

## ***Moniliophthora roreri*: Asilamiento y cultivo del hongo que causa la moniliasis del cacao**

**M. Catherine Aime & Jorge Díaz-Valderrama, unpublished. May 2022.**

El aislamiento de *M. roreri* en medio de cultivo a partir de frutos infectados de cacao es el primer paso para estudiar este patógeno en laboratorio. Permite confirmar el diagnóstico en campo, y extraer ADN de buena calidad a partir de micelios frescos para análisis moleculares. Sin embargo, el aislamiento, especialmente si el muestreo se realiza en áreas remotas, puede ser un factor limitante debido a la posible contaminación y el transporte. Para mitigar este problema, recolectamos tejido necrótico del interior de los frutos infectados o esporas del estroma blanco que se produce la superficie de frutos infectados en estado avanzado de moniliasis. Estos tejidos son colocados directamente en microtubos conteniendo la solución tampón de extracción de ADN. Adicionalmente, el tejido interno se puede sembrar en platos Petri con medio de cultivo. EL ADN obtenido de la extracción a partir de micelios frescos tiende a ser menos contaminado, pero en la mayoría de los casos produce mucho menos ADN que las extracciones de tejido necrótico interno y estroma blanco recolectados directamente. Por lo tanto, recomendamos ambos métodos de extracción. NOTA: en muchos casos la mayoría de los frutos infectados están momificados y secos, impidiendo realizar un aislamiento en medio de cultivo a partir del tejido necrótico interno; en estos casos, la recolección de estroma blanco de la superficie de la vaina directamente en el tampón de extracción de ADN puede ser la única forma de coleccionar el patógeno.

Colectas: Los frutos de cacao enfermos deben recolectarse en bolsas de papel. Las coordenadas geográficas, la fecha, el hospedero, el cultivar y cualquier otra información relevante sobre la muestra, el árbol y la plantación deben registrarse en la misma bolsa de colecta o en una libreta de campo. Los aislamientos y colectas de tejido interno necrótico o estroma blanco deben ocurrir el mismo día de la cosecha y realizarse en las condiciones más asépticas posibles.

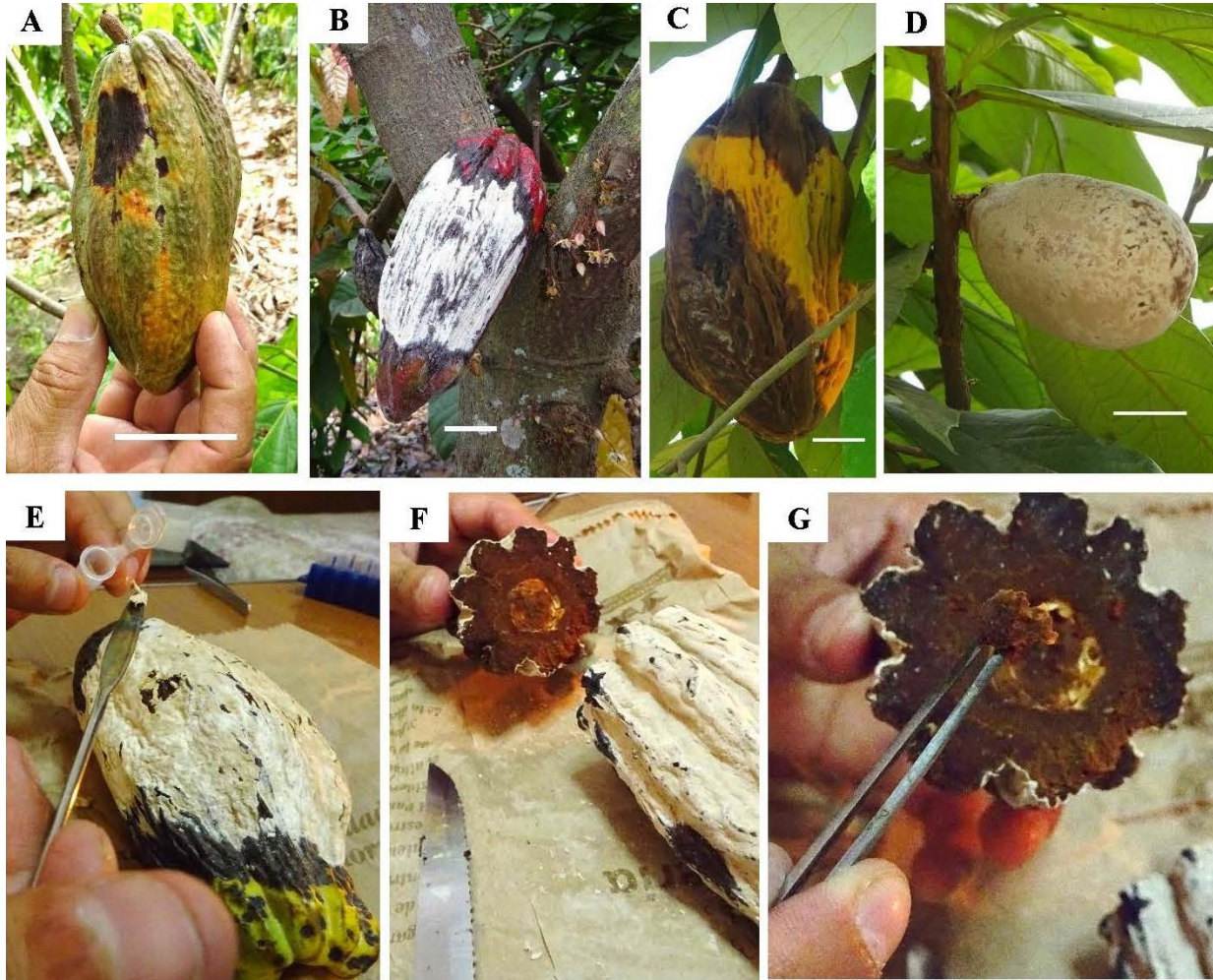
Muestreo de frutos: Abrir los frutos infectados con mucho cuidado y con un cuchillo desinfectado. NOTA: si una vaina está infectada con *M. roreri* tendrá olor a champiñones. Esto no es presente en vainas infectadas con otros patógenos como *Phytophthora* spp. Use pinzas y bisturí estériles para quitar una pequeña porción del tejido necrótico de la pulpa y/o los granos.

1. Método de cultivo: desinfectar el tejido interno en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% por tres minutos, y luego realizar tres lavados consecutivos de agua estéril de 1 minuto cada uno. Coloque el tejido desinfectado directamente en placas Petri con medio papa dextrosa agar (PDA), incrementado con un antibiótico si es posible. Incubar a temperatura ambiente. Monitorear diariamente el crecimiento.
2. Método directo para extracción de ADN: colocar el tejido interno en la solución de extracción de ADN. Usamos el kit de purificación genómica Wizard® (Promega,

- Madison, WI), pero también funcionarán otros métodos de extracción. (Ir al folleto molecular para obtener más instrucciones).
3. Frutos momificados: Los frutos momificados por lo general están demasiado desecado para obtener tejido interno, y el estroma exterior puede estar contaminado con otros microorganismos por lo que el aislamiento en cultivo puro no es tan recomendable. Recomendamos usar pinzas y espátulas pequeñas estériles para colectar una muestra del estroma blanco exterior de las superficies de los frutos y colocarlo directamente en la solución de extracción de ADN. (Ir al folleto molecular para obtener más instrucciones).

Cultivos: Una vez que el micelio del patógeno es evidente en el medio de cultivo y crecen desde el punto de inoculación, deben extraerse y sub cultivarse en placas nuevas de PDA. Dejar incubar a temperatura ambiente durante aprox. 1 semana. Los cultivos puros serán de color crema con tintes anaranjados, y las esporas (de color marrón y marrón oscuro) comenzarán a desarrollarse después de la primera semana en crecimiento.

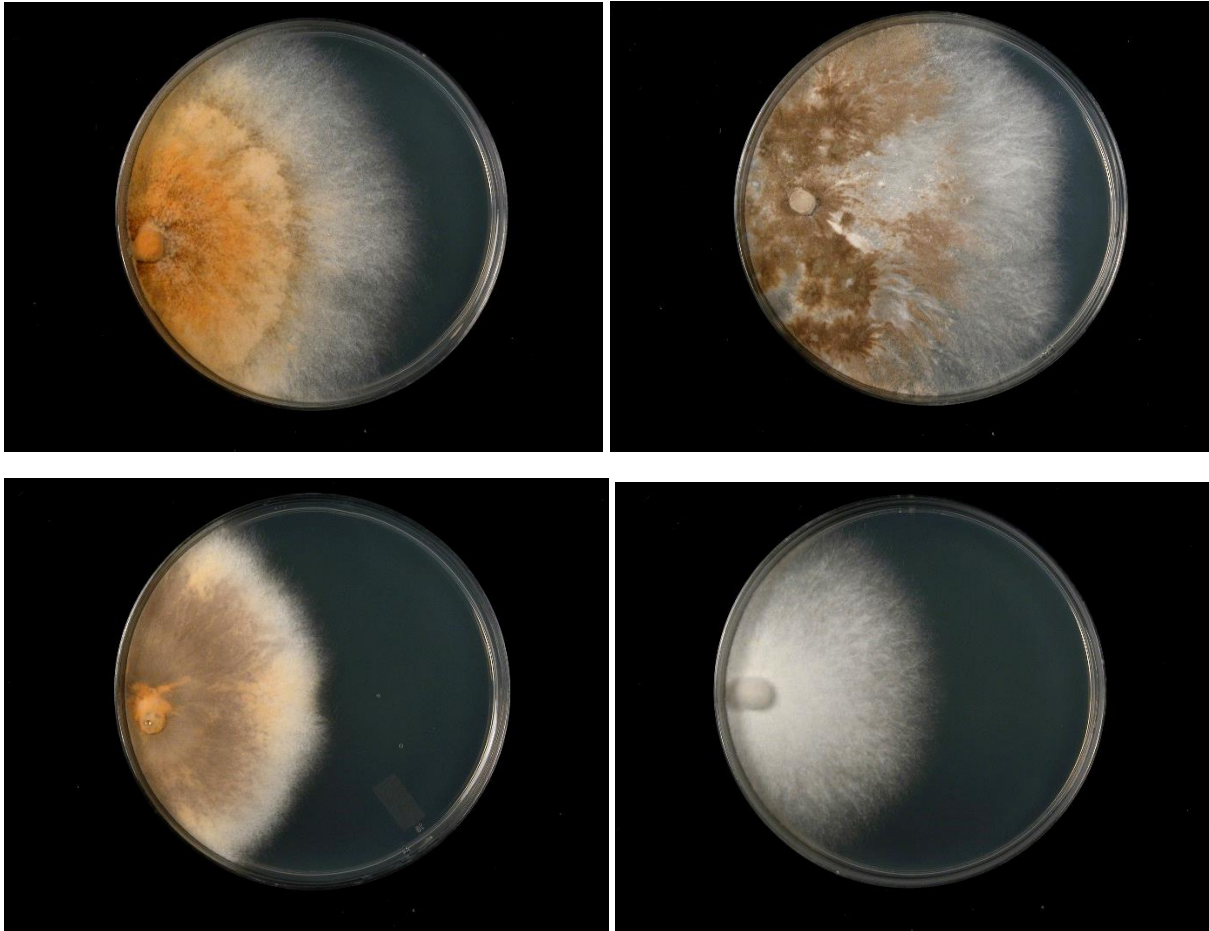
## *Moniliophthora roreri*: Colecta de muestras



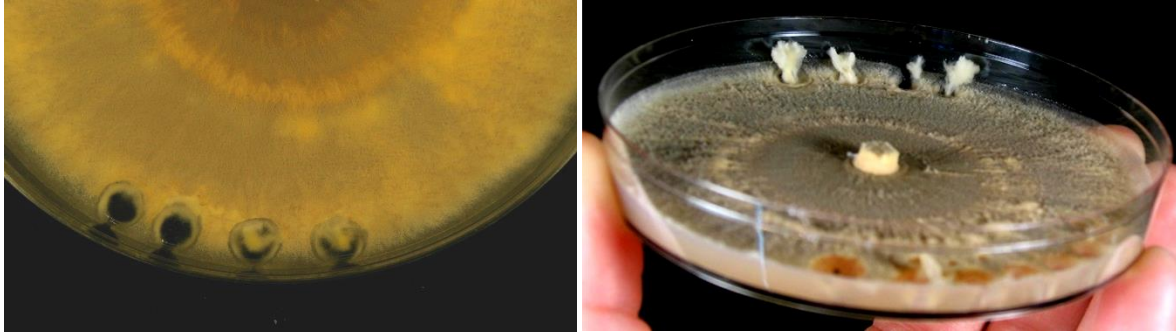
Signos, síntomas y recolección de tejido de *Moniliophthora roreri*. **A**, Identificación de manchas marrones y deformación en los frutos de cacao, síntomas tempranos de la moniliasis del cacao. **B**, Identificación de frutos de cacao momificados con estroma blanco en la superficie, síntoma y signo en un estado avanzado de la enfermedad. **C**, Síntomas (manchas marrones) y signos (estroma blanco) de moniliasis en fruto infectado de *Theobroma bicolor*. **D**, Síntomas (momificación) y signos (estroma blanco) de moniliasis en fruto infectado de *T. grandiflorum*. **E**, Uso de un tubo Eppendorf que contiene solución de extracción de ADN (ver métodos) para recolectar el estroma blanco de la superficie del fruto momificado. **F**, Fruto diseccionado para obtención de tejido necrótico interno. **G**, Recolección de tejido necrótico. Escala = 5 cm. Díaz-Valderrama JR, et al. 2022. Diversity in the invasive cacao pathogen *Moniliophthora roreri* is shaped by agriculture. *New Phytologist*: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.13603?af=R>



### *Moniliophthora roreri*: Morfología del cultivo

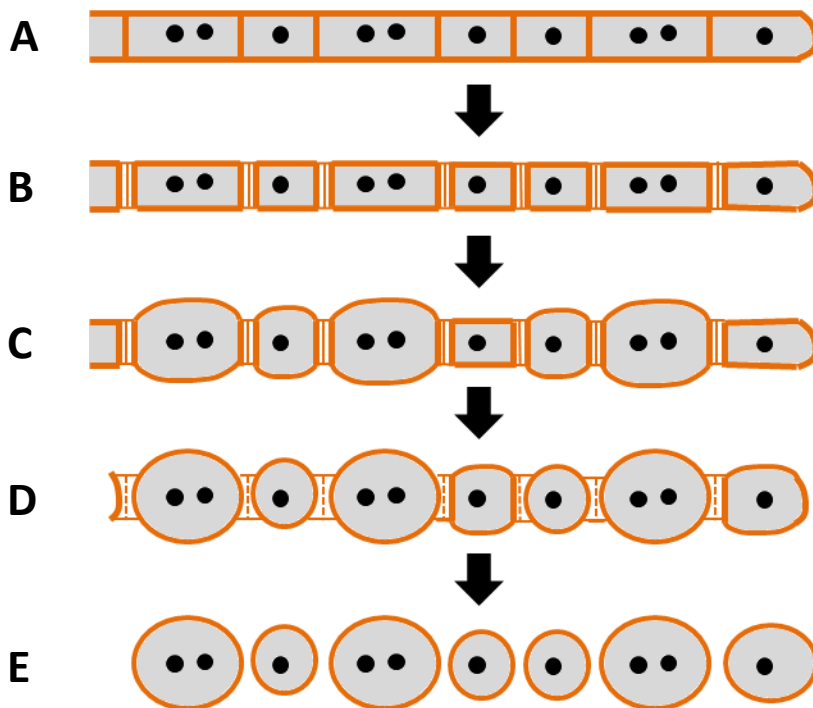


*Moniliophthora roreri* en medio de cultivo. Los cultivos jóvenes son de color blanco escarchado (abajo a la derecha). A medida que los cultivos se desarrollan, pueden desarrollar pigmentos anaranjados (izquierda). A medida que se desarrollan, los cultivos se volverán superficialmente marrones debido al color los conidios o esporas (arriba y abajo a la izquierda).



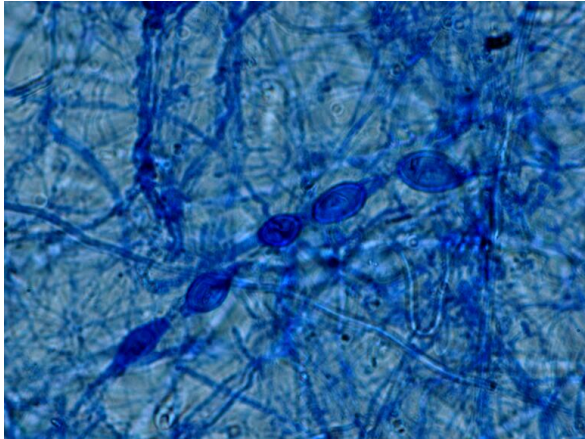
Los cultivos muy viejos pueden desarrollar mechones de hifas.

*Moniliophthora roreri*: Conidios o esporas



Modelo de la conidiogénesis o producción de esporas en *Moniliophthora roreri*. Este tipo de conidiogénesis es de diagnóstico en este patógeno del cacao. (A) Hifas monocarióticas con un número variable de núcleos (puntos negros); (B) contracción del plasma de las células de las hifas y formación de paredes celulares periclinales internas que delimitan los compartimentos libres de plasma; (C) hinchazón de las células conidiógenas durante la maduración de los conidios; (D) secesión de conidios; y (E) conidios maduros. Diaz-Valderrama JR, Aime MC. 2016. The cacao pathogen *Moniliophthora roreri* (Marasmiaceae) produces rhexolytic thallic

*conidia and their size is influenced by nuclear condition. Mycoscience 57:208-216. doi: 10.1016/j.myc.2016.01.004*



Células conidiogénicas de *Moniliophthora roreri* teñidas en “cotton blue”.