



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Análisis de la presencia de micovirus e identificación  
molecular de hongos endófitos en plantaciones de cacao  
(*Theobroma cacao L.*) en Tabasco**

Tesis para obtener el grado de:  
Doctor en Ciencias en Ecología y  
Manejo de Sistemas Tropicales

Presenta:  
MCA. Lucero Vázquez Cruz

Bajo la dirección de:  
Dra. Julia María Lesher Gordillo

En Co-dirección:  
Dra. María Dolores García Pedrajas  
(Director externo. Instituto de Hortofruticultura Subtropical  
y Mediterránea "La Mayora")

Villahermosa, Tabasco, a marzo de 2025

## Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Villahermosa, Tabasco el día 30 de enero de 2025, el que suscribe Lucero Vazquez Cruz, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales, con numero de matricula 171G1006, adscrito a la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autora de la tesis Presentada para la obtención del grado de doctor y titulada, **Análisis de la presencia de micovirus e identificación molecular de hongos endófitos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao L.*) en Tabasco**, dirigido por las Dra. Julia María Leshner Gordillo y María Dolores García Pedrajas.

### DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Villahermosa, Tabasco a 30 de enero de 2025.

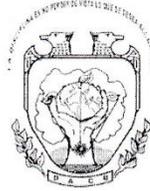


MCA. Lucero Vázquez Cruz



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN**

Villahermosa, Tab., a 20 de Enero de 2025

**ASUNTO:** Autorización de Modalidad de Titulación

**C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON  
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION  
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES  
P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza a la **C. LUCERO VAZQUEZ CRUZ** egresada del Doctorado en **CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Doctorado denominado: **"ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE MICOVIRUS E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ENDÓFITOS EN PLANTACIONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN TABASCO"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

**DR. ARTURO GARRIDO MORA  
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

UJAT  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

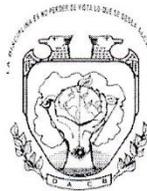
C.c.p.- Expediente Alumno de la División Académica

C.c.p.- Interesado



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN**



**2025  
AÑO DE LA  
Mujer  
Indígena**

ENERO 20 DE 2025

**C. LUCERO VÁZQUEZ CRUZ  
PAS. DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y  
MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES  
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales titulado: **"ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE MICOVIRUS E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ENDÓFITOS EN PLANTACIONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN TABASCO"**, asesorado por la Dra. Julia María Lesher Gordillo y Dra. María Dolores García Pedrajas, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por Dr. Eder Ramos Hernández, Dra. Ena Edith Mata Zayas, Dra. Julia María Lesher Gordillo, Dra. Sughey López Martínez, Dr. Manuel Ignacio Gallardo Álvarez, Dr. Miguel Alberto Magaña Alejandro y Dr. Guillermo Castañón Nájera.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E  
ESTUDIO EN LA DUDA, ACCIÓN EN LA FE**

**DR. ARTURO GARRIDO MORA  
DIRECTOR**

UJAT.  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

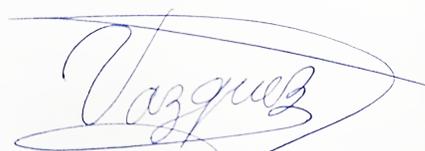
C.c.p.- Expediente del Alumno.  
C.c.p.- Archivo

Villahermosa, Tabasco a 30 de enero de 2025.

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTORA en la producción, creación y/o realización de la obra denominada, **Análisis de la presencia de micovirus e identificación molecular de hongos endófitos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao L.*) en Tabasco.**

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

**COLABORADORES**



**MCA. LUCERO VÁZQUEZ CRUZ**

EGRESADO



**DRA. JULIA MARÍA LESHER GORDILLO**

DIRECTORA



**DRA. MARÍA DOLORES GARCÍA PEDRAJAS**

CODIRECTORA

**TESTIGOS**



**DRA. SUGEY LOPEZ MARTINEZ**



**DR. EDER RAMOS HERNANDEZ**



UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



2025  
AÑO DE LA  
Mujer  
Indígena

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN

Villahermosa, Tabasco a 17 de enero de 2025

**C. LUCERO VAZQUEZ CRUZ**

EGRESADA DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA  
Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES  
PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad, y por instrucciones de la Dirección de Posgrado, se implementó la revisión de los documentos recepcionales (tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad, el Reglamento General de Estudios de Posgrado y el Código Institucional de Ética para la Investigación.

Por este conducto, hago de su conocimiento las observaciones y el reporte de originalidad de su documento de tesis. Con el objetivo de fortalecer y enriquecer el programa de posgrado, el responsable del programa realizó la revisión del documento en la plataforma iThenticate, obteniendo el reporte de originalidad, el índice de similitud y emitió las siguientes sugerencias y recomendaciones para dar seguimiento en el documento de tesis del proyecto de investigación: **“Análisis de la presencia de micovirus e identificación molecular de hongos endófitos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco”**.

OBSERVACIONES:

1. **El índice de similitud obtenido fue de 06%**, el cual se ubica dentro del estándar de tolerancia de acuerdo a las Políticas y Lineamientos para el uso y manejo del Software Antiplagio de la UJAT.
2. Aun que el índice de similitud obtenido indica coincidencias, éstas se refieren a frases en las secciones de antecedentes y métodos, vinculadas con el artículo científico publicado por la sustentante como parte de los requisitos de egreso del programa. Lo anterior no demerita el documento de tesis, se demuestra el nivel de originalidad del documento y de la investigación.



UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN

3. Se adjunta el informe de originalidad de la tesis obtenido a través de la herramienta Turnitin iThenticate.
4. Finalmente, se le solicita a la C. LUCERO VAZQUEZ CRUZ, integrar en la versión final del documento de tesis, este oficio y el informe de originalidad con el porcentaje de similitud de Turnitin iThenticate.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DR. ARTURO GARRIDO MORA  
DIRECTOR DACBIOL

U.J.A.T.  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

C.C.P. Dra. Julia María Leshner Gordillo. Directora de Tesis  
Archivo

# Análisis de la presencia de micovirus e identificación molecular de hongos endófitos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco

ORIGINALITY REPORT

## 6%

SIMILARITY INDEX

### PRIMARY SOURCES

1	revista-agroproductividad.org Internet	1308 words — 4%
2	ng.smf.org.mx Internet	74 words — < 1%
3	mail.revista-agroproductividad.org Internet	55 words — < 1%
4	hdl.handle.net Internet	52 words — < 1%
5	uvadoc.uva.es Internet	51 words — < 1%
6	talk.ictvonline.org Internet	47 words — < 1%
7	www.scielo.org.co Internet	45 words — < 1%
8	colposdigital.colpos.mx:8080 Internet	37 words — < 1%
9	cybertesis.uach.cl Internet	36 words — < 1%

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

## **Dedicatoria**

Gracias a Dios por enseñarme el camino, acompañarme y otorgarme la fortaleza en cada paso de este camino. A toda mi familia que siempre me ha acompañado.

## Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a todos mis amigos y compañeros del laboratorio de genómica y microbiología, que estuvieron conmigo en los momentos de estrés y alegría durante este largo y retador camino. Su apoyo, confianza, soporte y cariño han sido invaluable. Asimismo, quisiera expresar mi gratitud a todas las personas que contribuyeron con el desarrollo de mi investigación

Quisiera expresando mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Julia Maria Leshner Gordillo, cuya experiencia, paciencia y apoyo constante fueron fundamentales para la realización de este trabajo. Su guía no solo me proporcionó claridad académica, sino también motivación en momentos de duda. Su confianza en mí me impulsó a seguir adelante y superar los desafíos., A la Dra. María Dolores García Pedrajas del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"), gracias por compartir su experiencia en el estudio de los micovirus.

Asimismo, quisiera expresar mi gratitud a la MCA. Rosa Martha Padrón López por brindarme su apoyo, confianza, amistad y brindarnos un espacio en el laboratorio de microbiología.

A los profesores investigadores que conformaron el comité tutorial y sinodal, por su acompañamiento y sus valiosas observaciones para enriquecer esta tesis doctoral.

La Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) por otorgarme la beca a través del Programa Institucional de Superación Académica (PISA).

Además quiero agradecer a mi familia, en especial a mi esposo Roberto, mi madre, mi hermano Angel y mi hija Mary Carmen de Jesús por ser mi motor y apoyo.

A todos los mencionados mis más sinceros agradecimientos.



# CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Hongos endófitos infectados por micovirus .....	11
1.3.2 Micovirus.....	13
1.3.3 <i>Theobroma cacao</i> L. (1753) .....	47
1.3.4 Enfermedades fúngicas que afectan a <i>T. cacao</i> .....	49
<b>1.4. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
4.1 Objetivo general .....	57
4.2 Objetivo específicos.....	57
<b>CAPITULO II. METODOLOGÍA.....</b>	<b>58</b>
<b>2.1. METODOLOGÍA.....</b>	<b>59</b>
2.1.1. Colecta del material vegetal.....	59
Búsqueda de cepas fúngicas cacao ( <i>T. cacao</i> ).....	62
2.1.2 Extracción y purificación de dsARN a partir de muestras fúngicas .....	65
2.2.3 Identificación molecular fúngica.....	75
<b>CAPITULO III. ARTICULO 1 (ENVIADO).....</b>	<b>81</b>
<b>CAPITULO IV. ARTÍCULO 2 (ACEPTADO).....</b>	<b>94</b>



<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>111</b>
<b>CAPITULO VI. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>115</b>

## Anexo

<b>Anexo 1. Alojamiento de la tesis en el repositorio institucional.....</b>	<b>130</b>
------------------------------------------------------------------------------	------------

## Figuras

<b>Figura 1.</b> Diversos efectos ejercidos por los micovirus en los huéspedes fúngicos, modificado (Sutela et al., 2019).....	<b>12</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>Figura 2.</b> Clasificación de lo micovirus (23 taxones), según el comité internacional de taxonomía Viral (ICTV) (Villan Larios et al., 2023). .....	<b>15</b>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>Figura 3.</b> Estructura 3D de la cápside un micovirus (Ghabrial et al., 2015). .....	<b>16</b>
------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>Figura 4.</b> Representación del genoma bipartito. El dsARN1 (RdRP: ARN de polimerasa dependiente) y dsARN2 (CP: proteína de la cápside). UTR: Región No Traducida ( <a href="https://talk.ictvonline.org/">https://talk.ictvonline.org/</a> ).....	<b>17</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>Figura 5.</b> Estructura atómica del virión, consta de doble eje icosaédrico (Fuente: ICTV, 2019- <a href="https://talk.ictvonline.org/">https://talk.ictvonline.org/</a> ).....	<b>19</b>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>Figura 6.</b> Organización del genoma de FaVV1 y RnVV1. El pentanucleótido “UAAUG” (Modificado, Li et al., 2018).....	<b>19</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de la partícula de <i>Crysoviridae</i> P1 al P7 son las proteínas (Fuente: ICTV, 2019, <a href="https://talk.ictvonline.org/">https://talk.ictvonline.org/</a> ).....	<b>20</b>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>Figura 8.</b> Genoma del virus <i>Penicillium chrysogenum</i> (PcV) y del virus de la <i>Botryosphaeria dothidea</i> 1 (BdCV1) de la familia <i>Chrysoviridae</i> , sus genomas están representado por cuatro segmentos de dsARN, cada uno monocistrónico (ARN1 al 4). dsARN1 representa el motivo RdRP, dsARN2 codifica a la cápside, dsARN 3 y 4 se desconoce su función (Fuente: ICTV, 2019- <a href="https://talk.ictvonline.org/">https://talk.ictvonline.org/</a> ).....	<b>21</b>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>Figura 9.</b> Genoma de cinco virus <i>R. necatrix</i> . A) RnMBV1, megabiARNvirus; B) RnPV1, Partitivirus; C) MyRV3, micoreovirus; D) RnQV1, quadrivirus; E) RnVV1,	
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--



victorivirus. Las líneas gruesas continuas y las cajas abiertas representan dsARN y ORF. Las funciones de cada segmento se presentan dentro o arriba de la caja del ORF. VP son proteínas estructurales que conforma el genoma viral (Kondo et al., 2013). ..... 22

**Figura 10.** Morfología del *Reoviridae*, representando su triple capa y proteínas. (Fuente: ICTV, 2019-<https://talk.ictvonline.org/>). ..... 23

**Figura 11.** Morfología colonial de un hongo Fitopatógeno del agente causal de la Victoria blight en avena. a) Colonia libre de virus; crecimiento del micelio uniforme en toda la placa, b) hongo infectado (enfermo) el micelio se encuentra atrofiado. Infectado por *Victorivirus Helminthosporium victoriae* virus 190S (HvV190S) (Ghabrial & Suuki, 2009). ..... 25

**Figura 12.** Efecto el cambio climático de enfermedades en plantas y animales (modificado (Nnadi & Carter, 2021). ..... 26

**Figura 13.** Características culturales de cepas hipovirulentas. a) *B. cinerea*; b) *C. parasítica*; c) *S. sclerotiorum* (Ghabrial et al., 2015a; Jin et al., 2021; Kamaruzzaman et al., 2019). ..... 29

**Figura 14.** Características básicas del Arbol; a) árbol de *T. cacao*; b) Ramillete de flores; c) vaina o mazorca de cacao; d) Haz de la hoja del árbol de cacao. .... 47

**Figura 15.** Propagación de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* (B. Bailey et al., 2018; Rodríguez Polanco et al., 2024). ..... 53

**Figura 16.** Propagación de *Moniliophthora perniciosa* en plantas de *Theobroma cacao* (Evans, 2016; Meinhardt et al., 2008). ..... 54

**Figura 17.** Propagación del género *Phytophthora* en plantas de *Theobroma cacao* (Phillips W., y Cerda BR, 2007; Rodríguez Polanco 2024; Adeniyi et al., 2017). ..... 56

**Figura 18.** Esquema general de la primera fase de búsqueda de aislamiento de los micovirus. .... 60

**Figura 19.** Sintomatología de *M. roreri*, a) Fruto joven de 1 mes de edad con hinchazón; b) mazorca verde hinchada y con tumoración de dos a tres meses de edad; c) fruto con necrosis e inflamación. Síntomas de *M. perniciosa*, d y e) lesiones algodonosas; f) frutos jóvenes infectados con necrosis severa; h) manchas aceitosas característica típica que ha afectado a las semillas, y g) frutos jóvenes de 2 meses con síntomas iniciales (Evans, 2016). ..... 61

**Figura 20.** Colecta del material biológico en las plantaciones de cacao (*T. cacao*); a) ejemplar de *T. cacao*; b) Colecta de las hojas utilizando una pértiga; c y d) Mazorca o fruto de *T. cacao*. ..... 62



<b>Figura 21.</b> Procedimiento de desinfección de las muestras colectadas para el aislamiento de especies fúngicas.....	63
<b>Figura 22.</b> Transferencia a las cámaras de incubación, para el desarrollo de cultivo monospórico. a) obtención de los fragmentos en hoja de cacao; b) Transferencia de los fragmentos de hoja a las cajas Petri; y c) cámara húmeda.....	64
<b>Figura 23.</b> Transferencia de las muestras previamente desinfectadas; a) montaje directo en PDA; b) cámara de incubación con tejido de cacao. ....	65
<b>Figura 24.</b> Esquema general para la extracción y purificación de dsARN viral. ....	65
<b>Figura 25.</b> Procedimiento general para la obtención de micelio pulverizado con N2... ..	66
<b>Figura 26.</b> Etapas básicas para la extracción de dsARN de los micovirus. ....	68
<b>Figura 27.</b> Diseño de la columna cromatografía para el aislamiento de dsARN. ....	69
<b>Figura 28.</b> Fases obtenidas durante la extracción de las muestras. ....	69
<b>Figura 29.</b> Columna de celulosa según Morris et al., 1979 (original). a) Lisis celular a partir de muestra fúngica; b) preparación de la columna de celulosa; c) recuperación de los ácidos nucleicos adheridos a la celulosa; y d) producto final (dsARN). ....	70
<b>Figura 30.</b> Ejemplificación de los resultados obtenidos de la extracción de dsARN, en color negro podemos observar la banda viral. ADN genómico (ADNg). ....	71
<b>Figura 31.</b> HyperLadder™ 1kb. Marcador de peso molecular utilizado para la identificación viral. ....	72
<b>Figura 32.</b> Minitécnica para aislamiento de dsARN. a) preparación de la columna de celulosa; b) primera fase de lisis celular; c) purificación de los ácidos nucleicos; d) secado de los ácidos nucleicos. ....	74
<b>Figura 33.</b> Prueba de electroforesis para verificar la extracción de los ácidos nucleicos viral. ....	75
<b>Figura 34.</b> Pulverización de las muestras fúngicas para la extracción de los ácidos nucleicos. a) filtración de las hifas en la malla de papel Miracloth; b y c) trituración de las hifas empleando N2 líquido. ....	76
<b>Figura 35.</b> Extracción de ácidos nucleicos en muestras fúngicas. a) lisis celular; b) extracción de la fase acuosa; c) ácidos nucleicos purificados. ....	77



**Figura 36.** ADN genómico total de muestras fúngicas. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). ..... 78

**Figura 37.** Preparación de la muestra para la identificación molecular fúngica (PCR). 79

**Figura 38.** Programas utilizados para la visualización de la secuencia fúngicas (ITS). a) MEGA X; b) Bioedit 7.2.5 visualización de los electroferogramas. .... 80

## Tablas

**Tabla 1.** Rangos de los segmentos del genoma y longitudes de proteínas de los cinco géneros de la familia *Partitiviridae* (Fuente: ICTV, 2019-<https://talk.ictvonline.org/>). ..... 18

**Tabla 2.** Especies de hongos y oomicetes que causan enfermedades en *T. cacao*, a nivel mundial..... 50

**Tabla 3.** Sitios de colecta del material biológico en el Estado de Tabasco. .... 59

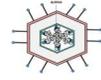


## RESUMEN

La producción del grano cacao es materia prima para diversas industrias, farmacéuticas, cosmetológica y alimentaria, e importante para el sostenimiento de muchas familias. Los Sistemas Agroforestales Cacao (SAFC), provee de grandes beneficios ecológicos que incluyen flora y fauna. Actualmente estos ecosistemas se ven afectados por la presencia de enfermedades fúngicas: *Moniliophthora roreri*, causante de la podredumbre helada de la vaina (FPR); *M. perniciosa*, agente causal de la enfermedad escoba de bruja (WBD) y *Phytophthora palmivora*, por mencionar las más importantes. El hongo causante de la moniliasis del cacao se ha extendido desde América Latina, Centroamérica y México y se ha extendido en los últimos 50 años. En México, los primeros reportes fueron desde el 2005 y en los últimos 20 años la producción bajo de 40 a 20 mil toneladas. En el 2021, la Secretaría de Agricultura Desarrollo Rural (SEDER), informa que México ocupa el catorceavo productor a nivel mundial con 28,106 toneladas de grano y 44,500 a 47,800 hectáreas de cacao; Tabasco, Chiapas y Guerrero son las principales regiones productoras. Una alternativa para el control sostenible de las plagas es el control biológico, empleando a los agentes microbianos, bacterias, hongos y virus, sustituyendo a los pesticidas químicos. Presentan grandes beneficios para la agricultura, favorecen la salud de las plantas, brindan protección a las plantas o interactuarse con el patógeno directa o indirectamente para disminuir la enfermedad de la planta. El uso de micovirus es un agente novedoso que tiene el beneficio de cruzar barreras entre especies, importante para la sostenibilidad de la agricultura. Esta investigación evaluó la presencia de micovirus en hongos endófitos aislados en plantaciones de cacao del estado de Tabasco (Cárdenas, Cunduacán, Centro, Huimanguillo, Jalpa y Comalcalco). La extracción del ARN se utilizaron la metodología de Valverde et al (1990) y Khankhum et al., (2007). La identificación molecular de las cepas fúngica se realizó a través de la región transcripta interna ITS1 y 5, basado en el método de White y col., (1990). Se analizaron 137 hongos mediante cromatografía en columna de celulosa. La cepa 174 fue la única que presentó un posible micovirus de un fragmento de 2.7 kb. La identificación molecular del hongo por la región ITS fue *Endomelanconiopsis*



*endophytica*, con un porcentaje de identidad de 99.81 y 100 % de cobertura total, aislada en plantación de cacao en Villahermosa, Tabasco, México. En este estudio se reporta la posible presencia de un mitovirus (ARNss) de la familia Narnaviridae. No forman partículas virales verdaderas y solo tienen un genoma de ARN monocatenario lineal (ARNss) de 2.3 – 3.6 kb y son los únicos que infectan a las mitocondrias dentro de los organismos eucariotas, se pueden transmitir vertical u horizontalmente. La información generada en este estudio permite dar inicio al uso de micovirus para el control biológico de plagas en plantas de cacao u otros fitopatógenos, si bien, aún falta conocer los mecanismos de este virus y los efectos en el hongo. Estos resultados sugieren utilizar estos organismos para el control de plagas. Sin embargo se requieren más estudios, analizar mayor número de cepas fúngicas que permitan detectar otras partículas virales.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
Mexico.

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL



## 1.1. INTRODUCCIÓN

Los cultivos de cacao (*Theobroma cacao L.*), proporcionan la materia prima para la producción del chocolate y sus derivados (polvo de chocolate, cosméticos, manteca de cacao). El cacao, conocido por los mayas “alimento de los Dioses”, posee numerosos beneficios para la salud, debido a que contienen fuentes importantes de polifenoles (flavonoles), que favorecen la salud: anticancerígenas, antidiabéticas y antiinflamatorio, entre otros beneficios (Díaz-Valderrama et al., 2020; Du et al., 2022; Martin & Ramos, 2021).

Este cultivo contribuye a la economía de numerosas familias, ayuda a preservar la biodiversidad de la flora, fauna y la fertilización del suelo. Se cultiva en más de 58 naciones de África, América, Asia y Oceanía, y su producción global en 2022 alcanzó las 4,923 mil toneladas (Aikpokpodion, Motamayor, Adetimirin, Adu-Ampomah, et al., 2009).

Juega un papel importante en la economía de muchas familias, contribuye en el mantenimiento de la biodiversidad de la flora, fauna y fertilización del suelo (Aikpokpodion et al., 2009). Se cultiva en más de 58 países de África, América, Asia y Oceanía, y su producción mundial en 2022 fue de 4,923 mil toneladas; más del 96% de la producción procede de pequeños agricultores (Calderón et al., 2022); 75% proviene de África Occidental, ocupando el primer lugar de la producción anual y menos del 20% del continente americano. La producción de cacao en México es de 28,106 toneladas de grano, los estados de Tabasco, Chiapas y Guerrero son las principales regiones productoras (SIAP, 2022)

Estos sistemas agroforestales de cacao (SAFC) provee diversos beneficios ecológicos, a la flora y fauna, captación de carbono, fortalecer o conservar la humedad y fertilidad del suelo; contribuyen en el control de plagas, circulación de nutrientes y conservación de suelo y agua, mantenimiento de diversos microorganismos importantes para el crecimiento de las plantas, aspectos ecológicos y suministro de bienes y culturales (Drouet Candell et al., 2019; Mortimer et al., 2018).



Estos SAFC proporcionan diversos servicios ecosistemáticos, que permiten mantener un flujo idóneo entre las interrelaciones ecológicas positivas como nutrición, mantenimiento del agua, biodiversidad de los diferentes taxones, árboles de importancia económica y ecológica, los anfibios se benefician de la sombra, dependiendo de la vegetación favorecerá a las poblaciones de aves y hormigas. Al mismo tiempo favorece, la esporulación de hongos endófitos e incluso de los antagonistas que son importantes para el control de las enfermedades fitopatógenas que contribuyen a un control natural en estos ecosistemas (Mortimer et al., 2018). Un buen manejo en la cobertura vegetal trae beneficio como; clima y regulación de patógenos. Esto puede ser prometedor para el manejo de las enfermedades que afectan al cacao, dado que actualmente enfrenta diversas problemáticas, principalmente por fitopatógenos, alta demanda de la materia prima y disminución de la fertilidad de los suelos (Blaser et al., 2017; Tadeo-lópez & Tolentino-Martínez, 2020).

La producción del grano ha disminuido a causa de las enfermedades producidas por hongos patógenos, con pérdidas que oscilar entre el 40 al 100% (Díaz-Valderrama et al., 2020). Los hongos más importantes son: *Moniliophthora roreri*, causante de la podredumbre helada de la vaina (FPR); *M. pernicioso*, agente causal de la enfermedad escoba de bruja (WBD) (B. A. Bailey, Evans, Phillips-Mora, et al., 2018); *Phytophthora palmivora*, *P. megakarya*, *P. theobromicola*, y *Nodulosporium sp.*, producen la enfermedad de la mazorca negra (BPR) (Decloquement et al., 2021; González Ruiz et al., 2019). También, se reporta otros patógenos como *Ceratocystis cacaofunesta* (marchitez del cacao por *Ceratocystis* o “Mal de machete”); *Oncobasidium theobromae* (muerte regresiva por estria vascular); *Rosellinia pepo* y *R. bunodes* agentes causantes de la pudrición negra de la raíz, también llamada pudrición de la raíz por *Rosellinia* (Delgado-Ospina et al., 2021).

El uso de sustancias químicas, es el recurso más utilizado para controlar a los fitopatógenos (Triadimefon, Tebuconazol y Procloraz), pero afectan la calidad de los suelos, a microorganismos autóctonos y la calidad de la semilla, como se ha mencionó anteriormente



se ven afectado diversos SAFC (Ghosh et al., 2023). Por tal razón, se han propuesto otros métodos de control, como el control biológico.

El control biológico de plagas es una alternativa atractiva porque tienen menor impacto al medio ambiente, busca combatir plagas utilizando agentes vivos; bacterias, nematodos, hongos y virus (Khan, Mukhtar, et al., 2023). Estos últimos se han utilizado frecuentemente para combatir plagas, ya sea por infección del patógeno o por protección cruzada (vacunación) (Stenberg et al., 2021). Actualmente se utilizan diversos microorganismos como ingredientes activos para el biocontrol como *Bacillus thuringiensis sp.*, hongos micoparásitos (*Trichoderma spp.*), biofertilizante (*Penicillium bilaiae*), virus entomopatógenos (baculovirus), *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces variotii* y *Metarhizium anisopliae* entre otros (De Oliveira et al., 2020; Koller et al., 2023).

En Europa se ha utilizado a los micovirus “virus fúngicos”, que utilizan la maquinaria molecular del huésped para su auto-replicación y sostenibilidad. Infechan desde hongos patógenos de planta, humanos e insectos, presentan menor impacto socioeconómico que sus homólogos (virus de plantas y animales) (Son et al., 2015). Sus hospederos se limitan a individuos dentro del mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG) o relacionados entre sí (Ghabrial et al., 2015a).

Se han reportado en *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota* y *Neocallimastigomycota*, se localizan principalmente en el citoplasma y mitocondrias (Kondo et al., 2022). El primer registro fue en 1962 en *Agaricus bisporus* (champiñón) infectado por *Agaricus bisporus virus 1* (AbV-1) (Hollings, 1962). Posteriormente Banks y col. (1968) descubrió partículas virales de ARN bicatenario (ARNds) en *Penicillium stoloniferum*. Desde entonces el interés sobre estos virus que infectan a hongos fitopatógenos ha sido de gran importancia para la virología, algunos autores mencionan que es el inicio de la micovirología.

Se consideran de naturaleza críptica debido a que sus huéspedes no presentan sintomatología. Mientras que algunos micovirus llevan una vida oculta otros provocan



alteraciones fenotípicas “hipovirulencia”; cambios morfológicos y fisiológicos, incluidas las producción de toxinas, alteraciones citológicas de orgánulos celulares y rasgos asociados a la virulencia, como la tasa de crecimiento, esporulación y actividades enzimáticas (Ghabrial et al., 2015a; Nuss, 2011)

El hipovirus CHV1 que infecta *Cryphonectria parasítica* (patógeno del castaño), se considera organismos modelo para establecer los programas de biocontrol para el patógeno. En 1904 se descubrió por primera vez en el parque zoológico de Nueva York, probablemente se introdujo accidentalmente desde Asia a través de los viveros e inició un desastre ecológico en los bosques de América del Norte (Dennert et al., 2019).

En 1950 en Italia, se informó por primera vez el fenómeno de hipovirulencia por CHV1, un virus de ARN no encapsulado de la familia *Hipoviridae* que atenúa la virulencia en las cepas fúngicas comparando con otros hongos virulentos que penetran y destruyen las capas de la corteza (Choi & Nuss, 1992). El beneficio de CHV1 surge como medida de control biológico del tizón del castaño, además permite conocer la expresión de la virulencia del hongo patógeno. Actualmente este virus es un modelo básico para emplear estrategias de control biológico, si se pretende utilizar a los micovirus para el biocontrol es importante conocer la historia desde la infección del patógeno, características de infección de los virus y sobre todo la interrelación del hongo-virus. El uso de agente con hipovirulencia ofrece una esperanza para gestionar diversas enfermedades producidas por hongos (Myers & James, 2022a).

A los virus los aprovechamos como agentes de control contra sus huéspedes de enfermedades forestales, pero aún presenta grandes desafíos. En el control biológico depende de varias condiciones ambientales y biológicas, para así obtener resultados positivos (Milgroom & Cortesi, 2004). Establecer el uso de micovirus no solo está relacionado con la hipovirulencia, sino además es necesario, que permanezcan dentro de la célula y se transmitan de forma eficiente entre los hongos patógenos.

En México las investigaciones están centradas en el uso de hongos entomopatógenos para el control de insectos, con una mortalidad de la plaga entre 40 a 95%. Los hongos más



empleados son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Lecanicillium lecanii*, *Trichoderma* y *Paecilomyces fumosoroseus*. Especialmente para insectos que afectan al maíz; gallina ciega o gusano cogollero (Zelaya-Molina et al., 2022). Finalmente, desde una perspectiva agrícola, el uso de micovirus puede contribuir a una agricultura sostenible basado en un buen programa de manejo integrado de plaga. La contaminación ambiental, ha generado resistencia en las plagas, por lo tanto, es necesario implementar alternativas limpias que reduzcan los efectos nocivos sobre el medio ambiente. Si bien el uso de micovirus suena prometedor, es necesario conocer las interrelaciones ecológicas que se producen entre las plantas-hongos-micovirus.

Debido a lo anterior esta investigación considera de suma importancia la búsqueda de nuevas alternativas para el control de fitopatógenas en plantas de cacao, como son los micovirus, por lo tanto, el objetivo fue evaluar la presencia de micovirus y hongos endófitos en plantaciones de cacao en el estado de Tabasco.



## 1.2. JUSTIFICACIÓN

La producción del grano de cacao a nivel mundial es de gran valor comercial, materia prima de diversas industrias, farmacéuticas, cosmetológica y alimentaria, además es importante para el sostenimiento de muchas familias. Los SAFC presentan múltiples beneficios ecológicos; conservación de fauna y flora, captación de carbono, fortalecer o conservar la humedad y fertilidad del suelo (Drouet Candell et al., 2019; Martin & Ramos, 2021). Uno de los grandes problemas que afecta a la producción del grano es la presencia de fitopatógenos principalmente por hongo. En la actualidad tres hongos han ganado popularidad; principalmente *M. roreri*, seguida de *M. pernicioso* y *P. palmivora*, *megakarya* y *theobromicola* (B. A. Bailey, Evans, Phillips-Mora, et al., 2018). Estos causan pérdidas significativas del grano que oscilar entre el 40 al 100% (Díaz-Valderrama et al., 2020).

El hongo causante de la moniliasis del cacao se ha extendido desde América Latina, Centroamérica y México y se ha extendido en los últimos 50 años. En México los primeros reportes fueron desde el 2005 y en los últimos 20 años la producción bajo de 40 a 20 mil toneladas. La Organización Internacional del Cacao (ICCO), reporta una producción mundial de 4,923 mil toneladas en 2021/2022 (Calderón et al., 2022); el 75% proviene de África Occidental, ocupando el primer lugar de la producción anual y menos del 20% del continente americano. En el 2021, la Secretaría de Agricultura Desarrollo Rural (SEDER), informa que México ocupa el catorceavo productor a nivel mundial con 28,106 toneladas de grano y 44,500 a 47,800 hectáreas de cacao; Tabasco, Chiapas y Guerrero son las principales regiones productoras.

También se enfrenta a otros problemas; cambio de uso de suelo, edad avanzada de las plantaciones, bajo rendimiento, no utilizar fertilizantes y deficiencias en el manejo de control de plagas (Córdova-Ávalos et al., 2001). Esta última es una estrategia más amigable, a diferencia del control químico, que si bien es efectivo, pone en riesgo a la agricultura sostenible y al medio ambiente. El control biológico utiliza a los agentes microbianos; bacterias, hongos y virus, sustituyendo a los pesticidas químicos (Ayaz et al., 2023). Estos tienen grandes beneficios para la agricultura, que incluyen desde un microbiota saludable



del suelo, favorecen la salud de las plantas, brindan protección a las plantas o están interactuando con el patógeno directa o indirectamente para disminuir la enfermedad de la planta (Catarino et al., 2015; Khan, Nerva, et al., 2023).

Unos de los agentes novedosos es el uso de micovirus, el beneficio de estos surge como medida de control biológico del tizón del castaño (*C. parasítica*-CHV1), permite conocer la expresión de la virulencia del hongo patógeno. Este virus es un modelo básico para emplear estrategias de control biológico, si se pretende utilizar a los micovirus para el biocontrol es importante conocer la historia desde la infección del patógeno (Dennert et al., 2019). Estos agentes virales han presentado éxito en diversos cultivos, frijol, lentejas, berenjenas, fresas y plantas de ornato entre otros cultivos de interés económico.

Se ha demostrado más de una vez y en diferentes nichos ecológicos la capacidad de los micovirus para cruzar barreras entre especies, esto explora mejor su potencial como agentes de control biológico. Probablemente las alteraciones fenotípicas (hipovirulencia) causada por lo introducción de micovirus en nuevos huéspedes, pueda ocurrir en la naturaleza. Este hallazgo puede permitir nuevos horizontes para su aplicación, sin embargo faltan más estudios para establecer conclusiones (Hough et al., 2023; Nuss, 2011). Los virus a través de la supresión de los mecanismos antivirales, puede cambiar la incompatibilidad vegetativa y transmitirse a otras especies, es un fenómeno es importante al momento de establecer las estrategias de biocontrol (Ghabrial & Suzuki, 2009).

La hipovirulencia puede tener como resultado la falta de producción toxinas fúngicas (aflatoxinas), regulación positiva de metabolismos asociados a lípidos, polisacáridos y aminoácidos en hongos con virus, mejora la patogenicidad de los hongos y aumenta la adaptabilidad en el medio ambiente y son capaces de modular una serie de vías moleculares, lo que da como resultado una alteración del metabolismo primario y secundario (Zhang et al., 2023; Zhao et al., 2020).

Por todas estas razones y el bajo rendimiento de la producción del grano de cacao, se considera de suma importancia establecer otras posibles estrategias de control de fitopatógenos en cacao, como es el uso de micovirus. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la presencia de micovirus y hongos endófitos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao L.*), en Tabasco.



## 1.3. ANTECEDENTES

### 1.3.1 Hongos endófitos infectados por micovirus

La diversidad del microbioma endohifal y el impacto en la biología del huésped fúngico aún no es muy clara, pero es ampliamente conocida en donde están involucrado diversos aspectos fisiológicos de los hongos y procesos del ecosistema. Las investigaciones facilitarán la información completa de las interacciones y funciones de los hongos dentro de los microbiomas (Debarbieux et al., 2017; Kelliher et al., 2023). Es importante mencionar a la micoesfera, zona rodeada por micelio de los hongos que se caracterizan por una elevada diversidad y actividad biológica.

En esta zona se produce intercambio de información genética entre los hongos y los micovirus (virus fúngicos), el estudio micoviral nos permite comprender la coevolucionado de estos organismos, puesto que diversos virus fúngicos están ampliamente distribuidos en todos los grupos principales de hongos (figura 1). Se ha sugerido que estos virus evolucionan en conjunto con sus hospederos, cabe señalar que se ha encontrado diversos mecanismos de defensa viral y esto puede depender del hospedero-virus y la planta (Hillman et al., 2018; Kelliher et al., 2023).

Los hongos producen estructuras complejas que son parte de su ciclo de vida, compuestos por orgánulos, lípidos y componentes intracelulares, capaces de almacenar bacterias y micovirus, estos pueden estar incorporados en las células dentro del microbioma endohifal (Hillman et al., 2018; Kelliher et al., 2023). En esta zona se efectúan un flujo genético involucrando a diversos microorganismos. En estos ecosistemas los hongos endófitos obtienen refugio y nutrición a través de los propágulos del huésped, aumentando la protección del huésped y la tolerancia contra diversos factores de estrés (Siddell et al., 2020).



**Esporulación,**  
morfología y  
color del  
cuerpo frutal.

**Crecimiento  
vegetativo**

Crecimiento hifal  
y morfología  
metabolismo/expr  
esión genética  
(transmisión  
horizontal de  
virus)

**Asociación entre  
las plantas y  
hongos endófitos o  
patógenos**



**Interacciones  
biológicas**

Capacidad  
competitiva  
(antagonismo)  
Patogenicidad

**Resiliencia  
ambiental**

Tolerancia  
térmica  
Relaciones  
tripartitas

**Figura 1.** Diversos efectos ejercidos por los micovirus en los huéspedes fúngicos, modificado (Sutela et al., 2019).

Un ejemplo de esta interacción es el primer virus de ARNs (CTHTV) involucra un hongo endosimbiótico "*Curvularia protuberia*" un hongo endófito. Por lo general las plantas no pueden crecer en suelos calientes, pero en el parque de Yellowstone, localizado en EE. UU., se encontró una hierba (*Dichanthelium lanuginosum*) creciendo en los suelos con temperaturas superiores a los 50 °C. Los tres son necesarios para tolerar altas temperaturas, es posible que esta relación tripartita sea común en la naturaleza pero no están estudiadas ampliamente. Ejerciendo tolerancia al calor por el virus favoreciendo a la planta y hongo, basados en sus experimentos con hongos infectados y libres de virus (Márquez et al., 2007). Los posible mecanismo de esta tolerancia al calor puede estar relacionado con osmoprotectores, melanina y proteínas de choque térmico (Morsy et al., 2010; Sutela et al., 2019).



Las infecciones por micovirus ejercen en los huéspedes diversos cambios, implicando alteraciones en el transcriptoma, el ARNs (ARN pequeño), el proteoma y metaboloma, (Hillman et al., 2018). Se han identificado micovirus en hongos endófitos hasta parásitos obligados, seguramente podemos descubrir múltiples beneficios (protección del huésped contra herbívoros, nutrición, refugio y transmisión de propágulos del huésped (Kelliher et al., 2023). Actualmente se encuentran registrado 52 hongos endófitos infectados con micovirus, desde hongo fitopatógenos, patógenos de insectos y humanos (Kotta-Loizou, 2021). Generándose diversas asociaciones mutualistas tripartita con diversos beneficios, sin embargo algunas investigaciones no explican los mecanismos de interacción entre estos organismos (Herrero et al., 2009).

En general los mecanismos moleculares de defensa de inmunidad infección viral del huésped y contradefensa viral, han sido ampliamente documentados principalmente en plantas y animales, debido a la importancia que tienen estos en la salud humana y agricultura, es importante conocer la interrelación viral-proteína-huésped. Una infección por micovirus regula los genes del huésped implicados en silenciamiento del ARN y generación de ARN derivados del micovirus y algunas veces inhibe el crecimiento del hongo. Los micovirus son desencadenantes, ya que algunos casos suprimen el silenciamiento del ARN de la respuesta antiviral del huésped (Kotta-Loizou, 2021). Las plantas así como los hongos han desarrollado mecanismos de ARNi “interferencia por ácido ribonucleico-ARN, importantes para regular la expresión génica y control de patógenos. Las defensas antivirales están involucradas los ARNi proceso por el cual se inhibe de forma específica la expresión de un gen, a través de la degradación del ARN mensajero (ARNm), impidiendo la síntesis de proteínas; guía al ARNi y/o metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM) para atacar a los virus de ARN o DNA (Nuss, 2011; Rodríguez et al., 2022).

### 1.3.2 Micovirus

Los virus fúngicos “micovirus”, utilizan la maquinaria molecular del huésped para su auto-replicación y sostenibilidad. Infectan desde hongos patógenos de planta, humanos e insectos, presentan menor impacto socioeconómico que sus homólogos (virus de plantas y animales)



(Son et al., 2015). Se han reportado en *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota* y *Neocallimastigomycota*, se localizan principalmente en el citoplasma y mitocondrias (Myers & James, 2022a). El primer registro fue en 1962 en *Agaricus bisporus* (champiñón) infectado por *Agaricus bisporus* virus 1 (AbV-1) (Hollings, 1962). Posteriormente Banks y col. (1968), identificó partículas virales de ARN bicatenario (ARNds) en *Penicillium stoloniferum*. Desde entonces el interés sobre estos virus que infectan a hongos son de gran importancia para la virología, algunos autores mencionan el inicio de la micovirología (Myers & James, 2022a).

Se consideran de naturaleza críptica debido a que sus huéspedes no presentan sintomatología. Mientras que algunos micovirus llevan una vida oculta otros provocan alteraciones fenotípicas “hipovirulencia”; cambios morfológicos y fisiológicos, que incluyen la producción de toxinas, alteraciones citológicas de orgánulos celulares y rasgos asociados a la virulencia, como la tasa de crecimiento, esporulación y actividades enzimáticas (Ghabrial et al., 2015b; Hillman et al., 2018). Esta peculiaridad los hace atractivos, debido a sus posibles beneficios en la agricultura, como agentes de biocontrol o comprender a sus huéspedes, caso contrario de sus homólogos, que han causados diversos problemas a nivel mundial (H. Wang et al., 2021).

El genoma de estos virus varía de 2,5 a 23 kb y codifican 12 genes. El gen de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), es el principal para establecer características constantes en todos los virus de ARN (Peyambari et al., 2021). En la actualidad se han descrito más de 200 micovirus, total o parcialmente y se han detectado en casi todos los linajes; hongos filamentosos, endófitos, patógenos y algunas levaduras, que equivale entre un 50 a 80% de las especies fúngicas se encuentran infectadas.

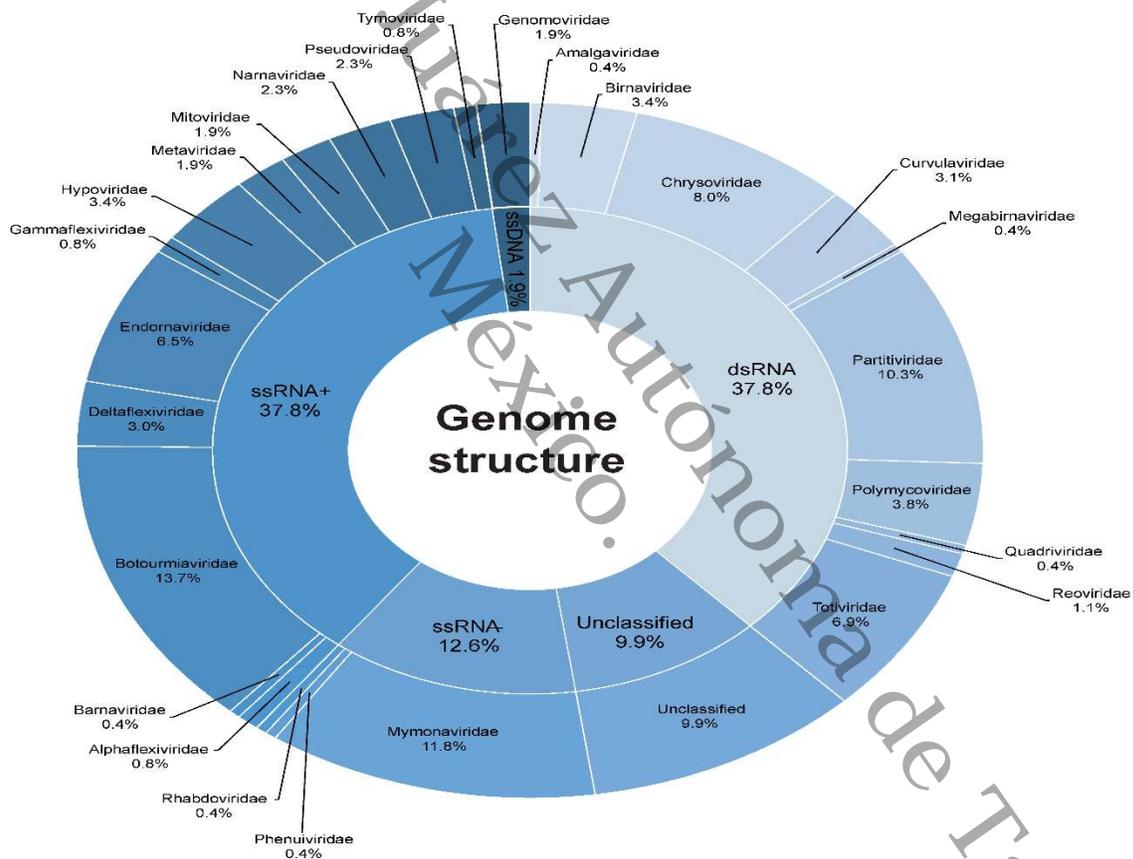
Actualmente se ha identificado micovirus en hongos entomopatógenos contra artrópodos (*Beauveria* sp., infectada por un virus de la familia *Partitiviridae*) y podrían utilizarse como micopesticidas, en *Aspergillus* y *Penicillium* que causan enfermedades en humanos (Kotta-Loizou, 2021). Por lo tanto, si tomamos en cuenta las aportaciones realizadas en los años 60



hasta la actualidad, podemos observar un aumento en las investigaciones científicas. Sin embargo aún quedan una gran diversidad de micovirioma por clasificar y descubrir.

### ***Taxonomía***

Actualmente están clasificados en 23 taxones (figura 2), según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICVT). El comité ha optado el sistema binomial género/especie para los virus; nombre del género más un epíteto de especie, género más epíteto alfanumérico y texto de forma libre (ejemplo, *C. hypovirus* 1-CHV1) (Siddell et al., 2020).



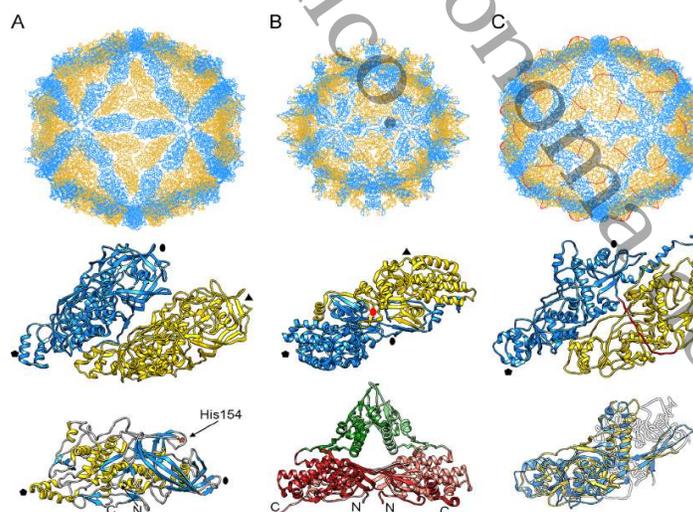
**Figura 2.** Clasificación de lo micovirus (23 taxones), según el comité internacional de taxonomía Viral (ICVT) (Villan Larios et al., 2023).



Presentan diversos genomas el más abundante son los virus de ARN de doble cadena (ARNds) empaquetados en partículas isométricas, ARN monocatenario (ARNss) y ADN monocatenario (ADNss). Las familias virales de ARNds son *Partitiviridae*, *Amalgaviridae*, *Quadriviridae*, *MegabiARNviridae*, *Reoviridae*, *Polymycoviridae*, *Totiviridae* y *Chrysoviridae*. Para los ARNss; *Narnaviridae*, *Hypoviridae*, *Hadakaviridae*, *EndoARNviridae*, *BaARNviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Mitoviridae*, *Alphaflexiviridae*, *Deltaflexiviridae* y *Yadokariviridae*. Los ADNss están representados por una familia *Genomoviridae* (Myers & James, 2022a).

### ***Virus de dsARN***

La familia *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae* y *Reoviridae*, presentan simetría icosaédrica (20 caras triangulares alrededor de la superficie) con un genoma dividido de 2 a 12 segmentos. Su genoma viral está protegido por una cubierta, llamada cápside (Figura 3). Todos carecen de una fase extracelular en sus ciclos de vida, almacenándose en el citoplasma del hongo (Ghabrial & Suzuki, 2009).

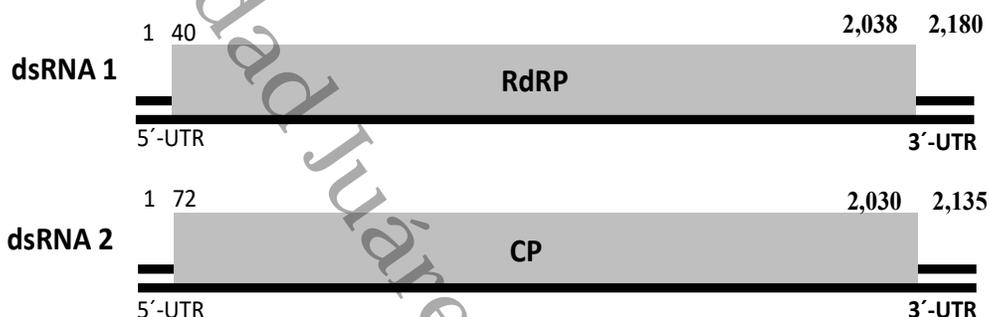


**Figura 3.** Estructura 3D de la cápside un micovirus (Ghabrial et al., 2015).

Los *Partitiviridae* son una familia de virus pequeños, isométricos de 34-42 nm de diámetro, sin envoltura con un genoma de dsARN bisegmentado de 3-4.8 kbp. Se han descrito tres.



géneros *Partitivirus* que infectan a los hongos, *Alphacryptovirus* y *Betacryptovirus* a las plantas, y *Cryspovirus*, los cuáles perjudican a los protozoos. Su replicación ocurre en el citoplasma y el ARN genómico actúa como plantilla para la síntesis de ARN mensajero (ARNm) en la partícula viral, su transcripción es por mecanismos semiconservados (Jiāng et al., 2022).



**Figura 4.** Representación del genoma bipartito. El dsARN1 (RdRP: ARN de polimerasa dependiente) y dsARN2 (CP: proteína de la cápside). UTR: Región No Traducida (<https://talk.ictvonline.org/>).

Representado por 5 géneros con 45 especies y 15 no asignados. Poseen dos segmentos genómicos esenciales que codifica dos proteínas, el ARN1 codifica la RdRp y el ARN2 (proteína de la cápside. CP). La cápside está compuesta por 120 copias de una sola proteína dispuesta en 60 dímeros con simetría icosaédrica (T1, número de triángulos). En una revisión realizada por Peyambari y col. (2014), menciona que algunos representantes de la familia *Partitiviridae* presentan ARN satélite, los segmentos lineales son de 1.4 -2.4 kbp (Figura 4 y tabla 1). Los genes que codifica ARN polimerasa (RdRps) son los más conservados entre los virus de ARN, el análisis filogenético sugiere su origen polifilético (su origen es controvertido) para los virus dsARN, agrupándose en diferentes subgrupos (Hough et al., 2023; Jiāng et al., 2022).

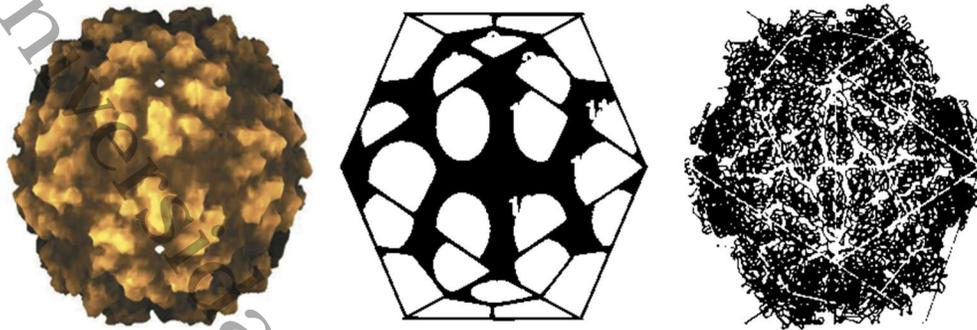


**Tabla 1.** Rangos de los segmentos del genoma y longitudes de proteínas de los cinco géneros de la familia *Partitiviridae* (Fuente: ICTV, 2019-<https://talk.ictvonline.org/>).

Género	dsARN1 (bp)	dsARN2 (bp)	RdRP (aa)	CP (aa)
<i>Betapartitivirus</i>	2180-2444	2135-2354	663-746	636-686
<i>Alphapartitivirus</i>	1873-2027	1708-1866	581-621	463-521
<i>Gammapartitivirus</i>	1645-1787	1445-1611	519-539	413-443
<i>Deltapartitivirus</i>	1563-1696	1415-1575	472-479	337-430
<i>Cryspovirus</i>	1786-1836	1374-1510	524	3169

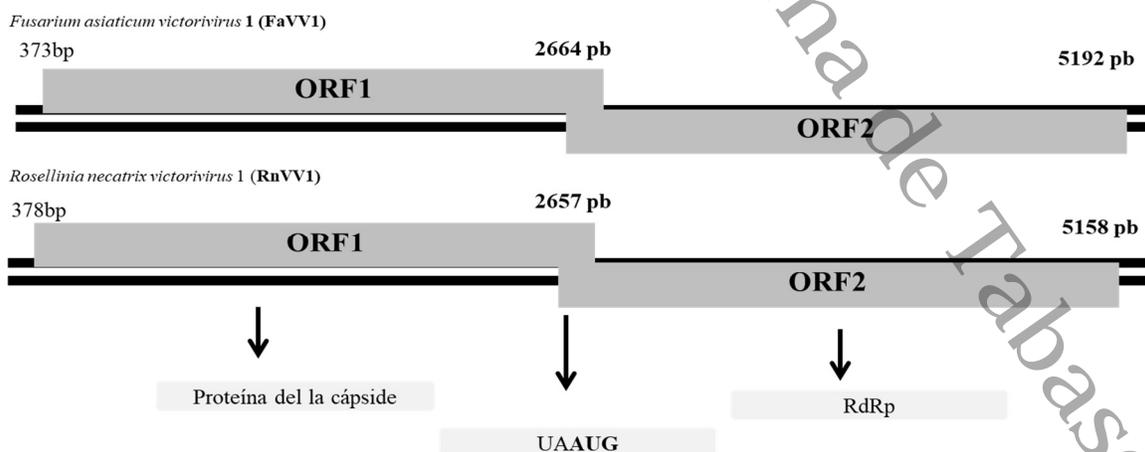
Los miembros con genomas de dsARN pueden infectar una amplia gama de huéspedes; vertebrados, invertebrados, hongos, plantas, protozoos y bacterias. Según Kamaruzzaman y col. (2019), la familia *Partitiviridae* no tiene efectos negativos en sus huéspedes, por lo tanto son candidatos idóneos para el virocontrol de enfermedades patógenas. Entre los virus caracterizados se encuentran a *Rhizoctonia solani partitivirus 2* (RsPV2), *Sclerotinia sclerotiorum partitivirus 1* (SsPV1), *Botrytis cinerea partitivirus 1* (BcPV1) y *partitivirus 1* (BfPV1), causantes de hipovirulencia en el patógeno (*Rhizoctonia solani*, *S. sclerotiorum*, *B. cinérea*, *Botryotinia fuckeliana* respectivamente). Hasta la fecha no hay registros de que este género se transmita a las plantas (Peyambari et al., 2021).

La familia *Totiviridae* al igual que los *Partitivirus*, infectan a protozoarios, metazoos y hongos. Está conformado por cinco géneros *Giardiavirus*, *Leishmanivirus*, *Trichomonasvirus*, *Totivirus* y *Victorivirus*, constituidos por un genoma de dsARN lineal no segmentado (bicistrónicos monosegmentados) de 4.6-7.0 kbp de longitud (Li et al., 2019).



**Figura 5.** Estructura atómica del virión, consta de doble eje icosaédrico (Fuente: ICTV, 2019-<https://talk.ictvonline.org/>).

Los representantes son isométricos (figura 5) y codifican una proteína necesaria para la cápside (Li et al., 2019). Codifica dos ORF 1 y 2 parcialmente superpuestos en una sola cadena, codifican la proteína de la cápside y RdRp (Respectivamente), los géneros que infectan a los hongos son los *Totivirus* y *Victorivirus*, este último solo infectan a hongos filamentosos (Jiāng et al., 2022). El género *Totivirus* infectan a las levaduras, en una revisión efectuada por Ghabrial, et al., (2015), reporta a los siguientes anfitriones *Saccharomyces cerevisiae*, *Sheffersomyces segobiensis* y *Xanthophyllomyces dendrorhous*, el hongo *Ustilago maydis* y a un hongo subterráneo *Tuber aestivum*.

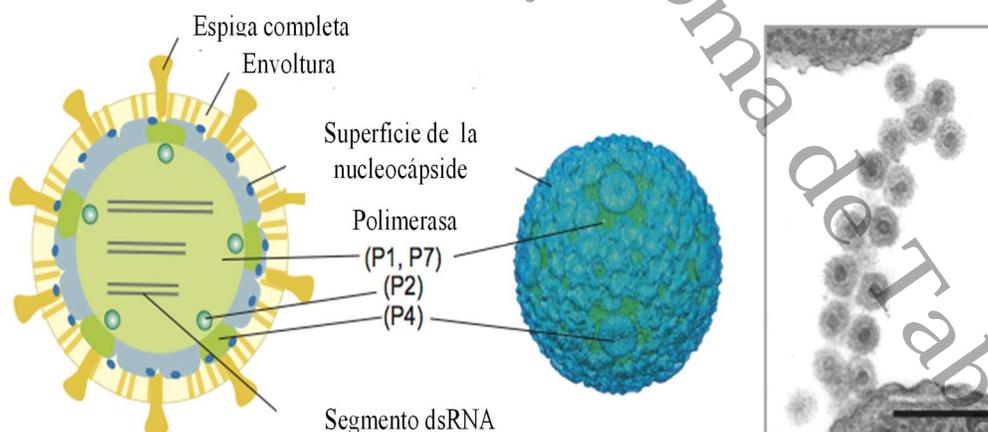


**Figura 6.** Organización del genoma de FaVV1 y RnVV1. El pentanucleótido “UAAUG” (Modificado, Li et al., 2018).



Li y col., (2019) reportaron al género *Victorivirus* en *Fusarium asiaticum*, causante del tizón de la cabeza de *Fusarium* en China, el virus *Fusarium asiaticum victorivirus* 1 (FaVV1). Su genoma consta de 5.281 nucleótidos de largo, alto contenido de Guanina (G) y Citocina (C) del 64%, presenta al comienzo del ORF2 un pentanucleótido (UAAUG), característica típica del género *Victorivirus* (*Rosellinia necatrix victorivirus* 1 (RnVV1), virus de ARN *Ustilaginoidea virens* 1 y *AlteARNria arborescens victorivirus* 1 (Figura 6).

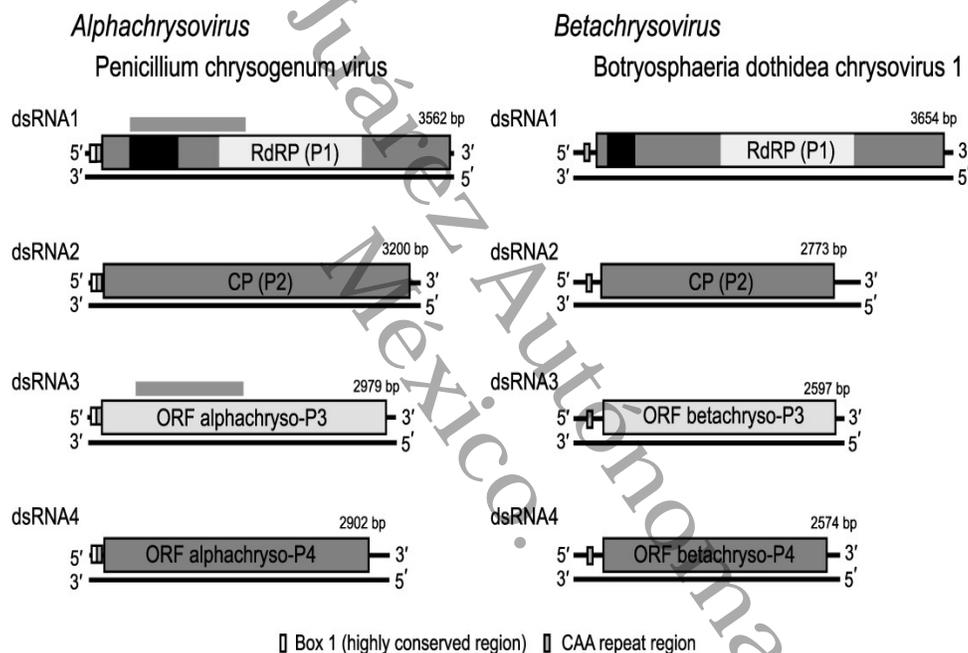
En la figura 7 se muestra un esquema de un *Crysoviridae*, al igual que los *Partitivirus* y *Totiviridae*, presenta un genoma de dsARN. Una morfología esférica (icosaédrica) de 85 nm de diámetro y cubiertos de espigas. Su virión está envuelto y contiene genoma de dsARN segmentado lineal (12.7-15 kb), cuatro segmentos en su genoma monocistrónico y alto contenido de G+C con 56%. El dsARN1 codifica a RdRp y dsARN a la cápside principal (Figura 10). Las proteínas P3 y P4 correspondientes a dsARN 3 y 4 su función es desconocida. Mientras que las proteínas P3 presentan actividad en la unión con los ácidos nucleicos (Ghabrial et al., 2015b; Hough et al., 2023; Jiāng et al., 2022). La cápside es un complejo de polimerasa responsable del empaquetamiento, replicación y transcripción del genoma y la capa superficial de la nucleocápside tiene una asimetría T=13 (compuesta por 60 unidades asimétricas de 13 proteínas, con un total de 780 PC).



**Figura 7.** Representación esquemática de la partícula de *Crysoviridae* P1 al P7 son las proteínas (Fuente: ICTV, 2019, <https://talk.ictvonline.org/>).



Los *Chrysoviridae* se han aislado en *Fusarium* el virus, *Fusarium graminearum* virus-ch9 (Fgv-ch9), *Fusarium graminearum* virus 2 (FgV2) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi mycovirus* 1 (FodV1) (Li et al., 2019). Se les asocia a infecciones asintomáticas, según Li et al., (2019) hay miembros que causan cambios en la morfología colonial pero el CITV aún no los reconoce como Chrysovirus. Carecen de ciclo extracelular acumulándose en el citoplasma del anfitrión y así transmitirse vía intracelular durante la división celular o por transferencia de esporas o anastomosis hifal, siempre deben ser compatibles (Peyambari et al., 2021).

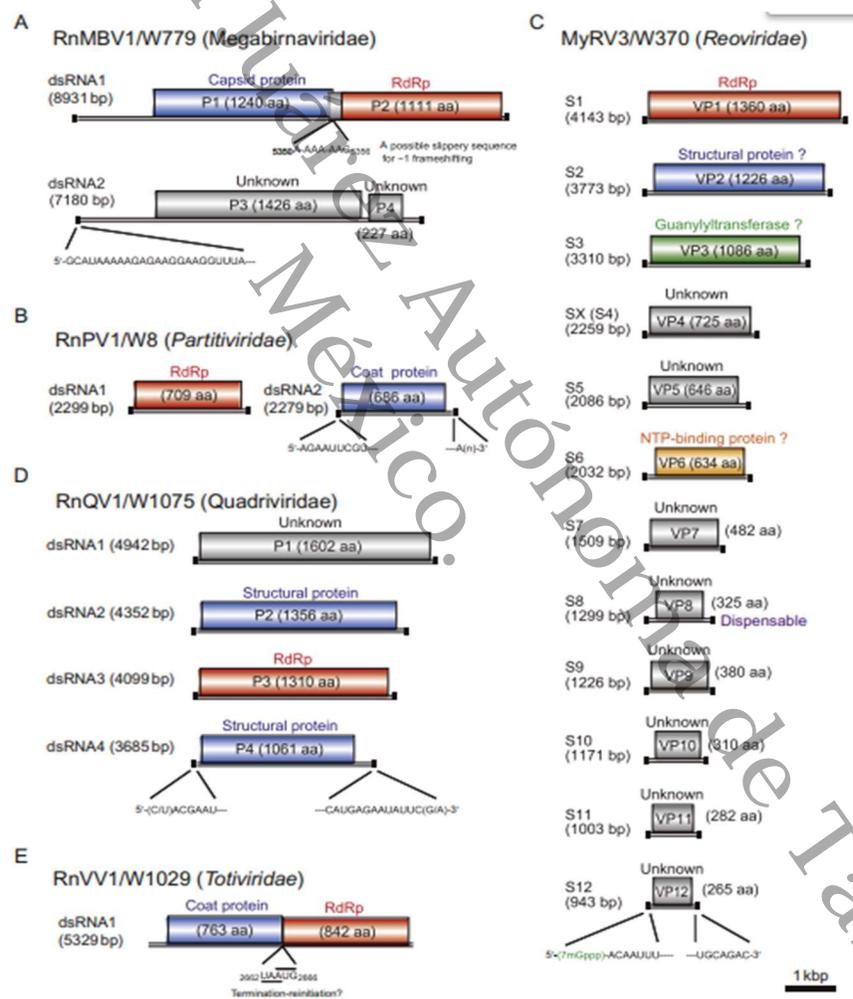


**Figura 8.** Genoma del virus *Penicillium chrysogenum* (PcV) y del virus de la *Botryosphaeria dothidea* 1 (BdCV1) de la familia *Chrysoviridae*, sus genomas están representado por cuatro segmentos de dsARN, cada uno monocistrónico (ARN1 al 4). dsARN1 representa el motivo RdRP, dsARN2 codifica a la cápside, dsARN 3 y 4 se desconoce su función (Fuente: ICTV, 2019-<https://talk.ictvonline.org/>).

Los virus Mycoreovirus 1 (MyRV1) y Micoreovirus 2 (MyRV2) son miembros de la familia *Reoviridae*, fueron reportados en huésped fúngicos por primera vez por Enebak, Hillman y



Macdonald en 1994 en *C. parasitica*. El Microreovirus 3 (MyRV3) en *R. necatrix*, su genoma está constituido por 12 segmentos, causante de hipovirulencia, los cuáles producen cambios en la morfología fenotípica del anfitrión (Ghabrial et al., 2015b; Hough et al., 2023; Jiāng et al., 2022). MyRV1 y MyRV2, infectan a *C. parasitica*, MyRV3 son miembros del género Mycoreovirus de la familia *Spinareovirinae*. El virus MyRV1 el segmento que genera la proteína viral (VP) VP10, la cual suprime las hifas aéreas, VP4 favorece la propagación eficaz del virus, a través de los conidios e inducción de síntomas (figura 8).

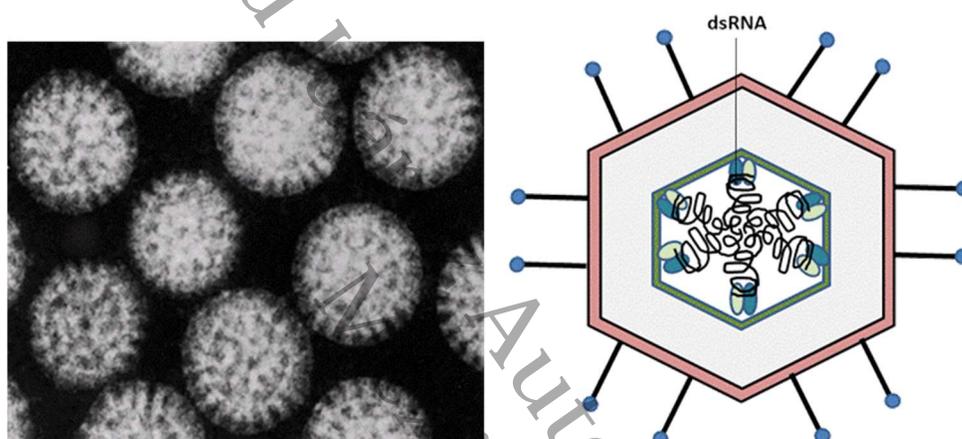


**Figura 9.** Genoma de cinco virus *R. necatrix*. A) RnMBV1, megabiARNvirus; B) RnPV1, Partitivirus; C) MyRV3, micoreovirus; D) RnQV1, quadrivirus; E) RnVV1, victorivirus. Las



líneas gruesas continuas y las cajas abiertas representan dsARN y ORF. Las funciones de cada segmento se presentan dentro o arriba de la caja del ORF. VP son proteínas estructurales que conforma el genoma viral (Kondo et al., 2013).

Los *Reoviridae* tiene una morfología simetría icosaédrica, de 60-80 nm de diámetro, con 45 % de G+C, su cápside está organizada por tres capas de proteínas rodeadas de 9, 10, 11 o 12 segmentos lineales (figura 9), codifican al RdRp, NTPasa, helicasa y enzima de protección y transmetilasa (Kondo, Kanematsu & Suzuki, 2013; Wei et al., 2013; ICTV, 2019).



**Figura 10.** Morfología del *Reoviridae*, representando su triple capa y proteínas. (Fuente: ICTV, 2019-<https://talk.ictvonline.org/>).

La familia *Quadriviridae* virus de dsARN, está integrada por un género *Quadrivirus* e infecta exclusivamente a los hongos filamentosos. El ICTV, reporta que los cuadrivirus carecen de una fase extracelular, transmitiéndose intracelularmente por anastomosis hifal siempre que sean compatibles, se ha citado, que no intervienen algún vector o si presentan una fase extracelular (Jiāng et al., 2022).

Los cuadrivirus están conformados por cuatro segmentos genómicos encapsulados en viriones esféricos de 45 nm de diámetro, su cápside consta de 60 copias heterodímero de dos proteínas P2 y P4, las cuales codifican dsARN2 y dsARN4 consecutivamente, estas forman la subunidad heterodimérica asimétrica.

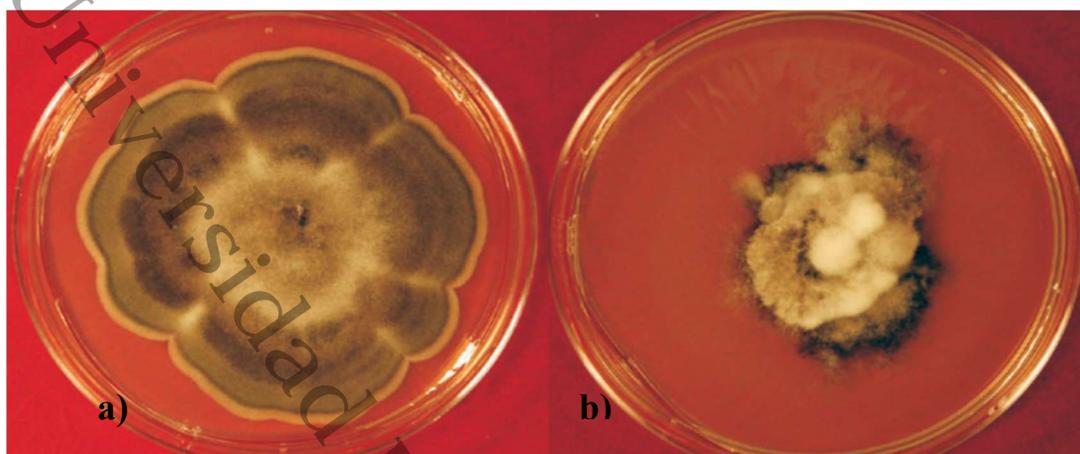


### ***Mecanismo de transmisión***

Los micovirus carecen de una fase extracelular y de vectores naturales ( artrópodos, murciélagos, anélidos) a diferencia de los virus de animales y vegetales, que, si lo presentan, comportándose como parásitos intracelulares obligado, lo que hace que pasen desapercibidos.

Debido a la ausencia de rutas extracelulares de transmisión puede ser debida a la facilidad que presenta de pasar de una célula a otra mediante intercambio de información genética en hongos, como fusión de hifas o anastomosis hifal (transferencia horizontal de genes) y heterocariosis (transferencia vertical de genes) y se diseminan a través de esporas, en donde hay intercambio citoplasmático entre hongos compatibles (Ghabrial & Suzuki, 2009; Nuss, 2011), sin embargo se encuentran distribuidos en la mayoría de los taxones fúngicos, con un origen muy antiguo. La transferencia horizontal de los genes es importante en la evolución de algunos micovirus, capaz de generar diversidad genética ampliamente. Este mecanismo se encuentra en los Retrovirus, virus de ADN y ARN sentido positivo, en algunas ocasiones en virus en sentido negativo y virus ARNds (Liu et al., 2012). Las estimaciones de la incidencia de micovirus sugieren que el 30-80 % de las especies de hongo pueden estar infectados (Ghabrial et al., 2015a).

En la mayoría de los huéspedes infectados, los micovirus parecen estar latente, ya que, en mayoría, los hongos no presentan ningún síntoma. A simple vista es difícil determinar un hongo infectado, es necesario comparar con hongos sanos (figura 11), se observan cambios en la morfología, fisiología, rasgos asociados a la virulencia tales como velocidad de crecimiento, producción de toxinas, alteraciones citológicas de organelos celulares, esporulación, pigmentación y actividad enzimática (Nuss, 2011). Es una asociación virus-hongo, los hongos patógenos infectado disminuyen su virulencia hacia la planta huésped, a este fenómeno se le conoce como hipovirulencia (Bocos et al., 2022).



**Figura 11.** Morfología colonial de un hongo Fitopatógeno del agente causal de la Victoria blight en avena. a) Colonia libre de virus; crecimiento del micelio uniforme en toda la placa, b) hongo infectado (enfermo) el micelio se encuentra atrofiado. Infectado por *Victorivirus Helminthosporium victoriae* virus 190S (HvV190S) (Ghabrial & Suuki, 2009).

### ***Los micovirus un aliado de la agricultura frente al cambio climático***

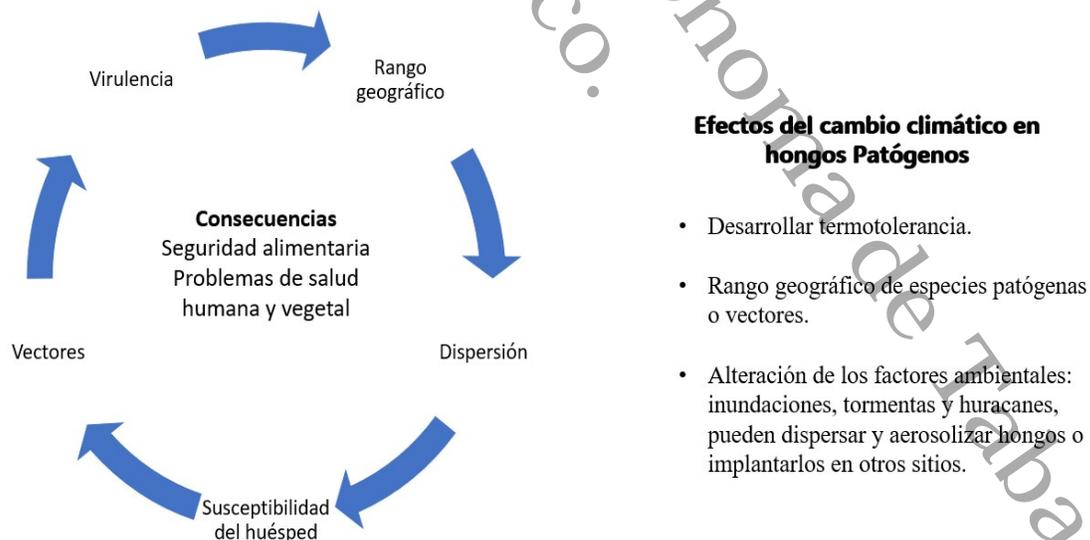
Los sistemas agroforestales nos proporcionan uno de los servicios más importantes para el sostenimiento de la vida humana el alimento. Debido al aumento poblacional se requiere cada día más recursos para satisfacer las necesidades humanas. Predecir estas consecuencias del cambio climático aun representa un desafío, ya se ha establecido modelos como rendimiento de los cultivos y secuestro de carbono, estos forman parte de los servicios proporcionado por los servicios ecosistémicos La deforestación de los sistemas agrícolas es una de las causas más importantes de pérdida o degradación de la biodiversidad y los servicios ecosistémicos relacionados en todo el mundo y están contribuyendo a la emisión de gases de efecto invernadero del sector agrícola (Mortimer et al., 2018). Los hongos fitopatógenos también representan una amenaza para la seguridad y prosperidad alimentaria, afectando significativamente a este sector (figura 12).

Debido a la relación que existe actualmente entre el clima y el desarrollo de patógenos, el cambio climático ocasionada la prevalencia y gravedad de enfermedades humanas, animales y vegetales. Al haber estos cambios en el clima las plantas también pueden ir



cambiando y se pueden introducir especies exóticas emergiendo nuevas plagas para las plantas. Nnadi & Cart (2021), refuerzan la idea de los efectos negativos del cambio climático en las poblaciones fúngicas, pueden desarrollar termotolerancia, y la adaptación gradual al aumento de temperatura causado por el cambio climático, puede aumentar el rango geográfico de especies patógenas o sus vectores, además están involucrados la alteración de los factores ambientales; inundaciones, tormentas y huracanes, pueden dispersar y aerosolizar hongos o implantarlos en otros sitios.

En una investigación realizada por Li y col., (2023), revela que los efectos del cambio climático afectan significativamente las poblaciones de hongos fitopatógenos en los ecosistemas de bosques (37,27–79,12%) y tierras de cultivo (34,93–82,51%) y en el suelo (11,95–28,19). %, hábitats de brotes de plantas (38,63–96,14%) y raíces (29,99–78,16%) en todos los escenarios de cambio climático. Los géneros que predominaron fueron: *Fusarium*, *Alternaria*, *Acrodontium*, *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Erysiphe* y *Pseudocercospora*. De forma general los fitopatógenos ponen el riesgo el almacenamiento global de carbono, la seguridad alimentaria y la sostenibilidad de los ecosistemas.



**Figura 12.** Efecto el cambio climático de enfermedades en plantas y animales (modificado (Nnadi & Carter, 2021).



Una de las herramientas para disminuir estas enfermedades es mediante productos químicos (carbofuran y carbendazim), a veces son ineficaces o no son específicos y dañan los suelos y mantos acuíferos (Li et al., 2023). Además estos productos químicos reducen significativamente las poblaciones microbianas, importantes para el sostenimiento del suelo e involucrados en los ciclos biogeoquímicos como fijación de carbono y nitrógeno (Vargas-González et al., 2019).

En este sentido los micovirus pudieran contribuir a la disminución de productos químicos, como se ha demostrado desde hace más de 50 años desde el descubrimiento de estas partículas y con el mejor ejemplo más conocido de interacciones entre virus y hongo, la hipovirulencia que ejerce *C. hipovirus 1 (CHV1)* en *C. parasítica*, el hongo causante del cancro letal del castaño. El beneficio de estos micovirus surge como medida de control biológico del tizón del castaño y permite conocer la expresión de la virulencia del hongo patógeno. Este virus es un modelo básico para emplear estrategias de control biológico, si se pretende utilizar a los micovirus para el biocontrol es importante conocer la historia desde la infección del patógeno, características de infección de los virus y sobre todo la interrelación del hongo-virus. Finalmente el estudio de la biogeografía de los microorganismos nos puede ofrecer una herramienta para utilizar a las comunidades microbianas como la macroecología que revela la función de estos microbiomas, ya que hasta la fecha se han descrito diversos hongos y bacterias como biocontrol.

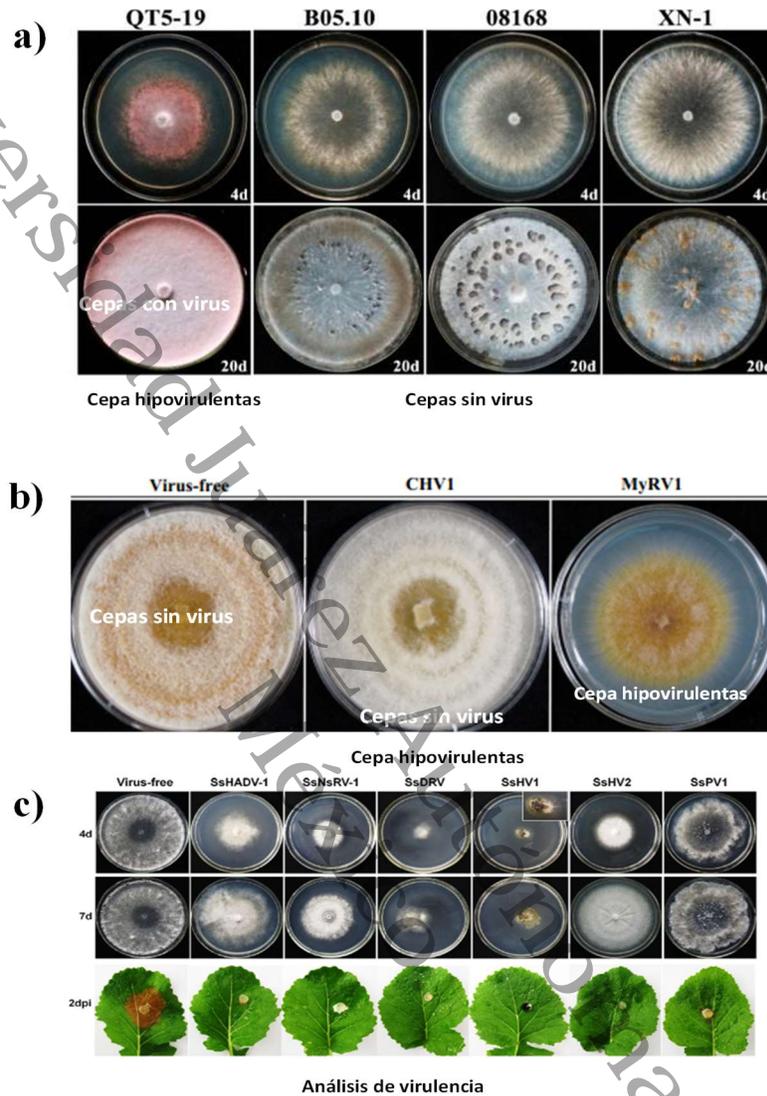
### ***Mecanismo de control hongo-virus: hipovirulencia***

Algunos virus fúngicos tienen la capacidad de convertir el estilo de vida del hongo huésped de un estado virulento a hipovirulento. La hipovirulencia es la atenuación de la virulencia fúngica mediada por micovirales, esto quiere decir, que no pueden producir daños graves a la planta hospedera a causa de una infección por virus en el hongo (figura 13). Fenotípicamente, la cepa fúngica presenta cambios morfológicos y fisiológicos, disminuye la tasa de crecimiento, toxinas, esporulación y actividades enzimáticas (Ghabrial et al., 2015a; Nuss, 2011).



Esta peculiaridad los hace atractivos, debido a sus posibles beneficios en la agricultura, como agentes de biocontrol o conocer al huésped, caso contrario de sus homólogos, que causan diversos problemas a nivel mundial (H. Wang et al., 2021). La hipovirulencia llama la atención de los investigadores por su potencial de utilizarlos como agentes de biocontrol, además permite comprender los mecanismos infecciosos de los hongos. Los especialistas buscan identificar si estos virus ejercen hipovirulencia, basado en detectar cambios en el fenotipo del hongo (Zhao et al., 2020). Esto dependerá del experimento, ya sea, eliminando a los micovirus en la cepa fúngica (curación) y coinfectan nuevamente al hongo y/o utilizar la cepa original (sin eliminar el virus). En este sentido se evalúa los efectos que ejercer los virus en una cepa coinfectada contra la original, algunos autores pretenden comprender los mecanismos moleculares que ejerce el micovirus en su huésped fúngico o su aplicación en la agricultura a campo abierto (Kamaruzzaman et al., 2019; Poimala et al., 2022).

En general las células eucariotas han desarrollado de forma natural el silenciamiento de ARNi (ARN de interferencia), como respuesta a estímulos endógenos o exógeno (virus o transgenes) y controlar los niveles de transcripción de ARNm. Los ARNi son evolutivamente conservados y específicos que regulan la expresión génica, a nivel postranscripcional (PTGS) o transcripcional (TGS) (Jin et al., 2021; Nuss, 2011). Causan alteraciones en el transcriptoma del huésped, a través de interacciones proteína-proteína y activación de silenciamiento del ARN antiviral en el hongo. Esto es posible, debido a que la infección viral suprime o activa genes involucrados en el crecimiento, ciclo celular, genes de señalización como ARN ribosómico o ADN polimerasa; e incluso suprime enzimas que degradan la pared celular de la planta huésped, lo que puede haber provocado la conversión de un hongo patógeno necrotrófico a endófito (Myers & James, 2022a; J. Yu & Kim, 2020).



**Figura 13.** Características culturales de cepas hipovirulentas. a) *B. cinerea*; b) *C. parasitica*; c) *S. sclerotiorum* (Ghabrial et al., 2015a; Jin et al., 2021; Kamaruzzaman et al., 2019).

Los hongos patógenos a través del ARNi pueden suprimir las barreras de defensas de plantas. Intervienen proteínas multidominio altamente conservadas llamadas Dicer (DCL-enzima AARNsa III, que degrada ARN), que convierten al ARNs en pequeños dúplex de ARN (ARNs-ARN de interferencia pequeño) de 21 a 26 pares de bases y se incorpora las proteínas Argonautas (AGO), formando un complejo silenciador inducido por el huésped por ARN



(RISC), este mecanismo es similar en los hongos, que se dirige a la transcripción de ARN, cargado de ARNi y RISC.

Los hongos y las plantas también utilizan la maquinaria de silenciamiento de ARNi para controlar a los micovirus. Lo virus de plantas o fúngicos han generado contradefensas con supresores de ARNi generados por virus (VSR o mico-VSR para micovirus) afectando los ARNi del huésped. El silenciamiento génico por ARNi fue descrito por primera vez en *Neurospora crassa* (Romano & Macino, 1992).

Los mico-VSR inhiben la producción de ARNi viral, secuestran ARN de interferencia pequeño (siARN) dúplex, alteran la función de AGO y DCL, interviene en la biogénesis de micro-ARN. Por lo tanto los VSR permiten la replicación del genoma y desplazamiento viral a nuevas células (Hough et al., 2023).

En una revisión realizada por Rodríguez et al., 2022, explica que el sistema mico-VSR altera la regulación genética importante para el desarrollo y comunicación entre otras células no infectadas. Los micovirus afectan el silenciamiento genético inducido por el huésped (SIGS), encargados de suprimir a los virus, ya que requieren a los ARNi en la célula diana que producen las defensas o patogenicidad, reduciendo el número e ineficacia. Lo anterior se reduce en “hipovirulencia”, la virulencia y patogenicidad se ve eliminada o reducida a consecuencia de una infección por micovirus. Este fenómeno se ha reportado en *C. parasítica* infectada por *C. hipovirus 1* (CHV1), *Sclerotinia sclerotiorum* por SsHADV-1 y por un partitivirus 1 (SsPV1), *Beauveria bassiana* (*B. bassiana chysovirus 2-BbCV2*), *Botrytis cinerea* por *B. cinerea hipovirus 1* y *Rhizoctonia solani* (*R. solani partitivirus BS5*), por mencionar algunos (Nuss, 2005; Sun et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Por otra parte los ARNi implican una respuesta de silenciamiento viral a nivel celular y es importante para una inmunidad innata en plantas y hongos. Los elementos importantes de silenciamiento son DCL y AGO proteínas conservadas (similares en hongos), con actividad de tipo AARNsa III asociadas para procesar ARN pequeños que se incorporan al complejo de silenciamiento (RICS), una hebra pequeña viral es degradada y la cadena guía restante es



dirigida al complejo RICS y es dirigida a AGO que tiene una actividad a AARNsa (Nuss, 2011), finalmente esta complementariedad de secuencia los ARNi cargados con RICS se dirigen a inhibir transcripciones específicas (Hough et al., 2023; Rodríguez et al., 2022).

Cabe resaltar que este mecanismo fue descrito en *Neurospora crassa*, identificando el mecanismo de ARNi y un gen RdRP. Codifica dos proteínas DCL1 y DCL2; dos proteínas similares a AGO (QDE-2 y SMS 2), involucradas en la vía de silenciamiento meiótico. La presencia de RdRP en genomas eucariotas se ha asociado a rasgos evolutivos de genomas virales de ARN portadores de RdRP, según los autores se pudo haber incorporado al genoma del huésped (Rodríguez et al., 2022). En *C. parasítica* también codifica estas dos proteínas DCL1 y DCL2 similares a las presentes en *N. crassa*. En la revisión realizada por Nuss (2011), menciona los experimentos realizados por Segers y col., (2007), el genoma de *C. parasítica* reveló la presencia de DCL1 y DCL 2 iguales a *N. crassa*. La combinación o independientes de DCL 1 y 2 no produjo cambios fenotípicos en *C. parasítica*. Sin embargo una infección por hipovirus CHV-1-EP713 de un mutante de DCL 1 y 2 reveló cambios en el fenotipo de crecimiento arduamente debilitado (Nuss, 2011).

Se han descrito cuatro micro-VSR, la primera la p26 codificado en hipovirus 1 de *Cryphonectria-CHV1-EP713*, *Fusarium graminearum gemytripvirus 1* (FgGMTV1) (Pengfei et al., 2020) y *Phytophthora PpaTbLV1* (Botella et al., 2022). En CHV1-EP713 reportan que sobreexpresa una proteína verde fluorescente (GFP) encargada de detectar la actividad de VSR (Nuss, 2011). Regula negativamente los mecanismos del sistema antiviral de ARNi en el huésped, facilitando la acumulación viral, p26 reduce la transcripción de DCL y AGO induciendo supresión de ARNi (Lihang et al., 2020).

En un estudio realizado por Zhang y col., 2023, utilizaron a p26-D4 proveniente de un virus FgMTV1, logrado modificar molecularmente a FgGMTV1 de ADNss circular de la familia *Genomoviridae*, que infecta a *F. graminearum* (patógeno del trigo y cebada). Los investigadores construyeron un vector basado en silenciamiento genético inducido por FgMTV, con repeticiones en tándem. Transformaron 8 vectores que portaban tamaños diferentes de GFP, utilizando una cepa transgénica de *F. graminearum* PH-1 (PH-



1/GFP) para el silenciamiento. Tres vectores lograron disminuir el crecimiento micelial, pigmentación reducida, colonias anormales y alta concentración viral. Demostraron que el vector basado en FgGMTV1 puede manipularse para silenciar genes de virulencia (tri 1 y 5) de *F. graminearum* y controlar la infección en el trigo. Esto abre una ventana de posibilidades de biocontrol práctico utilizando el vector de silenciamiento genético inducido por virus. Este hallazgo es un nuevo enfoque para el control biológico de enfermedades fúngicas utilizando a los micovirus con cepas hipovirulentas que generan modificaciones en los ARNi.

Un segundo micro-VSR es p24 identificada de *Cryphonectria* CHV4 representa homología con p26. En virus 1 de *Fusarium graminearum* (*Fgv1*) se determinó a p2 suprime la transcripción de DCL2 y AGO1. En un experimento realizado por Hammond et al., 2008, demostró que la actividad VSR induce silenciamiento de ARNi en cepas infectadas por micovirus comparando con las no infectadas. Se han informado p10 y CP (proteína de la cápside) en *Rosellinia necatrix micoreovirus 3* y *Tulasnella partitivirus 2*, pero no se ha documentado su mecanismo de silenciamiento. En *C. parasítica* se han documentado niveles altos de DCL 1 y 2, aumentando de 1,5 a 15 veces, consecutivamente, regulando negativamente postranscripcionalmente (Rodríguez et al., 2022).

En CHV-1 y 2, las proteínas p29 y p27 suprimen a ARNi, por lo tanto, permite mejorar la replicación y produce síntomas fenotipos en el huésped. En *Talaromyces marneffei partitivirus-1* (TmPV-1), se ha reportado regulación negativamente en los niveles de ARNm de las proteínas DCL y AGO en el huésped fúngico (Craven et al., 1993; Hough et al., 2023). Los micovirus ejercen estrategias de silenciamiento viral, que destruyen los ARNm de genes específicos antivirales. La p29 de CHV1 es una proteína de la membrana integral y es susceptible a la digestión proteolítica en ausencia de detergente y por lo tanto predomina en el citoplasma vesícula. Contiene ricos dominios de cisteína y proteasa, sugiere que el virus utiliza la red de Golgi del huésped para su replicación, esto puede estar asociado a los cambios fenotípicos del hongo ejercidos por el virus (Jacob et al., 2006).



## ***Importancia de los micovirus***

Dentro de este marco, se ha mencionado que los micovirus tienen enorme potencial para el control biológico de enfermedades producidas por hongos y sobre todos aquellos virus que ejercen hipovirulencia. Algunos autores señalan que estos virus ejercen modificaciones en el estilo de vida del huésped de patógeno a endófito (Myers & James, 2022b). Los hongos endófitos favorecen el crecimiento de las plantas y resistiendo a infecciones fúngicas. El uso de fungicida se utiliza en muchos cultivos agrícolas, pero presentan una desventaja puede causar resistencia en los hongos y tienen un impacto negativo en el medio ambiente. El cambio climático nos obliga a buscar alternativas o estrategias para el control fúngico que se están generando debido a estas condiciones climáticas (Ruiz et al., 2021).

Los virus infectan básicamente todas las formas de vida celular incluyendo a los hongos, es por ellos el nombre de micovirus virus que infectan a los hongos. La diversidad del microbioma (hongos, bacterias, protozoarios, virus, parásitos), se consideran omnipotente y se encuentran asociados en casi todos los organismos vivos, estas asociaciones pueden ser beneficiosa, neutras o perjudiciales para el huésped. Estudiar las interacciones permite comprender la patogenicidad viral en el huésped fúngico y virulencia del hongo. Esta relación “tripartita” entre virus, hongo y planta, puede establecerse positiva o negativa dependiendo del huésped, sin embargo, aún hay mucho por comprender y documentar, si consideramos que esta área está siendo explorada recientemente (Hough et al., 2023).

El control biológico de plagas es una alternativa atractiva porque tienen menor impacto al medio ambientales, busca combatir plagas utilizando agentes vivos; bacterias, nematodos, hongos y virus. Estos últimos se han utilizado frecuentemente para combatir plagas, ya sea por infección del patógeno o por protección cruzada (vacunación) (Stenberg et al., 2021). Actualmente se utilizan microorganismo como ingredientes activos para el biocontrol como *Bacillus thuringiensis* sp., hongos micoparásitos (*Trichoderma* spp.), biofertilizante (*Penicillium bilaiae*), virus entomopatógenos (baculovirus), *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces variotii* y *Metarhizium anisopliae* entre otros (De Oliveira et al., 2020; Koller et al., 2023).



También está surgiendo la aplicación de ARNds, mencionado en párrafos anterior, tienen la característica de degradar los ARNm mediante ARNi, su alta especificidad de las secuencias permite que los ARNds sean ideales para la aplicación de insecticidas selectivos, ya que es una herramienta sostenible para el biocontrol de insectos y hongos. Sin embargo su aplicación a gran escala aún está en las primeras etapas (Hough et al., 2022).

El estudio micoviral nos permite comprender la coevolucionado de estos organismos, puesto que diversos virus fúngicos están ampliamente distribuidos en todos los grupos principales de hongos. El mecanismo considerado una herramienta de control biológico es la hipovirulencia, que se caracteriza por la atenuación de la virulencia del hongo y consecuente la planta será beneficiada, se ha documentado una serie de mecanismos moleculares que ejercen estos virus en los hongos y en algunos casos las plantas están involucradas. Se encontrado interacciones ventajosas en hongos endófitos y patógenos de las plantas aumentan la virulencia y la tolerancia al calor (Kotta-Loizou, 2021; Umer et al., 2023).

## ***Reportes de micovirus en hongos***

### ***Micovirus en *Phytophthora****

El género *Phytophthora* se componen principalmente de patógenos vegetales con una amplia gama de huéspedes, provocando pérdidas significativas en la agricultura y silvicultura. En *P. infestans* agente causal del tizón de la papa y tomate, se reportan cuatro virus de ARNds denominados *Phytophthora infestans* RNA virus (PiRV 1-4). PiRV 1 y 2 al parecer representan una nueva familia, PiRV3 pertenece a la familia *Fusagraviridae* y el cuarto pertenece a la familia *Narnaviridae*, estos virus se pueden transmitir por anastomosis hifal (Cai, Myers, et al., 2019), solamente en el virus PiRV2, reportan disminución en la virulencia del hongo, pero estimula la producción de esporangio, por lo tanto, se predice que servirá como un factor de aptitud para el huésped del virus (Cai, Fry, et al., 2019). En *P. castaneae* un patógeno oomiceto causante de la pudrición de raíces y troncos de en árboles en Asia se identificaron 4 micovirus *Phytophthora castaneae* (PcaRV1-4), estos virus causan silenciamiento ARNi disminuyendo su virulencia en *P. castaneae*, señalan el autor que falta



investigarse más a fondo (Raco et al., 2022), por lo tanto, aún se está generando información si estos virus causan hipovirulencia y si pueden ser buenos candidatos para el biocontrol de enfermedades fitopatógenas.

En *P. cactorum* patógeno de la fresa, agente causal de la pudrición de la corona y abedul platead, alberga dos virus fúngicos *Phytophthora cactorum* bunya-like viruses 1 y 2 (PcBV1 y PcBV2), en este caso si reduce la tasa de crecimiento en su huésped. La producción de elicinas estaban suprimidas en los hongos infectados, estas proteínas excretadas principalmente por especies de *Phytophthora* y *Pythium*, interactúan con la planta huésped y promueven la virulencia del hongo, lo que indica un supuesto efecto viral en la patogénesis del huésped (Poimala et al., 2022).

### **Hipovirulencia en *Sclerotinia sclerotiorum***

El hongo *S. sclerotiorum* causa pudrición del tallo en más de 400 especies de plantas, causando pérdidas económicas en la producción. La hipovirulencia y la presencia de elementos ARNs en este hongo se ha documentado desde 1990, pero no sé, había estudió a fondo. Se han identificado 33 micovirus; 12 virus de ARNs+, hipovirus 1 de *Sclerotinia sclerotiorum* (SsHV1) y hipovirus 2 de *Sclerotinia sclerotiorum* (SsHV2) en *S. sclerotiorum*; *Sclerotinia sclerotiorum* megabirnavirus 1 (SsMBV), *Sclerotinia sclerotiorum* botybirnavirus 2, *Sclerotinia minor endornavirus* 1 (SmEV1), ocho mitovirus *Sclerotinia sclerotiorum* Mitovirus 1 (SsMV1/KL-1) y SsMv2/KL, por mencionar algunos, es pertinente resaltar que solo cinco son hipovirulentos. Dos virus de ARNs-, ARN de cadena negativa 1 de *Sclerotinia sclerotiorum* (SsNSRV-1) y *Sclerotinia sclerotiorum* rhabdovirus 1 (SsRhV) (Jiang et al., 2013; Jiāng et al., 2022; X. Yu et al., 2010). Además 10 virus de ARNs+: *Sclerotinia sclerotiorum* ourmia-like virus 22 (SsOLV22), *Sclerotinia sclerotiorum* ourmiavirus 17 (SsOV17), *Hubei sclerotinia* RNA virus 1 (HuSRV1) entre otros (Khan, Mukhtar, et al., 2023).

En el trabajo realiza por Marzano y col., (2015), caracterizaron un virus con homología similar a SsHV2, nombrado como *Sclerotinia sclerotiorum* hipovirus 2 Lactuca (SsHV2L).



El virus provenía de *S. sclerotiorum* que fue aislado en lechugas (*Lactuca sativa* L). En este estudio compararon el crecimiento y virulencia en las cepas de *S. sclerotiorum*. En el hongo libre de virus (curado) se observó pigmentación oscura tanto en micelio como en los esclerocios y mayor cantidad de estos. Mientras que en las hojas inoculadas, se observa lesiones que son significativamente diferentes en comparación con los hongos infectados por micovirus. En la cepa con el virus SsHV2L se observó una leve reducción en el crecimiento, la producción de esclerocios fue retrasada y en menor cantidad.

Utilizando microscopia electrónica, los micelios infectados, que contenían vesículas lipídicas con diámetros de 30 a 40 nm, se observó degradación de las mitocondrias y núcleo, un patrón similar también fue reportado en SsHV2, SsNSRV-1, ambos causaron reducción en el fenotipo del hongo (Gao et al., 2020; Khalifa & Pearson, 2014). SsNSRV-1 un mimonaviridos hace que su anfitrión crezca lentamente y pierda patogenicidad. Se transmite horizontalmente a través de fusión de hifas (Jiāng et al., 2022). Los hongos libres de virus no presentaron los cambios antes mencionados (Marzano et al., 2015).

La hipovirulencia por SsHV2L se considera baja a diferencias de otros virus como SsHV2, observando únicamente la de reducción de los esclerocios, estructuras fúngicas de resistencia y propagación para mantener su viabilidad durante largos periodos (Ordóñez-Valencia et al., 2018). Se detectaron en el ORF regiones que codificaban a la proteína p26, con secuencias similares a CHV1 y SsHV2. La proteína p26 es importante para la replicación viral, suprime el silenciamiento del ARN del huésped. La reducción de la pigmentación de SsHV2L puede ser una alteración mediada por el silenciamiento del ARN en la expresión de genes policetido sintasa (regulación de procesos moleculares y celulares) necesaria para la biosíntesis de melanina y podría tener relación con la degradación de los esclerocios. Pero se necesitan más estudios para comprender el silenciamiento a causa de los micovirus en SsHV2L (Gao et al., 2020).

En todos los micovirales detectados en *S. sclerotiorum* causan un debilitamiento leve en su huésped, crecimiento lento en PDA, disminución en esclerocios y desarrollo morfológico



anormal de la colonia. Las interacciones entre los micovirus y sus anfitriones no necesariamente son similares, debido a que los virus y sus huéspedes son diferentes. Estos virus suprimen genes de amplio espectro que tienen funciones en el metabolismo del carbono, energía, síntesis y transporte de proteínas, señales de traducción y respuesta al estrés. Por ejemplo; la pirofosfatasa inorgánica está involucrada en la producción y la conversión de energía, relaciona con el crecimiento hyphal y desarrollo de esclerótica y la infección en las cepas infectada por virus se suprime significativamente la escasez de energía. El gen para ciclofilina (involucradas en la virulencia) y la proteína integrina (formación esclerótica y exposición hyphal) en *Magnaporthe grisea*, *B. cinerea*, *C. parasítica* y *S. esclerotiorum* en estas dos últimas se ha documentado supresión de estos genes y por lo tanto, hipovirulencia (Jiang et al., 2013; Rodríguez et al., 2022).

### **Hipovirulencia en *Fusarium***

Las especies de *Fusarium* están presentes en el suelo, partes aéreas y subterráneas de la planta. Este hongo es común en regiones tropicales, templadas y condiciones climáticas extremas como desiertos. Este hongo afecta gravemente a los cultivos (manzana, tomate, caña de azúcar, palmera de aceite, arroz) causando un gran impacto económico. La enfermedad provoca deterioro en la planta, maduración acelerada en los frutos y muerte en la planta (Chitwood-Brown et al., 2021). Hasta la fecha se reportan 29 micovirus en diferentes especies de *Fusarium*; *Crysoviridae*, *Partitiviridae*, *Megabirnaviridae*, *Alternaviridae*, *Fusagraviridae* y *Totiviridae* y un grupo de ARNs no asignado, 11 virus de ARN (+) de cinco familias (*Deltaflexiviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae*, *Fusariviridae* y *Tymoviridae*), un virus de ARNs (+) y ARNs(-) de la familia *Mymonaviridae* (Li et al., 2019). Aunque se ha informado varios micovirales infectando a *Fusarium*, solo un número limitado ejerce hipovirulencia.

El virus *Fusarium graminearum* 1 (FgV1), virus *Fusarium graminearum*-ch9 (FgV-ch9), dos hipovirus *Fusarium graminearum* hipovirus 1 y 2 (FgHV1 y FgHV2) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* micovirus 1 (FodV1) provocan hipovirulencia. Como se mencionó



en párrafos anteriores, es necesario establecer sistemas hospederos de virus/hongos, tanto curados, introducidos artificialmente o coinfectados. Los daños que ejerce el virus en el huésped pueden ser dañinos, beneficiosos o neutrales.

Estos micovirus provenientes de especies de *Fusarium* pueden ser utilizados como agentes de control biológico. Por el ejemplo, FgHV2 y FgHV1 es un hipovirus de la familia *Alphahypovirus*, asociado a hipovirulencia, que incluyen tasa de crecimiento reducida, producción de conidios y concentración de DON (deoxinivalenol). En los experimentos la cepa libre de virus fácilmente se propaga a los nuevos sitios de inoculación a las espigas cercanas portadoras de virus. Las cepas infectadas retrasan el crecimiento micelial, reducen la pigmentación y la cantidad de micotoxinas. En el caso de FgV-ch9 miembro de la familia *Crysoviridae*, también asociado a hipovirulencia, reduce la tasa de crecimiento micelial y reducción de conidiación, morfología anormal de las colonias, citoplasma desorganizado y virulencia reducida.

El resto de los micovirus identificados en este hongo no provocan los cambios fenotípicos. Recientemente se identificó un micovirus que induce hipovirulencia en *F. oxysporum* denominado *Fusarium oxysporum* virus tipo ourmia 1 (FoOuLV1), causando rasgos tipos de hipovirulencia y con capacidad de transmisión horizontal, en los experimentos en plantas infectadas con hongos libre de virus e infectados, se observó disminución fenotípica en las cepas infectadas, en este estudio no se especifica los mecanismos (Zhao et al., 2020).

En un experimento evaluaron la producción de toxina DON de una cepa libre de virus y una cepa infectada con un virus de ARNs. La producción de DON fue significativamente diferente, la cepa con micovirus presentó menor número de toxina en comparación con la cepa sin virus (1.3 y 2,7 conidios por ml consecutivamente). Las esporas fueron colectadas en ambas cepas y se inocularon en plantas de trigo, la patogenicidad de la cepa con virus fue reducida en comparación con la cepa infectada, por lo tanto, el virus ejerce disminución de la virulencia y número de toxina (Sharma et al., 2018).



Un nuevo micovirus de ARNs llamado *Fusarium graminearum* virus de ARNs 5 (FgV5) difiere en relación con la cantidad de toxinas generadas en el hongo infectado, en los experimentos no se encontró diferencias significativas entre las cepas libres de virus, por lo tanto, no se considera hipovirulentos (L. Wang et al., 2018), por lo tanto, la producción de toxinas puede ser un parámetro para establecer la hipovirulencia de un hongo con micovirales.

Las interacciones entre virus-huésped se han estudiado a fondo en *Fusarium*, se sugiere que puedan unirse a los promotores de silenciamiento del ARN del huésped, debido a la homología del ORF2 en de las especies de *Fusarium* con hipovirus. Las proteínas de esporulación, los genes asociados a transcripción y traducción y vías metabólicas se encuentran silenciados en *Fusarium* infectado por FgV1; sin embargo, aún es necesario conocer más a fondo estos mecanismos para los micovirus de *Fusarium*. El ORF codifica proteinasa similar a la papaína (p20) que están estrechamente relacionadas con el supresor de silenciamiento de ARN (p29) de *Cryphonectria hipovirus* 1 (CHV1). Estas características moleculares se reportan en cepas fúngicas fenotípicamente anormales a diferencia de cepas no infectada por virus (Wen et al., 2021).

### **Hipovirulencia del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea***

La enfermedad del moho gris, causada por *B. cinerea*, presenta múltiples factores de virulencia, como proteasas secretoras, enzimas que degradan la cutícula y la pared celular de las plantas, ácido oxálico y proteínas inductoras de necrosis y ARN pequeños. Este fitopatógeno está distribuido a nivel mundial y puede atacar a más de 1,400 especies de plantas de interés comercial; pepino, fresa, tomate, uva y plantas ornamentales. Desde 1990, se estudia la posibilidad de que los hongos sean portadores de micovirus (Hao et al., 2021). Se reportan al virus *Botrytis X* (BVX), *Botrytis cinerea endornavirus* 1 (BcEV1), *Botrytis F* (BVF), *Botrytis cinerea hipovirus* 1 (BcHV1), *Botrytis cinerea Mitovirus* 1 (BCMV1), *Botrytis cinerea mymonavirus* 1 (BcMyV1), *micovirus cinerea mymonavirus* (BbMyV1), *virus del ARN de cadena negativa Botrytis cinerea* (1BcNSRV-1), *partivirus de la Botrytis cinerea* 1 BcPVI, *el virus semejante al virus de la ourmia* (BolV1).



Los virus BcEV1, BcFV1, BcHV1, BcMV1, BcMyV1, BcNSRV-1, BcPV1, BcRV1, and BOLV1, estaban relacionados con fenómeno de hipovirulencia, sin embargo, ninguno de estos virus tenía potencial como agentes de biocontrol de enfermedades causadas por *B. cinerea*. Esto puede relacionarse a transmisibilidad horizontal limitada de los micovirus posiblemente debido a la incompatibilidad de hifas entre los aislados hipovirulentos o baja competitividad de los aislados hipovirulentos infectados con micovirus debido al crecimiento micelial deficiente

En muestras fúngicas de tomate, se observó un aislado de color rosado de *B. cinerea* ligeramente debilitado, identificando a *Botrytis cinerea partitivirus 2* (BcPV2). La cepa QT5-19 (llamada así por los autores), se comparó con otras cepas virulentas. QT5-19 formó colonias de color rosa, sin producción de conidios, esclerocio, sin embargo, la tasa de crecimiento radial no similar al resto de las cepas. En los análisis de patogenicidad en hojas de tabaco, pepino, fresa y uva, se observaron lesiones pequeñas. Las cepas sin virus presentaron colonias color gris con producción de conidios y esclerocios y en las hojas inoculadas formaron lesiones grandes de 3 a 4 cm. Los autores concluyen que la cepa BcPV2 está estrechamente asociada a hipovirulencia de *B. cinerea*. Aunque el virus no reduce su tasa de crecimiento, pero si su patogenicidad ya que se observó disminución de conidios y esclerocios. Probablemente, la tasa de crecimiento de este hongo infectado por BcPV2 puede tener potencial para biocontrol de enfermedades de *B. cinerea*, ya que presenta alta competitividad de crecimiento y transmisión horizontal positiva (Kamaruzzaman et al., 2019). Parámetros similares se utilizaron en una cepa infectada con dos virus de ARNs de la familia *Partitiviridae* con alta similitud en la secuencia de proteínas de la cápside con *Fusarium poae micovirus* ARNs. Los parámetros asociados con la virulencia, actividad lacasa y tasa de esporulación en la cepa con virus fueron bajos en comparación con las cepas libres de virus.

La lacasa es secretada por *B. cinerea* para proteger al hongo de los metabolitos tóxicos formados durante la patogénesis y reducir la actividad de la lignificación del huésped, es capaz de degradar resveratrol y pterossilbena que se encuentran en la uva. Se consideran



patógenos débiles, las cepas donde reducen o suprimen la producción de la lacasa. Por lo consiguiente, el micovirus ejerció la hipovirulencia en la cepa al encontrar estos parámetros de virulencia baja (Potgieter et al., 2013). Otro parámetro para medir la virulencia son las estructuras de infección, que incluyen opresorios y cojines de infección, que desempeñan un papel importante durante los procesos de infección en hongos patógenos de planta, con la finalidad de penetrar en la planta hospedera. En las cepas hipovirulentas infectados con *Botrytis cinerea hipovirus 1* (BcHV1) y *Botrytis cinerea fusarivirus 1* (BcFV1), suprimieron la virulencia de los opresorios y cojines de infección en comparaiión con las cepas curas (Hao et al., 2018).

### **Hipovirulencia del hongo fitopatógeno *Cryphonectria parasitica***

La enfermedad del tizón del Castaño es causada por el ascomiceto *C. parasítica*. En Estados Unidos, se propagó rápidamente, en 1950 había destruido en su totalidad los ejemplares de castaño. Actualmente, se ha documentado cancro del castaño en cuatro continentes: América del Norte, Asia, Europa y África. La plaga ha afectado principalmente las regiones de Italia, extendiéndose a Francia, Suiza y Eslovenia (Rigling & Prospero, 2018). Cabe mencionar que *C. parasítica*, es un patógeno importante en Europa y se encuentra en la lista A2 de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (EPPO, 2023). En 1950 en Italia se informó por primera vez el fenómeno de hipovirulencia por *Cryphonectria hipovirus 1* (CHV1), un virus de ARN no encapsulado de la familia *Hipoviridae* que atenúa la virulencia en las cepas fúngicas comparando con otros hongos virulentos que penetran y destruyen las capas de la corteza (Choi & Nuss, 1992).

Se observó que algunos ejemplares los cancos comenzaban a cicatrizar a diferencia de aquellos que destruían la corteza. Las cepas aisladas en muestras de cancos con infección leve o con cicatrización, presentaron disminución en los conidios, virulencias, pigmentación y crecimiento micelial alterado (MacDonald, 1991). Actualmente, se reportan cuatro hipovirus llamada *Cryphonectria hipovirus 1* y 2 (CHV1, CHV2-Europa), 3 y 4 (CHV3, CHV4-América del Norte). Los virus CHV2 y 3 ejerce una hipovirulencia fuerte: debilitante



sobre el hongo, crecimiento lento, aislamientos de color marrón, micelio fino y conidiación reducida; y las colonias a menudo presentan márgenes lobulados, esporulación normal, producción de pigmento naranja, respectivamente (García-Pedrajas et al., 2019; Hillman et al., 2018).

Utilizando el método de ARN-seq en cepas hipovirulentas con CHV1 se ha encontrado que afecta las vías metabólicas, genes relacionados con metabolito, vías de señalización, virulencia y silenciamiento del ARN antiviral del huésped. Este último tiene la función de suprimir las defensas del huésped evitando que defienda del virus y causar hipovirulencia. Las cepas virulentas (libre de virus) pueden penetrar y destruir la corteza, causando marchitamiento y muerte del hospedero. Caso contrario de las cepas infectas con CHV1 que reducen la sintomatología sanando los canchales para la sobrevivencia de la planta. Los mecanismos moleculares son inciertos y pueden estar relacionados con interacciones postranscripcionales como el silenciamiento de genes o cambios en el metabolismo (Bocos et al., 2022).

También se ha estudiado cepas mutantes del hipovirus CHV1-EP713, que carecen de algunos dominios codificantes para p29 y p40 codificados en el ORFA, y p48 codificado por ORFB, se utilizaron con éxito para mapear factores virales para síntomas y modulación de la virulencia y replicación del virus en cepas hipovirulentas. Estas proteínas interactúan mecanismo de contradefensa para eludir la vigilancia del huésped y puede inhibir la regulación transcripcional. La p26 tiene la función de disminuir los niveles de Dicer y Argonata, proteínas esenciales para el silenciamiento antiviral (Eusebio-Cope et al., 2015). El beneficio de estos micovirus surge como medida de control biológico del tizón del castaño y permite conocer la expresión de la virulencia del hongo patógeno. Este virus es un modelo básico para emplear estrategias de control biológico, si se pretende utilizar a los micovirus para el biocontrol es importante conocer la historia desde la infección del patógeno, características de infección de los virus y sobre todo la interrelación del hongo-virus.



### **Hipovirulencia del hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix***

El ascomiceto *Rosellinia necatrix* causa la pudrición de la raíz en plantas leñosas y herbáceas (aguacate, durazno, frambuesas, cacao, manzana; flores como la rosa, clavel, gerbera) en más de 197 especies que abarcan 50 familias, por lo tanto, está distribuida en todo el mundo (Takemoto et al., 2009). Para su control químico se utilizan fungicidas efectivos, pero ponen en riesgo a la agricultura sostenible y medio ambiente. En *R. necatrix* se reportan virus ARNs de la familia *Reoviridae* (RnMYRV-3W370), *Rosellinia necatrix* partitivirus 2 (RnPV2), *Rosellinia necatrix partitivirus 11* (RnPV11), *Rosellinia necatrix partitivirus 25* (RnPV25) (Telengech et al., 2020), *Rosellinia necatrix fusagravirus 3* (RnFGV3) (Chun & Kim, 2021), *Rosellinia necatrix megabirnavirus 1* (RnMBV1) (Yaegashi et al., 2016).

En este último virus se informó que ejercicio silenciamiento de genes ARNi, debido a una infección viral en *R. necatrix*. Se mencionó en párrafos anteriores, que el silenciamiento de ARN es un mecanismo de defensa contra la infección viral, activando varias proteínas para inhibir la replicación (Complejo de silenciamiento inducido por ARN [RISC]). Utilizando secuenciación del genoma fueron identificadas proteínas similares a Dicer (RnDCL-1 y -2), Argonauta (RnAGL-1, -2 y -3) y cuatro ARN polimerasa dependientes de ARN (RnRdRP-1, -2, -3 y -4). Estas proteínas se encontraban reguladas positivamente por la infección, los resultados de los niveles de expresión principalmente RnDCL-2, RnAGL-2, RnRdRP-1 y RnRdRP-2 en la cepa infectada fueron de 2 a 4 veces mayores a diferencia de la cepa libre de virus.

Sus resultados difieren de *C. parasitica* y *Neurospora crassa* que revelaron regulación negativa en los genes relacionados con silenciamiento de ARN. Por lo tanto, la regulación positiva de los genes relacionados con el silenciamiento del ARN no es necesaria para inducir el silenciamiento del ARN. Probablemente, los micovirus de *R. necatrix* están interfiriendo en otros mecanismos. Los autores señalan que no es muy claro como estos genes están involucrados en el silenciamiento de genes del ARN, pero se encuentra una relación entre los crecimientos anormales de las cepas de *R. necatrix*. Se observó crecimiento



micelial reducido en las cepas transfretadas y colonia anormales. Estas características fenotípicas se reportan en otras cepas infectadas (Arjona-López et al., 2021; Yaegashi et al., 2016) a diferencia de la cepa libre de virus que su tasa de crecimiento micelial es más alta (Kanematsu et al., 2004; Telengech et al., 2020).

### ***Análisis filogenético de micovirus***

El genoma de los micovirus se puede clasificar en ARNds, ARNss y una familia de ADN circular de cadena sencilla, reportado por primera vez por Yu y col. (2009). El micovirus fue aislado de un esclerocio de *S. sclerotiorum* producido en *Brassica napus* enfermo de la provincia Hunan, China. El estudio consistió en realizar un bioensayo de virulencia en *Arabidopsis thaliana* infectada con una cepa libre de virus, una cepa infectada y otra curada. El crecimiento micelar, morfología colonial, y la prueba de virulencia en las hojas se realizó según lo descrito por Zhang y col. (2009). Fueron contados los esclerocios producidos por las colonias y se midió el tamaño de los esclerocios. Para el análisis molecular las muestras fueron obtenidas en papel celofán sobre agar papa dextrosa (PDA) a 20-22 °C. Se extrajo el ADN siguiendo el procedimiento de Sambrook (1989). Para el ARN se utilizó un Kit de Trizol (Invitrogen), tratadas con DNasa I (libre de ARNasa) antes de su uso. Para la secuencia de ADN se utilizó el Kit de gel de ADN de Axygen, amplificado por PCR usando 9-mer cebadores aleatorios y un fragmento de ADN de aproximadamente 400 pb amplificando con un cebador aleatorio (5'CGTCGAATA 3'), confirmando el fragmento de ADN por el análisis de hibridación de transferencia Southern.

La secuencia y análisis filogenéticos del ADN se analizó con DNAMAN 5.2.9 (Lynnon Biosoft). La similitud de secuencias y proteínas se usó la base de datos de GenBank y BLAST. El análisis estadístico de los datos experimentales se llevó a cabo con el programa SAS ANOVA y comparando la diferencia significativa (LSD).

La cepa DT-8 (infectada con virus) se desarrolló lentamente en PDA similar a la cepa Ep.1PN (Infectada con virus ARNds). La cepa DT.8 fue capaz de producir esclerocios alrededor de 3-5 días más largo y fue significativamente menor que la cepa sin virus (DT-8VF). La cepa curada DT-8VF recuperó su virulencia en la planta, en comparación con la



cepa DT-8 la cual debilita al hongo causándole hipovirulencia. Esta cepa durante la extracción del ARNs o ss no tuvo éxito por lo tanto se procedió a realizar la extracción de ADN genómico y se resuspendió en ARNs con tampón TAE y sometiendo a electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En el gel se mostraron dos bandas del ADN genómico del hongo, dos bandas de ADN adicional de 2 kb y 0,3 kb (LDE y SDE respectivamente). La LDE se confirmó que son elementos genómicos virales, que son partículas icosaédricas de 20 a 22 nm de diámetro, con una proteína de peso molecular de 35 KDa la cuales es una proteína de la cubierta (CP). Por lo tanto, la cepa DT-8 presenta un genoma viral DNAss circular, nombrado *Sclerotinia sclerotiorum* hipovirulencia asociado a un virus de ADN 1(SsHADV-1).

El análisis filogenético de SsHADV-1 está relacionado con un virus de plantas, *Germinivirus* su evolución pudo a ver originado de un replicón DNAss que adquirió nuevos genes adquiriendo moléculas para adaptarse a la planta. Presenta similitudes con el virus del garbanzo, del frijol y tabaco.

Su estructura de Rep y genoma son similares a los de Mastreviruses y muestra diferencias en la cápside de todos los *Germinivirus* por lo tanto comparten un ancestro común, adquirido las capas de las proteínas de forma independiente. El descubrimiento de este virus proporciona información sobre la evolución de los *Germinivirus* y sus posibles antepasados. El genoma de SsHADV-1 es muy pequeño y puede extraerse fácilmente a partir de cepas infectadas, por lo tanto, tiene atributos para ser candidato como herramienta genética para estudios genómicos y de control biológico de patógenos fúngicos ya que confiere hipovirulencia y puede ser transmitido vegetativamente y puede extenderse e forma natral en condiciones de campo.

La mayoría de los micovirus de ARNs presentan cápsides isométricas, clasificados en *Totiviridae*, *Partiviridae* y *Chrysoviridae* posee genomas monopartite, bipartido y cuadripartitas, respectivamente. Su evolución aún no es muy clara para los micovirus de ARNs, hay poca evidencia de que haya transferencia horizontal de genes (HGT), por anastomosis hifal. Para conocer la evolución de los micovirus de ARNs por HGT.



**Liu y col. (2012)**, realizaron un análisis filogenético de dos micovirus aislados en *S. sclerotiorum* en plantas de girasol (*Helianthus annuus*) enfermas. Aisladas en PDA a 20 °C, almacenadas a 4 °C para su conservación. La extracción y purificación de los micovirus, se realizó triturando el micelio en nitrógeno líquido, eliminando ADN y ARN de cadena simple mediante la digestión con nucleasa y DNasa I. Para la purificación de los ARNs se utilizó un Kit AxyPrep DNA (Axygen), para la síntesis de ADNc y clonación molecular de L-ARNs, utilizando un adaptador ligasa amino 3' (5'-pGCATTGCATCATGATCGATCGAATTCTTTAGTGAGGGTTAATTGCC-NH<sub>2</sub>-3'), para ligar al extremo 3' del segmento S-ARNs purificadas utilizando ARN ligasa de T y se ligó el ARNs por transcripción inversa con un cebador complementario 1 (5'-GGCAATTAACCCTCACTAAAG-3').

El ADNc se amplificó con el cebador complementario 2 (5'-TCACTAAAGAATTCGATCGATC-3'). Los productos resultantes recuperados se purificaron con el Kit de extracción Axygen, clonado en el vector pMD18-T (TAKARA). El ADN fue secuenciado por el método Sanger. Realizaron un análisis de hibridación de Northern, el cual verifica los clones generados de ADNc con el ARN purificado de L-ARNs, S-1 y S-2 de ARNs se marcaron con P dCTP, utilizando un kit de radio-etiquetado (TAKARA). El análisis de la secuencia y proteína de los virus de ARNs se utilizó la base de datos del sitio web NCBI. Para la búsqueda de similitudes de los datos NCBI GenBank se realizaron el programa Blast y la búsqueda de proteínas se utilizó el dominio NCBI-CDD. Además, se realizaron árboles filogenéticos utilizando dos métodos: máxima verosimilitud (ML) e Inferencia bayesiana (BI) para la secuencia de los aminoácidos alineados.

A partir del hongo *S. sclerotiorum* se aisló Sunf-M un micovirus monopartite que presenta un linaje evolutivo diferente a los virus de ARNs y el segundo pertenece a la familia *Partitiviridae*. La cepa Sunf-M presentó tres bandas de ARNs (L, M y S ARNs). La Secuencia y análisis de Northern presentó dos bandas de S ARNs S-1 y S-2 (156 pb y 1783 pb de longitud, respectivamente). La organización genómica de L-ARNs presentó dos marcos de lecturas (ORFs y ORF1). ORF1 codifica proteínas de 1305 aminoácidos (aa) con masa molecular de 144 kDa. La búsqueda de secuencia de BLAST mostró similitud significativa con proteínas



de tres virus ARNds no clasificados (Vid asociado a totivirus) en *Fusuariu graminearum* y *Phlebiopsis gigantea*. ORF2 codifica la proteína 1388-aa con una masa molecular de 146,2 kDA con una similitud con un virus de ARNds no clasificado aislado en *Diplodia scrobiculata*. La proteína comparte similitud con *Totiviridos* y *Chrysoviridae*, el ORF contiene dominios conservados con ocho virus de ARNds. La región de L-ARNds comparte similitud con el dominio *Phytoreo\_S7*, se caracteriza por generar proteínas S7 que son proteínas del núcleo viral, como el micovirus *Chrysviridae* aislado en *Penicillium chrysogenum*, así como otros virus.

### 1.3.3 *Theobroma cacao* L. (1753)

El cacao es un cultivo emblemático de México, su fruto es una baya comúnmente llamado mazorca, sus semillas son seleccionadas para su fermentación, secado y finalmente su trituración, obteniendo una pasta de color café llamada chocolate. Cacao proviene de la palabra Maya Ka'kau, Chocol'ha y el verbo chokola'j "beber chocolate juntos" (Díaz-Valderrama et al., 2020).



**Figura 14.** Características básicas del Árbol; a) árbol de *T. cacao*; b) Ramillete de flores; c) vaina o mazorca de cacao; d) Haz de la hoja del árbol de cacao.



El cacao proviene de un árbol de la subfamilia *Sterculioidea* de la familia Malváceae, se han descrito alrededor de 22 especies en el ámbito mundial, en México podemos encontrar a *T. bicolor* y *T. cacao*, se desarrollan en hábitat restringido a bosques húmedos del Neotrópico (Kongor et al., 2018). Es un árbol perennifolio de 4 a 10 m o más, sus hojas son grandes, colgantes, elípticas u oblongas, de punta larga ligeramente gruesa, verde oscuro en el haz y más pálidas en el envés que cuelgan de un pecíolo. El tronco puede ser dimórfico, con brotes ortotrópicos o chupones, ramas en forma de abanicos, es una especie cauliflora debido a que sus flores aparecen insertadas sobre el tronco.

Las flores son pentámeras, hermafroditas, actinomorfas formando ramilletes sostenidas en un pedicelo de 1 a 3 cm. La mazorca tiene una forma ovoidal, alargado y a veces puntiagudo (figura 14). Pueden llegar a medir entre 12 y 30 cm de largo y contiene alrededor de 30 a 40 semillas o frijoles envueltos por una pulpa mucilaginoso, rica en azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), con un pH de 3.0 a 3.5 y alto contenido de proteínas. Se cultiva en millones de pequeñas granjas familiares, y ofrece beneficio para la conservación del suelo. En el oeste de África, América Latina y sudeste asiático, es un cultivo de gran importancia económica generando ingresos a más de 4.5 millones de familias rurales (Kongor, et al., 2018; Bailey, et al., 2018).

En una revisión realizada por Kongor y col., (2018), reporta el 70 % de la producción mundial de cacao tiene lugar en la región ecuatorial y África occidental y el resto en regiones ecuatoriales central y África del Sur, las Antillas y zonas tropicales de Asia. En América se cultiva desde México hasta Brasil, Ecuador, Colombia, República Dominicana, Perú y Venezuela. Brasil y Ecuador son los principales productores con 235 y 138 mil toneladas, respectivamente. El clima tropical húmedo, lugares fértiles y drenados, zonas con poca luz son condiciones aptas para el cultivo de cacao. Estos entornos son aptos para la proliferación de una gran diversidad de enfermedades fitopatógenos del cacao, las bayas pueden permanecer en el árbol de 5 a 6 meses, generando ecosistemas aptos para las enfermedades (Ramírez-Guillermo et al., 2018).



La producción de cacao en México está centrada en los estados de Tabasco y Chiapas, con 61,600 ha de superficie cultivable, de la cuales se cosecha 37 mil toneladas anuales, en los años 70 y 90 presentaron un incremento de la producción. Actualmente presenta un decaimiento debido a las enfermedades fúngicas, principalmente por la presencia de *M. royeri* (SAGARPA, 2019), identificada en el 2005, propiciando abandono y falta de manejo agronómico.

### 1.3.4 Enfermedades fúngicas que afectan a *T. cacao*

El sector agroalimentario es una de las actividades socioeconómicas más importantes a nivel mundial por proveer una gran diversidad de productos alimentarios para satisfacer las necesidades humanas. No obstante, este se ve afectado por cambios globales que inciden en la economía y la producción de los agricultores. Una de las afectaciones primordiales es la presencia de enfermedades microbianas, causan pérdidas significativas en la producción del producto (Aguiar et al., 2023). No obstante, la presencia de los microorganismos en los ecosistemas y en las plantas son importante; proporcionan nutrientes, mejoran el sistema inmunológico, facilitan la absorción del agua, promueven su crecimiento, eliminan enfermedades transmitidas por el suelo, y el microbioma es considerado como un reservorio de genes (Lemanceau et al., 2017; Tosi et al., 2020).

El cacao (*Theobroma cacao L.*) de la familia *Malvaceae*, es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, que se enfrenta a diversas problemáticas, principalmente por enfermedades fitopatógenas (Tadeo-Sánchez & Tolentino-Martínez, 2020). Es fuente económica para muchas familias, materia prima para la elaboración de productos alimentarios, contribuye en el mantenimiento de la biodiversidad de la flora, fauna y fertilización del suelo. Se cultiva en más de 58 países de África, América, Asia y Oceanía (Aikpokpodion, Motamayor, Adetimirin, Adu-ampomah, et al., 2009) y su producción mundial en 2022 fue de 4,923 mil toneladas; más del 96% de la producción procede de pequeños agricultores (MIDAGRI, 2022); 75% proviene de África Occidental, ocupando el primer lugar de la producción anual y menos del 20% del continente americano. La



producción de cacao en México es de 28,106 toneladas de grano siendo los estados de Tabasco, Chiapas y Guerrero las principales regiones productoras (SEDER, 2021).

La producción del grano se ha visto afectada principalmente por hongos fitopatógenos con pérdidas que pueden oscilar entre el 40 al 100% (Díaz-Valderrama et al., 2020). En la tabla 2, se presenta un listado de los hongos fitopatógenos que afecta al cacao. Los fitopatógenos importantes son: *Moniliophthora roreri*, causante de la podredumbre helada de la vaina (FPR); *M. perniciosa*, agente causal de la enfermedad escoba de bruja (WBD) (Bailey et al., 2018); *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora megakarya*, *P. theobromicola*, y *Nodulosporium* sp., producen la enfermedad de la mazorca negra BPR (Decloquement et al., 2021; González Ruiz et al., 2019). También se reporta otros patógenos como *Ceratocystis cacaofunesta* (marchitez del cacao por *Ceratocystis* o “Mal de machete”); *Oncobasidium theobromae* (muerte regresiva por estría vascular); *Lasiodiplodia theobromae* causa muerte descendente y pudrición negra o carbón de las mazorcas; *Rosellinia pepo* y *Rosellinia bunodes* son los agentes causantes de la pudrición negra de la raíz, también llamada pudrición de la raíz por *Rosellinia* (Delgado-Ospina et al., 2021).

**Tabla 2.** Especies de hongos y oomicetes que causan enfermedades en *T. cacao*, a nivel mundial.

Fitopatógeno	Partes aéreas de la planta-fruto	Nombre de la enfermedad
<i>Moniliophthora roreri</i>	Fruto	Agente causal de la pudrición helada de la vaina del cacao
<i>Moniliophthora perniciosa</i>		Escoba de bruja
<i>Phytophthora megakarya</i>	Tallos, fruto y hojas	La enfermedad de la Vaina Negra (BP)
<i>Phytophthora capsici</i>		
<i>Phytophthora theobromicola</i>		
<i>Phytophthora palmivora</i>		



<i>Phytophthora citrophora</i>		
<i>Ceratocystis cacaofunesta</i>		Marchitez del cacao por <i>Ceratocystis</i> o “Mal de machete”
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<b>Tallo y fruto</b>	Muerte descendente y pudrición negra o carbón de las mazorcas
<i>Ceratobasidium theobromae</i>	<b>Hoja (Muerte vascular)</b>	Muerte regresiva por rayado vascular
<i>Rosellinia pepo</i> y <i>Rosellinia bunodes</i>	<b>Raíz</b>	Agentes causantes de la pudrición negra de la raíz o pudrición de la raíz por <i>Rosellinia</i>
<i>Armillaria mellea</i>		Agente de la pudrición de la raíz de <i>Armillaria</i> o fisura del cuello

#### *Moniliophthora roreri* (Moniliasis del cacao)

Es un patógeno altamente especializado de plantas de cacao, se ha informado que infecta a dos géneros de la familia Malvaceae (*Theobroma* y *Herrania*). La podredumbre helada es causada por *M. roreri*, infecta principalmente a los frutos causando una asociación hemibiotrófica (Bailey et al., 2018). Debido a la sintomatología, la enfermedad fue llamada helada, ceniza, mal palúdico, polvo, describiéndola como licuefacción de la mazorca, podredumbre acuosa o podredumbre de monilia (Evans, 2016). En 1933 Colombia nombro a la enfermedad como Moniliasis o podredumbre de la monilia (*Monilia roreri*) (Bailey et al., 2018).

Se han descrito a cinco grupos genéticamente diferentes distribuidos en varios países y es importante conocer la diversidad genética de moniliasis, debido a que permite general estrategias de control de patógeno (Barbosa et al., 2018). Phillips-Mora y col., (2007), informa que Colombia, presenta mayor diversidad de este hongo, los autores han desarrollado la hipótesis de que probablemente la enfermedad comenzó en ese país., Venezuela, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras y Perú presentan baja diversidad



genética, lo que sugiere una rápida y reciente presencia del *M. roreri*. La variación genética permite que los patógenos se adapten a las condiciones ambientales, permitiendo que los organismos evolucionen rápidamente y generando nuevas cepas patógenas con mayor resistencia a compuestos químicos. La dispersión de *M. roreri* se debe principalmente a las actividades humanas, distribuyendo las esporas de país a país. El patógeno se ha extendido desde Venezuela en 1940, en Panamá en 1970, llegando a Honduras, Belice, Costa Rica, Nicaragua, Perú, Guatemala, México en el 2005 y el más reciente en Alto Beni de Bolivia en el 2015 (Correa Alvarez et al., 2014; Phillips-Mora et al., 2015).

La propagación del hongo comienza con la propagación de la espora, se ha documentado que en una plantación hay alrededor de 44 millones de esporas (aproximadamente), que se dispersan fácilmente de fruto a fruto. Las esporas germinan en los frutos, a través de la cutícula, penetrando en los tejidos intercelularmente. Los síntomas externos son visibles después de 40 a 90 días, se observan deformaciones o protuberancias, las mazorcas jóvenes la infección será mayor y por lo tanto la infección será más agresiva internamente. La fase biotrófica dura alrededor de 45 y 95 días, cambios a fase necrotrófica, característico de los hongos intracelulares de paredes delgadas produciendo la muerte del tejido (B. A. Bailey, Evans, Phillips-Mora, et al., 2018).

Algunos frutos pueden ser asintomáticas, cuando el tejido presenta necrosis internamente en la superficie del fruto aparecerán manchas oscuras con apariencia aceitosas (figura 15). Debido a la descomposición de las almendras, la masa blanca es perjudicada junto con los tejidos internos, cuando las manchas oscuras se extienden en toda la mazorca, se comenzara a formar una felpa blanca que corresponde al micelio del hongo, después de 7 a 15 días emergerá la espora de tipo conidio color crema (B. Bailey et al., 2018; Rodríguez Polanco et al., 2024).



**Figura 15.** Propagación de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* (B. Bailey et al., 2018; Rodríguez Polanco et al., 2024).

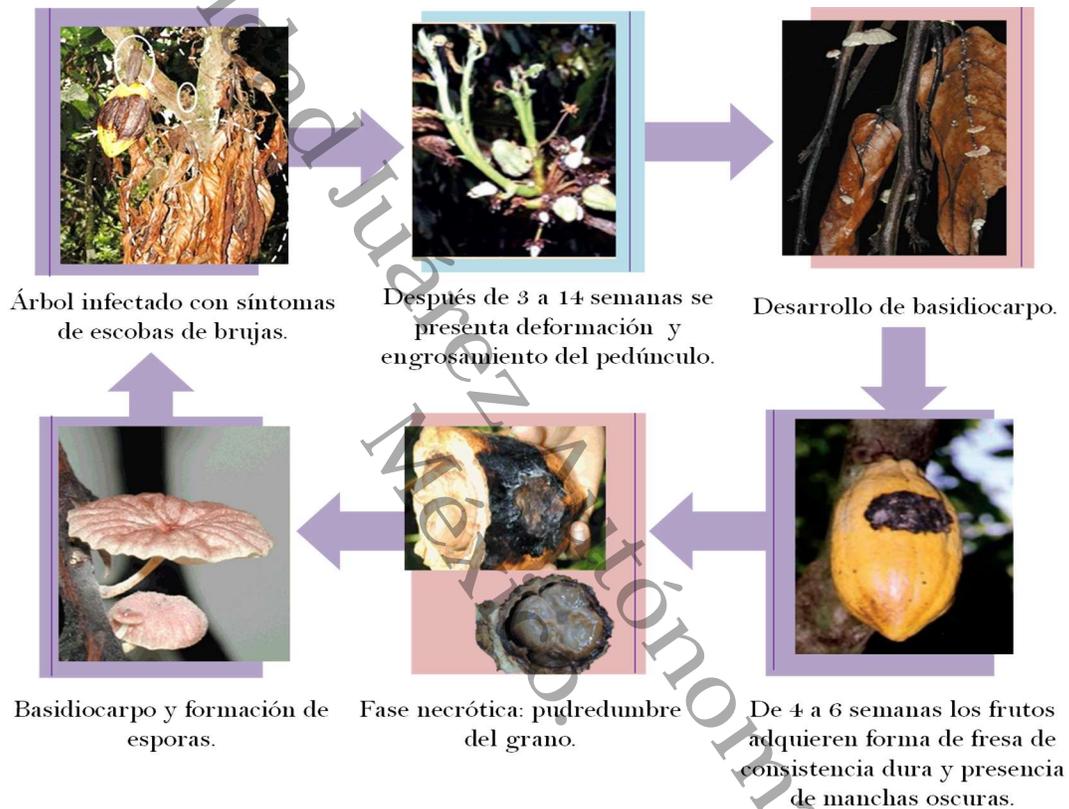
### *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja)

Es una enfermedad altamente agresiva, que afecta a uno de los productos más importantes del mundo, reduciendo la producción del grano de 35 a 90%, con pérdidas de más de 200,000 empleos. Es un patógeno fúngico hemibiotrófico del cacao (conocido antes como *Crinipellis perniciosa*), se encuentra distribuido en Bolivia, Brasil, Ecuador, Granada, Panamá, Colombia, Guayana Francesa, Perú, Trinidad y Tobago, Surinam y Venezuela (Evans, 2016). Se ha reportado 4 biotipos de esta especie, el biotipo C es específico en plantas de la familia *Malvaceae* (*Theobroma* y *Herrania*).

Presenta diversos modos de penetración, a través de las estomas y el tricrómico. Infecta los órganos de la planta, ramas, cojines florales y mazorcas. Entre los síntomas típicos se



encuentran brotes anormales que causan hinchazón en los tallos y yemas, conocido como escobas de brujas del cacao. Al igual que *M. royeri*, las mazorcas se distorsionan, maduración anormal y necrosis externa e interna en tejidos y semillas (Meinhardt et al., 2008; Meraz-Pérez et al., 2021).



**Figura 16.** Propagación de *Moniliophthora perniciosa* en plantas de *Theobroma cacao* (Evans, 2016; Meinhardt et al., 2008).

La espora se dispersa cualquier movimiento, aire, manipulación humana e insectos (figura 16). Una vez que el micelio se encuentra en los tejidos el tiempo de incubación puede variar de 3 a 14 semanas, el hongo causar un desequilibrio hormonal deformando la corteza y la médula. En esta fase el hongo se encuentra en una fase de crecimiento biotrófico, produciendo hifas intracelulares, desarrollándose en el tejido meristemático causando que las yemas axilares generen brotes laterales similares a una “escoba de bruja”, también



conocido como hipertrofia e hiperplasia, proliferación de brotes auxiliares y tallos anormales.

Los tejidos infectados permanecen verdes de 4 a 6 semanas, posteriormente aparecen manchas oscuras y luego se secan lentamente pasando a una fase necrótica. Una vez que los tejidos se secan aparecen las clamidosporas y las escobas secas forman basidiocarpos que son liberados al aire durante 2 a 8 días y se reinicia el ciclo de infección (Meinhardt et al., 2008; Evans, 2016).

### *Phytophthora* (Mancha negra de la mazorca)

La mancha negra de la mazorca o podredumbre negra es ocasionada por varias especies de *Phytophthora*, de la clase Oomicetos. Presentan celulosa en su pared celular, a diferencia de los hongos verdaderos que presentan quitina. Su micelio es filamentosos hialinos, ramificados y no septados (Perrine-Walker, 2020). En una revisión realizada por Wang & Jiao (2019), reportan más de 200 especies de *Phytophthora*, distribuidas en la mayoría de los países y diversos anfitriones. Las especies son patógenas hemibiotróficas (biótrofos a necrótrofos), infectan a diversos productos agrícolas y forestales, por ejemplo; *P. sojae*, *P. parasítica*, *P. capsici*, *P. palmivora* y *P. citricola* que infectan a soja, tabaco, pimienta, papaya, cítricos, consecutivamente, por mencionar algunas (Adeniyi, 2019).

Se ha reportado a cinco especies de *Phytophthora* que infectan a *T. cacao*; *P. citrophthora*, *P. capsici*, *P. megakarya*, *P. tropicalis* y *P. palmivora*, son fitopatógenos de gran importancia, se estiman pérdidas de 700,000 toneladas que equivalen a 30% de la producción, con pérdidas aproximadas de 3.800 millones de dólares, a nivel mundial (Evans, 2016; Adeniyi et al., 2017). *P. palmivora* se encuentra en la mayoría de los países; *P. megakarya* en África Occidental, *P. capsici* en áreas de América Central, Brasil Camerún y Caribe; y *P. citrophthora* en Brasil, Indonesia e India (Adeniyi, 2019).

Las especies de *Phytophthora*, infecta los tejidos internos del fruto, a las raíces y tallo, en cualquier etapa de desarrollo. La infección en las plántulas y raíz presentan pudrición, en tallo y ramas causa chancros (figura 17). Una vez infectada a los frutos, 30 horas después inicia a aparecer puntos negros traslucidos con apariencia acuosa, entre 7 a 14 días estas.



manchas se oscurecen (Evans, 2016). Estas lesiones necróticas de color café se extienden rápidamente, después de 3 a 5 días se observa manchas blancas o esporas blanquecinas formando el micelio y los esporangios del hongo. Los frutos enfermos son blandos y presentan necrosis interna de entre 30 y 100% (Rodríguez Polanco et al., 2024); Adeniyi et al., 2017).



**Figura 17.** Propagación del género *Phytophthora* en plantas de *Theobroma cacao* (Phillips W., y Cerda BR, 2007; Rodríguez Polanco 2024; Adeniyi et al., 2017).

Este hongo fitopatógeno puede infectar al fruto de cualquier edad y las medidas de control pueden ser ineficientes. *P. megakarya* es considerada la especie más agresiva y virulenta, las lesiones abarcar el 100% de los frutos y puede afectar al resto de los frutos en crecimiento (Figura 4). Adeniyi et al., 2017, explica que los síntomas o lesiones está relacionada con la humedad, a mayor humedad la infección es más rápida (se puede producir alrededor de cuatro millones de esporangios). Los frutos enfermos deben retirarse, debido a que representan un inóculo, por un periodo de tres años o más.



## 1.4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la presencia de micovirus y hongos endófitos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.), en Tabasco.

### 4.2 Objetivo específicos

1. Aislar e identificar molecularmente hongos endófitos, a partir de frutos de cacao (infectados y sanos) y hojarasca, en diferentes plantaciones de cacao (*T. cacao* L.).
2. Analizar la presencia de micovirus en hongos endófitos asociados en plantaciones de cacao como una posible estrategia de control biológico.
3. Implementar un cepario de hongos nativos aislados en mazorcas y hojas de cacao (*Theobroma cacao*), que presenten micovirus.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## CAPITULO II. METODOLOGÍA



## 2.1. METODOLOGÍA

### 2.1.1. Colecta del material vegetal

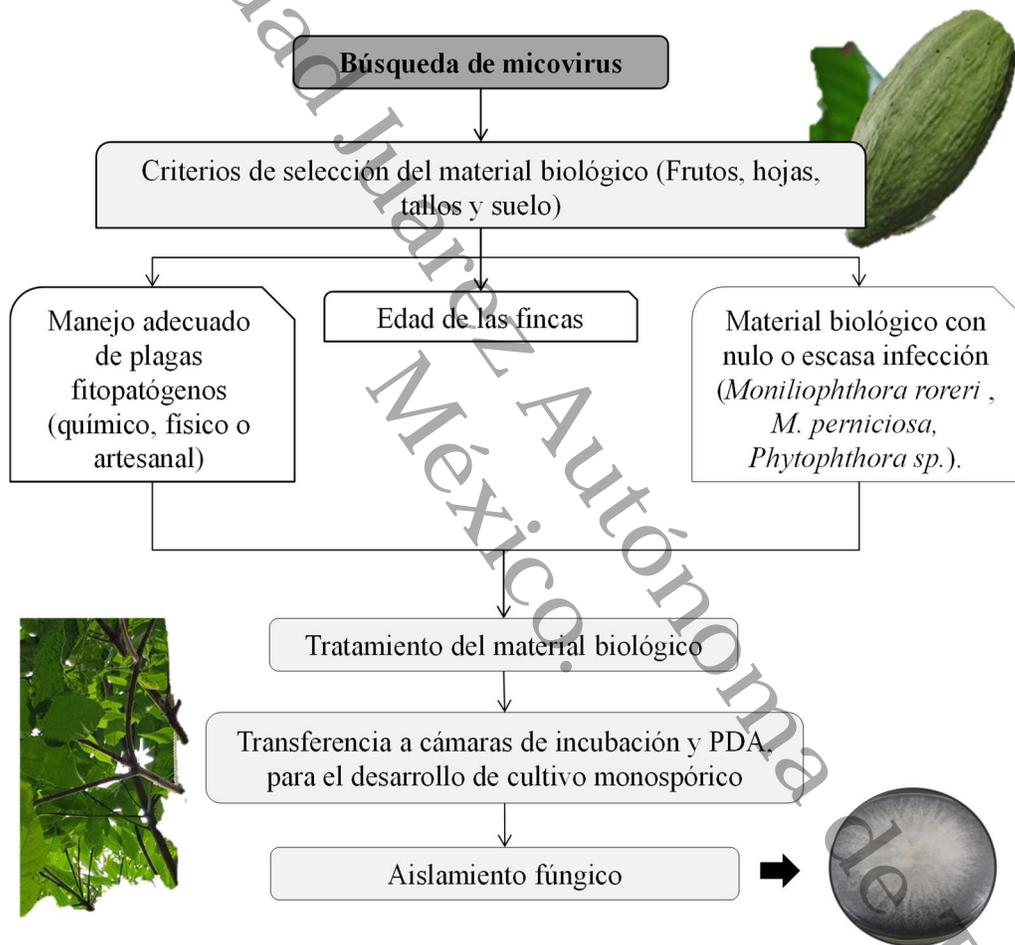
Para la búsqueda del material genético “micovirus”, el muestreo se realizó en dos grupos: ejemplares aparentemente sanos e infectados. Por cada individuo, se colectaron hojas y frutos sin señal de necrosis (sanos) y ejemplares que manifestaban daño por patógenos fúngicos. Se seleccionaron 14 haciendas productoras de cacao localizadas en el estado de Tabasco, en los municipios de Centro, Cárdenas, Cunduacán, Comalcalco y Huimanguillo (tabla 3), seleccionando 5 ejemplares por hacienda.

**Tabla 3.** Sitios de colecta del material biológico en el Estado de Tabasco.

Municipio	Localidad	Coordenadas
Huimanguillo	C. nueve 262, Carlos A. Madrazo Pob. 41, Lic. Carlos A. Madrazo C-41, Tab., México	17°54'47.5"N93°26'11.0"W
Huimanguillo	C. nueve 262, Carlos A. Madrazo Pob. 41, Lic. Carlos A. Madrazo C-41, Tab., México	17°55'39.0"N93°25'57.4"W
Cunduacán	Hacienda río Seco	18°06'14.8"N 93°18'26.3"W
Cunduacán	Hacienda cedi	17°59'0.2.0"N93°10'23.5"W
Cunduacán	Hacienda la Isla	17°58'40.8"N 93°03'28.8"W
Comalcalco	Hacienda La Luz (Wolter)	18°15'54.2"N 93°13'39.9"W
Jalpa	Hacienda Madrigal	18°06'00.0"N93°08'10.3"W
Jalpa	Hacienda Ulin Hernández	18°11'11.8"N93°07'08.8"W
Cunduacán	Hacienda Chapingo	18°06'14.8"N93°18'26.3"W
Cárdenas	C-40-Ernesto Aguirre Colorado	17°58'29.6"N93°29'53.8"W
Cárdenas	C-32-Lic. Francisco Trujillo Gurría	17°58'26.6"N93°29'53.4"W
Centro	Hacienda Buena Vista	17°58'39.0"N93°03'45.0"W
Centro	Casa la Palma	17°58'48.0"N 92°48'07.2"W
Centro	Carretera Vhsa., Cárdenas. DACBiol	17°59'19.5"N92°58'23.2"W



En la figura 18, se muestra un esquema general del método para el aislamiento de cepas fúngicas para la búsqueda de los micovirus. Con el objetivo de aumentar la posibilidad de aislar genomas virales, los frutos se colectaron en plantaciones que presentaron medidas profilácticas (químico, físico o artesanal); el estado de salud de los individuos debido a que los micovirus pueden estar involucrados en la resistencia genética, durante el transcurso del tiempo estos ejemplares arbóreos almacenaron estos genomas virales.

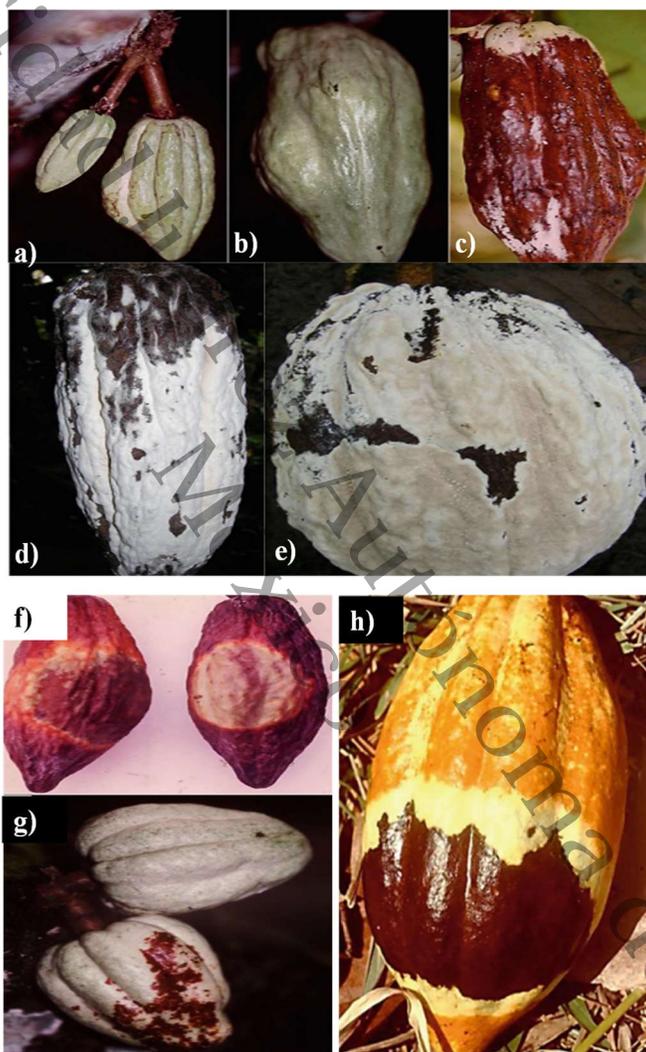


**Figura 18.** Esquema general de la primera fase de búsqueda de aislamiento de los micovirus.

Los ejemplares con escasa o nula contaminación, basado en la sintomatología causada por los fitopatógenos como: manchas blancas polvorientas en la superficie del fruto, deformaciones o tumoraciones, necrosis, manchas aceitosas, manchas de color café con bordes definidos, secas o momificadas, tallos engrosados, frutos con forma de fresa o



zanahoria, entre otros (Figura 19). El motivo de contar con este criterio es minimizar contaminación cruzada por hongos altamente infectivos y probablemente no presenten material genético viral (Aikpokpodion, Motamayor, Adetimirin, Adu-Ampomah, et al., 2009; B. A. Bailey, Evans, Phillips-Mora, et al., 2018).



**Figura 19.** Sintomatología de *M. royeri*, a) Fruto joven de 1 mes de edad con hinchazón; b) mazorca verde hinchada y con tumoración de dos a tres meses de edad; c) fruto con necrosis e inflamación. Síntomas de *M. pernicioso*, d y e) lesiones algodonosas; f) frutos jóvenes infectados con necrosis severa; h) manchas aceitosas característica típica que ha afectado a las semillas, y g) frutos jóvenes de 2 meses con síntomas iniciales (Evans, 2016).



Durante la colecta se utilizaron guantes de nitrilo, espátulas, bolsas de plástico y pértiga, previamente desinfectados con etanol al 75 %. Los frutos fueron cortados con un cuchillo, evitando lastimar la almohada floral (área de la nueva floración). Las hojas y tallos se utilizó una pértiga y con una espátula se colectaron 5 g de suelo aproximadamente almacenando en una bolsa estéril (figura 20).

El material biológico recolectado fue almacenado en bolsas de papel Kraft y posteriormente en bolsas herméticas de plástico, conservando a 4 °C durante su traslado al laboratorio de genómica, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), de la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL).



**Figura 20.** Colecta del material biológico en las plantaciones de cacao (*T. cacao*); a) ejemplar de *T. cacao*; b) Colecta de las hojas utilizando una pértiga; c y d) Mazorca o fruto de *T. cacao*.

#### **Búsqueda de cepas fúngicas cacao (*T. cacao*)**

En el laboratorio de microbiología de la DACBIOL de la UJAT, se llevaron a cabo los análisis necesarios para el aislamiento del material fúngico a partir de las muestras colectadas. Como primera fase de aislamiento, las muestras fueron desinfectadas, para asegurar que los hongos aislados provengan de los tejidos del hospedante. La segunda fase consiste en inocular los



fragmentos desinfectados en agar papa y dextrosa (PDA-Bioxon®) y en cámara de incubación o húmeda, debido a que tiene la ventaja de facilitar el crecimiento monospórico y proporcionan un ambiente idóneo (Azuddin et al., 2021; Cañedo & Ames, 2004; Krug, 2004).

### ***Desinfección del material biológico***

El tejido vegetal: hojas, tallos y mazorcas fueron cortadas en ocho fragmentos delgados de aproximadamente 3 y 5 mm (Azuddin et al., 2021; Cañedo & Ames, 2004). Posteriormente fue desinfectado bajo el siguiente protocolo: hipoclorito de sodio al 1 %, alcohol al 75% ambos por un minuto y para eliminar los residuos de alcohol se realizó un lavado con agua destilada estéril (30 segundos). Finalmente sobre una toalla de papel estéril se colocaron los fragmentos para su secado, antes de la siembra en las cajas Petri (figura 21).



**Figura 21.** Procedimiento de desinfección de las muestras colectadas para el aislamiento de especies fúngicas.

### ***Cámaras de incubación***

Las muestras desinfectadas fueron colocadas en una cámara de incubación. Esta consiste en una caja de Petri de 150 X 90 mm. El fondo de la caja se cubrió con algodón y 10 a 15 mL de agua destilada estéril (121 °C durante 30 minutos). Las muestras fueron transferidas bajo

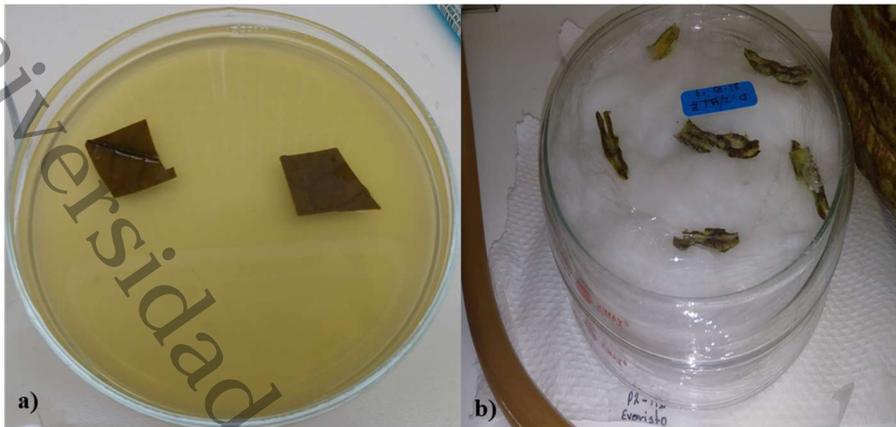


condiciones de esterilidad, utilizando una pinza (Figura 22), posteriormente la caja Petri se protege con papel Parafilm® para evitar contaminación (Krug, 2004). Directamente se inocularon dos fragmentos por tejido vegetal en PDA (Bioxon®), suplementado con ácido tartárico al 10 % para reducir el pH a  $3,5 \pm 0.1$  e inhibir el crecimiento microbiano (figura 22).



**Figura 22.** Transferencia a las cámaras de incubación, para el desarrollo de cultivo monospórico. a) obtención de los fragmentos en hoja de cacao; b) Transferencia de los fragmentos de hoja a las cajas Petri; y c) cámara húmeda.

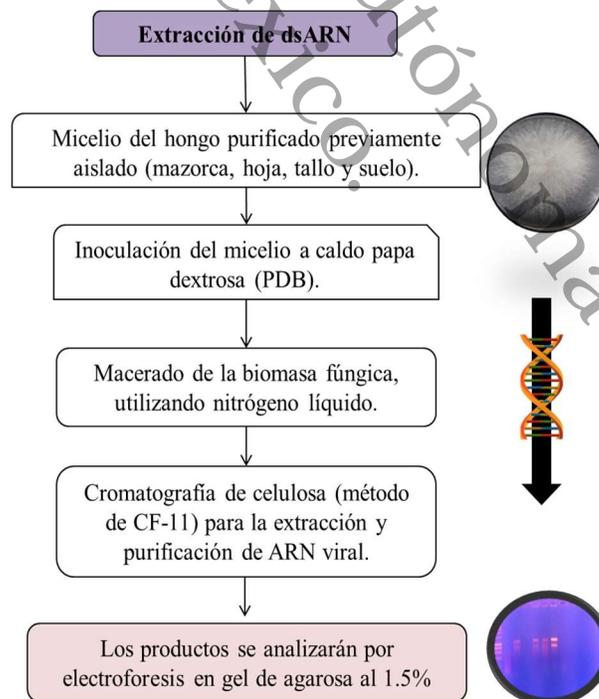
Las muestras en cámara humedad y tejidos en PDA, fueron incubados a 28 °C durante 30 días. Etiquetando con los datos correspondientes: sitio de muestreo, fecha, hora de inicio y tipo de tejido. Los fragmentos inoculados fueron transferidos a placas de PDA cada siete días o en caso de observar la presencia de micelio. Los aislamientos obtenidos fueron inoculados en PDA hasta obtener cepas fúngicas puras, incubando a 28 °C durante 5-7 días (figura 23).



**Figura 23.** Transferencia de las muestras previamente desinfectadas; a) montaje directo en PDA; b) cámara de incubación con tejido de cacao.

### 2.1.2 Extracción y purificación de dsARN a partir de muestras fúngicas

En la figura 24, se presenta un esquema general de la metodología, para la obtención del material genético viral (micovirus). Consiste en dos fases; cultivo de las cepas fúngicas previamente purificadas y extracción de los ácidos nucleicos (dsARN).



**Figura 24.** Esquema general para la extracción y purificación de dsARN viral.

## Cultivo fúngico Primera fase

Individualmente cada una de las cepas fúngicas fueron sembradas en placas con PDA para obtener un cultivo nuevo de 4 a 5 días incubación. Posteriormente se inocularon cuatro discos de micelio en 50 mL de caldo dextrosa y papa (PDB), incubando a temperatura ambiente durante un periodo de 6 días y en agitación continua (150 revoluciones por minuto [rpm]) con el objetivo de obtener de 3-5 g aproximadamente de biomasa fúngica (figura 25).



**Figura 25.** Procedimiento general para la obtención de micelio pulverizado con N<sub>2</sub>.



### 5.3.2 Pulverización de la biomasa fúngica

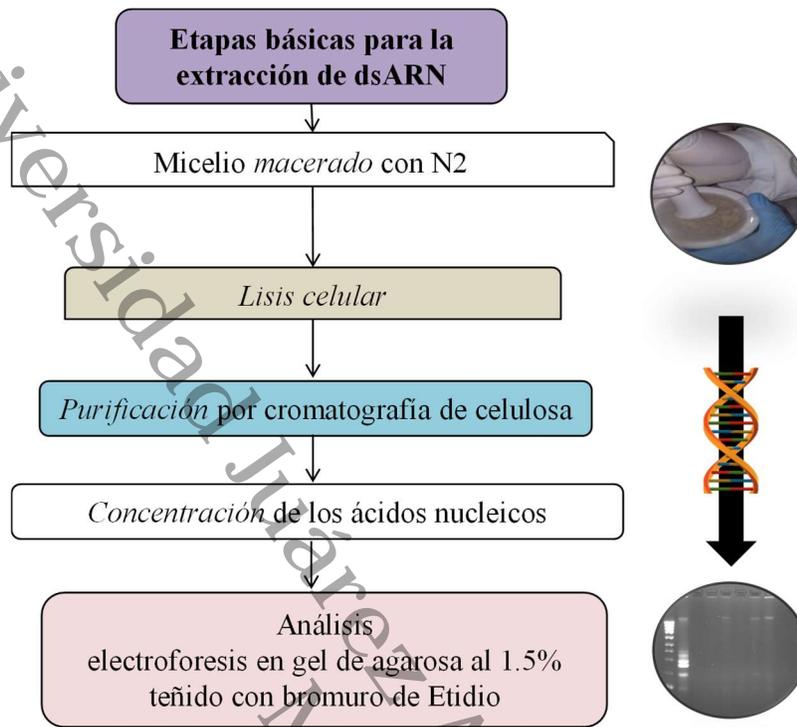
#### Segunda fase

Con el objetivo de eliminar los residuos líquidos, el micelio obtenido fue transferido a una malla en papel micracloth de 10cm<sup>2</sup> (Meck Millipore), realizando dos lavados con agua tridestilada estéril (121 °C durante 15 minutos). Subsiguientemente el micelio fue transferido a papel absorbente o papel filtro para eliminar remanentes del medio líquido. Una vez eliminado los residuos líquidos, el micelio fue transferido a un mortero de porcelana estéril y el material fúngico fue pulverizado con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) hasta obtener un polvo fino. El producto obtenido fue transferido a un tubo falco de 50 mL y almacenado a -80 ± 1 °C hasta su análisis (figura 25).

#### Cromatografía de celulosa para aislamiento de dsARN

En los últimos 50 años se ha publicado diversas metodologías para la extracción de dsARN en plantas, animales y hongos infectados por virus. Muchos de ellos basados en cromatografía de celulosa ampliamente utilizada por varios autores. De manera general este método consiste en la absorción selectiva de dsARN en celulosa de fibra a bajas concentraciones de etanol y buffer libre de etanol (Valverde & De La Torre-Almaraz, 2017).

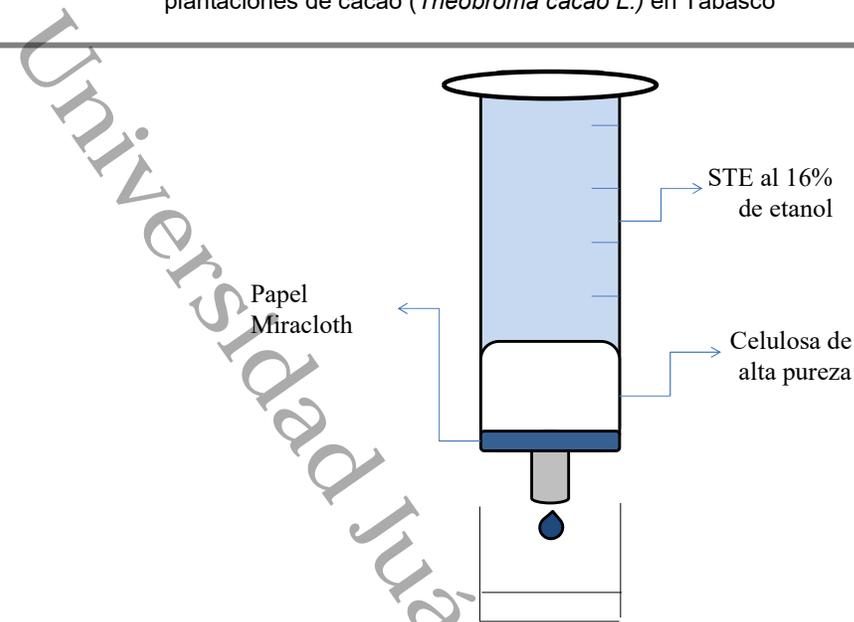
En esta investigación se aplicaron tres protocolos diferentes; el primero es el descrito por Morris y col. (1979), basado en las indicaciones originales, minitécnica descrita por Khankhum y col. (2007) y doble fenolización con algunas modificaciones a partir del método de Morris. Las modificaciones de este último fueron propuestas por la Dra. María Dolores García-Pedrajas del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental “La Mayora”. Estos métodos tienen la característica de emplear la celulosa como medio para la absorción selectiva de dsARN viral (figura 26).



**Figura 26.** Etapas básicas para la extracción de dsARN de los micovirus.

**Columna de celulosa según Morris et al., 1979 (original)**

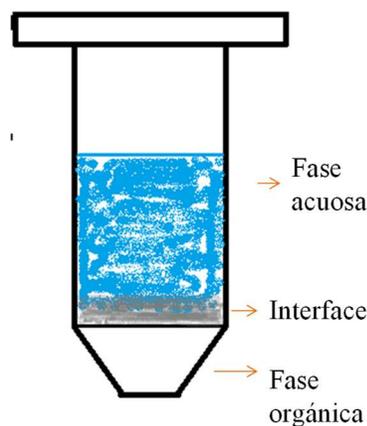
Por cada muestra se preparó, una columna cromatografía de celulosa, esta consiste en un tubo de 50 mL con un disco de papel Miracloth para la formación del tapón, posteriormente, se añadió una solución de celulosa: 1.5 g de celulosa de alta pureza (sigma) disuelta en 25 mL de STE (Tris, NaCl y Na<sub>2</sub>EDTA 2H<sub>2</sub>O) al 16% de etanol. El medio líquido fue eliminado por goteo para la formación de un tapón de celulosa (figura 27).



**Figura 27.** Diseño de la columna cromatografía para el aislamiento de dsARN.

### Lisis celular

Para la extracción de los ácidos nucleicos se utilizó 3.5 g de tejido fúngico macerado con 9 mL de STE 2X, 9 mL de STE saturado con fenol y 1 mL de dodecilsulfato sódico (SDS). Incubando por 30 minutos a 4 °C en agitación constante. Transcurrido el tiempo las muestras fueron centrifugadas a 8,000g durante 15 minutos. Posteriormente se recuperó 10 mL de la fase acuosa, la cuál contiene los ácidos nucleicos (figura 28).



**Figura 28.** Fases obtenidas durante la extracción de las muestras.



Para la purificación del dsARN la fase acuosa se transfirió a la columna cromatografía (señalada en párrafos anteriores) y esperar, a que la solución sea drenada por completo. Consecutivamente se realizó un primer lavado con 50 mL de solución de STE al 16% de etanol y esperar nuevamente hasta su drenado. Para estabilizar la columna es necesario agregar 2.5 mL de STE 1X y dejar drenar (figura 29).



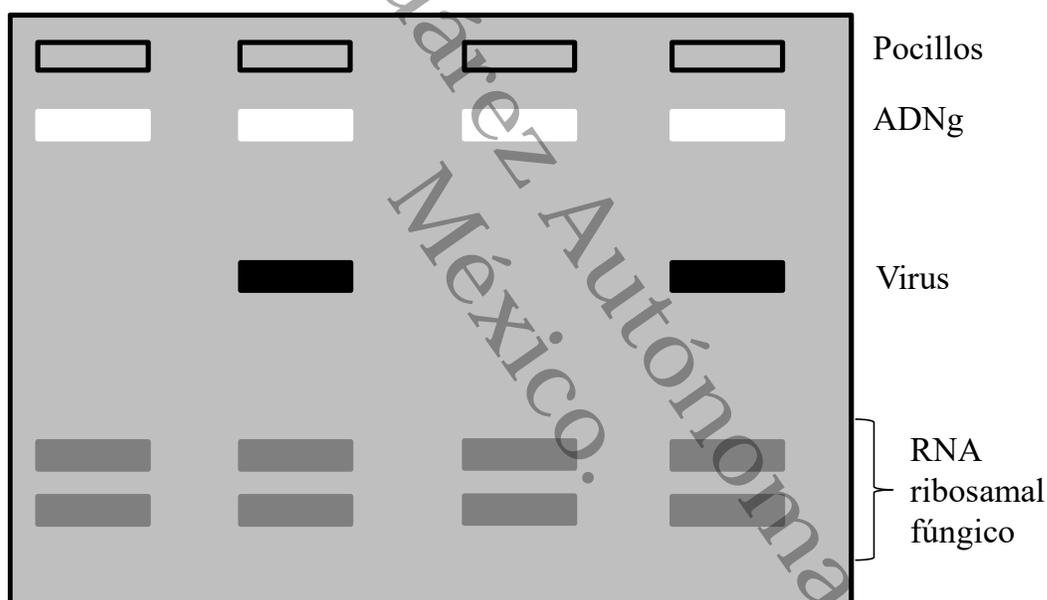
**Figura 29.** Columna de celulosa según Morris et al., 1979 (original). a) Lisis celular a partir de muestra fúngica; b) preparación de la columna de celulosa; c) recuperación de los ácidos nucleicos adheridos a la celulosa; y d) producto final (dsARN).

Para recuperar los ácidos nucleicos adheridos a la celulosa se utilizó 10 mL de STE 1X en un tubo limpio de 50 mL. Para precipitar la muestra se utilizó acetato de sodio 3.5M pH de 7.5 y 2.5 volúmenes de etanol puro. Posteriormente se centrifugó a 9,000 g durante 30 minutos a 4 °C. Al finalizar el proceso de centrifugación se recuperó la fase acuosa, precipitando por segunda ocasión y centrifugando nuevamente a 10,000 g durante 15 minutos. Finalmente se obtiene un pellet o una pastilla blanca, para disolverla fue necesario

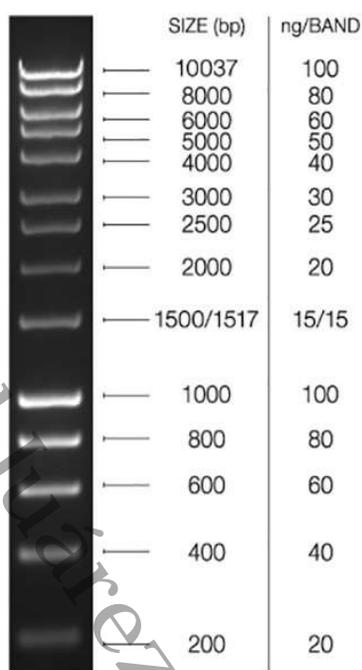


agregar de 50 a 100  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura libre de ARNsa (Milli-Q®), con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%.

Para verificar la integridad del ADN se utilizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La visualizado se efectuó bajo luz UV en un transluminador Bio-Print (Vilber®). Los fragmentos se determinaron por comparación con un marcador de 1-Kb (Invitrogen®). En la figura 30, se ejemplifican los posibles resultados de la extracción de dsARN y en la figura 31 el marcador de peso molecular utilizado para la identificación viral.



**Figura 30.** Ejemplificación de los resultados obtenidos de la extracción de dsARN, en color negro podemos observar la banda viral. ADN genómico (ADNg).



**Figura 31.** HyperLadder™ 1kb. Marcador de peso molecular utilizado para la identificación viral.

#### **Cromatografía en celulosa con doble fenolización (Morris et al., 1979), modificada**

La columna cromatografía de celulosa es preparada de forma similar, como se mencionó en párrafos anteriores, pero con doble disco de papel Miracloth y 1 g de celulosa (figura 27). Es necesario 3.5 g de micelio macerado, a la cual se le agregará 9mL de STE 2x, 9mL de Fenol y 1mL de SDS al 10%, homogenizar las muestras a 12,000 g x 25min a 4°C. Posteriormente extraer el líquido obtenido de la fase acuosa y fenolizar con 10 mL de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugar a 11,000g durante 30 minutos.

Subsiguientemente se obtuvieron 10 mL de la fase acuosa, a este volumen se le agregó 2,1 mL de etanol al 96% y homogenizar por 1 minuto en vòrtex. Este producto fue transferido a una columna de celulosa previamente preparada y esperar hasta que la gota se torne transparente. Para la purificación fue necesario realizar un lavado con 50 mL de STE con etanol al 16%. Se estabiliza la columna con 2.5 mL de STE 1X, y eluir con 6 mL de STE 1X, este volumen es recuperado en un nuevo tubo. La precipitación etanólica se realizó según el método de Morris et al., 1979, mencionado en párrafos anteriores.



**Minitécnica para aislamiento de dsARN (Khankhum y col. (2007), modificada.**

El método consistió en realizar la extracción de los ácidos nucleicos a menor escala en tubos Eppendorf de 2 mL. Para este método se utilizó 100 mg de micelio previamente triturado con N2. Para la lisis celular se utilizó 500µl de STE-1X, 500µl de Fenol y 100µl de SDS 10%, homogenizar y centrifugar a 9,000g durante 15 minutos. La fase acuosa fue transferida a un tubo Eppendorf de 2 mL (750 a 800 µl). Inmediatamente por segunda ocasión se agregó 500µl de Fenol: Cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Finalmente se centrifugo a 10,000 g durante 10 minutos. La fase acuosa que transferida a un tubo Eppendorf de 2 mL (figura 32).

Los 500 µl de la fase acuosa superior obtenida de la segunda fenolización, fue transferida a un tubo que contenía una solución de celulosa (250 mg de celulosa con 250µl etanol 96% y 750µl de Buffer STE 1x). Las muestras se homogenizaron y centrifugaron a 11,000 g por 10 minutos, el sobrenadante fue descartado utilizando la micropipeta. Consecutivamente se realizaron dos lavados con 1,500 µl de Buffer STE 1x con etanol 16%, homogeneizar con vórtex durante 1 minuto y centrifugar a 10,000 g por 10 minutos. Finalmente para recuperar los ácidos nucleicos adheridos a la celulosa fueron recuperados con 250 µl de buffer STE 1X (2 lavados), centrifugar a 10,000 g durante 15 minutos.

Finalmente para precipitar los ácidos nucleicos obtenidos, a la muestra se le añade 50µl de acetato de sodio (3.0 M pH 5,2) y 1,000 µl de etanol absoluto e incubar a -20 °C, durante toda la noche. Transcurrido el tiempo centrifugar a 11,000g a 4°C por 15 minutos. Descartar el sobrenadante por inversión, dejar secar durante 10 minutos y disuelto en 20µl de agua libre de ARNsa (Milli-Q®).



**Figura 32.** Minitécnica para aislamiento de dsARN. a) preparación de la columna de celulosa; b) primera fase de lisis celular; c) purificación de los ácidos nucleicos; d) secado de los ácidos nucleicos.

### 5.3.3.2 Integridad de los ARN obtenido

La revisión de los ácidos nucleicos obtenidos para los tres métodos, fueron visualizados por el método de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), visualizado bajo luz UV en un transluminador Bio-Print (Vilber®), ver la figura 33.



**Figura 33.** Prueba de electroforesis para verificar la extracción de los ácidos nucleicos viral.

### 2.2.3 Identificación molecular fúngica

#### Extracción de ácidos nucleicos.

Los aislamientos obtenidos fueron transferidos a 40 mL de caldo dextrosa y papa (PDB) en matraces Erlenmeyer con capacidad nominal de 250 mL, incubando a temperatura ambiente durante 3 a 7 días para obtener abundante crecimiento micelial. Con el objetivo de eliminar los residuos líquidos, el micelio obtenido fue transferido a una malla en papel Miracloth realizando dos lavados con agua tridestilada estéril. El material fresco fue pulverizado con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) en un mortero de porcelana, macerando con un pistilo hasta obtener un fino polvo (figura 33). El producto obtenido se transfirió a un tubo falco de 50 mL. El material fue almacenado a  $-80 \pm 1$  °C hasta su análisis (figura 34).



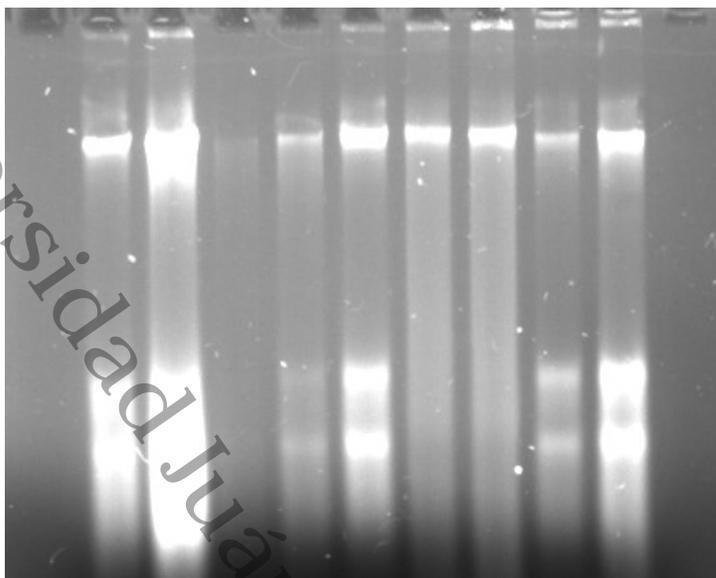
**Figura 34.** Pulverización de las muestras fúngicas para la extracción de los ácidos nucleicos. a) filtración de las hifas en la malla de papel Miracloth; b y c) trituración de las hifas empleando N<sub>2</sub> líquido.

Para la extracción de ADN genómico total, se utilizó el protocolo propuesto por (Stirling, 2003). La primera fase corresponde a la lisis celular: en un tubo Eppendorf de 2 mL con 300 mg de micelio previamente triturado, se añade 1,000  $\mu$ L de buffer de extracción (Tris- pH 7,2, 0,05 M, EDTA 0,05 M, SDS al 3 % y 2-mercaptoetano al 1 %), mezclar en vórtex por 1 minuto e incubar a  $65 \pm 0.5$  °C durante 60 minutos. Posteriormente las muestras son incubadas a 4 °C durante 5 minutos. A este homogenizado se añade 1,000  $\mu$ L de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1), mezclar en vórtex por 5 minutos y centrifugar a 2,000 g durante 20 minutos.



**Figura 35.** Extracción de ácidos nucleicos en muestras fúngicas. a) lisis celular; b) extracción de la fase acuosa; c) ácidos nucleicos purificados.

La fase acuosa es transferida a un tubo Eppendorf de 2 mL, el ADN obtenido se precipita con etanol puro y acetato de sodio al 3.5 M, incubar por 1 hora o durante toda la noche a 4 °C y centrifugar a 18,000g por 20 minutos. Finalmente, el ADN obtenido es purificado realizando dos lavados con 700  $\mu$ L de etanol al 70% (figura 35). El pellet se disuelve y se homogeniza lentamente con 50  $\mu$ L de buffer TE 1X [Tris-HCl 200 mM (9H 8.0), EDTA 20 mM (pH 8.0)], para su uso posterior, conservar a  $-80 \pm 1$  °C. La calidad del ADN fue analizada con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm y la pureza en base a la relación A260/280. El ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL), y visualizado bajo luz UV en un transluminador Bio-Print (Vilber®).



**Figura 36.** ADN genómico total de muestras fúngicas. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### **Amplificación por Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La identificación molecular se basa en la amplificación de las secuencias de rADN (ADN ribosomal) ITS 1, ITS 2, ITS 4 y 5.8 rADN, amplificada por PCR en un termociclador. Estos cebadores moleculares son utilizados universalmente para conocer la identidad de los hongos, la región ITS tiene la cualidad de no presentar genes insertados en la región, sin ningún tipo de restricciones, por lo tanto no presenta cambios. Se localiza, en ARN ribosómico de subunidad pequeña (ARNr) y los genes de ARNr de subunidad grande del cromosoma o también conocida como región transcrita.

Los cebadores universales de región de los espacios transcritos internos (ITS), fueron los oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990), los cuales amplifican la región ADNr 25S y 18S, respectivamente, incluyendo también el 5.8S. La amplificación fue realizada en un volumen final de 32  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura, 10  $\mu\text{L}$  de buffer, 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  de cada cebador y 5 u/ $\mu\text{L}$  Taq polimerasa (promega, Estados Unidos) y 1  $\mu\text{L}$  albúmina de suero bovino (BSA). La reacción de PCR fue realizada en un termociclador bajo el siguiente programa térmico: un ciclo inicial a 94 °C por 1 minuto.



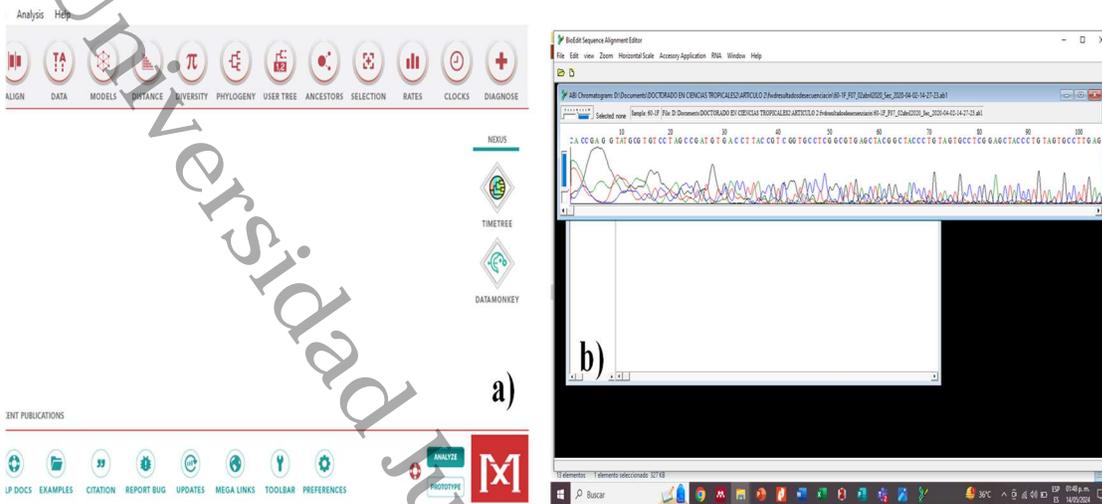
(desnaturalización), 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto (desnaturalización), 56 °C durante 1 minuto (hibridación) y 72 °C por 1 minuto (extensión) y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 minutos (Termociclador Bio Rad T100) (figura 37).

Las amplificaciones obtenidas fueron verificadas por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% w/v (1XTAE buffer), teñidas con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y visualizado bajo luz UV en un transluminador Bio-Print (Vilber®). Los fragmentos fueron determinados por comparación con un marcador de 1-Kb (Invitrogen). El producto obtenido fue secuenciado por el método de didesoxinucleótidos marcados en los secuenciadores modelo 3500 y 3130 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems), en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (PICYT).



**Figura 37.** Preparación de la muestra para la identificación molecular fúngica (PCR).

Con el programa Bioedit 7.2.5 se visualizaron los electroferogramas, omitiendo secuencias de mala calidad, posteriormente se realizó un alineamiento, incluido el software ClustalX2 2.0. La secuencia fue evaluada y comparada en un BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en NCBI (National Center for Biotechnology Information) (figura 38).

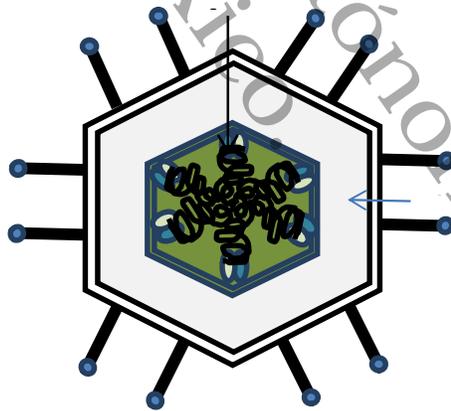


**Figura 38.** Programas utilizados para la visualización de la secuencia fúngicas (ITS). a) MEGA X; b) Bioedit 7.2.5 visualización de los electroferogramas.



### CAPITULO III. ARTICULO 1 (ENVIADO)

#### *Exploración de micovirus en hongos endófitos asociados a plantaciones de cacao (*Theobroma cacao L.*)*



Article

## *Exploración de micovirus en hongos endófitos asociados a plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.)*

Lucero Vázquez-Cruz\*; Julia María Lesher-Gordillo, Laboratorio de genómica, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas, Villahermosa, Tabasco, México. 86150; Rosa Martha Padrón-López, Laboratorio de microbiología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas, Villahermosa, Tabasco, México. 86150; María Dolores García-Pedrajas, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Algarrobo-Costa, Málaga, España. 29750.

**Objetivo/Background.** El objetivo de este estudio fue identificar micovirus en hongos endófitos aislados en plantaciones de *T. cacao* en Villahermosa Tabasco México. Estos virus tienen la peculiaridad de ser empleados como estrategia biológica para el control de enfermedades fúngicas, por lo tanto, este estudio pretende iniciar la búsqueda viral con el propósito de implementar estrategias de control biológico con el uso de micovirus.

**Materiales and Métodos.** Para el aislamiento fúngico se colectaron hojas y frutos, en 11 plantaciones de cacao en los municipios de Centro, Jalpa, Huimanguillo, Cunduacán y Comalcalco en Villahermosa Tabasco, México. La extracción del ARN se utilizaron la metodología de Valverde et al. (1990) y Khankhum et al., (2007). La identificación molecular de las cepas fúngica se realizó a través de la región transcrita interna ITS1 y 5, basado en el método de White y col., (1990).

**Resultados.** En este estudio se reporta la posible presencia de un mitovirus (ARNss) de la familia *Narnaviridae*. No forman partículas virales verdaderas y solo tienen un genoma de ARN monocatenario lineal (ARNss) de 2.3 – 3.6 kb y son los únicos que infectan a las mitocondrias dentro de los organismos eucariotas, se pueden transmitir vertical u horizontalmente.

**Conclusión.** La información generada en este estudio permite dar inicio al uso de micovirus para el control biológico de plagas en plantas de cacao u otros fitopatógenos, si bien, aún falta conocer los mecanismos de este virus y los efectos en el hongo. Estos resultados sugieren la posible utilización de estos organismos para el control de plagas.

**Palabras claves:** micovirus, hongos endófitos, control biológico

**Keywords:** mycovirus, endophytic fungi, biological control

## 1. Introducción

El estudio de los virus fúngicos “micovirus”, atraen la atención debido a su capacidad de infectar a los hongos patógenos, reduciendo su virulencia, por lo tanto, son agentes potenciales para control biológico, adema presentan una organización biológica, estilos de vida y ciclos de replicación. Infectan desde hongos patógenos de planta, humanos e insectos, y presentan menor impacto socioeconómico que sus homólogos (virus de plantas y animales) (Kondo et al., 2022; Son et al., 2015).

Sus hospederos se limitan a individuos dentro del mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG) o relacionados entre sí (Ghabrial et al., 2015; Yu & Kim, 2020). Se han reportado en *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota* y *Neocallimastigomycota*, se localizan principalmente en el citoplasma y mitocondrias (Kondo et al., 2022). El primer registro fue en 1962 en *Agaricus bisporus* (champiñón) infectado por *Agaricus bisporus* virus 1 (AbV-1) (Hollings, 1962). Posteriormente Banks y col. (1968) descubrió partículas virales de ARN bicatenario (ARNds) en *Penicillium stoloniferum*. Desde entonces el interés sobre estos virus que infectan a hongos patógenos es de gran importancia para la virología, algunos autores mencionan que es el inicio de la micovirología.

El genoma consiste en ARN bicatenario (ARNds), ARN monocatenario (ARNss) y ADNss. Los micovirus con ARNds se clasifican en siete familias según su número y rango de longitud de secuencia de sus segmentos genómicos (*Totiviridae*, *Endornaviridae*, *Partitiviridae*, *Megabirnaviridae*, *Chrusoviridae*, *Quadriviridae* y *Reoviridae*); siete de ARNss *Alphaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Hypoviridae*, *Metaviridae*, *Pseudoviridae* y *Narnaviridae* (Lemus-Minor et al., 2015; Myers & James, 2022). Los genomas de ADN no son comunes en este grupo de virus y hasta el momento solo se conoce un tipo de virus de ADN monocatenario (ss) circular, que causa hipovirulencia en *Sclerotinia sclerotiorum* (SsHADV-1), de la familia *Geminiviridae* (Yu et al., 2009). El genoma de estos virus varía de 2,5 a 23 kb y codifican 12 genes. El gen de

ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), es el principal para establecer características constantes en todos los virus de ARN (Peyambari et al., 2021).

En la actualidad se han descrito más de 200 micovirus, total o parcialmente, en casi todos los linajes; hongos filamentosos, endófitos, patógenos y algunas levaduras, que equivale entre un 50 a 80% de las especies fúngicas se encuentran infectadas. Una característica notable es la alteración del fenotipo y aptitudes de sus huéspedes. Esto es posible debido a que la infección viral suprime o activa genes involucrados en el crecimiento, ciclo celular, genes de señalización como ARN ribosómico o ADN polimerasa; e incluso suprime enzimas que degradan la pared celular de la planta huésped, lo que manifiesta la conversión de un hongo patógeno necrotrófico a endófito (Myers & James, 2022; Yu & Kim, 2020).

Esta característica hace atractivos a los micovirus, su capacidad de reducir su patogenicidad de los hongos, favoreciendo a la planta huésped. Esta interacción planta huésped, hongo patógeno y micovirus ha sido documentada ampliamente en *Cryphonectria parasítica*, reportando a virus de la familia *Hypoviridae*: *Cryphonectria* hipovirus 1, 2 y 3 (CHV1, CHV2 y CHV3) y Mycoreovirus 1 y 2 (MyRV1 y MyRV2), causando virulencia atenuada del hongo huésped (Rigling & Prospero, 2018; Van Diepeningen, 2021).

En esta investigación se reporta por primera vez, un micovirus de ARNs de la familia *Narnaviridae*, a partir de un hongo aislado en plantaciones de cacao (*T. cacao L.*). Los virus de la familia *Narnaviridae* son más simples de todos los virus de ARN, que se caracterizan por tener un pequeño ARN monocatenario de 2.3 – 3.6 kb que codifica un gen RdRP (ARN polimerasa dependiente de ARN) o ARN replicasa. Se han descrito hasta el momento 18 mitovirus, *Rhizoctonia solani* mitovirus (RsMV), *Cryphonectria parasítica* mitovirus, *Ophiostoma* mitovirus, *Rhizoctonia solani* mitovirus (9, 16, 17, 18, 19, 20). Por lo tanto los micovirus tienen un potencial de ser agentes de control biológico eficaz y seguros al momento de manejar en campo. Es necesario implementar estrategias de bioseguridad, caracterizar al virus y desarrollo de inoculantes (Myers & James, 2022). Este estudio es el primer paso para diseñar estrategias de control biológico para enfermedades fúngicas

en *T. cacao*, considerando la pérdida de la producción del grano es importante implementar nuevas estrategias para controlar las enfermedades fúngicas en la planta.

Finalmente desde una perspectiva agrícola, el uso de micovirus puede contribuir a una agricultura sostenible basado en un buen programa de manejo integrado de plaga. La contaminación ambiental, ha generado resistencia en las plagas, por lo tanto, es necesario implementar alternativas limpias que reduzcan los efectos nocivos sobre el medio ambiente. Si bien el uso de micovirus suena prometedor, es necesario conocer las interrelaciones ecológicas que se producen entre las plantas-hongos-micovirus.

## 2. Materiales y métodos

### Aislamiento fúngico.

En esta investigación se utilizaron 125 cepas fúngicas aislados en tejido de cacao (*T. cacao*) durante los años 2018 a 2020. Las muestras fueron colectadas de 11 sitios de muestreo localizadas en el estado de Tabasco en los municipios de Centro, Jalpa, Cunduacán, Comalcalco y Huimanguillo (Tabla 1). Se seleccionaron 5 ejemplares arbóreos de cacao por hacienda en cada uno de los individuos, se colectaron dos frutos y dos hojas (uno sano y uno infectado), y un fragmento de tallo, con un total de 300 muestras. Para el tratamiento y aislamiento fúngico de las diferentes muestras se empleó la metodología propuesta por (Aikpokpodion et al., 2009).

**Tabla 1.** Sitios de colecta del material biológico en el Estado de Tabasco.

Municipio	Localidad	Coordenadas
Huimanguillo	C. nueve 262, Carlos A. Madrazo Pob. 41, Lic. Carlos A. Madrazo C-41, Tab., México	17°54'47.5"N93°26'11.0"W
Huimanguillo	C. nueve 262, Carlos A. Madrazo Pob. 41, Lic. Carlos A. Madrazo C-41, Tab., México	17°55'39.0"N93°25'57.4"W
Cunduacán	Hacienda río Seco	18°06'14.8"N 93°18'26.3"W
Cunduacán	Hacienda Cedi	17°59'0.2.0"N93°10'23.5"W
Comalcalco	Hacienda a Luz	18°15'54.2"N 93°13'39.9"W
Jalpa	Hacienda Madrigal	18°06'00.0"N93°08'10.3"W
Jalpa	Hacienda Ulin Hernández	18°11'11.8"N93°07'08.8"W

Cunduacán	Hacienda Chapingo	18°06'14.8"N93°18'26.3"W
Cárdenas	C-40-Ernesto Aguirre Colorado	17°58'29.6"N93°29'53.8"W
Cárdenas	C-32-Lic. Francisco Trujillo Gurría	17°58'26.6"N93°29'53.4"W
Centro	Hacienda Buena Vista	17°58'39.0"N93°03'45.0"W
Centro	Carretera Vhsa., Cardenas.DACBiol	17°59'19.5"N92°58'23.2"W

Todos los aislamientos se inocularon individualmente en 40 ml de caldo papa dextrosa (PDB), incubando en agitación rotatoria (120 rpm) durante 7 a 10 días. El micelio obtenido fue filtrado en papel Miracloth de 10cm<sup>2</sup> (EMD Millipore Corp., Burlington, MA, Estados Unidos), aplicando dos lavados con agua destilada estéril. Posteriormente se trasladó a un mortero con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>), hasta pulverizar completamente las muestras.

#### **Extracción y purificación de ARN.**

El protocolo utilizado para la extracción de dsARN, se basa en cromatografía en celulosa según el método descrito por Valverde et al (1990) y Minitécnica para aislamiento de dsARN (Khankhum et al., 2007) y fue ajustado en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental “La Mayora”. Para comprobar la presencia de las dobles bandas ribosomales y del material viral se realizó una electroforesis en gel de 1.5 % de agarosa con Bromuro de etidio. Se incluyó un HyperLadder™ de 1kb. La visualización se realizó en un fotodocumentador bajo luz UV (Bio-Print -Vilber®).

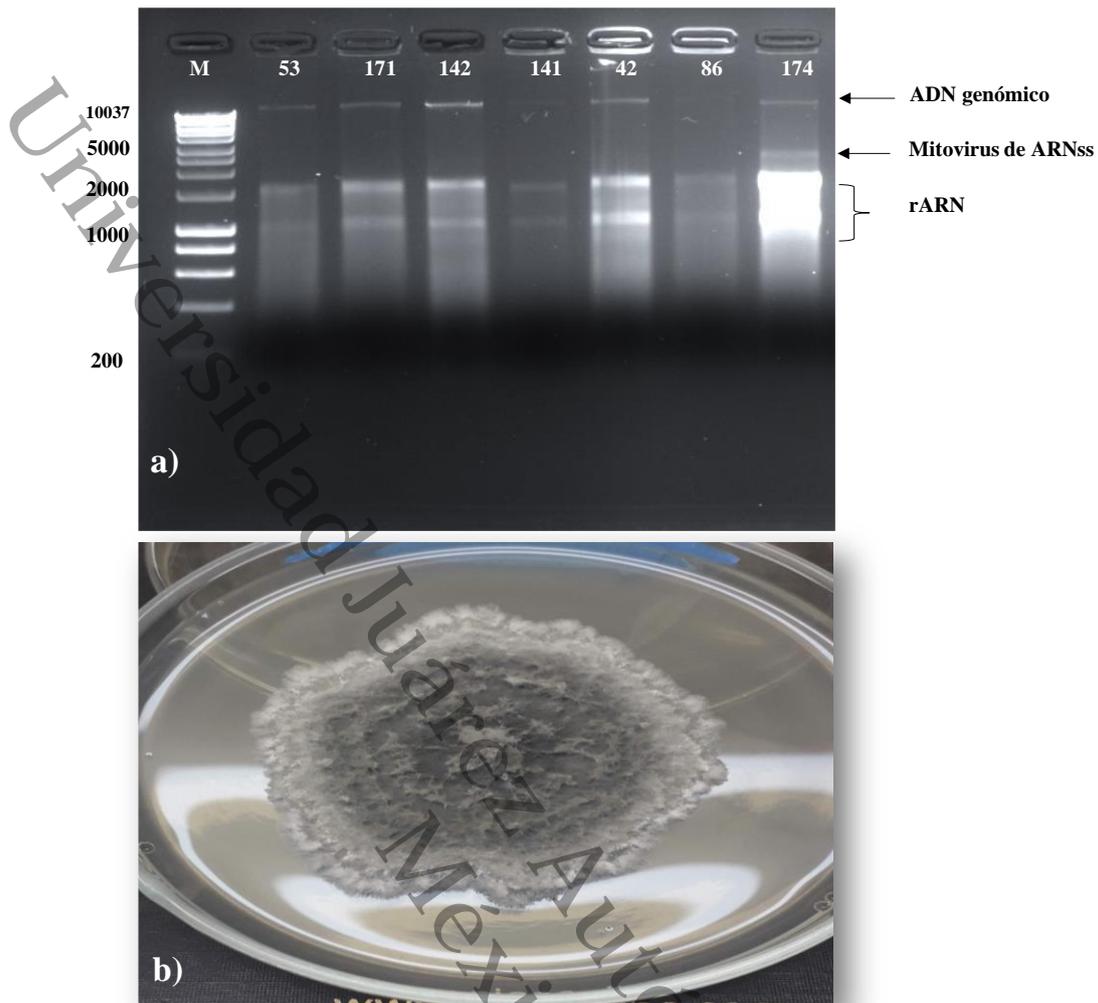
#### **Identificación molecular de los hongos.**

Posteriormente, el micelio se pulverizó con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) se procedió a realizar la extracción de ADN genómico. El ADN genómico total fue extraído del micelio de cada uno de los aislamientos individuales de acuerdo con el protocolo propuesto por Stirling, (2003) y la identidad de la cepa fúngica infectada con micovirus se realizó mediante una amplificación y secuenciación de la región de los espacios transcritos internos (ITS), con los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') e ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), y el protocolo de amplificación fue el propuesto por White et al., (1990). La secuenciación se realizó con el Genetic 3500xl Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT), en ambas direcciones ITS 1 y ITS4. Las secuencias ITS fueron editadas y ensambladas manualmente usando el software Bioedit 7.2.5 (Hall, 1999). Las secuencias fueron alineadas usando el software ClustalX 2.1 (Thompson et al., 1997), con la configuración predeterminada. El conjunto de secuencias alineadas se construyó un árbol filogenético con las secuencias de hongos endófitos utilizando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) XI (Tamura et al., 2021). Las secuencias ITS fueron analizadas con búsquedas en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) system of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3. Resultados y discusión

En este trabajo hemos identificado en un aislamiento fúngico, un elemento de ARNss, que representa el genoma de un supuesto mitovirus. Se analizaron 125 hongos mediante cromatografía en columna de celulosa. La cepa 174 fue la única que presentó un posible micovirus de un fragmento de 2.7 kb (figura 1). La identificación molecular del hongo por la región ITS fue *Endomelanconiopsis endophytica*, con un porcentaje de identidad de 99.81 y 100 % de cobertura total, aislada en plantación de cacao en Villahermosa, Tabasco, México. Esta especie se ha reportado por Rojas et al., (2018), en la República de Panamá en hojas sanas de cacao, así como en otras plantas de interés comercial (Douanla-Meli & Scharnhorst, 2021; Z.-H. Sun et al., 2016).



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa (1.5% p/v en tampón TAE) de los extractos obtenidos en cromatografía de celulosa preparados a partir de cultivos monospóricos de hongos para la identificación de micovirus. a) Carril M: marcador molecular de 1 kb (HyperLadder™), la cepa 174 presenta una banda mayor a 2.7 kb; b) morfología colonial de la cepa 174 en agar papa dextrosa (PDA) por 7 días a 28 °C.

El género mitovirus es un grupo de virus que infecta a los hongos, pertenece a la familia *Narnaviridae*, es el más simple de todos los virus de ARN. No forman partículas virales verdaderas y solo tienen un genoma de ARN monocatenario lineal (ARNss) de 2.3 – 3.6 kb que codifica un gen RdRP (ARN polimerasa dependiente de ARN). Estos virus se caracterizan por replicarse en las mitocondrias, con contenido A/U alto de 62 y 73 %, respectivamente y son incapaces de reproducir virus funcionales (Goh et al., 2018; Liu et al., 2016), un marco de lectura abierto (ORF) y con secuencias genéticas mitocondriales (Hillman & Cai, 2013). No forma viriones y se

replican en ribonucleoproteína dentro de las mitocondrias infectadas y se transmiten a las células hijas durante la división celular, transmitiéndose horizontalmente por anastomosis hifal y vertical a través de esporas (Nibert et al., 2019). Goh y col. (2018) sugiere que los mitovirus también pueden replicarse utilizando el ADN nuclear y mitocondrial de las plantas, debido a que muchas secuencias del genoma viral son similares a los genes en plantas. Los miembros de esta familia se encuentran distribuidos en los hongos filamentosos de los phyla *Ascomycota* y *Basidiomycota*.

Se han identificado mitovirus en hongos fitopatógenas, incluidos en ascomicetos y basidiomicetos; por ejemplo *Cryphonectria parasítica*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Neofusicoccum luteum*, *Cronartium ribicola* y *Botryosphaeria dothide*, causando una hipovirulencia en sus huéspedes (Abdoulaye et al., 2019; Liu et al., 2016; Marais et al., 2017; Torres-Trenas & Pérez-Artés, 2020; Wang et al., 2021). La hipovirulencia se caracteriza por disminuir el desarrollo de esporas y crecimiento fúngico, por lo tanto su patogenicidad atenuada. Esta peculiaridad los hace atractivos, debido a sus posibles beneficios en la agricultura, como agentes de biocontrol o conocer al huésped, caso contrario de sus homólogos, que causan diversos problemas a nivel mundial (Wang et al., 2021). Los micovirus se consideran como una estrategia de control biológico para de hongos patógenos de plantas, disminuyendo la virulencia del hongo infectado (Liu et al., 2016). Este fenómeno se ha estudiado ampliamente en *Cryphonectria parasítica* infectada por *Cryphonectria hipovirus 1* (CHV1), *Sclerotinia sclerotiorum* por SsHADV-1 y por un partitivirus 1 (SsPV1), *Beauveria bassiana* (*B. bassiana chysovirus 2-BbCV2*), *Botrytis cinerea* por *B. cinerea hipovirus 1* y *Rhizoctonia solani* (*R. solani partitivirus BS5*), por mencionar algunos (Nuss, 2005; A. Sun et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Por lo tanto, son agentes de biocontrol prometedor, con una investigación robusta pueden ser empleados como herramienta para el control de enfermedades fitopatógenas en *T. cacao* u otras plantas de interés comercial. Finalmente *E. endophytica*, se encuentra infectado por un mitovirus, pudiera ser utilizado para el control biológico de enfermedades fúngicas que afectan al cacao u otras plantas de interés comercial.

#### 4. Conclusiones

La información generada en este estudio permite dar inicio al uso de micovirus para el control biológico de plagas en plantas de cacao u otros fitopatógenos, si bien, aún falta conocer los mecanismos de este virus y los efectos en el hongo. Estos resultados sugieren posiblemente la utilización de estos organismos para el control de plagas. En este estudio se reporta preliminarmente la presencia de un mitovirus de ARNss de la familia *Narnavirida*, en *E. endophytica*, aislada en plantaciones de cacao del estado de Tabasco, México. A los miembros de esta familia causan la hipovirulencia en hongos patógenos, reduciendo su virulencia hacia la planta. Por lo tanto, esta cepa infectada por un micovirus pudiera ser empleada como control biológico, sin embargo, aún se necesitan más estudios, para establecer un programa de es necesario identificar molecularmente al virus y para conocer sus características funcionales, así como estudiar las estrategias de inoculación, permisos basados en la normatividad mexicana, consideraciones de vigilancia y bioseguridad en campo; pero es el primer paso para una posible estrategia de control.

#### 5. Referencias

- Abdoulaye, A. H., Foda, M. F., & Kotta-Loizou, I. (2019). Viruses Infecting the Plant Pathogenic Fungus *Rhizoctonia solani*. *Viruses*, *11*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/v11121113>
- Aikpokpodion, P. O., Motamayor, J. C., Adetimirin, V. O., Adu-Ampomah, Y., Ingelbrecht, I., Eskes, A. B., Schnell, R. J., & Kolesnikova-Allen, M. (2009). Genetic diversity assessment of sub-samples of cacao, *Theobroma cacao* L. collections in West Africa using simple sequence repeats marker. *Tree Genetics & Genomes*, *5*(4), 699-711. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0221-1>
- Douanla-Meli, C., & Scharnhorst, A. (2021). Palm Foliage as Pathways of Pathogenic Botryosphaeriaceae Fungi and Host of New *Lasiodiplodia* Species from Mexico. *Pathogens*, *10*(10), 1297. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101297>
- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., & Suzuki, N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, *479-480*, 356-368. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.034>
- Goh, C. J., Park, D., Kim, H., Sebastiani, F., & Hahn, Y. (2018). Novel Divavirus (the family Betaflexiviridae) and Mitovirus (the family Narnaviridae) species identified in basil (*Ocimum basilicum*). *Acta Virologica*, *62*(03), 304-309. [https://doi.org/10.4149/av\\_2018\\_224](https://doi.org/10.4149/av_2018_224)
- Hall, T. (1999). BioEdit: Un programa de análisis y editor de alineación de secuencias biológicas fácil de usar para Windows 95/98/NT. *Serie de simposios sobre ácidos nucleicos*, *41*, 95-98.

- Hillman, B. I., & Cai, G. (2013). The Family Narnaviridae. En *Advances in Virus Research* (Vol. 86, pp. 149-176). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00006-4>
- Hollings, M. (1962). Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*, *196*(4858), 962-965. <https://doi.org/10.1038/196962a0>
- Kondo, H., Botella, L., & Suzuki, N. (2022). Mycovirus Diversity and Evolution Revealed/Inferred from Recent Studies. *Annual Review of Phytopathology*, *60*(1), 307-336. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021621-122122>
- Lemus-Minor, C. G., Cañizares, M. C., García-Pedrajas, M. D., & Pérez-Artés, E. (2015). Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Dianthi*. *Archives of Virology*, *160*(9), 2375-2379. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2509-9>
- Liu, J.-J., Chan, D., Xiang, Y., Williams, H., Li, X.-R., Sniezko, R. A., & Sturrock, R. N. (2016). Characterization of Five Novel Mitoviruses in the White Pine Blister Rust Fungus *Cronartium ribicola*. *PLOS ONE*, *11*(5), e0154267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154267>
- Marais, A., Nivault, A., Faure, C., Theil, S., Comont, G., Candresse, T., & Corio-Costet, M.-F. (2017). Determination of the complete genomic sequence of Neofusicoccum luteum mitovirus 1 (NLMV1), a novel mitovirus associated with a phytopathogenic Botryosphaeriaceae. *Archives of Virology*, *162*(8), 2477-2480. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3338-9>
- Myers, J. M., & James, T. Y. (2022). Mycoviruses. *Current Biology*, *32*(4), R150-R155. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.049>
- Nibert, M. L., Debat, H. J., Manny, A. R., Grigoriev, I. V., & Licht, H. H. D. F. (2019). Mitovirus and Mitochondrial Coding Sequences from Basal Fungus *Entomophthora muscae*. *Viruses*, *11*(4), 351. <https://doi.org/10.3390/v11040351>
- Nuss, D. L. (2005). Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(8), 632-642. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1206>
- Peyambari, M., Thapa, V., & Roossinck, M. J. (2021). Evolution of Mycoviruses. En *Encyclopedia of Virology* (pp. 457-460). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21322-8>
- Rigling, D., & Prospero, S. (2018). *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology*, *19*(1), 7-20. <https://doi.org/10.1111/mpp.12542>
- Son, M., Yu, J., & Kim, K.-H. (2015). Five Questions about Mycoviruses. *PLOS Pathogens*, *11*(11), e1005172. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005172>
- Sun, A., Zhao, L., Sun, Y., Chen, Y., Li, C., Dong, W., & Yang, G. (2023). Horizontal and Vertical Transmission of a Mycovirus Closely Related to the Partitivirus RhsV717 That Confers Hypovirulence in *Rhizoctonia solani*. *Viruses*, *15*(10), 2088. <https://doi.org/10.3390/v15102088>
- Sun, Z.-H., Li, H.-H., Liang, F.-L., Chen, Y.-C., Liu, H.-X., Li, S.-N., Tan, G.-H., & Zhang, W.-M. (2016). Two New Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Endomelanconiopsis endophytica*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(7), 943. <https://doi.org/10.3390/molecules21070943>

- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Torres-Trenas, A., & Pérez-Artés, E. (2020). Characterization and Incidence of the First Member of the Genus Mitovirus Identified in the Phytopathogenic Species *Fusarium oxysporum*. *Viruses*, 12(3), 279. <https://doi.org/10.3390/v12030279>
- Van Diepeningen, A. D. (2021). Biocontrol via mycoviruses: A neglected option for bioprotection? En W. J. Ravensberg & Koppert Biological Systems, The Netherlands, *Burleigh Dodds Series in Agricultural Science* (pp. 541-584). Burleigh Dodds Science Publishing. <https://doi.org/10.19103/AS.2021.0093.20>
- Wang, H., Liu, H., Lu, X., Wang, Y., & Zhou, Q. (2021). A novel mitovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*. *Archives of Virology*, 166(5), 1507-1511. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05023-z>
- Yu, J., & Kim, K.-H. (2020). Exploration of the interactions between mycoviruses and *Fusarium graminearum*. En *Advances in Virus Research* (Vol. 106, pp. 123-144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.01.004>
- Zhang, Z., Guo, W., Lu, Y., Kang, Q., Sui, L., Liu, H., Zhao, Y., Zou, X., & Li, Q. (2023). Hypovirulence-associated mycovirus epidemics cause pathogenicity degeneration of *Beauveria bassiana* in the field. *Virology Journal*, 20(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02217-6>



## CAPITULO IV. ARTÍCULO 2 (ACEPTADO)

### Presencia de hongos endófitos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.), en el Estado de Tabasco, México

<https://doi.org/10.32854/agrop.v16i9.2636>



Tipo de artículo. Artículo científico

## Presencia de hongos endófitos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.), en el Estado de Tabasco, México.

Vázquez-Cruz, Lucero.<sup>1</sup>; Leshner-Gordillo, Julia. M.<sup>1\*</sup>; Ramos-Hernández, Eder.<sup>2</sup>; Padrón-López, Rosa. M.<sup>1</sup>; García-Pedrajas, María. D.<sup>3</sup>; Gallardo-Álvarez, Manuel. I.<sup>1</sup>; Montejó-Méndez, Heidi. B.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas, Villahermosa, Tabasco, México. 86150

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Área de investigación frutales tropicales. Huimanguillo, Tabasco, México. 86400.

<sup>3</sup>Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Algarrobo-Costa, Málaga, España. 29750

\*Autor para correspondencia: julialesher1@gmail.com

### ABSTRACT

The present work was done with the objective of identifying endophytic fungi associated with *Theobroma cacao* L. In Centro, Cunduacán and Comalcalco, locations into the state of Tabasco. The molecular identity used was the region of the Internal Transcribed Spaces (ITS), ITS 1 and ITS 4. Identifying fifteen fungal strains, grouped into thirteen different species, belonging to Ascomycota phylum; distributed in three different classes: *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes* and *Sordariomycetes*. It is important to mention that it is the first record of *Endomelanconiopsis endophytica* and *Freycinetia* founded in cacao in Tabasco. In addition, we also identified *Aspergillus foetidus*, *fischeri*, *delicatus arcoverdensis*; *Thielaviopsis ethacetica*, *Cophinforma atrovirens*, *Neurospora udagawae*, *Diaporthe miriciae*, *Nodulisporium indicum*, *Cophinforma atrovirens*; *Colletotrichum tainanense* y *hebelense*. Many of this endophytic fungi are secondary metabolites and antioxidants producers that can be used in medical industry or for biological control of phytopathogenic diseases, such as *Moniliophthora roreri*.

**Keywords:** Cocoa, fungi, endophytes.

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de identificar hongos endófitos asociados a *Theobroma cacao* L., en Centro, Cunduacán y Comalcalco en el Estado de Tabasco. Se utilizó la identidad molecular de la región de los espacios transcritos internos (ITS), ITS 1 e ITS 4. Identificando 15 cepas fúngicas, agrupados en 13 especies diferentes, pertenecen al filo Ascomycota, distribuidos en tres clases *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes* y *Sordariomycetes*. Es importante hacer mención que se reporta el primer registro de *Endomelanconiopsis endophytica* y *freycinetiae* en cacao en Tabasco. Además se identificó a *Aspergillus foetidus*, *fischeri*, *delicatus arcoverdensis*; *Thielaviopsis ethacetica*, *Cophinforma atrovirens*, *Neurospora udagawae*, *Diaporthe miriciae*, *Nodulisporium indicum*, *Cophinforma atrovirens*; *Colletotrichum tainanense* y *hebeiense*. Muchos de estos hongos endofíticos son productores de metabolitos secundarios o antioxidantes, que pueden ser utilizados en la industria médica o para el control biológico de enfermedades fitopatógenas como *Moniliophthora roreri*.

**Palabras clave:** Cacao, hongos, endófitos.

## INTRODUCCIÓN

El sector agroalimentario es una de las actividades socioeconómicas más importantes a nivel mundial por proveer una gran diversidad de productos alimentarios para satisfacer las necesidades humanas. Este sector se ha visto impactado por cambios globales que inciden en la economía, la producción de los agricultores y por diversas enfermedades fitopatógenas que causan pérdidas significativas en los cultivos (Wickramasuriya & Dunwell., 2018; Aguiar et al., 2023). Pero, los microorganismos también desempeñan un papel importante en el ecosistema, la planta sin la ayuda de los microbios mutualista, no podrían sobrevivir ya que mejoran el sistema inmunológico, promueven el crecimiento y eliminan las enfermedades transmitidas por suelo y el

microbioma es considerado como un reservorio de genes. El cacao 1  
(*Theobroma cacao* L.) de la familia *Malvaceae*, es uno de los cultivos 2  
más importantes a nivel mundial y que ha enfrentado diversas proble- 3  
máticas, principalmente por enfermedades fitopatógenas (Aikpokpo- 4  
dion et al., 2009). Se cultiva en más de 58 países de África, América, 5  
Asia y Oceanía. La Organización Internacional del Cacao (ICCO), re- 6  
portó una producción mundial de 4,923 mil toneladas en 2021/2022 7  
(MIDAGRI, 2022). En el 2021, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo 8  
Rural (SEDER), informa que México ocupa el catorceavo productor a 9  
nivel mundial con 28,106 toneladas de grano y 44,500 a 47,800 hec- 10  
táreas de cacao; Tabasco, Chiapas y Guerrero son las principales re- 11  
giones productoras. La producción del grano se ha visto afectada prin- 12  
cipalmente por hongos fitopatógenos con pérdidas de 38 a 70% (Díaz 13  
et al., 2020). Algunos fitopatógenos importantes son: *Moniliophthora* 14  
*roreri*, *M. perniciosa*, (Bailey et al., 2018); *Phytophthora palmivora*, *P.* 15  
*theobromicola*, y *Nodulosporium* sp., (Decloquement et al., 2021; 16  
González et al., 2019). Otros hongos reportados en la literatura son 17  
los endófitos, los cuales habitan en las plantas sin causar síntomas 18  
aparentes de una enfermedad, en una relación de antagonismo ba- 19  
lanceada, se provee de nutrientes y alojamiento para el hongo. Ade- 20  
más, el hongo favorece el sistema inmunológico del huésped, produce 21  
metabolitos secundarios y mejora la resistencia a patógenos (Tiwari & 22  
Bae, 2022). Se han identificado como hongos endófitos de plantas a 23  
*Fusarium graminearum*, *F. equiseti*, *Lasiodiplodia jatrofiphicola* (Cruz 24  
et al., 2022). En *T. cacao* se han aislado a *C. gloeosporioides*, *tropi-* 25  
*cale*, *theobromicola* (Christian et al., 2019); *Lasiodiplodia theobromae*, 26  
*Fusarium chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *Verticillium luteo* (Rubini et 27  
al., 2005); por mencionar algunos. Debido a lo anterior y a la gran 28  
importancia que juegan los organismos fúngicos en las plantas, espe- 29  
cíficamente en *T. cacao* L., el objetivo de esta investigación se centró 30  
en el aislamiento e identificación molecular de hongos endófitos de 31  
tres plantaciones de cacao en el estado de Tabasco, con la finalidad 32

de aportar conocimiento sobre la diversidad fúngica de este importante cultivo para México y el estado de Tabasco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitios de muestreo

Se seleccionaron tres sitios para la toma de muestra en el Estado de Tabasco, México (figura 1): Centro (17°58'39.0"N 93°03'45.0"W-Hacienda Buena Vista); Cunduacán (18°06'14.8"N 93°18'26.3"W- Hacienda río Seco) y Comalcalco (18°15'54.2"N 93°13'39.9"W- Hacienda a Luz).

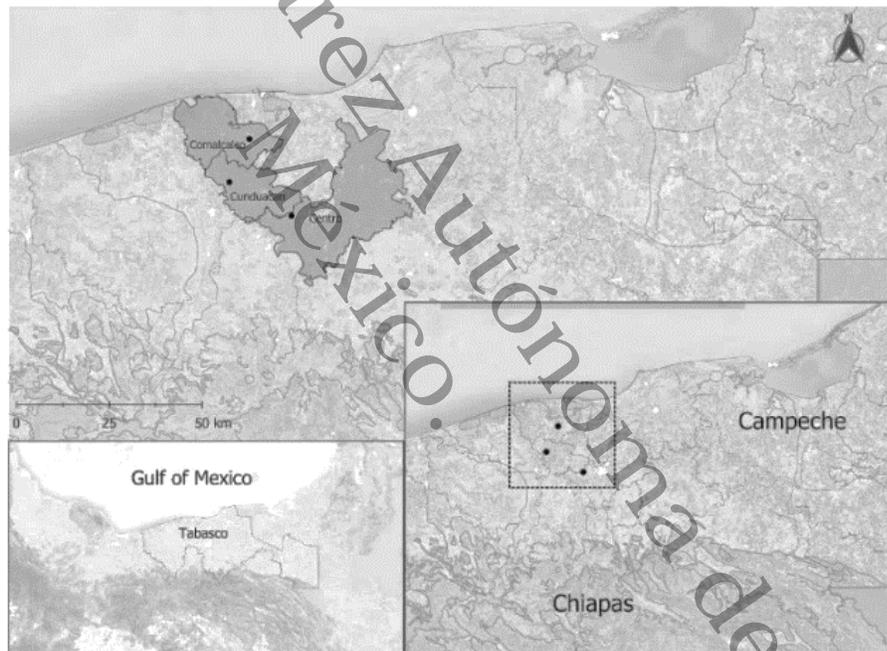


Figura 1. Localización de los tres sitios de colecta en los municipios de Centro, Cunduacán y Comalcalco, en el Estado de Tabasco, México.

### Colecta del material vegetal

La colecta se realizó en marzo de 2019, con un muestro aleatorio seleccionando frutos y hojas sanas e infectados, estos últimos con una infección leve; pequeñas manchas oscuras con apariencia aceitosa o

deformaciones; no fueron seleccionados frutos que presentaron ne- 1  
crosis o polvo blanco característico de una enfermedad fúngica (Ai- 2  
kpokpodion et al., 2009). Se seleccionaron 5 plantas de cacao por ha- 3  
cienda, en cada uno de los individuos, se colectaron dos frutos y dos 4  
hojas (uno sano y uno infectado), con un total de 60 muestras. Las 5  
hojas seleccionadas se cortaron con una pértiga previamente desin- 6  
fectada con alcohol al 70%, mientras que para los frutos se utilizó una 7  
tijera de poda. El material vegetal fue colocado en bolsas de papel 8  
Kraft, con los datos correspondiente y conservadas a temperatura de 9  
4 °C. En el laboratorio de microbiología se realizó el aislamiento de 10  
hongos; mientras que los análisis moleculares se realizaron en el la- 11  
boratorio de genómica de la Universidad Juárez Autónoma de Ta- 12  
basco en la División Académica de Ciencias Biológicas (UJAT- 13  
DACBiol). 14

### **Aislamiento del material fúngico**

 15 16

El procesamiento de las muestras se realizó bajo condiciones contro- 17  
ladas de esterilidad en una campana de flujo laminar. La metodología 18  
para el aislamiento de hongos, se utilizó la propuesta por Cañedo y 19  
Ames (2004); y Azuddin et al.,(2021). Se cortaron pequeños fragmen- 20  
tos de 3 a 5 mm a partir de bordes con lesiones y tejido sano, em- 21  
pleando una hoja de bisturí estéril. Consecutivamente el tejido vegetal 22  
fue desinfectado con hipoclorito al 1% y alcohol al 75% por un minuto 23  
cada uno y un lavado con agua tridestilada estéril (30 segundos). Se 24  
transfiriendo de 4 a 5 fragmentos a cámaras húmedas y algunos cor- 25  
tes se colocaron en una placa de agar de dextrosa y papa (PDA-Bio- 26  
xon®). Se incubaron a 27 °C durante 3 a 5 días. La purificación se 27  
realizó transfiriendo crecimiento de hifa a placas de PDA, para obtener 28  
nuevo crecimiento monospórico. 29

## **Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación de ADN**

Los aislamientos obtenidos fueron transferidos a 40 mL de caldo dextrosa y papa (PDB) en matraces Erlenmeyer de 250 mL, incubando a temperatura ambiente durante 3 a 7 días para obtener crecimiento micelial. El micelio resultante se filtró con papel Miracloth (20-25  $\mu\text{m}$ ) con dos lavados en agua tridestilada estéril. Posteriormente, el micelio se pulverizó con nitrógeno líquido ( $\text{N}_2$ ) con ayuda de un mortero y pistilo de porcelana. El ADN genómico total fue extraído del micelio de cada uno de los aislamientos individuales de acuerdo con el protocolo propuesto por Stirling, (2003). La calidad del ADN fue analizada con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm y la pureza en base a la relación 260/280. Para verificar la integridad del ADN se emplea la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### **Amplificación por Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La región de los espacios transcritos internos (ITS), entre los ribosomales (rADN) 18S-5.8S y 5.8S-28S fueron amplificadas por PCR en cada muestra. Los primers fueron ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), y el protocolo de amplificación fue el propuesto por White et al., (1990). La amplificación de PCR por muestra consistió en: 15  $\mu\text{L}$  de agua ultra pura libre de nucleasas, 10  $\mu\text{L}$  de 5X green: 1  $\mu\text{L}$  de los siguientes reactivos; albúmina de suero bovino (BSA), 0.2mM de dNTPs, MgCl a 1.5 mM, 10  $\mu\text{M}$  de cada cebador, 1.25u de GoTaq® DNA polimerasa y ADN a 100 ng. Las amplificaciones obtenidas se verificaron por electroforesis en Agarosa Ultrapura™ 1000 al 2.5% w/v (1XTAE buffer), se tiñeron con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y visualizado bajo luz UV en un transluminador Bio-Print (Vilber®). Los fragmentos se determinaron por comparación con un marcador de 1-Kb (Invitrogen®). La secuenciación se realizó con el Genetic 3500xl Analyzer (Applied

Biosystems, Foster City, CA) en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT), en ambas direcciones ITS 1 y ITS4. Las secuencias ITS fueron editadas y ensambladas manualmente usando el software Bioedit 7.2.5 (Hall, 1999). Las secuencias fueron alineadas usando el software ClustalX 2.1 (Thompson et al., 1997), con la configuración predeterminada. El conjunto de secuencias alineadas se construyó un árbol filogenético con las secuencias de hongos endófitos utilizando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) XI (Tamura et al., 2021). Las secuencias ITS fueron analizadas con búsquedas en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) system of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## RESULTADOS

En total se obtuvieron 15 aislamientos provenientes de plantaciones de cacao (*T. cacao*), en los municipios de Centro, Cunduacán y Comalcalco en Villahermosa Tabasco, México. Se obtuvieron amplicones de 450 a 650 pb correspondiente al gen de identificación (ITS 1 e ITS 4). El análisis del Blast reveló que los hongos pertenecen al filo Ascomycota, agrupadas en tres clases *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes* y *Sordariomycetes*. En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de las 15 cepas fúngicas, agrupadas en 13 especies diferentes, además se observa el porcentaje de identidad, total score y número de acceso proporcionado por la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

Tabla 1. Identificación de aislamiento del filo Ascomycota, en base a los datos obtenidos de las secuencias de rADN de ITS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Código de aislamiento	Número de Gen-Bank	Procedencia	Identificación de GenBank	Tamaño (pb)	Valor de cobertura (%)	Identidad (%)	Sitio		
							Cunducacán	Centro	Comalcalco
H174	156272.1	Hoja sana	CBS 120397 <i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	526	100	99.81		X	
H171	158434.1	Hoja sana	MFLUCC 17-0547 <i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i>	479	98	98.76		X	
H177	156272.1	Fruto sano	CBS 120397 <i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	524	100	99.80		X	
H02	163668.1	Fruto infectado	CBS 121.28 <i>Aspergillus foetidus</i>	365	88	98.46		X	
H53	137479.1	Fruto infectado	NRRL 181 <i>Aspergillus fischeri</i>	441	72	77.61		X	
H100	155899.1	Fruto infectado	IMI 50560 <i>Thielaviopsis ethacetica</i>	448	95	97.2	X		
H05	164291.1	Fruto infectado	CBS 124934 <i>Cophinforma atrovirens</i>	430	98	99.53	X		
H148	103582.1	Fruto infectado	CBS 309.91 <i>Neurospora udagawae</i>	358	93	95.85	X		
H130	147535.1	Fruto sano	BRIP 54736 <i>Diaporthe miriciae</i>	437	97	97.18	X		
H76	160206.1	Fruto infectado	CBS 101754 <i>Aspergillus delicatus</i>	262	85	94.25	X		

H60	166005. 1	Fruto sano	CBS 124.83 <i>Nodulisporium indicum</i>	461	99	95.81			X
H68	151816. 1	Hoja sana	JCM 19878 <i>Aspergillus arcovirens</i>	334	100	96			X
H301	164291. 1	Fruto sano	CBS 124934 <i>Cophinforma atrovirens</i>	337	78	93.54			X
H01	171185. 1	Fruto sano	CPC 30245 <i>Colletotrichum tainanense</i>	487	94	99.78			X
H120	160815. 1	Fruto Sano	MFLUCC 13-0726 <i>Colletotrichum hebeiense</i>	480	91	98.86			X

En la figura 2, se presenta el análisis filogenético que fue generado por el método de UPGMA con una longitud de la rama 3.3978 y las distancias evolutivas se calcularon usando el método de Máxima Verosimilitud utilizando 572 posiciones en el conjunto de datos finales.

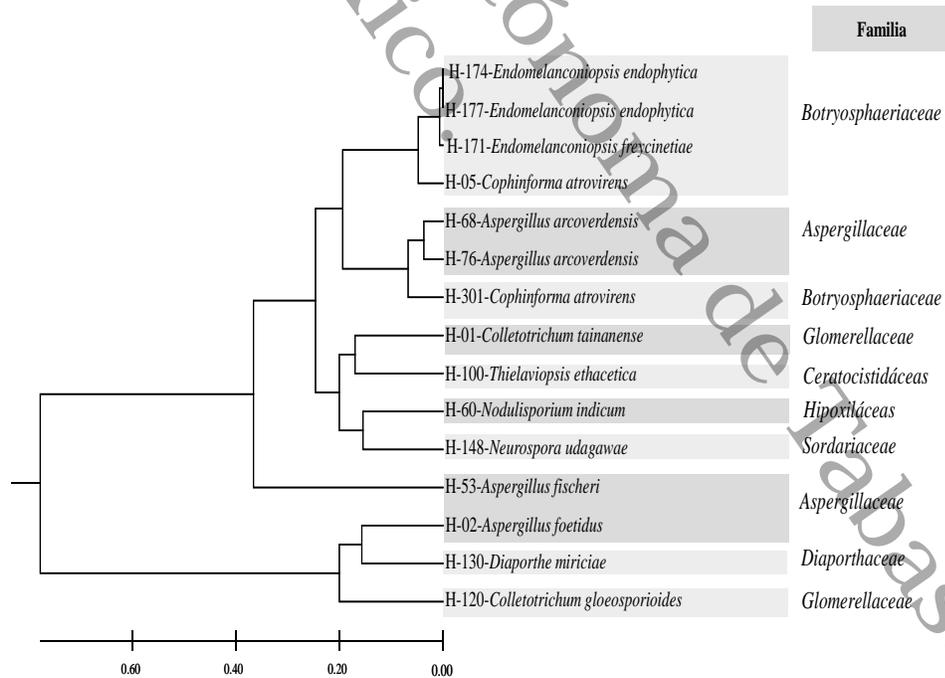


Figura 2. Representación de la proximidad filogenética basado en se- 1  
cuencias de la región ITS del ADNr de las especies identificadas ais- 2  
ladas en arboles de cacao en el Estado de Tabasco, utilizando el mé- 3  
todo UPGMA, las distancias evolutivas se calcularon usando el mé- 4  
todo de Máxima Verosimilitud. 5

## DISCUSIÓN 6

En el dendograma desarrollado a partir de las secuencias obtenidas, 8  
se observan dos grupos evolutivos, el primero de los cuales se subdi- 9  
vide en dos grupos, en los cuales se encuentran las familias: *Botr-* 10  
*yosphaeriaceae*, *Aspergillaceae*, *Glomerellaceae*, *Ceratocistidáceas*, 11  
*Hipoxiláceas* y *Sordariaceae*; en el segundo grupo se localizan a una 12  
especie de la familia *Aspergillaceae*, *Diaporthaceae* y *Glomerellaceae*, 13  
sin correlación geográfica. Es importante señalar que no se encontró 14  
registros previos de *Endomelanconiopsis endophytica*, *E. freycinetiae*, 15  
*Cophinforma atrovirens*, *Diaporthe miriciae*, *Neurospora udagawae* y 16  
*Colletotrichum tainanense* en cacao mexicano. Estas especies han 17  
sido aisladas a partir de tejidos de plantas de regiones tropicales y 18  
subtropicales, similar al clima de Tabasco (Macabeo et al., 2020). La 19  
especie *E. endophytica* fue reportado por primera vez por Rojas et al., 20  
(2008), en la República de Panamá en hojas sanas de cacao, así 21  
como en otras plantas de interés comercial como *Ficus hirta* y palmera 22  
tropical (Douanla & Scharnhorst, 2021; Sun et al., 2016). *E. freycine-* 23  
*tiae* se ha identificado en la familia *Pandanaceae*, relacionado estre- 24  
chamente con *E. endophytica* (Tibpromma et al., 2018). Residen ar- 25  
mónicamente en las plantas y son considerados hongo antagonista, 26  
capaz de inhibir a fitopatógenos como; *Colletotrichum truncatum* y *F.* 27  
*oxysporum* (Azuddin et al., 2021); además pueden segregar metabo- 28  
litos secundarios con actividad citotóxica en líneas celulares y con pro- 29  
piedades antioxidantes (Sun et al., 2016). Se identificó en este estudio 30  
a *N. indicum* del orden Xylariales (Bitzer et al., 2008); en la base de 31

datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), se encuentra registrada hasta el momento en la India y Vietnam. En México, en mazorcas de cacao infectadas se aisló a *Nodulosporium sp.*, registrada por González et al., (2019), causando síntomas de pudrición en mazorca y deshidratación en hojas. También se aisló a *D. miriciae* es una especie descrita por Thompson et al. (2015) en plantas de *Glycine max* y *Vigna radiata* en Australia. En relación con *N. udagawae* del género *Sordariaceae*, es considerado un hongo endofítico, que coloniza suelos, árboles y arbustos muertos (Fujimoto, 2018; Macabeo et al., 2020). En este estudio, se reportan a cuatro especies de la familia *Aspergillaceae*; *Aspergillus foetidus*, *arcoverdensis*, *fischeri* y *delicatus*, el género *Aspergillus*, son comunes en plantas de cacao y semillas (González et al., 2019). Por otra parte se identificó a *T. ethacetica*, patógeno generalista con una amplia variedad de hospedantes, caña de azúcar, cacao y coco. Probablemente su origen puede ser antropogénico, se ha registrado en varios países en los cinco continentes (Borges et al., 2019; Mbenoun et al., 2015). Se aislaron dos especies de género *Colletotrichum* (*C. tainanense* y *hebeiense*), encontradas frecuentemente en cacao y es uno de los géneros más importantes económicamente (Landeró et al., 2017). Estudios recientes en Indonesia, Taiwán y la India, reportan a *C. tainanense*, como patógeno en *Capsicum annum* y *Punica granatum L* (De Silva et al., 2019; Manjunatha et al., 2022), causan una enfermedad llamada antracnosis. Finalmente, especies como *E. endophytica*, *A. arcoverdensis*, *D. miriciae* y *N. indicum*, podrían ser utilizadas para el control biológico de enfermedades en plantas, principalmente para cacao, debido a que la literatura expresa que pueden presentar una serie de sustancias químicas con actividad antioxidante, antiinflamatoria y de gran interés en la industria farmacéutica, cosmetológica y para el control biológico (Fujimoto, 2018; Reyes et al., 2021). Estos resultados sugieren que el sistema agroforestal, guarda una gran diversidad de especies fúngicas, muchas de ellas pueden ser utilizadas como control biológico o

para el desarrollo en la industria farmacéutica (Reyes et al., 2021). Cabe destacar que es necesario realizar más estudios a los hongos identificados, como pruebas de patogenicidad, detección de metabolitos o aplicar métodos genómicos, basados en marcadores moleculares que permitan identificar las posibles variantes alélicas asociadas a la patogenicidad y agresividad de estas especies (Douanla-Meli & Scharnhorst, 2021).

## CONCLUSIONES

En esta investigación reportamos a 13 especies de hongos endofíticos diferentes aisladas a partir de árboles de cacao en el estado de México. Reportando especie endófitas no patógenas hasta el momento (*E. endophytica*, *E. freycinetiae*, *A. arcoverdensis*, *D. miriciae*), que con estudios moleculares y de patogenicidad pudieran ser empleados como organismos para el control biológicos de fitopatógenos en arboles de interés económicos, entre ellos el cacao.

## REFERENCIAS

1. Aguiar, M., Conway, A. J., Bell, J. K., & Stewart, K. J. (2023). Agroecosystem edge effects on vegetation, soil properties, and the soil microbial community in the Canadian prairie. PLOS ONE, 18(4), e0283832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283832>
2. Aikpokpodion, P. O., Motamayor, J. C., Adetimirin, V. O., Adu-Am-pomah, Y., Ingelbrecht, I., Eskes, A. B., Schnell, R. J., & Kolesnikova-Allen, M. (2009). Genetic diversity assessment of sub-samples of cacao, *Theobroma cacao* L. collections in West Africa using simple sequence repeats marker. Tree Genetics & Genomes, 5(4), 699-711. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0221-1>
3. Azuddin, N. F., Mohd, M. H., Rosely, N. F. N., Mansor, A., & Zakaria, L. (2021). Molecular Phylogeny of Endophytic Fungi from Rattan (*Calamus castaneus* Griff.) Spines and Their Antagonistic

- 
- Activities against Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Fungi*, 7(4), 1  
Article 4. <https://doi.org/10.3390/jof7040301> 2
4. 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. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580-1594. 3  
<https://doi.org/10.1111/mpp.12648> 4 5 6
5. Borges, A. F., de Alcântara Neto, F., da Silva Matos, K., Júnior, J. E. A. B., Júnior, N. S. M., Moreira, S. I., & de Melo, M. P. (2019). *Thielaviopsis ethacetica* the etiological agent of sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 44(5), 460-467. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00298-9> 7 8 9 10 11
6. Calderón, A. R. A., Quispe, J. R. A., & Monroy, E. R. C. (2022). Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). Boletín trimestral(01). <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/3561419/Commodities%20Cacao%3A%20ener-mar%202022.pdf> 12 13 14 15 16
7. Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos fitopatógenos (1er ed.). Centro Internacional de la Papa (CIP). <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf> 17 18 19 20
8. Cardoso, J. E., Fonseca, W. L., Viana, F. M. P., Ootani, M. A., Araújo, F. S. A., Brasil, S. O. S., Mesquita, A. L. M., & Lima, C. S. (2019). First Report of *Cophinforma atrovirens* Causing Stem Rot and Dieback of Cashew Plants in Brazil. *Plant Disease*, 103(7), 1772-1772. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1574-PDN> 21 22 23 24 25
9. Christian, N., Herre, E. A., & Clay, K. (2019). Foliar endophytic fungi alter patterns of nitrogen uptake and distribution in *Theobroma cacao*. *New Phytologist*, 222(3), 1573-1583. <https://doi.org/10.1111/nph.15693> 26 27 28 29
10. *Collecting\_and\_preserving\_fungi.pdf*. (s. f.). Recuperado 12 de julio de 2023, de [https://assets.ipcc.int/static/media/uploads/resources/collecting\\_and\\_preserving\\_fungi.pdf](https://assets.ipcc.int/static/media/uploads/resources/collecting_and_preserving_fungi.pdf) 30 31 32

11. Cruz-Dávila, J., Pérez, J. V., Castillo, D. S. del, & Diez, N. (2022). Fusarium graminearum as a producer of xylanases with low cellulases when grown on wheat bran. *Biotechnology Reports*, 35, e00738. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00738>
12. De Silva, D. D., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., Ades, P. K., Nasraddin, A., Mongkolporn, O., & Taylor, P. W. J. (2019). Identification, prevalence and pathogenicity of Colletotrichum species causing anthracnose of Capsicum annuum in Asia. *IMA Fungus*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0001-y>
13. Decloquement, J., Ramos-Sobrinho, R., Elias, S. G., Britto, D. S., Puig, A. S., Reis, A., Da Silva, R. A. F., Honorato-Júnior, J., Luz, E. D. M. N., Pinho, D. B., & Marelli, J.-P. (2021). Phytophthora theobromicola sp. nov.: A New Species Causing Black Pod Disease on Cacao in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 12, 537399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399>
14. Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Aime, M. C. (2020). The History of Cacao and Its Diseases in the Americas. *Phytopathology*, 110(10), 1604-1619. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
15. Douanla-Meli, C., & Scharnhorst, A. (2021). Palm Foliage as Pathways of Pathogenic Botryosphaeriaceae Fungi and Host of New Lasiodiplodia Species from Mexico. *Pathogens*, 10(10), 1297. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101297>
16. Fujimoto, H. (2018). Immunomodulatory constituents from Ascomycetous fungi. *Journal of Natural Medicines*, 72(1), 20-31. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1162-x>
17. González Ruiz, A., Sánchez Arizpe, A., Ochoa Fuentes, Y., Galindo Cepeda, M., Rodríguez Guerra, R., & Flores Torres, L. (2019). Primer reporte de Nodulosporium (Xylariaceae) en Theobroma cacao L. en Chiapas, México y pruebas de patogenicidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10(4), 779-788. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1657>

18. Hall, T. (1999). BioEdit: Un programa de análisis y editor de alineación de secuencias biológicas fácil de usar para Windows 95/98/NT. Serie de simposios sobre ácidos nucleicos, 41, 95-98.
19. Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), GBIF Helpdesk. (2023). [Secuencias INSDC. Versión 1.30. Archivo Europeo de Nucleótidos (EMBL-EBI). Conjunto de datos de metadatos]. <https://www.gbif.org/occurrence/3818537631>
20. Landero Valenzuela, N., Lara Vivero, F., Andrade Hoyos, P., Aguilar Pérez, L., & Aguado Rodríguez, G. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 7(5), 1189-1198.
21. Macabeo, A. P. G., Cruz, A. J. C., Narmani, A., Arzanlou, M., Babai-Ahari, A., Pilapil, L. A. E., Garcia, K. Y. M., Huch, V., & Stadler, M. (2020). Tetrasubstituted  $\alpha$ -pyrone derivatives from the endophytic fungus, *Neurospora udagawae*. Phytochemistry Letters, 35, 147-151. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.11.010>
22. Manjunatha, N., Sharma, J., Pokhare, S. S., Agarrwal, R., Patil, P. G., Sirsat, J. D., Chakranarayan, M. G., Bicchal, A., Ukale, A. S., & Marathe, R. A. (2022). Characterization of *Alternaria* and *Colletotrichum* Species Associated with Pomegranate (*Punica granatum* L.) in Maharashtra State of India. Journal of Fungi, 8(10), 1040. <https://doi.org/10.3390/jof8101040>
23. Mbenoun, M., Wingfield, M. J., Letsoalo, T., Bihon, W., Wingfield, B. D., & Roux, J. (2015). Independent origins and incipient speciation among host-associated populations of *Thielaviopsis ethacetica* in Cameroon. Fungal Biology, 119(11), 957-972. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.05.009>
24. Reyes, R. (2021). Identification and evaluation of enzymatic ability of fungal endophytes from *Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands. Studies in Fungi, 6(1), 460-468. <https://doi.org/10.5943/sif/6/1/35>

25. Rojas, E. I., Herre, E. A., Mejía, L. C., Arnold, A. E., Chaverri, P., & Samuels, G. J. (2008). Endomelanconiopsis, a new anamorph genus in the Botryosphaeriaceae. *Mycologia*, 100(5), 760-775. <https://doi.org/10.3852/07-207>
26. Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W. V., Maki, C. S., Araújo, W. L., Santos, D. R. dos, & Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1, 24-33. <https://doi.org/10.7150/ijbs.1.24>
27. SIAP. (2022). Panorama Agroalimentario 2022 [Servicio de Información Agroalimentaria y Pes]. Gobierno de México. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2022/Panorama-Agroalimentario-2022](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2022/Panorama-Agroalimentario-2022)
28. Stirling, D. (2003). DNA Extraction from Fungi, Yeast, and Bacteria. En J. M. S. Bartlett & D. Stirling (Eds.), *PCR Protocols* (pp. 53-54). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:53>
29. Sun, Z.-H., Li, H.-H., Liang, F.-L., Chen, Y.-C., Liu, H.-X., Li, S.-N., Tan, G.-H., & Zhang, W.-M. (2016). Two New Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Endomelanconiopsis endophytica*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(7), 943. <https://doi.org/10.3390/molecules21070943>
30. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
31. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

- 
32. Thompson, S. M., Tan, Y. P., Shivas, R. G., Neate, S. M., Morin, L., Bissett, A., & Aitken, E. A. B. (2015). Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 39-49. <https://doi.org/10.3767/003158515X687506>
33. Tibpromma, S., Hyde, K. D., Bhat, J. D., Mortimer, P. E., Xu, J., Promputtha, I., Doilom, M., Yang, J.-B., Tang, A. M. C., & Karunathna, S. C. (2018). Identification of endophytic fungi from leaves of Pandanaceae based on their morphotypes and DNA sequence data from southern Thailand. *MycKeys*, 33, 25-67. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.33.23670>
34. Tiwari, P., & Bae, H. (2022). Endophytic Fungi: Key Insights, Emerging Prospects, and Challenges in Natural Product Drug Discovery. *Microorganisms*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020360>
35. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplificación y secuenciación directa de genes de ARN ribosomal fúngico para filogenética. En *PCR Protocols* (pp. 315-322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
36. Wickramasuriya, A. M., & Dunwell, J. M. (2018). Cacao biotechnology: Current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 4-17. <https://doi.org/10.1111/pbi.12848>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24



## CAPITULO V. CONCLUSIONES GENERALES

La producción del grano de cacao en el estado Tabasco, se ha visto afectada considerablemente a consecuencia de las enfermedades fitopatógenas. Ocasionando abandono de las plantaciones o cambio de uso de suelo. Debido a la importancia comercial del grano a nivel mundial, se considera importante buscar nuevas alternativas para el manejo sostenible de las enfermedades fúngicas. Esta investigación se planteó el objetivo de buscar en hongos endófitos a micovirus, que presentan la característica de atenuar la virulencia de los hongos patógenos, favoreciendo a la planta y que probablemente favorezca la producción del grano.

Se analizaron 14 plantaciones de cacao en seis (Centro, Cárdenas, Comalcalco, Cunduacán, Jalpa y Huimanguillo) municipios del estado de Tabasco, con un total de 137 cepas fúngicas. Estas fueron analizadas por 3 métodos diferentes, basados en el uso de columnas de celulosa descrito por Morris y col. (1979). A pesar de los esfuerzos para el aislamiento molecular de las partículas virales, solo se detectó una cepa identificada como *Endomelanconiopsis endophytica* que presentó un micovirus de un fragmento de 2.7 kb de la familia *Narnaviridae*. Los miembros de esta familia son los virus de ARN más simples, caracterizado por una molécula de ARN de sentido positivo de 2.3 kb y codifica únicamente un ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) para dirigir su propia replicación. Representado por dos géneros: *Narnavirus* y *Mitovirus*. Estos comparten propiedades básicas de organización del genoma y se diferencian por sitios de traducción de RdRp y por lo tanto su replicación. Los *Narnavirus* se encuentran en el citosol, mientras que el género *Mitovirus* se limita a las mitocondrias (Hillman & Cai, 2013).

Se han identificado mitovirus en hongos patógenos, en *C. parasítica*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Neofusicoccum luteum*, *Cronartium ribicola* y *Botryosphaeria dothide*, causando una hipovirulencia en sus huéspedes (Abdoulaye et al., 2019; Liu et al., 2016; Marais et al., 2017; Torres-Trenas & Pérez-Artés, 2020; Wang et al., 2021a). La hipovirulencia se caracteriza por disminuir el desarrollo de esporas y crecimiento fúngico, por lo tanto su patogenicidad atenuada. Esta peculiaridad los hace atractivos, debido a sus posibles beneficios en la agricultura, como agentes de biocontrol o conocer al huésped, caso



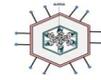
contrario de sus homólogos, que causan diversos problemas a nivel mundial (Wang et al., 2021).

Estos micovirus se consideran como una estrategia de control biológico de hongos fitopatógenos de plantas (Liu et al., 2016). Este fenómeno se ha estudiado en *C. parasítica* infectada por *Cryphonectria hipovirus 1* (CHV1), *Sclerotinia sclerotiorum* por SsHADV-1 y por un *partitivirus 1* (SsPV1), *Beauveria bassiana* (*B. bassiana chysovirus 2*-BbCV2), *Botrytis cinerea* por *B. cinerea hipovirus 1* y *Rhizoctonia solani* (*R. solani partitivirus* BS5), por mencionar algunos (Nuss, 2005; A. Sun et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Es importante mencionar la baja incidencia en esta investigación, puede deberse a múltiples factores, tipo de muestreo o metodología empleada desde el aislamiento de los hongos o extracción de las partículas virales. Según, Rodríguez y col., (2023), menciona que los porcentajes de incidencia pueden variar de 0 a 100 %, estos valores pueden depender del método para la detección y aislamiento de partículas virales. La mayoría de los investigadores, utilizan la microcelulosa (CF11), es económica y fácil de conseguir, a partir de columnas y una serie de lavados y precipitados y al final detección de bandas por electroforesis aíslan estos virus por detección de bandas.

En un estudio donde obtuvieron 100 % de incidencia, utilizaron el método de Secuenciación de alto rendimiento para dsRNA en *Rosellinia necatrix* (este estudio se realizó en Japón y España). Un segundo estudio con el mismo valor de prevalencia, detectaron por metatranscriptómica a virus en *Botrytis cinerea*. En Nueva Zelanda la incidencia fue del 2 al 9% empleando el mismo método. La prevalencia de estos micovirus en hongos filamentosos puede variar, dependiendo el método de búsqueda de micovirus, VCG o utilizan aislamientos cultivados donde en cada traspaso se pueden eliminar los virus. Actualmente el método de metatranscriptómica detecte con mayor exactitud las secuencias de toda la transcripción de ARN presentes en la célula y uso de análisis bioinformático, permitan discriminar las transcripciones del huésped de aquellas copias de los micovirus de ARN o ADN.

El uso de agente con hipovirulencia ofrece una esperanza para gestionar las enfermedades fitopatógenas que afectan a los cultivos de interés comercial. A los virus los aprovechamos como agentes de control contra sus huéspedes de enfermedades forestales, pero aún presenta



grandes desafíos. En el control biológico depende de varias condiciones ambientales y biológicas, para así obtener resultados positivos (Milgroom & Cortesi, 2004). En el uso de organismos hipovirulentos no es la excepción, los mecanismos de transmisión de estos virus se efectúa intracelularmente “anastomosis hifal o fusión de hifas”, división celular y esporulación (García-Pedrajas et al., 2019). El biocontrol basado en micovirus ha tenido gran éxito en Europa, algunos autores señalan que puede deberse a la baja diversidad genética entre las cepas de hongos. En las regiones donde se encontraban naturalmente las cepas de CHV1 hipovirulentas se propaga eficazmente, a diferencia de aquellas donde no se aislaron cepas virulentas y por lo tanto los resultados son muy desiguales (Umer et al., 2023).

Establecer el uso de micovirus no solo está relacionado con la hipovirulencia, sino además es necesario, que permanezcan dentro de la célula y se transmitan de forma eficiente entre los hongos patógenos. Una limitante es que los virus carecen de una fase infectiva extracelular y transmiten intracelularmente, por anastomosis hifal y por esporas, por lo tanto es necesario que los hongos sean compatibles vegetativamente y permanezcan en mismo VCG, ya que entre cepas incompatibles da lugar a la muerte celular programada y evita la transmisión de los micovirus. Lo anterior puede estar relacionada con baja incidencia de los micovirus.

Finalmente desde una perspectiva agrícola, el uso de micovirus puede contribuir a una agricultura sostenible basado en un buen programa de manejo integrado de plaga. La contaminación ambiental, ha generado resistencia en las plagas, por lo tanto, es necesario implementar alternativas limpias que reduzcan los efectos nocivos sobre el medio ambiente. Si bien el uso de micovirus suena prometedor, es necesario conocer las interrelaciones ecológicas que se producen entre las plantas-hongos-micovirus. La hipervirulencia no se ha comprendido por completo, es importante tomarla en cuenta si se pretende emplear un micovirus, ya que existe la posibilidad de que estos virus generen alta virulencia en su huésped fúngico. El uso de métodos molecular más novedosos como metatranscriptómica y metabolómica se están volviendo atractivos para la búsqueda de estas partículas virales, ya que permite diferenciar el ADN o ARN viral del huésped, a pesar de estos nuevos métodos, los resultados de las investigaciones han sido desiguales al momento de hablar sobre prevalencia en micovirus. Es necesario recalcar las alternativas o herramientas que nos



proporcionan estos agentes, como es el uso ARNi que involucra una serie de estudios y actualmente hay un debate científico debido a los vacíos de información. Para finalizar, los micovirus son una herramienta para el biocotrol de plagas fúngicas y nos permite conocer la ecología y coevolución de estos con sus huéspedes.

Este trabajo es el primer paso para la identificación molecular de micovirus que pueden utilizarse como una estrategia para el control biológico de enfermedades que afectan al cacao. Aunque aún falta más estudios, implementar otras estrategias de aislamiento fúngico que permitan tener otras oportunidades de aislar molecularmente a los micovirus



## CAPITULO VI. LITERATURA CITADA

- Adeniyi, D. (2019). Diversity of Cacao Pathogens and Impact on Yield and Global Production. En P. Osobase Aikpokpodion (Ed.), *Theobroma Cacao—Deploying Science for Sustainability of Global Cocoa Economy*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.81993>
- Aguiar, M., Conway, A. J., Bell, J. K., & Stewart, K. J. (2023). Agroecosystem edge effects on vegetation, soil properties, and the soil microbial community in the Canadian prairie. *PLOS ONE*, *18*(4), e0283832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283832>
- Aikpokpodion, P. O., Motamayor, J. C., Adetimirin, V. O., Adu-ampomah, Y., Ingelbrecht, I., Eskes, A. B., Schnell, R. J., & Kolesnikova-allen, M. (2009). *Genetic diversity assessment of sub-samples of cacao , Theobroma cacao L. collections in West Africa using simple sequence repeats marker*. 699-711.  
<https://doi.org/10.1007/s11295-009-0221-1>
- Aikpokpodion, P. O., Motamayor, J. C., Adetimirin, V. O., Adu-Ampomah, Y., Ingelbrecht, I., Eskes, A. B., Schnell, R. J., & Kolesnikova-Allen, M. (2009). Genetic diversity assessment of sub-samples of cacao, *Theobroma cacao* L. collections in West Africa using simple sequence repeats marker. *Tree Genetics & Genomes*, *5*(4), 699-711. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0221-1>
- Arjona-López, J. M., Telengech, P., Suzuki, N., & López-Herrera, C. J. (2021). A moderate level of hypovirulence conferred by a hypovirus in the avocado white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology*, *125*(1), 69-76.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.10.007>
- Ayaz, M., Li, C.-H., Ali, Q., Zhao, W., Chi, Y.-K., Shafiq, M., Ali, F., Yu, X.-Y., Yu, Q., Zhao, J.-T., Yu, J.-W., Qi, R.-D., & Huang, W.-K. (2023). Bacterial and Fungal Biocontrol Agents for Plant Disease Protection: Journey from Lab to Field, Current Status, Challenges, and Global Perspectives. *Molecules*, *28*(18), 6735.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28186735>
- Azuddin, N. F., Mohd, M. H., Rosely, N. F. N., Mansor, A., & Zakaria, L. (2021). Molecular Phylogeny of Endophytic Fungi from Rattan (*Calamus castaneus* Griff.)



- Spines and Their Antagonistic Activities against Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Fungi*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/jof7040301>
- 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. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580-1594. <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- 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. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580-1594. <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- Bailey, B., Evans, H., Phillips-Mora, W., Ali, S. S., & Meinhardt, L. W. (2018). *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580-1594. <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- Barbosa, C. S., Fonseca, R. R. da, Batista, T. M., Barreto, M. A., Argolo, C. S., Carvalho, M. R. de, Amaral, D. O. J. do, Silva, E. M. de A., Arévalo-Gardini, E., Hidalgo, K. S., Franco, G. R., Pirovani, C. P., Micheli, F., & Gramacho, K. P. (2018). Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora pernicioso* and *Moniliophthora roreri* subpopulations. *BMC Genomics*, 19(1), 509. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4875-7>
- Blaser, W. J., Opong, J., Yeboah, E., & Six, J. (2017). Shade trees have limited benefits for soil fertility in cocoa agroforests. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 243, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.04.007>
- Bocos, I. T., Niño-Sánchez, J., Ginésy, M., & Diez, J. J. (2022). New Insights on the Integrated Management of Plant Diseases by RNA Strategies: Mycoviruses and RNA Interference. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9236. <https://doi.org/10.3390/ijms23169236>
- Botella, L., Jung, M. H., Rost, M., & Jung, T. (2022). Natural Populations from the *Phytophthora palustris* Complex Show a High Diversity and Abundance of ssRNA and dsRNA Viruses. *Journal of Fungi*, 8(11), 1118. <https://doi.org/10.3390/jof8111118>
- Cai, G., Fry, W., & Hillman, B. (2019). PiRV-2 stimulates sporulation in *Phytophthora infestans*. *Virus Research*, 271, 197674. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197674>



- Cai, G., Myers, K., Fry, W. E., & Hillman, B. I. (2019). Phytophthora infestans RNA virus 2, a novel RNA virus from Phytophthora infestans, does not belong to any known virus group. *Archives of Virology*, 164(2), 567-572. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4050-0>
- Calderón, A. R. A., Quispe, J. R. A., & Monroy, E. R. C. (2022). *Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). Boletín trimestral(01)*. <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/3561419/Commodities%20Cacao%203A%20ene-mar%202022.pdf>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos fitopatógenos* (1er ed.). Centro Internacional de la Papa (CIP). <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Catarino, R., Ceddia, G., Areal, F. J., & Park, J. (2015). The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. *Plant Biotechnology Journal*, 13(5), 601-612. <https://doi.org/10.1111/pbi.12363>
- Chitwood-Brown, J., Vallad, G. E., Lee, T. G., & Hutton, S. F. (2021). Breeding for Resistance to Fusarium Wilt of Tomato: A Review. *Genes*, 12(11), 1673. <https://doi.org/10.3390/genes12111673>
- Choi, G. H., & Nuss, D. L. (1992). Hypovirulence of Chestnut Blight Fungus Conferred by an Infectious Viral cDNA. *Science*, 257(5071), 800-803. <https://doi.org/10.1126/science.1496400>
- Chun, J., & Kim, D.-H. (2021). Co-infection of a novel fusagravirus and a partitivirus in a Korean isolate of *Rosellinia necatrix* KACC40168. *Virus Genes*, 57(1), 121-126. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01809-6>
- Córdova-Ávalos, V., Sánchez-Hernández, M., Estrella-Chulím, N. G., Macías-Layalle, A., Sandoval-Castro, E., Martínez-Saldaña, T., & Ortiz-García, C. F. (2001). (Theobroma cacao L.) EN EL EJIDO FRANCISCO I. MADERO. *Universidad y Ciencia*.
- Correa Alvarez, J., Castro Martínez, S., & Coy, J. (2014). Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388-399. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>



- Craven, M. G., Pawlyk, D. M., Choi, G. H., & Nuss, D. L. (1993). Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *Journal of Virology*, 67(11), 6513-6521.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.67.11.6513-6521.1993>
- De Oliveira, D., Balbinotte, J., Monnerat, R., Lopes, J. R. S., Da Cunha, T., Zanardi, O. Z., De Miranda, M. P., Machado, M. A., & De Freitas-Astúa, J. (2020). Selection of *Bacillus thuringiensis* strains in citrus and their pathogenicity to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) nymphs. *Insect Science*, 27(3), 519-530.  
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12654>
- Debarbieux, L., Fischer, M., & Quax, T. (2017). Viruses of Microbes. *Viruses*, 9(9), 263.  
<https://doi.org/10.3390/v9090263>
- Decloquement, J., Ramos-Sobrinho, R., Elias, S. G., Britto, D. S., Puig, A. S., Reis, A., Da Silva, R. A. F., Honorato-Júnior, J., Luz, E. D. M. N., Pinho, D. B., & Marelli, J.-P. (2021). *Phytophthora theobromicola* sp. nov.: A New Species Causing Black Pod Disease on Cacao in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 12, 537399.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399>
- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernández, J. B., Chaves-López, C., Romanazzi, G., & Paparella, A. (2021). The Role of Fungi in the Cocoa Production Chain and the Challenge of Climate Change. *Journal of Fungi*, 7(3), 202.  
<https://doi.org/10.3390/jof7030202>
- Dennert, F., Meyer, J. B., Rigling, D., & Prospero, S. (2019). Assessing the Phytosanitary Risk Posed by an Intraspecific Invasion of *Cryphonectria parasitica* in Europe. *Phytopathology*®, 109(12), 2055-2063. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-19-0197-R>
- Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Aime, M. C. (2020). The History of Cacao and Its Diseases in the Americas. *Phytopathology*®, 110(10), 1604-1619.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
- Drouet Candell, A., Valarezo-Beltrón, O., Camacho-Abril, J., & García-Vásquez, G. (2019). Promotores de sustentabilidad para sistemas agroforestales de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Madre de Dios (Perú) y San Plácido (Ecuador). *Revista*



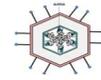
- Científica y Tecnológica UPSE*, 6(2 Dicbre.), 76-81.  
<https://doi.org/10.26423/rctu.v6i2.478>
- Du, J., Zhang, Q., Hou, S., Chen, J., Meng, J., Wang, C., Liang, D., Wu, R., & Guo, Y. (2022). Genome-Wide Identification and Analysis of the R2R3-MYB Gene Family in *Theobroma cacao*. *Genes*, 13(9), 1572. <https://doi.org/10.3390/genes13091572>
- Eusebio-Cope, A., Sun, L., Tanaka, T., Chiba, S., Kasahara, S., & Suzuki, N. (2015). The chestnut blight fungus for studies on virus/host and virus/virus interactions: From a natural to a model host. *Virology*, 477, 164-175.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.024>
- Evans, H. C. (2016). Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). En B. A. Bailey & L. W. Meinhardt (Eds.), *Cacao Diseases* (pp. 63-96). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_3)
- Gao, Z., Wu, J., Jiang, D., Xie, J., Cheng, J., & Lin, Y. (2020). ORF I of Mycovirus SsNSRV-1 is Associated with Debilitating Symptoms of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Viruses*, 12(4), 456. <https://doi.org/10.3390/v12040456>
- García-Pedrajas, M. D., Cañizares, M. C., Sarmiento-Villamil, J. L., Jacquat, A. G., & Dambolena, J. S. (2019). Mycoviruses in Biological Control: From Basic Research to Field Implementation. *Phytopathology*®, 109(11), 1828-1839.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0166-RVW>
- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., & Suzuki, N. (2015a). 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, 479-480, 356-368.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.034>
- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., & Suzuki, N. (2015b). 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, 479-480, 356-368.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.034>
- Ghabrial, S. A., & Suzuki, N. (2009). Viruses of Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 353-384. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081932>
- Ghosh, D., John, E. A., & Wilkinson, A. (2023). Clever pest control? The role of cognition in biological pest regulation. *Animal Cognition*, 26(1), 189-197.  
<https://doi.org/10.1007/s10071-022-01731-4>



- González Ruiz, A., Sánchez Arizpe, A., Ochoa Fuentes, Y., Galindo Cepeda, M., Rodríguez Guerra, R., & Flores Torres, L. (2019). *Primer reporte de Nodulosporium (Xylariaceae) en Theobroma cacao L. en Chiapas, México y pruebas de patogenicidad* | *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10(4), 779-788. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1657>
- Hao, F., Ding, T., Wu, M., Zhang, J., Yang, L., Chen, W., & Li, G. (2018). Two Novel Hypovirulence-Associated Mycoviruses in the Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*: Molecular Characterization and Suppression of Infection Cushion Formation. *Viruses*, 10(5), 254. <https://doi.org/10.3390/v10050254>
- Hao, F., Wu, M., & Li, G. (2021). Characterization of a novel genomovirus in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Virology*, 553, 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.11.007>
- Herrero, N., Sánchez Márquez, S., & Zabalgoageazcoa, I. (2009). Mycoviruses are common among different species of endophytic fungi of grasses. *Archives of Virology*, 154(2), 327-330. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0293-5>
- Hillman, B. I., Annisa, A., & Suzuki, N. (2018). Viruses of Plant-Interacting Fungi. En *Advances in Virus Research* (Vol. 100, pp. 99-116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.10.003>
- Hillman, B. I., & Cai, G. (2013). The Family Narnaviridae. En *Advances in Virus Research* (Vol. 86, pp. 149-176). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00006-4>
- Hollings, M. (1962). Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*, 196(4858), 962-965. <https://doi.org/10.1038/196962a0>
- Hough, B., Steenkamp, E., Wingfield, B., & Read, D. (2023). Fungal Viruses Unveiled: A Comprehensive Review of Mycoviruses. *Viruses*, 15(5), 1202. <https://doi.org/10.3390/v15051202>
- Hough, Howard, J. D., Brown, S., Portwood, D. E., Kilby, P. M., & Dickman, M. J. (2022). Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 980592. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.980592>



- Jacob, D., Turina, M., & Van Alfen, N. (2006). Mycovirus Cryphonectria Hypovirus 1 Elements Cofractionate with *trans* -Golgi Network Membranes of the Fungal Host *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology*, 80(13), 6588-6596. <https://doi.org/10.1128/JVI.02519-05>
- Jiāng, D., Ayllón, M. A., Marzano, S.-Y. L., Kondō, H., Turina, M., & ICTV Report Consortium. (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: Mymonaviridae 2022: This article is part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles collection. *Journal of General Virology*, 103(11). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001787>
- Jiang, D., Fu, Y., Guoqing, L., & Ghabrial, S. A. (2013). Viruses of the Plant Pathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. En *Advances in Virus Research* (Vol. 86, pp. 215-248). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00008-8>
- Jin, Y., Zhao, J.-H., & Guo, H.-S. (2021). Recent advances in understanding plant antiviral RNAi and viral suppressors of RNAi. *Current Opinion in Virology*, 46, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.12.001>
- Kamaruzzaman, M., He, G., Wu, M., Zhang, J., Yang, L., Chen, W., & Li, G. (2019). A Novel Partitivirus in the Hypovirulent Isolate QT5-19 of the Plant Pathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. *Viruses*, 11(1), 24. <https://doi.org/10.3390/v11010024>
- Kanematsu, S., Arakawa, M., Oikawa, Y., Onoue, M., Osaki, H., Nakamura, H., Ikeda, K., Kuga-Uetake, Y., Nitta, H., Sasaki, A., Suzuki, K., Yoshida, K., & Matsumoto, N. (2004). A Reovirus Causes Hypovirulence of *Rosellinia necatrix*. *Phytopathology*®, 94(6), 561-568. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.6.561>
- Kelliher, J. M., Robinson, A. J., Longley, R., Johnson, L. Y. D., Hanson, B. T., Morales, D. P., Cailleau, G., Junier, P., Bonito, G., & Chain, P. S. G. (2023). The endohyphal microbiome: Current progress and challenges for scaling down integrative multi-omic microbiome research. *Microbiome*, 11(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01634-7>
- Khalifa, M. E., & Pearson, M. N. (2014). Characterisation of a novel hypovirus from *Sclerotinia sclerotiorum* potentially representing a new genus within the Hypoviridae. *Virology*, 464-465, 441-449. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.005>



- Khan, H. A., Mukhtar, M., & Bhatti, M. F. (2023). Mycovirus-induced hypovirulence in notorious fungi *Sclerotinia*: A comprehensive review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(3), 1459-1478. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01073-4>
- Khan, H. A., Nerva, L., & Bhatti, M. F. (2023). The good, the bad and the cryptic: The multifaceted roles of mycoviruses and their potential applications for a sustainable agriculture. *Virology*, 585, 259-269. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.07.004>
- Khankhum, S., Escalante, C., De Souto And, E. R., & Valverde, R. A. (2017). Extraction and electrophoretic analysis of large dsRNAs from desiccated plant tissues infected with plant viruses and biotrophic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 147(2), 431-441. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1014-7>
- Koller, J., Sutter, L., Gonthier, J., Collatz, J., & Norgrove, L. (2023). Entomopathogens and Parasitoids Allied in Biocontrol: A Systematic Review. *Pathogens*, 12(7), 957. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070957>
- Kondo, H., Kanematsu, S., & Suzuki, N. (2013). Viruses of the White Root Rot Fungus, *Rosellinia necatrix*. En *Advances in Virus Research* (Vol. 86, pp. 177-214). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00007-6>
- Kongor, J. E., De Steur, H., Van de Walle, D., Gellynck, X., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2018). Constraints for future cocoa production in Ghana. *Agroforestry Systems*, 92(5), 1373-1385. <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0082-9>
- Kotta-Loizou, I. (2021). Mycoviruses and their role in fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 63, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.05.007>
- Krug, J. C. (2004). MOIST CHAMBERS FOR THE DEVELOPMENT OF FUNGI. En *Biodiversity of Fungi* (pp. 589-593). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50030-1>
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., & Moënne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends in Plant Science*, 22(7), 583-595. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.008>
- Li, P., Bhattacharjee, P., Wang, S., Zhang, L., Ahmed, I., & Guo, L. (2019). Mycoviruses in *Fusarium* Species: An Update. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 257. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00257>



- Li, P., Tedersoo, L., Crowther, T. W., Wang, B., Shi, Y., Kuang, L., Li, T., Wu, M., Liu, M., Luan, L., Liu, J., Li, D., Li, Y., Wang, S., Saleem, M., Dumbrell, A. J., Li, Z., & Jiang, J. (2023). Global diversity and biogeography of potential phytopathogenic fungi in a changing world. *Nature Communications*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42142-4>
- Lihang, P., Wang, S., Zhang, L., Qiu, D., Zhou, X., & Guo, L. (2020). A tripartite ssDNA mycovirus from a plant pathogenic fungus is infectious as cloned DNA and purified virions. *Science Advances*, *6*(14), eaay9634. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay9634>
- MacDonald, W. L. (1991). Biological Control of Chestnut Blight: Use and Limitations of Transmissible Hypovirulence. *Plant Disease*, *75*(7), 653. <https://doi.org/10.1094/PD-75-053>
- Márquez, L. M., Redman, R. S., Rodriguez, R. J., & Roossinck, M. J. (2007). A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance. *Science*, *315*(5811), 513-515. <https://doi.org/10.1126/science.1136237>
- Martin, M. Á., & Ramos, S. (2021). Impact of cocoa flavanols on human health. *Food and Chemical Toxicology*, *151*, 112121. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112121>
- Marzano, S.-Y. L., Hobbs, H. A., Nelson, B. D., Hartman, G. L., Eastburn, D. M., McCoppin, N. K., & Domier, L. L. (2015). Transfection of *Sclerotinia sclerotiorum* with *In Vitro* Transcripts of a Naturally Occurring Interspecific Recombinant of *Sclerotinia sclerotiorum* Hypovirus 2 Significantly Reduces Virulence of the Fungus. *Journal of Virology*, *89*(9), 5060-5071. <https://doi.org/10.1128/JVI.03199-14>
- Meinhardt, L. W., Rincones, J., Bailey, B. A., Aime, M. C., Griffith, G. W., Zhang, D., & Pereira, G. a. G. (2008). *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology*, *9*(5), 577. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00496.x>
- Meraz-Pérez, I. M., Carvalho, M. R., Sena, K. F., Soares, Y. J. B., Estrela Junior, A. S., Lopes, U. V., dos Santos Filho, L. P., Araújo, S. A., Soares, V. L. F., Pirovani, C. P., & Gramacho, K. P. (2021). El patosistema *Moniliophthora perniciosa* – mazorca de cacao: Estrategias de defensa estructurales y activadas contra el establecimiento



- de enfermedades. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115, 101656.  
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101656>
- MIDAGRI. (2022). Observatorio de Commodities Cacao. En *Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego*.
- Milgroom, M. G., & Cortesi, P. (2004). BIOLOGICAL CONTROL OF CHESTNUT BLIGHT WITH HYPOVIRULENCE: A Critical Analysis. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 311-338.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140325>
- Morris, T. J. (1979). Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA from Virus-Infected Plant and Fungal Tissue. *Phytopathology*, 69(8), 854. <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-854>
- Morsy, M. R., Oswald, J., He, J., Tang, Y., & Roossinck, M. J. (2010). Teasing apart a three-way symbiosis: Transcriptome analyses of *Curvularia protuberata* in response to viral infection and heat stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 401(2), 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.034>
- Mortimer, R., Saj, S., & David, C. (2018). Supporting and regulating ecosystem services in cacao agroforestry systems. *Agroforestry Systems*, 92(6), 1639-1657.  
<https://doi.org/10.1007/s10457-017-0113-6>
- Myers, J. M., & James, T. Y. (2022a). Mycoviruses. *Current Biology*, 32(4), R150-R155.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.049>
- Myers, J. M., & James, T. Y. (2022b). Mycoviruses. *Current Biology*, 32(4), R150-R155.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.049>
- Nnadi, N. E., & Carter, D. A. (2021). Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathogens*, 17(4), e1009503.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009503>
- Nuss, D. L. (2005). Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 632-642. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1206>
- Nuss, D. L. (2011). Mycoviruses, RNA Silencing, and Viral RNA Recombination. En *Advances in Virus Research* (Vol. 80, pp. 25-48). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385987-7.00002-6>



- Ordóñez-Valencia, C., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Hernández-Cuevas, L. V., & Larsen, J. (2018). Desarrollo morfológico temprano de esclerocios por *Sclerotinia sclerotiorum* en presencia de bicarbonato de potasio. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(3).  
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1803-4>
- Perrine-Walker, F. (2020). *Phytophthora palmivora*–Cocoa Interaction. *Journal of Fungi*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/jof6030167>
- Peyambari, M., Thapa, V., & Roossinck, M. J. (2021). Evolution of Mycoviruses. En *Encyclopedia of Virology* (pp. 457-460). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21322-8>
- 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>
- Phillips-Mora, W., Baqueros, F., Melnick, R., & Bailey, B. (2015). First report of frosty pod rot caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Bolivia. *New Disease Reports*, 31, 29. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.031.029>
- Poimala, A., Raco, M., Haikonen, T., Černý, M., Parikka, P., Hantula, J., & Vainio, E. J. (2022). Bunyaviruses Affect Growth, Sporulation, and Elicitin Production in *Phytophthora cactorum*. *Viruses*, 14(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/v14122596>
- Potgieter, C. A., Castillo, A., Castro, M., Cottet, L., & Morales, A. (2013). A wild-type *Botrytis cinerea* strain co-infected by double-stranded RNA mycoviruses presents hypovirulence-associated traits. *Virology Journal*, 10(1), 220. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-220>
- Raco, M., Vainio, E. J., Sutela, S., Eichmeier, A., Hakalová, E., Jung, T., & Botella, L. (2022). High Diversity of Novel Viruses in the Tree Pathogen *Phytophthora castaneae* Revealed by High-Throughput Sequencing of Total and Small RNA. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.911474>



- Ramírez-Guillermo, M. Á., Lagunes-Espinoza, L. C., Ortiz-García, C. F., Gutiérrez, O. A., Rosa-Santamaría, R. de la, Ramírez-Guillermo, M. Á., Lagunes-Espinoza, L. C., Ortiz-García, C. F., Gutiérrez, O. A., & Rosa-Santamaría, R. de la. (2018). VARIACIÓN MORFOLÓGICA DE FRUTOS Y SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DE PLANTACIONES EN TABASCO, MÉXICO. *Revista fitotecnica mexicana*, 41(2), 117-125. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.117-125>
- Rigling, D., & Prospero, S. (2018). *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 7-20. <https://doi.org/10.1111/mpp.12542>
- Rodríguez, L., Plummer, K. M., Khalifa, M. E., & MacDiarmid, R. M. (2022). Mycovirus-encoded suppressors of RNA silencing: Possible allies or enemies in the use of RNAi to control fungal disease in crops. *Frontiers in Fungal Biology*, 3, 965781. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.965781>
- Rodríguez Polanco, E., Navarro Niño, D. A., Bermeo Fúquene, P. A., & Parra Alferes, E. B. (2024). *Ofertas tecnológicas para el manejo de la monilia y la pudrición parda en cacao (Theobroma cacao L.)* (1.<sup>a</sup> ed.). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia). <https://doi.org/10.21930/agrosavia.nbook.7406825>
- Ruiz, A., Rodríguez-Romero, J., Gómez-Cid, L., Pacifico, D., & Ayllón, M. A. (2021). Novel Mycoviruses Discovered in the Mycovirome of a Necrotrophic Fungus. *mBio*, 12(3), e03705-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03705-20>
- Sharma, M., Guleria, S., Singh, K., Chauhan, A., & Kulshrestha, S. (2018). Mycovirus associated hypovirulence, a potential method for biological control of Fusarium species. *VirusDisease*, 29(2), 134-140. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0438-4>
- SIAP. (2022). *Panorama Agroalimentario 2022* [Servicio de Información Agroalimentaria y Pes]. Gobierno de México. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2022/Panorama-Agroalimentario-2022](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2022/Panorama-Agroalimentario-2022)
- Siddell, S. G., Walker, P. J., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Dutilh, B. E., Harrach, B., Harrison, R. L., Junglen, S., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Nibert, M. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., & Davison, A. J. (2020). Binomial nomenclature for virus species: A



- consultation. *Archives of Virology*, 165(2), 519-525.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04477-6>
- Son, M., Yu, J., & Kim, K.-H. (2015). Five Questions about Mycoviruses. *PLOS Pathogens*, 11(11), e1005172. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005172>
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., Friberg, H., Gil, J. F., Jensen, D. F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehmann, G., Vetukuri, R. R., & Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94(3), 665-676. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>
- Stirling, D. (2003). DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 226, 53-54. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:53>
- Sun, A., Zhao, L., Sun, Y., Chen, Y., Li, C., Dong, W., & Yang, G. (2023). Horizontal and Vertical Transmission of a Mycovirus Closely Related to the Partitivirus RhsV717 That Confers Hypovirulence in *Rhizoctonia solani*. *Viruses*, 15(10), 2088. <https://doi.org/10.3390/v15102088>
- Sutela, S., Poimala, A., & Vainio, E. J. (2019). Viruses of fungi and oomycetes in the soil environment. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(9), fiz119. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz119>
- Tadeo-Sánchez, J. M., & Tolentino-Martínez, J. M. (2020). El cacao Grijalva de Tabasco: Dinámicas socio territoriales en torno a su producción Tabasco. *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 30(56). <https://doi.org/10.24836/es.v30i56.1002>
- Takemoto, S., Nakamura, H., Sasaki, A., & Shimane, T. (2009). *Rosellinia compacta*, a new species similar to the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*. *Mycologia*, 101(1), 84-94. <https://doi.org/10.3852/08-100>
- Telengech, P., Hisano, S., Mugambi, C., Hyodo, K., Arjona-López, J. M., López-Herrera, C. J., Kanematsu, S., Kondo, H., & Suzuki, N. (2020). Diverse Partitiviruses From the Phytopathogenic Fungus, *Rosellinia necatrix*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1064. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01064>
- Tosi, M., Mitter, E., Gaiero, J., & Dunfield, K. (2020). It takes three to tango: The importance of microbes, host plant, and soil management to elucidate manipulation



- strategies for the plant microbiome. *Canadian Journal of Microbiology*, 66(7), 413-433. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0085>
- Umer, M., Mubeen, M., Shakeel, Q., Ali, S., Iftikhar, Y., Bajwa, R. T., Anwar, N., Rao, M. J., & He, Y. (2023). Mycoviruses: Antagonistic Potential, Fungal Pathogenesis, and Their Interaction with *Rhizoctonia solani*. *Microorganisms*, 11(10), 2515. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102515>
- Valverde, R., & De La Torre-Almaraz, R. (2017). Extracción y purificación de dsRNAs largos de plantas infectadas con virus y hongos; aplicación en la detección e identificación de virus. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-9>
- Vargas-González, G., Alvarez-Reyna, V. de P., Guigón-López, C., Cano-Ríos, P., & García-Carrillo, M. (2019). Impacto ambiental por uso de plaguicidas en tres áreas de producción de melón en la Comarca Lagunera, México. *CienciaUAT*, 13(2), 113-127.
- Villan Larios, D. C., Diaz Reyes, B. M., Pirovani, C. P., Loguercio, L. L., Santos, V. C., Góes-Neto, A., Fonseca, P. L. C., & Aguiar, E. R. G. R. (2023). Exploring the Mycovirus Universe: Identification, Diversity, and Biotechnological Applications. *Journal of Fungi*, 9(3), 361. <https://doi.org/10.3390/jof9030361>
- Wang, H., Liu, H., Lu, X., Wang, Y., & Zhou, Q. (2021). A novel mitovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*. *Archives of Virology*, 166(5), 1507-1511. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05023-z>
- Wang, W., & Jiao, F. (2019). Effectors of *Phytophthora* pathogens are powerful weapons for manipulating host immunity. *Planta*, 250(2), 413-425. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03219-x>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Boletín Técnico/Technical Bulletin*, 55(2), 272-279.
- Yaegashi, H., Shimizu, T., Ito, T., & Kanematsu, S. (2016). Differential Inductions of RNA Silencing among Encapsidated Double-Stranded RNA Mycoviruses in the White Root Rot Fungus *Rosellinia necatrix*. *Journal of Virology*, 90(12), 5677-5692. <https://doi.org/10.1128/JVI.02951-15>



- Yu, J., & Kim, K.-H. (2020). Exploration of the interactions between mycoviruses and *Fusarium graminearum*. En *Advances in Virus Research* (Vol. 106, pp. 123-144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.01.004>
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S. A., Li, G., Peng, Y., Xie, J., Cheng, J., Huang, J., & Yi, X. (2010). A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(18), 8387-8392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913535107>
- Zelaya-Molina, L. X., Chávez-Díaz, I. F., De Los Santos-Villalobos, S., Cruz-Cárdenas, C. I., Ruíz-Ramírez, S., & Rojas-Anaya, E. (2022). Control biológico de plagas en la agricultura mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *27*, 69-79. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i27.3251>
- Zhang, Z., Guo, W., Lu, Y., Kang, Q., Sui, L., Liu, H., Zhao, Y., Zou, X., & Li, Q. (2023). Hypovirulence-associated mycovirus epidemics cause pathogenicity degeneration of *Beauveria bassiana* in the field. *Virology Journal*, *20*(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02217-6>
- Zhao, Y., Zhang, Y., Wan, X., She, Y., Li, M., Xi, H., Xie, J., & Wen, C. (2020). A Novel Ourmia-Like Mycovirus Confers Hypovirulence-Associated Traits on *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 569869. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.569869>



## Anexo 1. Alojamiento de la tesis en el repositorio institucional

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
<b>Título de Tesis:</b>	Análisis de la presencia de micovirus e identificación molecular de hongos endófitos en plantaciones de cacao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) en Tabasco
<b>Autor(a) o autores(ras) de la Tesis:</b>	Lucero Vázquez Cruz
<b>ORCID:</b>	<a href="https://orcid.org/0000-0002-2512-9842">https://orcid.org/0000-0002-2512-9842</a>
<b>Resumen de la Tesis:</b>	<p>La producción del grano cacao es materia prima para diversas industrias, farmacéuticas, cosmetológica y alimentaria, e importante para el sostenimiento de muchas familias. Los Sistemas Agroforestales Cacao (SAFC), provee de grandes beneficios ecológicos que incluyen flora, fauna y captación de carbono. Actualmente estos ecosistemas se ven afectados por la presencia de enfermedades fúngicas: <i>Moniliophthora roreri</i>, causante de la podredumbre helada de la vaina (FPR); <i>M. perniciosa</i>, agente causal de la enfermedad escoba de bruja (WBD) y <i>Phytophthora palmivora</i>, por mencionar las más importantes. El hongo causante de la moniliasis del cacao se ha extendido desde América Latina, Centroamérica y México y se ha extendido en los últimos 50 años. En México, los primeros reportes fueron desde el 2005 y en los últimos 20 años la producción bajo de 40 a 20 mil toneladas. En el 2021, la Secretaría de Agricultura Desarrollo Rural (SEDER), informa que</p>



México ocupa el catorceavo productor a nivel mundial con 28,106 toneladas de grano y 44,500 a 47,800 hectáreas de cacao; Tabasco, Chiapas y Guerrero son las principales regiones productoras. Una alternativa para el control sostenible de las plagas es el control biológico, empleando a los agentes microbianos, bacterias, hongos y virus, sustituyendo a los pesticidas químicos. Estos tienen grandes beneficios para la agricultura, favorecen la salud de las plantas, brindan protección a las plantas o interactuarse con el patógeno directa o indirectamente para disminuir la enfermedad de la planta. El uso de micovirus es un agente novedoso que tiene el beneficio de cruzar barreras entre especies, importante para la sostenibilidad de la agricultura. Esta investigación evaluó la presencia de micovirus en hongos endófitos aislados en plantaciones de cacao del estado de Tabasco (Cárdenas, Cunduacán, Centro, Huimanguillo, Jalpa y Comalcalco). La extracción del ARN se utilizaron la metodología de Valverde et al (1990) y Khankhum et al., (2007). La identificación molecular de las cepas fúngica se realizó a través de la región transcripta interna ITS1 y 5, basado en el método de White y col., (1990). Se analizaron 137 hongos mediante cromatografía en columna de celulosa. La cepa 174 fue la única que presentó un posible micovirus de un fragmento de 2.7 kb. La identificación molecular del hongo por la región ITS fue *Endomelanconiopsis endophytica*, con un porcentaje de identidad de 99.81 y 100 % de cobertura total, aislada en plantación de cacao en Villahermosa, Tabasco, México. En este estudio se reporta la posible presencia de un mitovirus (ARNss) de la familia Narnaviridae. No forman partículas virales verdaderas y solo tienen un genoma de ARN monocatenario lineal (ARNss) de 2.3 – 3.6 kb y son los únicos que infectan a las mitocondrias dentro de los organismos eucariotas, se pueden transmitir vertical u horizontalmente. La información generada en este estudio permite dar inicio al uso de micovirus para el control biológico de plagas en plantas de cacao u otros



	<p>fitopatógenos, si bien, aún falta conocer los mecanismos de este virus y los efectos en el hongo. Estos resultados sugieren la posible utilización de estos organismos para el control de plagas. Sin embargo se requieren más estudios, analizar mayor número de cepas fúngicas que permitan detectar otras partículas virales.</p>
<p><b>Palabras claves de la Tesis:</b></p>	<p>MICOVIRUS, CACAO, ENDÓFITOS, FITOPATÓGENOS</p>
<p><b>Referencias citadas:</b></p>	<p>Adeniyi, D. (2019). Diversity of Cacao Pathogens and Impact on Yield and Global Production. En P. Osobase Aikpokpodion (Ed.), <i>Theobroma Cacao—Deploying Science for Sustainability of Global Cocoa Economy</i>. IntechOpen. <a href="https://doi.org/10.5772/intechopen.81993">https://doi.org/10.5772/intechopen.81993</a></p> <p>Aguiar, M., Conway, A. J., Bell, J. K., &amp; Stewart, K. J. (2023). Agroecosystem edge effects on vegetation, soil properties, and the soil microbial community in the Canadian prairie. <i>PLOS ONE</i>, 18(4), e0283832. <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283832">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283832</a></p> <p>Aikpokpodion, P. O., Motamayor, J. C., Adetimirin, V. O., Adu-ampomah, Y., Ingelbrecht, I., Eskes, A. B., Schnell, R. J., &amp; Kolesnikova-allen, M. (2009). Genetic diversity assessment of sub-samples of cacao, <i>Theobroma cacao</i> L. collections in West Africa using simple sequence repeats marker. 699-711. <a href="https://doi.org/10.1007/s11295-009-0221-1">https://doi.org/10.1007/s11295-009-0221-1</a></p> <p>Cai, G., Myers, K., Fry, W. E., &amp; Hillman, B. I. (2019). Phytophthora infestans RNA virus 2, a novel RNA virus from <i>Phytophthora infestans</i>, does not belong to any known virus group. <i>Archives of Virology</i>, 164(2), 567-572. <a href="https://doi.org/10.1007/s00705-018-4050-0">https://doi.org/10.1007/s00705-018-4050-0</a></p> <p>Chun, J., &amp; Kim, D.-H. (2021). Co-infection of a novel fusagravirus and a partitivirus in a Korean isolate of <i>Rosellinia necatrix</i> KACC40168. <i>Virus Genes</i>, 57(1), 121-126. <a href="https://doi.org/10.1007/s11262-020-01809-6">https://doi.org/10.1007/s11262-020-01809-6</a></p> <p>Decloquement, J., Ramos-Sobrinho, R., Elias, S. G., Britto, D. S., Puig, A. S., Reis, A., Da Silva, R. A. F., Honorato-Júnior, J., Luz, E. D. M. N., Pinho, D. B., &amp; Marelli, J.-P. (2021). <i>Phytophthora theobromicola</i> sp. nov.: A New Species Causing Black Pod Disease on Cacao in Brazil. <i>Frontiers in Microbiology</i>, 12, 537399. <a href="https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399">https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399</a></p>



Drouet Candell, A., Valarezo-Beltrón, O., Camacho-Abril, J., & García-Vásquez, G. (2019). Promotores de sustentabilidad para sistemas agroforestales de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Madre de Dios (Perú) y San Plácido (Ecuador). *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 6(2 Dicbre.), 76-81. <https://doi.org/10.26423/rctu.v6i2.478>

Ghabrial, S. A., & Suzuki, N. (2009). Viruses of Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 353-384. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081932>

Ghosh, D., John, E. A., & Wilkinson, A. (2023). Clever pest control? The role of cognition in biological pest regulation. *Animal Cognition*, 26(1), 189-197. <https://doi.org/10.1007/s10071-022-01731-4>

Hollings, M. (1962). Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*, 196(4858), 962-965. <https://doi.org/10.1038/196962a0>

Hough, B., Steenkamp, E., Wingfield, B., & Read, D. (2023). Fungal Viruses Unveiled: A Comprehensive Review of Mycoviruses. *Viruses*, 15(5), 1202. <https://doi.org/10.3390/v15051202>

Hough, Howard, J. D., Brown, S., Portwood, D. E., Kilby, P. M., & Dickman, M. J. (2022). Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 980592. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.980592>

Khan, H. A., Mukhtar, M., & Bhatti, M. F. (2023). Mycovirus-induced hypovirulence in notorious fungi *Sclerotinia*: A comprehensive review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(3), 1459-1478. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01073-4>

Khan, H. A., Nerva, L., & Bhatti, M. F. (2023). The good, the bad and the cryptic: The multifaceted roles of mycoviruses and their potential applications for a sustainable agriculture. *Virology*, 585, 259-269. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.07.004>

Khankhum, S., Escalante, C., De Souto And, E. R., & Valverde, R. A. (2017). Extraction and electrophoretic analysis of large dsRNAs from desiccated plant tissues infected with plant viruses and biotrophic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 147(2), 431-441. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1014-7>



Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., & Moëgne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends in Plant Science*, 22(7), 583-595. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.008>

Li, P., Bhattacharjee, P., Wang, S., Zhang, L., Ahmed, I., & Guo, L. (2019). Mycoviruses in *Fusarium* Species: An Update. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 257. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00257>

Morris, T. J. (1979). Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA from Virus-Infected Plant and Fungal Tissue. *Phytopathology*, 69(8), 854. <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-854>

Morsy, M. R., Oswald, J., He, J., Tang, Y., & Roossinck, M. J. (2010). Teasing apart a three-way symbiosis: Transcriptome analyses of *Curvularia protuberata* in response to viral infection and heat stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 401(2), 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.034>

Mortimer, R., Saj, S., & David, C. (2018). Supporting and regulating ecosystem services in cacao agroforestry systems. *Agroforestry Systems*, 92(6), 1639-1657. <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0113-6>

Myers, J. M., & James, T. Y. (2022a). Mycoviruses. *Current Biology*, 32(4), R150-R155. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.049>

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>

Rodríguez, L., Plummer, K. M., Khalifa, M. E., & MacDiarmid, R. M. (2022). Mycovirus-encoded suppressors of RNA silencing: Possible allies or enemies in the use of RNAi to control fungal disease in crops. *Frontiers in Fungal Biology*, 3, 965781. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.965781>

Rodríguez Polanco, E., Navarro Niño, D. A., Bermeo Fúquene, P. A., & Parra Alferes, E. B. (2024). Ofertas tecnológicas para el manejo de la monilia y la pudrición parda en cacao (*Theobroma cacao* L.) (1.a ed.). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia). <https://doi.org/10.21930/agrosavia.nbook.7406825>

Ruiz, A., Rodríguez-Romero, J., Gómez-Cid, I., Pacifico, D., & Ayllón, M. A. (2021). Novel Mycoviruses Discovered in the Mycovirome of a



Necrotrophic Fungus. *mBio*, 12(3), e03705-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03705-20>

Telengech, P., Hisano, S., Mugambi, C., Hyodo, K., Arjona-López, J. M., López-Herrera, C. J., Kanematsu, S., Kondo, H., & Suzuki, N. (2020). Diverse Partitiviruses From the Phytopathogenic Fungus, *Rosellinia necatrix*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1064. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01064>

Tosi, M., Mitter, E., Gaiero, J., & Dunfield, K. (2020). It takes three to tango: The importance of microbes, host plant, and soil management to elucidate manipulation strategies for the plant microbiome. *Canadian Journal of Microbiology*, 66(7), 413-433. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0085>

Umer, M., Mubeen, M., Shakeel, Q., Ali, S., Iftikhar, Y., Bajwa, R. T., Anwar, N., Rao, M. J., & He, Y. (2023). Mycoviruses: Antagonistic Potential, Fungal Pathogenesis, and Their Interaction with *Rhizoctonia solani*. *Microorganisms*, 11(10), 2515. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102515>

Valverde, R., & De La Torre-Almaraz, R. (2017). Extracción y purificación de dsRNAs largos de plantas infectadas con virus y hongos; aplicación en la detección e identificación de virus. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-9>

Vargas-González, G., Alvarez-Reyna, V. de P., Guigón-López, C., Cano-Ríos, P., & García-Carrillo, M. (2019). Impacto ambiental por uso de plaguicidas en tres áreas de producción de melón en la Comarca Lagunera, México. *CienciaUAT*, 13(2), 113-127.

White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Boletín Técnico/Technical Bulletin*, 55(2), 272-279.

Yaegashi, H., Shimizu, T., Ito, T., & Kanematsu, S. (2016). Differential Inductions of RNA Silencing among Encapsidated Double-Stranded RNA Mycoviruses in the White Root Rot Fungus *Rosellinia necatrix*. *Journal of Virology*, 90(12), 5677-5692. <https://doi.org/10.1128/JVI.02951-15>

Yu, J., & Kim, K.-H. (2020). Exploration of the interactions between mycoviruses and *Fusarium graminearum*. En *Advances in Virus Research* (Vol. 106, pp. 123-144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.01.004>



Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S. A., Li, G., Peng, Y., Xie, J., Cheng, J., Huang, J., & Yi, X. (2010). A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18), 8387-8392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913535107>

Zelaya-Molina, L. X., Chávez-Díaz, I. F., De Los Santos-Villalobos, S., Cruz-Cárdenas, C. I., Ruíz-Ramírez, S., & Rojas-Anaya, E. (2022). Control biológico de plagas en la agricultura mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 27, 69-79. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i27.3251>

Zhang, Z., Guo, W., Lu, Y., Kang, Q., Sui, L., Liu, H., Zhao, Y., Zou, X., & Li, Q. (2023). Hypovirulence-associated mycovirus epidemics cause pathogenicity degeneration of *Beauveria bassiana* in the field. *Virology Journal*, 20(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02217-6>

Zhao, Y., Zhang, Y., Wan, X., She, Y., Li, M., Xi, H., Xie, J., & Wen, C. (2020). A Novel Ourmia-Like Mycovirus Confers Hypovirulence-Associated Traits on *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 569869. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.569869>