



Vigilada Mineducación

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE *MONILIOPHTHORA RORERI* A  
FUNGICIDAS QUÍMICOS: EFICACIA Y POTENCIAL DE GENERAR  
RESISTENCIA**

**Characterization of the response of *Moniliophthora roreri* to chemical fungicides:  
efficacy and potential for resistance generation.**

**Daniela Serna Muriel.**

**Proyecto de Grado para optar al título de Biólogo de la Universidad EAFIT.**

**Asesor: Sandra Mosquera López.**

**Universidad EAFIT**

**Escuela de Ciencias**

**Biología.**

## Caracterización de la respuesta de *Moniliophthora roreri* a fungicidas químicos: eficacia y potencial de generar resistencia

Daniela Serna Muriel <sup>a\*</sup>, Javier Correa Álvarez <sup>b</sup>, Sandra Mosquera López <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Pregrado de Biología, Escuela de Ciencias Aplicadas e Ingeniería, Universidad EAFIT, Medellín, Antioquia.

<sup>b</sup> Grupo de Investigación CIBIOP, Área de Sistemas Naturales y Sostenibilidad, Escuela de Ciencias Aplicadas e Ingeniería, Universidad EAFIT, Medellín, Antioquia.

[\\*dsernam1@eafit.edu.co](mailto:dsernam1@eafit.edu.co)

### Resumen

La moniliasis, causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, es una de las enfermedades más limitantes para la producción de los cultivos de cacao en Latinoamérica. La estrategia más empleada en Colombia para el manejo de esta enfermedad es el control cultural, sin embargo, sería más eficaz al ser complementada con el control químico. Aún se desconoce las implicaciones del empleo del control químico para este patógeno. Por consiguiente, para avanzar en un control eficaz de esta enfermedad, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia de diferentes fungicidas sobre cepas de *M. roreri* pertenecientes a diferentes poblaciones del hongo y el riesgo de que el hongo desarrolle resistencia a estos fungicidas. Nuestros resultados mostraron que la susceptibilidad de *M. roreri* varía dependiendo del fungicida aplicado y de la región de origen de la cepa. Los resultados también mostraron que, a pesar de la variabilidad encontrada entre los fungicidas evaluados, Amistar Top® y Melyra®, fueron los más eficaces en disminuir el crecimiento micelial de *M. roreri* *in vitro*, con dosis letales medias de 0.05 ppm y 0.26 ppm en cultivo sumergido, respectivamente. Finalmente se demostró que *M. roreri* genera resistencia a fungicidas como Amistar Top® en un periodo corto, cuando está sometido a una presión constante de selección del fungicida.

### Palabras claves

Moniliasis, *Theobroma cacao*, control químico, sensibilidad a fungicidas, inhibidores SDHI.

### 1. Introducción

El cacao es un cultivo tropical, originario del Amazonas, el cual, se cultiva en África, Asia y Latinoamérica y es de importancia para la industria chocolatera pues sus semillas son la materia prima para la producción del chocolate (De Souza *et al.*, 2018). Entre los retos que tienen que enfrentar los productores de cacao está el control fitosanitario pues este cultivo es atacado por diversas enfermedades, incluyendo la moniliasis la cual es de particular importancia para los países productores de Latinoamérica (Aime & Phillips-Mora, 2005; Mejía *et al.*, 2008). Esta enfermedad es causada por *Moniliophthora roreri*, un hongo basidiomiceto que ataca plantas pertenecientes la familia Marasmiaceae y principalmente, a especies de los géneros *Herrania* y *Theobroma* (Jaimes *et al.*, 2016).

Durante el desarrollo de la enfermedad, *M. royeri* ataca los frutos del cacao en cualquier etapa de su desarrollo, generando daños internos y externos lo que puede llevar a una pérdida total de la producción del cultivo (Correa Álvarez *et al.*, 2014). En las etapas tempranas de la enfermedad, los síntomas se manifiestan como protuberancias, puntos subepidérmicos aceitosos de color marrón o manchas cloróticas. Estas manchas progresan y son colonizadas por el micelio y las esporas del hongo, siendo estas el síntoma más característico de la enfermedad (Jiménez *et al.*, 2022; Cubillos, 2017; Bailey *et al.*, 2018).

*M. royeri* no es una especie genéticamente homogénea, esta cuenta con una alta variabilidad genética lo que se deriva en diferentes poblaciones del hongo. Estas poblaciones se han distribuido por diferentes países y regiones de América dando origen a por lo menos cinco grupos genéticos, los cuales han sido validados por diferentes métodos, entre ellos el uso de marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), SSR (Simple Sequence Repeat), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) y la secuenciación de lectura larga (Phillips-Mora *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2015; Jaimes *et al.*, 2016; Minio *et al.*, 2023). Entre estos grupos, los grupos Bolívar y Co-Oeste son los de mayor distribución con presencia en múltiples países incluyendo Colombia, Perú, Venezuela, Ecuador y América Central. Los tres grupos restantes son más limitados y comprenden las regiones de Colombia y el noroeste de Ecuador (Ali *et al.*, 2015). Sin embargo, un trabajo más reciente en el que se evaluaba la diversidad genética de las poblaciones colombianas del hongo sugiere que la diversidad de *M. royeri* puede ser aún mayor. En este trabajo se encontraron siete grupos genéticos distribuidos por las diferentes zonas cacaoteras de este país (Quiroga-Pérez, 2021). La variación genética de *M. royeri* es de importancia pues podría ser responsable de la fácil adaptación del hongo a ambientes cambiantes (Jaimes *et al.*, 2016). Sin embargo, no existe información en nuestro conocimiento que asocie esta variación con diferentes fenotipos del hongo. No sabemos si algunas de estas poblaciones son más virulentas que otras o si están mejor adaptadas a ciertos agroecosistemas. Por otro lado, tampoco sabemos si estas poblaciones responden de manera diferencial a los fungicidas empleados para su control (Jaimes *et al.*, 2016).

Aunque el control de la moniliasis depende en gran medida del control cultural (Suárez-Contreras, 2017; Philips-Mora *et al.*, 2007), es decir de la eliminación semanal de frutos enfermos y de otras actividades agronómicas, este no es del todo eficiente. Por esta razón, algunas plantaciones más tecnificadas usan el control químico como complemento al control cultural. En este tipo de control, los agricultores emplean fungicidas protectantes y sistémicos los cuales se aplican de manera conjunta como mezcla de tanque y en programas de rotación de fungicidas (Jiménez *et al.*, 2022; Torres-de-la-Cruz *et al.*, 2019). Entre los fungicidas protectantes, el Propiconazol, el Clorotalonil y el Óxido cuproso son comunes y se emplean principalmente para evitar el establecimiento de nuevas infecciones en mazorcas jóvenes debido a su naturaleza protectora (Franco, 2016; Correa Álvarez *et al.*, 2014; Torres-de-la-Cruz *et al.*, 2019; Anzules *et al.*, 2019). Por otro lado, los fungicidas sistémicos más empleados son Azoxistrobina, Tebuconazol, Propiconazol, Tiabendazol, Trifloxistrobina y Pyrimethanil. Estos fungicidas varían en sus mecanismos de acción (Torres-de-la-Cruz *et al.*, 2019). Por ejemplo, la Trifloxistrobina y Azoxistrobina son

estrobirulinas que inhiben la respiración celular al bloquear las enzimas ubiquinol oxidasas que interactúan con el complejo III. El Propiconazol y Tebuconazol son triazoles que inhiben la biosíntesis del esteroles en la membrana celular de los hongos. Por su lado, el Tiabendazol es un benzimidazol que bloquea las proteínas motoras y la formación del citoesqueleto y el Pirimetanil bloquea la síntesis proteica y de aminoácidos, específicamente la biosíntesis de metionina (FRAC Classification of Fungicides, 2022).

Aunque algunos trabajos han evaluado el efecto de fungicidas protectantes y sistémicos sobre *M. royeri* con resultados promisorios *in vitro* e *in vivo* (Torres-de-la-Cruz *et al.*, 2019; Anzules *et al.*, 2019; Suárez & Hernández, 2010; Krauss *et al.*, 2010; Leandro-Muñoz *et al.*, 2017), aún no hay estudios que evalúen como los diferentes fungicidas afectan las diversas poblaciones de *M. royeri*. Es posible que diferentes poblaciones de *M. royeri* presenten susceptibilidades diferentes a estos fungicidas debido a su variabilidad genética y a los diferentes modos de acción de los fungicidas. También se ignora si existe la posibilidad de que el hongo desarrolle resistencia a alguna de estas moléculas pues tampoco ha sido evaluada. La aparición de resistencia a diferentes fungicidas es común entre los hongos y puede derivarse de múltiples mecanismos, incluyendo la desintoxicación del hongo mediante enzimas que metabolizan el fungicida, la alteración de la proteína diana, la sobreexpresión de la proteína diana y la presencia de bombas de salida que eliminan el fungicida de la célula (Sánchez-Torres, 2021; Massi *et al.*, 2021). Por ejemplo, la resistencia a las estrobilurina es causada por mutaciones en el citocromo b mitocondrial del hongo las cuales modifican el sitio Qo del complejo enzimático del citocromo bc1 en donde actúa el fungicida (Sánchez-Torres, 2021; Hahn, 2014). A pesar de que aún no se cuenta con reportes científicos, es posible que *M. royeri* pueda desarrollar resistencia a estos fungicidas por mecanismos similares tras el uso continuo de estas moléculas en las plantaciones de cacao.

Lo anterior evidencia que aún hay mucho desconocimiento relacionado al control químico de *M. royeri*. Por este motivo, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la eficacia de diferentes fungicidas sobre cepas de *M. royeri* pertenecientes a diferentes poblaciones colombianas del hongo. Con los resultados de estas evaluaciones se seleccionará el fungicida más eficaz y se determinará cual es la probabilidad de que el hongo desarrolle resistencia a este fungicida empleando una metodología de evolución experimental.

## **2. Materiales y métodos**

### *2.1. Obtención y cultivo de las cepas representativas de las poblaciones de Moniliophthora royeri*

Para estas evaluaciones, se emplearon 20 cepas de *M. royeri* provenientes del cepario de la Universidad EAFIT. Estas cepas fueron aisladas de diferentes regiones cacaoteras de Colombia y pertenecen a diferentes grupos genéticos del hongo según lo definido por Quiroga- Pérez (2021) (Tabla 1). El cultivo de las cepas se hizo en placas de agar extracto de malta (MEA, por sus siglas en inglés) que contenía 30 g/l de extracto de malta (OXOID, Estados Unidos), 3 g/l de triptona (OXOID, Estados Unidos) y 15 g/l de agar las cuales fueron incubadas a 30 °C por 15 días y empleadas para las evaluaciones de susceptibilidad.

**Tabla 1.** Código, lugar de aislamiento y grupo genético de las cepas de *Moniliophthora roreri* empleadas en este estudio (Quiroga-Pérez, 2021).

<b>Código</b>	<b>Lugar de aislamiento</b>	<b>Grupo genético</b>
MR024	Barrancabermeja, Santander	7
MR027	Barrancabermeja, Santander	7
MR037	Barrancabermeja, Santander	6
MR028	San José del Nus, Antioquia	7
MR029	San José del Nus, Antioquia	7
MR030	San José del Nus, Antioquia	1
MR034	San José del Nus, Antioquia	2
MR045	Yopal, Casanare	7
MR048	Yopal, Casanare	7
MR049	Yopal, Casanare	7
MR050	Yopal, Casanare	2
MR057	Palestina, Caldas	2
MR063	Palestina, Caldas	2
MR066	Palestina, Caldas	2
MR067	Palestina, Caldas	ND*
MR068	Palestina, Caldas	2

<b>Código</b>	<b>Lugar de aislamiento</b>	<b>Grupo genético</b>
MR081	Neira, Caldas	2
MR082	Neira, Caldas	2
MR083	Neira, Caldas	2
MR084	Neira, Caldas	2

\*No definido

## 2.2 Evaluación de la susceptibilidad de cepas de *Moniliophthora roreri* a los fungicidas químicos

La Tabla 2 muestra los fungicidas que se emplearon para las evaluaciones de susceptibilidad. Estos fungicidas comprenden diferentes mecanismos de acción y fueron elegidos por ser empleados en las plantaciones de cacao para el control de *M. roreri* o por haber sido evaluados por otros estudios contra *M. roreri* o su especie cercana *Moniliophthora perniciosa* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Nombre comercial, ingrediente activo, concentración y mecanismo de acción de los fungicidas químicos empleados.

<b>Nombre comercial</b>	<b>Ingredientes activos y concentración</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Referencia</b>
Luna Tranquility®	Fluopyram 125 g/L	Inhibe: Respiración (complejo II: succinato-deshidrogenasa)	Universidade Estadual de Campinas, 2021
	Pyrimethanil 375 g/L	Inhibe: Síntesis de aminoácidos y proteínas	
Verango®	Fluopyram 500 g/L	Inhibe: Respiración (complejo II: succinato-deshidrogenasa)	Universidade Estadual de Campinas, 2021
Amistar Top®	Azoxistrobina 200 g/L	Inhibe: Respiración (complejo III citocromo bc1 (ubiquinol oxidasa) en el sitio Qo (gen cyt b))	Torres de la Cruz <i>et al.</i> , 2019; Figueroa-Saavedra <i>et al.</i> , 2023
	Difenoconazole 125 g/L	Inhibe: Biosíntesis de esteroides en membranas, fungicidas inhibidores de la	

Nombre comercial	Ingredientes activos y concentración	Mecanismo de acción	Referencia
		desmetilación	
Melyra®	Mefentrifluconazole 200 g/L  Pyraclostrobin 200 g/L	Inhibe: Biosíntesis de esteroides en membranas, fungicidas inhibidores de la desmetilación  Inhibe: Respiración (complejo III citocromo bc1 (ubiquinol oxidasa) en el sitio Qo (gen cyt b))	Anzules <i>et al.</i> , 2019
Cantus®	Boscalid 500 g/ha	Inhibe: Respiración (complejo II: succinato-deshidrogenasa)	(Figuroa-Saavedra <i>et al.</i> , 2023)

Para las evaluaciones de susceptibilidad, el centro de placas de MEA fueron inoculadas con el hongo empleando bocados de micelio de cinco mm provenientes de cultivos de 15 días de las cepas de *M. roreri* en MEA. Posteriormente seis discos ( $\varnothing$ : ~ 2.5 mm) de papel filtro de 12  $\mu$ m (Sartorius, Quantitative Grade 389) se añadieron de forma equidistante a 2 cm del bocado del hongo. Cinco de los seis discos fueron inoculados con 4  $\mu$ l de una suspensión de 100 ppm de los diferentes fungicidas (Tabla 2) y el restante con 4  $\mu$ l de agua destilada estéril el cual se empleó como control (Figura suplementaria 1) (Goettel *et al.*, 1992).

Las placas con los tratamientos fueron incubadas a 30 °C por 14 días, tiempo en el cual se determinó la susceptibilidad de la cepa a los fungicidas empleando la aparición de halos de inhibición de crecimiento micelial como indicativo de susceptibilidad (Figura suplementaria 1). Se consideraron altamente susceptibles aquellas cepas cuyo crecimiento no se extendió hacia el papel filtro con el fungicida. Es decir, las cepas que mostraron halo de inhibición notable en comparación con el crecimiento en el papel filtro del control agua. Las cepas que crecieron cerca del papel filtro con el fungicida, pero no lograron extender su crecimiento sobre este papel se catalogaron como medianamente susceptibles. Por último, se determinaron como no susceptibles las cepas que demostraron la capacidad de crecer sobre el papel filtro con los fungicidas. Cada cepa se evaluó en dos pruebas independientes cada una empleando tres replicas biológicas por cepa, es decir tres cajas de MEA con los tratamientos de fungicidas y el control agua para evaluar la reproducibilidad de los resultados.

### 2.3 Determinación de la dosis letal media de los fungicidas químicos más eficaces sobre cepas de *Moniliophthora roreri*

La dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de los fungicidas Amistar Top®, Melyra® y Cantus®, seleccionados a partir de los ensayos de susceptibilidad (Numeral 2.2) por ser los más eficaces, se determinó empleando la metodología modificada de Goettel et al. (1992). Específicamente, esporas provenientes de cultivos de 15 días en MEA de las cepas de *M. royeri* MR037 o *M. royeri* MR083, las cepas más y menos susceptibles a los fungicidas según los ensayos de susceptibilidad (Numeral 2.2), fueron suspendidas en Tween 80 al 0.05 % (V/V) (Merck, Alemania) a una concentración de  $8 \times 10^5$  esporas por ml. Posteriormente, 10  $\mu$ l de esta suspensión ( $4 \times 10^6$  esporas) fueron inoculados en pozos de placas de Elisa estériles de 96 pozos con 140  $\mu$ l del medio de cultivo caldo Sabouraud dextrosa (CSD), que contenía 20 g/l de dextrosa (Merck, Alemania) y 9 g/l de peptona especial (OXOID, Estados Unidos) y los fungicidas a diferentes concentraciones. Específicamente, las concentraciones empleadas fueron 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 y 1 ppm para Amistar Top®; 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5 y 5 ppm para Melyra®; y 0, 0.1, 1, 5, 10 y 20 ppm Cantus®.

Las placas de Elisa fueron incubadas por 10 días a 30 °C, al final de los cuales se midió la absorbancia de los cultivos a una longitud de onda de 655 nm con ayuda de un BIO-RAD iMark™ Microplate Reader, empleando pozos no inoculados con el hongo con CSD y las diferentes concentraciones de los fungicidas, como blancos. Las absorbancias de los cultivos se ajustaron a modelos lineales en función de las concentraciones de los fungicidas y los modelos obtenidos fueron empleados para el cálculo de la  $DL_{50}$  según la ecuación 1, en donde  $b$  corresponde a la absorbancia obtenida en los cultivos sin fungicida (0 ppm) y  $m$  a la pendiente de la línea descrita por el modelo lineal.

$$DL_{50} = \frac{(1/2)b - b}{m} \text{ Ecuación 1}$$

Estas evaluaciones se hicieron en tres tiempos independientes cada uno empleando seis replicas por tratamiento, es decir seis pozos para cada cepa sometida a cada concentración de fungicida.

#### 2.4. Evaluación del riesgo de desarrollo de resistencia a fungicidas en *Moniliophthora royeri*

La evaluación del riesgo de desarrollo de resistencia a fungicidas en *M. royeri* se hizo empleando un ensayo de evolución experimental con el fungicida Amistar Top® y la cepa MR037, seleccionados por ser la combinación de fungicida y cepa con menor  $DL_{50}$ , es decir el fungicida más eficaz sobre la cepa más susceptible (Catrileo et al., 2020). Para esto, cinco placas de MEA con 0.1 ppm de Amistar Top® fueron inoculadas con bocados de micelio de 5 mm provenientes de cultivos de 15 días de la cepa MR037 en MEA, dando origen a las cinco poblaciones de MR037 (poblaciones MR037F+1 a MR037F+5) que serían sometidas a la presión del fungicida (F+) durante el ensayo de evolución experimental. De la misma manera, cinco placas de MEA sin fungicida fueron inoculadas con bocados similares de la cepa MR037, dando origen a las cinco poblaciones control de

MR037 (poblaciones MR037F-1 a MR037F-5) las cuales no serían sometidas a la presión del fungicida (F-) durante el ensayo de evolución experimental.

Las placas fueron incubadas a 30 °C por 8 días en donde bocados de micelio de cinco mm de estos cultivos fueron trasladados a placas nuevas de MEA con 0.1 ppm de Amistar Top® o sin fungicida para las poblaciones sometidas a F+ o F-, respectivamente, lo que comprendía el primer ciclo evolutivo del ensayo de evolución experimental. Es decir, para este experimento se consideró como un ciclo evolutivo el periodo de 8 días comprendido entre la inoculación de una caja de MEA y la inoculación de la siguiente caja de MEA durante el cual las poblaciones fueron sometidas a los diferentes regímenes de presión de fungicida (F+ y F-) (Figura suplementaria 2).

El desarrollo de resistencia en MR037 al fungicida se monitoreo evaluando los cambios en el crecimiento micelial de las poblaciones de MR037 que evolucionaron bajo la presión del fungicida (F+) en comparación con aquellas que evolucionaron sin la presión del fungicida (F-). Para esto, el diámetro de las colonias de las poblaciones de MR037 obtenidas al final de cada ciclo evolutivo se midió en tres puntos diferentes con la ayuda de un Micrómetro Digital Pie De Rey y el promedio de las tres mediciones se empleó como el diámetro de colonia de la población.

Basándose en las medidas de crecimiento micelial se realizaron incrementos progresivos en la concentración de Amistar Top® (de 0.1 ppm a 0.5 ppm y de 0.5 ppm y 1 ppm) con el fin de incrementar la presión de selección del fungicida en las poblaciones sometidas a F+. Los incrementos se realizaron a medida que las líneas bajo presión de selección F+ iban generando resistencia a Amistar Top®, es decir cuando las colonias de las poblaciones bajo F+ presentaban un incremento en el diámetro de sus colonias que se mantenía en por lo menos dos ciclos evolutivos.

### **3. Resultados**

#### *3.1 Susceptibilidad de *Moniliophthora roreri* a los diferentes fungicidas químicos*

Para la evaluación de la susceptibilidad de *M. roreri* a los diferentes fungicidas se emplearon 20 cepas aisladas por un estudio previo a partir de diferentes regiones cacaoteras de Colombia (Tabla 1) (Quiroga-Pérez, 2021). Estas fueron seleccionadas de tal manera que se tuvieran entre 3 a 4 cepas por cada una de las regiones y asegurando que pertenecieran a diferentes grupos genéticos representando la diversidad genética de la especie (Tabla 1). En las evaluaciones se evidenció que las cepas de *M. roreri* presentaron una susceptibilidad variable dependiendo del fungicida, con unas cepas siendo altamente susceptible a todos los fungicidas (++) (por ejemplo, la cepa MR037), otras no susceptibles (-) a ninguno de los fungicidas (por ejemplo, la cepa MR083), y otras altamente susceptible a algunos fungicidas (++ o +) y no susceptible a otros (-) (por ejemplo, la cepa MR024) (Tabla 2, Figura 1). Así mismo, se encontró que la efectividad de los fungicidas para controlar el crecimiento del hongo variaba según la cepa, con una misma molécula capaz de reducir el crecimiento micelial en algunas cepas, pero no en otras. A pesar de esta variabilidad, los resultados de nuestras evaluaciones mostraron que, entre los fungicidas

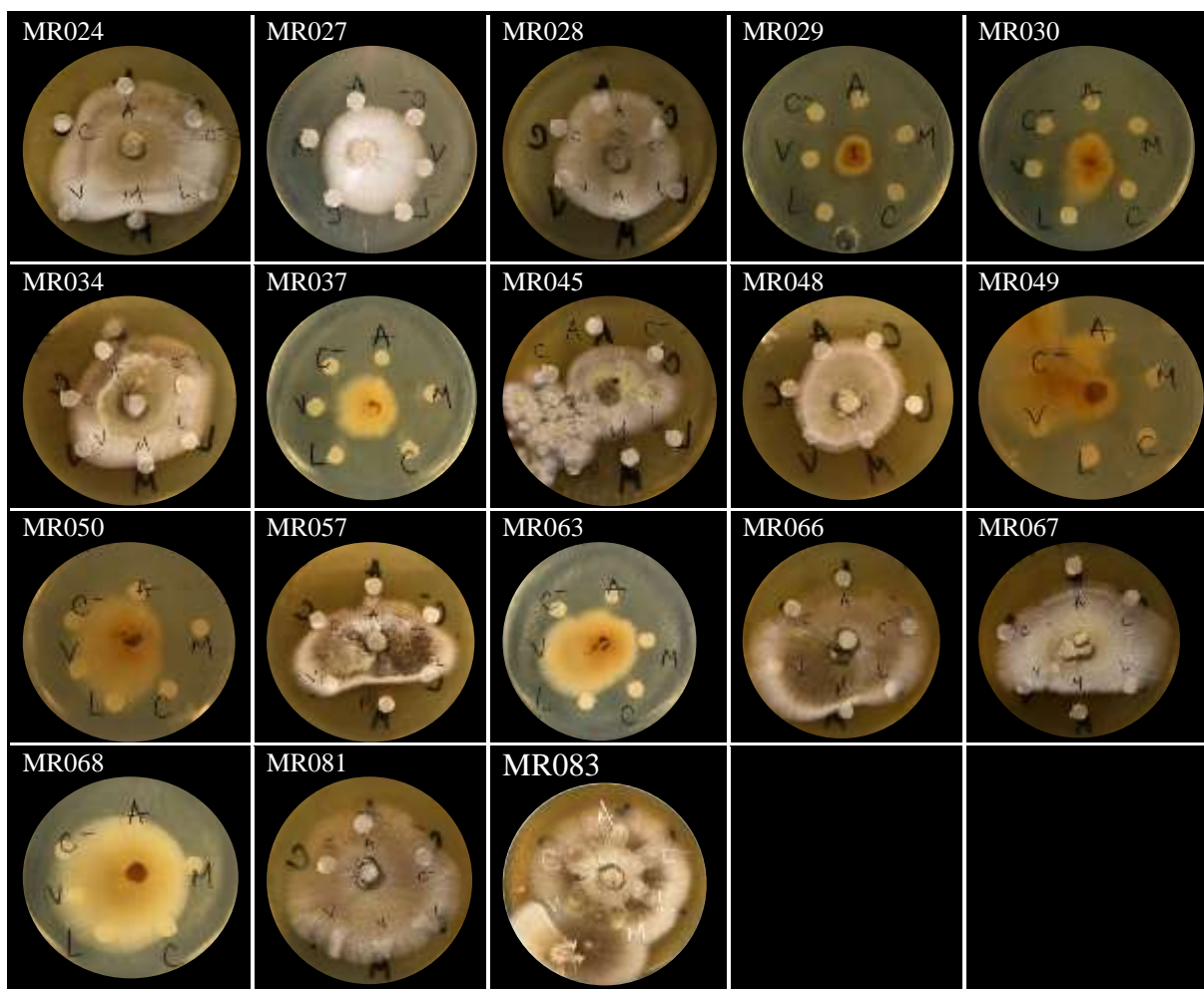
evaluados, Melyra® fue el más eficaz, con el 50% de las cepas presentando una susceptibilidad alta (++), seguido por Amistar Top® y Cantus® con un 30% de las cepas presentando una susceptibilidad alta y finalizando con Luna Tranquility® y Verango Prime®, siendo estos los menos eficaces, con solo 20% y 10% de las cepas presentando una susceptibilidad alta (Tabla 3).

**Tabla 3.** Susceptibilidad de las cepas de *Moniliophthora roreri* a los diferentes fungicidas químicos.

Código	Melyra®	Amistar Top®	Cantus®	Luna Tranquility®	Verango Prime®	Región
MR024	++	-	++	-	-	Barrancabermeja, Santander
MR027	++	+	-	+	-	
MR037	++	++	++	++	++	
MR028	-	-	+	-	-	San José del Nus, Antioquia
MR029	++	++	++	++	+	
MR030	++	++	++	-	++	
MR034	-	+	+	-	-	
MR045	++	++	-	++	-	Yopal, Casanare
MR048	-	-	+	+	-	
MR049	++	-	++	++	-	
MR050	++	+	++	-	-	
MR057	++	+	-	-	-	Palestina, Caldas
MR063	+	++	+	-	-	
MR066	+	+	-	-	-	
MR067	++	++	-	-	-	
MR068	+	-	-	-	-	Neira, Caldas
MR081	-	-	-	-	-	
MR082	-	-	-	-	-	
MR083	-	-	-	-	-	
MR084	-	-	-	-	-	

Susceptibilidad alta (++), Susceptibilidad media (+), No susceptibles (-).

Con relación al origen de las cepas, se encontró que las cepas originarias de una misma región presentaron patrones de susceptibilidad similares. Por ejemplo, las cepas provenientes de Neira mostraron un bajo nivel de susceptibilidad a todos los fungicidas, mientras que las cepas de Palestina presentaron una alta susceptibilidad a Melyra® y Amistar Top®, pero fueron relativamente resistentes a los demás fungicidas. Por su lado, las cepas de Yopal fueron en su mayoría relativamente susceptibles a todos los fungicidas, con excepción de Verango Prime®, y las cepas de Barrancabermeja fueron susceptibles a Melyra®, pero presentaron una susceptibilidad media a los demás fungicidas. Finalmente, las cepas de San José Del Nus fue el grupo de cepas con la mayor variabilidad con relación a su susceptibilidad a los fungicidas en donde no se reconoció un patrón discernible.



**Figura 1.** Imágenes representativas de las cepas utilizadas para clasificar la susceptibilidad de *Moniliophthora roreri* a los fungicidas químicos descritos en la tabla 2, donde A corresponde a Amistar Top®, M a Melyra®, C a Cantus®, L a Luna Tranquility®, V a Verango® y C al Control.

### 3.2 Dosis letal media de los fungicidas químicos más eficaces sobre las cepas de *Moniliophthora roreri* con susceptibilidad diferencial

Para determinar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) se seleccionaron los fungicidas Melyra®, Amistar Top® y Cantus® por ser los más eficaces en las evaluaciones de susceptibilidad (Tabla 3, Figura 1). A sí mismo, se seleccionaron las cepas MR037 y MR083 por estar entre las cepas más susceptibles y menos susceptibles, respectivamente (Tabla 3, Figura 1).

**Tabla 4.** Estimación de parámetros estadísticos que describen el crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en función de las concentraciones de los fungicidas empleados para la determinación de la  $DL_{50}$ .

Modelo	Amistar Top®		Melyra®		Cantus®	
	Cepas		Cepas		Cepas	
	MR037	MR083	MR037	MR083	MR037	MR083
Intercepto, $b$ (Estimado $\pm$ DE)	0.56 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.13	0.96 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.10	0.89 $\pm$ 0.06
Pendiente, $m$ (Estimado $\pm$ DE)	-5.46 $\pm$ 1.66	-4.35 $\pm$ 1.33	-1.85 $\pm$ 0.43	-1.83 $\pm$ 0.24	-0.10 $\pm$ 0.02	-0.10 $\pm$ 0.02
R <sup>2</sup> Ajustado	0.29	0.24	0.53	0.79	0.46	0.45
Grados de libertad	22	28	14	13	22	20
Valor p-value	0.003	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
$DL_{50}$ (ppm)	0.05	0,05	0.24	0.26	5.26	4.18

Los resultados de estas evaluaciones mostraron que, independiente de la cepa, el fungicida Amistar Top® fue el más efectivo mostrando  $DL_{50}$  menores a 0.05 ppm, seguido por Melyra® con  $DL_{50}$  menores a 0.26 ppm. y Cantus® fue el menos efectivo mostrando  $DL_{50}$  superiores a 4 ppm (Tabla 4). Estos resultados son inesperados ya que en las evaluaciones de susceptibilidad a los fungicidas Melyra® mostró ser el más eficaz en concentraciones de 100 ppm. Con relación a cada una de las cepas (MR037 y MR083) no se encontraron diferencias notables en la  $DL_{50}$  independientemente del fungicida. Estos resultados también fueron inesperados pues estas cepas fueron elegidas por ser representantes de las cepas más susceptibles (MR083) y menos susceptibles (MR037) (Tabla 3, Figura 1). Estas diferencias entre los resultados de los dos ensayos (ensayos de susceptibilidad y de  $DL_{50}$ ), puede ser debida a diferencias en las metodologías empleadas en las evaluaciones. Las evaluaciones de  $DL_{50}$  se realizaron en cultivo sumergido en donde las cepas del hongo estaban en mayor contacto con las moléculas del fungicida. Por el contrario, en las evaluaciones de susceptibilidad, la interacción entre las cepas y las moléculas era superficial y estaba restringida a la difusión de las moléculas del fungicida desde el papel filtro y a través del MEA.

### *3.3 Riesgo de adquisición de resistencia al fungicida más eficaz en *Moniliophthora roreri**

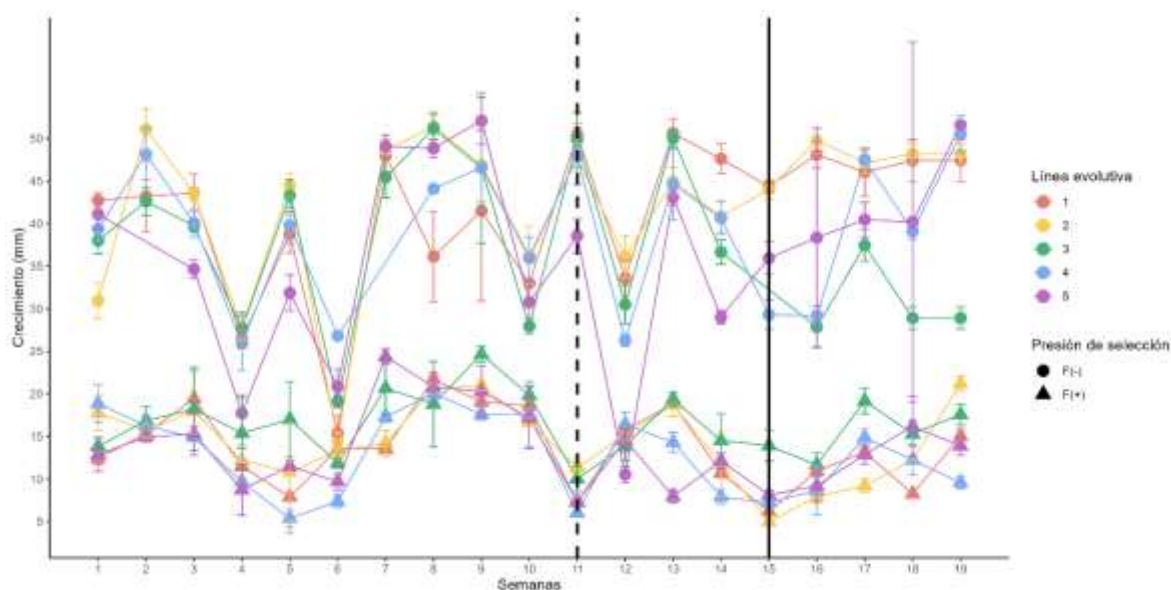
Se seleccionó el fungicida Amistar Top® por presentar las menores DL<sub>50</sub>, y la cepa MR037 por ser entre las dos cepas evaluadas la cepa más susceptible según los ensayos de susceptibilidad (Tabla 3 y Tabla 4). Para estas evaluaciones, poblaciones de la cepa seleccionada (MR037) fueron sometidas a ciclos de crecimiento consecutivos en cajas MEA bajo presión del fungicida a una concentración de 0.1 ppm, la cual es ligeramente inferior a la dosis letal para esta cepa (abolición total del crecimiento) y superior a la DL<sub>50</sub>. Al inicio del experimento (Semana 1; Figura 2), las colonias de estas poblaciones presentaban un diámetro promedio de  $15.17 \pm 2.94$  mm bajo la presión del fungicida (F+), comparado con  $38.42 \pm 4.54$  mm mostrado por las colonias de las poblaciones control, sin presión de selección (F-).

A partir del sexto ciclo evolutivo (Semana 6; Figura 2), se comenzó a observar un incremento en el diámetro promedio de las colonias de las poblaciones bajo presión de fungicida (F+). Este incremento se mantuvo hasta alcanzar un valor promedio de  $18.00 \pm 1.25$  mm pasados diez ciclos evolutivos (semana 10; Figura 2), indicando un incremento cercano a 3 mm con relación al ciclo 0 para estas poblaciones. Por el contrario, el diámetro promedio de las colonias de las poblaciones sin presión de fungicida (F-) se mantuvo relativamente constante durante los diez ciclos evolutivos (semana 10; Figura 2). A partir de este punto se decidió incrementar la presión de selección y se fijó la concentración de Amistar Top® a 0.5 ppm.

Tras el incremento de la presión de selección se observó, según lo esperado, una disminución en el diámetro de las poblaciones bajo selección (F+). Estas poblaciones mostraron un diámetro de colonia medio de  $8.41 \pm 2.21$  mm (semana 11, Figura 2), representando una reducción de 9 mm aproximadamente en comparación con las poblaciones sometidas a 0.1 ppm. Para esta nueva presión de selección (0.5 ppm), también se evidenció un incremento en el diámetro de las colonias de las poblaciones bajo presión del fungicida (F+) con el pasar de los ciclos evolutivos. Sin embargo, el incremento se observó después de menos ciclos y fue más pronunciado. Pasados tres ciclos bajo esta nueva presión de selección, el diámetro medio de las colonias fue de  $15.84 \pm 4.84$  mm para las poblaciones MR037F+, representando un incremento de 7 mm aproximadamente con relación a las colonias de estas poblaciones en el ciclo 11. Por su lado, el diámetro promedio de las colonias de las poblaciones sin presión de fungicida (F-) presentó un ligero incremento ( $46.66 \pm 3.41$ ; semana 13, Figura 2). Este incremento puede deberse a que estas poblaciones se estaban volviendo más eficientes en asimilar el MEA lo que se vio reflejado en un incremento en el crecimiento micelial.

A pesar de que luego el crecimiento de las poblaciones MR037F+ disminuyera aproximadamente 4 mm en el ciclo 14 (semana 13 a semana 14; Figura 2) se decidió aumentar (semana 15; Figura 2) la presión de selección, a una concentración de 1 ppm de Amistar Top® a partir de este punto. Similar a lo observado tras el primer incremento de la presión de selección, las colonias de las poblaciones bajo selección (F+) mostraron una disminución en su diámetro medio ( $8.10 \pm 3.47$  mm) (Semana 15, Figura 2), presentando

una reducción de 7 mm aproximadamente en comparación con las poblaciones sometidas a 0.5 ppm (semanas 13 y 15; Figura 2). El diámetro de las colonias de las poblaciones MR037F+ siguió aumentando a medida que el experimento avanzaba bajo la nueva presión de selección (1 ppm) (Semana 15 a semana 19; Figura 2) y, pasados cuatro ciclos evolutivos (Semana 19; Figura 2), ya estas presentaban un diámetro de colonia medio de  $15.46 \pm 4.31$  mm, representando un incremento superior a 7 mm con relación al ciclo evolutivo 15. Los diámetros de las colonias de las poblaciones sin presión de fungicida (F-) se mantuvieron con relación a aquellos presentados en la semana 13, es decir no se evidenciaron nuevos cambios en estas poblaciones ( $45.32 \pm 9.32$  mm; semana 13 a semana 19; Figura 2).



**Figura 2.** Diámetro de las colonias de las poblaciones de *Moniliophthora roreri* durante el experimento de evolución experimental. Los puntos y las barras de error representan el promedio y la desviación estándar de las tres mediciones del diámetro de colonia para cada población en los ciclos evolutivos. Los diámetros correspondientes a las poblaciones de control, sin presión del fungicida (F-), están representados por círculos y los de las poblaciones sometidas a la presión del fungicida (F+) están representados por triángulos. Cada línea de color representa una población de MR037 a través de los 19 ciclos evolutivos. La línea vertical punteada representa el cambio de concentración de Amistar Top ® de 0.1 ppm a 0.5 ppm, y la línea vertical sin puntear representa el cambio de concentración de 0.5 ppm a 1 ppm.

#### 4. Discusión

Con este estudio se pretendía determinar si cepas de *M. roreri* pertenecientes a diferentes poblaciones colombianas del hongo eran diferencialmente susceptibles a los fungicidas comúnmente empleados para el control de la moniliasis en las plantaciones de cacao y cuál era el riesgo de que el hongo desarrollara resistencia a los ingredientes activos de estos fungicidas. Los ensayos de susceptibilidad demostraron que, efectivamente, la

susceptibilidad de las poblaciones de *M. royeri* varía dependiendo del fungicida y de su región de origen. A pesar de la dependencia de la cepa, nuestros resultados mostraron que, entre los fungicidas evaluados, Melyra®, Amistar Top® y Cantus® son eficaces *in vitro* contra la mayoría de las cepas de *M. royeri*. Algunas excepciones fueron las cepas procedentes de Neira, Caldas las cuales no fueron susceptibles a ninguno de los fungicidas evaluados. Estos resultados van en línea con lo reportado previamente por otros estudios que evaluaban la susceptibilidad *in vitro* de *M. royeri* a fungicidas similares a Melyra®, Amistar Top® y Cantus®, es decir con los mismos ingredientes activos. Por ejemplo, un estudio reporta inhibiciones *in vitro* superiores al 50% del crecimiento en cepas de *M. royeri* sometidas a 100 ppm de estos fungicidas (Farley Figueroa-Saavedra *et al.*, 2023). Por su lado, un estudio reportó la eficacia de algunas de estas moléculas (Pyraclostrobin y Azoxistrobina) para el control de la enfermedad en plantaciones de cacao (Anzules *et al.*, 2019; Torres-de-la-Cruz *et al.*, 2019). Estos resultados en conjunto sugieren que estos fungicidas son una buena opción para el control de la moniliasis en campo.

Sin embargo, al observar las DL<sub>50</sub> de estos fungicidas más eficaces, se aprecia que estas son x100 y x10 veces menores para Amistar Top® y Melyra® en comparación a Cantus®, respectivamente. Al considerar los ingredientes activos de Amistar Top® y Melyra®, se evidencia que estos en conjunto afectan la respiración celular y la biosíntesis de las membranas celulares del hongo empleando mecanismos de acción similares. Específicamente, los dos ingredientes activos de Melyra®, Mefentrifluconazole y Pyraclostrobin, afectan la biosíntesis de esteroides en las membranas y en la desmetilación y reducen la capacidad del hongo para formar ATP durante la respiración al bloquear la proteína citocromo bc1 del complejo III citocromo bc1 (ubiquinol oxidasa) en el sitio Qo (gen Cyt b), respectivamente (FRAC Classification of Fungicides, 2022; BASF, 2023). En Amistar Top®, la Azoxistrobina hace la función del Pyraclostrobin (bloquear la proteína citocromo bc1 del complejo III citocromo bc1) y el Difenconazole la del Mefentrifluconazole (afecta la biosíntesis de esteroides en las membranas y en la desmetilación) (FRAC Classification of Fungicides, 2022; Syngenta, 2022).

Por su lado, el fungicida Cantus® solo contiene el Boscalid como ingrediente activo, y el cual, aunque también afecta la respiración del hongo, emplea un modo de acción diferente pues este inhibe el succinato-deshidrogenasa (SDHI) en el complejo II (FRAC Classification of Fungicides, 2022; Agroactivo, 2018). Cabe mencionar que algunos de los ingredientes activos de los fungicidas menos eficientes, Luna Tranquility® y Verango®, también emplean este mecanismo para inhibir la respiración celular del hongo (FRAC Classification of Fungicides, 2022; Bayer, 2021a) (FRAC Classification of Fungicides, 2022; Bayer, 2021b). Estos resultados sugieren que; mientras que inhibir la biosíntesis de esteroides y bloquear ubiquinol oxidasa en el Cyt b es suficiente para inhibir el crecimiento de *M. royeri*, la inhibición del SDHI en el complejo II no es efectiva.

Los fungicidas que inhiben el SDHI en el complejo II son empleados con éxito en diversos cultivos para el control de hongos fitopatógenos (Duan *et al.*, 2019; Keinath & DuBose, 2017). Es posible que la falta de inhibición de estos fungicidas observada en *M. royeri* se deba a que las cepas de las poblaciones de *M. royeri* evaluadas pertenezcan a poblaciones

del hongo que ya presenten algún nivel de resistencia a este tipo de fungicidas. La generación de resistencia a estas moléculas por parte de hongos es común (FRAC Code List, 2022). Esta resistencia se puede generar de manera espontánea según la capacidad que tenga el hongo de absorber o detoxificar el fungicida o por la presión selectiva resultante de la exposición repetida al fungicida la cual conlleva a cambios genéticos que modifican el sitio diana de la molécula (Massi *et al.*, 2021; Sánchez-Torres, 2021).

Hasta el momento no hay trabajos que hayan evaluado el desarrollo de resistencia a fungicidas que inhiben el SDHI en el complejo II en *M. royeri*. Sin embargo, en este estudio se demostró que una cepa de *M. royeri* (MR037) puede generar resistencia al fungicida Amistar Top®, el cual tiene ingredientes activos que comprenden dos mecanismos de acción distintos que actúan de manera conjunta. Para la aparición de resistencia en patógenos como *M. royeri* no es necesario que la presión de selección este limitada a una molécula específica, esta también puede generarse por el uso de distintos fungicidas con mecanismos de acción similares. Este tipo de resistencia se conoce como resistencia cruzada (Yang *et al.*, 2019). El estudio realizado por Yang *et al.* (2019) demostró que el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* no solo puede generar resistencia cruzada al Difenconazol, Propiconazol y Tebuconazol, quienes comparten el mismo mecanismo de acción actuando mediante la inhibición de la desmetilación (DMI), sino también a moléculas con mecanismos de acción diferentes. Aunque los resultados de nuestras evaluaciones no implican la aparición de resistencia cruzada en *M. royeri* entre los fungicidas que inhiben la respiración del hongo al bloquear el ubiquinol oxidasa en el Cyt b y los que lo hacen al inhibir el SDHI en el complejo II. Estos si demuestran la posibilidad de aparición de resistencia a fungicidas en este hongo. Por consiguiente, no se debe descartar la posibilidad de que alguna de las poblaciones de *M. royeri* ya presenten resistencia a algún fungicida.

## 5. Conclusiones

Nuestros resultados demostraron que los fungicidas Amistar Top ® y Melyra ® son efectivos para inhibir el crecimiento micelial de cepas de *M. royeri* pertenecientes a poblaciones diferentes del hongo. Por consiguiente, estos sugieren que el empleo de fungicidas que inhiban en conjunto la respiración del hongo al bloquear el ubiquinol oxidasa en el Cyt b y la biosíntesis de esteroides en las membranas celulares son una buena alternativa para el control de la moniliasis en las plantaciones colombianas de cacao. Sin embargo, también se demostró que se corre el riesgo de que *M. royeri* desarrolle resistencia a estos fungicidas si estos no son empleados de una manera responsable. Por lo anterior es de gran importancia implementar en campo programas de prevención y monitoreamiento de resistencia, en donde se tenga en cuenta: reducir el número de aplicaciones repetidas de fungicidas con mecanismos de acción similares, alternar o aplicar combinadamente fungicidas con mecanismo de acción diferentes o con diferentes riesgos de generar resistencia y usar la dosis recomendada por el fabricante para cada aplicación (Brent & Hollomon, 1998; FRAC Working Group/Expert Forum, 2023).

## Referencias

- Agroactivo. (2018). Cantus® WG. Agroactivocol.com. <https://agroactivocol.com/wp-content/uploads/2022/10/FICHA-TECNICA-CANTUS-WG.pdf>
- Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97(5), 1012–1022. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832751>
- Ali, S. S., Shao, J., Strem, M. D., Phillips-Mora, W., Zhang, D., Meinhardt, L. W., & Bailey, B. A. (2015). Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Frontiers in Microbiology*, 6, 850. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00850>
- Anzules, V., Borjas, R., Alvarado, L., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2019). Cultural, biological and chemical control of *Moniliophthora roreri* and *Phytophthora* spp IN *Theobroma cacao* 'CCN-51'. *Scientia agropecuaria*, 10(4), 511–520. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.08>
- Bailey, B. A., Evans, H. C., Phillips-Mora, W., Ali, S. S., & Meinhardt, L. W. (2018). *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot: Frosty pod rot of cacao. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580–1594. <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- BASF. (2023). Melyra®. Basf.com. [https://download.basf.com/p1/8a8082587fd4b608017fe080719e0db9/es/PE\\_-\\_Ficha\\_Tecnica\\_-\\_Melyra%C2%AE\\_Hoja\\_T%C3%A9cnica\\_espa%C3%B1ol.pdf](https://download.basf.com/p1/8a8082587fd4b608017fe080719e0db9/es/PE_-_Ficha_Tecnica_-_Melyra%C2%AE_Hoja_T%C3%A9cnica_espa%C3%B1ol.pdf)
- Bayer. (2021a). Luna Tranquility®. Bayer.co. <https://www.agro.bayer.co/content/dam/regional-folders/latam/colombia/spanish/image/product-sheet/luna-tranquility-bayer-ficha-tecnica-colombia.pdf>
- Bayer. (2021b). Verango Prime®. Bayer.co. <https://www.agro.bayer.co/content/dam/regional-folders/latam/colombia/spanish/image/product-sheet/verango-bayer-ficha-tecnica-colombia.pdf.pdf>
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (1998). *Fungicide resistance: the assessment of risk* (Vol. 2). Brussels, Belgium: Global Crop Protection Federation.

- Catrileo, D., Acuña-Fontecilla, A., & Godoy, L. (2020). Adaptive laboratory evolution of native *Torulaspora delbrueckii* YCPUC10 with enhanced ethanol resistance and evaluation in co-inoculated fermentation. *Frontiers in microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.595023>
- Correa Álvarez, J., Castro Martínez, S., & Coy, J. (2014). Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta agronomica*, 63(4), 388–399. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
- Cubillos, G. (2017). Frosty Pod Rot, disease that affects the cocoa (*Theobroma cacao*) crops in Colombia. *Crop Protection (Guildford, Surrey)*, 96, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.011>
- De Souza, P. A., Moreira, L. F., Sarmiento, D. H. A., & da Costa, F. B. (2018). Cacao—*Theobroma cacao*. In *Exotic Fruits* (pp. 69–76). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00010-1>
- Duan, Y., Xiu, Q., Li, H., Li, T., Wang, J., & Zhou, M. (2019). Pharmacological characteristics and control efficacy of a novel SDHI fungicide pydiflumetofen against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 103(1), 77–82. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-18-0763-re>
- Farley Figueroa-Saavedra, H., Barbaru-Grajales, A., Xavier Paguay-Soxo, P., Octavio Intriago-Reyna, H., & Isman Acosta-Perez, K. (2023). Sensitivity In Vitro Of Isolates Of *Moniliophthora Roreri* Against Fungicides With Different Modes Of Action. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 14(2), 3527–3533. <https://doi.org/10.47750/pnr.2023.14.02.415>
- FRAC Classification of Fungicides. (2022). Fungicide Resistance Action Committee. <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-mode-of-action-poster/frac-moa-poster-2022.pdf>
- FRAC Code List. (2022). Fungicide Resistance Action Committee. [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a_2)
- FRAC Working Group/Expert Forum. (2023). Fungicide Resistance Action Committee. <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/by-frac-working-group-expert-forum>

- Franco Dominguez, C. J. (2016). *Fungicidas protectantes para el control de monilia (Moniliophthora roreri CiF & par) en clones de cacao (Theobroma cacao L.) EET-103 y CCN-51* (Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ). <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1300/2/T-UTEQ-0030.pdf>
- Goettel, M. S., Duke, G. M., Schaalje, G. B., & Richards, K. W. (1992). Effects of selected fungicides on in vitro spore germination and vegetative growth of *Ascosphaera aggregata*. *Apidologie*, 23(4), 299–309. <https://doi.org/10.1051/apido:19920404>
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, 7(4), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Jaimes, Y. Y., Gonzalez, C., Rojas, J., Cornejo, O. E., Mideros, M. F., Restrepo, S., Cilas, C., & Furtado, E. L. (2016). Geographic differentiation and population genetic structure of *Moniliophthora roreri* in the principal cocoa production areas in Colombia. *Plant Disease*, 100(8), 1548–1558. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1498-RE>
- Jiménez, D. L., Alvarez, J. C., & Mosquera, S. (2022). Frosty pod rot: a major threat to cacao plantations on the move. *Tropical Plant Pathology*, 47(2), 187–200. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00472-y>
- Keinath, A. P., & DuBose, V. B. (2017). Management of southern blight on tomato with SDHI fungicides. *Crop Protection (Guildford, Surrey)*, 101, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.013>
- Krauss, U., Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., García, J., Crozier, J., Brown, N. A., ten Hoopen, G. M., & Holmes, K. A. (2010). Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biological Control*, 54(3), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.011>
- Leandro-Muñoz, M. E., Tixier, P., Germon, A., Rakotobe, V., Phillips-Mora, W., Maximova, S., & Avelino, J. (2017). Effects of microclimatic variables on the symptoms and signs onset of *Moniliophthora roreri*, causal agent of Moniliophthora pod rot in cacao. *PloS One*, 12(10), e0184638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184638>

- Massi, F., Torriani, S. F. F., Borghi, L., & Toffolatti, S. L. (2021). Fungicide resistance evolution and detection in plant pathogens: *Plasmopara viticola* as a case study. *Microorganisms*, 9(1), 119. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010119>
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Van Bael, S., Arnold, A. E., Hebbar, P., Samuels, G. J., Robbins, N., & Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>
- Minio, A., Figueroa-Balderas, R., Cohen, S. P., Ali, S. S., Carriel, D., Britto, D., Stack, C., Baruah, I. K., Marelli, J.-P., Cantu, D., & Bailey, B. A. (2023). Clonal reproduction of *Moniliophthora roreri* and the emergence of unique lineages with distinct genomes during range expansion. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 13(9). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad125>
- Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56(6), 911–922. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x>
- Quiroga-Pérez, M. (2021). Intraspecific variability of the *Moniliophthora roreri* populations in Colombia and its association with colony morphology and growth rate. (Tesis de pregrado). Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Sánchez-Torres, P. (2021). Molecular mechanisms underlying fungicide resistance in citrus postharvest green mold. *Journal of Fungi*, 7(9), 783. <https://doi.org/10.3390/jof7090783>
- Suárez, Y. J., & Hernández, F. A. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). *Revista Corpoica*, 13-22. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12699>
- Suárez-Contreras, L. Y. (2017). Diversidad genética de *Moniliophthora roreri* mediante Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs). *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 11(2), 425–434. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i2.7342>
- Syngenta. (2022). Amistar Top®. [syngenta.com. https://www.syngenta.com.co/sites/g/files/kgtney501/files/media/document/2022/07/26/amistar\\_top\\_ficha\\_tecnica\\_10\\_abril\\_2022.pdf](https://www.syngenta.com.co/sites/g/files/kgtney501/files/media/document/2022/07/26/amistar_top_ficha_tecnica_10_abril_2022.pdf)

Torres-de-la-Cruz, M., Quevedo-Damián, I., Ortiz-García, C. F., Lagúnez-Espinoza, L. del C., Nieto-Angel, D., & Pérez-de la Cruz, M. (2019). Control químico de *Moniliophthora roreri* en México. *Biotecnia*, 21(2), 55–61. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i2.906>

Universidade Estadual de Campinas. (2021). Uma chave para dois cadeados: Fluopyram é capaz de inibir a enzima Oxidase Alternativa e pode levar ao controle da devastadora doença Vassoura de Bruxa do Cacau [Whitepaper]. Gonçalo Pereira.

Yang, L.-N., He, M.-H., Ouyang, H.-B., Zhu, W., Pan, Z.-C., Sui, Q.-J., Shang, L.-P., & Zhan, J. (2019). Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>