de este estudio se establecieron hasta la identificación morfológica presuntiva de los hongos esporulados, lo anterior por recursos en fresco. No obstante, se reconoce la necesidad de emplear pruebas moleculares para confirmar la identidad taxonómica de los hongos purificados en este estudio.

En 2012, Baralt *et al.*⁹ obtuvieron una abundancia de 55 morfotipos clasificados en 10 unidades taxonómicas a partir de frutos de cacao recolectados en la zona amazónica de Venezuela. Así mismo, en una investigación realizada en Indonesia se reportó el hallazgo de 25 aislados correspondientes a 7 taxones fúngicos¹³. Mientras que Amin *et.al.*¹⁹ purificaron 5 géneros fúngicos del fruto de cacao, dando cuenta de la abundancia y diversidad de géneros que puede habitar en esta matriz. El número de hongos

endófitos recuperados bajo las condiciones de esta investigación es considerablemente menor a lo reportado en los estudios previos sobre la micobiota en mazorcas de cacao. La variabilidad entre la cifra de hongos endófitos reportados en cada estudio depende de factores como las características de la plantación (genotipo, incidencia de fitopatógenos y localización geográfica)^{22,23}, condiciones de cultivo in-vitro e intensidad y método de muestreo²⁰. Señalando a los anteriores factores como determinantes en la diversidad de la micobiota desarrollada al interior del fruto y la tasa de recuperación de estos a nivel de laboratorio²¹.

Los tres géneros de hongos endófitos identificados presuntamente en esta investigación pertenecen a la división Ascomycota y han sido reportados previamente como endófitos en diferentes zonas de la planta de cacao^{9,22,24,25}. Entre estos, el género *Pestalotiopsis* se caracteriza por tener un gran número de ejemplares anamorfos, donde se han reportado solamente 13 morfotipos sexuales en zonas tropicales y templadas²⁵. Este género ha sido mencionado en estudios previos como hongo endófito del fruto⁹, tallo²¹ y ramas¹⁰ de la planta de cacao.

Aunque en esta investigación se obtuvo únicamente una morfología correspondiente al género *Pestalotiopsis* sp., en la literatura se destaca como uno de los taxones fúngicos más prevalentes con porcentajes de recuperación entre el 8%-10% en tejido vegetal del cacao^{9,21}.

En diferentes reportes se han mencionado algunas funciones ecosistémicas del género *Pestalotiopsis* en la planta de cacao. En la investigación realizada por Hanada *et al.*²¹ se demuestra la función biocontroladora de especies del género *Pestalotiopsis* sobre fitopatógenos del cacao como *Phytophthora palmivora*, reduciendo los síntomas y lesiones ocasionados en la mazorca. Otros autores describen a este género como un colonizador neutral de *Theobroma cacao* que no aporta beneficios a la planta²⁶ o como patógeno, siendo el caso de *P. güepinii*, causante de antracnosis en tallo, hojas y frutos maduros de cacao²⁷.

Lo anterior es posible gracias a la amplia variabilidad genética dentro del grupo taxonómico *Pestalotiopsis* spp.²⁸, haciendo necesario la identificación del hongo endófito 2 a nivel de especie para

relacionar su posible rol biológico en la planta de cacao.

En este estudio, se obtuvieron dos morfotipos fúngicos pertenecientes al género *Colletotrichum*, aislado y caracterizado como hospedador en hojas y frutos en *T. cacao*^{9,24}. Este grupo taxonómico es ampliamente reportado como fitopatógeno en plantas de cacao²⁹ y otras especies vegetales causando antracnosis³⁰. Así mismo, en la literatura se menciona que especies como *C. theobromicola* pueden encontrarse como saprobios inactivos o patógenos latentes del cacao²⁹, haciendo posible su aislamiento en esta etapa desde mazorcas de cacao sin signos de enfermedad.

A pesar del reconocimiento del género *Colletotrichum* spp. como patógeno, algunas especies se han descrito como microorganismos benéficos. Este es el caso de *C. tropicale*, cuya inoculación suprimió la infección del patógeno *Phytophthora palmivora* en mazorcas de cacao³¹. Otros reportes incluyen la generación de biomasa vegetal, gracias a que la relación simbiótica del endófito provoca cambios en el metabolismo de la

planta que potencializa el aumento en la absorción de nutrientes³².

El endófito 4 pertenece al género *Phomopsis*, este grupo taxonómico se caracteriza por presentar conidios de dos tipos: alfa (α) y beta (β), que se diferencian en tamaño y forma¹⁰. En el morfotipo identificado solo se observaron α -conidios durante su caracterización microscópica en los medios de cultivo evaluados. Según la investigación realizada por Kanematsu *et al.*³², algunas especies de este género solo producen β -conidios a temperatura de 35°C¹⁰. Debido a que esta no fue la condición de incubación empleada en este estudio, puede ser una explicación para la ausencia de β -conidios en el endófito 4.

Al igual que los aislados anteriores, *Phomopsis* spp. y su teleomorfo *Diaporthe* spp. han sido descritos como endófitos de plantas de cacao^{5,15}. Baralt *et al.*⁹ describió la presencia de *Phomopsis* sp. como simbionte en la mazorca del cacao, así como otros autores reconocen a este género fúngico como uno de los más abundantes en hojas y ramas de esta especie vegetal³³. Además de *T. cacao*, las especies de este grupo taxonómico han sido reportadas como

microorganismos endófitos en plantas de banano²¹, guayabo blanco³⁵ y mango³⁶.

Debido a la variedad de funciones ecosistémicas reportadas para los géneros fúngicos aislados en este estudio, es importante aclarar el rol de estos morfotipos para entender la dinámica de los microorganismos presentes en la mazorca de cacao. Esto se puede realizar mediante una identificación taxonómica a nivel de especie y estudios de interacción entre la planta y los hongos endófitos en cuestión²¹.

Las especies de los géneros que se aislaron como endófitos del fruto de cacao han resaltado por ser una fuente rica de metabolitos novedosos para la bioprospección, debido a que se ha reportado la síntesis de aproximadamente 160 compuestos con aplicación industrial, agrícola y farmacéutica²⁶. Un ejemplo de estos es el taxol, sintetizado por *Pestalotiopsis microspora*, el cual es ampliamente usado en la industria farmacéutica en tratamientos anticancerígenos³⁷. La nectriapirona es un metabolito secundario producido por *Phomopsis* spp. que se ha empleado en el sector médico como antiinflamatorio y

antimicrobiano²⁶. Lo anterior es un vistazo de la variedad y versatilidad de los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos de especies vegetales y permite pensar en la posibilidad de aprovechar estos géneros fúngicos para la obtención de compuestos bioactivos novedosos.

Conforme a la caracterización de los aislamientos, en este estudio se utilizó el área bajo la curva para comparar el crecimiento de los hongos endófitos en los diferentes medios de cultivo. Este parámetro ha sido empleado por los autores Carbajo *et al.*³⁸ y Trejos³⁹ como una forma de acondicionar la variable de crecimiento micelial en el tiempo para su comparación entre tratamientos, así como se realiza en esta investigación.

De forma general, los 5 hongos endófitos aislados presentaron mayor crecimiento en medio PDA durante el tiempo evaluado, mostrando los mayores valores de área bajo la curva comparado con los demás tratamientos (Tabla 3). Estos resultados se soportan en que el PDA provee los nutrientes necesarios para el desarrollo micelial, proporcionando dextrosa como principal fuente de carbono, lignina y otros minerales

aprovechables por diversos géneros fúngicos⁴⁰. Estos resultados son consistentes con los hallados por Suarez *et al.*⁴¹ y Patil *et al.*⁴², donde *Colletotrichum* spp. y *Phomopsis* spp. mostraron mayor crecimiento en PDA comparado con otros medios de cultivo.

Con el medio cacao se buscaba mantener condiciones nutricionales similares a la matriz de procedencia de los hongos endófitos, esperando obtener un mayor crecimiento micelial. Sin embargo, este medio fue el menos apto para el desarrollo de la mayoría de los hongos aislados, ya que se evidenció menor crecimiento con respecto a los demás medios de cultivo (Tabla 3). Dado que este medio no es convencional, las investigaciones de hongos en medio cacao son escasas, por lo que se señala la falta de fundamentos teóricos y experimentales que expliquen los resultados obtenidos en este medio.

En la evaluación del tiempo de esporulación de los aislados en los diferentes medios de cultivo, ninguno de los hongos formó estructuras reproductivas en medio cacao. Uno de los factores que determina la producción de conidios en hongos filamentosos es la limitación nutricional⁴³, donde la falta de

acceso a nutrientes reduce el crecimiento y estimula la conidiación⁴⁴. El medio cacao contiene los sustratos comúnmente asimilados por los hongos durante su ciclo de vida como simbiontes de la mazorca de cacao. Por lo tanto, este medio de cultivo no expone a los endófitos a restricciones nutricionales que propicien la producción de estructuras reproductivas, siendo una posible explicación para la ausencia de conidios en los aislados evaluados. Es probable que cuando los hongos terminen su fase de crecimiento micelial cambien las condiciones nutricionales del medio e inicie la etapa de esporulación⁴⁵, sin embargo, esto no se evidenció en el desarrollo de este ensayo.

CONCLUSIONES

En este estudio se determinó que los morfotipos aislados de frutos de cacao pertenecen a los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* y *Phomopsis*. De estos, los dos primeros se encontraron en el municipio de Maceo y el último en San Pedro de Urabá, por lo tanto, los grupos taxonómicos identificados no coincidieron entre los municipios antioqueños muestreados. No obstante, estas determinaciones requieren la confirmación taxonómica mediante estudios moleculares, principalmente

para el endófito 5 puesto que durante su crecimiento *in vitro* no produjo estructuras reproductivas para ser identificado mediante claves taxonómicas.

Los hongos endófitos aislados presentaron características macro y microscópicas diferentes de acuerdo con el medio de cultivo en el que se desarrollaron, resaltando cambios en la superficie, color y formación de estructuras reproductivas. Por otra parte, el medio cacao, cuyas condiciones nutricionales fueron similares a la matriz de origen de los hongos endófitos, no fue apto para el desarrollo micelial de la mayoría de los aislados. Mientras que el medio PDA destacó por ser el mejor para el crecimiento vegetativo de los hongos endófitos, siendo una opción para la recuperación y mantenimiento de estos aislados fúngicos en condiciones *in-vitro*.

Debido al alcance planteado en este estudio no se puede asegurar que los hongos aislados e identificados representan la diversidad en las mazorcas de cacao de los municipios de Maceo y San Pedro de Urabá. Sin embargo, los resultados de esta investigación constituyen una base para estudios posteriores en los que se tenga como interés el crecimiento y aprovechamiento de estos géneros fúngicos.

BIBLIOGRAFÍAS

1. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Cadena de cacao. Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales [Internet]. [Consultado 16 Ago 2021]. Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2021-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
2. Federación Nacional de Cacao - Fedecacao. Producción de cacao en grano [Internet]. [Consultado 12 Jul 2021]. Disponible en: <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/nacionales/23-institucionales/1320-datos-abiertos>.
3. Fonseca P. Oportunidades comerciales para el sector colombiano del cacao y sus derivados en el marco de la Alianza del Pacífico. [Tesis de pregrado]. Bogotá D.C.: Universitaria Agustiniiana; 2018.
4. Hawksworth D, Lucking R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum Journal*. 2017; 5(4).
5. Chaithra M, Vanitha S, Ramanathan A, Jegadeeshwari V, Rajesh V, Hegde V, Apshara E. Morphological and Molecular Characterization of Endophytic Fungi Associated with Cocoa (*Theobroma cacao* L.) in India. *Current Journal of Applied Science and Technology*. 2020; 38(6): 1-8.
6. Chocho V. Antagonismo in vitro de hongos endófitos foliares de cacao frente a *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri*. [Tesis de pregrado]. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica

del Litoral, 2016.

7. Song J, Pongnak W, Soyong K. Isolation and identification of endophytic fungi from 10 species palm trees. *Journal of Agricultural Technology*. 2016; 12(2): 349-363.

8. Barraras I. Utilização de fungos endofíticos para a produção de produtos com interesse farmacêutico. [Tesis de maestría]. Almada: Instituto Superior de Ciências Da Saúde Egas Moniz, 2016.

9. Baralt A, Fernández R, Sosa D, Iztúriz M, Parra D, Pérez S. Identificación preliminar de hongos endófitos cultivables presentes en hojas y frutos de cacao. I Congreso Venezolano de Ciencia, tecnología e Innovación. Caracas: Micobiota del cacao; 2012.

10. Delgado J, Junior B, Molina C, Chaves G, Antonello P. The Role of Fungi in the Cocoa Production Chain and the Challenge of Climate Change. *Journal of Fungi*. 2021; 7(3).

11. Abello J, Kelemu S. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2006; 7(55): 55-57.

12. Suárez L, Rangel A. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Monilophthora roreri*. *Acta Agronomica*. 2013; 62(4): 370-378.

13. Simamora A, Hahuly M, Henuk J. Endophytic fungi as potential biocontrol agents of *Phytophthora palmivora* in the cocoa plant. *Biodiversitas*. 2021; 22(5): 2601-2609.

14. Rubini M, Silva R, Pomella A, Maki C, Araújo W, Santos D, Azevedo J. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal Biological Sciences*. 2005; 1(1): 24-33.

15. Domínguez D, Vázquez H, Reyes B, Arzaluz J, Martínez A. Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrizico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2013; 16(1): 51-59.

16. Departamento administrativo de planeación. Temperatura promedio anual, en los Municipios de Antioquia. [Internet]. [Consultado 21 Ago 2021]. Disponible en: <http://www.antioquiadatos.gov.co/index.php/2-2-5-temperatura-promedio-anual-en-los-municipios-de-antioquia-ano-2016>

17. Hernández S, Reyes M, García J, Mayek N, Reyes C. Incidencia de hongos potencialmente tóxicos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista mexicana de fitopatología*. 2007; 25(2): 127-133.

18. Alexopoulos C, Mims C. *Introductory Mycology*. 3th ed. New York: Jhon Wiley & Sons: 1979.

19. Amin N, Daha L, Agus N. The study on the role of entomopathogenic fungal endophytes in controlling the cocoa pod borer (*Conopomorpha cramerella* (Snellen)) (Lepidoptera: *Gracillariidae*) on cocoa plant. *Journal of Entomology*. 2014; 11(3): 142-152.

20. Crozier J, Thomas S, Aime M, Evans H, Holmes K. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Journal of Plant Pathology*. 2006; 55(6): 783-791.
21. Hanada R, Pomella A, Costa H, Bezerra J, Loguercio L, Pereira J. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology*. 2010; 114(12): 90-110.
22. Asman A, Rosmana A, Ariska A. Diversity of fungal community associated with cacao (*Theobroma cacao* L.) top clones from Sulawesi, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020; 486(1).
23. Chi Chi L. Diversidad de hongos endófitos asociados a una variedad comercial de *Carica papaya* L. en la península de Yucatan. [Tesis de maestría]. Mérida: Centro de investigación científica de Yucatán, 2020.
24. Villavicencio M. Identificación y evaluación de hongos endófitos de *Theobroma cacao* L. como candidatos a agentes de control biológico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) del cacao. [Tesis de maestría]. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2018.
25. Rodríguez G. Caracterización morfológica de hongos endófitos asociados a cacao nativo y su capacidad antagónica para el control de *Moniliophthora perniciosa*. [Tesis de pregrado]. Tarapoto: Universidad Nacional de San Martín, 2011.
26. Udayanga D, Liu X, McKenzie C, Chukeatirote E, Bahkali A, Hyde K. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*. 2011; 50: 189-225.
27. Christian N, Allen E, Clay K. Foliar endophytic fungi alter patterns of nitrogen uptake and distribution in *Theobroma cacao*. *New phytologist*. 2019; 222(1): 1573-1583.
28. Pillman R. Prospección de enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en tres comunidades de Pichari-Cusco. [Tesis de pregrado]. Cusco: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2013.
29. Solarte A. Caracterización morfológica, molecular y patogénica de *Pestalotiopsis* sp. agente causante de la enfermedad del clavo en la guayaba (*Psidium guajava*) y evaluación *in-vitro* de biofungicidas. [Tesis de maestría]. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, 2014.
30. Rojas E, Rehner S, Samuels G, Van S, Herre E, Cannon P. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*. 2010; 102(6): 1318-1338.
31. Landero N, Lara F, Andrade P, Aguilar

- L, Aguado G. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2016; 7(5): 1189-1198.
32. Arnold A, Mejía L, Kylo D, Maynard Z, Robbins N, Allen E. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003; 100(26): 15649-15654.
33. Kanematsu S, Kobayashi T, Kudo A, Ohtsu Y. Conidial morphology, pathogenicity and culture characteristics of *Phomopsis* isolates from peach, japanese pear and apple in Japan. Phytopathological Society of Japan. 1999; 65: 264-273.
34. Mejia L, Rojas E, Maynard Z, Van S, Arnold E, Hebban P, Samuels G, Robbins N, Allen E. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. Biological control. 2008; 46(1): 4-14.
35. Luberiaga R. Hongos endófitos asociados a estructuras reproductivas del Guayabo Blanco (*Eugenia uruguayensis*); producción de enzimas y metabolitos bioactivos. [Tesis de pregrado]. Universidad de la república Uruguay, 2012.
36. Morales V, Rodríguez M. Hongos endófitos en plantaciones de mango 'Haden' de la planicie de Maracaibo, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía. 2006; 23(3).
37. Sánchez R, Sánchez B, Monserrat Y, Ulloa A. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2013 16(2): 132-146.
38. Carbajo M, Fermoselle O, Meneguzzi N, Canteros B, Rodríguez G. Comportamiento de hongos en medios con vinaza de caña de azúcar. II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo. San Juan: INTA ediciones; 2019.
39. Trejos E. Evaluación de parámetros para pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos mediante la técnica de difusión en agar. [Tesis de maestría]. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana, 2009.
40. Suárez A, Holguín H. Evaluación de medios de cultivo sintéticos y cereales para la producción de semilla de setas comestibles. Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas. 2012; 5(1): 130–140.
41. Patil D, Baikar A, Raut R. Performance of different growth media for the growth and sporulation of *Phomopsis* sp. of cashew. Plant Archives. 2016; 16(1): 275-278.
42. Santos M, Sánchez G, Guzmán S, Farías J. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* simmonds, agente causal de la antracnosis del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* christm. swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología. 2004; 22(3): 423-428.
43. Su Y., Lin Y., Cai L. Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. Mycology. 2012; 3(3): 195-200.

44. Dahlberg K., Van J. Physiology and biochemistry of fungal sporulation. *Annual Review of Phytopathology*. 1982; 20: 281-301.

45. Gao L., Liu X., Sun M., Li D., Wang J. Use of a novel two-stage cultivation method to determine the effects of environmental factors on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycoscience*. 2009; 50: 317-321.