

**BIOPROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS FILOSFÉRICOS
CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTAGÓNICA CONTRA PYRICULARIA
ORYZAE EN EL CULTIVO DE ARROZ.**

BIOPROSPECTING AND CHARACTERIZATION OF FILOSPHERIC FUNGI WITH
ANTAGONISTIC BIOLOGICAL ACTIVITY AGAINST *PYRICULARIA ORYZAE* IN
RICE CULTIVATION.

Rito Herrera

Universidad de Panamá, Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá. Panamá.

rito.herrera@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0003-2509-0391>

Martha de Von Chong

Universidad de Panamá, Centro Regional Universitario de Coclé. Panamá.

martha.chaves@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0002-1087-4196>

Alex Cruz

Ministerio de Educación. Panamá.

ureholding@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-2644-3086>

Recepción: 16 de mayo de 2023

Aprobación: 14 de octubre 2023

DOI: <https://doi.org/10.48204/semillaeste.v4n1.4427>

RESUMEN

Se realizaron muestreos de la filósfera de arroz, en una parcela bajo la modalidad de agricultura orgánica de subsistencia, ubicada en la comunidad de Los Alvéos, provincia de Coclé, República de Panamá. Posteriormente, se efectuaron aislamientos de hongos de la filósfera del arroz, pruebas de enfrentamiento *in vitro* e identificación de los

microorganismos (hongos) con potencial antagonico frente al fitopatógeno *Pyricularia oryzae*, causante de la enfermedad conocida como tizón de la panícula (pyriculariosis). Se aislaron un total de 68 cepas fúngicas endófitas de la filósfera (20 de la sección apical, 22 de la sección media y 26 de la sección basal), de las cuales 29 mostraron antagonismo positivo (PCIR $\geq 40\%$) ante el fitopatógeno *P. oryzae*, correspondiendo a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium* (se identificaron molecularmente amplificando el gen ITS y secuenciándolos). El objetivo de esta investigación fue aislar y caracterizar hongos con actividad biológica antagonica contra *p. oryzae*.

Palabras clave: arroz, filósfera, hongos, antagonismo.

ABSTRACT

Sampling of the rice phyllosphere was carried out in a plot under the modality of organic subsistence agriculture, located in the community of Los Alvéos, province of Coclé, Republic of Panama. Subsequently, isolation of fungi from the rice phyllosphere, in vitro confrontation tests and identification of microorganisms (fungi) with antagonistic potential against the phytopathogen *Pyricularia oryzae*, which causes the disease known as panicle blight (pyriculariosis), were carried out. A total of 68 endophytic fungal strains were isolated from the phyllosphere (20 from the apical section, 22 from the middle section and 26 from the basal section), of which 29 showed positive antagonism (PCIR $\geq 40\%$) against the phytopathogen *P. oryzae*, corresponding to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Fusarium* (they were identified molecularly by amplifying the ITS gen and sequencing them). The objective of this research was to isolate and characterize fungi with antagonistic biological activity against *p. oryzae*.

Keywords: rice, phyllosphere, fungi, antagonism.

INTRODUCCIÓN

El hongo *P. oryzae* (*Magnaphortales*) tiene un ciclo de vida corto en la planta y por tanto múltiples infecciones se pueden llevar a cabo en un campo infectado por este patógeno. El hongo penetra por la hoja gracias a una estructura de forma semiesférica denominada apresorio. Debido a una gran presión (aproximadamente 8 Mpa) ejercida sobre la superficie de la hoja, el hongo es capaz de penetrar en la planta. Una vez dentro crece de una manera

biotrófica, es decir, sin afectar demasiado al crecimiento de la planta y sin matar a las células vegetales. Al cabo de unos tres días, los efectos del hongo sobre la hoja comienzan a ser visibles y a generar lesiones debido a la necrosis o muerte de las células de la hoja. En ese punto, realmente podemos decir que el hongo empieza a matar a la planta y se alimenta de los restos de las células vegetales muertas (Alvarez-López *et al.*, 2014).

En las últimas décadas el control biológico de plagas y enfermedades en la agricultura ha adquirido gran importancia frente a los problemas fitosanitarios ocurridos por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos, lo cual ha traído como consecuencia severos problemas de contaminación al medio ambiente y ha aumentado la resistencia de fitopatógenos, incrementando su virulencia (Bhattacharya y Jha, 2012) (Bellido, 2005) (Fernández, 2001) .

La filósfera es considerada como adversa para la colonización de organismos, pues no existe allí una fuente rica en nutrientes (Leveau y Lindow, 2001). Las comunidades microbianas del filoplano, son diversas e incluyen microorganismos que pueden encontrarse como epífitos en la superficie de la planta o endófitos dentro de los tejidos de ésta (Lindow y Brandl, 2003). Los microorganismos filoféricos, incluyendo los hongos endofíticos son considerados como agentes potenciales de biocontrol contra patógenos claves en la producción del cultivo de arroz como lo es *P. oryzae*. El control biológico ha incrementado su importancia recientemente ya que disminuye la aplicación de agroquímicos, evitando el deterioro de los suelos y la acumulación de residuos químicos en el ambiente (Pal y McSpadden, 2006).

Se ha encontrado que la regulación biológica de patógenos foliares, frecuentemente involucra la aplicación de microorganismos antagonistas sobre la superficie de la hoja (filoplano o filósfera) y que el éxito de dichos antagonistas depende de su capacidad para establecerse como microbiota epífitico (Blakeman y Fokkema, 1982).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Colecta de campo

Las plantas en estudio fueron tomadas al azar (muestreo al azar eliminando efecto borde) en una parcela de 10 m² cultivada con la variedad de arroz IDIAP Gab 8, bajo el sistema de agricultura orgánica de subsistencia, no se emplearon agroquímicos durante todo el ciclo del cultivo, la zona está ubicada en la comunidad de Los Alvéos, corregimiento de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé, República de Panamá. El sitio de muestreo fue seleccionado para la bioprospección de bacterias debido a que no estaba sometido a los efectos de los agroquímicos (MIDA, Agencia Regional de Antón, provincia de Coclé, comunicación oral).

2. Aislamiento de hongos epifíticos de la filósfera del arroz (*Oryza sativa*).

Las hojas colectadas, libres de lesiones, se dividieron en la sección base, media y apical, en segmentos de 2x2 cm. Se colocaron bajo agua de grifo durante 5 min. para eliminar todos los residuos de suelo y otras materias extrañas. Seguidamente a cada sección se le agregó 20 ml de agua peptonada y se homogenizó durante 1 min a 200 rpm (Stomacher Seward®).

A partir de la solución en agua peptonada, se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) de cada sección foliar (apical, media y basal) (Ávila *et al.*, 2014), de las cuales se tomaron alícuotas y se depositaron por agotamiento sobre la superficie de platos Petri conteniendo agar papa dextrosa (PDA), incubándose a temperatura ambiente por al menos 5 días.

2.1 Aislamiento de hongos endofíticos de la filósfera del arroz (*O. sativa*).

Para hongos endofíticos, cada sección de la hoja fue cortada en cuadrados de 2x2 mm, se lavaron con abundante agua de grifo por 5 min., luego se sumergieron con alcohol al 70% por 1 minuto, segundo lavado con cloro al 4% por 3 minutos, pasado por alcohol al 70% por 30 segundos y finalmente alcohol al 40% por 30 segundos; posteriormente se dejaron secar en papel filtro estéril y se colocaron en platos Petri con agar papa dextrosa (PDA). Los platos sembrados se incubaron a temperatura ambiente expuestos a 16 h luz y 8 h de oscuridad por 8 días.

3. Bioensayo dual: Hongos Aislados vs *Pyricularia oryzae*.

En agar papa dextrosa, se colocó un disco de 7 mm de diámetro del hongo aislado a 15 mm del centro del plato, en el sentido opuesto también a 15 mm del centro, se colocó un disco (7 mm de diámetro) con el patógeno (*P. oryzae*). Los tratamientos se incubaron a 28°C y las mediciones se realizaron el día 3, 5 y 8 posterior al montaje del ensayo. Se utilizó como control, un disco del patógeno en el centro de un plato Petri con agar papa dextrosa.

Se tomaron medidas del crecimiento micelial del patógeno en enfrentamiento y en el plato control, calculando el índice de inhibición, mediante la fórmula:

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \cdot 100$$

R1

Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual). (Quiróz, *et al.*, 2014).

El comportamiento de inhibición mostrado por los diferentes aislamientos se agrupará de la siguiente manera (Benítez *et al.*, 2007):

Negativo: ausencia de zona de inhibición o un porcentaje menor de 10% y crecimiento normal de la colonia fúngica, de forma similar al control.

Baja: ausencia de zona de inhibición o con un porcentaje entre 10–39% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.

Media: ausencia de zona de inhibición o un porcentaje entre de 40–69% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.

Positivo: presencia de zona de inhibición definida o en un porcentaje entre 70–100%.

Se considerarán para discusión los géneros fúngicos con porcentajes de inhibición \geq a 40% (inhibición media a positivo según la clasificación de Benítez *et al.*, 2007).

4. Identificación de hongos con actividad antagónica

Las cepas fúngicas con características macroscópicas similares se agruparon en morfotipos para su identificación taxonómica, se empleó la técnica de microcultivo en cámara húmeda incubándose a 28 °C, alternando 16 h de luz y 8 h de oscuridad, para favorecer el crecimiento de estructuras características de los hongos. Se observaron las

estructuras microscópicas y se clasificaron por géneros. Posteriormente, para su identificación molecular se amplificaron por PCR convencional los genes ribosomales (ITS) y se secuenciaron con el fin de determinar la especie de hongo.

4.1. Extracción de ADN e identificación molecular de hongos rizosféricos

Se mezclaron por separado 100 mg de diferentes micelios fúngicos con 1 ml de tampón de extracción de ADN (DEB) que contiene proteinasa K (0,05 mg / ml) y se maceró en un mortero estéril. El extracto resultante se dispensó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. 50 µl de dodecil sulfato de sodio al 20% (SDS) se añadieron al tubo y se incubó en un baño de agua a 65 ° C durante 30 min. Los tubos se dejaron enfriar temperatura ambiente antes de añadir 100 µl de acetato de potasio 7,5 M y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos recién esterilizados en autoclave a los que se agregaron 2/3 volúmenes de isopropanol frío y alcohol isopropílico. Los tubos se invirtieron suavemente 3-5 veces antes de incubar a -20 ° C durante 1 hora. A partir de entonces, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µl de etanol al 70% encada tubo y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm antes de desechar cuidadosamente el sobrenadante con el sedimento de ADN intacto. Se eliminaron las trazas de etanol antes de secar los sedimentos de ADN a 37 ° C durante 10-15 min. Los gránulos de ADN fueron resuspendidos en 50 µl de tampón Tris-EDTA (TE) (Awa y Oguntade, 2015).

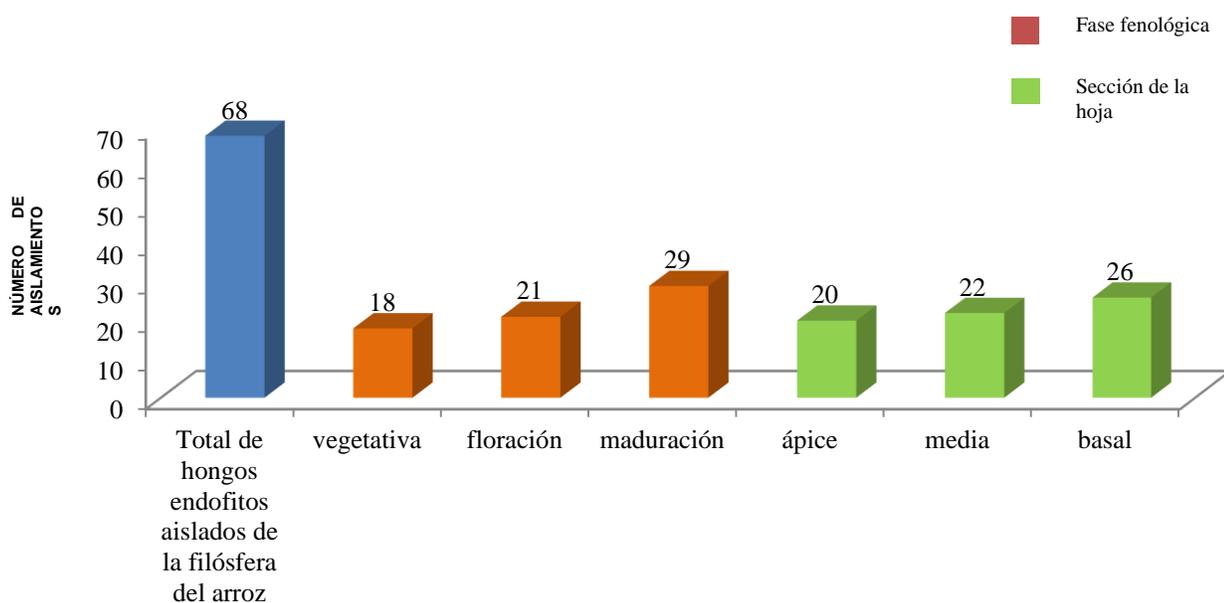
Se amplificó por PCR el gen de la región espaciadora transcrita interna (ITS) que flanquea ITS1, (ITS 1: 5 'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' e ITS 4: 5 'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'). Las condiciones de la PCR incluyeron un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos (cada ciclo compuesto por 30 s) de desnaturalización a 94°C. El alineamiento de los cebadores se realizó a 55 °C durante 30 s, seguido de 1,5 min., extensión a 72 °C y una extensión final de 7min a 72°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la bioprospección de hongos epifíticos no se lograron aislamientos que permitieran evaluar actividad biológica antagonista. Sin embargo, partir de la prospección de hongos endófitos de la filósfera del arroz, se obtuvo un total de 68 aislamientos. En la Figura 1 se observan el número de cepas fúngicas obtenidas en cada una de las variables evaluadas (fase fenológica, sección de la hoja).

Figura 1.

Prospección de hongos endófitos de la filósfera con las variables: etapa fenológica y sección de la hoja.



Los datos obtenidos no presentaron una distribución normal, aplicándose entonces una prueba de Wicolxon/Kruskal-Wallis (no paramétrica), lo que indicó que la sección basal de la hoja fue donde más aislamientos de hongos endófitos se encontraron. El modelo utilizado en la prospección de hongos endófitos autóctonos en la hoja del arroz explica en un 41% los aislamientos obtenidos (Tabla 1).

Tabla 1.

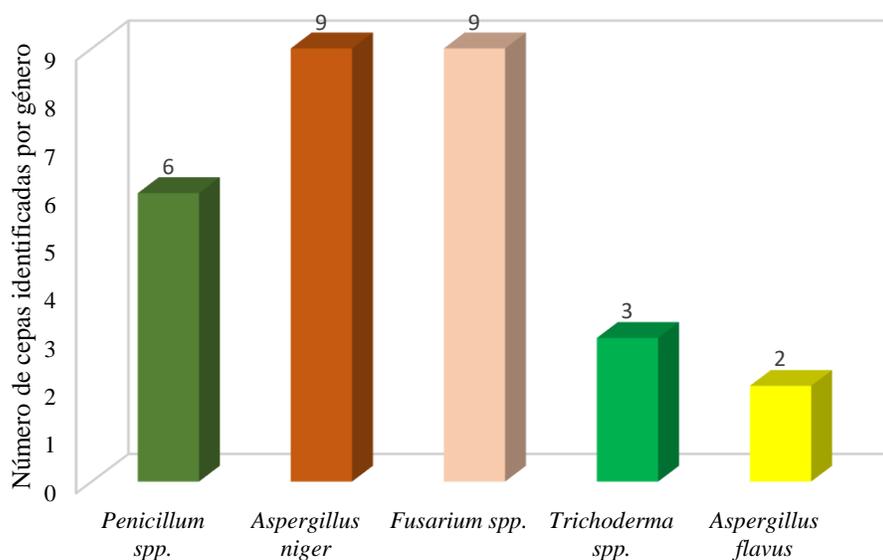
Resumen de ajuste para la prospección de hongos endófitos

| | |
|---------------------------------|----------|
| R cuadrado | 0.471703 |
| R cuadrado ajustado | 0.410068 |
| Raíz del error cuadrático medio | 1.072431 |
| Media de respuesta | 6.065424 |
| Observaciones (o suma de pesos) | 68 |

Del total de aislamientos fúngicos (68), de la filósfera del arroz, 29 mostraron antagonismo positivo (PICR $\geq 40\%$) correspondiendo a cuatro géneros (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*): *Trichoderma*. (3 cepas), *A. flavus* (2 cepas), *A. niger* (9 cepas), *Penicillium* (6 cepas) y *Fusarium* (9) cepas. (Figura 2).

Figura 2.

Hongos endófitos con antagonismo positivo: Trichoderma, A. flavus, A. niger, Penicillium, Fusarium.



En la tabla 2 se describe la sección de la hoja de la cual se aisló cada género fúngico con actividad antagónica.

Tabla 2.

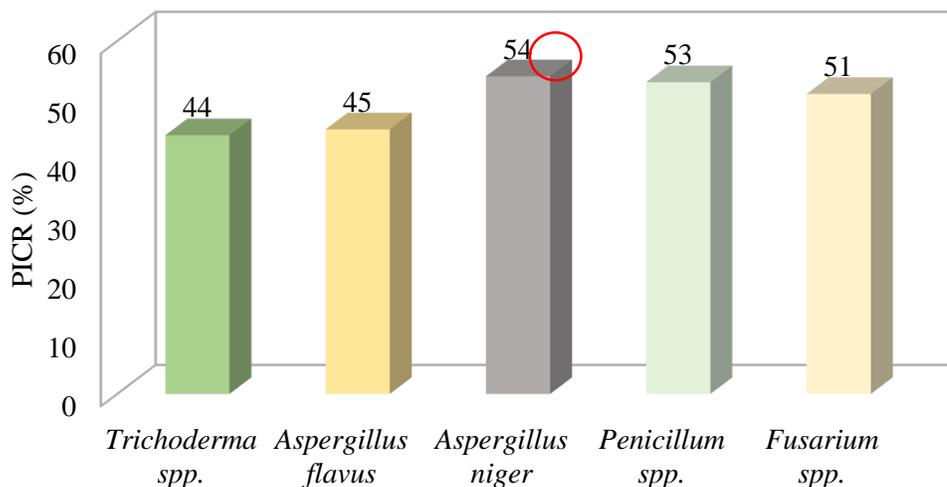
Secciones de la hoja en las cuales se aislaron los géneros fúngicos con actividad antagónica positiva frente a P. oryzae.

| Géneros | Sección de la hoja |
|---------------------------|---------------------------|
| <i>Penicillium.</i> | Apical |
| <i>Aspergillus flavus</i> | Basal, media |
| <i>Aspergillus niger</i> | Media, apical |
| <i>Fusarium</i> | Apical, media, basal |
| <i>Trichoderma</i> | Basal |

En la Figura 3 se muestran los PICR de los géneros fúngicos identificados con actividad antagónica positiva frente a *P. oryzae*, a los 8 días de observación. Como indicamos, se tomó como inhibición efectiva o positiva aquellas cepas en las que el crecimiento fúngico radial era mayor o igual a 40% (Figura 3), resultando *A. niger* con el mayor valor de PICR.

Figura 3.

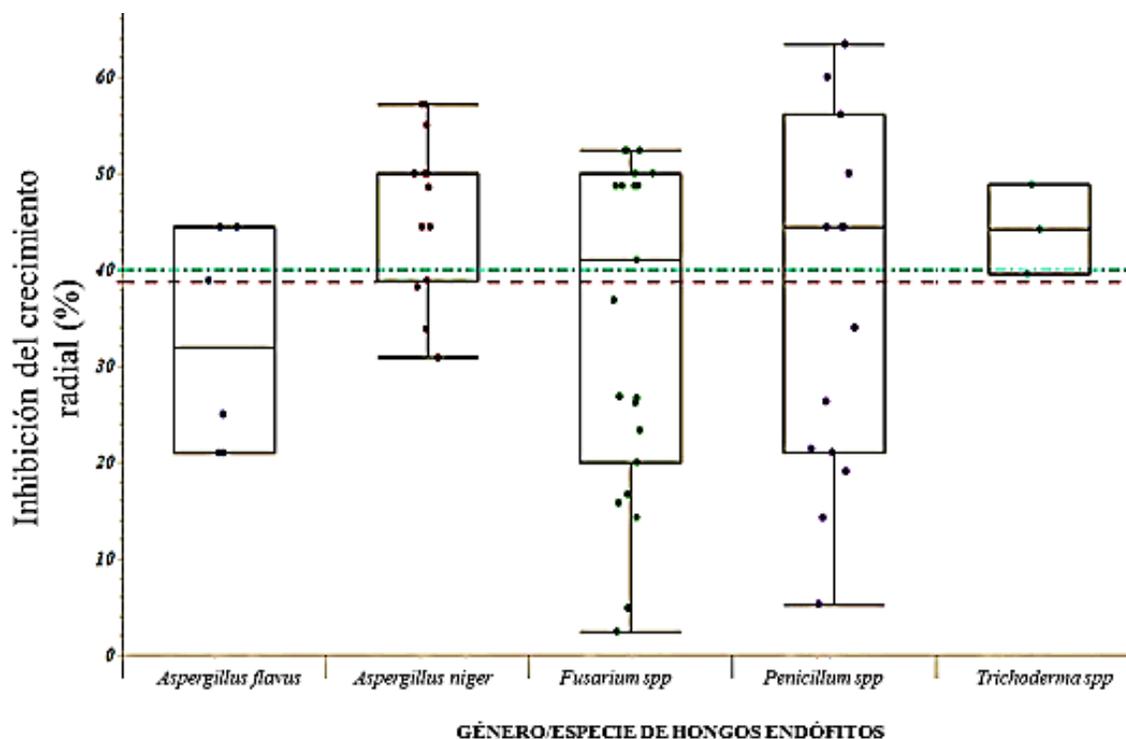
Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de las cepas fúngicas con actividad antagónica positiva frente *Pyricularia oryzae*. *Trichoderma*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium*, *Fusarium*.



Se realizó un diagrama caja barra para determinar el hongo con el mayor poder de inhibición frente al patógeno evaluado. La línea roja representa la media y la verde representa el valor de inhibición superior a 40%. Se aprecia que la mayoría de los datos se encuentran por arriba de la media. Por otra parte, se observa que los hongos *Fusarium* y *Penicillium* arrojaron gran cantidad de valores por debajo de la media, (Figura 4). Los Datos analizados con el paquete estadístico R.

Figura 4.

Inhibición del crecimiento de P. oryzae por hongos endófitos antagonistas aislados de la filósfera. Línea verde representa PCIR $\geq 40\%$, línea roja representa la media de los datos analizados. Datos analizados con el paquete estadístico R.



El segmento del gen ITS amplificado a partir de los aislados fue secuenciado en ambas direcciones a partir de productos purificados. Las muestras de ADN de PCR se secuenciaron en ambas cadenas mediante electroforesis en un ABI (secuenciador capilar de ADN automatizado). Las secuencias generadas se analizaron utilizando el software de análisis de secuenciación BioEdit 7.2.5. Las identidades de los aislamientos se confirmaron mediante NCBI / BLAST (Awa y Oguntade, 2015).

Los hongos identificados se criopreservaron en glicerol al 30% y posteriormente fueron ultracongelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

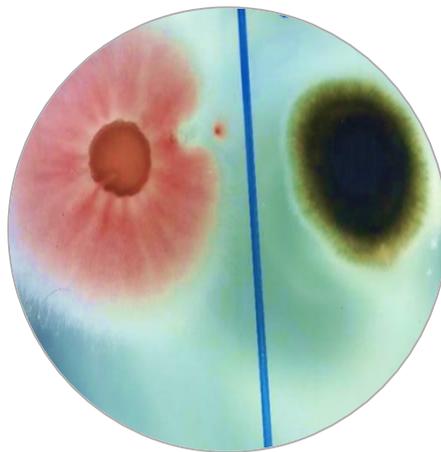
Las cepas fúngicas con características macroscópicas similares se agruparon en morfotipos para su identificación taxonómica, se empleó la técnica de microcultivo en cámara húmeda

incubando a 28 °C, alternando 16 h de luz y 8 h de oscuridad, para favorecer el crecimiento de estructuras características de los hongos. Se observaron las estructuras microscópicas y se clasifico por géneros.

A pesar de lo mencionado, los hongos endófitos identificados no presentan diferencia significativa en cuanto al porcentaje de inhibición frente al fitopatógeno *P. oryzae*. ($X^2=7.2824$, $g.l.=5$, $p=0.2005$). Se han reportado cepas de *Aspergillus* con potencial antagónico, en el control de enfermedades fungosas como la causada por *Fusarium*, (Figura 5) observándose principalmente un efecto de inhibición por competencia (Quiróz-Sarmiento *et al.*, 2008), contrastando con lo reportado por Reyes *et al.*, (2012), quienes realizaron enfrentamientos duales con cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* contra *Fusarium*, encontrándose que las cepas de *Trichoderma* fueron estadísticamente superior a las cepas de *Aspergillus*.

Figura 5.

Fusarium localizado en la sección basal de la hoja, en enfrentamiento antagónico contra el fitopatógeno *P.oryzae*.

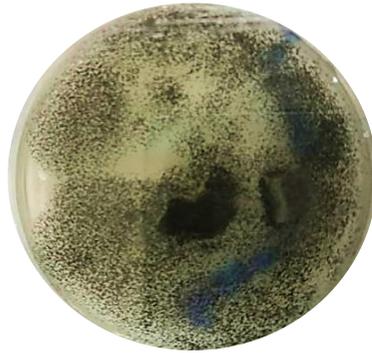


Se tienen algunos reportes que describen el efecto antagónico de algunas especies de *Aspergillus* (Figura 6) hacia patógenos como *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*

f. sp. lycopersici raza 2, y *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*, los cuales son causantes de enfermedades en cultivos como tomate y melón (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008)

Figura 6.

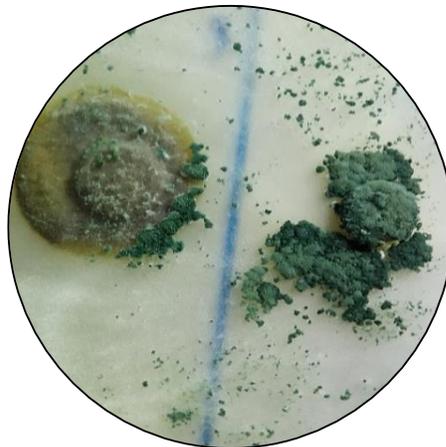
A. niger en proceso de colonización contra el fitopatógeno *P. oryzae*.



El hongo *Trichoderma* (Figura 7) también se ha utilizado en el control de *Moniliophthora roreri* en cacao, con reducción del área bajo la curva de esta enfermedad por la aplicación de cepas comerciales y nativas de especies de este agente de biocontrol (Villamil *et al.*, 2015). En el cultivo del plátano *Musa spp.* se ha informado el uso de microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* en el control de hongos foliares (Castro, 2015).

Figura 7.

Trichoderma spp (color verde) colonizando al hongo *P. oryzae*.



La aplicación de *Trichoderma* en el arroz ha sido poco estudiada, sin embargo, en la última década se han obtenido resultados satisfactorios en el control de *P. oryzae*, todos ellos mediante la interacción *in vitro* entre hongos fitopatógenos del arroz y especies de

Trichoderma. Pérez-Torres *et al.*, (2018), encontraron eficiencias para la inhibición de *P. oryzae* con cepas de *Trichoderma. harzianum* de 63, 75 y 82% utilizando 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} UFC, respectivamente. Esos resultados contrastan con los obtenidos en este estudio, ya que la cepa de *Trichoderma* (Cepa-17) presentó valores de inhibición de 44% a los 8 días de la inoculación.

CONCLUSIONES

-La densidad de población de los microorganismos aislados varían significativamente con la etapa fenológica y las secciones de la filósfera evaluadas. En etapa fenológica de maduración se logró la mayor cantidad de aislamientos de hongos endófitos; en cuanto a las secciones de la filósfera, la parte basal o base de la hoja es la que presenta mayor número de aislamientos de hongos endófitos.

-Se aislaron cepas de hongos endofíticos de la filósfera del arroz con capacidad antagonica positiva (PCIR $\geq 40\%$) frente a *P. oryzae*, pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*. El género *Fusarium* y la especie *Aspergillus niger*, presentaron mayor actividad biológica antagonista.

- El género *Fusarium* es omnipresente en todas las secciones de la hoja (apical, media, basal).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ávila, C. C., Goretti, R. M., Lizcano T. R. (2014). Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura de Campoalegre (Huila). Colombia. 15-20.

Álvarez-López, A., Osorio-Vega, W., Diez-Gómez, M., Marín-Montoya, M. (2014). Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana* 25:2.

Awa, O., Oguntade, O. (2015). Molecular Identification of Fungal Species Associated with Mango Anthracnose in Southwest Nigeria. *Journal of Agriculture and Environmental Science* 2, 99-103

- Bellido, J. (2005). Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de la cebolla. *Agriculture*, Universidad de Puerto Rico.
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, L., Corrales, L. (2007). Aislamiento de los Microorganismos Cultivables De La Rizosfera De *Ornithogalum umbellatum* y Evaluación Del Posible Efecto Biocontrolador en dos Patógenos del Suelo. *NOVA*, 5(8), 147-153.
- Bhattacharyya, P., Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 4:1327- 50.
- Blakeman, J., Fokkema, N. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review Phytopathology* 20: 167-192.
- Castro, R., Pesántez, M., Flores. (2015). Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 133-138.
- Fernández, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 62: 96-100.
- Leveau, J., Lindow. S., (2001). Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 98 (6), 3446-3453.
- Lindow, S., Brandl, M. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 1875-1883.
- Pal, K., McSpadden, G. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. Disponible DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Pérez-Torres, E., Bernal-Cabrera, A., Milanés-Virelles, P., Sierra-Reyes, Y., Leiva-Mora, M., Marín Guerra, S., Monteagudo-Hernández, O. (2018). Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (Cepa A-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro* 30, 1. 17-26.
- Quiroz-Sarmiento, V., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Lara Hernández, M. (2008). Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista mexicana de micología*, 26, 27-34
- Reyes, R., Alejo, J., Ruiz, A. (2012). Inhibición del crecimiento in vitro de *Fusarium sp.* Aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad*; 16, 3.
- Villamil, J., Viteri, S. Villegas, W. 2015. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Revista de la Facultad Nacional de Medellín* 68 (1).