

**ANALISIS DE LA DIVERSIDAD INTRAESPECIE DE *Moniliophthora roreri*
(Cif.) Evans *et al.* POR MEDIO DE MARCADORES MORFOLOGICOS Y
GENETICOS.**

LINA MARÍA ARBELAEZ
Bacterióloga

**Trabajo presentado como requisito parcial para optar al titulo de Magister en
Biotecnología.**

Directora
LUCIA AFANADOR KAFURI
Bióloga, MSc. Fitopatología

Asesor
Brian C. Bock
Biólogo, Ph.D. Etología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLIN
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
MEDELLIN
2010

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

2010

Nota de aceptación

Jurado

Jurado.

Ciudad y fecha (día, mes, año):

CONTENIDO

Pag.

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1. Generalidades del cultivo de cacao.

2.1.1. Tipos de cacaos cultivados.

2.1.2. Fenología del cacao.

2.1.3. Distribución Agroecológica.

2.1.4. Importancia económica.

2.1.5. Principales enfermedades del cultivo.

2.2. Generalidades de *M. royeri*.

2.2.1. Etiología.

2.2.2. Distribución geográfica.

2.2.3. Rango de hospederos.

2.2.4. Mecanismos de dispersión.

2.2.5. Signos de la enfermedad.

2.2.6. Síntomas de la enfermedad.

2.2.7. Ciclo de la enfermedad.

2.2.8. Control de la enfermedad.

2.3. Importancia de la genética poblacional en hongos fitopatógenos.

2.4. Marcadores moleculares utilizados en el análisis de la variabilidad genética de hongos fitopatógenos.

2.4.1. Marcadores bioquímicos.

2.4.2. Marcadores de ADN.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

3.2. Objetivos específicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del estudio.

4.2. Aislamiento y almacenamiento de las cepas del hongo.

4.2.1. Metodología del muestreo y colecta de tejido enfermo.

4.2.2. Aislamiento del hongo.

4.2.3. Almacenamiento.

4.3. Evaluación de las condiciones óptimas de crecimiento y esporulación.

4.4. Evaluación de la variabilidad de *M. roreri* mediante características morfológicas.

4.4.1. Análisis estadístico de la caracterización morfológica.

4.5. Caracterización de la diversidad de *M. roreri* mediante análisis isoenzimático.

4.5.1. Producción de micelio.

4.5.2. Extracción de la proteína.

4.5.3. Electroforesis y revelado de la actividad enzimática.

4.5.4. Análisis estadístico de la caracterización isoenzimática.

4.6. Caracterización de la diversidad de *M. roreri* mediante regiones de ADN ricas en A-T.

4.6.1. Extracción del ADN.

4.6.2. Regiones ricas en A-T.

4.6.3. Análisis estadístico de la caracterización molecular.

5. RESULTADOS

5.1. Muestreo y colecta de muestras.

5.1.1. Aislamiento del hongo.

5.2. Almacenamiento.

5.2.1. Selección del sistema óptimo de almacenamiento.

- 5.3. Evaluación de condiciones optimas de crecimiento y esporulación.
 - 5.3.1. Velocidad de crecimiento.
 - 5.3.2. Esporulación del hongo.
- 5.4. Evaluación de variabilidad de *M. roreri* mediante características morfológicas.
- 5.5. Análisis isoenzimático.
 - 5.5.1. Condiciones para la evaluación de la actividad enzimática.
 - 5.5.2. Sistemas enzimáticos y buffers de corrida.
 - 5.5.3. Análisis de diversidad genética de las poblaciones de *M. roreri* en Antioquia
- 5.6. Regiones ricas en A+T
 - 5.6.1. Extracción de ADN
 - 5.6.2. Digestión con la enzima de restricción.
 - 5.6.3. Análisis de similitud genética de los resultados del marcador Regiones ricas en A-T
- 5.7. Análisis compendio de los tres marcadores evaluados
- 6. DISCUSIÓN
 - 6.1. Almacenamiento de muestras.
 - 6.2. Evaluación de condiciones óptimas de crecimiento y esporulación.
 - 6.3. Evaluación de la variabilidad de *M. roreri* mediante características morfológicas.
 - 6.4. Análisis isoenzimático.
 - 6.5. Regiones Ricas en A+T.
 - 6.6. Discusion general
- 7. CONCLUSIONES
- 8. BIBLIOGRAFÍA
- 9. ANEXOS.

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales enfermedades del cacao, clasificadas por el nombre común de la enfermedad, agente etiológico y órganos afectados por cada patógeno durante la infección.....	9
Tabla 2. Incidencia de las principales enfermedades del cacao, registradas en cinco municipios del departamento de Antioquia.....	10
Tabla 3. Zonas de procedencia y origen geográfico de los aislamientos de <i>M. roleri</i> colectados en municipios de Antioquia, con la respectiva información meteorológica de cada una de las zonas.....	32
Tabla 4. Identificación y origen geográfico de las cepas de referencia caracterizadas por Phillips (2003), las cuales son representativas de los cinco grupos genéticos de <i>M. roleri</i>	34
Tabla 5. Codificación de las variables morfológicas de <i>M. roleri</i> utilizadas en el análisis estadístico: Tipos de Esporulación, Borde de la colonia, textura de la colonia y sectores.....	38
Tabla 6. Enzimas evaluadas en aislamientos de <i>M. roleri</i> de Antioquia. Abreviatura y ecuación asignada a cada una de acuerdo al sistema IUBMB.....	41
Tabla 7. Sistemas de buffers utilizados en la evaluación de 30 sistemas de enzimas en aislamientos de <i>M. roleri</i> de Antioquia y sus respectivos autores.....	41

	Pág.
Tabla 8. Identificación de aislamientos de <i>M. roreri</i> procedentes de frutos de cacao de 12 municipios del departamento de Antioquia, sitio de origen y tipo de cacao fuente de cada aislamiento.	47
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) de la variable tasa de crecimiento en 12 cepas de <i>M. roreri</i> evaluadas en los 4 tipos de medios y su interacción.....	49
Tabla 10. Radio medio (mm) de crecimiento de la colonia de 12 cepas de <i>M. roreri</i> según el medio de cultivo, evaluado en el día 13.	51
Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) para los efectos de los cuatro medios de cultivo y su interacción sobre la esporulación de las 12 cepas evaluadas	51
Tabla 12. Esporulación media (esporas/ml x 10 ⁴) de 12 cepas de <i>M. roreri</i> según el medio de cultivo en el día 13.	52
Tabla 13. Estadística descriptiva de forma global de las variables cuantitativas evaluadas en la caracterización morfológica de <i>M. roreri</i>	53
Tabla 14. Resumen de las principales medidas para las variables cuantitativas evaluadas en la caracterización morfológica de 236 aislamientos de <i>M. roreri</i> de Antioquia.	54
Tabla 15. Resultado de la prueba de Tukey (P<0.05) de las Variables crecimiento radial y día de esporulación evaluadas por municipio en la caracterización morfológica de <i>M. roreri</i>	55

Tabla 16. Resultado de la prueba de Tukey ($P < 0.05$) de la Variable producción de esporas evaluada por municipio en la caracterización morfológica de <i>M. roreri</i>	57
Tabla 17. Resultado de la prueba de Tukey ($P < 0.05$) de las Variables porcentaje de esporas alargadas, porcentaje de esporas globosas, ancho de espora cilíndrica y largo espora cilíndrica evaluadas por municipio en la caracterización morfológica de <i>M. roreri</i>	59
Tabla 18. Estadística descriptiva de las variables cualitativas evaluadas en la caracterización morfológica de <i>M. roreri</i>	63
Tabla 19. Frecuencias absolutas y relativas para la variable color de esporulación observada en las cepas de <i>M. roreri</i>	64
Tabla 20. Enzimas que presentaron actividad enzimática en los nueve buffers empleados.	69
Tabla 21. Resultados del Índice de Shannon y porcentaje de loci polimórficos de las doce poblaciones evaluadas. (los valores más representativos sobresalen en cursiva).....	73
Tabla 22. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para aislamientos de <i>M. roreri</i> entre y dentro de los municipios de Antioquia, obtenido a partir de los resultados de la caracterización isoenzimática.....	76
Tabla 23. Agrupación de los aislamientos de <i>M. roreri</i> por medio del marcador molecular regiones ricas en A+T.....	80

Tabla 24. Distancias genéticas entre los individuos de cada municipio determinados por el marcador regiones ricas en A+T.....82

Tabla 25. Resultados del Índice de Shannon determinado para las poblaciones de *M. roreri* por medio del marcador regiones ricas en A+T.....82

Tabla 26. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para aislamientos de *M. roreri* entre y dentro de los municipios de Antioquia mediante el empleo del marcador molecular regiones de ADN ricas en A-T.83

Tabla 27. Valores Φ_{st} obtenidos al realizar comparaciones entre poblaciones de Apartado (1), Dabeiba (2), Remedios (3), Segovia (4), Maceo (5), Puerto Berrío (6), Nariño (7), Támesis (8), Taraza (9), San Jerónimo (10), Valdivia (11) y Chigorodó (12).....84

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Tiempo completo de duración del ciclo de la moniliasis del cacao causada por <i>M. roreri</i>	16
Figura 2. Mazorcas de cacao colectadas en campo, mostrando síntomas típicos de la enfermedad.....	33
Figura 3. Características del crecimiento y esporulación de <i>M. roreri</i> - cepa 077M en los cuatro medios de cultivo evaluados: M1 (AEM); M2 (PDCA); M3 (AEMV8) y M4 (V8M) y las cuatro repeticiones.	50
Figura 4. Radio medio del crecimiento de la colonia al día 13 evaluado en 12 cepas de <i>M. roreri</i> en cuatro medios de cultivo.....	50
Figura 5. Número medio de esporas de 12 cepas de <i>M. roreri</i> en cuatro medios de cultivo al día 13, expresadas como número de esporas/ml por 10^4	52
Figura 6. Gráfica de la desviación estándar de las Variables crecimiento radial (a) y día de esporulación (b) evaluadas por municipio en la caracterización morfológica de <i>M. roreri</i>	56
Figura 7. Gráfica de la desviación estándar de la Variable producción de esporas evaluada por municipio en la caracterización morfológica de <i>M. roreri</i>	58
Figura 8. Tipos de esporas encontrados en <i>M. roreri</i> , en donde se destaca una mayoría de tipo globoso (G) y pocas de tipo ovoide o elipsoide (E). Microfotografía con una magnificación 40x.....	60

Figura 9. Gráfica de la desviación estándar de las Variables porcentaje de esporas globosas (a) y porcentaje de esporas alargadas (b), ancho de espora cilíndrica (c) y largo de espora cilíndrica (d) y diámetro de espora globosa (e), evaluadas por municipio en la caracterización morfológica de <i>M. roreri</i>	62
Figura 10. Características macroscópicas de <i>M. roreri</i> en medio AEM + V-8.	63
Figura 11. Colonias de <i>M. roreri</i> mostrando la presencia de sectores de diferente forma y tamaño.....	65
Figura 12. Representación gráfica del análisis del análisis de componentes principales de la caracterización morfológica de variables de <i>M. roreri</i> . G1: grupo principal y G2: grupo secundario.....	67
Figura 13. Representación gráfica del análisis de coordenadas principales (primeras dos dimensiones) para variables morfológicas de 236 cepas de <i>M. roreri</i>	68
Figura 14. Efecto de la edad del micelio (10, 15 y 20 días) de <i>M. roreri</i> sobre los patrones electroforéticos de la enzima MDH en el buffer Tris-Citrato pH 7.5, para una cepa de San Jerónimo (003SJ) y dos de Dabeiba (039D y 047D).....	70

Figura 15. Actividad enzimática de los locus a) MDH, b) Esterasas y c) PEP-B, en los recuadros se delimita el locus PEPB-1 (E) y el locus PEPB-2 (D), con su respectivo fenotipo electroforético: banda lenta (B), banda rápida (A) y las dos bandas en la misma muestra (C). En d) se presentan los tres loci monomórficos en orden descendente: PGM, ODH y GPI, representando el mismo patrón obtenido con las otras 15 enzimas monomórficas evaluadas.....71

Figura 16. Dendograma (a) y distribución (b) de los grupos genéticos de *M. roleri* en el departamento de Antioquia, según el índice Nei por medio del método de agrupamiento UPGMA, indicando la formación de tres grupos genéticos. G1: Apartado, Dabeiba, Segovia, Maceo, San Jerónimo, Nariño, Támesis (color negro), G2: Remedios y Valdivia (color azul) y G3: Tarazá, Puerto Berrío, Chigorodó (color rojo).....75

Figura 17. Electroforesis de los patrones de digestión del ADN genómico total de aislamientos de *M. roleri* con la enzima *HaeIII* evaluados con diferentes concentraciones de ADN. Línea M: Marcador de peso molecular (1kb), línea 1: 003A (1,6 µg/µl), 2: 010A2 (2,3 µg/µl), 3: 002A (2,6 µg/µl), 4: 005A (3,0 µg/µl), 5: 12A1 (4,4 µg/µl).....77

Figura 18. Patrones de restricción obtenidos por medio de la enzima *HaeIII* de ADN genómico total de *M. roleri*. Línea 1: Marcador de peso molecular (1kb), las líneas 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 9 corresponde a las cepas 146T1, 81M2, (73), 67R1, 62R1, 62R2 y 65R, estas muestras no se visualizaron claramente. En los carriles 7 (69R), 10 (56R), 11 (54R), 12 (50D1), 13 (24A2), 14 (45R) se observa un perfil claro. Las flechas indican las bandas con su peso molecular más relevantes en la diferenciación de cepas.....78

Figura 19. Dendograma obtenido mediante regiones ricas en A+T, por medio del método de agrupamiento UPGMA, de 117 aislamientos de *M. roreri* muestreados en el departamento de Antioquia, indicando los 6 grupos obtenidos (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9 y G10).....81

Figura 20. Dendograma (a) y distribución (b) de los grupos genéticos de *M. roreri* en el departamento de Antioquia, según el índice Nei por medio del método de agrupamiento UPGMA, indicando la formación de dos grupos genéticos. G1: Apartado, Dabeiba y Chigorodó (color negro), G2: Segovia, Maceo, San Jerónimo, Nariño, Támesis, Remedios, Valdivia y Puerto Berrío (color rojo) y *: Tarazá (color Morado).....85

Figura 21. Figura del flujo de las corrientes de aire en territorio Colombiano a nivel mensual las cuales están sobrepuestas a la orografía del país.97

RESUMEN

Introducción. La variación molecular y fenotípica fue evaluada en aislamientos de *Moniliophthora roreri*, patógeno causante de la moniliasis, una de las enfermedades más limitantes en las plantaciones de cacao (*Theobroma cacao L.*), con el fin de obtener más información sobre la diversidad intraespecífica de este patógeno en 12 municipios cacaoteros del departamento de Antioquia.

Materiales y métodos. La caracterización fenotípica se realizó en 236 aislamientos con base en variables de tipo cualitativo y cuantitativo: Tipo de esporulación, Borde de la colonia, Textura de la colonia, sectores, Crecimiento radial, Día de esporulación, Producción de esporas, Porcentaje de esporas globosas y alargadas, Diámetro de esporas globosas y Ancho y largo de esporas alargadas. La caracterización molecular se realizó a través de la actividad de 30 isoenzimas utilizando electroforesis de almidón y mediante el marcador de regiones ricas en A-T se definieron perfiles de restricción de ADN mitocondrial utilizando la enzima *HaeIII*.

Resultados. Las poblaciones de *M. roreri* mostraron variación morfológica y no conformaron grupos que respondieran a patrones definidos con respecto al origen geográfico, tipo de cacao o condiciones climáticas predominantes en las zonas objeto de estudio. Por medio de isoenzimas se determinó la actividad en las 30 enzimas evaluadas de las cuales solo 4 fueron polimórficas y se observó que la diversidad genética encontrada correspondió a una población de tipo asexual, sin embargo, se encontraron individuos con patrones de bandas consistentes con la

hipótesis de un estado diploide existente, pero poco estudiado. La diversidad encontrada por medio de regiones ricas en A-T fue baja, con un coeficiente de similitud entre aislamientos de 0.95, encontrándose la mayoría de la variación genética según el análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro de los municipios con un porcentaje de variación del 80%.

Conclusiones. Las poblaciones del hongo en Antioquia presentan una reproducción predominante de tipo asexual, evidenciada en los bajos niveles de variabilidad genética encontrada. Sin embargo la poca variación existente puede deberse a procesos ocasionales de reproducción de tipo sexual.

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, caracterización morfológica, isoenzimas, regiones ricas en A-T, variabilidad genética.

1. INTRODUCCION

El principal problema fitosanitario que presenta el cultivo del cacao es la moniliasis del cacao, enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, la cual ataca el fruto en cualquier edad de desarrollo, lo que conlleva a reducir su valor comercial y ocasiona pérdidas económicas de aproximadamente el 60% de la producción nacional (Espinal *et al.*, 2005).

En Antioquia, la presencia de la moniliasis es una de las causas de los bajos rendimientos del cultivo, generando pérdidas económicas e incidiendo directamente sobre la productividad y competitividad del departamento frente a los demás productores de cacao del país, presentandose entre el 5% al 15% en los municipios de Támesis, Turbo y Maceo como los menos afectados y del 40% al 46% en los municipios de Apartadó y Valdivia como los más afectados (Maya *et al.*, 2004).

El desconocimiento de la biología y de la variabilidad genética del patógeno causante de la moniliasis, hace que las estrategias de manejo de la enfermedad no sean efectivas, haciendo a Colombia menos competitiva, frente a otros países productores de mayor desarrollo investigativo en el tema, lo que les permite competir mejor en un mercado cada vez más exigente mediante un manejo ambientalmente más racional de los problemas fitosanitarios.

Frente a este panorama, varios estudios sobre el patógeno se han llevado a cabo con el fin de identificar su origen, forma de diseminación y la diversidad genética del hongo. Evans (1981) reporta que la presencia de *M. roreri* en especies de tipo silvestre de *Theobroma* y *Herrania* en Colombia y Ecuador, hace suponer que este hongo es nativo del noroeste de Suramérica, de donde se expandió a otras regiones en forma natural y por intervención humana; así mismo, Phillips (2003) realizó estudios moleculares por medio de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) e ITS (intergenic transcribed sequence) y encontró que Colombia posee la más alta diversidad

genética de *M. roleri* considerándose a este país como el centro de origen y diversidad de este hongo, teoría que es soportada por varios reportes históricos que registran la aparición de la moniliasis, así como el hallazgo de huéspedes silvestres infectados con *M. roleri* en el oriente de Colombia, en Norte de Santander y Santander en 1817 y en el valle del bajo Cauca, este de Colombia en 1851.

Los resultados de las investigaciones de Phillips (2003) convierten a Colombia en una de las zonas de mayor interés para el estudio de *M. roleri*, al ser considerada una de las regiones de mayor diversidad y posible origen de esta especie. Con el fin de ampliar estos hallazgos, Grisales (2007) inició en Colombia un estudio con aislamientos provenientes de las zonas cacaoteras de Antioquia, investigación de la cual ya se obtuvieron los primeros resultados indicando que en estas zonas existen niveles bajos de diversidad y diferenciación genética en poblaciones del hongo en 12 municipios del departamento, a excepción de los municipios de Apartado y Dabeiba que mostraron una variación genética moderada.

Con el fin de aportar información y profundizar más en el conocimiento de las poblaciones de *Moniliophthora roleri* en zonas cacaoteras de Antioquia, el presente estudio se llevó a cabo para la caracterización fenotípica y genotípica del patógeno mediante el uso de dos marcadores moleculares, Isoenzimas y Regiones ricas en A-T, información que servirá como punto de partida a otros estudios realizados en otras zonas cacaoteras de Colombia.

2. Marco Teórico/Estado del arte

2.1 Generalidades del cultivo de cacao

El cacao es un árbol leñoso de la familia *Esterculiaceae*, género *Theobroma*, especie *Theobroma cacao* L; es originario del sotobosque y crece en una franja geográfica tropical con un rango de temperatura entre los 20°C y los 30°C (Pinzón y Ardila, 2005).

El árbol presenta un tallo principal que se desarrolla verticalmente hasta una altura de 0.8 a 1.5 metros en forma normal, las flores se producen en el tronco, ramas y tallos leñosos y sus frutos o mazorcas crecen directamente del tronco y de las ramas más antiguas; en la parte externa del fruto presenta una cáscara o pericarpio, y en la parte interna está compuesto por semillas o granos ordenados por hileras, alrededor de un eje central llamado placenta, en la cual los granos están cubiertos por un mucílago rico en azúcares. La maduración del fruto ocurre entre los 150 y 180 días después de la polinización de la flor, dependiendo del origen genético y del clima donde se desarrolla (Pinzón y Ardila, 2005).

2.1.1 Tipos de cacaos cultivados

Este cultivo presenta tres grupos genéticos que a la vez determinan tres clases de grano (Pinzón y Ardila, 2005):

- Tipo Criollo o nativo: cacao genuino muy rugoso, con diez surcos profundos y cáscara delgada fácil de quebrar, reconocido como de gran calidad, de escaso contenido en tanino y reservado para la fabricación de chocolates más finos y de exquisito aroma. Los criollos puros presentan condiciones desfavorables para su manejo pues resultan muy delicados, con alta susceptibilidad a plagas y enfermedades y presentan poco rendimiento; dentro de estos se clasifican los originarios de México, Centroamérica y los

venezolanos. En Colombia se encuentran pocas poblaciones de este tipo de cacao.

- Tipo Forastero: originario de alta amazonia, son llamados amazónicos, tienden a ser amelonados, su cascara es lisa y gruesa con poca rugosidad y surcos poco profundos. Es el tipo de cacao más cultivado y de menor calidad en relación con el sabor y el aroma que confieren los granos al chocolate elaborado con ellos, pero tiene mejor rendimiento en contenido de grasas entre otras características. Se producen en Trinidad, Ecuador, África, Asia y Brasil.
- Tipo híbrido: entre los que se destaca el Trinitario, (originario de Trinidad) es un cruce sexual entre el Criollo y el Forastero, su calidad es más próximo al Forastero. Sin embargo, presenta la robustez de éste y el delicado sabor del cacao Criollo. Muchos clones conocidos en la actualidad como Universal, fueron seleccionados en Trinidad a partir de poblaciones híbridas, es decir, corresponden a individuos sobresalientes de la descendencia de aquellos cruzamientos. Actualmente se cultiva en Colombia y presentan resistencia a algunas enfermedades fungosas entre ellas Escoba de bruja causada por *Crinipellis pernicioso* (Pinzón y Ardila, 2005).

2.1.2 Fenología del cacao

El cacao es una planta que responde a los hidroperíodos y dependiendo de éstos se da su comportamiento y desarrollo (Pinzón y Ardila, 2005). Por lo tanto si la región o lugar de establecimiento del cultivo presenta una época de lluvia es unimodal (Urabá, Llanos Orientales) o dos épocas de lluvias es bimodal (Región Andina y Montaña Santandereana). Dependiendo de estas condiciones presenta cuatro etapas para el desarrollo de la planta:

- Período de reposo. Condición climática seca, formación escasa de frutos.

- Período vegetativo: ocurre iniciando las lluvias, el árbol presenta una actividad fisiológica abundante, con menor prioridad en frutos y mayor prioridad en crecimiento vegetativo.
- Período reproductivo. El árbol desarrolla gran parte de sus flores y frutos.
- Período de cosecha: Período de la cosecha principal que dura de 2-3 meses.

2.1.3 Distribución agroecológica

En los últimos años se ha buscado establecer cultivos de cacao híbridos con el fin de obtener plantaciones menos variables, con mayor uniformidad y mejor rendimiento. Estos estudios hicieron que se considerara una sectorización del tipo de cruzamiento para el cacao de tipo híbrido, teniendo en cuenta para esto las zonas agroecológicas. De acuerdo a estos resultados, para Antioquia se definieron dos zonas agroecológicas para el cultivo del cacao (Pinzón y Ardila, 2005):

- Zona de Bosque Húmedo Tropical en Urabá con una temperatura de 26-30°C y precipitación mm/año mayor a 2500 y altitud de 0-500 m.s.n.m.
- Zona Andina o Marginal Baja Cafetera (ZA) con una temperatura de 23-26°C y precipitación mm/año de 1500-2000 y altitud de 500-1200 m.s.n.m.

A pesar de esta clasificación, actualmente en Antioquia se cultiva cacao en otras zonas agroecológicas como son (Espinal, 1992):

- Zona de Bosque Muy Húmedo Tropical con una temperatura mayor de 24°C y una precipitación entre 4000-8000 mm/año.
- Zona de Bosque Muy Húmedo Premontano con una temperatura entre 18-24°C y una precipitación entre 2000-4000 mm/año.
- Zona de Bosque Seco Tropical o Tierra Caliente Seca con una temperatura mayor de 24°C y una precipitación entre 1000-2000 mm/año.

Las zonas de mayor precipitación y mayor temperatura presentan condiciones adecuadas para el desarrollo de enfermedades fungosas (Pinzón y Ardila, 2005).

2.1.4 Importancia económica

El cacao es uno de los principales productos de importancia económica para Colombia y el mundo. Las estadísticas de los años 2006/07 indican que el principal importador mundial es Europa con una demanda de 1.540.000 toneladas en el 2004 y el mayor productor a nivel mundial es África con 2.392.000 toneladas y una participación del 70.4% de la producción Mundial, mientras que América tiene una participación de 12.1% (411.000 toneladas). Sin embargo, la producción mundial con respecto a los años anteriores presentó una disminución aproximada del 9%, como consecuencia de las condiciones meteorológicas adversas en muchas regiones productoras de cacao (ICCO, 2008).

A nivel nacional los principales productores de cacao en grano en el 2007 fueron: Santander 49%, Huila 12% y Antioquia 6%, con un área sembrada en Colombia de 97.208 hectáreas en el 2004 y presentando un aumento en el 2007 equivalente a un total de 104.000 hectáreas cultivadas (FEDECACAO, 2008), lo que indica la gran actividad e importancia económica del cacao, de la cual dependen 25.000 pequeños productores (Ministerio de agricultura y desarrollo rural de Antioquia e IICA, 2006).

En Antioquia unas 1300 familias cultivan cacao. En el 2001 existían en el departamento 4623 has de cacao en producción, que aportaban 1751.6 toneladas de grano seco por valor de \$3.872,8 millones (\$2211/Kg), para un rendimiento promedio de 378.9 Kg/ha (Cadena Productiva del Cacao y su Agroindustria en Antioquia, 2002).

2.1.5 Principales enfermedades del cultivo

Existen diversos patógenos causantes de enfermedades del cacao, los cuales conllevan a pérdidas económicas en los cultivos, afectando la economía campesina, disminuyendo la producción y causando un deterioro de la planta y de sus frutos (Tabla 1).

Tabla 1. Principales enfermedades del cacao, clasificadas por el nombre común de la enfermedad, agente etiológico y órganos afectados por cada patógeno durante la infección (Pinzón y Ardila, 2005).

Nombres Comunes	Agente Causal	Órganos que atacan
Monilia, Moniliasis Pasma, Neva	<i>(Moniliophthora roreri)</i>	Frutos
Escoba de Bruja	<i>(Crinipellis pernicioso)</i>	Tejidos de crecimiento de cogollos, puntas de las ramas, yemas axilares, hojas, cojines florales, pepinos, mazorcas y flores.
Phytophthora	<i>(Phytophthora palmivora)</i>	Pepinos y mazorcas, hojas, troncos y raíz.
Roselinia	<i>(Rosellinia pepo)</i>	Raíces
Ceratocystis	<i>(Ceratocystis fimbriata)</i>	Tronco y cuello de la raíz.

La moniliasis del cacao o también llamada pudrición acuosa, es causada por el hongo *Moniliophthora roreri* y es considerada como una enfermedad fungosa de importancia económica. Estudios realizados por Rodríguez *et al.* (2005), estimaron que por causa de este patógeno en Colombia se pierde más del 40% de la cosecha anual, equivalente en términos de grano comercial a 28.000 toneladas métricas sobre una producción promedio en los últimos seis años de 42.000 toneladas.

Maya *et al.* (2004), determinaron la incidencia de las principales enfermedades del cacao en cinco municipios de Antioquia, los cuales representan las zonas cacaoteras mas importantes del Departamento, indicando a la moniliasis como la principal enfermedad limitante del cultivo con respecto a otras enfermedades fungosas (Tabla 2).

Tabla 2. Incidencia de las principales enfermedades del cacao, registradas en cinco municipios del departamento de Antioquia (Maya *et al.*, 2004).

Municipio	%Monilia	%Escoba de bruja	%Fitofthora	%Rosellinia
Apartadó	41.05	7.38	3.06	0.27
Turbo	12.30	0	0.80	0
Támesis	4.55	0	10.52	0
Maceo	14.58	2.95	1.16	0
Valdivia	45.80	8.90	0.80	0

2.2 GENERALIDADES DE *M. roreri*

2.2.1 Etiología

En 1933, Ciferri & Parodi, confirmaron y nombraron el hongo *Monilia roreri* Ciferri en honor a J. B. Rorer pionero en las investigaciones sobre este patógeno, clasificándolo como: clase: Deuteromycota, Orden: Hyphales, Genero: *Monilia*, Especie: *roreri.*, hongo imperfecto por la ausencia aparente de un estado meiótico. Evans *et al.* (1978) continuaron con los estudios sobre este hongo y observaron que las esporas no formaban cadenas monilioides típicas del genero *Monilia* y las hifas se parecían más a las del grupo Basidiomycetes, presentando septos del tipo doliporo, por lo que instauraron el nuevo género *Moniliophthora*, para acomodar este patógeno.

Con el fin de definir la taxonomía del hongo, varios investigadores (Evans, 1981; Evans *et al.*, 2003; Phillips, 2003) compararon a *M. roreri* con otro hongo patógeno de cacao, conocido como *Crinipellis perniciosa*, un Basidiomycete, y encontraron además de afinidades genéticas varias similitudes en su patogenicidad al hospedero como alteraciones en el balance hormonal, provocando una hipertrofia e hiperplasia al fruto, y ambos atacando especies de *Theobroma* spp. y *Herrania* spp.

Posteriormente, Evans *et al.* (2003) clasificaron formalmente a *Moniliophthora roreri*, dentro del género *Crinipellis*, al observar su relación genética por medio del

análisis de regiones ITS, lo que llevó a una nueva combinación denominada *Crinipellis roreri* con dos variedades según el tipo de hospedero: *C. roreri* var. *gileri*, patógeno en *T. gileri* y *C. roreri* var. *roreri* en *T. cacao*. Además, observaron que ambas variedades presentan un proceso meiótico durante los procesos de esporogénesis y germinación, contrario a lo que se había presumido hasta el momento.

Dos años más tarde, Aime y Phillips (2005) por medio de un estudio filogenético utilizando cuatro genes nucleares (28S rDNA, 18S rDNA, ITS, RPB1 y EF1- α) observaron que *M. roreri* y *C. pernicioso* son hongos estrechamente relacionados, lo que confirmó la teoría propuesta hasta el momento. El mismo estudio, permitió definir que ambos hongos hacen parte de un linaje nuevo y distinto dentro de la familia Marasmiaceae; el cual comprende dentro del género *Moniliophthora* dos especies: *M. pernicioso* comb. nov. y *M. roreri*.

2.2.2 Distribución geográfica

La moniliasis del cacao ha sido reportada en varios países de Centro y Suramérica. El primer brote fue reportado en Ecuador por Rorer (1918) y posteriormente se reportó en Colombia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras y Guatemala. Los últimos reportes indican la presencia de la enfermedad en Belize y México, mostrando como el hongo se ha ido diseminando en las plantaciones de cacao de Centroamérica (Phillips *et al.*, 2006).

2.2.3 Rango de hospederos

El hongo es exclusivo del fruto del cacao, y se ha encontrado causando la enfermedad en especies del género *Herrania* spp. y *Theobroma* spp. (Evans, 1981). Dentro del género *Theobroma*, las especies más importantes son: *T. cacao*, especie ampliamente cultivada y de gran importancia comercial, *T. bicolor* en centro América y *T. grandiflorum* en Brasil (Wood y Lass, 1985). También, Baker *et*

al. (1954) documentaron la presencia de éste patógeno en poblaciones silvestres de *T. gileri* en Antioquia, Colombia. (Phillips, 2003).

2.2.4 Mecanismos de dispersión

Existen varios mecanismos de dispersión del hongo capaces de facilitar el desarrollo de la enfermedad en cultivos de cacao; dentro de estos los principales son:

- Viento, el hongo una vez ha esporulado en el fruto, las masas de esporas son liberadas y transportadas libremente por el viento. (Phillips, 2003). La densidad de esporulación puede alcanzar 44 millones de conidias por cm² y en el fruto maduro puede producir cerca de 7.000 millones de conidias (Campuzano, 1976). *M. royeri* está bien adaptado a este tipo de dispersión, gracias a la pared gruesa de las esporas y a la consistencia polvosa de las masas de éstas (Evans, 1986).
- Humanos: las actividades realizadas por el hombre permiten la diseminación de la enfermedad a grandes distancias, lo cual supera las barreras geográficas. El hombre puede diseminar el hongo al transportar frutos infectados aparentemente sanos, con el fin de usar éstos como semilla para el establecimiento de cultivos o con otros propósitos (Evans, 1986).
- Insectos: el transporte de hongos por insectos puede suceder de dos formas, como esporas adheridas en las partes del cuerpo del insecto o en el tracto digestivo de éste llevándolas de un fruto a otro. Sin embargo, este tipo de diseminación ha sido poco estudiado (Phillips, 2003).
- Agua: lluvias torrenciales acompañados de vientos fuertes, sugieren una posible vía de diseminación del hongo a grandes distancias (Porrás y Enríquez, 1998); ya que el agua es considerado como uno de los

mecanismos más efectivos en la liberación de pequeñas nubes de esporas (Evans, 1981).

2.2.5 Signos de la enfermedad

Evans (1981) describió las características morfofisiológicas del hongo, al reportar como la colonia en medio agar extracto de malta (AEM) tiene un crecimiento lento con un diámetro de 8-15 mm después de 2 semanas. Se caracteriza por presentar inicialmente un color salmón a rosáceo y al final del desarrollo de la colonia un color canela o arcilla con una temperatura óptima de crecimiento de 25-26°C, máximo 33°C y microscópicamente presenta hifas hialinas, pared delgada y septada, sin conexiones en clampa, pero con doliporo, las conidias se separan fácilmente, tienen pared gruesa, forma globosa a subglobosa, algunas veces elipsoides, y en cadenas formadas en sucesiones basipétalas. También se presentan conidias cilíndricas de pared delgada.

Castaño (1952) y Campuzano (1976) describieron las características morfológicas y de crecimiento del hongo en aislamientos obtenidos en el departamento de Caldas en Colombia. Castaño (1952) observó en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) a 28°C, que las colonias mostraban áreas de crecimiento concéntrico de diferentes colores con una área de esporulación compacta en el centro de la colonia. Las esporas fueron heteromórficas con una forma predominantemente esferoide, elipsoide y ovoide elíptica y un tamaño entre 5-10 µm de largo y 5-15 µm de ancho. Por otro lado Campuzano (1976) observó que la densidad de las esporas formadas en mazorcas enfermas, se incrementa más rápidamente durante los primeros nueve días del desarrollo de la colonia y el pico de producción era alcanzado después de 15-16 días con 4.4×10^7 esporas cm^{-2} .

Posteriormente, Phillips (2003) evaluó las características morfofisiológicas de 88 aislamientos procedentes de ocho países: Venezuela, Colombia, Perú, Panamá, Ecuador, Costa Rica, Nicaragua y Honduras. El crecimiento del hongo en medio V8

a 20°C durante 20 días, con un fotoperiodo 12 horas luz/12 horas oscuridad, indicó después de un análisis de acuerdo a su país de origen que los aislamientos de Perú, Colombia y Venezuela presentaron en promedio una mayor tasa de crecimiento, esporulación y tamaño de la espora, contrario a los aislamientos de Centroamérica y el centro de Ecuador. Con respecto a la forma de las esporas también las clasificó como globosa/subglobosa y predominantemente elipsoide.

Dentro de los análisis también encontró aislamientos que presentaron la capacidad de crecer y esporular menos intensamente que otros, posiblemente como un mecanismo de economía metabólica baja debido a las condiciones favorables de la región. Los aislamientos de crecimiento lento pueden ser explicados como una selección no intencional mediada por humanos, debido a que estos aislamientos tienen menos oportunidad de ser detectados antes del transporte y el descargue, en este sentido los largos periodos de colonización del fruto antes de la manifestación visible de los síntomas demuestran como un fruto aparentemente saludable puede ser seleccionado y transportado para uso como fuente de material de siembra u otras actividades.

También observó a temperaturas extremas un incremento del tamaño de la espora, probablemente como un mecanismo de sobrevivencia bajo temperaturas no óptimas, un fenómeno similar ha sido reportado en esporas viejas y su relación con la formación de estructuras resistentes a través de la ampliación de la pared de la espora (Campuzano, 1981). Este mecanismo recurrente podría explicar la capacidad del hongo a sobrevivir en el campo durante periodos de condiciones adversas o entre ciclos de cosechas, ya que esporas grandes de pared gruesa, no solamente las protege contra temperaturas adversas, sino también contra estrés hídrico (Carlile y Watkinson, 1994).

Los resultados también sugirieron que *M. royeri* puede exhibir un significativo grado de plasticidad fenotípica (efectos generales del medio ambiente a la expresión fenotípica). Modificaciones morfofisiológicas temporales y permanentes observadas

en este estudio y propuestas por el autor como posibles adaptaciones del hongo para crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, diversas altitudes (desde el nivel del mar hasta más de 100 m.s.n.m) y diversas zonas (zonas secas a zonas muy húmedas); lo que sugiere que puede sobrevivir en áreas más allá de su rango geográfico y con suficiente capacidad de adaptación para acomodarse a cambios climáticos.

En general, Phillips (2003) encontró una considerable variación morfofisiológica, donde la mutación puede explicar parte de la variación observada, dato que corroboró cuando comparó frecuencias de fragmentos de ADN secuenciados de *M. roreri* encontrando mutaciones puntuales.

2.2.6 Síntomas de la enfermedad

El primer síntoma de infección sobre el fruto se presenta al mes de la inoculación, observándose principalmente en la epidermis y se caracteriza por puntos pequeños de apariencia aceitosa, que con el tiempo se unen formando una mancha café con bordes bien definidos, sobre la cual aparece más tarde el micelio y las esporas del hongo. Internamente las almendras se encuentran fuertemente adheridas y en estado de descomposición más o menos avanzado, los frutos enfermos generalmente tienden a ser más pesados que los sanos.

Otros síntomas típicos de la enfermedad en el fruto, son la presencia de deformaciones o protuberancias en forma de Giba (típico de mazorcas jóvenes), maduración prematura, manifestándose por una coloración amarillenta y el tejido interno se caracteriza por formar una masa compacta difícil de separar (Campuzano, 1976).

2.2.7 Ciclo de la enfermedad

El ciclo comienza por la dispersión de una espora asexual infectiva de *M. roreri*, la cual en condiciones ideales para su desarrollo y germinación tales como:

temperatura entre 25°C y 30°C; Humedad relativa por encima de 80% y precipitación entre 40-1000 mm por año, benefician el desarrollo de la infección (Evans, 1981).

La aparición de síntomas dependen de la edad del fruto infectado, en los primeros estados de crecimiento del pepino, se desarrolla completamente la enfermedad y en frutos con más de 4 meses de edad la infección generalmente queda limitada a la corteza, presentando solamente los síntomas iniciales y generalmente no causa daño interno en la semillas (Rodríguez *et al.*, 2005).

El ciclo de duración de la enfermedad es de 68 a 74 días en promedio, con el desarrollo durante este periodo de todos los síntomas descritos anteriormente (Figura 1).



Figura 1. Tiempo completo de duración del ciclo de la moniliasis del cacao causada por *M. rozeri* (Rodríguez *et al.*, 2005).

2.2.8 Control de la enfermedad

El principal control es cultural mediante la remoción de las mazorcas que presentan síntomas aun incipientes de la enfermedad. La frecuencia de la realización de esta

labor debe oscilar entre 8 y 15 días de acuerdo a sí es una localidad o época de elevada precipitación y sí son plantaciones de alta productividad con el fin de lograr mantener el daño de la monilia por debajo del 6% (Sánchez *et al.*, 2003).

El control por medio de fungicidas y productos biológicos ha sido evaluado, algunos productos han mostrado ser eficientes a nivel experimental, pero no son adoptados por los pequeños agricultores por sus costos o la poca eficiencia en campo (Phillips *et al.*, 2005). Sin embargo, una alternativa útil es la utilización de genotipos de cacao resistentes a la enfermedad como es el caso del clon ICS-95, el cual fue evaluado por Phillips *et al.*, (2005) con diversas cepas de *M. royeri*, de origen colombiano, las cuales presentan alta variabilidad genética y pertenecen a donde se cree es el centro de origen del hongo. Cinco de las siete cepas evaluadas presentaron alto grado de agresividad concordante con su variabilidad genética causando síntomas internos y externos severos en los frutos de la mayoría de los clones.

La utilización del clon ICS-95, el cual demostró un nivel de resistencia bastante significativa, podría ser una alternativa menos costosa para los agricultores pequeños y podría ser implementado junto con otras medidas de control complementarias, tales como la recolección de frutos enfermos y la utilización de agentes de control biológico como *Trichoderma theobromicola* y *Trichoderma paucisporum*, los cuales se han aislado como hongos endófitos de cacao en sur América y se ha encontrado que producen un antibiótico que inhibe el desarrollo de *M. royeri in vitro* y en pruebas con mazorcas (Samuels *et al.*, 2006). Otra alternativa es la utilización de *Trichoderma* spp. con mezclas de cepas del micoparásito *Clonostachys rosea*, control que puede reducir la enfermedad hasta un 25% (Krauss y Soberanis, 2001) y el desarrollo de nuevos biocontroladores tales como hongos basidiomicetos endófitos de cacao, capaces de competir por el mismo nicho ecológico o por producción de metabolitos bioactivos contra *M. royeri* y *M. pernicioso* (Thomas *et al.*, 2008).

2.3 Importancia de la Genética poblacional en hongos fitopatógenos

Los patógenos de plantas son responsables de causar mortalidad, reduciendo el número de hospederos, disminuyendo la fecundidad de plantas, forzando la dinámica poblacional del hospedero y afectando la estructura y composición de comunidades de plantas naturales (Gilbert, 2002).

Para entender el impacto de las enfermedades en comunidades de plantas naturales se requiere del conocimiento de la estructura poblacional del patógeno, estudio que se lleva a cabo, gracias a la genética de poblaciones, que nos permite identificar el proceso evolutivo de una población, identificando al patógeno con mayor potencial de evolución y por lo tanto con mayor facilidad de escapar a los efectos de resistencia de las plantas o evolucionar para contrarrestar otros métodos de control como la aplicación de fungicidas. Por consiguiente, esta rama de la genética puede ser aplicada para guiar las estrategias de resistencia en las plantaciones con respeto al manejo de fungicidas en diversos agrosistemas, así como en la identificación de zonas de cuarentena, para evitar el transporte de frutos infectados (posterior diseminación de la enfermedad) y la búsqueda de germoplasma resistente. Para lograr esto, es necesario evaluar el potencial evolutivo relativo de las poblaciones del patógeno y así valorar el riesgo relativo que ellos poseen para el agrosistema. (McDonald and Linde, 2002).

Según McDonald y Linde (2002), la estructura genética de una población es la cantidad y distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones y es la consecuencia de la interacción entre cinco fuerzas que afectan la evolución, las cuales son:

- Mutación: es la última fuerza de variación genética, es un cambio directo en la secuencia de ADN de un individuo, creando nuevos alelos en una población. Por medio de este proceso puede ocurrir la formación de nuevas cepas patogénicas.

- **Recombinación:** es la segunda fuerza de variación genética, por medio de ésta se crean nuevas combinaciones de alelos, pero no nuevos alelos, las nuevas combinaciones pueden generar nuevos genotipos dentro de poblaciones aumentando el potencial de adaptación cuando ocurren cambios ambientales.
- **Deriva genética:** es un proceso aleatorio, que lleva a una fijación de alelos y por lo tanto disminuye la cantidad de variación genética en una población. Los efectos de la deriva se acentúan más en poblaciones de tamaño pequeño (reducciones ocasionados por cuellos de botella o eventos fundadores, donde una población nueva se inicia a partir de un número pequeño de individuos).
- **Selección natural:** es un proceso direccional que establece que las condiciones del medio ambiente favorecen o dificultan, es decir seleccionan, la reproducción de los organismos vivos según sean sus peculiaridades. La selección natural es responsable de algunos cambios adaptativos en una población, particularmente ésta es una fuerza conservativa.
- **Flujo genético:** es la migración de individuos de un área a otra, los cuales deben sobrevivir y reproducirse en esa nueva población. Este proceso es importante porque introduce nueva variación genética.

Los patógenos que poseen mayor riesgo de contrarrestar los genes de resistencia de la planta, son aquellos que tienen un sistema de reproducción mixto, alto potencial de flujo genético, gran tamaño de población efectivo y altas tasas de mutación; contrario a los patógenos que presentan un menor riesgo los cuales se caracterizan por presentar reproducción asexual estricta, bajo potencial de flujo genético, tamaño de población efectiva pequeña y bajas tasas de mutación (McDonald y Linde, 2002).

Un ejemplo de un fitopatógeno con potencial evolutivo alto, es el hongo *Melampsora epitea*, el cual produce la enfermedad de la roya del sauce, considerada una enfermedad epidémica en plantaciones de sauce en Suecia, por presentar una alta variabilidad genética (índice de Shannon entre 0.977-1.0), soportada por presentar reproducción de tipo sexual (tiene altas tasas de recombinación genética) y alto flujo genético (suficiente para prevenir la deriva genética), características potenciales que favorecen una rápida adaptación del patógeno a cambios ambientales (Samils *et al*, 2001).

Phillips (2003) realizó el primer estudio sobre la diversidad genética de *M. roreri*, con el objetivo principal de determinar el centro de origen y diversidad genética de *M. roreri*, en diferentes países productores de cacao de Centro y Sur América, para lo cual se llevó a cabo un muestreo representativo de las poblaciones del hongo en Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Panamá, Costa Rica, Nicaragua y Honduras. La variabilidad genética del patógeno fue evaluada por medio del empleo de dos marcadores moleculares: ISSR (secuencias intercaladas simples repetidas) y AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción amplificados). Los resultados de este trabajo llevaron a la identificación de cinco grupos genéticos en las poblaciones de *M. roreri* caracterizados de la siguiente manera:

- Grupo I (**Co-Central**): a este grupo pertenecen varios aislamientos de municipios del centro de Colombia: Caldas, Huila y Antioquia (Támesis). Estas regiones se caracterizan por presentar una altitud mayor a los 1000 m.s.n.m., adecuada precipitación (40-1000 mm) y temperaturas cercanas a las mínimas para el establecimiento del hongo y el cultivo.
- Grupo II (**Co-East**): este grupo está conformado por aislamientos del oriente del departamento de Santander (San Vicente de Chucurí, El Carmen de Chucurí y Río Negro) y está conformado a su vez por tres subgrupos que

mostraron un alto nivel de diferenciación, posiblemente debido a un proceso de adaptación local a las condiciones ambientales en esta área.

Los aislamientos de los grupos Co-Central y Co-East son aparentemente endémicos de Colombia, altamente variables y se cree que Co-Central es un subgrupo de Co-East.

- Grupo III (**Gileri**): conformado por cepas aisladas de *Theobroma gileri* en el nor-occidente de Ecuador. Estas zonas presentan diversas condiciones ambientales: altitud mediana a baja, altas temperaturas, altas precipitaciones y ausencia de periodos prolongados de sequia.

- Grupo IV (**Co-West**): conformado por 2 subgrupos:
 - Grupo IV A: constituido por aislamientos del centro de Ecuador.
 - Grupo IV B: constituido por todos los aislamientos de Centro América y aislamientos del occidente de Antioquia (Urabá y San Jerónimo). En centro América se encontraron dos aislamientos representativos, uno de Panamá (Colon) y el otro de Costa Rica (Costa Pacifica).

Las condiciones ambientales de estas regiones son muy similares a las descritas en el grupo Gileri.

- Grupo V (**Bolívar**): conformado por todos los aislamientos de Perú y Venezuela, dos cepas de Colombia (norte del departamento de Santander) y diez aislamientos colectados en la periferia de Ecuador (uno en Tenguel en el sur de Ecuador, con alta diferenciación con respecto al resto de los aislamientos, tres de la Provincia de Manabí, tres de la provincia de Napo, dos de Pichilingue, uno de Baba y uno de Río Congo).

Estas regiones se caracterizan por presentar bajas altitudes, altas temperaturas, precipitación moderada a baja y un marcado periodo seco de 3 a 4 meses consecutivos. La distribución particular de este grupo en varios países se cree que es debida al movimiento de material infectado por el hombre.

Al analizar las poblaciones de *M. royeri* de Centro y Sur América, Phillips (2003) encontró que los aislamientos de Colombia presentaban un nivel alto de diversidad genética, intermedio para aislamientos de Ecuador y bajo para los de América Central; sugiriendo a Colombia como el lugar de origen de *M. royeri*, cercano al área del Magdalena Medio, y que de allí el hongo se dispersó a otros países por adaptación a nuevas condiciones ambientales, lo que descartaría a Ecuador, como centro de origen de la enfermedad, tal como había sido reportado (Rorer, 1918).

Los grupos que presentan menor variabilidad están conformados por cepas del hongo causantes de brotes recientes de la enfermedad, la cual probablemente se diseminó a estos países por una población fundadora pequeña.

Los resultados de Phillips (2003) también sugieren que los aislamientos de Centro América son muy uniformes según lo indica el patrón de bandas de los ISSR y AFLP, llevando a pensar que el hongo se ha dispersado de forma clonal en esta área.

En el 2004, Maya *et al.*, realizaron un estudio para identificar la incidencia de las principales enfermedades del cacao y se encontró que *Moniliophthora royeri* era el principal patógeno limitante en los cultivos cacaoteros de Antioquia. Estos resultados llevaron a Grisales (2007) a iniciar un estudio sobre la variabilidad genética de 12 poblaciones (Apartado, Dabeiba, Chigorodó, Remedios, Segovia, Maceo, Támesis, San Jerónimo, Nariño, Taraza, Valdivia y Puerto Berrio) de este fitopatógeno en Antioquia, por medio de dos marcadores moleculares de tipo dominante: RAPDs y ap-PCR. El análisis estadístico de grupo y de grupos

principales mostró que la población de *M. royeri* en Antioquia posee gran similitud genética, lo que indica que su propagación ha sido de forma asexual favorecida por la presencia de condiciones climáticas muy uniformes en el departamento y por el tipo de material vegetal utilizado en el establecimiento de los cultivos de cacao, a excepción de los municipios de Dabeiba y Apartadó que mostraron una variación genética moderada, lo que sugiere a estas zonas como focos de dispersión de nuevas variantes del patógeno.

2.4 Marcadores moleculares utilizados en el análisis de la variabilidad genética en hongos fitopatógenos.

Un marcador molecular, es alguna clase de molécula que indica la existencia de un proceso químico o genético. En genética, un marcador genético, es un fragmento de ADN cuya herencia se puede rastrear, puede ser un gen, o un segmento de ADN sin función conocida. Como las secuencias de ADN son específicas, los marcadores se usan a menudo como formas indirectas de rastrear secuencias de ADN que no han sido aún identificados, pero cuyas ubicaciones aproximadas se conocen (Halliburton, 2004).

Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN.

2.4.1 Marcadores bioquímicos

Estos marcadores están representados por las isoenzimas, proteínas totales o de almacenamiento, y constituyen la primera generación de marcadores (Solís y Torres, 2005).

- **Isoenzimas**

Las isoenzimas fueron descubiertas por Hunter y Markert (1957). Se caracterizan por presentar distintas formas moleculares de una misma enzima con especificidad por el mismo sustrato (Solís y Torres, 2005).

Esta definición abarca las variantes enzimáticas que son el producto de diferentes genes y entonces representan diferentes loci, descritas como isoenzimas y las enzimas que son el producto de diferentes alelos de un mismo gen descritas como alloenzimas. Las Isoenzimas son proteínas que catalizan diferentes tipos de reacciones y pueden ser expresadas en diferentes estados de desarrollo o en diferentes tejidos, por ejemplo: hay tres genes diferentes que codifican la enzima lactato deshidrogenasa que cataliza la interconversión de ácido láctico a ácido pirúvico y codifican tres formas diferentes, una forma es encontrada exclusivamente en testículo, otra en músculo esquelético y las otras en diversos tejidos. Las proteínas pueden estar constituidas por una única cadena polipeptídica y se denomina monómero, dos cadenas: dímero, tres cadenas: trímero y cuatro cadenas: tetrámero (Richardson *et al.*, 1986).

La técnica permite detectar con certeza el efecto de una modificación alélica, debido a un cambio de movilidad electroforética, lo que permite separar las moléculas por su diferencia en carga, tamaño o ambas bajo la acción de un campo eléctrico. Las alteraciones en la carga eléctrica neta se producen por sustitución de un aminoácido por otro de distinta polaridad, por ejemplo, cambio de un aminoácido ácido por otro básico o neutro.

Las principales características de las isoenzimas incluyen la simplicidad, el bajo costo y además presentan una cobertura del genoma de 10-20 *loci* por especie. La expresión alélica es de tipo codominante (es decir, que en un individuo diploide es posible visualizar la expresión de ambos alelos y por lo tanto identificar individuos homocigóticos y heterocigóticos), lo que permite medir los niveles de variación

genética entre y dentro de las poblaciones y detectar la presencia de híbridos e introgresión de genes (Paredes y Gepts, 1995). Son selectivamente neutrales y están libres de efectos deletéreos (cuando los alelos tienen efectos negativos que imposibilitan la reproducción del genotipo que los posee).

La genética de poblaciones es esencialmente un estudio de las causas y efectos de la variación genética dentro y entre poblaciones, y por mucho tiempo las Isoenzimas están entre los marcadores moleculares más utilizados para este fin en estudios de animales, humanos, plantas, bacterias, entre otros y también han sido evaluadas en muchos estudios en hongos fitopatógenos con diversos objetivos como:

- Diferenciación de poblaciones sexuales y asexuales por medio de patrones isoenzimáticos; Tooley *et al.* (1985) evaluaron poblaciones sexuales y asexuales de *Phytophthora infestans*, al resolver dos locus polimórficos (Gpi-1 y Pep) para las poblaciones asexuales y cuatro locus polimórficos (Gpi-1, Pep, Me y Xdh) para las sexuales, permitiendo así diferenciarlas. También lograron observar patrones de bandas consistentes con la hipótesis que indica que este hongo presenta un estado vegetativo diploide.
- Variabilidad genética dentro de una misma especie de hongos; trabajos realizados por Mohammadi *et al.* (2004) en 13 cepas de *Fusarium oxysporum* revelaron 10 locus polimórficos de seis enzimas permitiendo detectar una considerable diversidad genética entre aislamientos de nueve formas especiales, sugiriendo que el análisis isoenzimático es una herramienta útil en la identificación de la diversidad genética en hongos de una misma especie.

Así mismo, Komjáti *et al.* (2007) analizaron 45 aislamientos de *Plasmopara halstedii* por medio de 16 sistemas isoenzimáticos de los cuales tres, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y fosfoglucomutasa,

mostraron patrones de bandas claras y reproducibles y revelaron polimorfismo entre los aislamientos, además los investigadores encontraron que la técnica fue idónea por requerir pocas cantidades de material para alcanzar buena resolución de las bandas (31-100µg por muestra de reacción).

- Variabilidad genética entre especies; diversas investigaciones permiten observar la utilidad de las isoenzimas para detectar variabilidad genética entre especies de diversos géneros de hongos, por ejemplo: análisis realizados entre especies de *Phytophthora* por Lebot *et al.* (2003) permitieron obtener diferentes zimogramas específicos de cada especie, logrando identificar cada uno de los aislamientos de interés.

Otro ejemplo es el estudio realizado por Mwenje *et al.* (2006) quienes evaluaron siete aislamientos de *Armillaria* sp. obtenidos en Kenya por medio de PCR-RFLP, IGS-1 DNA y dos isoenzimas (Pectin liasa y pectin metil esterasa), con cada una de las técnicas y la combinación de éstas se logró diferenciar tres grupos distintos: Grupo I: conformado por aislamientos relacionados con la especie *A. fuscipes*, Grupo II: relacionados con la especie *A. mellea* ssp. *nipponia* y Grupo III: relacionados con la especie *A. binnules*.

2.4.2 Marcadores de ADN

Constituyen la última generación de marcadores moleculares, los cuales presentan varias ventajas, ya que no son afectados por el medio ambiente, están presentes en cualquier estadio de desarrollo del individuo, son universales, estables y específicos para cada individuo (huella génica) (Solís y Torres, 2005).

Existe una amplia variedad de marcadores de ADN, entre los que se destacan:

- RAPD (Polimorfismo de ADN amplificado arbitrariamente), para su desarrollo se utilizan primers al azar para amplificar algunas secuencias de ADN. Los primers (reverse y forward) se hibridan simultáneamente al ADN genómico. Si las secuencias blanco son lo suficientemente cercanas el ADN entre ellos se amplificará y se visualizara por geles de agarosa o poliacrilamida. La variación en las secuencias blanco resultará en productos de amplificación de diferentes tamaños. Este marcador tiene poca repetitividad y no puede ser asociado con loci específicos (Halliburton, 2004).
- AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados): se utiliza para evaluar de forma simultánea diferentes regiones de ADN distribuidas al azar a través del genoma. Los principales pasos para su desarrollo son: corte del ADN genómico con enzimas de restricción, incorporación de adaptadores específicos en los extremos de los fragmentos genómicos, amplificación específica por PCR y visualización en geles de poliacrilamida. Las bandas que se obtienen no pueden ser asociadas con loci específicos, razón por la cual no son muy útiles para estimar la heterocigosidad u otros estudios que requieran información de locus específicos. Este marcador es útil para la identificación de individuos y su relación; para estimar flujo genético y dispersión. (Halliburton, 2004)
- RFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción) este marcador permite identificar el polimorfismo del ADN por cambios en los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, produciendo fragmentos de diferente longitud, los cuales pueden ser separados en geles de agarosa o poliacrilamida y visualizados por diversos métodos. Este marcador es muy útil para el estudio de enfermedades genéticas humanas y mapeo genético. (Halliburton, 2004)
- Microsatélites: son unidades repetidas de 1 a 6 nucleótidos de longitud. Muchos loci Microsatélites son usualmente encontrados en regiones no

codificantes donde la tasa de substitución de nucleótidos es más alto que en regiones codificante. Los primers utilizados son diseñados de una única secuencia flanqueante de un locus, amplificados por PCR y visualizados por geles de agarosa o poliacrilamida. Son marcadores genéticos neutrales, altamente variables (a menudo con 10 o más alelos por locus), útiles para definir estructura y dinámica poblacional (Halliburton, 2004).

- Regiones de ADN ricas en A y T: marcador molecular que se utilizó en este estudio, el cual permite determinar variación genética en poblaciones, por medio del polimorfismo observado en la longitud de fragmentos obtenidos por el corte de la doble cadena del ADN con una enzima de restricción, en este caso *HaeIII*, para que este polimorfismo sea detectado, es necesario que las secuencias nucleotídicas de dos o más individuos comparados sean diferentes. Las diferencias en la secuencia de ADN de los individuos resultan en el corte de fragmentos de distintos tamaños, separados a través de electroforesis en geles de agarosa (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Varios estudios sobre hongos se han llevado a cabo analizando las regiones ricas en A-T del ADN y se han comparado los resultados y la utilidad de este marcador con otros marcadores moleculares, un ejemplo es lo evaluado por Afanador *et al.* (2003), en un estudio realizado para identificar especies de *Colletotrichum* sp. causantes de la antracnosis en tomate de árbol, mango y pasiflora. En este estudio, se utilizaron como marcadores moleculares los RAPDs, AP-PCR y regiones ricas en A-T, los resultados obtenidos usando este último marcador corroboraron los datos encontrados con las otras técnicas, según los cuales los aislamientos de tomate de árbol pertenecen a una población homogénea pero los aislamientos de mango y pasiflora mostraron un alto nivel de variación.

Freeman *et al.* (2000) también lograron correlacionar los resultados obtenidos a partir del marcador regiones ricas en A-T con respecto al marcador ap-PCR, indicando que las poblaciones de *Colletotrichum* sp. en almendras y fresas fueron

distintas y clonales y en poblaciones de *C. gloeosporioides* aislados de aguacate; presentaban múltiples genotipos.

Otro estudio realizado con el fin de observar la diversidad genética de aislamientos de *Rhizoctonia solani* en arroz y el efecto de prácticas de manejo de la enfermedad, tales como la rotación de cultivos en la estructura de la población del patógeno, se llevó a cabo por medio de la caracterización morfológica de los aislamientos, pruebas de patogenicidad, identificación de los grupos de anastomosis y el empleo de marcadores moleculares tales como regiones ricas en A-T. Los resultados obtenidos por medio del marcador molecular corroboraron lo obtenido con las otras pruebas, observándose una mayor diversidad y virulencia en aislamientos obtenidos a partir de tejidos enfermos de la planta comparada con la obtenida en aislamientos del suelo (Banniza *et al.*, 1999).

Por medio de los marcadores moleculares se logra caracterizar poblaciones de un hongo en particular y analizando las investigaciones anteriormente mencionadas se determina la importancia de la estructura poblacional de patógenos en cultivos de interés comercial. Sin embargo, revisando la literatura sobre el hongo objeto de este trabajo, se encuentran pocos estudios realizados sobre estos aspectos, registrándose para Colombia únicamente los estudios realizados por Phillips (2003) y Grisales (2007) sobre la variabilidad genética de *M. roreri*. El trabajo de Grisales (2007) se centró particularmente en aislamientos del hongo procedentes de varios municipios cacaoteros del departamento de Antioquia y forma parte del macroproyecto: "Caracterización de la variabilidad de *M. roreri* (Cif.) Evans *et al.*, causante de la moniliasis del cacao (*T. cacao*) en plantaciones de Antioquia y Evaluación de Clones por su respuesta a la enfermedad", en el cual se planteó el empleo de varios marcadores genéticos, RAPDs, ap-PCR, Isoenzimas y Regiones ricas en A-T y marcadores morfológicos, con el fin de brindar información sobre la diversidad genética y fenotípica de estas poblaciones del hongo.

Hasta el momento se alcanzaron los primeros resultados con los marcadores de tipo dominante: RAPDs y ap-PCR (Grisales, 2007), los cuales indican a la población antioqueña de *M. royeri* como muy homogénea. Considerando este aspecto y teniendo en cuenta lo descrito por McDonald y Linde (2002), el hongo presenta un alto flujo genético, lo que indica su alta capacidad de dispersión, clasificándolo en un riesgo moderado para el cultivo, información útil en el control de la enfermedad debido a que se puede implementar zonas de cuarentena en las áreas donde se encontró mayor variabilidad (Dabeiba y Apartadó), con el fin de restringir el movimiento de frutos por el hombre, causa posible de esta diseminación del hongo en Antioquia y aportar información para futuros estudios en la identificación, evaluación y desarrollo de material resistente.

Considerando lo anterior, el presente estudio planteó el uso de dos marcadores moleculares, uno de tipo codominante: Isoenzimas, y otro de tipo dominante: Regiones ricas en A+T, y la caracterización morfológica de las poblaciones antioqueñas de *Moniliophthora royeri*, con el fin de aportar más información a la biología del hongo y a la distribución de la diversidad genética de éstas en las zonas cacaoteras. Los resultados de este trabajo permitirán aportar información que puede servir como herramienta útil en la búsqueda de material genético de cacao resistente, un componente importante del manejo integrado de la enfermedad y de gran importancia en un país donde actualmente se está promoviendo e implementando el cultivo del cacao a nivel comercial.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Caracterizar fenotípica y genotípicamente aislamientos del hongo *Moniliophthora roreri* patógeno del cacao (*Theobroma cacao* L.) colectados en 12 municipios cacaoteros del Departamento de Antioquia.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar morfológicamente 236 aislamientos de *M. roreri* mediante la evaluación de las variables tamaño y forma de las esporas, densidad de esporulación, tipo de esporulación y características de la colonia.
- Identificar grupos o variantes genéticas de *M. roreri* con base en los perfiles isoenzimáticos detectados en la población objeto de estudio.
- Identificar grupos o variantes genéticas de *M. roreri* con base en el análisis de Regiones ricas en A-T detectadas en la población objeto de estudio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Localización del estudio

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Sanidad Vegetal y de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. La recolección de las muestras en campo se realizó en las principales zonas cacaoteras del departamento de Antioquia en los municipios de Apartado, Dabeiba, Remedios, Segovia, Maceo, Nariño, Puerto Berrío, Támesis, Tarazá, San Jerónimo, Valdivia y Chigorodó; en la Tabla 3 se describen estas zonas con sus respectivas características.

Tabla 3. Zonas de procedencia y origen geográfico de los aislamientos de *M. royeri* colectados en municipios de Antioquia, con la respectiva información meteorológica de cada una de las zonas.

Municipio	T°C	%HR	msnm	Precipitación Anual (mm ³)	Área de producción (ha.)	Región	Zona de vida ^a
Apartadó	28	85	90	3200	1840	Urabá	bh-T/ bmh-T
Dabeiba	24	70	650	1500	376	Occidente	bs-T/bh-T/ bmh-T
Remedios	24	80	700	2200	131	Nordeste	bh-T
Maceo	24	85	969	2200	638	M. medio	bh-T
Puerto Berrío	25	85	592	2400	56	M. medio	bh-T
Segovia	25	70	650	2100	40	Nordeste	bh-T
Nariño	26	85	1180	3500	193	Oriente	bmh-PM
Tarazá	24	75	500	3000	35	Bajo Cauca	bh-T
Támesis	21	65	1600	2200	145	Suroeste	bmh-PM
San Jerónimo	27	85	700	1500	3	Occidente	ZA/bs-T
Chigorodó	28	90	35	3800	54.4	Urabá	bh-T/ bmh-T
Valdivia	28	80	700	2550	37	Norte	bmh-PM/ bh-T

^abh-T: bosque húmedo tropical, bmh-T: bosque muy húmedo tropical, bs-T: bosque seco tropical, bmh-PM: bosque muy húmedo premontano, ZA: zona andina.

4.2. Aislamiento y almacenamiento de las cepas del hongo.

4.2.1. Metodología del muestreo y colecta de tejido enfermo

Para la obtención de los aislamientos del hongo se recolectaron frutos enfermos de cacao en 12 municipios cacaoteros del departamento de Antioquia. En cada municipio se escogieron tres fincas, y en cada finca se tomaron ocho mazorcas con los síntomas más representativos de la enfermedad, como: giba, puntos aceitosos, mancha café dura con micelio y esporulación del hongo (Figura 2). A cada muestra se le realizó un registro de ingreso al laboratorio, en el cual se consignó la siguiente información: código de la muestra, fecha, nombre del municipio, nombre de la vereda, nombre de la finca, manejo fitosanitario del cultivo, temperatura promedio, precipitación, humedad relativa, material de siembra (Híbrido o regional) y tipo de cacao.



Figura 2. Mazorcas de cacao colectadas en campo, mostrando síntomas típicos de la enfermedad.

4.2.2. Aislamiento del hongo

Para el aislamiento del hongo se siguió el procedimiento descrito por Evans (1981). Cada mazorca se lavó con agua y jabón, consecutivamente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 2 min y luego se lavaron con agua destilada estéril por 2 min. Después de la desinfección, a partir de cada mazorca se cortó parte de la epidermis y del interior del fruto se obtuvieron trozos de tejido de 0.5 cm con un área sana y otra enferma. Cada porción de tejido se sembró en medio de

cultivo PDA (200 gr de Papa, 20 gr de Dextrosa, 10 gr de Agar y 1000 ml de agua destilada) acidificado con ácido láctico al 25% (10 ml/L).

Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente (25°C) durante 15 días, tiempo en el cual se dio el desarrollo completo de la colonia, la cual fue utilizada para la identificación macro y microscópica del hongo, teniendo en cuenta las características de crecimiento de ésta, la morfología de las conidias y micelio del hongo.

4.2.3. Almacenamiento

Los aislamientos obtenidos a partir de cada mazorca fueron almacenados mediante tres sistemas diferentes y bajo dos condiciones de temperatura: a) cuadros de papel filtro colonizados con el hongo y disecados a 4°C; b) bloques de agar colonizados por el hongo en crioviales con agua ultrapura a temperatura ambiente (+/- 24°C) y cajas Petri con medio agar extracto de malta (Oxoid: 50g/L de agua) a temperatura ambiente y a temperatura de 4°C.

Como aislamientos referencia de *M. roreri* se utilizaron cuatro cepas representativas de cuatro de los cinco grupos genéticos identificados por Phillips (2003), las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Wilbert Phillips Mora del Instituto CATIE de Costa Rica (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación y origen geográfico de las cepas de referencia caracterizadas por Phillips (2003), los cuales son representativos de los cinco grupos genéticos de *M. roreri*.

Código cepa	Departamento	Municipio	Grupo Genético
Co2	Santander	Tibú	Bolívar
Co8	Antioquia	San Jerónimo	Co-occidental
Co11	Caldas	Palestina	Co-central
Co28	Santander	No definido	Co-oriental

4.3. Evaluación de condiciones óptimas de crecimiento y esporulación

La selección del medio más adecuado para el crecimiento y esporulación del hongo se llevó a cabo en 12 cepas (010A2, 037D, 062R, 068Se, 077M, 099P, 123N, 147T, 155Ta, 179Sj, 207V, 210C) de *M. royeri*, una de cada municipio muestreado y cuatro medios de cultivo: AEM (50 gr agar extracto de malta, 1 L agua destilada), V8 Modificado (200 mL jugo V8, 18g agar, 1gr arginina y 20 gr maltosa, 1L de agua destilada, pH 5.4), PDCA (200 gr de Papa, 20g de dextrosa, 200 gr cáscara de cacao, 18 gr de agar y 1L de agua destilada) y AEMV8 (50 gr agar extracto de malta, 200mL jugo V8, 18 gr de agar por 1L de agua).

Se empleó un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial 4x12 con cuatro repeticiones por tratamiento y condiciones de incubación a una temperatura promedio de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad en una incubadora de iluminación dual marca Scientific Precision 818.

Los parámetros evaluados fueron la velocidad de crecimiento y la densidad de esporulación de cada uno de los aislamientos en cada medio. La tasa de crecimiento se determinó mediante medición cada dos días de cuatro radios predeterminados de la colonia por un período de 13 días y la densidad de la esporulación se evaluó el último día, teniendo en cuenta el número de esporas por cm^2 tomando como base un área fija de 19.63 cm^2 de la colonia.

Para evaluar el crecimiento, inicialmente se llevó a cabo un análisis de medidas repetidas en el tiempo, pero finalmente el análisis se enfocó en el día 13, por ser éste el momento en el que todas las combinaciones de cepas y medios obtuvieron los mayores valores para la variable radio medio.

El análisis de los datos se realizó empleando el programa estadístico SAS versión 8.2.

4.4. Evaluación de variabilidad de *M. roreri* mediante características morfológicas

Cumplida la fase anterior de evaluación de diferentes medios de cultivo para determinar las mejores condiciones de crecimiento y esporulación de *M. roreri*, se procedió a realizar la caracterización morfológica de aislamientos del hongo.

La caracterización morfológica se realizó por medio de un análisis cualitativo y cuantitativo de diferentes variables determinadas en estructuras reproductivas del hongo y características de crecimiento en el medio de cultivo seleccionado Agar Extracto de Malta más V8. Para esta fase se trabajó con 236 cepas del hongo colectadas en los 12 municipios más representativos de las zonas cacaoteras del departamento de Antioquia.

La siembra en el medio seleccionado se hizo a partir de cultivos de diez días de edad, crecidos en medio PDAC e incubados a temperatura ambiente y luz natural. De cada aislamiento se extrajo un disco de 5 mm de diámetro con agar y micelio que se colocó en el centro de una caja de Petri con el medio AEM + V8, seguido de incubación a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ bajo condiciones de 12h luz por un periodo de 16 días.

A cada aislamiento se le evaluaron las siguientes variables cualitativas y cuantitativas descritas por Phillips (2003) con algunas modificaciones: tasa de crecimiento, día de esporulación; producción de esporas; tamaño y forma de las esporas; proporción de esporas según su forma; características de la colonia (tipo de esporulación, borde, textura, presencia o ausencia de sectores). Para la consignación de los datos se utilizó un formato previamente elaborado con cada una de las características a evaluar.

El crecimiento de las colonias se midió hasta que cualquiera de las cepas evaluadas colonizará completamente la caja Petri, a intervalos de dos días, midiendo la longitud de la colonia sobre cuatro radios prefijados en cada una de las cajas. De las cuatro medidas se calculó una media para cada momento en el

tiempo, con las cuales se construyó una curva de crecimiento para cada aislamiento.

La variable días a esporulación, se determinó por observación visual de las colonias de cada aislamiento cada 24 horas, en un periodo de 16 días, determinando la presencia de esporulación por cambios en el color de la colonia.

La producción de esporas se determinó a los 16 días de edad de los cultivos, calculando la cantidad de éstas en toda la colonia fúngica, a partir de la cual se preparó una suspensión acuosa de esporas del hongo mediante la adición de 45 ml de una solución acuosa de Tween-80 al 0.01%. Para determinar la concentración de esporas se realizó un conteo en una cámara de Newbauer, calculando el número de esporas/cm² de superficie de la colonia del hongo.

Para observar la forma, tamaño y proporción de esporas con forma diferente, se tomó 1 ml de la suspensión de esporas preparada de cada aislamiento, se depositó sobre un portaobjetos y se observó al microscopio óptico con magnificación 400x, mediante la adaptación a éste de una cámara digital, lo cual permite la toma de fotografías y análisis posterior de las mismas con el programa Scion Image 4.0.

De cada preparado se midieron 10 esporas al azar por repetición en cuatro campos diferentes, para un total de 40 esporas por aislamiento. En las esporas globosas se midió el diámetro y en las elipsoides el ancho y el largo. La presencia o ausencia de cada tipo de espора y su proporción se determinó sobre las mismas 40 esporas.

La apariencia y color de las colonias se determinó visualmente al cabo de 16 días de incubación, teniendo en cuenta el tipo de esporulación, borde, textura y la presencia o ausencia de sectores en la misma, para los cuales se establecieron categorías a las que se les asignó un valor numérico de 0 a 3 según se muestra en la tabla 5. El color de la esporulación en la colonia se determinó de acuerdo a la tabla de colores de Munsell (1990).

Tabla 5. Codificación de las variables morfológicas de *M. roreri* utilizadas en el análisis estadístico: Tipos de Esporulación, Borde de la colonia, textura de la colonia y sectores.

Variable	Categoría	Valor Asignado
Tipo de Esporulación	Uniforme	0
	Anillos en toda la colonia	1
	Uniforme con anillos terminales	2
	Uniforme con anillos centrales	3
Borde de la colonia	Uniforme – entero	0
	Ondulado	1
	Plumosos	2
Textura de la colonia	Afelpada	0
	Polvosa	1
	Estriada	2
	Algodonosa	3
Sectores	Ausencia	0
	Presencia	1
Forma de la spora	Circular o Globosa	0
	Elipsoide	1
	Elipsoides y globosas	2

4.4.1. Análisis Estadístico de las características morfológicas

Para el análisis de los datos se utilizó un diseño experimental de Bloques al azar, en donde cada bloque correspondió a un momento de tiempo, para un total de cuatro (4) repeticiones.

A los datos morfológicos se les realizó estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA), para evaluar las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se llevó a cabo el test de comparación de Tukey, mediante el programa XLSTAT Versión 2009.1.01.

También se realizó el análisis por medio de Componentes Principales y de Coordenadas principales, para lo cual los datos se organizaron en una matriz de datos para las variables cualitativas y cuantitativas utilizadas en la caracterización de las colonias del hongo. El análisis se hizo utilizando el coeficiente de Gower, que permite analizar variables cuantitativas, binarias y multiestado. Los análisis

fueron llevados a cabo mediante el empleo del paquete estadístico Multi-Variate Statistical Package Plus (MSVP) versión 3.13q; (Kovach Computing Services, Pantraeth, Anglesey, Wales, United Kingdom).

4.5. Caracterización de la diversidad de *M. roreri* mediante análisis isoenzimático

Para la caracterización de la diversidad del hongo mediante análisis isoenzimático, se evaluaron inicialmente 30 enzimas y nueve sistemas de buffers con el fin de identificar su actividad en *M. roreri*. Las enzimas seleccionadas se evaluaron en 17 cepas del hongo, representativas de cada zona del departamento de Antioquia con el fin de identificar aquellas polimórficas y monomórficas, paralelo a esto, se evaluó la influencia de la edad del micelio del hongo sobre la actividad enzimática, para ello se utilizaron extractos de micelio del hongo obtenidos a partir de cultivos de 10, 15 y 20 días de edad.

Los resultados de estos estudios preliminares permitieron seleccionar los sistemas enzimáticos y de buffer óptimos para la caracterización isoenzimática de toda la población de *M. roreri* en Antioquia.

4.5.1. Producción de Micelio.

Cada aislamiento del hongo fue reactivado inicialmente en AEM (50 gr/L de extracto de malta), por 17 días a temperatura ambiente. A partir de la colonia activa de cada aislamiento, se preparó una suspensión acuosa de esporas a una concentración aproximada de 1×10^6 esporas/ml, de la cual se tomó 1 ml y se adicionó a un erlenmeyer con 60 ml de medio líquido caldo levadura, malta (3 gr de extracto de levadura, 5 gr de extracto de malta, 5 gr de peptona y 10 gr de sucrosa) más 60 μ l de ampicilina (20 mg/mL)

Los cultivos se incubaron a una temperatura de 26°C, en completa oscuridad y agitación constante a 80 rpm durante 15 días. Una vez cumplido el tiempo de

incubación, el micelio se extrajo al vacío, el exceso de humedad se eliminó con la ayuda de papel toalla estéril, luego cada muestra se dividió en porciones de 0.25 gr de micelio, las cuales se almacenaron posteriormente en viales plásticos a -80°C hasta su uso.

4.5.2. Extracción de la proteína

Para la extracción de las enzimas se siguió la metodología descrita por Correa (1984), la cual consiste en tomar muestras de 0.25 mg de micelio congelado más 1 ml de buffer de extracción (17gr de sucrosa, 0.1gr de ácido ascórbico, 0.1gr de cisteína hidroclorehídrica diluidos en un buffer al 0.05M de Tris-Citrato [pH 8.7]) y una pizca de arena de cuarzo lavada y esterilizada. La mezcla así conformada se maceró en mortero bajo condiciones de baja temperatura (+/- 10°C) hasta obtener una solución homogénea, luego ésta se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 13.000 rpm por 20 min a una temperatura de 4°C, el sobrenadante se extrajo y se dividió en alícuotas de 60 µl en tubos eppendorf de 0.6 ml y luego se almacenaron a -80°C, o se utilizaron inmediatamente en la fase siguiente.

4.5.3. Electroforesis y revelado de la actividad enzimática

La electroforesis horizontal en geles de almidón y el revelado de la actividad enzimática se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Murphy *et al.* (1990). Los sistemas evaluados se presentan en las Tablas 6 y 7. La Tabla 6 indica la abreviatura y ecuación asignada a cada enzima de acuerdo al sistema IUBMB (clasificación enzimática de acuerdo al Nomenclatura Committee of the Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology), nomenclatura dada por medio de una ecuación que indica el tipo de actividad y reacción que cataliza. La Tabla 7 los sistemas de buffer utilizados con sus respectivos creadores.

Tabla 6. Enzimas evaluadas en aislamientos de *M. roreri* de Antioquia. Abreviatura y ecuación asignada a cada una de acuerdo al sistema IUBMB.

Enzima	Abreviatura	Ecuación
Aspartate aminotransferasa	AAT	2.6.1.1.
Aconitate hidratase	ACOH	4.2.1.3
Alcohol deshidrogenasa	ADH	1.1.1.1
Adenylate kinasa	AK	2.7.4.3
Creatine kinase	CK	2.7.3.2.
Dihydrolipoamide dehydrogenase	DDH	1.8.1.4
Esterasa	Est (α-NA)	No específica
Fructosa-biphosphate aldolase	FBA	4.1.2.13
Fructose biphosphatase	FBP	3.1.3.11
Formaldehyde dehydrogenase	FDH	1.2.1.1
Fumarase	FUM	4.2.1.2
Glucosa dehydrogenase	GCDH	1.1.1.118
General protein	GP	No específica
Glucosa-phosphate isomerase	GPI	5.3.1.9
Glutamate dehydrogenase	GTDH	1.4.1.2
Glutamate dehydrogenase (NADPH+)	GTDHP	1.4.1.4
Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase	G-3-PDH	1.1.1.8
L-Iditol dehydrogenase	IDDH	1.1.1.14
Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42
Lactate dehydrogenase	LDH	1.1.1.27
Lactoylglutathione lyase	LGL	4.4.1.5
Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37
Malic enzyme	ME	1.1.1.40
Octanol dehydrogenase	ODH	1.1.1.73
Peptidasa A	PEP-A	3.4.11-13
Peptidasa B	PEP-B	3.4.11-13
Phosphogluconate dehydrogenase	PGDH	1.1.1.44
Phosphoglucomutase	PGM	5.4.2.2.
Purine-Nucleoside Phosphorylase	PNP	2.4.2.1
Xanthine dehydrogenase	XDH	1.1.1.204

Tabla 7. Sistemas de buffers utilizados en la evaluación de 30 sistemas de enzimas en aislamientos de *M. roreri* de Antioquia y sus respectivos autores.

Buffer	Autor
Tris Citrato pH 7.0 y 8.0	Whitt (1970)
Tris-Malato-EDTA	Selander <i>et al.</i> (1971)
Borato (discontinuo)	Brewer (1970).
Chipp	Chippindale (1989).
Litio-Borato/Tris Citrato	Selander <i>et al.</i> (1971)
fosfato-Citrato Continuo	Selander <i>et al.</i> (1971)
PGI fosfato	Selander <i>et al.</i> (1971)
Poulik	Selander <i>et al.</i> (1971)
Tris-Citrato-EDTA	Avise <i>et al.</i> (1975)

Para la electroforesis, las muestras se cargaron en el gel mediante la absorción de los extractos de micelio en rectángulos de papel filtro Whatman #3 de 12x5 mm, los segmentos de papel con la muestra fueron incubados a -20°C mientras se realizó la preparación de las condiciones para la electroforesis. El gel es preparado el día anterior y almacenado durante toda la noche a 4°C, a la mañana siguiente éste se corta en la parte superior, de tal manera que se tenga una porción de 5 cm que va a corresponder al cátodo y la porción restante que corresponde al ánodo. Una vez las muestras son cargadas, el gel es ubicado sobre los tanques con el buffer y mediante el empleo de esponjas se hace un puente que permita el flujo continuo de corriente a través del gel, luego se aplicó el voltaje adecuado según el sistema de buffer a utilizar.

Al día siguiente se corta el gel en cuatro láminas con un hilo de nylon, cada lámina luego es depositada en una bandeja debidamente marcada y luego tratada con un sistema enzimático diferente, lo que permitió revelar cuatro enzimas en un mismo gel. Una vez preparada la tinción, ésta se agregó al gel y luego se incubó a la temperatura específica para cada enzima, los geles en los cuales se ha revelado la enzima son posteriormente tratados con una solución fijadora (1:5:5 ácido acético glacial:metanol:agua) para facilitar su documentación fotográfica y posterior conservación.

4.5.4. Análisis estadístico de la caracterización isoenzimática

Las bandas obtenidas con cada sistema enzimático se clasificaron según su orden de migración o movilidad en el gel, a las bandas más rápidas se les asignó la letra A y a las bandas más lentas la letra B.

Un estimativo de la diversidad genética entre aislamientos se determinó mediante el programa POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1997). Por medio de cual se calculó el grado de diversidad genética dentro de poblaciones utilizando el Porcentaje de locus polimórficos (P), Número de alelos por locus (A),

Heterocigocidad promedio de individuos (H), el índice de Shannon (Shannon y Weaver, 1949), como medida de diversidad genética y como estimativo del flujo genético se halló el Número de Migrantes que representa la tasa de migración efectiva (N_m) usando el F_{st} (Wright, 1978).

El coeficiente de endogamia definido como $F_{is}=1-(H_o/H_e)$ fue calculado para todas las poblaciones. Las distancias genéticas y la identidad genética se generaron por medio del índice de Nei entre las poblaciones de los 12 municipios, para posteriormente agruparse mediante el método de la media aritmética no ponderada (UPGMA) y graficarse por medio de un dendograma. Para identificar la relación entre la distancia geográfica de los municipios y la distancia genética de estos se llevó a cabo un test de Mantel, utilizando para los cálculos 1000 permutaciones por medio del programa XLSTAT Versión 2009.1.01.

Para determinar la distribución de la variabilidad genética entre subregiones y entre y dentro de los municipios se hizo un análisis de la varianza molecular (AMOVA) por medio del programa ARLEQUIN Ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006).

4.6. Caracterización de la diversidad de *M. roreri* mediante regiones de ADN ricas en A-T.

4.6.1. Extracción del ADN

La extracción de ADN total del micelio del hongo fue producido siguiendo la metodología descrita para la obtención de proteínas isoenzimáticas, con una modificación, que consistió en la liofilización del micelio por 24 horas a -50°C . La extracción de ADN se hizo siguiendo la metodología descrita por Álvarez *et al.*, (2004). A cada muestra se le produjo daño celular por congelación y maceración con nitrógeno líquido y posterior incubación con buffer de extracción (1% SDS, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) y 1.5 μl de Proteinasa K a 65°C por 60 minutos. Luego se adicionó 200 μl de 7.5 M acetato de Amonio e incubó a

temperatura ambiente (25°C) por 10 minutos seguido de una centrifugación a 12.000 rpm durante 20 minutos.

Las proteínas fueron extraídas con un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico en proporción 24:1 y centrifugación a 12.500 rpm durante 10 minutos, el ADN se precipitó con un volumen de isopropanol al 100% durante toda la noche a -20°C y posterior centrifugación por 10 minutos a 12.500 rpm; luego se realizaron lavados con alcohol al 70% y centrifugación a 12.500 rpm por 5 minutos, el pellet de ADN resultante se secó por una hora a 37°C, posteriormente se resuspendió con 100 µl de agua desionizada estéril y para remover el ARN se adicionó RNasa con incubación a 37°C por una hora.

La cantidad y calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, tinción con bromuro de etidio y visualización bajo UV; la cuantificación se realizó en un espectrofotómetro (Perkin Elmer), para lo cual se prepararon diluciones de ADN de 1:100 para un volumen final de 1200 µl y se les midió la densidad óptica a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La concentración del ADN total se calculó mediante la relación de los valores obtenidos a 260 nm, la constante (50 ng/µL) y la dilución utilizada.

4.6.2. Regiones ricas en A-T

Para obtener las regiones del ADN ricas en A-T se realizó una digestión del ácido nucleico por medio de la enzima de restricción *HaeIII* (Fermentas), la cual corta en sitios GGCC, para lograr la digestión se adicionaron 7.5 µl de ADN total y luego se preparó un coctail (0.25 µl de RNasa, 1 µl de Buffer R y 1.25 µl de enzima *HaeIII*) del cual se adicionó 2.5 µl a cada muestra de ADN. El ADN y la enzima se incubaron toda la noche a 37°C y al día siguiente la electroforesis se realizó en geles de agarosa al 0.8% a 70 voltios durante 11 horas y visualización bajo luz U.V. El resultado son fragmentos menores de 2 Kb de tamaño y son parcialmente

asociados con el genoma mitocondrial, también puede estar presente contaminación de regiones ricas en A-T del ADN nuclear (Afanador *et al.*, 2003.).

4.6.3. Análisis Estadístico de la caracterización molecular

El análisis de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versión 2.0. Los datos se organizaron en una matriz binaria, diseñada asignándole el número 0 a la ausencia de banda y 1 a la presencia de esta. Posteriormente, se generó una matriz de similitud mediante el empleo del coeficiente de DICE (Nei y Li, 1979); la cual se analizó por el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted pairgroup method using arithmetic average), gráficamente se evaluó por medio de la generación de un dendograma. Para estimar la confiabilidad de los grupos genéticos designados en cada dendograma generado se calculó el valor Bootstrap (P) de los nodos de cada grupo utilizando el programa Winboot (Yap, 1996) basado en 1000 repeticiones.

Para el análisis de la variabilidad genética se utilizó el programa POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1997). Por medio de cual se calculó el grado de diversidad genética dentro de poblaciones utilizando el Porcentaje de locus polimórficos (P), Heterocigocidad promedio de individuos (H), el índice de Shannon (Shannon and Weaver, 1949), como medida de diversidad genética y como estimativo del flujo genético se halló el Número de Migrantes que representa la tasa de migración efectiva (Nm).

Con el fin de analizar los resultados obtenidos de forma global, se realizó un análisis de Coordenadas Principales con los datos combinados de los tres marcadores y posteriormente se realizó una representación grafica (scatter plot) utilizando para ello el paquete estadístico (MSVP) versión 3.13q; (Kovach Computing Services, Pantraeth, Anglesey, Wales, United Kingdom).

5. RESULTADOS

5.1. Muestreo y colecta de muestras

5.1.1. Aislamiento del hongo

El total de fincas muestreadas fue de 32 correspondientes a 20 veredas de 12 municipios Antioqueños (Tabla 8, Anexo1).

El número de muestras procesadas fue de 299, de las cuales 236 fueron positivas para *M. roleri*, en seis no se obtuvo ningún crecimiento y 57 correspondieron a hongos saprófitos y fitopatógenos tales como *Phytophthora* sp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. y algunas bacterias no identificadas. También se observó la presencia de hongos endófitos, los cuales normalmente se asocian con frutos de cacao, destacándose entre estos la presencia de *Colletotrichum* spp. y *Botryodiplodia* spp.

5.2. Almacenamiento

Se conformó un cepario de 236 aislamientos de *Moniliophthora roleri*, el cual se encuentra establecido por duplicado; una copia en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín y otra en el laboratorio de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia. El almacenamiento del hongo se hizo de acuerdo a los tres sistemas descritos previamente, siendo el más favorable el sistema de cuadros de papel filtro colonizados por el hongo, seguido del sistema de bloques de agar en crioviales y el menos favorable el de cajas Petri con medio AEM.

Tabla 8. Identificación de aislamientos de *M. royeri* procedentes de frutos de cacao de 12 municipios del departamento de Antioquia, sitio de origen y tipo de cacao fuente de cada aislamiento.

Código Cepa ^a	Municipio	Veredas	Tipo cacao	Número de cepas por tipo de cacao	Total de Aislamientos
004A- 027A	Apartado	2	Trinitario y Otros	3	28
			Amelonado	9	
			Angoleta cundeamor	16	
028D-051D	Dabeiba	1	Amelonado	6	26
			Trinitario	20	
052R-067R	Remedios	2	Amazónico	7	13
			No Amazónico	6	
068SE-073SE 261SE-276SE	Segovia	3	Amazónico	3	15
			No Amazónico	1	
076M-097M	Maceo	2	Cundeamor	8	24
			Angoleta	9	
			Amelonado	7	
098P-121P	Puerto Berrío	2	Angoleta	5	22
			Cundeamor	3	
			Amelonado	10	
122N-144N	Nariño	1	Trinitario	10	20
146T-153T 235T-246T	Támesis	1	Trinitario	9	20
154Ta-172Ta	Tarazá	1	Trinitario	12	15
			Amelonado	3	
001SJ-003SJ 174SJ-187SJ 247SJ-250SJ	San Jerónimo	2	Clones	7	20
188V-257V	Valdivia	1	Trinitario	7	20
			Amelonado	3	
210C-282C	Chigorodó	2	Trinitario	6	13
			Amelonado	1	
TOTAL	12	20			236

^a El código asignado a las cepas no corresponde exactamente a números consecutivos debido a que algunas de las cepas aisladas se perdieron en el proceso de purificación.

5.2.1. Selección del sistema óptimo de almacenamiento

Ensayos preliminares destinados a evaluar la viabilidad de las cepas del hongo bajo los tres sistemas de almacenamiento (datos no reportados), indicaron los sistemas de cuadros de papel filtro disecados y bloques de agar extracto de malta en agua ultrapura, como los más apropiados para la preservación del patógeno. En el caso del primero, se logró la recuperación del 100% de las cepas almacenadas en medio agar extracto de malta o en PDA más cáscara de cacao. En el caso de los bloques de agar extracto de malta en agua, la recuperación fue de aproximadamente 80%, cuando éstos se sembraron en los mismos medios.

El sistema de almacenamiento en cajas Petri con agar extracto de malta a una temperatura de 4°C, no fue completamente satisfactorio, lo que se vió reflejado en una tasa de recuperación muy baja y/o en el crecimiento muy retardado o nulo del hongo en medio fresco de agar extracto de malta. Cuando las cajas Petri con el hongo son mantenidas a temperatura ambiente (+/- 25°C), éste creció muy bien en medio fresco y el porcentaje de recuperación de las cepas fue del 100%. Sin embargo, este sistema presenta algunas desventajas tales como envejecimiento, secamiento y pérdida de viabilidad del hongo cuando se hacen subcultivos repetidos.

Estos resultados, indican como mejores alternativas de almacenamiento a largo plazo para *M. roreri*, en primera instancia a los cuadros de papel filtro colonizados con el hongo y en segundo lugar a los bloques de agar extracto de malta en agua ultrapura. Para el almacenamiento a corto plazo, se recomienda el sistema de cajas Petri con medio agar extracto de malta a temperatura ambiente, utilizando solo dos subcultivos por cepa del hongo.

A partir de este cepario se realizaron los estudios de caracterización morfológica, previa evaluación e identificación del medio más adecuado para el crecimiento y

esporulación del hongo. Igualmente, éste cepario fue utilizado en la caracterización molecular y bioquímica del hongo.

5.3. Evaluación de condiciones óptimas de crecimiento y esporulación

5.3.1. Velocidad de crecimiento

En la Figura 3 se aprecia el comportamiento del crecimiento y esporulación de las cepas de *M. roreri* en los cuatro medios de cultivo evaluados. Según se muestra en la Figura 4, no existe un paralelismo entre las líneas que representan el comportamiento del hongo en los diferentes medios, lo cual hace sospechar de una interacción entre los aislamientos evaluados y los medios, interacción que resultó ser estadísticamente significativa en el análisis de varianza (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) de la variable tasa de crecimiento en 12 cepas de *M. roreri* evaluadas en los 4 tipos de medios y su interacción.

ANOVA				
Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
CEPA	11	136	201.42	<.0001
MEDIO	3	136	161.04	<.0001
CEPA*MEDIO	33	136	12.47	<.0001

Lo anterior indica, que la elección del medio de cultivo depende de la cepa a utilizar, sin embargo, debido a que la interacción observada no invierte de manera drástica las posiciones de los medios de cultivo y a que el objetivo de este ensayo preliminar era determinar el medio más adecuado para la caracterización morfológica de aislamientos de *M. roreri* en Antioquia, se optó por identificar el medio que de manera consistente ofreciera las mejores condiciones de crecimiento para la mayoría de las cepas, lo que identificó al medio M1 (AEM), como el más adecuado, seguido del medio M3 (AEM más V8). Ver Tabla 10.

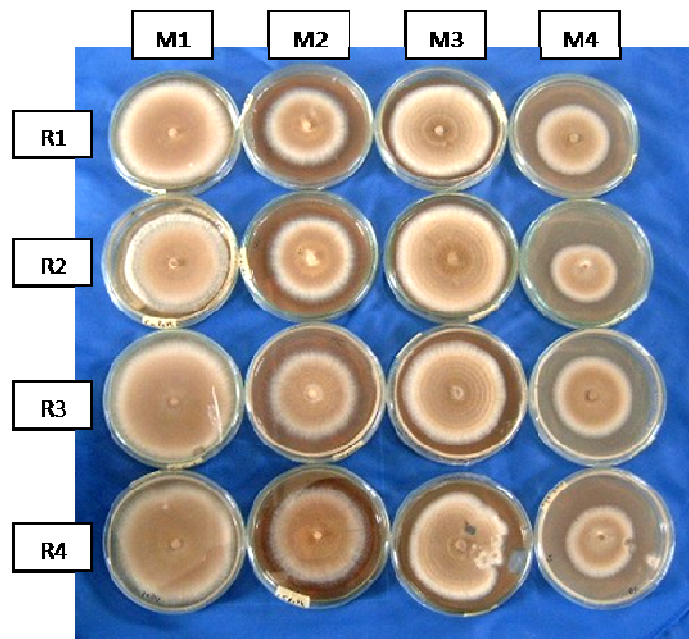


Figura 3. Características del crecimiento y esporulación de *M. roreri* - cepa 077M en los cuatro medios de cultivo evaluados: M1 (AEM); M2 (PDCA); M3 (AEMV8) y M4 (V8M) y las cuatro repeticiones.

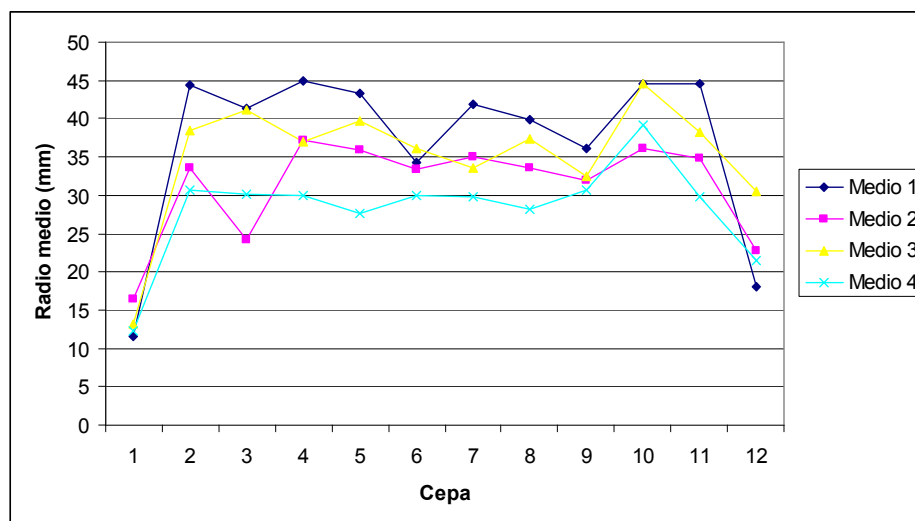


Figura 4. Radio medio del crecimiento de la colonia al día 13 evaluado en 12 cepas de *M. roreri* en cuatro medios de cultivo.

Tabla 10. Radio medio (mm) de crecimiento de la colonia de 12 cepas de *M. royeri* según el medio de cultivo, evaluado en el día 13.

MEDIO	RADIO	GRUPOS
1	41.5134	A
3	37.8430	B
2	33.5813	C
4	30.6124	D

Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), según prueba de LSD

5.3.2. Esporulación del hongo

Para el análisis de la esporulación se encontró una interacción estadísticamente significativa entre los medios de cultivo y las cepas (Tabla 11), interacción que se puede apreciar en el no paralelismo entre las líneas que identifican los medios de cultivo en la Figura 5.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) para los efectos de los cuatro medios de cultivo y su interacción sobre la esporulación de las 12 cepas evaluadas.

ANOVA				
Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
CEPA	11	136	62.91	<.0001
MEDIO	3	136	260.92	<.0001
CEPA*MEDIO	33	136	8.59	<.0001

En esta interacción tampoco se observa que las posiciones de los medios de cultivo cambien de manera drástica, pues el medio de cultivo M3 permanece de manera sistemática por encima de los otros medios. Considerando lo mencionado anteriormente, en relación con el objetivo principal del ensayo preliminar, se optó por identificar el medio que de manera consistente ofreciera las mejores condiciones de crecimiento y esporulación para la mayoría de las cepas evaluadas, considerando que en términos de esporulación, el medio más adecuado era el M3 (AEM más V8), seguido del medio M1 (AEM). Ver Tabla 12.

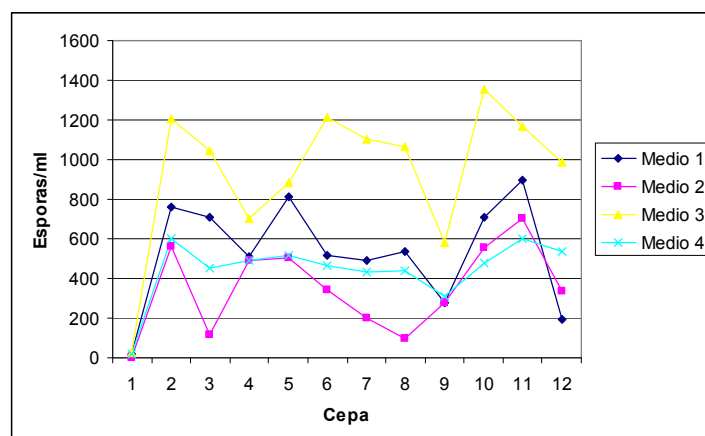


Figura 5. Número medio de esporas de 12 cepas de *M. royeri* en cuatro medios de cultivo al día 13, expresadas como número de esporas/ml por 10^4 .

Tabla 12. Esporulación media (esporas/ml $\times 10^4$) de 12 cepas de *M. royeri* según el medio de cultivo en el día 13.

MEDIO	RADIO	GRUPOS
3	945.67	A
1	534.51	B
4	446.02	C
2	349	D

Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), según prueba de LSD

Para la decisión final acerca del medio a utilizar en la fase de caracterización morfológica de aislamientos de *M. royeri* de Antioquia, se le dio más importancia a la variable esporulación, sin desestimar la importancia de la variable crecimiento. Atendiendo a esto, se seleccionó como el medio más adecuado al Agar extracto de malta más jugo V8 (Medio 3), el cual por su composición permite un crecimiento adecuado del hongo y provee los nutrientes necesarios para promover la fase reproductiva del mismo, aspecto que se vio reflejado en una alta esporulación de la mayoría de las cepas evaluadas en el estudio.

5.4. Evaluación de variabilidad de *M. roreri* mediante características morfológicas

La caracterización morfológica para todas las cepas aisladas se realizó en el medio M3 (AEM suplementado con jugo V8), en esta caracterización se registró para los diferentes aislamientos características de tipo cuantitativo como: tasa de crecimiento, día de esporulación, producción de esporas, tamaño y proporción de esporas según su forma y características de tipo cualitativo como: Tipo de esporulación, borde de la colonia, textura de la colonia y presencia o ausencia de sectores.

El resumen de los resultados para las variables cuantitativas evaluadas en las 236 cepas de *M. roreri* es presentado en la Tabla 13 y Tabla 14. Las variables diámetro de las esporas globosas, día de esporulación y crecimiento radial fueron las más homogéneas con coeficientes de variación de 14.2%, 15.1% y 28%, respectivamente

Tabla 13. Estadística descriptiva de forma global de las variables cuantitativas evaluadas en la caracterización morfológica de *M. roreri*.

Variable	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica	Coefficiente de variación	Varianza (n)
Crecimiento radial (mm)	11,906	44,000	28,396	7,970	0,280	63,260
Producción de esporas (esporas/cajas)	6,878	1232,500	556,684	211,367	0,379	44487,481
Ancho de esporas cilíndricas (μm)	0,000	25,568	6,789	2,633	0,387	6,905
Largo de esporas cilíndricas (μm)	0,000	24,439	12,170	4,053	0,332	16,357
Diámetro esporas Globosas (μm)	3,838	14,437	8,164	1,158	0,142	1,335
Porcentaje esporas Alargadas	0,000	87,500	34,186	20,496	0,598	418,332
Porcentaje esporas Globosas	12,500	100,000	64,568	20,464	0,316	417,016
Día de Esporulación	5,000	12,000	7,677	1,165	0,151	1,351

El análisis de varianza indicó que las variables cuantitativas que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$) fueron tasa de crecimiento,

Tabla 14. Resumen de las principales medidas para las variables cuantitativas evaluadas en la caracterización morfológica de 236 aislamientos de *M. royeri* de Antioquia

Origen	n	CRECIMIENTO RADIAL				PRODUCCION DE ESPORAS (x 10 ⁴)				% ESPORAS GLOBOSAS				% ESPORAS ALARGADAS			
		Me*	Media	Dt (n)*	CV*	Me*	Media	Dt (n)*	CV*	Me*	Media	Dt (n)	CV	Me*	Media	Dt (n)*	CV*
Apartadó	28	23,89	23,93	3,98	0,17	538,75	516,58	166,32	0,32	47,50	48,04	12,33	0,26	52,50	51,96	12,33	0,24
Chigorodó	13	31,78	31,58	6,24	0,20	601,25	560,60	262,97	0,47	50,00	49,04	13,10	0,27	47,50	45,83	12,46	0,27
Dabeiba	26	22,27	22,13	4,39	0,20	507,50	541,21	255,10	0,47	57,50	57,28	20,59	0,36	40,00	40,19	21,85	0,54
Maceo	24	22,84	24,27	6,50	0,27	518,13	526,61	149,34	0,28	71,25	69,79	12,70	0,18	28,75	29,27	13,66	0,47
Nariño	20	31,52	33,19	6,77	0,20	670,63	657,60	210,69	0,32	62,50	59,88	22,82	0,38	37,50	39,00	24,18	0,62
Puerto Berrío	23	19,44	22,84	7,88	0,35	343,75	363,18	151,80	0,42	62,50	63,77	14,04	0,22	35,00	31,88	13,55	0,42
Remedios	13	29,50	28,68	4,13	0,14	722,50	709,04	133,60	0,19	93,33	84,81	17,92	0,21	6,67	15,38	17,79	1,16
Segovia	15	35,03	33,30	6,67	0,20	540,00	533,81	238,25	0,45	67,50	67,33	17,76	0,26	32,50	32,67	17,76	0,54
San Jerónimo	20	39,58	37,59	6,11	0,16	595,00	626,31	189,28	0,30	90,00	86,75	13,47	0,16	10,00	13,25	13,47	1,02
Támesis	20	30,83	28,62	7,64	0,27	556,25	544,55	123,71	0,23	72,50	70,96	16,95	0,24	27,50	29,04	16,95	0,58
Tarazá	15	26,13	27,05	5,44	0,20	692,50	639,75	174,15	0,27	62,50	63,17	12,80	0,20	37,50	36,97	12,71	0,34
Valdivia	20	36,39	35,00	5,89	0,17	556,88	586,43	223,07	0,38	65,00	63,88	24,84	0,39	30,00	35,00	25,15	0,72

Origen	n	ANCHO ESPORAS CILINDRICAS (µm)				LARGO ESPORAS CILINDRICAS (µm)				DIAMETRO GLOBOSAS (µm)				DÍA ESPORULACIÓN			
		Me*	Media	Dt (n)*	CV*	Me	Media	Dt (n)*	CV	Me*	Media	Dt (n)*	CV	Me	Media	Dt (n)*	CV*
Apartadó	28	7,30	7,25	0,67	0,09	14,29	14,10	1,41	0,10	7,76	7,75	0,63	0,08	7,50	7,71	0,57	0,07
Chigorodó	13	6,99	7,59	2,60	0,34	13,08	13,59	3,99	0,29	7,59	7,98	2,21	0,28	7,00	6,92	0,87	0,13
Dabeiba	26	7,27	6,89	1,35	0,20	13,33	12,38	3,01	0,24	7,85	7,72	0,85	0,11	8,00	7,90	0,67	0,08
Maceo	24	7,66	7,31	1,26	0,17	13,35	13,01	1,99	0,15	8,46	8,43	0,67	0,08	8,75	8,60	0,84	0,10
Nariño	20	6,80	6,51	1,73	0,27	12,87	12,43	3,12	0,25	7,74	7,69	0,93	0,12	7,00	7,35	0,45	0,06
Puerto Berrío	23	7,26	7,42	4,31	0,58	13,46	12,25	3,61	0,29	8,08	7,82	1,12	0,14	8,50	8,78	1,44	0,16
Remedios	13	6,27	5,50	2,79	0,51	11,04	9,54	4,90	0,51	8,75	8,82	0,66	0,07	7,50	7,50	0,39	0,05
Segovia	15	7,56	7,42	2,36	0,32	13,69	13,29	3,98	0,30	9,37	9,44	1,06	0,11	7,00	7,13	0,50	0,07
San Jerónimo	20	6,16	5,36	4,34	0,81	12,00	8,48	6,28	0,74	8,49	8,78	1,24	0,14	5,00	6,11	1,64	0,27
Támesis	20	7,10	6,33	2,28	0,36	12,72	11,45	4,08	0,36	8,01	8,12	0,40	0,05	7,00	7,84	1,00	0,13
Tarazá	15	6,69	6,73	0,51	0,08	13,07	13,21	1,00	0,08	7,43	7,42	0,59	0,08	8,00	7,97	0,94	0,12
Valdivia	20	7,53	6,71	3,08	0,46	12,57	11,42	5,16	0,45	8,22	8,60	1,32	0,15	7,00	7,48	0,77	0,10

*Me: Mediana, Dt= Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación.

producción de esporas, largo esporas cilíndricas, diámetro esporas globosas, porcentaje esporas alargadas, porcentaje esporas globosas y día de esporulación, la variable ancho de esporas cilíndricas no presentó diferencias estadísticamente significativas.

Radio de la colonia: los valores medidos a través del radio medio de la colonia del hongo fueron evaluados al día 13 tal como aparece en la tabla 15 y se observó que a pesar de que la variabilidad hace que los grupos de medias se traslapen entre sí, se pueden establecer dos grupos extremos, el primero con las cepas originarias de San Jerónimo, Valdivia, Segovia y Nariño, que se podrían considerar como las de mayor crecimiento, por otro lado estarían las cepas originarias de Maceo, Apartado, Puerto Berrío y Dabeiba, que conformarían el grupo con menor crecimiento (Figura 6).

Día de esporulación: Los valores de esta variable, oscilaron entre el día 5 y el 12. Esta variable tuvo una relación directa con la tasa de crecimiento en la mayoría de los municipios, pero es de destacarse que en la mayoría de los aislamientos la esporulación ocurrió en el día 7 (Figura 6).

Tabla 15. Resultado de la prueba de Tukey ($P < 0.05$) de las Variables crecimiento radial y día de esporulación evaluadas por municipio en la caracterización morfológica de *M. roleri*.

CRECIMIENTO RADIAL			DÍA ESPORULACIÓN		
Categoría	Media estimada	Grupos	Categoría	Media estimada	Grupos
SJ	37,589	a	P	8,775	a
V	35,004	ab	M	8,604	a
SE	33,302	abc	Ta	7,967	ab
N	33,189	abc	D	7,904	ab
C	31,577	abc	T	7,842	ab
R	28,675	bcd	A	7,714	b
T	28,616	bcd	R	7,500	b
Ta	27,046	cd	V	7,475	b
M	24,273	d	N	7,350	b
A	23,926	d	SE	7,133	bc
P	22,842	d	C	6,923	bc
D	22,133	d	SJ	6,108	c

Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de tukey.

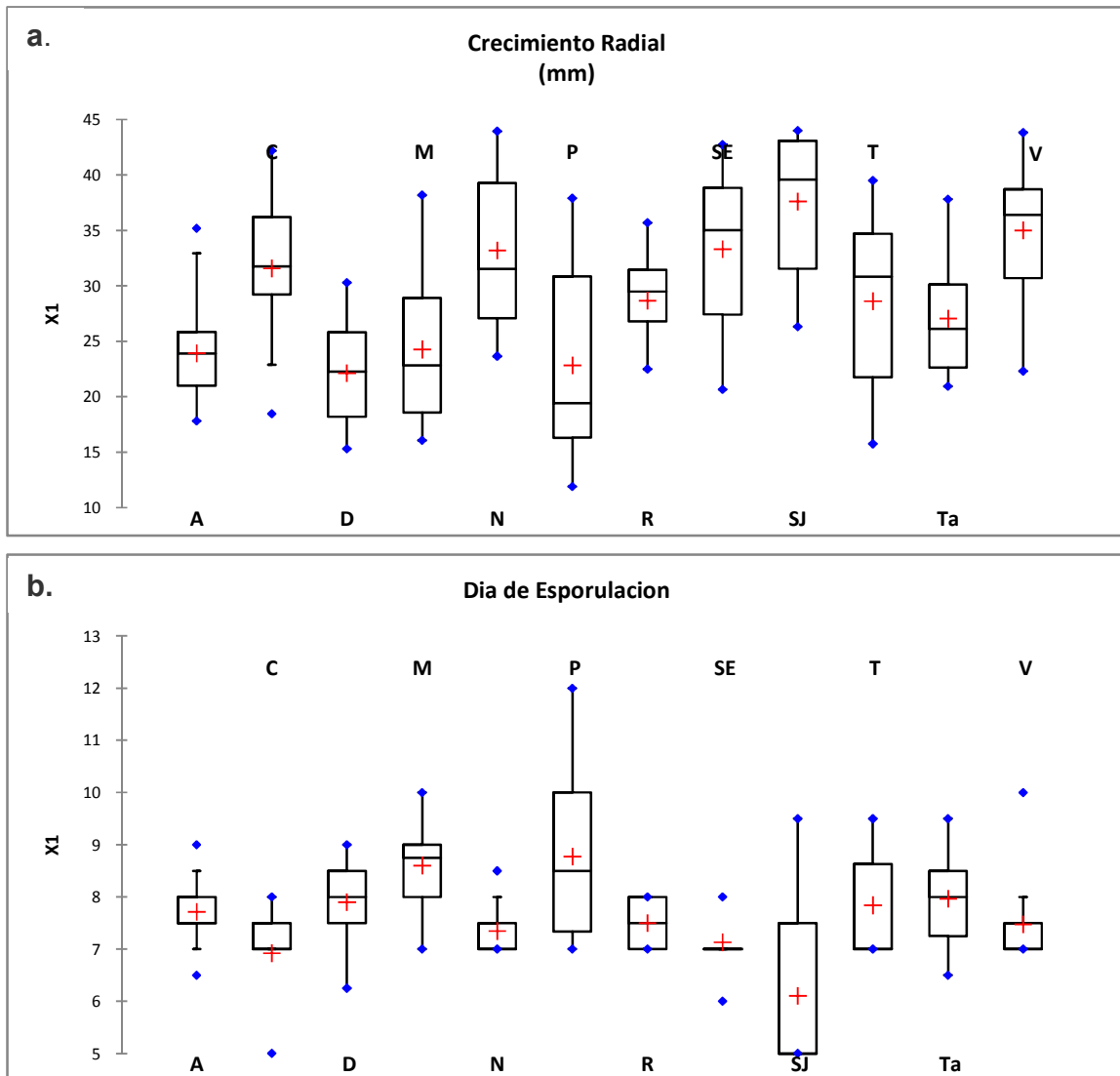


Figura 6. Gráfica de la desviación estándar de las Variables crecimiento radial (a) y día de esporulación (b) evaluadas por municipio en la caracterización morfológica de *M. roleri*

Producción de esporas: esta variable presentó un rango muy amplio oscilando los valores entre 3.63×10^6 y 7.09×10^6 esporas/caja. El municipio de Remedios presentó la mayor producción de esporas 7.09×10^6 esporas/caja y el municipio

con menor producción de esporas fue Puerto Berrío con una producción de 3.63×10^6 esporas/caja (Tabla 16).

Analizando de forma individual los aislamientos de cada municipio con respecto a la producción de esporas, estos formaron dos grupos de alta y baja esporulación, en el primer caso integrado por aislamientos de Valdivia, Segovia, Nariño, San Jerónimo, Tarazá y Remedios y en el segundo caso por aislamientos de Puerto Berrío, los demás municipios se encuentran en un nivel intermedio, lo que demuestra que no hay una tendencia clara en éstos a agruparse de acuerdo a su sitio o zona de origen (Figura 7).

Tabla 16. Resultado de la prueba de Tukey ($P < 0.05$) de la Variable producción de esporas evaluada por municipio en la caracterización morfológica de *M. roreri*.

PRODUCCIÓN DE ESPORAS		
Categoría	Media estimada	Grupos
R	709,038	a
N	657,600	a
Ta	639,750	a
SJ	626,313	a
V	586,425	a
C	560,596	ab
T	544,550	ab
D	541,212	ab
SE	533,809	ab
M	526,615	ab
A	516,580	ab
P	363,185	b

Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.

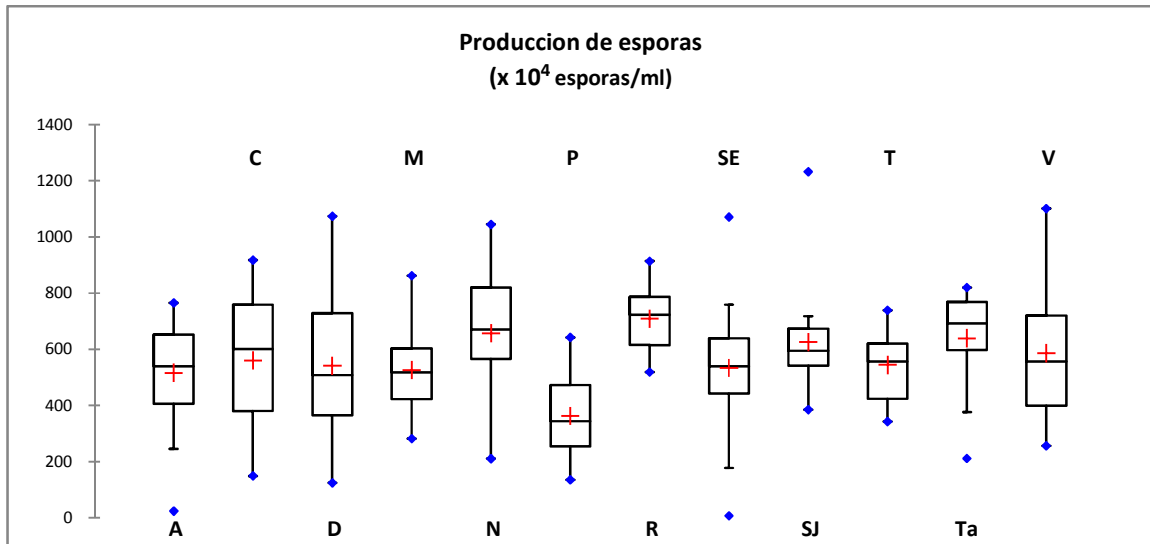


Figura 7. Gráfica de la desviación estándar de la Variable producción de esporas evaluada por municipio en la caracterización morfológica de *M. royeri*.

Porcentaje de esporas Globosas: entre municipios esta variable osciló en un rango de 48.04% y 86.75% y esporas alargadas entre 13.25% y 51.96%. Los municipios con mayor porcentaje de esporas globosas fueron San Jerónimo 86.75% y Remedios 84.81% y en menor proporción Apartado 48.04%. Los municipios con mayor porcentaje de esporas alargadas fueron Apartado 51.96% y Chigorodó 46% y en menor proporción San Jerónimo 13.25% (Tabla 17).

Tabla 17. Resultado de la prueba de Tukey ($P < 0.05$) de las Variables porcentaje de esporas alargadas, porcentaje de esporas globosas, ancho de espora cilíndrica y largo espora cilíndrica evaluadas por municipio en la caracterización morfológica de *M. roreri*.

% Esporas Alargadas			% Esporas Globosas		
Categoría	Media estimada	Grupos	Categoría	Media estimada	Grupos
A	51,964	a	SJ	86,750	a
C	45,833	ab	R	84,808	a
D	40,192	ab	T	70,958	ab
N	39,000	ab	M	69,792	ab
Ta	36,967	abc	SE	67,333	abc
V	35,000	abc	V	63,875	bcd
SE	32,667	bc	P	63,768	bcd
P	31,884	bc	Ta	63,167	bcd
M	29,271	bcd	N	59,875	bcd
T	29,042	bcd	D	57,276	bcd
R	15,385	cd	C	49,038	cd
SJ	13,250	d	A	48,036	d

Ancho Espora Cilíndrica			Largo Espora Cilíndrica		
Categoría	Media estimada	Grupos	Categoría	Media estimada	Grupos
C	7,594	a	A	14,098	a
P	7,420	a	C	13,594	ab
SE	7,417	a	SE	13,288	ab
M	7,313	a	Ta	13,209	ab
A	7,248	a	M	13,014	ab
D	6,895	a	N	12,427	ab
Ta	6,730	a	D	12,376	ab
V	6,708	a	P	12,247	abc
N	6,509	a	T	11,451	abc
T	6,332	a	V	11,422	abc
R	5,498	a	R	9,536	bc
SJ	5,362	a	SJ	8,479	c

Diámetro de las esporas globosas: los valores de la variable oscilaron en un rango de 3.8 μm y 14.4 μm , el municipio que presentó un promedio de esporas con un menor diámetro fue Tarazá 7.42 μm y el de mayor diámetro Segovia 9.44 μm .

Con esta variable los reagrupamientos por medio de la prueba de Tukey no pudieron realizarse porque las diferencias no fueron significativas en este caso particular.

La mayoría de las cepas tiende a producir esporas de tipo globoso, sin embargo, se encuentra de los dos tipos de esporas (Figura 8)

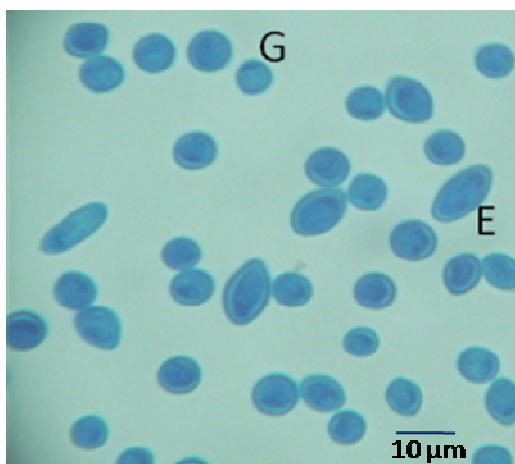
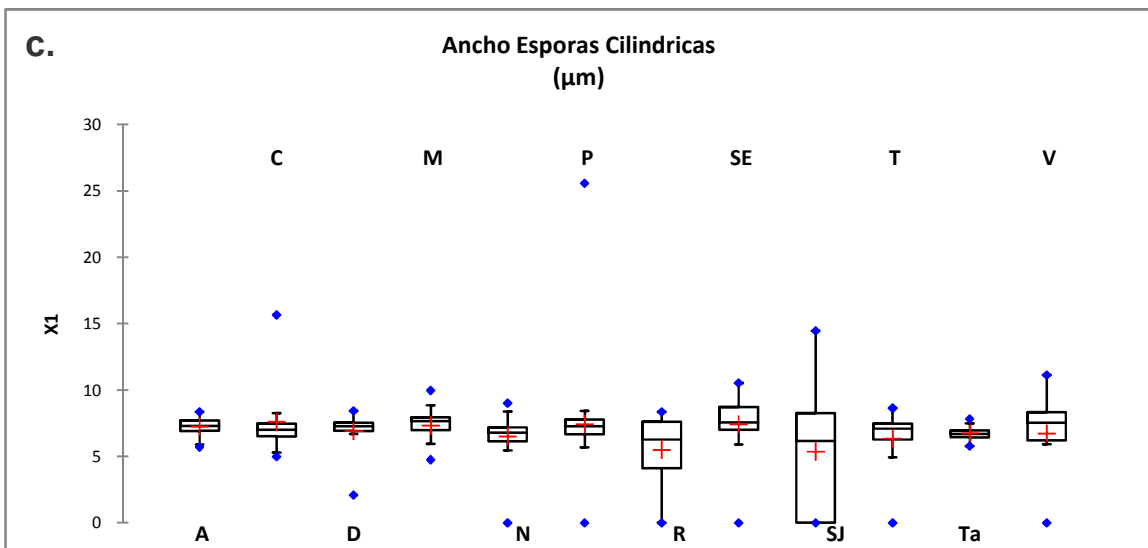
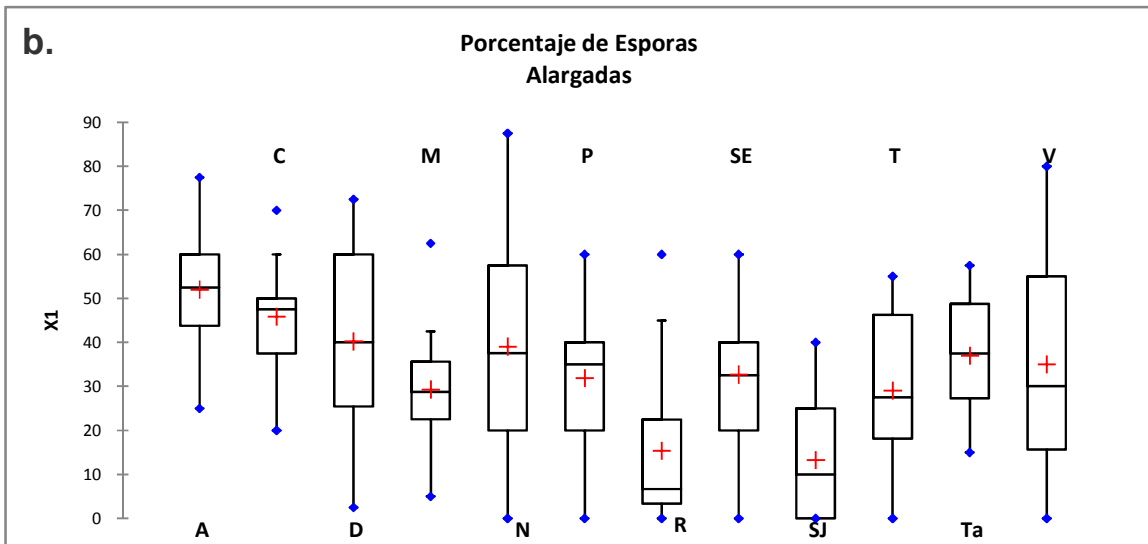
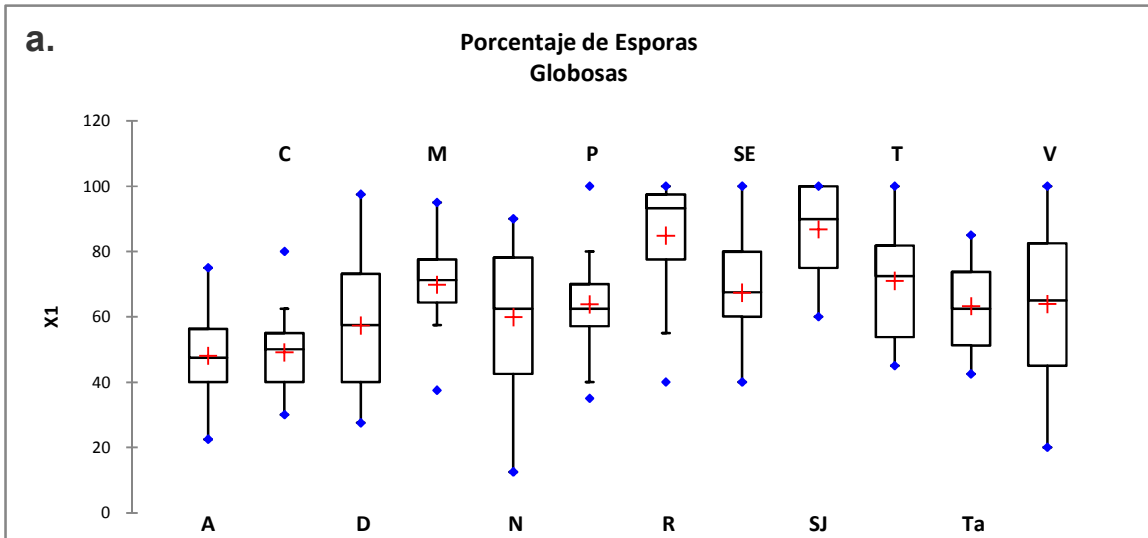


Figura 8. Tipos de esporas encontrados en *M. roreri*, en donde se destaca una mayoría de tipo globoso (G) y pocas de tipo ovoide o elipsoide (E). Microfotografía con una magnificación 40x.

Tamaño de las esporas alargadas: los valores del ancho de las esporas oscilo entre 2.09 y 25.6 μm , el municipio que presentó un promedio de esporas con un mayor diámetro fue Chigorodó 7.59 μm y un menor diámetro fue San Jerónimo 5.36 μm . Los valores del largo de las esporas oscilaron entre 3.23 y 24.4 μm , el municipio que presentó un promedio de esporas con un mayor diámetro fue Apartado 14.1 μm y el de menor diámetro fue San Jerónimo 8.48 μm . La descripción estadística de las variables Ancho de esporas alargadas, largo de esporas alargadas y diámetro de esporas globosas, se observa en la Figura 9 y Tabla 17.



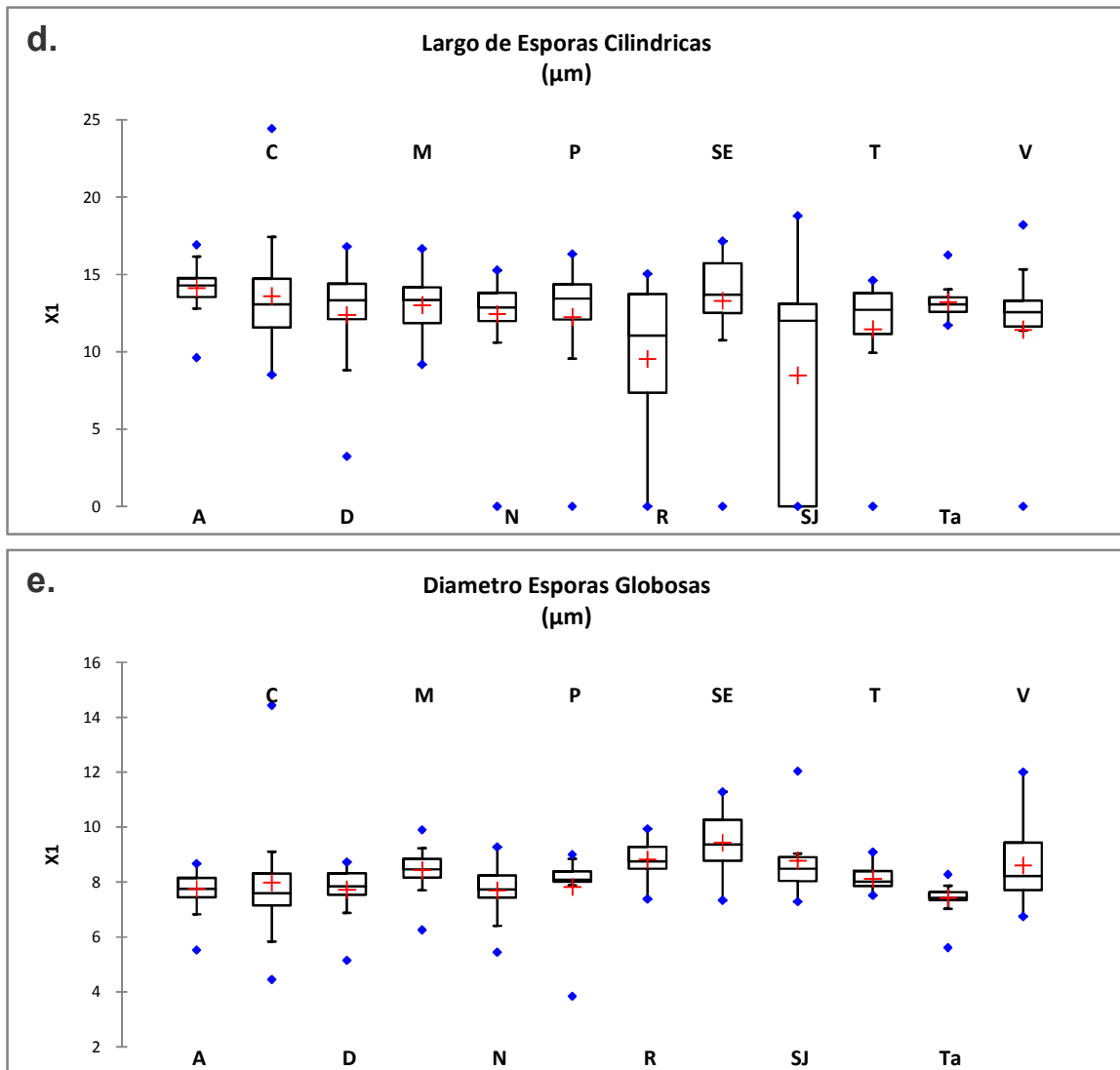


Figura 9. Gráfica de la desviación estándar de las Variables porcentaje de esporas globosas (a) y porcentaje de esporas alargadas (b), ancho de espora cilíndrica (c) y largo de espora cilíndrica (d) y diámetro de espora globosa (e), evaluadas por municipio en la caracterización morfológica de *M. roreri*.

Características de la colonia: La textura de colonia predominante fue la afelpada (79.3%) tipo 0, seguida de la textura polvosa tipo 1 con un 16%, mientras que las texturas estriadas tipo 2 y algodonosa tipo 3 se presentaron en frecuencias mínimas de 3.4% y 1.3% respectivamente. (Tabla 18 y Figura 10).

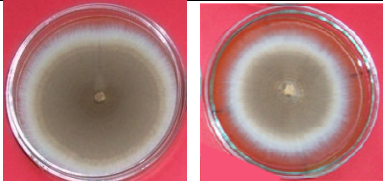
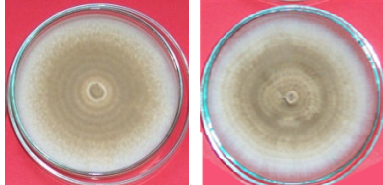

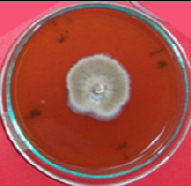
Código de la cepa	Imagen de la colonia descrita	Descripción
004A, 079M1.		Textura afelpada, esporulación uniforme, borde plumoso, tonalidad café (7.5YR 5/3).
086M2, 115P.		Textura polvosa, esporulación con anillos centrales, borde entero, tonalidad café claro (7.5YR 6/3)
170 Ta.		Textura afelpada, esporulación con anillos en toda la colonia, borde plumoso y tonalidad café (7.5YR 5/3)
081M2.		Textura estriada, esporulación uniforme, borde ondulado y tonalidad café claro (7.5YR 6/3).

Figura 10. Características macroscópicas de *M. roreri* en medio AEM + V-8.

Tabla 18. Estadística descriptiva de las variables cualitativas evaluadas en la caracterización morfológica de *M. roreri*.

Variable	Categorías	Frecuencias	%
Tipo de Esporulación	0	143	60,34
	1	75	31,65
	2	13	5,48
	3	6	2,53
Borde de la Colonia	0	20	8,44
	1	8	3,38
	2	209	88,18
Textura de la Colonia	0	188	79,32
	1	38	16,03
	2	8	3,38
	3	3	1,27
Sectores	0	204	86,08
	1	33	13,92

Las colonias tienden a presentar una esporulación de color café, el cual en algunos casos tiende hacia una tonalidad más clara u oscura dependiendo del aislamiento. De acuerdo al sistema Munsell, la mayoría de los aislamientos presentó matices amarillo – rojizos y tonalidades café (C) café claro (CC) y café pálido (CP) (Figura 10). El color predominante fue el café (37.97%) seguido del café pálido (19.83 %) y el café claro (17.72 %), los otros colores se presentaron en frecuencias mucho menores (Tabla 19).

Tabla 19. Frecuencias absolutas y relativas para la variable color de esporulación observada en las cepas de *M. royeri*.

Categoría	Frecuencia por categoría	Frecuencia relativa por categoría (%)
CA (Café Amarillento)	2	0,84
CCA (Café Claro Amarillento)	9	3,8
CR (Café Rojizo)	2	0,84
CMP (Café muy Pálido)	22	9,28
B (Blanco)	2	0,84
CC (Café Claro)	42	17,72
A (Amarillo)	1	0,42
C (Café)	90	37,97
CRC (Café Rojizo Claro)	2	0,84
CO (Café Oscuro)	5	2,11
GR (Gris Rosáceo)	3	1,27
CP (Café Pálido)	47	19,83
BR (Blanco Rosáceo)	1	0,42
R (Rosado)	9	3,8

La mayoría de las cepas presentaron esporulación uniforme tipo 0 (60.34%), seguido de cepas con anillos en toda la colonia esporulación tipo 1 (31.65%), los de menor proporción fueron uniforme con anillos terminales esporulación tipo 2 (5.48%) y la uniforme con anillos centrales tipo 3 (2.53%). En algunas cepas sobre todo del municipio de Apartado se observaron colonias amarillas que no producían esporulación, con características de alta adhesión al medio, difíciles de desprender.

En cuanto a la variable borde de la colonia se observó que el borde mas representativo fue el plumoso tipo 2 (88.18%), mientras que el borde uniforme tipo 0 y ondulado tipo 1, se presentaron solo en un 8.44% y 3.38% respectivamente. En lo relacionado a la presencia o no de sectores en la colonia, los resultados indican que en la mayoría de los casos éstos están ausentes (86.08%), esta tendencia fue observada por igual para las cepas de todos los municipios. Según observaciones realizadas en laboratorio, los sectores normalmente tienden a presentarse a partir del día 13, siendo más notorios a medida que envejecen las colonias del hongo (Tabla 18 y Figura 11).

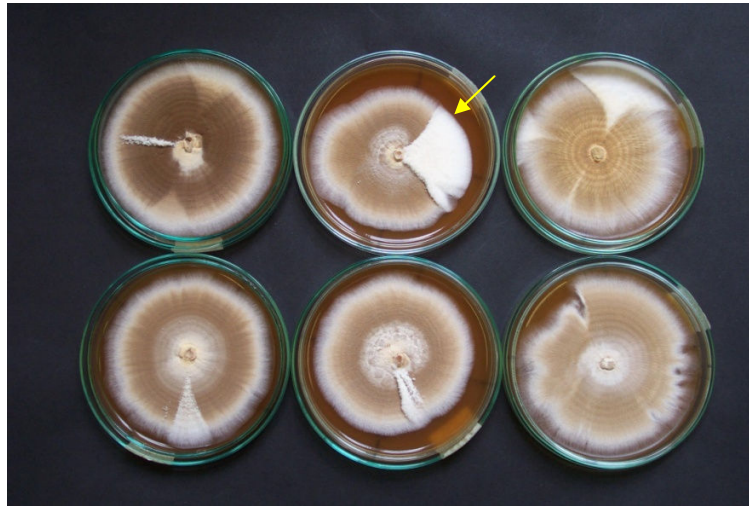


Figura 11. Colonias de *M. roleri* mostrando la presencia de sectores de diferente forma y tamaño.

El análisis de componentes principales realizado sobre las variables morfológicas cuantitativas evaluadas en los aislamientos de *M. roleri* no permitió la identificación de grupos definidos, indicando como la mayoría de los aislamientos se aglomeraron en un solo grupo, aunque se encuentran individuos aislados del grupo principal, este grupo se encuentra representado por individuos de todos los municipios (Figura 12). De la variabilidad total el primer componente explicó un 95.18%, presentándose como el eje principal, los otros nueve ejes explicaron una variabilidad entre un 2% y 0.04%.

Las variables que más contribuyeron a explicar la variación en el primer componente fueron: Diámetro de esporas globosas y día de esporulación. Las variables ancho de esporas alargadas y crecimiento radial aportaron muy poco a la variabilidad en los 8 ejes. Por lo tanto la variable día de esporulación estuvo directamente relacionada con las variables cuantitativas relacionadas con las esporas.

El grupo principal se subdivide en 2 grupos, en el primero (G1) se encuentran la mayoría de los individuos, algunos se alejan del grupo G1, los cuales corresponden a individuos de los municipios de Puerto Berrío (120P) y Chigorodó (214C y 222C).

En el segundo grupo (G2) se encuentran aislamientos de los municipios de San Jerónimo (184SJ, 179SJ, 175SJ, 187SJ1, 180SJ, 1SJ, 250SJ, 187SJ2 y 182SJ1), Valdivia (252V, 201V2 y 207V), Remedios (064R y 062R1), Nariño (130N), Segovia (269SE2), Támesis (240T y 243T) y Puerto Berrío (104P1), predominando los aislamientos de San Jerónimo en el eje de la variable diámetro de esporas globosas como se mencionó anteriormente.



Figura 12. Representación gráfica del análisis de componentes principales de la caracterización morfológica de variables de *M. royeri*. G1: grupo principal y G2: grupo secundario.

El análisis de coordenadas principales permite evaluar tanto variables cualitativas como cuantitativas. Los resultados indican el bajo nivel de variación de la población antioqueña del hongo. Según estos, las dos primeras dimensiones explican el 28.29% de la variación total. Ambas coordenadas muestran un poder discriminante similar, relacionado por la similitud en el porcentaje que explica cada eje (16.07% y 12.22%) de la variación. En la Figura 13 sobre el espacio tridimensional se refleja una nube de puntos que muestra como la variabilidad genética se distribuye homogéneamente en la población, y no se presenta ninguna diferenciación o agrupamiento por cepa, lugar de origen o por alguna característica morfológica en particular.