UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L) por su respuesta de defensa a *Moniliophthora roreri* y su polimorfismo de SSRs

Darwin Hernando Martínez Botello

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitopatología
Sede Bogotá
2015

Caracterización de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L) por su respuesta de defensa a *Moniliophthora roreri* y su polimorfismo de SSRs

Darwin Hernando Martínez Botello
Código: 07790939

Director
Oscar arturo oliveros garay
Director

Subdirectora
Sandra Melo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitopatología
Sede Bogotá
2015

Resumen

La moniliasis del Cacao producida por *Moniliophthora roreri*, es un hongo basidiomiceto considerado como la enfermedad potencial más limitante de la producción en el cultivo en Colombia. La respuesta de defensa frente a su infección actualmente es considerada como susceptible en todos los materiales comerciales utilizados para el cultivo en el mundo. En Colombia, recientemente se han identificado algunos materiales regionales con un comportamiento fitosanitario en campo favorable a la infección del patógeno, sin embargo la respuesta de defensa frente a la infección aún no se conoce.

Por otra parte, la falta de una huella genómica para la identificación de los cultivares regionales colombianos ha ocasionado problemas de identificación en los jardines clónales que actualmente existen en el país, existiendo algunos errores en el etiquetado.

El presente estudio se basó en la evaluación de resistencia genética y molecular de 24 cultivares de *Theobroma cacao* L. Se dividió en tres capítulos, en el primero se realizó una revisión bibliográfica de las principales investigaciónes asociadas la Moniliasis del Cacao; en el segundo, se determinó la respuesta de defensa de 13 materiales frente a la infección por *M. roreri,* 8 de ellos regionales colombianos y 5 introducidos. Finalmente, en el tercer capítulo se determinó la huella molecular de los 24 cultivares de *Theobroma cacao* L, 18 de ellos regionales colombianos y 6 introducidos.

La respuesta a la infección por *M. roreri* se determinó mediante inoculaciones artificiales dirigidas del patógeno a una concentración de $1x10^5$ esp/ml en frutos de 75 días de edad, se utilizó una cámara húmeda que proporcionó las condiciones adecuadas para la germinación e infección del patógeno. La respuesta de defensa se determinó a través de la cuantificación del daño midiendo la severidad externa e interna, variables que fueron cuantificadas por grados de la infección según escala propuesta por (Phillips *et al*., 2005).

La generación de la huella molecular se determinó a través de la evaluación de polimorfismos genéticos proporcionados por 19 marcadores moleculares, 10 de ellos asociados a la diversidad genética y 9 identificados por su asociación a características cuantitativas QTLs de resistencia a *M. roreri.* Los 9 marcadores moleculares permitieron la agrupación de los materiales según su respuesta a la infección por *M. roreri* determinada en el segundo capítulo. Según el parámetro molecular Fst= 0,157, se encontraron poblaciones diversas con formación de subpoblaciones y conglomerados. Se observó cómo los materiales FEC 2 y FSV 155 se alejan genéticamente de los demás cultivares evaluados, seguramente por sus características de resistencia (FEC 2) y por su origen criollo (FSV 153).

El cultivar FEC 2 por sus características de resistencia genética a Monilia se postula como material parental para un proceso de mejoramiento genético que busque la identificación de QTLs asociados a la resistencia genética a Monilia, con lo cual a un futuro se podrán iniciar trabajos de búsqueda y selección de genes de resistencia asociados a la enfermedad. Además se postula como el material vegetal base para el diseño de modelos de resistencia a Monilia ya sea en siembra nueva o cambio de copa.

Palabras clave: Fitopatología, Resistencia, *Moniliophthora roreri*, Moniliasis, Cacao

Abstract

Cocoa moniliasis produced by *Moniliophthora roreri*, is a basidiomycete fungus considered the most limiting crop production in Colombia potential disease. The defense response against the infection is now considered as susceptible in all commercial materials used for cultivation in the world. In Colombia, have recently identified some regional materials with a plant behavior conducive to pathogen infection field, however the defense response against infection is not yet known.

Moreover, the lack of a genomic fingerprint for identifying regional cultivars Colombian identification has caused problems in clonal gardens that currently exist in the country, there are some errors in the labeling.

This study was based on the assessment of genetic and molecular resistance of 24 cultivars of *Theobroma cacao* L. is divided into three chapters, the first a literature review of the main research associated Moniliasis Cocoa was performed; in the second, the defense response of 13 materials against infection by *M. roreri* including 8 regional Colombians to 5 introduced was determined. Finally, in the third chapter the molecular footprint of 24 cultivars of *Theobroma cacao* L, including 18 regional Colombians and 6 introduced was determined.

The response to infection by *M. roreri* artificial inoculation was determined by targeting the pathogen at a concentration of 1x105 sperm / ml in fruits of 75 days of age, which provided a humid chamber suitable for germination of the pathogen and infection conditions used . The defense response was determined by quantifying the damage by measuring the external and internal severity variables were quantified by degrees of infection by scale given by (Phillips et al., 2005).

Generating the print molecule was determined through the assessment of genetic polymorphisms provided by molecular markers 19, 10 which are associated with genetic diversity and 9 identified by its association with quantitative characteristics QTLs *M. roreri* resistance. 9 molecular markers allowed the grouping of materials according to their response to infection with *M. roreri* given in the second chapter. According to the molecular parameter Fst = 0.157, diverse populations and subpopulations forming clusters were found. He watched the FEC 2 and FSV 155 are genetically materials away from the other cultivars evaluated, probably for its durability (FEC 2) and its Creole origin (FSV 153).

The FEC 2 cultivar characteristics of genetic resistance to Monilia is postulated as parental material for a breeding process that seeks to identify QTLs associated with genetic resistance to Monilia, which to a future work may initiate search and selection of genes associated with disease resistance. Also postulated as vegetable material base for the design of models of resistance to Monilia either reseeding or changing glass.

Keywords: Plant pathology, Endurance, *Moniliophthora roreri,* Moniliasis, Cacao

Contenido

Pág.

Resumen ..... **V**

Lista de figuras ..... **IX**

Lista de tablas ..... **XII**

Introducción **1**

1. Estado del arte **3**
1.1 Origen e importancia del cultivo 3
1.2 Las principales plagas y la Moniliasis del Cacao. 6
1.3 Taxonomía y Rango de hospederos 13
1.4 Etiología del agente causal 13
1.5 Ciclo de vida 15
1.6 Distribución geográfica 18
1.7 Manejo Integrado de la Enfermedad 19
1.8 Manejo Químico, biológico y cultural 20
1.9 Control genético 22
1.10 Mecanismos de defensa en plantas 26
1.11 Respuesta de Hipersensibilidad - HR 31
1.12 Resistencia sistémica Inducida 32
1.13 Resistencia sistémica adquirida 32
1.14 Interacción gen a gen 34
1.14.1 Proteínas efectores o *Avr* y de Resistencia 34
1.14.2 Modelos de interacción 36
1.14.3 Señalización durante las respuestas de defensa en plantas 38
1.15 Susceptibilidad encendida por efectores 39
1.16 Silenciamiento génico 40
1.17 Estudios moleculares sobre el patógeno. 41
1.18 Importancia de los marcadores moleculares 42
1.19 Electroforesis capilar 50

2. Respuesta de cultivares de *Theobroma cacao* L a la infección por *Moniliophthora roreri*. **53**
2.1 Materiales y métodos 55
2.2 Localización 55
2.3 Preparación de los árboles y polinizaciones 57
2.4 Preparación del inóculo y pruebas de patogenicidad 59
2.5 Determinación de la respuesta a la infección por *Moniliophthora roreri* 60
2.6 Evaluación y variación estacional del comportamiento de *M. roreri* en campo 61
2.7 Resutados 61
2.8 Evaluacion y variación estacional del comportamiento de *M. roreri* en campo 61
2.9 Determinación de la respuesta a la infección por *Moniliophthora roreri* 63
2.10 Analisis comparativo de los cultivares FEC 2 y ICS 95 con TSH 565 a la infección de *Moniliophthora roreri* 71

2.11 Aparición de síntomas y signos de *M. roreri*....80
2.12 Discusión....81

3. Evaluación de polimorfismos SSR en materiales regionales introducidos con énfasis en resistencia genética a monilia....89
3.1 Materiales y métodos....90
3.1.1 Localización....90
3.1.2 Toma de muestras....90
3.1.3 Extracción y cuantificación de ADN....91
3.1.4 Análisis de Microsatelites SSR....92
3.1.5 Estimación de las distancias genéticas....94
3.1.6 Electroforesis capilar....96
3.1.7 Análisis de datos moleculares....98
3.1.8 Numero de alelos por locus....99
3.1.9 Heterocigosidad esperada (He)....99
3.1.10 Heterocigosidad observada (Ho)....99
3.1.11 Índice de contenido polimórfico (PIC)....99
3.1.12 Análisis de varianza molecular (AMOVA)....100
3.1.13 Comparacion con la base de datos ICGD....101
3.2 Resultados....102
3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN....102
3.2.2 Análisis de Microsatélites SSR....104
3.2.3 Análisis de datos moleculares....107
3.3 Comparación con la base de datos ICGD y huella molecular....113
3.3.1 Análisis de componentes principales....117
3.3.2 Análisis de distancias genéticas....121
3.3.3 Distancias entre poblaciones....121
3.3.4 Distancias entre individuos utilizando marcadores moleculares asociados a QTLs de resistencia a *M. roreri*....124
3.4 Discusiones....126
3.4.1 Analisis de microsatélites....126
3.4.2 Análisis de datos moleculares....127
3.4.3 Análisis de componentes principales....129
3.4.4 Distancias entre poblaciones....130
4. Conclusiones y recomendaciones....133

Anexos....133

Bibliografía....133

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Producción mundial de cacao en grano durante los últimos 5 años en miles de toneladas. Fuente: Federación Nacional de Cacaoteros 2013. German Cocoa and Chocolate Foundation, ICCO, Quarterly Bulletin of Statistics, 2013, Naciónal de Chocolates Grupo Nutresa, 2013 5
Figura 2. Tendencias en la producción de Cacao mundial desde 1830 a 2013.Fuente: Tomado de Ploetz (2006); Bradeau (1969); FAOSTAT (2006); Lanaud et al., (2003) y Fedecacao (2013) y modificado por el autor.....11
Figura 3. Principales enfermedades de Cacao en el Mundo.Fuente: Tomado de P. van Grinsven, Mars, Inc. Citado por Hebbar (2007) y adaptado por el autor. 11
Figura 4. Ciclo de vida de la enfermedad. Fuente: Diseñado por Darwin Martínez; imagen de Darwin Martinez. 15
Figura 5. Síntomas y signos característicos de una infección por M. roreri en frutos de Cacao, Theobroma cacao L. 16
Figura 6. Síntomas y signos atípicos de una infección por M. roreri en frutos de Cacao, Theobroma cacao L. 17
Figura 7. Control biológico natural de M. roreri en frutos de Cacao (Theobroma cacao L). Fuente: Aránzazu et al., 2010.....21
Figura 8. Modelo de siembra con resistencia a M. roreri en el municipio de san Vicente de Chucuri en Santander. Fuente: Tomado de Aránzazu 2013. 26
Figura 9. Mecanismos de resistencia en plantas. Fuente. Ingle et al., 2010. 29
Figura 10. Modelo Zig-Zag propuesto por Jones and Dangl, 2006. 30
Figura 11. Vías de señalización durante las respuestas de defensa en plantas. Fuente: Tomado de López, 2007.....34
Figura 12. Ubicación geográfica de la granja Villa Mónica en San Vicente de Chucuri de 2014. Fuente: Google earth.....56
Figura 13. Proceso de inoculación artificial con el método del sensidisco.A) Suspensión; B). Demarcación de área a inocular; C). Aplicación del sensidisco; D). Envoltura con vinipel y cámara húmeda. Fuente. Autor 60
Figura 14. Comportamiento fitosanitario del clon FEC2, en las regiones de Santander, Huila y Arauca.....62
Figura 15. Ubicación geográfica de las parcelas demostrativas. 63
Figura 16. Datos longitudinales para las variables de Porcentaje de infección por Monilia, Severidad Interna y Externa en el tiempo.....69

Figura 17. Índice de severidad interna y externa del material FEC 2, a la novena semana después de la inoculación con 10^5 esp/ml de M. roreri, durante 2 años de evaluación en San Vicente de Chucuri. Año 2013. 76
Figura 18. Índice de severidad interna y externa de cultivares CAUC 43, CCN 51 y CAUC 39, regionales de Cacao a la novena semana después de la inoculación con 105 esp/ml de M. roreri. 78
Figura 19. Índice de severidad interna y externa de cultivares regionales de Cacao a la novena semana después de la inoculación con 105 esp/ml de M. roreri. 79
Figura 20. Rango de alelos (pb) esperado de cada microsatélites con el color del fluorocromo con que se marcó. 97
Figura 21. Size standard LIZ 600. 98
Figura 22. Electroforesis de verificación de extracción de ADN de genotipos regionales con el Kit Quiagen en gel de Agarosa al 0.8% teñida con bromuro de Etidio. 102
Figura 23. Electroforesis de cuantificación de ADN en gel de Agarosa. Del carril 5 al 12 se encuentran los cultivares: FEC 2, ICS 95, CAUC 43, CAUC 39, FLE 2, CCN 51, ICS 39, FSV 155. 103
Figura 24. Electroforesis de verificación en gel de agarosa al 2.5%. 104
Figura 25. Electroforesis de verificación en gel de agarosa al 2.5%, con una amplificación en Multiplex.Nota: El producto amplificado en Multiplex corresponde a ADN de CAUC 39 FEC 2 con 4 microsatélites amplificados según su temperatura de anillamiento. 106
Figura 26 Electroferograma detectado por los microsatélites MTCcIR 10 y MTCcIR 168 evaluados para el cultivar FEC 2. 106
Figura 27. Gráfico de Análisis de Componentes principales según los 10 marcadores microsatélites asociados a la diversidad genética de Theobroma Cacao L. 118
Figura 28. Grafico de Analisis de Componentes principales segun 9 marcadores microsatelites asociados a QTLs de resistencia a M. roreri. 119
Figura 29. Árbol de distancias individuales DSA construido según el método de estimación de distancias geneticas Neighbor Joining (NJ). 123
Figura 30. Árbol de distancias individuales DSA construido según el método de estimación de distancias geneticas Neighbor Joining (NJ) y utilizando los marcadores moleculares microsatélites asociados a QTLs de resistencia a M. roreri. 126

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Principales enfermedades de Cacao. 7
Tabla 2. Genes de resistencia y avirulencia clonados en diferentes Patosistemas. 35
Tabla 3. Genes de resistencia y avirulencia clonados en diferentes Patosistemas. 37
Tabla 4. Características más importantes de los diferentes tipos de marcadores moleculares. 45
Tabla 5. Utilidad y aplicaciones de los marcadores moleculares en Cacao. 46
Tabla 6. Características principales básicas de los cultivares de Cacao (Theobroma cacao L), evaluados 57
Tabla 7. Escala para la clasificación de materiales de cacao por su respuesta a M. roreri.59
Tabla 8. Promedio de la severidad interna y externa a la 9a semana de inoculación, en San Vicente de Chucurí, año 2013. 64
Tabla 9. Porcentaje de frutos de Cacao con Moniliasis según los grados de severidad externa por cultivar a la novena semana de infección con 10^5 esporas/ml de Moniliophthora roreri.....66
Tabla 10. Porcentaje de frutos de Cacao con Moniliasis según los grados de severidad interna por cultivar a la novena semana de infección con 10^5 esporas/ml de Moniliophthora roreri.....67
Tabla 11. Porcentaje de infección de Moniliasis en cultivares regionales e introducidos de cacao a la novena semana de inoculación con 105 esporas/ml de Moniliophthora roreri. 70
Tabla 12. Severidad externa, interna e incidencia de Moniliasis en el cultivar FEC 2 a nueve semanas de inoculación artificial con 105 esporas/ml de Moniliophthora roreri.....71
Tabla 13. Severidad externa, interna e incidencia de Moniliasis en el cultivar ICS 95 a nueve semanas de inoculación artificial con 105 esporas/ml de Moniliophthora roreri.....72
Tabla 14. Severidad externa, interna e incidencia de Moniliasis en los cultivares ICS 95 y FEC 2 a nueve semanas de inoculación artificial con 10^5 esporas/ml de Moniliophthora roreri.....73
Tabla 15. Porcentaje de frutos de los cultivares FEC 2 e ICS 95, en cada grado de severidad externa, a nueve semanas después de la inoculación artificial con 105 esporas/ml de Moniliophthora roreri, durante cuatro repeticiones en San Vicente de Chucuri-Santander 74
Tabla 16. Clasificación de los cultivares después de 4 pruebas de resistencia genética en campo. 75
Tabla 17. Nombre, secuencias, temperatura de anillamiento y marcaje con fluorocromos de cada uno de los microsatélites usados. 93

Tabla 18. Microsatelites encontrados para los QTLs y sus respectivos grupos de ligamiento. 96
Tabla 19. Resultados obtenidos de la cuantificación midiendo la absorbancia en un equipo Nanodrop de los cultivares regionales FEC 2, FLE 2, FSV 153, FSV 41 FSA 13 y CR 46. 103
Tabla 20. Microsatélites amplificados del ADN CAUC 39 según su temperatura de anillamiento. 105
Tabla 21. Numero de alelos observados, rango de tamaño de alelos esperados, rango de tamaño de alelos observados y PIC de los 19 locus evaluados. 108
Tabla 22. Alelos identificados (bp) de los microsatélites amplificados en los diferentes cultivares de cacao criollo evaluados. 109
Tabla 23. Parámetros genéticos para los marcadores microsatélites. 111
Tabla 24. No de Muestras, heterocigosidad observada y esperada según las poblaciones evaluadas. 112
Tabla 25. Rangos de interpretación (Wright, 1965). 113
Tabla 26. Comparación entre los alelos obtenidos en el presente capitulo y los reportados por Zhang, D., 2010b en el banco Internacional de Germoplasma ICGD. 114
Tabla 27. Huella molecular de los cultivares regionales colombianos evaluados. 116

Introducción

El Cacao ha sido cultivado en centro América, especialmente por los Mayas desde hace más de 1500 años. En américa del sur, su uso se dio inicialmente en Brasil, de donde fue llevado desde 1.778 de forma comercial al Africa por los portugueses; solo a partir de 1890 después de cultivarse en el continente Africano. Durante los dos últimos siglos, el continente americano pasó de ser el mayor productor a registrar la producción más baja del mercado mundial, principalmente debido a enfermedades de origen fúngico como la Moniliasis y la Escoba de bruja (Ploetz *et al*., 2007). La disminución de la cosecha por estas enfermedades ha sido superior al 40% en los países productores de las Américas; según el consumo en Colombia principalmente se hace como chocolate de mesa, aunque también es utilizado como materia prima para confitería, productos farmacéuticos y cosméticos (Aranzazu *et al*., 2013). Institucionalmente ocupa el tercer renglón de la agenda exportadora agropecuaria como generadores importante de divisas para el País (Fedecacao 2013).

Colombia es considerado centro de origen del genero *Theobroma cacao* L, por lo que registra una de las bases geneticas más amplias y diversas del mundo (Motamayor *et al*., 208), propiedades conferidas por eventos de división y multiplicación celular que le han permitido a la planta perdurar a través del tiempo. Esta diversidad puede ser el producto de rearreglos o mutaciones (variaciones alélicas), que a su vez llevan a cambios en la estructura genética de las poblaciones, manteniendo caracteres de interés agronómicos que deben ser evaluados a través de pruebas y experimentos en campo. La búsqueda de fuentes de resistencia genética a enfermedades se fundamenta en este tipo de evaluaciones, las cuales permitirán conocer la respuesta de las plantas a la infección por los patógenos en campo. Así mismo, fortalecerá el conocimiento de cultivares para su posterior implementación en programas de mejoramiento genético y de manejo integrado de las enfermedades. Características de resistencia propias a cada planta que pueden ser identificables a través de las herramientas moleculares y que permiten la discriminación de grupos específicos.

Esta diversidad puede estar asociada con respuestas alternas de la planta y capacidad de defensa frente a la infección por un patógeno. Eventos de defensa que se dan a través de las vías de señalización, rutas que permiten la modulación de la transcripción génica de la planta para la activación de los mecanismos de defensa, con múltiples respuestas en las que se pueden incluir: la respuesta de hipersensibilidad, la producción de especies de oxigeno reactivas (ROS), la producción de ácido salicílico (AS), la producción de óxido nítrico (ON), la señalización por MAP Kinasas (MAPK), la síntesis de lignina (refuerzo de pared-barreras estructurales), los compuestos antimicrobianos (Fitoalexinas), las proteínas relacionadas con patogenicidad (genes *PR*) y la regulación proteica (complejo Ubiquitina (UB)-proteosoma) (López, 2007).

La Moniliasis del Cacao es causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, se considera la enfermedad más limitante para la producción mundial de Cacao (Phillips *et al*., 2008). El agente causal, es un hongo basidiomicete que ha mostrado potencial de adaptación y afinidad a las condiciones medioambientales que lo rodean, con un nivel de infección severo y gran capacidad para invadir regiones geográficas nuevas. Características que la han convertido en la enfermedad más importante del cultivo del Cacao. De acuerdo a lo anterior, la presente investigación busca como objetivo general identificar una fuente nueva de resistencia a *Moniliophthora roreri* en cacao y contribuir a los esfuerzos que se vienen haciendo para reducir la incidencia a la enfermedad.

Así mismo, los objetivos específicos son los siguientes: 1. Conocer la reacción de 13 genotipos de cacao a la inoculación artificial de *Moniliophthora roreri*. 2. Determinar los grados de resistencia a Moniliasis, y si ésta, es una expresión genotípica o producto de las circunstancias ambientales (escape) 3. Establecer la huella genética mediante marcadores microsatélites de 24 genotipos regionales de interés agronómico para Colombia. Los objetivos propuestos serán logrados a través de 3 capítulos desarrollados como temas individuales y presentados a continuación.

1. Estado del arte

Los capítulos son las principales divisiones del documento. En estos, se desarrolla el

1.1 Origen e importancia del cultivo

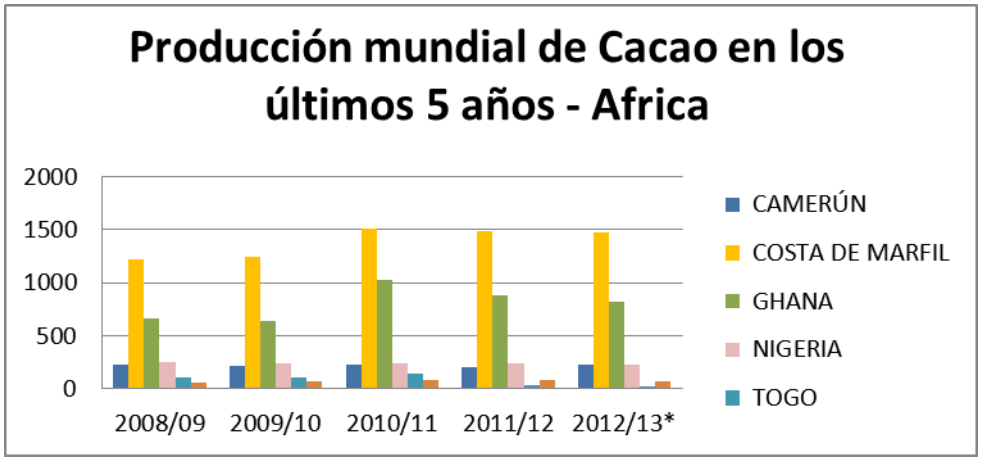
El árbol de cacao *Theobroma cacao* L., pertenece a la familia *Malvaceae* y es originario del bosque húmedo tropical americano. Respecto a su procedencia, existen diversas hipótesis sobre los tipos y orígenes, entre las más importantes se pueden mencionar a Van Hall (1914) quien plantea un origen en Orinoco y Amazonas, Miranda (1962) asocia el origen a América central, Cheesman (1944) y Cuatrecasas (1964) plantean su origen a la provincia del Alto Amazonas y centro américa, Schultes (1984) con un planteamiento de domesticación en Suramérica y dispersión a Centroamérica por migraciones humanas, y Wood & Lass (1985) con su reporte de tres grupos: Criollos, Forasteros y Trinitarios.

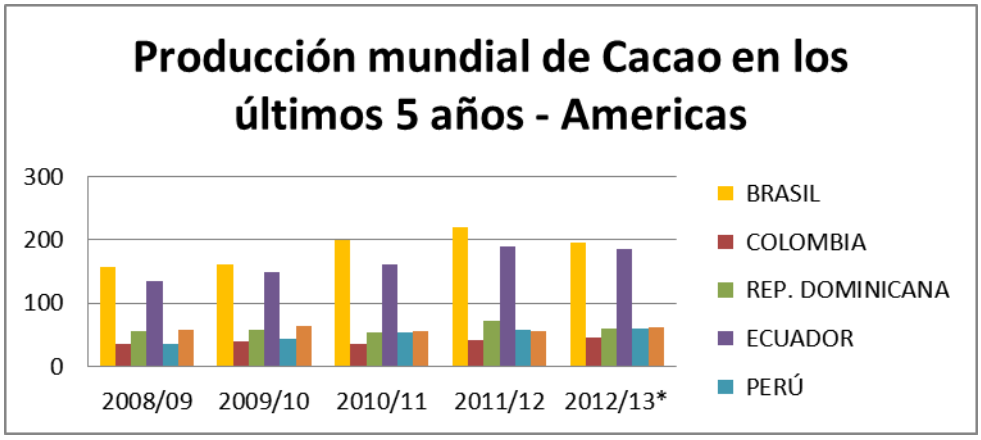
Finalmente un estudio de la estructura y las relaciones genéticas del Cacao criollo con las demás poblaciones utilizando marcadores moleculares AFLP y SSR (Motamayor *et al*., 2002; Motamayor *et al*., 2008) plantea la presencia de criollos ancestrales y modernos, con un origen en el norte de Suramérica y una introducción por el hombre a Centroamérica, clasificando al género *Theobroma cacao* L, en 10 grupos genéticos denominados: Amelonado, Contamana, Criollo, Curaray, Guiana, Iquitos, Marañón, Nacional, Nanay y Purús.

Su valor radica en ser uno de los cultivos perennes más importantes del mundo y su empleo en la fabricación de chocolate (Almeida *et al*., 2007). Según el uso industrial, la especie *Theobroma cacao* L es la más utilizada de las 22 que conforman el género *Theobroma* L, (Schnell 2005). Los últimos datos estadísticos reportados por FAO (2009) para la siembra de Cacao en el mundo revelan más de 6.583 millones de hectáreas hasta el año 2008 (ICCO, 2009). Igualmente Fedecacao (2013), reporta una producción

mundial de 3.966 MTm, liderada por países como Costa de Marfil con 1.475 MTm y Ghana con 820 MTm

En la figura 1, se presenta la producción mundial de Cacao en grano de los últimos 5 años. En la misma tabla, se puede observar según el año cacaotero 2012/2013, la producción mundial por continentes, donde el africano lidera las estadísticas con un registro de producción de 2.826 MTM, seguido por América con 606 MTM y Asia-Oceanía con 534. En Suramérica, Brasil es el país que reporta la mayor producción con 195.000 t, seguido por Ecuador con 185.000 t y Republica Dominicana con 60.000 t. Colombia ocupa el 4 lugar con 47.000 t (Fedecacao-ICCO, 2013).





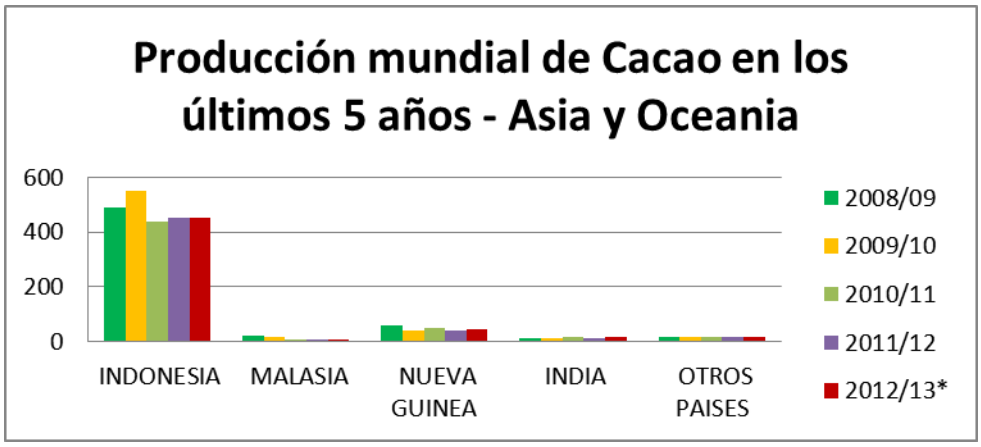


Figura 1. Producción mundial de cacao en grano durante los últimos 5 años en miles de toneladas. Fuente: Federación Nacional de Cacaoteros 2013. German Cocoa and Chocolate Foundation, ICCO, Quarterly Bulletin of Statistics, 2013, Nació**ó**nal de Chocolates Grupo Nutresa, 2013

Además de la importancia en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética, el cacaotiene una figura social muy significativa a nivel mundial, pues las características agroclimáticas y geográficas tan específicas que posee, lo ubican en países subdesarrollados localizados en zonas tropicales sobre la línea ecuatorial, representando el sustento de una gran cantidad de Agricultores (Efombagn *et al*., 2007) con sistemas de siembra caracterizados por conservar el suelo y el ambiente (Evans *et al*., 2002) en la medida en que son grandes generadores de biomasa, con capacidad de capturar CO_2 y eficientes liberadores de oxígeno (Espinel, 2005). La actividad actualmente está generando 73.000 millones de dólares (Ploetz, 2007), de la cual dependen más de 60.000 puestos de trabajo (Morais, 2005, citado por Lanaud, *et al*., 2009).

Colombia cuenta con grandes fortalezas frente al cultivo por su tradición chocolatera, seguramente debido a sus cualidades geográficas y su riqueza agroclimática, así como su amplia base genética. Actualmente es reconocido como país productor de Cacao fino y de aroma. Estas ventajas permitieron que su explotación fuera incluida dentro de los 10 renglones exportables que el gobierno nacional ha definido a través del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural para apoyar el desarrollo del campo (Fedecacao, 2012). El cultivo demanda una gran mano de obra que genera el sustento de aproximadamente

30.000 familias; adicionalmente, su empleo para sustitución de cultivos ilícitos ha generado una sostenibilidad económica y un respaldo de la sociedad colombiana.
El gobierno de Colombia y el gremio cacaotero mantienen un interés para renovar y rehabilitar plantaciones, establecidas con materiales regionales productivos y resistentes. El plan decenal para Cacao dentro de la agenda nacional cacaotera para el año 2021 pretende generar una sustentabilidad económica con disponibilidad de más de dos millones de hectáreas aptas para el desarrollo del cultivo (Proexport, 2012), materiales genéticos definidos y metas claras de producción (246.000 tn). Al respecto, entidades como la Federación Nacional de Cacaoteros está innovando con la siembra de Cacaos regionales bajo sistemas agroforestales asociados con plátano, frutales y arboles maderables, establecidos bajo modelos de siembra y cambio de copa (Aránzazu *et al*., 2009) con estudios de compatibilidad entre cultivares y una transformación del manejo agronómico del cultivo.

1.2 Las principales plagas y la Moniliasis del Cacao.

A pesar de la claridad que existe actualmente sobre la competitividad y la generosidad del cultivo del Cacao, diversos factores han permitido que la planta sea altamente susceptible a nuevas plagas y enfermedades (Ploetz, 2007). Entre ellos, su domesticación relativamente lejana al centro de origen y la adaptabilidad de la especie a diferentes regiones agroclimáticas, eventos que ocasionan una coevolucion constante y una adaptación rápida de los enemigos naturales al nuevo hospedero. Estas limitaciones bióticas causan perdidas en la producción de todas las regiones cacaoteras del mundo, constituyendo el mayor obstáculo en la producción del cacao (Gotsch, 1997).

Entre las plagas más importantes según el daño económico se puede mencionar las ocasionadas por los miridos Heteróptera: Miridae, con pérdidas anuales estimadas entre 100.000 y 200.000 tn, las principales especies incluyen *Sahlbergella* spp*., Distantiella theobroma y Helopeltis* spp, reportadas en África occidental y *Monalonyum* spp, en América Latina. Igualmente, “el barrenador de la vaina” producido por *Conopomorpha cramerella*, provoca pérdidas anuales de 40.000 tn en Asia (Ploetz, 2007). Recientemente en Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario ICA, ha reportado el barrenador del fruto *Carmenta foraseminis* en los departamentos Antioquia,

Cundinamarca, Norte de Santander y Tolima; no obstante aún no se tienen datos claros sobre las pérdidas económicas que está produciendo en las plantaciones (ICA, 2013).
Otros problemas significativos, son causados por mamíferos y aves, los cuales pueden variar dependiendo del órgano atacado y la región geográfica donde se encuentren (Bowers *et al*; Entwistle 1972 y Wood et al., 1985). Algunas plagas también reportan perdidas indirectas en el cultivo, principalmente como vectores que trasmiten enfermedades, entre ellas las cochinillas que transfiere el *Cacao* swollen shoot *virus*; CSSV, y el pasador del tronco, un escarabajo llamado Xyleborus, vector del hongo *Ceratocystis cacaofunesta* y *Ceratocystis fimbriata* (Ploetz 2007).

A pesar de producir importantes pérdidas para el cultivo, las plagas están causando menos daño que las enfermedades. Al respecto se relacionan algunas de las más importantes asociadas al Cacao. En la tabla 1, se presentan las principales enfermedades del cultivo del cacao (Ploetz, 2007). En la misma tabla se puede observar las pérdidas causadas en orden de importancia descendente, así como el impacto y la distribución geográfica. Las dos enfermedades con mayor potencial para producir daños por encima del índice económico a nivel mundial son la escoba de bruja y la Moniliasis (Evans, 2002).

La *Escoba de bruja*, es causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa,* evolutivamente cercana a *Moniliophthora roreri* (Phillips *et al*.,2005) por pertenecer al mismo género. En países como Brasil ha causado pérdidas de más de 250.000 tn, principalmente en regiones como Bahía, donde la producción anual bajo de 400.000 tn a 150.000 tn (Evans, 2007) con hospederos alternos como las Solanáceas y algunos de la familias Bignoniaceae y Malpighiaciae, (Evans, 2007).

Tabla 1. Principales enfermedades de Cacao.

Enfermedad	Perdidas	Impacto Actual	Impacto Futuro	Agente Causal	Distribución Geográfica Actual
Mazorca Negra	450	***	***	*Phytophthora arecae*	Philippines and Vanuatu
				P. capsici	Brasil, El Salvador, Guatemala, India, Jamaica, México, Trinidad, Venezuela
				P. citrophthora	Brasil, India, México
				P. heveae	Malaysia
				P. megakarya	Cameron, Po. Fernando, Gabon, Ghana, Nigeria
				P. megasperma	Venezuela
				P. nicotianae var. *Parasitica*	Cuba
				P. palmivora	Pantropical
Escoba de Bruja	250	***	***	*Moniliophthora perniciosa*	Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Grenada, Guyana, Panamá, Perú, St. Vincent, Surinam, Trinidad and Tobago, Venezuela
Swollen shoot	50	**	***	*Cacao swollen shoot virus*	Benín, Costa de Marfil, Indonesia (Sumatra), Liberia, Malaysia (Sabah), Nigeria, Papua New Guinea, Sierra Leone, Sri Lanka, Togo
Moniliasis	30	**	****	*Moniliophthora roreri*	Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Venezuela, Bolivia.
VSD	30	**		*Oncobasidium theobromae*	Burma, China (Hainan Island), southern India, Indonesia, Malaysia, Papua New Guinea (main island, New Britain and

				New Ireland), the Philippines, Thailand
Ceratocystis	n/a	**	*Ceratocystis cacaofunesta* (syn. *fimbriata*)	Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador
Cushion (green-point) gall	n/a	*	*Albonectria* (syns.: *Calonectria* and *Nectria*) *rigidiuscula* (anamorph: *Fusarium decemcellulare*)	Western Hemisphere, Africa and Sri Lanka
Rosellinia	n/a	*	*Rosellinia bunodes*	Tropical América, India, Indonesia (Java and Sumatra), Malaysia (peninsular), Philippines, Sri Lanka
			R. paraguayensis	Grenada
			R. pepo	Central America, West Indies, West África

a. Las enfermedades se enumeran según el orden estimado de perdida. Las figura están en miles de toneladas

b= El impacto relativo es el siguiente: * Bajo. ** Moderado. *** Muy alto.

El futuro impacto es el potencial de destrucción que causaría una determinada enfermedad si se diseminara fuera del rango geográfico actual. Fuente: Tomado de Ploetz (2006), y modificado por el autor.

Por su parte, la Moniliasis del Cacao es producida por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.,* 2003 Basidiomiceto reportado en 13 países de las Américas (Phillips *et al*., 2012) y considerado probablemente la enfermedad del Cacao más agresiva y de más difícil control. A nivel mundial, no reporta las pérdidas de producción más grandes, seguramente porque aún no se encuentra en las países de mayor producción (Hebbar, 2007). En ese sentido, si enfermedades como estas lograran introducirse al África occidental tendrían graves consecuencias, pues en esta región se concentra más del 70% de la producción mundial de Cacao, registrando más de 2.460 tn (Evans 2002) (ICCO Volumen XXXVI No 2).

Lo anterior, sumado a la gran diversidad y adaptabilidad que han mostrado el patógeno y combinado con la longevidad de sus esporas y las condiciones agroclimáticas favorables que ofrecen los países productores, la Moniliasis se convierte en un invasor formidable con capacidad de colonizar todos los ecosistemas donde aún no se encuentra (Phillips, *et al*., 2005). No obstante, no se puede descartar la presencia de barreras físicas como el Océano Atlántico, lo que haría imposible su difusión, convirtiendo la dispersión humana de la enfermedad en la amenaza más importante para el cultivo del cacao en el mundo; para el caso, siendo las barreras geográficas inoperantes y dejando muy poco que hacer para prevenir la entrada de estos patógenos a nuevos territorios (Evans, 1986). Al respecto, todos los países productores de cacao han tomado medidas para evitar esta posible situación.

Otra enfermedad considerada importante es la Mazorca Negra, un Oomicete que pertenece al reino Stramenopila y es producida por un complejo de 7 especies de *Phytophthora* spp, especializada según la zona geográfica y el hospedero, se encuentra distribuida a nivel mundial y es considerada la especie más invasiva (Jaimes *et al*., 2010). Entre las más importantes se puede mencionar la *Phytophthora megakarya*, solo reportada en África Occidental (Erwin *et al* 1996; Guest 2007) causando pérdidas superiores a 450.000 toneladas métricas, entre el 20 y 25% de la producción de países como Camerún y Nigeria (Evans, 2007). La diversidad de este género resulta ser bastante compleja ya que mientras más estudios se hacen más especies de Phytophthoras aparecen (Evans *et al*., 2003). En la Figura 2, se presentan las tendencias en la producción mundial de Cacao desde 1830 a 2013; allí se puede observar un decrecimiento progresivo de la producción del grano en las Américas a partir del año 1830, sumado al crecimiento significativo de los continentes de Asia, África y Oceanía, quienes evidencian como a inicios del siglo XX, las Américas producían más del 50% de la producción, seguido por el Caribe, África, Asia y Oceanía. Sin embargo, la presencia de enfermedades como la *Ceratocystis cacaofunesta,* y posteriormente la llegada de la escoba de bruja y la Moniliasis, eliminaron la mayoría de las plantaciones en Centroamérica y Suramérica (Enríquez 2004) logrando declinar la producción cacaotera y generando un impacto significativo en los países productores.

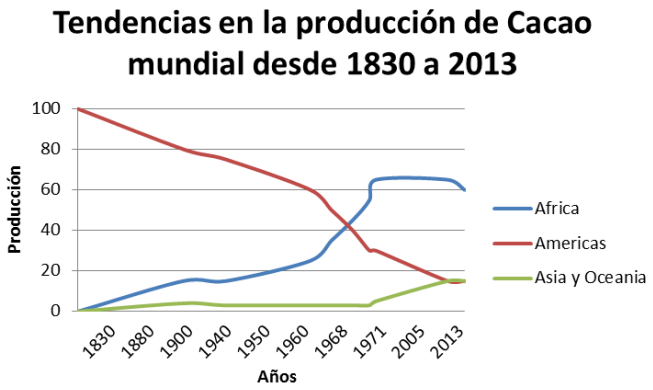


Figura 2. Tendencias en la producción de Cacao mundial desde 1830 a 2013.Fuente: Tomado de Ploetz (2006); Bradeau (1969); FAOSTAT (2006); Lanaud *et al*., (2003) y Fedecacao (2013) y modificado por el autor.

En la figura 3, se presentan las cinco enfermedades de Cacao más importantes en el mundo. Allí, se puede observar como la mazorca negra producida por *Phytophthora* sp, es considerada una enfermedad Pantropical, pues se encuentra distribuida en todo el mundo y es la que actualmente ocasiona las perdidas más grandes al cultivo.

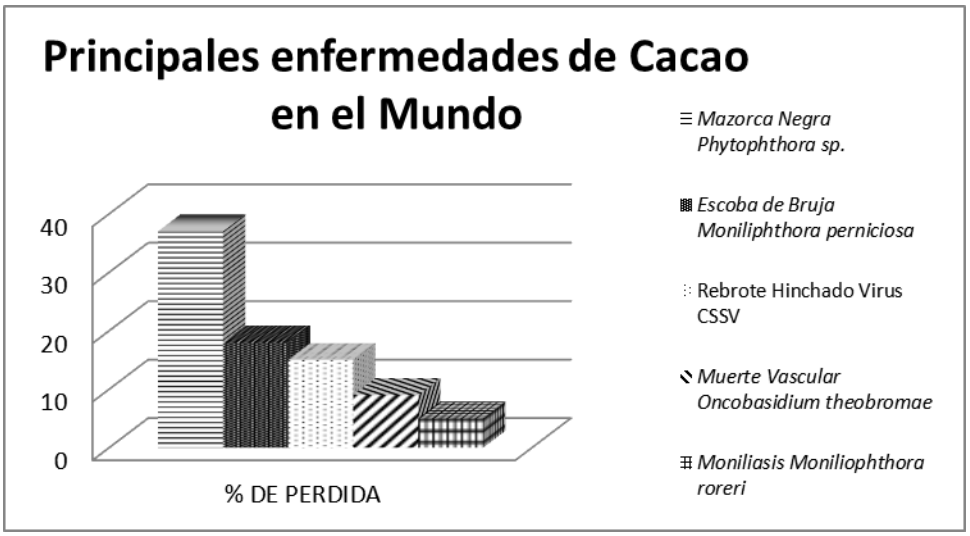


Figura 3. Principales enfermedades de Cacao en el Mundo.Fuente: Tomado de P. van Grinsven, Mars, Inc. Citado por Hebbar (2007) y adaptado por el autor.

El potencial de daño y la capacidad destructiva de *Moniliophthora roreri* ha desplazado a enfermedades como la Escoba de Bruja en países como Perú y Ecuador, donde aspectos de su biología entre ellos la capacidad de sobrevivir en ambientes extremos (0-

1.400) m.s.n.m, la susceptibilidad de las variedades comerciales de Cacao y la rápida tasa de expansión de su rango geográfico convierten a la Moniliasis en una de las principales amenazas para la cacaocultura mundial (Phillips *et al*., 2007),

El mismo autor menciona la agresividad del hongo y relaciona aspectos importantes de su biología, entre los cuales se pueden mencionar los siguientes: su capacidad de sobrevivir en ambientes extremos (0-1.400) m.s.n.m, la aparente susceptibilidad de la mayoría de las variedades comerciales de Cacao, la rápida tasa de expansión de su rango geográfico y su facilidad para ser diseminado por el ser humano. Condiciones que convierte a la Moniliasis en una de las principales amenazas para la cacaocultura mundial (Phillips-Mora, 2003).

El hongo *Moniliophthora roreri* puede infectar los géneros *Theobroma* spp y *Herrania* spp, aparentemente todas las especies de estos dos géneros son suceptibles incluyendo *T. grandiflorum* (Cupuaçu) y *T. bicolor* (pastate) (Phillips, 2008). Su infección es específica a los frutos causándoles daños externos e internos hasta finalmente destruirlo, se puede dar en cualquier estado de desarrollo con daños y niveles de perdida variables que dependen principalmente de las condiciones climáticas y el manejo que se le dé al cultivo (Barros 1966; Phillips 1986).

El patógeno se encuentra en 13 de los 21 países del mundo que cultivan Cacao, sin embargo su rango geográfico se ha limitado a América central y del Sur, a excepción de la región nororiental de Venezuela y Brasil donde la Escoba de Bruja ha sido reportada como el patógeno más limitante en la producción (Ploetz, 2007). No obstante, al tener en cuenta características del patógeno como la propagación actual, la amplitud de su rango geográfico y la fase invasiva en la que se encuentra (Evans, 2002; Evans *et al*., 2003), se deberá contemplar la posibilidad de que la Moniliasis logre invadir las regiones productoras de África occidental, el sudeste Asiático o incluso Brasil, afectando directamente en dicho caso, la sostenibilidad económica del cultivo. Situación que constituye una amenaza real para la producción de Cacao en el mundo y para la estabilidad de la industria de Chocolate y confitería.

En las Américas ha sido evaluada la importancia económica de la enfermedad al constituir el mayor obstáculo a la producción de Cacao en el Neotrópico. En Ecuador

(Rorer, 1926), Costa Rica (Enríquez, *et al* . ,1982), Perú (Krauss *et al*., 2001) y Honduras (Anón, 2001), (Evans 2007). En Colombia, la enfermedad se encuentra distribuida en todas las zonas productoras del País (Fedecacao, 2014), en donde factores como la baja adopción de la tecnología, la poca motivación económica por parte de la industria y la edad avanzada de los cultivos han permitido la dispersión del hongo, a pesar de los buenos resultados de algunos trabajos en manejo cultural, químico, biológico y genético (Barros, 1980; Porras *et al*., 1990; Argüello, 2000a; Krauss *et al*., 2002; Aránzazu *et al*., 2013). Sin embargo, la adopción completa de la tecnología disponible para el control de la Moniliasis no se ha logrado por los pequeños productores.

1.3 Taxonomía y Rango de hospederos

La Monilia se clasifica dentro del dominio Eukaryota, reino Fungi, filum Basidiomycota, clase Basidiomycetes, subclase Agaricoycetidae, orden Agaricales, familia Marasmiaceae, genero *Moniliophthora* y especie *M. roreri.* Las especies reportadas actualmente como hospederas de *Moniliophthora roreri* se encuentran en los géneros *Theobroma* y *Herrania* (Whitlock *et al*., 1999), los dos de la familia *Malvaceae*. Para el primer genero se han descritos infecciones por Monilia en *T. bicolor* (Rorer, 1918), *T. gireli* (Baker *et al.,* 1954), *T. mammosum*, *T.simiarum, T. sylvestre, T. angustifolium* (Evans, 1981a), *T. grandiflora* (Enríquez, 1981). Para el segundo genero hospedero identificado se han descrito infecciones en las especies *H. balaensis* (Baker *et al*., 1954), *H. nítida*, *H. pulcherrima* (Evans, 1981b), *H. purpurea* (Cuhn, 2006).

1.4 Etiología del agente causal

La Moniliasis del Cacao fue descrita inicialmente en Ecuador (Rorer, 1918) e identificada por Smith en el mismo año como una especie del género Monilia (Gorgensen, 1970). En 1933 Ciferi y Parodi realizaron la descripción completa del hongo, determinando su estado mperfecto y la ausencia de estado meiótico, clasificándolo como Deuteromicete, Orden Hypahles, Genero Monilia, especie *M. roreri* (Parodi 1936).

Más tarde se propuso incluir el hongo en el nuevo género *Moniliophthora*, debido a la presencia de un doliporo en las septos del micelio vegetativo y un desarrollo basipetalo de las esporas, que lo hace afín con los basidiomicetes (Evans 1981), reclasificándolo en el orden Moniliales, familia Moniliaceae y el género *Moniliophthora*, especie *M. roreri*.

Evans *et al*. Porras (1982). Más adelante, estudios de la taxonomía del patógeno al compararlo con el hongo *Crinipellis perniciosa*, causante de la Escoba de bruja del Cacao, permitieron fortalecer la teoría del origen genético de las dos enfermedades a partir de un mismo taxón (Evans, 2002; Griffith *et al*., 2003). En su trabajo reportaron la similaridad molecular sobre comparaciones de ARNr y los mecanismos de patogenicidad y virulencia, con alteraciones hormonales acompañadas de hipertrofia e hiperplasia del fruto, así mismo con hospederos similares *Theobroma* spp y *Herrania* spp (Holliday, 1980).

Posteriormente trabajos de microscopia electrónica, marcadores moleculares ITS (Evans *et al*., 2003) y un estudio filogenético donde utilizaron las regiones génicas 28S rDNA, 18S rDNA, ITS, RPB1 y EF1-α (Phillips et al., 2005), confirman la relación estrecha que existe entre los dos patógenos y definen un linaje nuevo y distinto dentro de la familia Marasmiaceae; género *Moniliophthora* y especie *M. roreri.* Actualmente el centro de origen del patógeno se considera es la región nororiental de Colombia (Phillips, *et al*., 2003-2005).

Las condiciones de sobrevivencia más importantes para *M. roreri* se basan en épocas de formación de pepinos y cosecha o durante la época seca donde los frutos enfermos y momificados después de 100 días de infección son una de las fuentes de inoculo más importantes para su producción y dispersión (Ampuero, 1967, citado por Phillips, 1986). Anteriormente se consideraba los conidios de Monilia como los únicos propágulos del hongo debido a la ausencia de su fase sexual. Sin embargo, en investigaciones realizadas por Evans (2002- 2003-2007) se encontraron evidencias del estado meiotico de las esporas de *M. roreri,* aclarando el dilema de cómo llamar los propágulos del hongo si conidios o esporas. El autor durante estas tres revisiones menciona la presencia de un basidio modificado con un seudoestroma denso y carnoso, sobre el cual se desarrollan las esporas, calculándose que en condiciones de campo, un centímetro cuadrado de micelio esporulante es capaz de producir 44 millones de esporas con alto porcentaje de germinación.

1.5 Ciclo de vida

Moniliophthora roreri, es un hongo hemibiótrofo (Griffith *et al*., 2003; Meinhardt *et al*., 2014) debido a que posee una etapa biótrofa y una necrotrófica. Autores como Evans *et al*., (1978; 1981 y 2002), mencionaron posibles estados anamorfo y teleomorfo del hongo, basados en sus asociaciones como *Crinipellis perniciosa*, ahora llamada *Moniliophthora perniciosa*, sin embargo, recientemente se han reportado evidencias del estado meiótico de las esporas de *M. roreri,* proponiendo una fase sexual producto de una división meiótica durante las fase de formación de esporas y germinación, dando lugar a hifas infectivas monocarióticas durante la etapa intercelular y biotrófica. En la figura 4, se presenta el ciclo de vida de la enfermedad, donde seguramente una señal no identificada asociada con la edad del fruto, estimula la transición a la fase diploide necrotrófica del hongo, la cual induce los síntomas de mancha característicos de los frutos de Cacao (Meinhardt *et al*., 2014).

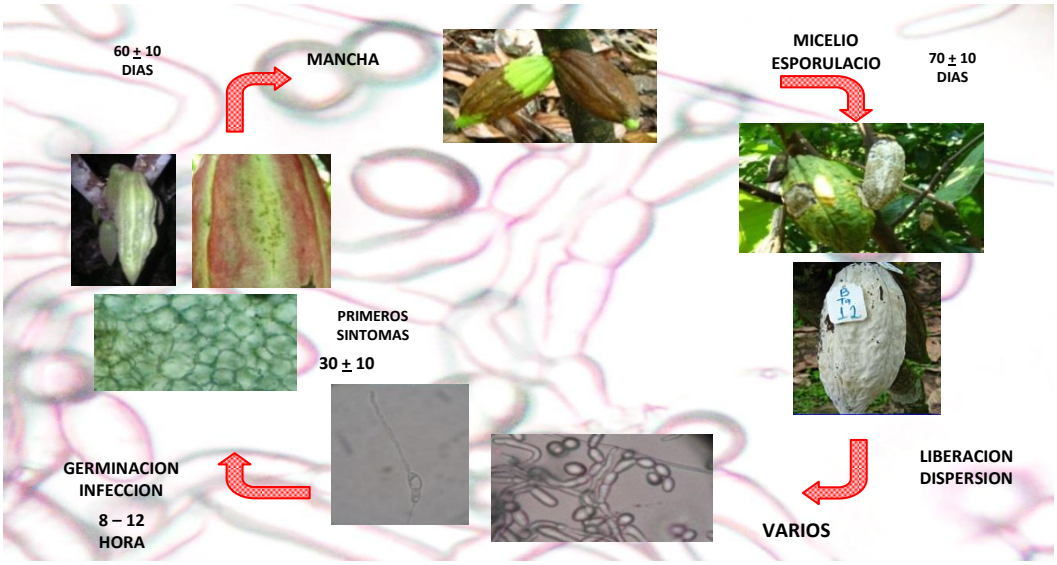


Figura 4. Ciclo de vida de la enfermedad. Fuente: Diseñado por Darwin Martínez; imagen de Darwin Martinez.

Según la figura 4, independientemente de las condiciones ambientales, el hongo inicia su ciclo de vida, generalmente cuando comienza la época seca, una vez los frutos esporulados han logrado iniciar la dispersión de las esporas, ya sea por corrientes de aire, vibraciones del árbol durante la cosecha o poda; normalmente no se necesitan

lluvias abundantes para que estas esporas puedan iniciar la infección, tan solo con el roció de la noche y la madrugada la espora puede tomar el líquido necesaria para iniciar este proceso. Situación que explica por qué en países con estaciones secas prolongadas el hongo en algunas regiones logra mantener su ciclo infeccioso (Evans 1981). En Colombia, seguramente esta característica, sumada a las lluvias modales y bimodales que existen, le permiten al hongo mantenerse activo durante todo el año.

En regiones ubicadas a más de 1000 m.s.n.m, condiciones como la temperatura y la humedad relativa desfavorecen la dispersión de las esporas, demorando alrededor de 80 +/- 10 días para que el fruto enfermo evidencie los síntomas y signos y complete su ciclo de infección. En regiones ubicadas por debajo de los 600 m.s.n.m, estas mismas condiciones aceleran el ciclo de la infección, llegando a completarlo en 50 +/- 10 (Fedecacao, 2013).

En la figura 5, se presentan los síntomas y signos característicos de una infección por *M. roreri* en frutos *Theobroma cacao* L. En la misma figura, también se puede observar como la constitución genética de la planta y su respuesta frente a la infección pueden afectar el ciclo del patógeno, el cual varía según el grado de resistencia de la planta (Phillips, 1986).

Figura 5. Síntomas y signos característicos de una infección por *M. roreri* en frutos de Cacao, *Theobroma cacao* L.

Según la figura N º 5, se pueden observar los síntomas y signos característicos de *M. roreri* en frutos menores y mayores de 3 meses, las islas verdes, la marchitez y deformaciones son los más comunes a esta edad. En frutos mayores se presentan principalmente los puntos aceitosos. **A, B**: Frutos menores de 70 días en síntoma de islas verdes. **C**: Fruto menor de 70 días con deformación del tejido. **D, E** y **F**: Puntos aceitosos en frutos mayores de tres meses. **G** y **H**: Frutos mayores a 3 meses en estado de mancha. **I**: Fruto mayor a 3 meses y enfermo con puntos iniciales y una mancha avanzada de *Phytophthora* sp.

La aparición de los primeros síntomas, pueden ser variables aún en frutos de un mismo cultivar inoculados artificialmente en forma simultánea, esto podría explicar las amplias diferencias entre autores con respecto a esta fase de la infección (Phillips, 1986). Cuando se inoculan frutos de diversas edades, los primeros síntomas pueden aparecer entre los 54 y los 78 días después de la inoculación (Aránzazu *et al*., 1977). Los primeros síntomas se hacen visibles a partir de la 5 semana dpi, con aparición de micelio entre los 3 y 9 días después del primer síntoma (Sánchez, 1982). En La figura 6 se presentan los síntomas atípicos de una infección por *M. roreri* en frutos de Cacao. En la misma figura se puede observar una dilatoriedad en la expresión de la esporulación del hongo, así como un impedimento físico en la continuidad de la mancha. Igualmente se pueden presentar manchas necrosadas muy oscuras, pequeñas y ligeramente hundidas, a veces rodeadas por halos de maduración prematura otras por hongos biocontroladores (Phillips-Mora 2004; Fedecacao 2012).

Figura 6. Síntomas y signos atípicos de una infección por *M. roreri* en frutos de Cacao, *Theobroma cacao* L.

En frutos de cultivares susceptibles, es común observar el crecimiento interno del hongo a través de la necrosis del tejido epidermal o pericarpio. Sin embargo en esta figura, se puede observar como existe una respuesta de resistencia parcial a la infección del patógeno.

El hongo se caracteriza por tener un crecimiento *in vitro* lento y concéntrico con un diámetro de 8 a 15 mm después de 2 semanas en Agar Extracto de Malta (AEM) (Evans, 1981). Sus colores pueden variar entre un salmón a un café claro (Arbeláez, 2010). La temperatura puede estar entre los 22 a 33 ^{o}C Merchán (1981). Sus hifas son hialinas, pared delgada y septada, sin conexiones en clampa, pero con doliporo, las esporas pueden presentar pared gruesa o delgada, de forma globosa o subglobosa, algunas veces elipsoides (Phillips, 2003). También pueden ser cilíndricas de pared delgada, sus esporas son heteromorficas con formas predominantemente esferoides, elipsoides y ovoides elipsadas, con tamaños entre 5-10 um de largo y 5-15 um de ancho (Arbeláez, 2010). Las esporas que permanecen en los frutos momificados pueden experimentar un sobre-engrosamiento de la pared celular, con desprendimiento ligero. Seguramente como mecanismo de dispersión para aumentar el grado de incidencia de la enfermedad (Campuzano, 1981).

1.6 Distribución geográfica

El potencial invasivo de *M. roreri,* le ha permitido durante los últimos años, colonizar 13 países en las Américas. Todos ubicados sobres la franja ecuatorial tropical, clasificando al hongo como la enfermedad más limitante de la producción de Cacao. El hongo ha logrado colonizar completamente las regiones productoras de Colombia en 1817, Ecuador 1917, parte de Venezuela 1941, Panamá 1956, Costa Rica 1978, Nicaragua 1980, Perú 1988, Honduras 1997, Guatemala 2002, Belice 2004, México (Tabasco-Chiapas), Bolivia y el Salvador (2012) (Phillips-Mora *et al*., 2012). La continuidad en su dispersión por casi 200 años, permite pensar en la habilidad para diseminarse y adaptarse a nuevos ecosistemas.

Continentes como África, Asia y Oceanía, registran las mayores producciones del grano seco en el mundo (IICCO 2013), sin embargo aún no reportan la presencia del patógeno. Es claro que más de 82.400.000 Km^2 de océano (Atlantic ocean, 2010) incluyendo mares costeros, constituyen una barrera geográfica infranqueable entre las Américas y el viejo continente, sin embargo, otras fuentes de dispersión como el aumento del

movimiento del material de siembra y de Cacao comercial podrían jugar un papel importante en la diseminación a estas nuevas regiones (Evans 1918; Phillips 2007). En ese sentido, es importante fortalecer las normas legales que permiten el control sanitario en cada país, buscando evitar la entrada de la Moniliasis a sus zonas productivas, evento que en algún momento parecería inevitable.

En Latinoamérica, países productores como Brasil aún no registran la enfermedad, sin embargo, actualmente se construye una vía que comunica a Brasil y Perú a través de la Amazonia, lo que probablemente acelerará la dispersión del hongo hacia esta region. (Phllips 2007).

1.7 Manejo Integrado de la Enfermedad

La comprobada eficacia de *M. roreri* como fitopatogeno en Cacao ha complicado el manejo de la enfermedad. Su gran éxito radica en la notable capacidad de producir millones de esporas altamente infectivas que son fácilmente diseminadas por el ambiente (Phillips *et al*., 2003). Estas esporas han interactuado por casi 200 años de una forma constante con los diversos ecosistemas que rodean el cultivo, situación que le ha permitido fortalecer sus mecanismos de dispersión y diseminación a nuevos ambientes. Estudios sobre los frutos enfermos momificados señalan la producción de cerca de 44 millones/cm^2 de esporas, permaneciendo por más de 9 meses produciendo ciclos sucesivos de esporas que se diseminan a través de todo el ecosistema que los rodea (Ram, 1989). Las esporas pueden permanecer viables por más de 7 meses, engrosando su pared para soportar condiciones adversas, manteniendo una presión de inoculo sobre el cultivo para iniciar un nuevo ciclo si las condiciones son favorables (Wood y Las 1985; Phillips 2003). El conocimiento de estos mecanismos de dispersión y germinación ha permitido implementar el manejo integrado de la enfermedad, buscando un conjunto de técnicas y herramientas culturales, químicas, biológicas y genéticas, necesarias para mantener las poblaciones del patógeno a niveles inferiores al daño económico FAO (1967), medidas de control basadas en un manejo permanente y sistemático a través de todo el año (Fedecacao, 2012).

En Colombia, entidades como la Federación Nacional de Cacaoteros recomiendan realizar todas las practicas agronómicas en los momentos indicados, al comprobar que

las esporas una vez se desprenden del fruto, pueden permanecer en las hojas viejas del árbol, sobre plantas arvenses e incluso sobre las demás plantas que forme parte del ecosistema manteniendo un inoculo constante para nuevas infecciones (Ram, 1989).

1.8 Manejo Químico, biológico y cultural

Actualmente se recomienda el uso de sustancias químicas protectantes y sistémicas como compuestos activos a base de cobre ya sea sistémico (Azoxystrobin) o de contacto (clorotalonil) (Flood *et al*., 2004). Al respecto, Torres de la Cruz (2010), evaluó el compuesto Azoxystrobin y determino el efecto de la molécula sobre la germinación y la esporulación de las esporas, destacando en su trabajo la importancia de tener en cuenta los sistemas productivos bajo el cual se realizan las evaluaciones para el control químico del hongo, donde factores como la productividad, el área de evaluación y los precios del momento pueden afectar los resultados, no obstante, diversos autores consideran el control químico como antieconómico y en algunos casos ineficaz (Phillips, 2005; Desrosiers y Suarez 1982ª). La selección de fungicidas efectivos contra *M. roreri* podría dar resultados favorables si se tienen en cuenta factores como la resistencia de la cepa y el uso eficiente en cacaos productivos (Murillo *et al*., 1984; López, 2005; Quevedo 2012).

El control biológico es considerado como una herramienta confiable, segura y compatible, afín a prácticas químicas, culturales y geneticas, que lo constituyen en un elemento valioso del manejo integrado de plagas y enfermedades (Peshin *et al*., 2009). En fitopatología el termino se aplica al "uso o manipulación de organismos vivos, nativos o introducidos que estimulen la resistencia de la planta o supriman la actividad en poblaciones de uno o más fitopatogeno (Hoyos, 2012). Su característica principal es la reducción de la población del patógeno hasta niveles inferiores al índice de daño económico, mas no se caracteriza por eliminar completamente el patógeno, particularidad que ha marginado la efectividad de la técnica. Seguramente por el tradicionalismo que se tiene con los controles químicos y la supresión inmediata del patógeno.

Los primeros estudios sobre el uso de microorganismos para el control de enfermedades asociadas al cultivo del Cacao fueron desarrollados a base de sustancias inhibidoras y bacterias antagonistas a *Moniliophthora roreri* (Bravo *et al*., 1978a, 1979; Jiménez, 1985). Generalmente aislados de la microbiota del suelo, de la superficie de las hojas (epifitos) o

partes aéreas de la planta y en algunos casos de los espacios intercelulares de la planta (microorganismos endófitos) (Hoopen *et al*., 2003); Hoyos 2013).

Colombia como centro de origen de *Moniliophthora roreri* cuenta con el mayor potencial de agentes de biocontrol seguramente originados por interacción constante del patosistema (coevolucion) (Phillips-Mora *et al*., 2007). Entre los microorganismos más importantes se encuentran los siguientes: *Clonostachys rosea, Trichoderma* sp, *Clonostachys byssicola, Trichoderma ovalisporum, T koningiopsis y T. paucisporu*, reportados como controladores por medio de la inhibición del crecimiento y la esporulación de *M. roreri* (Krauss *et al*., 2001-2003-2006; Evans *et al.*, 2003; Melnick *et al*., 2008).

En los últimos años se ha realizado estudios dirigidos a la búsqueda de microorganismos biocontroladores, instituciones como Corpoica, Fedecacao y diferentes Universidades promueven esfuerzos para la evaluación de estos agentes, encontrando que hongos como *Clonostachys* sp, y bacterias como los *Bacillus* sp, y las *Pseudomonas* siguen predominando como los biocontroladores por excelencia para *Moniliophthora roreri*. (Krauss *et al*., 2001; Ten Hoopen *et al*., 2003; Krauss *et al*., 2003). En la figura 7 se presenta el control biológico natural de *M. roreri* en frutos de Cacao. En la misma figura se puede observar como existe un contacto físico entre la planta y el hongo, así como un alto reconocimiento del patógeno, donde en algunos casos se podría producir cambios morfológicos o bioquímicos en la planta, modificando o modulando las poblaciones del patógeno por cambios en su entorno (Hoyos, 2013).

Trichoderma sp. ***Verticillium* sp**

Figura 7. Control biológico natural de *M. roreri* en frutos de Cacao (*Theobroma cacao* L). Fuente: Aránzazu *et al*., 2010.

El control mediante las prácticas culturales constituye una de las herramientas más importantes para disminuir la presión de inoculo dentro de un cultivo de Cacao. Es considerado como la técnica más eficaz para reducir la fuente de inoculo del patógeno. Está conformado por un manejo agronómico apropiado que incluye labores como el corte cada 8 días de frutos enfermos en cualquier etapa de desarrollo (Aránzazu 1979; Krauss *et al*., 2003); igualmente prácticas como la regulación de sombra, la fertilización, el drenaje de los suelos, la cosecha y beneficio oportuno de los frutos (Delgado *et al*., 1982) y todas las practicas que involucre disminuir la humedad relativa, mejoren la circulación del aire y disminuyan las condiciones apropiadas para el crecimiento del patógeno (Aránzazu 1979; Barros 1966a, 1967b, 1980; Phillips 1986; Amores *et al*., 2009)

Prácticas culturales como la poda, constituyen el elemento más importante para la formación de la planta. Actualmente en Colombia existen algunas técnicas que involucran el manejo del árbol permitiéndole a la planta mantener un equilibrio constante entre el dosel de hojas y el leño maduro, necesario para la formación de cojines florales y frutos. A esta técnica se le ha llamado poda en Cono Natural (Báez 2012). Así mismo se incluyen otras técnicas como la poda de formación, sanitaria y de rehabilitación, contribuyendo de una forma muy eficaz para el control del patógeno en el cultivo del Cacao (Aránzazu, 2013). Todas estas prácticas ayudan al óptimo desarrollo del árbol, fortaleciendo sus mecanismos de defensa y evitando el ingreso de nuevas enfermedades.

1.9 Control genético

La interacción constante a través de los años entre una población de un hospedero y una de un patógeno se define como un Patosistema (Agrios, 2011). El patosistema *Moniliophthora roreri – Theobroma cacao* L, forma parte integral del ecosistema del cultivo del cacao, estas relaciones de casi 200 años han permitido la coevolucion del sistema hasta el punto de lograr que *M. roreri* pueda imponerse sobre los mecanismos de defensa de la planta de cacao, logrando romper la inmunidad encendida tanto por el patógeno como por sus efectores (Ingle *et al*., 2006; Phillips, *et al*., 2005). Sin embargo, la dispersión de cultivo de Cacao más allá de su centro de origen, le ha permitido a la planta crear una diversidad genética adaptada a factores medioambientales propios a

cada región donde se encuentre. En ese orden, existe una variedad de atributos agronómicos que incrementan la posibilidad de encontrar materiales con diversos grados de resistencia a la enfermedad (Phillips, 1986).

Desde el punto de vista genético, siempre se ha discutido si se trata de una respuesta de resistencia o tolerancia, exponiendo como una planta de Cacao exhibe disminución del daño por infección con *M. roreri.* La resistencia ha sido definida como la capacidad de la planta para reducir la incidencia o desarrollo del patógeno, mientras la tolerancia como la capacidad de la planta para soportar la presencia del patógeno con poca o ninguna reacción, la cual puede ser expresada por ausencia casi completa de síntomas o daño (Parlevliet,1979). Lo anterior no ha evitado el hecho que existan diferencias entre la respuesta a la infección por *M. roreri* en tipos y cultivares de Cacao (Ampuero 1967; García *et al*., 1952; Naundorf 1954), evaluados por medio de infección natural (Delgado *et al*., 1960 citados por Phillips, 1986).

En los últimos años, en Latinoamérica se pueden destacar los programas de mejoramiento de Perú (UNAS) de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en Bahía - Brasil el CEPLAC, el INGENIC o grupo internacional para el mejoramiento del Cacao, y en Costa Rica, el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE. Este último ha predominado por la identificación de clones tolerantes a Moniliasis con distinto origen genético y/o geográfico (Phillips *et al*., 2012). Todos basados en el incremento de la productividad y la resistencia a enfermedades. Es así, como la selección de materiales resistentes en estos países ha constituido dentro de sus programas de mejoramiento el primer paso para la identificación de características de resistencia.

Por otra parte, al tomar la primicia de que todo evento de suceptibilidad es una respuesta de resistencia tardía (Agrios, 2005) es decir, que toda planta no se considera como un hospedero pasivo ante el ataque de un microorganismo. Se debe tener en cuenta un estudio donde se relaciona la resistencia a *M. roreri* como un evento Poligénico, al estar gobernado por 3 regiones QTLs en los cromosomas 2, 7 y 8 de los 10 que contiene el genoma (Brown *et al*., 2007). En este orden, actualmente no se ha descrito ningún modelo específico para la resistencia a *M. roreri*, pero si se han descrito algunos genes

que pueden estar interactuando para conferir algún tipo de resistencia (Argüello *et al*., 2009; Argout, *et al*., 2012).

Los principales trabajos realizados en mejoramiento genético hacia la búsqueda de la resistencia tuvieron origen en Trinidad, donde clones trinitarios llamados Imperial College Selección (ICS) fueron seleccionados por diferentes características, entre ellas productivas y de resistencia (Jhonson *et al*., 2009). El Catalogo de Cultivares de Cacao muestra como base la amplia diversidad genética contenida en su Colección Internacional de Germoplasma (IC3), identificando clones tolerantes a Moniliasis con distinto origen genético y/o geográfico, y cruzando progresivamente los clones para obtener variedades con niveles crecientes de resistencia, aprovechando de esta forma el carácter predominantemente aditivo que tiene esta característica en Cacao (Cervantes *et al.* 2006, citado por Phillips *et al*., 2012)

Algunos países de las Américas han seleccionado cultivares de diferentes regiones con características sobresalientes, entre ellos se encuentran el UF-273 y UF-712 (Costa Rica, 1960), EET-75 (Ecuador, 1965 – 1966), ICS-95 (Trinidad, 1959) y PA-169 (Perú, 1961) Phillips (2012). Así mismo, la unión de países centroamericanos productores de Cacao ha permitido crear estrategias de control genético, dentro de los cuales se han identificado clones como el CATIE (CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1 y el PMCT-58 (Phillips *et al*., 2012). No obstante, aún son motivo de estudio en una red de jardines clónales en países como Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala y Belice. Con esto, pretenden definir las características de adaptación a los diferentes agros ecosistemas donde están siendo evaluados.

Colombia, como centro de origen es el país que ha convivido por más tiempo con la enfermedad. brindando una amplia posibilidad en la búsqueda de cultivares nuevos con características importantes. En los últimos años, entidades como la Federación Nacional de Cacaoteros FEDECACAO, y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, han seleccionado cultivares colombianos en todas las regiones del país. Entre ellos, materiales vegetales como los Caucacias 37, 39 y 43, genotipos que han demostrado características de resistencia frente a la infección por *M. roreri* en el país (Yeirme & Aranzazu, 2010).

Asi mismo, Fedecacao ha trabajado bajo la técnica de selección varietal participativa; una herramienta que tiene en cuenta los conocimientos del agricultor para seleccionar los mejores arboles híbridos de cada finca bajo criterio del propietario y del técnico extensionista, los cuales son ingresados a un programa se selección de árboles con características sobresalientes en rendimiento, calidad y resistencia a plagas y enfermedades, donde son evaluados en tres fases de investigación. (Fedecacao 2012).
El objetivo de este seguimiento, es el conocimiento agronómico de los cultivares, lo que permitirá definir su rango de adaptación y la existencia de interacciones genotipo x ambiente (Phillips, *et al*., 2012); corroborando su adaptación a las condiciones agroclimáticas de cada región, para luego aprobar o desaprobar su uso y distribución en la comunidad cacaotera.

Recientemente en Colombia se publicó el catálogo de clones (Aránzazu *et al*., 2013); en donde se mencionan materiales regionales e introducidos que han demostrado características de resistencia importantes a *M. roreri*. Así mismo, el Instituto Colombiano Agropecuario y Corpoica han reportado clones con un buen nivel de resistencia como el ICS 95, y moderadamente resistentes los clones CCN 51, IMC 67 según escala Phillips (2005). El conocimiento de estos genotipos resistentes de Cacao, podrá proporcionar una alternativa genética para el control de *M. roreri*, duradera y de bajo costo que fácilmente aplica a medidas complementarias de control dentro de un manejo integrado de plagas. (Phillips *et al*., 2013).

Otro tipo de control genético que actualmente se está implementando en Colombia por la Federación Nacional de Cacaoteros, es el uso de modelos de siembra por resistencia y la renovación de copa de árboles suceptibles e improductivos por clones resistentes a enfermedades y plagas (Aránzazu, *et al*., 2013). El primero se basa en la distribución programada de una serie de tres o cuatro clones caracterizados por tener un porcentaje de compatibilidad aceptable y un grado de resistencia alto a *M. roreri*. El segundo tipo de control genético se apoya en la capacidad que tiene la planta de Cacao para renovar sus raíces, con lo cual se busca seleccionar los arboles improductivos y suceptibles para renovarlos a través de una enjertación en leño grueso (cambio de copa) con cultivares de resistencia (Fedecacao, 2012). Los dos métodos se pueden mezclar constituyendo un tipo de control que busca intervenir plantaciones con ambientes infestados con Moniliasis para generar una alternativa de siembra en donde la única opción hasta hace poco era el

abandono o cambio de actividad de las plantaciones como fue reportado en diferentes épocas (Phillips-Mora y Wilkinson 2007; Phillips 2012).

En la figura 5, se presenta el Modelo de siembra con resistencia a *M. roreri*. En la misma figura, se puede observar como el manejo genético puede complementar alternativas de manejo integrado contra la Moniliasis del Cacao.

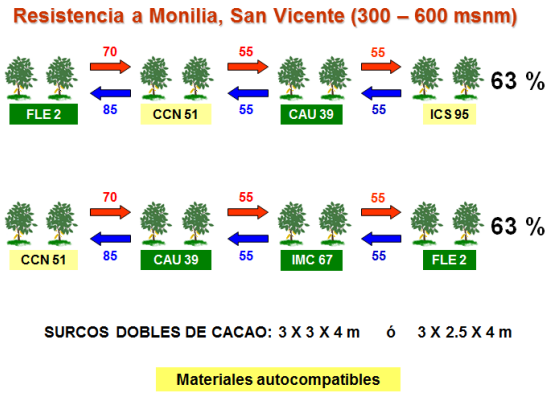


Figura 8. Modelo de siembra con resistencia a *M. roreri* en el municipio de san Vicente de Chucuri en Santander. Fuente: Tomado de Aránzazu 2013.

A pesar de todos los esfuerzos en la búsqueda de controles que permitan disminuir el daño económico ocasionado por *M. roreri*, y los resultados positivos que se tienen con algunas herramientas para el control, el Cacao se caracteriza por pertenecer a pequeños agricultores (Fedecacao, 2012). Esta condición no ha permitido una adopción completa de la tecnología disponible para el manejo, seguramente porque algunas registran mano de obra elevada y altos costos, posicionando el control genético por resistencia como un método más económico, sencillo, duradero y eficaz para el agricultor (Agrios, 2005; Phillips, 1986).

1.10 Mecanismos de defensa en plantas

Las plantas no poseen un sistema inmune que les permita defenderse de todos los patógenos, pero si posee una serie de mecanismos que le permiten reconocer, interactuar y bloquear o eliminar su colonización y multiplicación (Ingle *et al*., 2009). En ese orden, se puede definir la suceptibilidad a un fitopatógeno como la excepción a la regla, ya que solo una pequeña parte de los hongos, virus, bacterias y nematodos pueden ocasionar enfermedad (Dangl & Jones, 2001; Nu¨rnberger & Lipka 2005).

Las plantas se encuentran naturalmente bajo una interacción constante con los patógenos, a pesar de ello, pueden permanecer sanas debido a la activación de varios mecanismos de defensa, los cuales pueden ser activados de forma no especifica, tanto por factores bióticos como abióticos, entre ellos, el choque térmico, la sequía, sustancias químicas y luz ultravioleta. Ingle *et al*., (2006).

La capacidad invasiva del *Moniliophthora roreri* es modulada por varios factores: el agroecosistema en el que se desarrolla el Cacao, el carácter de virulencia del patógeno, su adaptabilidad, las propiedades de resistencia y suceptibilidad de la planta. La presencia y las características de estos factores, actuando de manera concertada para definir la suceptibilidad de la planta (López, 2007). En términos generales un microorganismo puede ser patogénico o no, así como puede ser virulento o poco virulento, en ese sentido, la patogenicidad la podemos definir como la habilidad del patógeno para causar o no enfermedad. Así mismo, el término de virulencia determina el rango de la enfermedad, es decir, si la enfermedad tiene un alto grado de daño en el hospedero se puede reconocer como muy virulento, en el caso que el daño interno sea leve, se podrá relacionar con una baja virulencia (Agrios, 2008).

Algunas de las barreras primarias que debe superar el patógeno son: Pared celular, glucósidos, saponinas, alcaloides, proteínas antifúngicas e inhibidores enzimáticos, las cuales pueden estar de forma constitutiva ó pueden ser inducidos producto del reconocimiento del patógeno, entre los que se encuentran formaciones de lignina y calosa, fitoalexinas, estrés oxidativo y proteínas R, así mismo, respuestas de hipersensibilidad y activación de varios genes de defensa (Wittstock y Gershenzon (2002), citado por (López, 2007).

El Patosistema Cacao - *M. roreri,* es considerado como una interacción compatible Flor (1955) ya que las defensas de la planta no logran contener el patógeno haciéndola suceptible a su infección. En el caso de ser una interacción incompatible se consideraría la primera planta de Cacao resistente a *M. roreri*, con capacidad de contener la infección y colonización del hongo.

Los tipos de resistencia que se reconocen actualmente son cuantitativa, cualitativa y no-hospedero (Flor, 1955; Hammond y Jones (2000); Dichkinson (2003); Ingle, Carstens,

Katherine, Denby (2006); (López, 2007). La primera se considera no específica o horizontal y se caracteriza por presentar una variación continua del nivel de resistencia en la planta. Según (López, 2007), en la mayoría de los casos no se observa reacción de hipersensibilidad clara, sin ser este el factor determinante para definirla. Varios o pocos genes la controlan clasificándola como de carácter Poligénico, contribuyendo cada uno de manera parcial y aditiva a la resistencia. Así mismo, Brown y cols. (2007) menciona los 10 cromosomas que conforman el genoma de la planta, de los cuales 2, 7 y 8 contienen loci que codifican características cuantitativas de resistencia a *M. roreri*, sin definir cuales o cuantos de sus genes esta implicados en el proceso. Sin embargo, su influencia controla múltiples pasos de los procesos fisiológicos y bioquímicos que le pueden llegar a permitir a la planta a detener el crecimiento del patógeno.

Este tipo de resistencia se puede asociar a algunos cultivares de Cacao, los cuales no logran protegerse suficientemente de la infección por *M. roreri*, pero si logran dilatar el avance y la dispersión de la enfermedad, reduciendo la expansión y el desarrollo del patógeno. La resistencia cualitativa, se considera de tipo vertical por no presentar variación en el nivel de resistencia, está controlada por genes mayores y clasificada como de carácter monogénica. También se conoce como raza-especifica pues se asocia al modelo de gen por gen (Flor, 1955). Se caracteriza por tener variedades de plantas que contienen genes *R* dominantes cuyos productos interactúan con los codificados por genes *Avr* dominantes del patógeno. Esta interacción produce una reacción incompatible o de resistencia. Así mismo aquellas interacciones que impliquen genes recesivos de la planta y del patógeno conducirá a la enfermedad o una interacción compatible (Flor, 1955).

La resistencia de tipo no-hospedero es la más común en las plantas (Ingle *et al*., 2006), su efectividad depende tanto de las barreras preformadas como de reacciones inducidas. Su reconocimiento produce la activación del sistema de defensa denominado actualmente como defensa basal. Se caracteriza por la capacidad de una especie de planta para reconocer todos los tipos de un patógeno particular. En la figura 9, se presentan algunos mecanismos de resistencia en plantas. En la misma figura se puede observar gráficamente como la resistencia No-hospedero puede activar los mecanismos de defensa en las plantas, asi como también podrán se suprimidas por moléculas

efectoras producidas por los patógenos, las cuales podrían evitar la continuidad en las señales de activación de defensa.

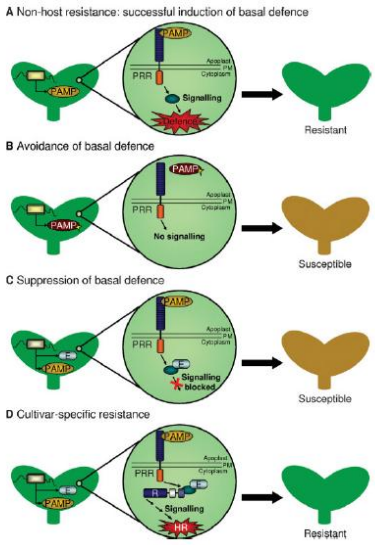


Figura 9. Mecanismos de resistencia en plantas. Fuente. Ingle *et al*., 2010.

Su mecanismo de acción se basa tanto en la formación de papilas ricas en calosa y la producción de especies de oxigeno reactivas (ROS) como en el incremento en la expresión de genes de la vía de fenilpropanoides y genes asociados con la defensa como PR Ingle *et al*., (2006); Dichkinson 2003; (López, 2007). En cuanto a las bases moleculares de este mecanismo, en los últimos años se ha presentado un gran avance con la publicación del modelo Zig-Zag Jones y Dangl (2006), quien representa de forma gráfica la respuesta de ~~la~~ inmunidad vegetal. En este modelo se pueden encontrar tres etapas de reconocimiento, dos involucradas en la planta (PTI y ETI) y una que involucra el patógeno (ETS).

El modelo inicia con el reconocimiento por la planta de moléculas conservadas esenciales en el patógeno reconocidos como PAMPs (ver figura 10a), por parte de proteínas receptores moleculares (PRRs), generalmente situadas en la membrana plasmática de la célula vegetal (Gomez-Gomez y Boller, (2000); He, Shan y Sheen (2007); Boller y He, (2009); Zipfel, (2009); Thomma, Nurnberger y Joosten (2011); Monaghan y Zipfel (2012). Evento que dispara una inmunidad encendida por patrones moleculares o PAMPs y es llamado (PTI). Este tipo de interacción es suficiente para

detener la infección antes que el microorganismo comience la multiplicación y es efectiva contra patógenos potenciales no adaptados. Interacciones moleculares consideradas como la base de la resistencia no hospedero (Navarro y cols. (2004); Chisholm, Coaker, Day y Staskawicz (2006); Schulze-Lefert y Panstruga (2011).

Sin embargo, la interacción constante a través del tiempo, permite la evolución de estos patosistemas, logrando superar barreras impuestas, tanto por la planta como por el patógeno. En ese sentido, una vez un patógeno logra superar las barreras mediadas por la respuesta PTI se genera una interacción compatible mediada por (ETS) o suceptibilidad encendida por efectores. Los efectores, son proteínas producidas por el patógeno y que pueden evitar las cascadas de señalización molecular que intervienen en las respuestas de defensa PTI (Jones & Dangl, 2006). Ejemplo de ellos son los efectores TALEs (del inglés, transcription activator-like effector) Bogdanove y Voytas (2011); Muñoz, Bernal; Szurek; López (2012), proteínas producidas por fitopatógenos del genero *Xanthomonas* y *Ralstonia* para modular la regulación de la expresión génica de sus hospederos. En la figura 10, se presenta el modelo Zig-Zag propuesto para la amplitud en la respuestas de defensa de las plantas (Jones & Dangl, 2006). En la misma figura se puede observar una interaccion directa entre los PAMPs y las moléculas efectoras con la activación de los mecanismos de defensa, los cuales pueden diferir según la amplitud de la respuesta en la planta.

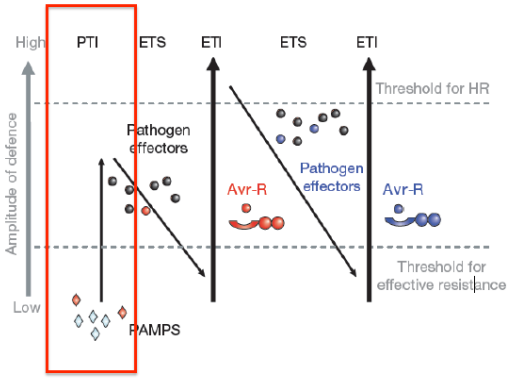


Figura 10. Modelo Zig-Zag propuesto por Jones and Dangl, 2006.

En ese sentido, la planta ha desarrollado un mecanismo de reconocimiento para estas proteínas efectoras, suprimiendo su efecto y generando una respuesta de inmunidad encendida por efectores (ETI, del inglés, effector triggered immunity). Es importante

mencionar que este tipo de respuesta esta mediada por proteínas de resistencia que puedan reconocer directa o indirectamente efectores (Chisholm *et al*., 2006); (Jones & Dangl, 2006); Dodds y Rathjen (2010).

Este reconocimiento proteína-proteína o gen-gen, (Flor, 1971), es un modelo de resistencia gobernado por la presencia de un gen de resistencia *R* en la planta y un gen de avirulencia en el patógeno *Avr* (Dangl & Jones, 2001); Kiraly, Barna y Kiraly (2007). En ese sentido, si al inicio de un proceso infeccioso se encuentran presentes el gen de resistencia *R* y el gen de *Avr*, la interacción será incompleta o resistente, si alguno de los dos no se encuentra presente, la interacción será completa o susceptible.

El reconocimiento de los efectores del patógeno por parte de las proteínas *R* puede ser directo o indirecto. En el caso del reconocimiento directo, la proteína *R* actúa como un receptor que interactúa con la proteína *Avr* del patógeno, la cual actuaría como un ligando En casos donde no se ha logrado demostrar este tipo de interacción *R-Avr,* se ha demostrado otro tipo de interacción mediada por una tercera proteína llamada blanco de patogenicidad. Este modelo se basa en la detección de cambios inducidos por efectores de los patógenos en la proteína blanco de patogenicidad de la planta. Evento reconocido como Modelo del Gen Guardián. Así, la alteración de este blanco en el hospedero le conferirá éxito al patógeno en hospederos de genotipos susceptibles, pero inducirá la respuesta ETI en hospederos de genotipo resistente que posean la proteína *R* (Dangl & Jones, 2001). Otros autores han reportado el modelo guardián en varios Patosistemas (Mackey y cols. (2002); Caplan y cols. (2008); Lorang y cols. (2012), donde la familia de genes involucrados en la activación de los mismos, han sido encontrados en el genoma de Cacao (Argout y cols. (2011).

1.11 Respuesta de Hipersensibilidad - HR

La respuesta de hipersensibilidad se caracteriza por ser localizada y especifica. Este tipo de respuesta puede ser generada por la interacción gen a gen (*R-Avr*) para evitar el avance físico del patógeno, produciendo muerte celular programada de las células adyacentes al punto de infección y bloqueando del desarrollo de la misma; mecanismos elicitados a través de señales químicas que pueden inducirse de forma sistémica en la

planta, proporcionando protección a una diversidad de patógenos Campbell y Reece (2007).

Uno de los resultados de la activación de los mecanismos de defensa en la planta, son la producción de especies reactivas de oxigeno (ROS), las cuales pueden inducir la producción de iones super-oxidos, peróxido de hidrogeno y radicales hidroperóxidos. Estas moléculas pueden producir la peroxidación de los lípidos y la subsecuente destrucción de la membrana celular. Generalmente, tienen un efecto tóxico directo sobre el patógeno, así como pueden estimular otros mecanismos de defensa. Autores como Benezer *et al.*, 2008, reportan evidencias de como las especies reactivas de oxigeno pueden contribuir a la muerte de las células vegetales adyacentes al punto de infección, bien sea por actividad fitotóxica directa de la célula infectada o bien estimulando los genes que provocan la muerte programada (reacción hipersensible o apoptosis).

La reacción de hipersensibilidad (HR) se considera como la máxima expresión de resistencia de las plantas al ataque por patógenos (Sanzon y Zavaleta, 2011). Durante la HR las células adyacentes al punto de infección sufren apoptosis para detener el avance del patógeno. Este mecanismo se reconoce como muerte celular programada, respuesta controlada desde el núcleo que involucra una serie de eventos metabólicos que conducen a la destrucción de las célula (Zandbergen *et al*., 2010). Genes R.

1.12 Resistencia sistémica Inducida

La resistencia sistémica inducida (SIR), utiliza las defensas estructurales y bioquímicas constitutivas en la planta, generalmente inducidas por un estímulo externo. Ejemplos de SIR son: la interacción entre las Rizobacterias y las células vegetales de *Pseudomona aeruginosa* 7NSK2, la cual tiene la capacidad de inducir la producción de ácido salicílico para generar resistencia a *B. cinérea*; la inducción de resistencia genética contra *Colletotrichum lindemuthianum* y *B. cinérea*, gracias a la aplicación de *Pseudomnonas aeruginosa* en suelo y semillas de frijol *Phaseolus vulgaris* L (Lopez, 2007).

1.13 Resistencia sistémica adquirida

La resistencia sistémica adquirida (SAR), es reconocida por la activación de la expresión de genes de resistencia y de proteínas relacionadas con patogénesis. Puede tanto crear barreras bioquímicas de defensa contra la infección por patógenos, como transmitirse a las

demás células vecinas, es de amplio espectro y se puede mantener por más tiempo Burbano y Garcés, (2007). Entre los compuestos más estudiados como elicitores de este tipo de resistencia se pueden mencionar el ácido salicílico (AS), el acibenzolar-S-Methyl, y algunos compuestos elaborados con poliaminas y activadores de Ca^{2+}- Calmodulina.

El papel principal de SAR está relacionado con la disminución de síntomas de la enfermedad, y se asocia a la respuesta de hipersensibilidad HR (Durrant y Dong (2004); Spoel y Dong (2012). Actualmente estas moléculas se utilizan en programas de manejo fitosanitario como estrategias para la protección de cultivos (Romero y Ritchie (2004); Noutoshi y cols. (2012).

Los genes R, pueden ser considerados como un producto de la coevolución de un Patosistema especifico, los cuales a través de bases moleculares complejas lograron reconocer específicamente los componentes del patógeno, asociándolos como extraños a su constitución genética normal. Este evento conduce a la activación de mecanismos de defensa a través de respuestas desencadenadas tanto por receptores de patrones moleculares asociados a microorganismos MAMPS como por el reconocimiento de proteínas efectoras producidas por el patógeno (Ingle *et al*., 2006; Dichkinson *et al*., 2003; López, 2007). Los patrones moleculares pueden ser elementos constitutivos del patógeno difícilmente alterables por el mismo, o compuestos derivados de la degradación de la pared celular de la planta.

Este evento ha conducido a una serie respuestas dirigidas tanto por la planta como por el patógeno. Las primeras destinadas a bloquear la infección, el desarrollo y la colonización del hongo y la segunda gobernada por la superación de las barreras y las defensas inducidas de la planta. Algunas de las más importantes se mencionan de la siguiente forma: 1) la identificación y el bloqueo de las respuestas de defensa de la planta a través de proteínas llamadas efectoras, alterando la señalización y la expresión de las respuestas de defensa. 2) la detección de proteínas efectoras condicionadas por el accionar de las proteínas de resistencia. En la figura 11, se presentan las vías de señalización durante las respuestas de defensa en plantas. En la misma figura, se pueden observar vías mediadas por los genes *NDR*1, *EDS*1 y *PAD*4, donde autores como López, (2007), menciona lo siguiente:

"Estas tres vías están asociadas con la acumulación del AS, sin embargo, también se presentan en las vías mediadas por JA y ET. La vía mediada por el gen *NDR1* (gen tipo CNL), la vía que depende de los genes *EDS 1* y *PAD 4* (genes de tipo TNL) y una tercera via en la cual los genes *R,* no poseen una estructura definida pero dependen de *EDS*1" (Lopez, 2007).

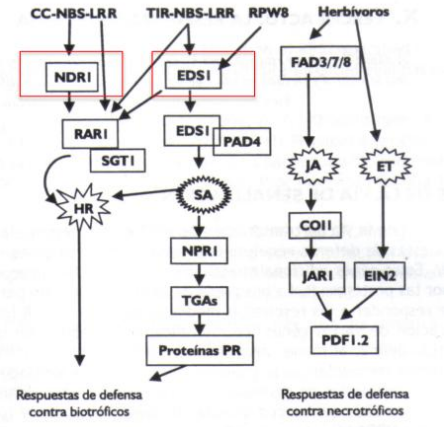


Figura 11. Vías de señalización durante las respuestas de defensa en plantas. Fuente: Tomado de López, 2007.

1.14 Interacción gen a gen

1.14.1 Proteínas efectores o *Avr* y de Resistencia

Los genes efectores o *Avr* del patógeno, son aquellos que pueden codificar proteínas responsables de interactuar con las proteínas producidas por los genes *R* de la planta (Flor, 1955). En una reacción incompatible, las proteínas Avr son identificadas por las proteínas R de la planta, suprimiendo el desarrollo y la colonización del patógeno. Sin embargo, en una reacción compatible las proteínas codificadas por los genes *Avr* pueden bloquear los sistemas de defensa de la planta y producir la infección a través del desarrollo y la colonización del patógeno (Flor, 1955). Cuando la proteína Avr es identificada por proteínas codificadas por genes *R*, se activan una serie de mecanismos de defensa, en los que se pueden encontrar la muerte celular localizada PCD o reacción hipersensible, especies de oxigeno reactivas ROS y flujos iónicos que usan la vía de transducción de señales con un papel importante de las MAP kinasas (Hammond *et al*., 2000); (López, 2007). En la tabla 2, se presentan los genes de resistencia y avirulencia clonados en diferentes patosistemas.

Tabla 2. Genes de resistencia y avirulencia clonados en diferentes Patosistemas.

Planta	**Gen R**	**Localización**	**Gen Avr**	**Patógeno**
Tomate	Prf	Intracelular	AvrPto	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
Arabidopsis	RPS2	Intracelular	AvrRpt2	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
Arabidopsis	RPM1	Intracelular	AvrRpm1, avrB	*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*
Arabidopsis	RPS5	Intracelular	AvrPphB	*Pseudomonas syringae* DC3000
Arabidopsis	RPP8	Intracelular	AvrRpp8	*Peronospora parasitica*
Tomate	Mi	Intracelular	-	*Meloidogyne incognita, Macrosiphum euphorbia*
Tomate	I2c	Intracelular	-	*Fusarium oxysporum*
Tomate	I2	Intracelular	-	*Fusarium oxysporum*
Arroz	Xa1	Intracelular	-	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
Arroz	Pib	Intracelular	-	*Magnaporthe grisea*
Papa	Rx	Intracelular	Proteína de cápside	Virus X de la papa
Papa	Gpa2	Intracelular	-	*Globodera rostochiensis*
Trigo	Cre3	Intracelular	-	*Heterodera avenae*
Capsicum	Bs2	Intracelular	AcrBs2	*Xanthomonas campestris*
Maíz	RpI-D	Intracelular	-	*Puccinia sorghi*
Arroz	Pi-ta	Intracelular	AvrPITA	*Magnaporthe grisea*
Cebada	Mla	Intracelular	-	*Erysiphe graminis*
Tabaco	N	Intracelular	Replicasa	Virus del mosaico del tabaco
Arabidopsis	RPP1	Intracelular	-	*Peronospora parasitica*
Lino	L6 L1-12	Intracelular	-	*Melampsora lini*
Lino	M	Intracelular	-	*Melampsora lini*
Arabidopsis	RPP5	Intracelular	-	*Peronospora parasitica*
Arabidopsis	RPS4	Intracelular	AvrRps4	*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*
Arroz	Xa21	Extracelular	-	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
Tomate	Cf-2	Extracelular	Avr2	*Cladosporium fulvum*
Tomate	Cf-4	Extracelular	Avr4	*Cladosporium fulvum*
Tomate	Hcr9-4E	Extracelular	Avr4E	*Cladosporium fulvum*
Tomate	Cf-5	Extracelular	Avr5	*Cladosporium fulvum*
Tomate	Cf-9	Extracelular	Avr9	*Cladosporium fulvum*
Remolacha	HSI pro-1	Extracelular	-	*Heterodera schachti*

Fuente: Takken y Joosten 2000

Según la tabla 2, existen diferentes patosistemas hasta el momento, así como genes *R* y *Avr* correspondientes a cada evento de interacción. Los términos efector y proteína *Avr* cumplen la misma función, sin embargo el primer vocablo se utiliza principalmente en resistencias de tipo no-hospedero, es decir, cuando no se ha determinado la respectiva proteína R que reconocerá la proteína efectora. El segundo vocablo se utilizara

solamente en Patosistemas donde ya se ha identificado la proteína R que reconoce la proteína Avr, antes llamada proteína efectora (López 2007).

Por otra parte, autores liderados por Argout *et al*., (2011) publicaron el 76% del tamaño estimado del genoma de *Theobroma cacao* L, con una descripción del 82% de los genes descritos hasta el momento y anclados en los 10 cromosomas que contiene la planta, evidenciando la expansión especifica de algunas familias de genes durante la evolución, como es el caso de los flavonoides. En su estudio, también muestran una fuente importante de genes candidatos para el mejoramiento de *T. cacao*, y como a través de un diagrama de Venn se pueden observar los genes compartidos entre los genomas de *T. cacao*, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Glycine max* y *Vitis vinífera*. Así mismo, relacionan al genoma de Cacao 253 genes tipo LRR-RLK ortólogos de genes de resistencia LRR-RLK de *Arabidopsis*. En cuanto a los genes *NBS* encontraron 297 ortólogos en el genoma, donde se resaltan los genes tipo *TIR*, y genes *NPR*1 que se encuentran en *A. thaliana*.

1.14.2 Modelos de interacción

Diferentes modelos de interacción planta-hospedero se han propuesto hasta el momento, sin lograr definir cuál es el más valido. Entre los planteamientos propuestos se han definido dos tipos de interacciones, las que se realizan de forma directa, y las de contacto indirecto. Entre los modelos más importantes se encuentran el modelo Gen por Gen, propuesto por (Flor, 1955), el cual describe la dominancia y el reconocimiento de una proteína Avr y un proteína de resistencia R, más tarde argumentado teóricamente por la presencia del dominio LRR en las proteínas R, apoyadas por una interacción proteína-proteína de estos mismos.

En la tabla 3, se presentan los genes de resistencia y avirulencia clonados en diferentes patosistemas, observando algunos de los genes *R* y *Avr* que han sido aislados, clonados y caracterizados molecularmente en diferentes especies de plantas y patógenos. Según De Wit, (1997), esto ha permitido predecir la estructura, localización y posibles mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la interacción entre las proteínas R y Avr.

Tabla 3. Genes de resistencia y avirulencia clonados en diferentes Patosistemas.

Planta	Gen R	Localización	Gen Avr	Patógeno
Tomate	Prf	Intracelular	AvrPto	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
Arabidopsis	RPS2	Intracelular	AvrRpt2	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
Arabidopsis	RPM1	Intracelular	AvrRpm1, avrB	*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*
Arabidopsis	RPS5	Intracelular	AvrPphB	*Pseudomonas syringae* DC3000
Arabidopsis	RPP8	Intracelular	AvrRpp8	*Peronospora parasitica*
Tomate	Mi	Intracelular	-	*Meloidogyne incognita, Macrosiphum euphorbia*
Tomate	I2c	Intracelular	-	*Fusarium oxysporum*
Tomate	I2	Intracelular	-	*Fusarium oxysporum*
Arroz	Xa1	Intracelular	-	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
Arroz	Pib	Intracelular	-	*Magnaporthe grisea*
Papa	Rx	Intracelular	Proteína de cápside	Virus X de la papa
Papa	Gpa2	Intracelular	-	*Globodera rostochiensis*
Trigo	Cre3	Intracelular	-	*Heterodera avenae*
Capsicum	Bs2	Intracelular	AcrBs2	*Xanthomonas campestris*
Maíz	RpI-D	Intracelular	-	*Puccinia sorghi*
Arroz	Pi-ta	Intracelular	AvrPITA	*Magnaporthe grisea*
Cebada	Mla	Intracelular	-	*Erysiphe graminis*
Tabaco	N	Intracelular	Replicasa	Virus del mosaico del tabaco
Arabidopsis	RPP1	Intracelular	-	*Peronospora parasitica*
Lino	L6 L1-12	Intracelular	-	*Melampsora lini*
Lino	M	Intracelular	-	*Melampsora lini*
Arabidopsis	RPP5	Intracelular	-	*Peronospora parasitica*
Arabidopsis	RPS4	Intracelular	AvrRps4	*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*
Arroz	Xa21	Extracelular	-	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
Tomate	Cf-2	Extracelular	Avr2	*Cladosporium fulvum*
Tomate	Cf-4	Extracelular	Avr4	*Cladosporium fulvum*
Tomate	Hcr9-4E	Extracelular	Avr4E	*Cladosporium fulvum*
Tomate	Cf-5	Extracelular	Avr5	*Cladosporium fulvum*
Tomate	Cf-9	Extracelular	Avr9	*Cladosporium fulvum*
Remolacha	HSI pro-1	Extracelular	-	*Heterodera schachti*

Fuente: Takken y Joosten 2000

El modelo de gen guardián, se apoya en el reconocimiento de proteínas R y Avr, no se establece de forma directa, y esta mediado por una tercera proteína llamada blanco de patogenicidad. En este modelo la proteína R se mantiene alerta para detectar cualquier tipo de modificación en la proteína custodiada. La consolidación del modelo se realizó bajo ensayos moleculares en *Arabidopsis,* donde identificaron la proteína RIN 4 (Axtell *et al*., 2003, Mackey *et al*., 2002-2003; Ingle *et al*., (2006); López 2007)

Posiblemente las historias evolutivas de cada Patosistema están influyendo en la adopción de un sistema de reconocimiento u otro. Es así como se podría pensar que la interacción constante de casi 200 años en el Patosistema Cacao-*M. roreri,* ha originado diferentes fuerzas coevolutivas que han moldeado la adopción de los diversos mecanismos tanto en la planta como en el patógeno. (Phillips *et al*., 2012, López 2007), sin lograr establecer un modelo específico para la interacción Cacao-Monilia.

1.14.3Señalización durante las respuestas de defensa en plantas

En un evento de interacción planta-patógeno, la colonización exitosa de la célula hospedera por el patógeno depende de ciertos factores, generalmente mediados por el ambiente, genotipo del hospedero y capacidad infectiva del patógeno (Agrios 2008). Sin embargo, los patógenos pueden desarrollar habilidades importantes para evadir los sistemas de defensa de la planta, entre las más importantes se pueden encontrar las siguientes: 1). La capacidad de evadir el sistema de detección por parte de los receptores de membrana de la célula huésped o evitando producir y enmascarar las moléculas elicitoras de respuestas de defensa. 2). La detoxificación de moléculas o compuestos antimicrobianos producidos durante una respuesta de defensa. 3) Alta tasa de crecimiento que le confiera capacidad de alejarse rápidamente del sitio donde se está dando con mayor intensidad la respuesta de defensa.

Las vías de señalización se encuentran asociadas con la acumulación del ácido salicílico, el ácido jasmonico y el etileno, definidas por tres rutas principales y mediadas por genes con estructura definida. La primera intervenida por el gen *NDR*1 (genes con dominio (Coiled-coil, NBS y LRR). La segunda mediada por los genes *EDS*1 y *PAD*4, con dominios (TIR – NBS Y LRR), y una tercera vía sin una estructura definida pero dependientes de EDS1 (ver figura 11).

Los eventos de señalización que ocurren para la activación de la inmunidad mediada por PTI o ETI, son comunes, encontrando un sobrelapamiento considerable en las respuestas intracelulares. Entre las más estudiadas se pueden nombrar las siguientes: activación de la transcripción de genes relacionados con defensa, apertura de canales iónicos en la membrana plasmática, activación de vías MAP quinasas MAPK (Mitogen-reactive oxyegen species), fortificación de paredes celulares a través de la deposición de calosa, síntesis y acumulación de fitoalexinas (Hammerschimidt, 2003; Colcombet y Hirt, 2008).

Básicamente, la detección de PAMPs permite la reprogramación de la expresión génica. Como ejemplos se pueden citar los genes *FRK*, *At2g17740* y *WRKY22/29,* reportados por autores como (Asai *et al*., 2002; Shan *et al*., 2008), en la activación de la PTI. Otro factor importante en la inmunidad es la presencia de proteínas relacionadas con la patogenicidad, las cuales son consideradas como expresiones de los genes de resistencia. Entre las actividades más importantes de estas proteínas se han relacionado la actividad quitinasa y glucanasa. Autores como Slaughter *et al*., 2012; Sudisha *et al*., 2012; Zhang *et al*., 2012) reportan su actividad de defensa ante eventos de infección, convirtiendo a los genes que las producen en marcadores de resistencia, incluyendo el nivel de su expresión como un indicador de la amplitud de la resistencia. Un ejemplo de ellos son las proteínas PR1, PR2, PR3, PR4 y PR5, marcadores de resistencia descritas por (Loon *et al*., 2006).

1.15 Susceptibilidad encendida por efectores

La susceptibilidad encendida por efectores de patógenos (ETS), es un mecanismo utilizado por los fitopatógenos para superar la inmunidad mediada por PAMPs (PTI). Actualmente existen muchas interacciones bajo las cuales se logra la suceptibilidad de la planta, sin embargo, entre los más estudiados se pueden mencionar el sistema de secreción tipo III (T3SS) y las proteínas efectoras de virulencia secretadas a través de el en bacterias del genero Pseudomonas principalmente. Como ejemplo de ello se puede mencionar los efectores AvrPtoB de Pst DC3000 (Gohre *et al*., 2008), los efectores AvrPto que bloquean la actividad de las MAPKs quinasas (Abramovithc *et al*., 2006; Rasmussen *et al*., 2012).

Otro tipo de efectores secretados a través del sistema T3SS son aquellos que pueden interferir en los cloroplastos de la célula hospedera, alterando la producción de AS y por consiguiente disminuyendo la amplitud de la respuesta de resistencia (Jelenska *et al*., 2007). Como ejemplo se puede citar el efector Hopl1 de *P. syringae* pv maculicola. Al respecto, investigadores como (Torres-Zabala *et al*., 2007), reportan la actividad de efectores AvrPto en fitoreguladores como el ácido abscísico ABA, molécula que puede inducir la apertura y cierre estomático, así como su concentración en el interior de la célula podría favorecer el crecimiento y desarrollo de los fitopatógenos.

También se ha descrito la relación filogenética de especies hospederas y su interacción con las interacciones que pueden albergar un determinado patógeno adaptado. Es decir, entre más alejadas filogenéticamente las especies hospederas, el repertorio de efectores de un patógeno adaptado para una de ellas, se hace inefectivo para causar enfermedad en la otra. Esto debido a que se reduce la especificidad efector-NBS-LRR, pero aumenta la PTI. Es por esta razón que la PTI es considerada la respuesta principal de la resistência no hospedero.

1.16 Silenciamiento génico

El silenciamiento génico se describió inicialmente como un mecanismo de defensa desarrollado por las plantas para la protección a infecciones víricas. Actualmente se ha comprobado su uso para defensa contra hongos, nematodos e incluso mamíferos, también es utilizado como regulador de la expresión de genes endógenos y para el control de la invasión genómica por sus propios transposones. López (2007) en su revisión llamada Fitopatología Molecular define el silenciamiento génico de la siguiente forma:

"*El silenciamiento génico puede ser dividido en etapas, involucrando diferentes actividades enzimáticas. El punto de entrada de PTGS es la producción de ARN de doble cadena (dsARN). Los dsARN son reconocidos por una ARNasa de tipo III llamada DICER, la cual produce ARN pequeños de 21-24 nt que poseen 2 nt salientes en el*

extremo 3´ (siARNs). Estos siARNs se incorporan dentro de un complejo multiproteico denominado RISC (RNA-induced Silencing Complexes). Dentro del complejo RISC, una helicasa separa las dos cadenas de los siARNs, lo que permite a RISC, por apareamiento de bases, reconocer las moléculas de ARN blanco, las cuales son entonces degradadas".

Mecanismos de defensa que aún no se han descrito en el Patosistema Cacao-*M. roreri*.

1.17 Estudios moleculares sobre el patógeno.

Colombia es considerado como el centro de origen de *Moniliophthora roreri*, en razón a la máxima de la diversidad del hongo, lo cual fue determinado mediante estudios morfológicos, fisiológicos y moleculares (Phillips-Mora, 2003); (Phillips-Mora, Aime & Wilkinson, 2007). La caracterización de la enfermedad se realizó en los países latinoamericanos donde se encontraba la Moniliasis en la época. Las pruebas morfo fisiológicas consistieron tanto en evaluaciones macro y microscópicas de cada cepa como en estudios de velocidad de crecimiento. Estos análisis fueron complementados con amplificaciones de fragmentos de ADN de longitud polimórfica AFLPs y por análisis de secuencias simples repetitivas SSR, secuencias de regiones ITS de los genes ribosomales de cada cepa, (regiones ITS1, ITS 2 y la subunidad ribosomal 5.8s). Según los autores el estudio arrojo limitada evidencia para soportar la tesis de que *M. roreri* es capaz de reproducirse en forma sexual según lo descrito por Evans *et al*, (2002), fenómenos que al parecer, solo se dan bajo condiciones específicas.

Las barreras geografías que existen entre Colombia y los demás países no fueron suficientes para evitar la diseminación del hongo, tomándole más de 170 años para colonizar 13 países de las Américas (Phillips *et al*., 2007). Actualmente, se reconocen 5 grupos genéticos, llamados de la siguiente forma: el *GG Bolívar*, presente en el Departamento de Norte de Santander en Colombia y en las provincias Guayas, Manabí y Napo en los límites de Ecuador, detectado también en Venezuela y Perú. El *GG Colombia Co-Occidental,* encontrado en Centro América y el centro de Ecuador. El *GG Colombia Oriental*, detectado en el departamento de Santander en Colombia. El *GG Colombia Central*, detectado en los departamentos de Antioquia, Caltas y Huila. Finalmente el *GG Gileri*, aislado del noroccidente ecuatoriano de plantas silvestres. La

presencia de cuatro de los 5 grupos genéticos en Colombia apoya que el país sea su centro de origen.

Según las dos técnicas moleculares que utilizaron (AFLP/SSR) y los secuencias obtenidas por la región ITS de cada cepa, los autores dividieron los aislamientos en dos conglomerados. El primero llamado *Orientalis*, el cual incluía a los grupos genéticos *GG Oriental*, *Central*, y *Bolívar*. El segundo grupo llamado *Occidentalis*, con los grupos genéticos GG Co-Occidental y Gileri. El primer conglomerado aparentemente originado en el nororiente colombiano y el segundo en el nor-occidente colombiano (Phillips-Mora, Aime & Wilkinson 2007). A partir de la dispersión de la población inicial, las barreras geográficas existentes entre los conglomerados seria la causa de la divergencia en cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos, (Phillips-Mora, 2003).

Actualmente, diferentes estudios han contribuido al entendimiento evolutivo de *Moniliophthora roreri*, entre ellos el publicado por (Costa y cols., 2012), basado en la secuenciación del genoma mitocondrial y su comparación con el ADN mitocondrial de *Moniliophthora perniciosa*, investigación que permitió definir la abundancia de plasmidos lineales en *M. roreri* y secuencias repetitivas en *M. perniciosa*, diferencias que posiblemente pueden estar relacionadas con las necesidades fisiológicas y de desarrollo de cada especie.

1.18 Importancia de los marcadores moleculares

El descubrimiento de las bases moleculares durante los años 50 abrió un mundo de nuevas posibilidades científicas para el conocimiento y mejor aprovechamiento de la agricultura, contribuyendo en gran medida a la llamada revolución biotecnológica (Phillips 1998).

Los marcadores moleculares pueden ser considerados como aquellas moléculas de proteínas o ADN que pueden identificar, caracterizar y definir un genotipo determinado (Ferreira *et al*., 1998). Muchos de ellos permiten la asociación de genotipos con fenotipos específicos, siendo considerados actualmente como una herramienta eficaz para estudiar la información genética de cualquier organismo. Su contribución permitió el desarrollo exponencial de la genómica estructural, a través del análisis de la información contenida

en el ADN, donde se encuentra técnicas como los marcadores de tipo Microsatelites SSR, AFLPs, RAPD, EST, RFLP y los SNP.

Hoy en día son herramientas de información distribuidas ampliamente y aplicadas según la necesidad de cada investigación. Se han utilizado casi en todas las áreas científicas, cambiando la historia de la biología evolutiva y sistemática. Su contribución al Patosistema Cacao-*M. roreri*, se basa principalmente en la determinación del centro de origen, el conocimiento de la variabilidad de las poblaciones, la distribución, estructura genética y la identificación de especies y cepas. Así mismo su empleo ha permitido la asociación de rasgos cuantitativos QTLs con la asociación rasgo-marcador y la selección asistida por marcadores.

Existen dos tipos de marcadores moleculares: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN (Phillips 1998). Algunas de estas técnicas se pueden clasificar según la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (Mullis *et al.,* 1986). Al respecto, autores, como Karp *et al*., (1997) citado por (Azofeifa 2006), las dividen en tres categorías básicas, Categoría 1: métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, RFLP y número variable de repeticiones en tándem (VNTRs). Categoría 2: técnicas que utilizan iniciadores (primer) arbitrarios o semiarbitrarios. Por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP), RAPD, RAMPO. Categoría 3: PCR con sitio “objetivo específico”. Por ejemplo, SSR. Las categorías 2 y 3 son marcadores basados en la PCR; entré los marcadores de uso más amplio se pueden mencionar los siguientes:

Isoenzimas: fueron los primeros marcadores moleculares tipo proteínas usados en genética de plantas (Tanksley *et al*., 1983). Las isoenzimas o aloenzimas son las proteínas más ampliamente estudiadas como marcadores moleculares (Powell 1992), son variantes de una misma enzima, que comparten un sustrato común pero difieren un su movilidad electroforética (tamaño, carga o conformación) (Marder *et al*., 1959) citado por Phillips (1998). En Cacao su uso se ha concentrado en la caracterización de genotipos (Lanaud 1986; Yidana *et al*., 1988; Ngambi-Ndjama 1988)

Por otra parte, marcadores moleculares como los SSR, AFLP y RAPD se apoyan fundamentalmente en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa PCR. Método

que también ha suministrado otro tipo de marcadores como los (SCARs) o regiones amplificadas de secuencias caracterizadas, los (SAMPLs) o amplificación selectiva de loci polimórficos, la (RAF) amplificación azarosa de las huellas del ADN "ADN Fingerprinting" y (DAMD) o amplificación directa con ADN microsatélites (Ramage *et al.* 2004; Saxena *et al.* 2005). Entre los más estudiados en el Patosistema Cacao se encuentran los siguientes:

Microsatelites: los Microsatelites SSR, son secuencias simples repetitivas ubicadas en tándem de 2 a 5 nucleótidos que se encuentran dispersas en todo el cromosoma, las cuales pueden o no estar asociadas con los genes. Generalmente se usan para estudios de diversidad genética y mapeo. Según su conformación tienen la capacidad de identificar polimorfismos en variedades muy relacionadas y en especies muy similares entre sí. Su complementariedad con otras técnicas la constituyen en una herramienta muy útil para establecer diferencias entre grupos genéticos apoyados en el número de repeticiones que contiene cada genotipo estudiado.

La técnica posee una herencia de tipo codominante y se usa de acuerdo a la necesidad de la investigación, resultando muy adecuada en la búsqueda y esclarecimiento de relaciones genealógicas. Sus principales características son la alta variabilidad, su aspecto neutral dentro de las poblaciones, su elevado contenido de información polimórfica, su distribución y frecuencia, sumada a la poca cantidad de ADN que se requiere para trabajar con ellos los convierten en una técnica adecuada para trabajos moleculares. Utiliza la PCR para la amplificación y sus productos pueden ser visualizados mediante gel de agarosa de alta resolución o mediante automatización mediante electroforesis multiplex y lectura en secuenciador de ADN.

Un método derivado de los Microsatelites es la AMP-PCR iniciada con Microsatelites anclados. Al respecto Azofeifa (2006) cita a Valadez *et al*., 2000 y menciona que esta técnica emplea iniciadores con "anclas" en sus extremos 3´ o 5´, los cuales utilizan de una a tres bases adicionales al microsatélite, por ejemplo; C(CT)8, CA(CT)8, CAC(CT)8 o (CT)8C, (CT)8CA y (CT)8CAC, y sirven para seleccionar aquellas islas de Microsatèlites en el genoma que están flanqueando con el complemento de bases específicas, por ejemplo; T(TA)8, GT(GA)8, GTG(GA)8 o (GA)8G, (GA)8GT y (GA)8GTG, por lo que se incrementa su especificidad.

La técnica de Microsatelites constituyo una de las herramientas importantes para determinar el centro de origen del Cacao (Alto Amazonas), hipótesis apoyada por Motamayor *et al*., (2002-2008) al determinar polimorfismos en accesiones centroamericanas que le permitieron respaldar al Alto Amazonas como origen probable y ruta de dispersión del Cacao hasta su establecimiento y domesticación en México. En la tabla Nº 4, se presentan las características más importantes de los diferentes tipos de marcadores moleculares. En la misma tabla se puede observar la alta variabilidad y reproducibilidad y el costo medio de los marcadores microsatélites, lo cual constituye uno de los principales causales para la aceptación de esta herramienta molecular.

Tabla 4. Características más importantes de los diferentes tipos de marcadores moleculares.

Tipo	Variabilidad	Herencia	Genoma	Reproducibilidad	Costo
RFLP	Media	Codominante	Completo	Alta	Medio
PCR-RFLP	Media	Codominante	Parcial	Alta	Medio
RAPD	Alta	Dominante	Completo	Baja	Bajo
AFLP	Alta	Dominante	Completo	Media	Medio
Microsatélites	Alta	Codominante	Parcial	Alta	Medio
Secuenciación	Media	Codominante	Parcial	Alta	Alto
SNP	Alta	Codominante	Parcial	Alta	Alto
EST	Media	Codominante/Dominante	Parcial	Alta	Alto

Fuente: Tomado de Astorga 2008.

Al respecto, estudios realizados en el Centro de Agricultura Tropical de investigación y Extensión CATIE, utilizaron marcadores moleculares de tipo ***RFLP*** para determinar los parentales verdaderos de 120 árboles que aparentemente pertenecían al cruce Catongo x Paund 12. Los resultados demostraron que solo 55 plantas se clasificaban como híbridos verdaderos, 29 correspondían a autopolinización del Paund 12, tres a autopolinización del Catongo y el remanente sin origen conocido Morera *et al*., (1994).

Tabla 5. Utilidad y aplicaciones de los marcadores moleculares en Cacao.

Autor	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Brown *et al*.,2007; Cervantes *et al*., 2006; Clement et al., 2003a; Crouzillat et al 2000;	Búsqueda de caracteres de interés agronómico	QTLs	QTL´s asociados con resistencia a Phytophthora palmivora
Feltus *et al*., 2011; Flament *et al*., 2001; Lanaud *et al*., 1995; L2009; Risterucci et al., 2000-2003	Búsqueda de caracteres de interés agronómico	Isoenzimas, RFLP, RAPD, AFLP, SSR	QTL´s asociados con resistencia a Phytophthora palmivora
Pugh *et al., 2004*	Desarrollo e integración de nuevos marcadores microsatélites a mapa de ligamiento.	SSR, RFLP, Isoenzimas	Desarrollo de mapa de ligamiento, más detallado, asado en marcadores codominantes. El nuevo mapa consta de 465 marcadores; 268 SSRs, 176 RFLPs, cinco isoenzimas y 16 Rgenes-RFLP dispuestos en 10 grupos de ligamiento que corresponden al número haploide de cromosomas de la especie.
Crouzillat *et al., (2000a)*	Determinar los componentes genéticos que controlan la producción en la F1 de cruces entre clones de Catongo y Pound 12.	RFLP, RAPD y AFLP	Los marcadores solos o en combinación con los fenotipos permitieron una selección temprana de los árboles más productivos. Desarrollo de mapas genéticos.
Crouzillat *et al., (2000b)*.	Posible uso de marcadores relacionados a resistencia de enfermedades.	RFLP, RAPD y AFLP	Desarrollo de mapa genético.
Brown *et al*., 2007; Cervantes *et., al*2006; Lanaud *et al*., 2009	Búsqueda de caracteres de resistencia asociada a *Moniliophthora roreri*	SSR	Localización de QTL´s asociados a resistencia a Moniliophtora roreri
Lanaud *et al., 2004*	Mapeo genético y caracterización de gen candidato.	PCR	Secuenciación de genes relacionados a la defensa y resistencia contra Phytophthora
Lerceteau *et al. (1997); N¨Goran et al., 2000*	Análisis de la diversidad genética	RFLP	La técnica permitió la discrimina ción entre los

			genotipos estudiados.
Cervantes *et al*., 2006; Clement et al., 2003 a y b; Crouzillat et al., 1996; Feltus et al., 2011	Búsqueda de caracteres de interés agronómico	QTL´s	Caracteristicas cuantitativas asociadas a caracteres morfológicos (vigor, floración, rendimiento, número de óvulos, índice de grano y peso de mazorca)
Brown *et al*., 2005;Faleiro *et al*., 2006; Figueira *et 2006;* Lanaud *et al*., 2009;Queiroz *et al*., 2003	Búsqueda de caracteres de interés agronómico	QTL	QTL´s asociado con resistencia a Crinipellis (Moniliophthora) perniciosa

Fuente: Azofeifa, 2006; Astorga, 2008 y Ovando, 2012, modificado por el autor

Entre las herramientas moleculares más utilizadas para estudios evolutivos y de diversidad del Cacao, se encuentran los Microsatelites, técnica ampliamente utilizada para identificar polimorfismos, además de su facilidad en la automatización y la reproducibilidad del proceso. Al respecto autores como Lanaud (1999); y Saunders y Saunders y Hemeida (20004) han seleccionado y propuesto un estándar internacional de 15 marcadores Microsatelites, partieron de 25 previamente descritos como potenciales candidatos para conocer la diversidad genética, revelar la presencia de accesiones duplicadas y la estructura poblacional de las accesiones (Irish *et al*., 2009); (Johnson ,2009); (Ruiz, 2011), fortaleciendo el uso responsable de los bancos de germoplasma en todo el mundo.

Al respecto Zhang *et al*., (2009), evaluó la colección de Cacao del banco de germoplasma del Centro de Agricultura Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE en Costa Rica, considerada una de las más completas del mundo, concluyendo la presencia de redundancia genética en las accesiones y respaldando la versatilidad de los Microsatelites como herramienta molecular confiable y reproducible. Esta herramienta también ha sido de ayuda para la caracterización de la resistencia a enfermedades como la Escoba de bruja y la Moniliasis (tabla 4 y 4-1), identificando marcadores Microsatelites

específicos para grupos de plantas resistentes y suceptibles (Santos *et al*., 2007) ligados a características cuantitativas QTLs (Brown *et al*., 2007).

Los QTLs son caracteres cuantitativos cuya variación fenotípica es continua y determinada por la segregación de más de uno y a menudo por muchos loci o genes, su herencia tiene un patrón poligénico (Powell 1992; Tanksley *et al*., 1983) y seutilizan para el mejoramiento genético del Cacao, por su utilidad en la selección de plantas en estados tempranos de desarrollo (semillas, plántulas, etc.) y por permitir no solo encontrar el locus que está ligado con una característica, sino también por identificar el gen asociado con ese locus (Phillips 1998).

En ese sentido Brown y cols., (2007), a partir de una población F1 de Paund 7 x UF 273 ubicada en Costa Rica-CATIE, crearon un mapa de ligamiento utilizando 180 marcadores; los autores asociaron los grupos de ligamiento 2, 7 y 8 a características cuantitativas como la resistencia a *M. roreri,* para los grupos de ligamiento 4, 8 y 10 la resistencia a *Phytophthora* sp, y para la altura de la primera horqueta los grupos 4 y 6 en los 10 grupos de ligamiento. Así mismo, Ovando (2012), menciona la importancia de las herramientas moleculares para la construcción de mapas de ligamiento y búsqueda de loci asociados a caracteres cuantitativos QTLs. Igualmente muestra como los principales intereses de los avances moleculares en Cacao se han centrado en los últimos años en características como la resistencia a enfermedades, el vigor de las plantas, el número de óvulos y las características de mazorca y grano. Asi mismo resalta la importancia económica de las enfermedades como el eje central de los esfuerzos para la localización de los genes responsables de conferir resistencia a algunos genotipos de Cacao, y menciona como los estudios en búsqueda de genes de resistencia genética han tomado gran parte de la motivación de autores, mientras que un porcentaje menor de trabajos se enfocan en la búsqueda de genes involucrados en caracteres morfológicos de árboles, frutos y almendras (Cervantes-Martínez *et al*., 2006; Clement *et al*., 2003ª, 2003b; Crouzillat *et al*., 1996; Feltus *et al*., 2011)

La complementariedad de las herramientas moleculares ha constituido avances importantes en las evidencias moleculares del Cacao en los últimos 20 años. En Colombia, estudios de diversidad genética realizados en el banco de germoplasma de la estación experimental la Suiza en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica-, han complementado técnicas como los RAPD, RFLP y los SSR

(Sánchez 2007), reportando similaridad entre algunos materiales, sugiriendo la presencia de duplicados, estos resultados son importantes en la depuración de las colecciones establecidas en el banco de germoplasma en Colombia.

Así mismo, a través de modelos de unión temporal entre entidades colombianas como Fedecacao y Corpoica se han realizado estudios para la caracterización de genotipos regionales colombianos e introducidos, encontrando dos grupos genéticos muy distantes, el primer grupo ubicando los materiales regionales de Colombia y los introducidos de Ecuador, Trinidad, Perú y USA. En el segundo grupo ubicaron algunos genotipos reconocidos como criollos con una similitud cercana al 90%.(Aránzazu *et al*., 2009)

Estas investigaciones permiten respaldar la técnica de los Microsatelites como una herramienta importante para estudios de genética básica y mejoramiento vegetal, fortaleciendo el recurso genético en Colombia y orientando la selección de nuevos materiales de siembra (Hernández, 2013).

Recientemente un grupo de investigadores encabezados por Argout *et al*., (2011) publicaron los avances en la secuenciación del genoma del Cacao (*Theobroma cacao* L), posiblemente uno de los adelantos más importantes en la historia del Cultivo. En su trabajo resaltan la presencia de algunos genes relacionados con la producción de flavonoides y su importancia para la calidad del Cacao. Igualmente, proporcionan una fuente importante de genes candidatos para el mejoramiento genético de *Theobroma cacao* L, sobre la base de la complementariedad que existe entre proteomas de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinífera*, *Populus* sp y *Glycine max.*

Al mismo tiempo, una serie de autores liderados por Costa *et al*., 2012, secuenciaron y compararon el genoma mitocondrial de *Moniliophthora roreri* con *Moniliophthora perniciosa*, resaltando el tamaño del ADN mitocondrial del patógeno (95 Kb) y encontrando su homología con el agente causal de la escoba de bruja. Al respecto Argout, *et al*., 2011, demuestra la presencia de dos tipos de (genes R), los de tipo NBS-LRR (sitios de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina) y los de tipo RPK (receptores proteína kinasa), así como un nivel relativamente alto de similaridad en los procesos metabólicos y celulares, basados en la comparación y la complementariedad de

genomas (diagrama de Venn). Información que permitirá el entendimiento de la bioquímica y el mejoramiento genético del Cacao.

Según el estudio genético, un porcentaje muy pequeño de los genotipos de Cacao en el mundo son los encargados de producir semillas de sabor y aroma (no supera el 5% de la producción mundial), resultados soportados en las características sensoriales que los genotipos criollos poseen (Argout *et al*., 2011); comportamiento que sumado al interés progresivo de la industria de calidad en Cacao ha motivado a la profundización de los estudios asociados a las características sensoriales del cultivo, cada vez más dependientes de las exigencias del mercado. Al respecto, autores como Aidé *et al*., 20013, reporta la importancia del Cacao como materia prima para la elaboración de chocolatería y confitería, resaltando tanto los criterios de calidad física, química y sensorial del grano como la fuerte influencia del el origen y la región del cultivar para la aceptación final del producto.

En los últimos 15 años diferentes autores han reportado sobre la calidad y las cualidades sensoriales de los grupos de cacao Criollo, Forastero y Trinitario (Papalexandratou *et al*., 2011a-2011b; Rodríguez *et al*., 2011; Dongo *et al*., 2009) así como la relevancia del origen genético (Sukha *et al*., 2005; 2005 Eskes *et a*l., 2007) y los criterios importantes para la buena fermentación del grano y el manejo postcosecha (Afoakwa *et al*., 2008; Ciferri *et al*., 1957; Clapperton *et al*., 1994).

Finalmente, a pesar de la presencia de *Moniliophthora roreri* y de la constante amenaza de dispersión hacia los continentes más productores del mundo, el cultivo del Cacao se proyecta cada vez más con un gran potencial socioeconómico, receptor de la industria cambiante y de los mercados cada vez más especiales. Según lo anterior, las herramientas moleculares se muestran como una alternativa viable para el entendimiento, la comprensión de la compleja realidad del cultivo.

1.19 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se basa en la separación de diferentes moléculas presentes en una disolución de sustancias o iones cargados eléctricamente a partir de la relación masa/carga y el uso de capilares. La inducción de cargas eléctricas aumenta la

sensibilidad de la separación entre las moléculas y disminuye el tiempo de análisis (Virtanen; Mikkers, 1979). En el caso de ADN, los fragmentos que se analicen deberán estar unidos a fluorocromos que serán detectados por un láser de argón, excitándolos a distintas longitudes de onda y favoreciendo el análisis de múltiples fragmentos al mismo tiempo. El desplazamiento normalmente se realiza hacia el polo opuesto según la carga del fragmento y la separación según la longitud de campo eléctrico, condicionando la velocidad a través del capilar según peso molecular (Castagnino, 1999).

Según el potencial para analizar un gran número de fragmentos en corto tiempo, la técnica de electroforesis capilar se está utilizando con éxito en el análisis de productos amplificados de marcadores moleculares, permitiendo la cuantificación real de los fragmentos de ADN generados después de la PCR, dado que junto a los marcadores fluorescentes se añade un marcador del tamaño molecular, en ese sentido, se podrán combinar diferentes tamaños alélicos en la misma muestra por lo que cada capilar analizara varios fragmentos.

En relación con el análisis estadístico de los resultados obtenidos después de emplear este tipo de técnicas, actualmente existe una variedad de programas que permiten su interpretación; para el caso de los microsatélites, en el presente estudio además de la cuantificación de la variabilidad genética, para el manejo adecuado de la información se estableció la huella y parámetros genéticos como el número de alelos por locus, la Heterocigocidad esperada (He) y observada (Ho), el índices de contenido polimórfico, la estimación de las distancias geneticas poblacionales y el análisis de componentes principales de los cultivares evaluados. Así mismo se determinó la respuesta de resistencia en campo a *M. roreri* bajo ensayos controlados de campo, actividades desarrolladas en el segundo y tercer capítulo del presente estudio.

2. Respuesta de cultivares de *Theobroma cacao* L a la infección por *Moniliophthora roreri*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe un interés mundial por mantener y aumentar la producción del grano; esta situación favorable se refleja en la preparación de Colombia para responder a las exigencias que esto implica, generando alternativas que promueven sosteniblemente la producción de cacao.

Colombia es un país productor y consumidor de Cacao principalmente en forma de bebida, gran parte de su producción se dedica al consumo interno y es comercializada directamente por la industria nacional. Su producción promedio es inferior a los 500 kilogramos/hectárea/año, donde diversos factores han contribuido para ello, entre los que se encuentran: el alto grado de incompatibilidad de plantaciones, la edad avanzada del cultivo, bajos niveles de tecnología y la alta susceptibilidad a enfermedades; causantes de grandes pérdidas en la producción (Aranzazu *et al*., 2014). Al respecto, diferentes instituciones durante los últimos años han estudiado posibles opciones para mejorar la producción y el manejo integrado de la enfermedad, entre ellas la búsqueda de materiales élites con características de productividad, resistencia y otras alternativas al control cultural, químico, biológico y genético.

Aquellos materiales que provienen de otros países se le denomina introducidos o universales, mientras que los cultivares que son seleccionados de plantaciones colombianas de edad avanzada se les denomina regionales (Aranzazu, 2014). En tal sentido, la diversidad genética del país puede ser vista de forma comercial o regional, la primera considerada estrecha y constituida principalemnte por clones introducidos y en menor proporción regionales; la segunda razonada como amplia y diversa, constituida por plantaciones de mas

de 90 años que conforman mas el 90% del área sembrada (Fedecacao, 2014). De esta forma y dada la estrecha base genética comercial del cultivo se podria tener un gran potencial con los arboles hibridos de edad avanzada, los cuales pueden aportar una amplia diversidad genética la base comercial que existe en la actualidad.

Esta base genética regional promisoria de materiales de cacao se encuentran en riesgo de desaparecer por diferentes factores de índole social, económica, cultural y técnica (Fedecacao, 2014). Condición preocupante si se tiene en cuenta la estrecha base genética de materiales de carácter regional con registro comercial ICA aplicable a proyectos productivos, realidad que ofrece poca variabilidad para desarrollar programas de investigación en mejoramiento genético y fitopatología avanzada.

La Moniliasis es una enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, que en la actualidad se sigue considerando como la más importante del cultivo (Evans 2013; Phillips-Mora 2003), seguramente por el gran potencial de adaptación y por su afinidad a las condiciones medioambientales que lo rodean. Habilidad que le ha permitido por cerca de 200 años, colonizar 13 países productores del grano en las Américas, definiéndola como la enfermedad potencial más compleja y peligrosa para la producción del grano en el mundo. En términos económicos podrían mencionarse cifras anuales de pérdidas del orden de 16.000 toneladas por año, que representan un valor superior a los 45 millones de Dólares, dinero que podría recuperarse para los productores, al implementarse controles más efectivos de la enfermedad.

Actualmente, la coevolucion que ha presentado el Patosistema Cacao-Monilia, constituye una herramienta de investigación básica, necesaria para comprender los mecanismos de infección del patógeno y las posibles reacciones que presenta la planta frente a su infección; eventos que son considerados como respuestas de resistencia de carácter Poligénico (Phillips, 2008), permitiendole a la planta una respuesta diferencial a la infección del patógeno, condición que puede ser regulada por factores como: diferencias en la patogenicidad del agente causal, diferencias en los genes que gobiernan la resistencia de la planta hospedante, los ambientes que afectan la expresión final y la intensidad del desarrollo de la enfermedad. Al respecto, países como Costa Rica, Ecuador, Perú y Brasil, están implementando formas más efectivas para reducir las pérdidas por enfermedades, entre ellas, el establecimiento de materiales genéticos resistentes. En Colombia, durante los

últimos 10 años, entidades como la Federación Nacional de Cacaoteros, ha registrado datos productivos y fitosanitarios, estableciendo parcelas demostrativas en las principales regiones productoras del país, realizando pruebas de selección de árboles según sus características de productividad y respuesta a enfermedades.

Entre los cultivares seleccionados y evaluados, se están destacando algunos clones regionales por sus bajos porcentajes de infección en las diferentes parcelas del país. Por lo anterior, la institución ha realizado algunas pruebas de resistencia genética en campo, resultados que fueron consolidados con las pruebas realizadas en el presente trabajo, robusteciendo la información y contrastándola con la respuesta fitosanitaria de los materiales en campo, afianzando que la incidencia de la Moniliasis no es igual en todos los cultivares.

Esta actividad buscó conocer la respuesta a la infección por *M. roreri* en algunos clones regionales que tiene el País. Los resultados permitieron apoyar y fortalecer el nuevo desarrollo cacaotero, fortaleciendo alternativas de manejo tales como el control genético para ser incorporadas dentro del manejo integrado del cultivo del Cacao. Al respecto, este capítulo tiene por objetivo, demostrar la existencia de nuevas fuentes de resistencia a Moniliasis en Cacao, como una contribución a los esfuerzos que se vienen haciendo para reducir las pérdidas de esta enfermedad.

2.1 Materiales y métodos

2.2 Localización

La evaluación de la respuesta a la infección por *Moniliophthora roreri* se realizó en la colleción de cultivares de Cacao de 8 años de edad establecidos en la granja Villa Mónica, en el Centro Nacional de Capacitación de la Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia, localizado en el municipio de San Vicente de Chucuri en Santander. El inóculo se preparó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Fedecacao y se obtuvo de un inóculo natural de campo, tomado de un fruto en estado de mancha dejado sobre cámara húmeda para incrementar su esporulación.

En la figura 12, se presenta la ubicación geográfica de la granja Villa Mónica en San Vicente de Chucuri-Santander. En la misma figura se puede observar como el municipio se encuentra a 6º 52' 37.3" de longitud oeste y 73º 24' 47.7" de latitud norte, y a una altura de

692 m.s.n.m. Tiene una temperatura promedio anual de 27 °C, y una temperatura máxima y mínima de 27 °C y 13 °C, respectivamente. La precipitación media anual es de 1900 a 3100 mm. De acuerdo con la clasificación de zonas de vida de Holdridge y según su distribución geográfica, esta región está conformada por cuatro tipos de bosques, denominados de la siguiente forma: Bosque húmedo tropical, Bosque muy húmedo premontano, Bosque muy húmedo montano bajo y Bosque pluvial montano. La investigación se desarrolló en la zona de Bosque húmedo tropical, la cual se refleja en las coordenadas descritas anteriormente.

Figura 12. Ubicación geográfica de la granja Villa Mónica en San Vicente de Chucuri de 2014. Fuente: Google earth.

Las parcelas demostrativas comprenden 210 árboles regionales constituídos por 21 genotipos seleccionados en fincas de agricultores, en donde se evalúan por características sensoriales, productivas y fitosanitarias. En ella cada cultivar está representado por 10 árboles útiles plantados en una hilera, generalmente distanciados a 3 metros entre hileras y 3 metros entre plantas. Para la investigación se seleccionaron 16 genotipos de esta colección, teniendo en cuenta sus características de resistencia frente a la infección por *M. roreri*. En la tabla 6, se presentan algunas características principales de los materiales de Cacao (*Theobroma cacao* L) que fueron evaluados en el presente trabajo de investigacion. Así mismo, en la figura 14, se presenta la ubicación geográfica de las parcelas demostrativas.

En la tabla 16, también se puede observar el país de origen, los posibles parentales y algunos descriptores tanto morfológicos (del fruto) como productivos y fitosanitarios de los cultivares. Entre los más importantes se encuentran el rendimiento, el índice de mazorca (Nº de frutos para hacer un Kg de Cacao), la reacción a Monilia, la compatibilidad y tanto el color como la rugosidad del fruto.

Tabla 6. Características principales básicas de los cultivares de Cacao (*Theobroma cacao* L), evaluados

							Fruto	
Cultivar	País de Origen	Origen	Rendimiento Kg/ha/año	Índice de Mazorca	Reacción a *M. roreri*	Compatibilidad	Color sin madurar	Rugosidad
ICS 39	Trinidad	Hibrido de Trinitario X Criollo	1.598	12	S	AI	Verde intermedio	Intermedia
TSH 565	Trinidad	ICS 1 x SCA 6	1.212	19	S	AI	Rojo intenso	Intermedia
IMC 67	Perú	Forastero Alto Amazonas	975	18	NA	AI	Verde ligero	Ligera
CCN 51	Ecuador	ICS 95 x IMC 67	1.441	15	MR	AC	Rojo intermedio	Intermedia
ICS-95	Trinidad	Hibrido de Trinitario X Criollo	902	20	R	AC	Rojo intenso	Intermedia
FEC 2	Colombia	Hibrido Trinitario	901	16	R	AI	Rojo intenso	Intermedia
CAUC 43	Colombia	IMC 67 x Desconocido	860	23	MR	AI	Verde rojizo ligero	Ligera
CAUC 39	Colombia	IMC 67 x Desconocido	918	24	MR	AI	Verde rojizo ligero	Ligera
FLE 2	Colombia	Hibrido Trinitario	1.371	13	MR	AI	Verde rojizo ligero	Intermedia
FSV 155	Colombia	Criollo x Desconocido	450	25	MS	AC	Verde ligero	Intensa
FSV 153	Colombia	Hibrido Trinitario	915	13	MS		Rojo intenso	Intensa
FTA 2	Colombia	Hibrido Trinitario	1.389	15	MS	AC	Rojo intermedio	Ligera
FSV 41	Colombia	Hibrido Trinitario	1.474	13	MS	AC	Rojo intenso	Intensa

a. MR: Medianamente resistente. R: Resistente. MS: Medianamente suceptible. S: Suceptible

AC: atuocompatible. AI: autoincompatible

2.3 Preparación de los árboles y polinizaciones

Los cultivares fueron preparados agronómicamente, fertilizándolos según una relación 3:1 de elementos mayores y menores con una poda principal durante el mes de Febrero y una poda de sostenimiento durante el mes de Septiembre. La polinización artificial se

efectuó protegiendo los botones florales con tubos plásticos para evitar la fecundación natural. Al día siguiente se procedió a realizar la polinización manual para obtener una cantidad de frutos por árbol con la misma edad. Los frutos formados se protegieron con fundas plásticas para evitar su contaminación hasta el día de la inoculación con *M. roreri*. La polinización se realizó con polen del CCN 51, los frutos fueron inoculados al cumplir 70 días de edad en promedio. Se hicieron observaciones semanales para registrar el período de incubación, igualmente se tomaron dos registros, el primero a la quinta semana después de la inoculación y tres semanas después se realizó el segundo, conocido como lectura final para cuantificar la respuesta fitosanitaria del cultivar. Esta lectura, también llamada de octava semana fue diseñada por Phillips, (2005) y constituye la herramienta para calificar la respuesta de los materiales a la infección por *Moniliophthora roreri*. El muestreo se realizó de forma destructiva categorizando las variables a evaluar (severidad externa, severidad interna y porcentaje de infección) por medio de grados según el estado de infección del clon. Previa la inoculación, se demarcó un área aproximada de 4 cm^2 con esmalte en la parte ecuatorial del fruto

La variable de *Severidad externa,* fue evaluada de acuerdo con la apariencia externa que mostró cada fruto y medida por medio de la siguiente escala Phillips*., et al* (2005): entre 0 y 4.9 variando de la siguiente forma: 0 para mazorcas sanas, 1 para puntos iniciales o deformaciones, 2 puntos concentrados próximo a mancha, (3 - 3.9) para áreas en mancha, y (4 - 4.9) para aparición de micelio y esporulación. La *Severidad interna* se evaluó de acuerdo al grado de daño interno de cada fruto y se midió por medido de la siguiente escala Phillips*., et al* (2005), clasificación internacionalmente aceptada: para este caso varió de uno a cinco grados así: 0 para 100% de almendra sana, 1 para el 20 % de almendra afectada, 2 para el 40%, 3 para el 60%, 4 para el 80%, y finalmente 5 para el 100% de almendra dañada. Para efectos estadísticos se consideró cada registro como proveniente de una muestra categórica, por lo tanto, cada fruto recibió un valor cuantitativo, así mismo, cada fruto fue considerado como una repetición, tomando 15 frutos por material. En la tabla 7, se presenta la escala de respuesta a la infección por *M. roreri* propuesta por Phillips-Mora *et al*., (2005). En dicha tabla se puede observar como la variable severidad interna es la que permite categorizar la equivalencia en porcentaje de daño interno del grano, clasificando la respuesta de resistencia en Resistente (R), Moderadamente resistente (MR), Moderadamente susceptible (MS) y Susceptible (S).

Variable utilizada por considerarse como aquella que representa mejor los factores de patogenicidad y virulencia de *M. roreri*.

Tabla 7. Escala para la clasificación de materiales de cacao por su respuesta a *M. roreri*.

Calificación	**Sigla**	**Rango I.S.I.**	**Equivalencia % Daño del grano**
Resistente	R	0 -1,25	0 -25
Moderadamente Resistente	MR	1,26 - 2,5	26 -50
Moderadamente Susceptible	MS	2,51 - 3,75	51 – 75
Susceptible	S	3,76 - 5,0	**76 – 100**

2.4 Preparación del inóculo y pruebas de patogenicidad

Dado que aún no se conoce si existe variabilidad en *M. roreri* y según la alta presión de inoculo de este patógeno que existen en el país, se decidio realizar la evaluación con inóculo natural obtenido de frutos esporulados en cámara humeda. Las esporas fueron desprendidas y recogidas en una bolsa con agua destilada y autoclavada, esta suspensión de esporas fue ajustada por medio de cámara Neubauer en microscopio óptico, a una concentración de $1x10^{5}$ esp / ml de *M. roreri* (Phillips *et al* 2005). Con la suspensión preparada aproximadamente media hora antes de la aplicación, se inóculo frutos de dos meses de edad obtenidos mediante polinización artificial, ajustando el método a la técnica de sensidisco que consistió en rodajas de papel filtro humedecido en la solución de esporas de Monilia y colocado sobre el fruto en un área de 2 cm^2 previamente demarcada, luego el sitio inoculado se cubrió con vinipel y se embolsó el fruto. Esta metodología es la misma que fue utilizada por Aránzazu 2012. En la figura 13, se detallan algunos aspectos de la metodología de la inoculación. En la misma figura se puede observar cómo una vez realizada la inoculación, se cubrieron las mazorcas con bolsas transparentes de polietileno para después introducir una toalla húmeda con 50 ml de agua destilada, con el objeto de proveer una cámara húmeda dentro de ellas.

Después de dos días se cortaron los extremos inferiores de las bolsas y se eliminaron las toallas (Phillips, 1986). Con el fin de comparar la incidencia y la severidad entre cultivares se

utilizaron los arboles introducidos ICS 95 y CCN 51 reportados por la unión temporal Fedecacao-Corpoica como resistentes y moderadamente resistentes, como suceptible se utilizó el material TSH 565. Nueve semanas después se determinaron las variables de severidad externa, interna y porcentaje de infección.

Figura 13. Proceso de inoculación artificial con el método del sensidisco.A) Suspensión; B). Demarcación de área a inocular; C). Aplicación del sensidisco; D). Envoltura con vinipel y cámara húmeda. Fuente. Autor

Durante el período de evaluación se realizaron cuatro pruebas de inoculación para resistencia genética a *M. roreri*, con lo cual se obtuvieron cuatro medidas sobre los mismos individuos tomadas a través del tiempo, estos registros fueron correlacionados bajo una matriz autorregresiva de primer orden, modelando una estructura de correlación en el tiempo. Para el ajuste del modelo se utilizaron los criterios de información Akaique (AIC) y bayesiano (BIC), el mejor modelo ajustado fue un modelo cuadrático en el tiempo, donde se encontraron significativos los parámetros de tiempo, tiempo al cuadrado y severidad externa. Es importante resaltar que cada repetición tiene una duración de 5 meses, entre la polinización de la flor y la lectura de 8 semana. Las condiciones climáticas fueron monitoreadas por medio de estación climática ubicada en la granja Villa Monica ubicada en el municipio de San Vicente de Chucuri.

2.5 Determinación de la respuesta a la infección por *Moniliophthora roreri*

Con los datos de severidad externa, interna y porcentaje de infección se realizó un análisis de varianza (siguiendo un diseño completamente al azar) y pruebas de comparación de medias (Tukey) para determinar posibles diferencias estadísticas entre los cultivares. La clasificación de la respuesta de resistencia a la infección por *M. roreri,* se realizara teniendo

en cuenta la variable de severidad interna, considerada como aquella que expresa mejor el nivel de daño. La toma de datos se realizara de forma destructiva a la novena semana después de la inoculación con el patógeno. Para la descripción de la respuesta se utilizaran las categorías de Resistente (R), Moderadamente resistente (MR), Moderadamente susceptible (MS) y Susceptible (S).

2.6 Evaluación y variación estacional del comportamiento de *M. roreri* en campo

Con el fin de correlacionar la respuesta a la infección por Monilia bajo inoculaciones artificiales, con la variación estacional del comportamiento del patógeno en campo, se determinó la respuesta fitosanitaria de tres parcelas experimentales de evaluación de materiales en los departamentos de Antioquia, Santander y Arauca. Los materiales regionales evaluados fueron el FEC 2 y CAUC 29, mientras que los materilaes introducidos ICS 95, TSH 565, fueron utilizados como testigos de la susceptibilidad y la resistencia.

2.7 Resutados

2.8 Evaluacion y variación estacional del comportamiento de *M. roreri* en campo

En la Figura 14 y 15, se presenta el comportamiento de los materiales regionales FEC 2, CAUC 39, y los materiales introducidos utilizados como testigos de la resistencia (ICS 95) y susceptibilidad (TSH 565), asi mismo, se presenta la ubicación geográfica de las parcelas demostrativas. En figura 14 tambien se puede observar los porcentajes de infección de las tres enfermedades más importantes en Colombia durante los últimos tres años. Las parcelas experimentales se encuentran en los municipios de San Jeronimo Maceo - Antioquia (Finca Rafael Rivera); Tame–Arauca (Finca la Perla) y San Vicente de chucuri (Finca Villa Mónica). La misma figura también ratifica la clasificación realizada durante el estudio, mostrando como los cultivares ICS 95 y FEC 2 mantienen una frecuencia baja en la infección del patógeno en tres regiones diferentes, mientras que cultivares como el CAUC 39 clasificados en el grupo intermedio, presentan una frecuencia más alta, contrastados con la susceptibilidad del cultivar TSH 565, testigo de la susceptibilidad. Respuestas fitosanitarias que hace evidente lo reportado por Aránzazu 2012, quien menciona el manejo integrado de la enfermedad como

el método más importante para reducir la incidencia del patógeno a porcentajes inferiores al índice de daño económico.

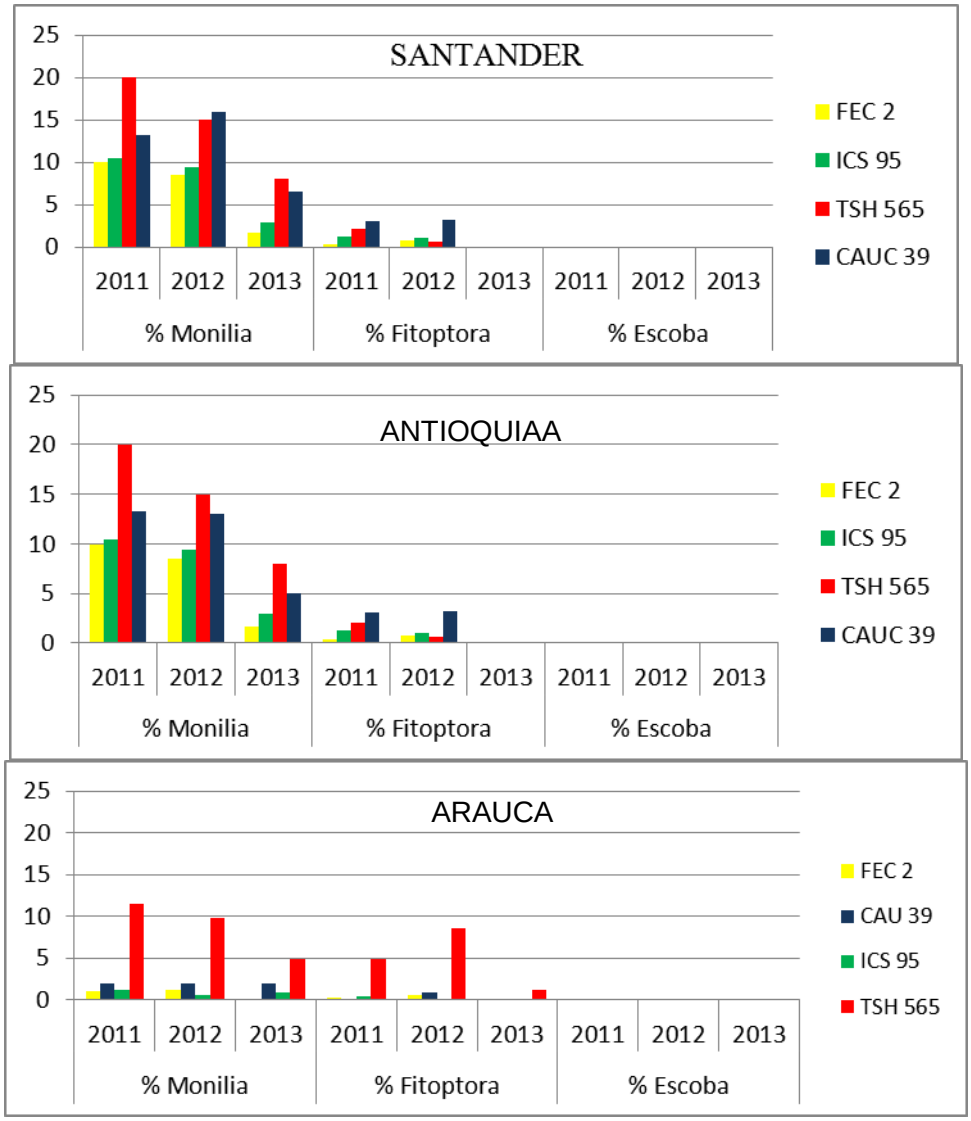


Figura 14. Comportamiento fitosanitario del clon FEC2, en las regiones de Santander, Huila y Arauca.

Figura 15. Ubicación geográfica de las parcelas demostrativas.

2.9 Determinación de la respuesta a la infección por *Moniliophthora roreri*

Mediante las pruebas dirigidas con inoculación artificial de *M. roreri*, se encontraron diferencias significativas en los niveles de resistencia o suceptibilidad a *Moniliophthora roreri*, entre los 13 cultivares de Cacao evaluados en la investigación. El método propuesto por Phillips *et al*., (1986; 2005) y utilizado en Colombia por Fedecacao (Aranzazu, 2010) permitió obtener altos porcentajes de infección en las tres repeticiones, con más del 80 por ciento para todos los cultivares a excepción del clon FEC 2. Los grados de severidad interna y externa permitieron separar claramente los cultivares resistentes de los susceptibles. La respuesta de severidad e incidencia dividió en tres grupos los cultivares evaluados, el primero con una respuesta de resistencia baja y consistente, el segundo con valores de resistencia intermedia y el tercero con niveles altos de resistencia.

En la tabla 8, se presenta el promedio de la severidad interna y externa según el número de repeticiones de los materiales regionales en pruebas de resistencia a Monilia a la 9 semana de inoculación, evidenciando una estabilidad en la expresión de los síntomas de algunos cultivares y tipologías de resistencia importantes, con una dilatoriedad en los síntomas, característica significativa al momento de retardar la expresión de los mismos en los frutos inoculados.

En la tabla, también se detallan las diferencias significativas (p<0,05) entre los promedios de severidad externa e interna en los cultivares evaluados, donde los materiales ICS 39, TSH 565, FSV 155, FSV 153, IMC 67, FSV 41 y FTA 2, mostraron susceptibilidad moderada a *M. roreri*; el genotipo FEC 2 mostró la menor severidad externa, que fue de 0,8 (síntoma de puntos iniciales); le siguieron los cultivares ICS 95, CAUC 43 y CAUC 39 que tuvieron valores inferiores a 2 (síntoma de puntos concéntricos). Los clones regionales FLE 2, FSV 155, FSV 153, FTA 2, FSV 41 e IMC 67 presentaron los valores más altos, que fueron de 2.1; 2,6; 2,5; 2,3; 2,5 y 2,4 respectivamente. Entre los cultivares introducidos el ICS 95 y CCN 51 tuvieron las mejores respuestas con valores de severidad externa de (1,5) (síntoma de puntos iniciales); y (2,5) (síntoma de puntos concéntricos) respectivamente.

En cuanto a los porcentajes de infección, en la misma tabla se observa una incidencia superior al 80% para cultivares como el FSV 153, IMC 67, ICS 39, FSV 155, FLE 2, FSV 41, ICS 95 y CAUC 39 y CCN 51mientras que cultivares como el CAUC 43 y FEC 2 presentaron porcentajes de 75 y 53 por ciento con diferencias significativas entre ellos (P<0.05). El cultivar FEC 2 además de mostrar la menor incidencia, tuvo el valor más bajo de severidad interna y externa.

Tabla 8. Promedio de la severidad interna y externa a la 9a semana de inoculación, en San Vicente de Chucurí, año 2013.

Cultivar	Severidad Externa	Severidad Interna	Incidencia
FEC 2^{f}	0,8	0,6	53,0
*ICS 95^{ef}	1,5	1,2	88,3
CAUC 43de	1,3	1,8	74,8
CAUC 39de	1,9	1,7	88,3
FLE 2^{cde}	2,1	2,4	93,0
CCN 51^{abcd}	2,5	3,0	79,8
FSV 153^{bcd}	2,5	2,6	96,5
FSV 155^{bc}	2,6	2,6	93,1
FTA 2^{bcd}	2,3	2,7	90,0
IMC 67^{ab}	2,4	3,9	96,5
FSV 41^{abc}	2,5	3,3	93,0
ICS 39^{abc}	2,8	3,7	93,3
**TSH 565^{a}	3,1	4,3	100,0

Cultivares con la misma letra no difieren estadísticamente.

*****Materiales utilizados como testigos resistentes ******Materiales utilizados como testigos susceptibles.

Como se detalla en la tabla 8, los 13 cultivares evaluados mostraron diferencias significativas de susceptibilidad a *M. roreri*. El Clon FEC 2, presentó un valor de severidad externa e interna menor a 0,8 (puntos iniciales) y porcentajes de infección de 53%, mientras que clones como CAUC 39, CAUC 43, CCN 51 y ICS 95 presentaron valores de severidad externa e interna menores de 2,9 (formación de mancha) e incidencias que variaron entre 74,5 (CAUC 43) y 88 por ciento (ICS 95). En contraste el TSH 565 y el ICS 39 mostraron valores de severidad externa e interna mayores a 2,8 (formación de mancha) e incidencias del 100 por ciento.

En la tabla 9 y 10, se presentan los porcentaje de frutos de Cacao con Moniliasis según los grados de severidad externa e interna por cultivar a la novena semana de infección con *Moniliophthora roreri*. Según la tabla 9, de la totalidad de los frutos inoculados durante las cuatro pruebas, el 12% resultaron sanos internamente al momento de la evaluación, el 88 por ciento presentaron síntomas externos, que correspondieron principalmente a los grados en escala 1 puntos iniciales (20 % de los frutos) y 2 puntos concéntricos (34%) y en menor proporción a los grados 3,4 y 5, correspondientes síntomas superiores al estado de la mancha. En la tabla 10, también se puede observar como el 71% de los frutos inoculados presentaron síntomas internos, mientras el 28,5% restante permanecieron sanos aún después de haber presentado síntomas externos.

Tabla 9. Porcentaje de frutos de Cacao con Moniliasis según los grados de severidad externa por cultivar a la novena semana de infección con 10^5 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*.

SEVERIDAD EXTERNA										
Cultivar	**0,0**	**1,0**	**2,0**	**3,1**	**3,4**	**3,9**	**4,1**	**4,3**	**4,6**	**4,9**
FEC 2^{f}	0,47	0,27	0,25	0,02	-	-	-	-	-	-
ICS 95^{ef}	0,12	0,33	0,50	-	-	-	-	0,05	-	-
CAUC 43^{de}	0,25	0,30	0,40	0,03	-	-	-	0,02	-	-
CAUC 39^{de}	0,12	0,22	0,43	0,13	0,02	-	0,03	0,03	-	0,02
FLE 2^{cde}	0,20	0,07	0,27	0,05	0,05	0,08	-	0,07	0,17	0,05
CCN 51^{abcd}	0,07	0,38	0,25	0,08	-	0,02	0,05	0,07	0,05	0,03
FSV 153^{bcd}	0,07	0,10	0,43	0,05	0,08	0,13	0,02		0,02	0,10
FSV 155^{bc}	0,03	0,17	0,40	0,05	0,17	0,03	0,03	0,07	0,03	0,02
FTA 2^{bcd}	-	0,12	0,53	0,13	0,10	0,03	0,03	-	-	0,05
IMC 67^{ab}	0,07	0,08	0,42	0,13	0,07	0,12	0,07	0,02	-	0,03
FSV 41^{abc}	0,10	0,38	0,15	0,03	-	0,03	0,03	0,15	-	0,12
ICS 39^{abc}	0,07	0,12	0,23	0,12	0,27	-	0,07	-	0,07	0,07
**TSH 565^{a}	-	0,10	0,15	0,28	0,17	0,02	0,02	0,20	0,07	-
X̄	11,9	20,3	34,0	8,6	7,1	3,6	2,7	5,1	3,1	3,7

Escala de severidad externa. 0: fruto sano. 1: Puntos iniciales o deformaciones.; 2: Puntos concéntricos; 3,1: Área en mancha menor o igual a área demarcada; 3,4: Área en mancha superior al área demarcada; 3,9: Área de la mancha mayor a 50% del fruto; 4,1: Aparición de micelio; 4,3: Aparición de esporas; 4,6: Esporulación menor al 50% de la mancha; 4,9: Esporulación igual a la mancha.

Tabla 10. Porcentaje de frutos de Cacao con Moniliasis según los grados de severidad interna por cultivar a la novena semana de infección con 10^5 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*.

SEVERIDAD INTERNA						
Cultivar	**0,0**	**1,0**	**2,0**	**3,0**	**4,0**	**5,0**
FEC 2^{f}	0,73	0,07	0,12	0,05	0,02	0,02
*ICS 95^{ef}	0,40	0,28	0,20	0,05		0,07
CAUC 43^{de}	0,40	0,18	0,03	0,12	0,12	0,15
CAUC 39^{de}	0,52	0,03	0,13	0,07	0,02	0,23
FLE 2^{cde}	0,23	0,07	0,20		0,02	0,48
CCN 51^{abcd}	0,37	0,15	0,05	0,02	0,03	0,38
FSV 153^{bcd}	0,20	0,27	0,10	0,02		0,42
FSV 155^{bc}	0,20	0,23	0,12	0,03	0,03	0,38
FTA 2^{bcd}	0,07	0,03	0,13	0,02	0,18	0,57
IMC 67^{ab}	0,10	0,13	0,12	0,13	0,07	0,45
FSV 41^{abc}	0,30	0,17		0,05		0,48
ICS 39^{abc}	0,20	0,03	0,02	0,03	0,10	0,62
**TSH 565^{a}			0,18	0,07		0,75
$\dot{X}$	28,6	12,7	10,8	5,0	4,5	38,5

Escala de severidad interna. 0: frutos sano. 1: 1-20%; 2: 21-40%; 3: 41-60%; 4: 61-80%; 5: >80%

Como se observa en las tablas 9 y 10, el 47% de los frutos del cultivar FEC 2 se mantuvieron sanos y el 73% de los frutos enfermos externamente no presentaron síntomas internos, donde el 99% de los frutos fueron calificados con un síntoma externo menor a 2 (puntos concéntricos) y solo el 2% fue superior a 3 (mancha menor al área demarcada). Resultado contrastado con el cultivar ICS 95 utilizado como testigo resistente, que presentó solo el 12% de frutos sanos, el 95% de los frutos fueron calificados con severidad menor a 3 (síntoma en grado de mancha) y el 40% de los frutos enfermos no presentaron síntomas internos.

Así mismo, de la totalidad de los frutos inoculados con presencia de síntomas externos de la enfermedad, el síntoma más frecuente fue los puntos concéntricos, el cual se dio en

el 34 % de los frutos inoculados. Los puntos iniciales se presentaron con una frecuencia superior al 20%; el 3 por ciento de los frutos presentó micelio de los cuales una mínima parte (11%) fueron calificados con grado 4,3 y 5 de la escala, indicando que se encontraban en etapa de esporulación.

En el material introducido TSH 565, cultivar utilizado como testigo de la susceptibilidad, fue frecuente la presencia de micelio con esporulación (27%), en tanto que los clones ICS 95 y CCN 51 fueron los menos afectados por síntomas de mancha o esporulación. En contraste los síntomas de puntos iniciales y concéntricos fueron presentados principalmente por el cultivar FEC 2 con un 58% (tabla 10).

Cultivares como FSV 41, FSV 155, IMC 67, FSV 153, mostraron síntomas internos en más del 70 % de los frutos, con un 40% de ellos en daño interno superior al grado 3 y un promedio de 28% con daño interno entre los grados 1 y 2; mientras que el cultivar TSH 565 presentó el 100% de los frutos enfermos, con la mayor cantidad de frutos en mancha con un 100% de daño interno.

El 28% de los frutos inoculados del material FEC 2 presentaron síntomas internos, de los cuales el 19% de los frutos presentaron un daño inferior al 40% del fruto (grado 2), el 5% un daño del 60% (grado 3) y en una menor proporción los grados 4 y 5 (80 y 100 por ciento de daño interno). Por otra parte, en el cultivar ICS 95 solo el 12% de los frutos inoculados en promedio durante las cuatro repeticiones permanecieron sanos, el 88% presentaron síntomas externos, concentrados principalmente en el grado 2 (puntos concéntricos), donde el 40% de los mismos no mostraron síntomas de daño interno (ver tabla 10); en este cultivar, los frutos que presentaron síntomas internos se encontraron entre los grados 1; 2; 3; y 5 con porcentajes de daño interno del 28; 20; 5 y 7 por ciento respectivamente, encontrando la mayor frecuencia en el grado 1 que representa frutos con daño interno inferior al 20%.

En la figura 16, se presentan los datos longitudinales para las variables de Porcentaje de Monilia, Severidad Interna y Externa en el tiempo. En la misma figura también se puede detallar la correlación entre las variables evaluadas durante las cuatro pruebas o repeticiones. Para efectos estadísticos solo se analizaron aquellos clones que completaron las cuatro repeticiones.

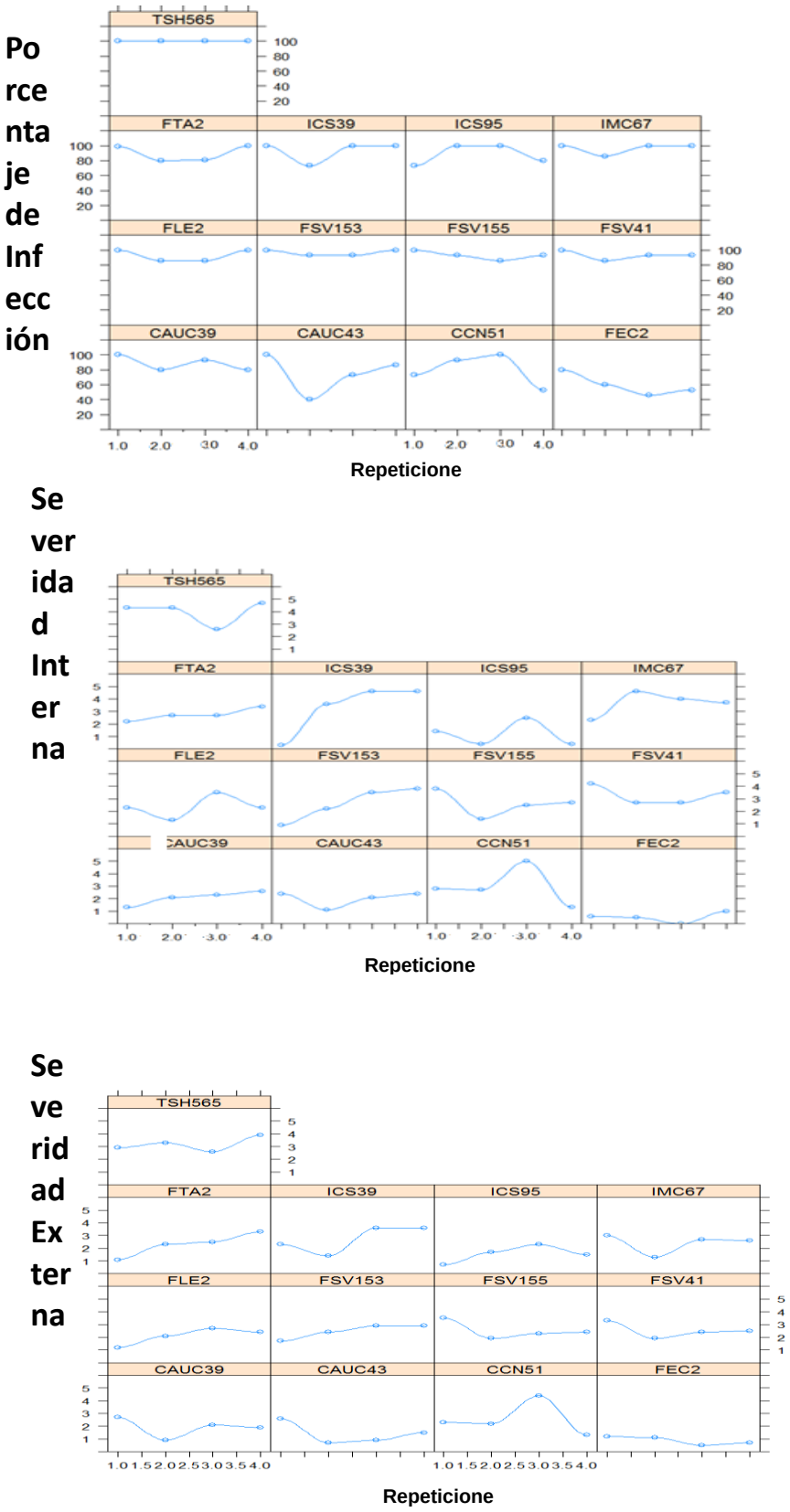


Figura 16. Datos longitudinales para las variables de Porcentaje de infección por Monilia, Severidad Interna y Externa en el tiempo.

Como se observa en la figura 16, el análisis longitudinal del comportamiento fitosanitario en los cultivares evaluados fue realizado con la respuesta de las variables de severidad externa, severidad interna y porcentaje de infección después de cuatro pruebas bajo ensayos controlados de campo, mostrando diferencias significativas entre el Clon FEC 2 y el TSH 565 considerado el testigo susceptible de los materiales evaluados (Tukey 0,05).

En la tabla 11, se presenta el porcentaje de infección de Moniliasis en cultivares regionales e introducidos de cacao a la novena semana de inoculación con 10^5 esporas/ml de *Moniliophthora roreri* durante cuatro repeticiones. Allí se pueden observar tanto las diferencias significativas del comportamiento de las cuatro pruebas realizadas, donde cada una corresponde a una repetición entre los promedios del porcentaje de infección en los cultivares evaluados (Kruskal-Wallis) ($P<0,05$), como el bajo porcentaje de infección presentado por el cultivar FEC 2 durante las pruebas.

Tabla 11. Porcentaje de infección de Moniliasis en cultivares regionales e introducidos de cacao a la novena semana de inoculación con 105 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*.

REPETICION					
Cultivar	**I**	**II**	**III**	**IV**	**$\dot{X}$**
TSH 565[a]	100	100	100	100	100
FSV 153[ab]	100	93	93	100	97
IMC 67[ab]	100	86	100	100	97
ICS 39[abc]	100	73	100	100	93
FSV 155[bc]	100	93	86	93	93
FLE 2[bc]	100	86	86	100	93
FSV 41[bc]	100	86	93	93	93
FTA 2[bc]	100	80	80	100	90
ICS 95[c]	73	100	100	80	88
CAUC 39[c]	100	80	93	80	88
CCN 51[d]	72	91	97	53	78
CAUC 43[d]	100	73	40	86	75
FEC 2[e]	53	60	46	53	53

*Cultivares con la misma letra no difieren estadísticamente $P<0,05$

2.10 Analisis comparativo de los cultivares FEC 2 y ICS 95 con TSH 565 a la infección de *Moniliophthora roreri*

En la tabla 12 y 13, se presentan las severidades externas e internas y los porcentajes de infección de Moniliasis en el cultivar ICS 95 y FEC 2 a nueve semanas de inoculación artificial con 10^5 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*. En la tabla 12, se detalla cómo el cultivar FEC 2 mostró constantemente en las cuatro repeticiones una reacción de resistencia con un daño interno del fruto menor al 20% (severidad interna en grado 1) y síntomas externos no superiores a los puntos concéntricos (severidad externa en grado 2) a la 9 semana de incubación del hongo. En la tabla 13, se puede observar una mayor susceptibilidad del material ICS 95 aún cuando su clasificación es de resistente, cón valores de daño interno en el fruto entre el 10 y el 40% (grado 1 y 2) y un porcentaje de infección del 88% en promedio; resultado contrastado con el 53% de infección del material FEC 2, cultivar regional también clasificado como resistente.

Como también se puede observar en las tablas 12 y 13, la pruebas de kruskal-wallis (α=0,05) solo mostraron diferencias significativas para las variables incidencia en el cultivar FEC 2 entre las cuatro repeticiones, demostrando consistencia en valores de severidad externa inferiores a 1,0 (síntomas en puntos iniciales). En contraste, el cultivar ICS 95 presentó un modelo altamente significativo ($P<0,0001$) durante las cuatro repeticiones, con diferencias para las tres variables evaluadas (severidad externa entre 0,73 y 2,33), (severidad interna entre 0,4 y 2,4) e incidencias (porcentajes de infección) superiores al 70 por ciento.

Tabla 12. Severidad externa, interna e incidencia de Moniliasis en el cultivar FEC 2 a nueve semanas de inoculación artificial con 105 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*.

Cultivar	Repetición	Severidad Externa	Severidad Interna	% infección
FEC 2a	I	1,00	0,93	53,00
FEC 2b	II	1,07	0,47	60,00
FEC 2c	III	0,53	0,00	46,00
FEC 2d	IV	0,67	1,00	53,00

Tabla 13. Severidad externa, interna e incidencia de Moniliasis en el cultivar ICS 95 a nueve semanas de inoculación artificial con 105 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*.

Cultivar	Repetición	Severidad Externa	Severidad Interna	% infección
ICS 95a	I	0,73	1,40	73,00
ICS 95b	II	1,67	0,40	100,00
ICS 95c	III	2,33	2,47	100,00
ICS 95d	IV	1,47	0,40	80,00

Con el fin de resaltar la respuesta de resistencia a Monilia del clon FEC 2, en la tabla 14 se presenta la severidad externa, interna e incidencia de Moniliasis en los cultivares ICS 95, FEC 2 y TSH 565 a nueve semanas de inoculación artificial con 10^5 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*. Allí se puede observar la comparación entre la severidad interna y externa a la novena semana de los clones ICS 95 y FEC 2, evaluados durante cuatro repeticiones en San Vicente de Chucuri-Santander.

Según la respuesta de los cultivares (FEC 2 e ICS 95), los mayores valores en severidades e incidencia fueron mostrados por el clon ICS 95, donde la repetición tres presentó valores de severidad interna (2,47) equivalente a un daño interno superior al 40% y un porcentaje de infección del (100) por ciento, comparados con la constancia en los valores de severidad y la mayor frecuencia en los grados 0 y 1 (frutos sanos; puntos iniciales), para el cultivar FEC 2.

Según la tabla 14, la estabilidad del cultivar FEC 2 en la expresión de los síntomas externos e internos frente a la infección por *M. roreri*, contrasta con la variación presentada por el testigo de la resistencia (ICS 95), resultados que se fortalecen con el análisis de varianza realizado a las cuatro repeticiones de los dos cultivares, en donde el ICS 95 evidencia diferencias significativas entre repeticiones ($p<0,03$), comparado con la poca variabilidad en la respuesta de resistencia del cultivar FEC 2. Ratificando la poca dispersión observada en los síntomas ocasionados por el patógeno y la concentración de los mismos en los grados 1 y 2, que equivale a una severidad externa de puntos concéntricos, y daño interno menor al 40% del fruto en el cultivar FEC 2.

Así mismo, del cultivar FEC 2 se puede resaltar el alto porcentaje de frutos sanos (superior al 40%) y bajos porcentajes en la expresión de síntomas externos (7%), sin lograr la expresión de signos o etapa de esporulación. Resultados que indican poca dispersión y variabilidad en los síntomas y signos durante las cuatro repeticiones.

Tabla 14. Severidad externa, interna e incidencia de Moniliasis en los cultivares ICS 95 y FEC 2 a nueve semanas de inoculación artificial con 10^5 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*.

Cultivar	Repeticion	Severidad Externa	Severidad Interna	% infección
FEC 2	I	1,00[a]	0,93[a]	53,00[b]
FEC 2	II	1,07[a]	0,47[a]	60,00a
FEC 2	III	0,53[a]	0,00[a]	46,00[c]
FEC 2	IV	0,67[a]	1,00[a]	53,00[b]
ICS 95	I	0,73[c]	1,40[b]	73,00[c]
ICS 95	II	1,67[ab]	0,40[b]	100[a]
ICS 95	III	2,33[a]	2,47[a]	100[a]
ICS 95	IV	1,47[bc]	0,40[b]	80[b]
TSH 565	I	3,92[d]	4,80[c]	100[d]
TSH 565	II	2,59[d]	3,80[c]	100[d]
TSH 565	III	3,29[d]	4,33[c]	100[d]
TSH 565	IV	2,91[d]	4,33[c]	100[d]

*****Cada repetición está señalada con una letra en orden alfabético.

En la tabla 15, se presenta el Porcentaje de frutos de los cultivares FEC 2, ICS 95 Y TSH 565, en cada grado de severidad externa, a nueve semanas después de la inoculación artificial con 10^5 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*, durante cuatro repeticiones en San Vicente de Chucuri-Santander. En la misma tabla, se puede observar la dispersión de los grados de severidad externa para el cultivar ICS 95, similar a la presentada por el

material FEC 2, evidenciando una alta concentración de los síntomas entre los grados 1 y 2 (puntos iniciales y concéntricos), no obstante, el material ICS 95, durante la segunda repetición presento un 20% de los frutos inoculados con signos de esporulación (grado de severidad externa 4.3).

Tabla 15. Porcentaje de frutos de los cultivares FEC 2 e ICS 95, en cada grado de severidad externa, a nueve semanas después de la inoculación artificial con 105 esporas/ml de *Moniliophthora roreri*, durante cuatro repeticiones en San Vicente de Chucuri-Santander

SEVERIDAD EXTERNA										
Cultivar	**0,0**	**1,0**	**2,0**	**3,1**	**3,4**	**3,9**	**4,1**	**4,3**	**4,6**	**4,9**
FEC 2	0,47	0,07	0,47							
FEC 2	0,40	0,13	0,47							
FEC 2	0,53	0,40	0,07							
FEC 2	0,47	0,47	0,07							
ICS 95	0,20	0,13	0,67							
ICS 95		0,13	0,67					0,20		
ICS 95	0,33	0,67								
ICS 95	0,27	0,73								
TSH 565		0,07		0,13				0,80		
TSH 565		0,07	0,33	0,60						
TSH 565		0,13	0,13	0,07	0,33	0,07			0,27	
TSH 565		0,13	0,13	0,33	0,33		0,07			

Cada repetición está señalada con una letra en orden alfabético. Los grados de severidad externa fueron clasificados de la siguiente forma: **0**: frutos sanos. **1**: puntos iniciales. **2**: puntos concéntricos. **3.1**: mancha menor al área demarcada. **3.4**: mancha igual o superior al área demarcada. **3.9** mancha superior al 50% del fruto. **4.1**: mancha

con aparición de micelio. **4.3**: aparición de esporas. **4.6**: esporulación inferior al 50% de la mancha. **4.9**: esporulación igual a la mancha.

Finalmente en la tabla 16, se presenta la clasificación de los cultivares después de 4 pruebas de resistencia genética en campo. En dicha tabla, se puede observar la formación de grupos según su respuesta de severidad y porcentaje de infección, al mismo tiempo se evidencia como las variables evaluadas permitieron distinguir cuatro tipos de grupos de cultivares, con base en la tabla de clasificación de cultivares (Phillips, 2005) y la severidad interna, variable que refleja mejor el daño, demostrando una buena correlación entre el grado de severidad interna y externa. Según la misma tabla, en el primer grupo (materiales resistentes) se observa la clasificación de los cultivares FEC 2 e ICS 95, los cuales tuvieron severidades menores a 1.2 e incidencia entre 53 y 88 por ciento, con diferencias significativas entre sus repeticiones (Tukey<0.05); el segundo grupo (materiales moderadamente resistentes) (MR), formado por los cultivares CAUC 39, FLE 2 y CAUC 43, se caracterizaron por tener poca variabilidad en la expresión de sus síntomas y un comportamiento frecuente durante las cuatro repeticiones para cada una de las tres variables; en este grupo se puede resaltar la respuesta del cultivar CAUC 43, por tener valores relativamente bajos de severidad interna (1,8), pero con un porcentaje de infección (incidencia) superior al 75% de la infección. En el tercer y cuarto grupo se ubicaron los materiales con respuesta moderadamente susceptible (FSV 155, FSV 153, CCN 51, FTA 2, IMC 67, ICS 39 Y FSV 41) (MS) y susceptible completa (TSH 565).

Tabla 16. Clasificación de los cultivares después de 4 pruebas de resistencia genética en campo.

Grupo	Cultivar	Severidad Interna	Grupo de Clasificacion	Respuesta
1	FEC 2	0,6	R	Resistente
	ICS 95	1,2	R	
2	CAUC 43	1,8	MR	Moderadamente Resistente
	CAUC 39	1,7	MR	
	FLE 2	2,4	MR	
3	FSV 155	2,6	MS	Moderadamente Susceptible

	FSV 153	2,6	MS	
	FTA 2	2,7	MS	
	CCN 51	2,95	MS	
	FSV 41	3,3	MS	
	IMC 67	3,9	S	
4	ICS 39	3,7	S	Grupo Susceptible
	TSH 565	4,3	S	

***** Cultivares clasificados con la misma letra no presentan diferencias significativas

En la figura 17, se presenta el iíndice de severidad interna y externa del material FEC 2, a la novena semana después de la inoculación con 10^5 esp/ml de *M. roreri,* durante 2 años de evaluación en San Vicente de Chucuri. En la misma figura, se pueden ver tres pruebas de inoculación (A, B y C) realizadas al cultivar FEC 2. A: muestra un 53% de infección de frutos a nueve semanas después de la inoculación por *Moniliophthora roreri*.; las figuras B y C: muestran un índice promedio de severidad externa, interna de 0,6 y 1 (síntoma en puntos concéntricos y daño interno menor al 20% del fruto).

Figura 17. Índice de severidad interna y externa del material FEC 2, a la novena semana después de la inoculación con 10^5 esp/ml de *M. roreri*, durante 2 años de evaluación en San Vicente de Chucuri. Año 2013.

Es importante señalar que según lo expuesto no se tuvo en cuenta en el análisis el factor época, el cual pudo tener influencia sobre el cultivar ICS 95, clasificado como resistente

con una dispersión de síntomas y signos marcada entre repeticiones en comparación con el cultivar FEC 2, clasificado también como resistente con poca dispersión en sus síntomas y signos. Los genotipos ICS 95 y FEC 2 presentaron una dilatación de los síntomas en los frutos, no obstante, el cultivar FEC 2 mostro un mayor efecto discriminatorio al mantener más del 40% de los frutos inoculados sanos.

Así mismo, las condiciones favorables brindadas por el embolsado (cámara húmeda) durante el proceso de infección permitieron un alto porcentaje de incidencia y una observación clara de diferencias entre cultivares, en cuanto a su severidad interna y externa; evitando se produjeran escapes a la enfermedad.

En la figura 18, se presenta el índice de severidad interna y externa de cultivares CAUC 43, CCN 51 y CAUC 39, regionales de Cacao a la novena semana después de la inoculación con 10^5 esp/ml de *M. roreri***.** En dicha figura se muestran los grupos de cultivares de Cacao clasificados como moderadamente resistentes según la escala de Phillips *et al*., (2005) durante tres repeticiones. **A:** cultivar CAUC 43 mostrando un índice de severidad externa, interna e incidencia de 1,3; 1,8 y 75% respectivamente. **B:** cultivar FLE 2 mostrando un índice de severidad externa, interna e incidencia de 2,1; 2,4 y 93%. **C:** cultivar CAUC 39 mostrando un índice de severidad externa, interna e incidencia de 1,9; 1.7 y 88%. Materiales clasificados dentro del grupo de resistencia moderada, caracterizados por tener un patrón de respuesta con alta variabilidad en la expresión de sus síntomas para cada una de las tres variables, donde se pueden resaltar los síntomas externos del material CAUC 43, quienes no superaron los puntos concéntricos (severidad externa de 1,3) ni el 40% de daño interno del fruto (severidad interna de 1,8), pero con una incidencia del 75% de la infección.

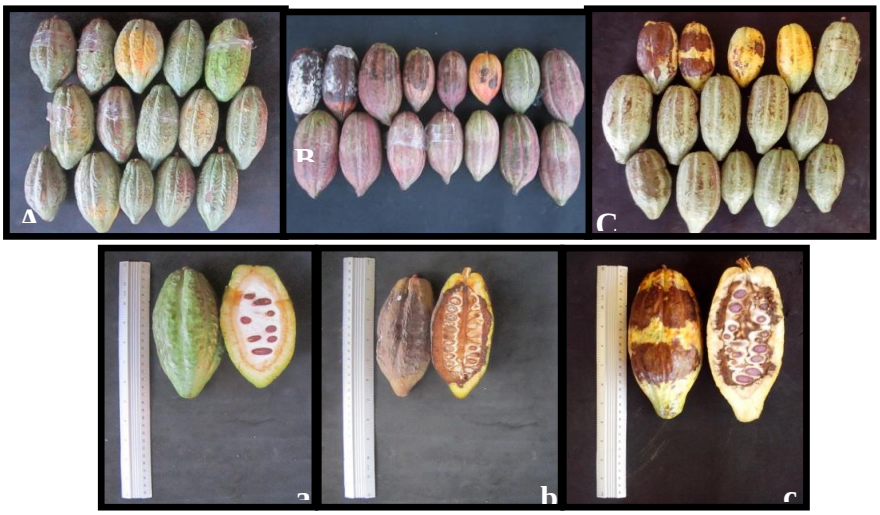


Figura 18. Índice de severidad interna y externa de cultivares CAUC 43, CCN 51 y CAUC 39, regionales de Cacao a la novena semana después de la inoculación con 105 esp/ml de *M. roreri.*

En la figura 19, se presenta el índice de severidad interna y externa de cultivares regionales de Cacao a la novena semana después de la inoculación con 10^5 esp/ml de *M. roreri*. En dicha figura se muestran las características más importantes del daño ocasionado en los frutos de los materiales FSV 155, FSV 153, FTA 2, FSV 41, IMC 67, ICS 39 y TSH 565, con síntomas internos entre 2.6 y 4.3 (daño interno entre el 40 y el 100% del fruto) y diferencias significativas (Tukey=0,05); en este grupo se puede resaltar el TSH 565, cultivar que presento el valor más alto de severidad e incidencia, con un daño externo de 3,1 (estado de mancha) y una severidad interna en grado 4.3 equivalente a un daño superior al 80% del fruto (ver tabla 8).

Figura 19. Índice de severidad interna y externa de cultivares regionales de Cacao a la novena semana después de la inoculación con 105 esp/ml de *M. roreri*.

Grupo de cultivares de Cacao clasificados como moderadamente suceptibles y susceptibles según la escala de Phillips *et al*., (2005). A B, C, D, E, F: Clasificados como moderadamente susceptibles. G: testigos de la evaluación y clasificado como suceptible. **A:** cultivar de FSV 155 según su severidad externa, interna e incidencia**. a:** fruto de FSV 155 en estado de esporulación**. B:** cultivar FSV 153 según su severidad externa, interna e incidencia. **b:** fruto de FSV 153 en estado de esporulación. **C:** cultivar FTA 2 según su severidad externa, interna e incidencia. **c:** fruto de FTA 2 en estado de esporulación. **D:** cultivar FSV 41 según su severidad externa, interna e incidencia. **d:** fruto de FSV 41 en estado de esporulación. **E:** cultivar IMC 67 según su severidad externa, interna e incidencia. **e:** fruto de IMC 67 en estado de esporulación. **F:** cultivar ICS 39 según su severidad externa, interna e incidencia. **G:** cultivar TSH 565 mostrando un índice de severidad externa, interna e incidencia.

Como se muestra en la figura 19, existió una respuesta diferencial en los síntomas y el porcentaje de infección de los clones evaluados. Resultado que evidencia y contrasta con

la respuesta del material FEC 2 de la figura 17, el cual presentó un comportamiento discriminatorio al patógeno (patogenicidad inferior al 60%), impidiendo la infección del hongo y variando el tiempo de expresión de los síntomas; mostrando seguramente una dependencia del componente genético más no del efecto ambiental ya que el ensayo se llevó a cabo en las mismas condiciones climáticas y con igual método de inoculación (Anexo 5).

Así mismo, de acuerdo a la respuesta de severidad interna y según las diferencias significativas (Tukey<0.05), el grupo de cultivares moderadamente resistente no presentó diferencias altamente significativas en ninguna de las variables evaluadas, al igual que el grupo moderadamente susceptible, demostrando un patrón de respuesta similar, concentrando las variables respuesta según su estado de resistencia moderada o susceptibilidad moderada a la 9 semana de evaluación frente a la infección por *M. roreri*.
En el anexo 5, se muestran los valores de humedad relativa, precipitación, radiación solar, y los promedios de temperaturas máximas y mínimas cada 5 días que han predominado durante las evaluaciones y que fueron obtenidos de la Estación Climática del Centro Nacional de Capacitación Villa Mónica en San Vicente de Chucuri-Santander. Según el anexo, la temperatura y humedad presentan una frecuencia en sus valores mensuales, manteniendo un promedio de 25^{o}C y 85% de humedad durante las épocas evaluadas.

2.11 Aparición de síntomas y signos de *M. roreri*

Durante el último año y después de las tres primeras repeticiones de la evaluación de resistencia, durante la actividad se realizaron lecturas semanales de los síntomas y signos de *M. roreri*, con el objeto de observar el avance de la enfermedad después de la inoculación con 10^5 esp/ml. El seguimiento se realizó en los cultivares FEC 2, CAUC 39, TSH 565, por representar las tres categorías más importantes de la clasificación de la resistencia (Resistente; Moderadamente Resistente; Suceptible).

Los resultados mostraron una elevada variación entre cultivares en cuanto al momento de aparición de los síntomas. A los 28 días se encontró que el total de los frutos de los cultivares TSH 565, CAUC 39 Y FEC 2 mostraron el síntoma de puntos iniciales, reconocido por literatura como el primer síntoma de *M. roreri* en frutos jóvenes de Cacao.

En ninguno de los cultivares evaluados se presentaron síntomas como las tumefacciones o islas amarillas. La aparición de manchas se presentó en el cultivar TSH 565 a los 40 días después de la inoculación del hongo, y en los cultivares CAUC 39 y FEC 2 a los 56 y 105 días respectivamente. Así mismo, la expresión de signos como la esporulación se presentaron en los cultivares TSH 565 y CAUC 39 a los 56 y 63 días después de la inoculación (novena semana y toma de lectura final), mientras que en el cultivar FEC 2, no se logró observar este síntoma por maduración del fruto a los 165 días después de la polinización manual.

En los tres cultivares evaluados se observó una variación en el tiempo de incubación de *M. roreri*, necesitando el hongo en el cultivar TSH 565 solo 56 días para completar su ciclo de infección, mientras que en el cultivar CAUC 39 necesitó 63 días o nueve semanas, contrastado con las más de 15 semanas (105) días, que necesito el patógeno para llegar a estado de mancha menor al área demarcada en el genotipo FEC 2.

2.12 Discusión

Los resultados de este estudio muestran que existen amplias diferencias en la respuesta de la planta a la infección de *Moniliophthora roreri* entre los cultivares evaluados. Así mismo, fue posible determinar los diferentes niveles de resistencia y suceptibilidad al patógeno, teniendo en cuenta el uso de indicadores y variables como la severidad externa, interna, igualmente, el uso del embolsado que reflejó altos niveles de incidencia. Autores como Sánchez, 1982; Brenes, 1983; Phillips 1986; Suarez *et al*., 2006, Brown *et al*., 2006 y Aránzazu *et al*., 2009, reportan en investigaciones similares cultivares con diferentes niveles de resistencia, evidenciando grados alternos de respuesta a la infección por *M. roreri* e indicando la presencia de resistencia horizontal en las plantas de Cacao (*Theobroma cacao* L). Este tipo de resistencia se ha reportado por diferentes autores para una variedad de cultivos agrícolas de interés mundial (Daolin *et al*., 2009 en trigo), (Fukuoka *et al*., 2009 en Arroz), (Krattinger *et al*., 2009 en Cereales) (Brown *et al*., 2009 en Cacao) entre otros; se caracteriza por la presencia de diferentes tipos de respuesta a la infección por un patógeno entre grupos de individuos genéticamente idénticos. Generalmente es clasificada según las variables que se estén evaluando y

dentro de los siguientes límites: Resistente; Moderadamente resistente; Moderadamente susceptible y Susceptible.

La estabilidad y durabilidad de la resistencia presentada por el cultivar FEC 2 durante las cuatro repeticiones en diferentes épocas, es reconocida como una resistencia horizontal caracterizada por tener una herencia Poligénica o cuantitativa, condicionada a la expresión de múltiples genes en un sistema, por ello, las clases de resistencia y susceptibilidad son difíciles de reconocer ya que el efecto de cada gen es muy limitado Vanderplank *et al*., (1984); respuesta contrastada con la resistencia de tipo vertical o monogénica; donde también, Phillips (1986) menciona el riesgo del uso de la resistencia vertical contra *Moniliophthora roreri*, basado en la presión de selección ejercida sobre el patógeno y la posibilidad de nuevas razas.

La poca variación entre repeticiones y la estabilidad en la expresión de los síntomas del cultivar regional FEC 2, demostró poca influencia de la época en el método de inoculación y en la respuesta de resistencia. Resultado que contrasta con el comportamiento diferencial de cultivares como ICS 95, FLE 2 y el CAUC 39. Al respecto, Phillips 1986, reporta el efecto de la época en la respuesta de los cultivares a la infección por *M. roreri*, puesto que, cultivares como EET 75, EET 59, permitieron detectar el efecto de la época sobre la inoculación, sin embargo, también menciona como cultivares con respuestas significativas de resistencia tienden a tener mayor estabilidad en la expresión de los síntomas a través del tiempo. Así mismo, autores como (Lanaud *et al*., 1999; Motamayor *et al*., 2003; Bhattacharjee *et al*., 2004; Saunders *et al*., 2004; Cuauhtémoc *et al*., 2006; Zhan *et al*., 2006; Johnson *et al*., 2009; Irish *et al*., 2010; Argout *et al*., 2011), reportan en sus estudios la gran diversidad genética que tiene el Cacao, variación que puede constituir una fuente de resistencia suficiente para las principales enfermedades del Cacao, condescendiendo en una mayor variabilidad en la respuesta a la infección por *M. roreri*.

Al respecto, según el análisis longitudinal realizado y el modelo de estructura autorregresiva de orden uno mostrado en la figura 16, el cultivar FEC 2 evidencia una estabilidad en la respuesta de resistencia a *M. roreri,* comportamiento reflejado a través del tiempo en las tres variables evaluadas; resultados que contrastan con la respuesta de los clones clasificados como medianamente resistentes o susceptibles, quienes mostraron menor estabilidad y mayor variabilidad en las variables evaluadas. No

obstante, la interacción entre la planta y el patógeno siempre estará sujeta a condiciones basadas en el triángulo de la enfermedad (Agrios, 2008). En ese sentido, autores como Brown *et al*., (2009) reportan el comportamiento de cultivares como el UF 273, clon parental de la resistencia a *M. roreri* que ha demostrado estabilidad en la respuesta de resistencia a Monilia a través del tiempo.

Según las variables de severidad e incidencia, la primera hizo evidente el grado de daño causado a los cultivares, señalando la capacidad virulenta de *M. roreri* para causar la infección y generar con éxito un nuevo ciclo de vida. La incidencia por su parte, permitió la cuantificación de la patogenicidad, midiendo la capacidad de infectar y causar enfermedad en los cultivares, admitiendo la determinación de la efectividad de las inoculaciones artificiales. Autores como (Phillips 1986, Jaimes 2010 y Aránzazu 2012) señalan la estrecha relación existente entre la severidad interna y las otras variables, mencionando la correlación positiva y altamente significativa que existe entre ellas.

El 73% de los frutos inoculados con *M. roreri* en el cultivar FEC 2 no expresaron síntomas internos, así mismo, no fueron evidentes en el 40% de los frutos del ICS 95,variaciónes en la respuesta de la planta común a todos los cultivares, y que permitió denominarlos en Resistentes (R), moderadamente resistentes (MR); moderadamente susceptibles (MS) y Suceptibles (S); donde los grupos con respuesta MR y MS fueron clasificados dentro de una respuesta intermedia. Entre los cultivares resistentes, el FEC 2 y el cultivar introducido testigo de la resistencia ICS 95, por exponer una severidad interna menor a 1.2, con una severidad externa inferior a 1.5, así como mostrar una incidencia promedio de cuatro repeticiones de 53 % (FEC 2) y 88 % (ICS 95).

Autores como (López, 2011; Suarez *et al*., 2006; Agrios 2005) relacionan los bajos valores en la incidencia y en el grado de daño a la presencia de varios genes de resistencia que les confiere mecanismos que impiden o retrasan el desarrollo del patógeno. Al mismo tiempo, Paliwal, (2001) señala la variación que puede presentar la resistencia de tipo cuantitativa, indicando que no siempre es de tipo absoluta, variando de una forma parcial de la resistencia hasta la casi total inmunidad. Así mismo, Renfro (1985) menciona las siguientes posibles causas: (a) diferencias en la patogenicidad del agente causal; (b) diferencias en los genes que gobiernan la resistencia de la planta

hospedante; (c) los ambientes que afectan la expresión final y la intensidad del desarrollo de la enfermedad.

Por las razones mencionadas y teniendo en cuenta que el clon FEC 2 ha sido evaluado agronómicamente bajo diferentes ambientes y épocas por más de 3 años y conociendo su incidencia a diversas fuentes de inóculo natural, esta evaluación confirma la estabilidad de su resistencia, considerando al cultivar FEC 2 como promisorio para su utilización en un programa de mejoramiento genético.

Los cultivares clasificados como intermedios (materiales con una respuesta Moderadamente Resistente o Moderadamente Susceptible) se caracterizaron por mostrar una variación genética respecto a las variables evaluadas, sus valores fueron superiores a 1.5 (puntos concéntricos); 1.3 (daño interno superior al 20% del fruto) y 77 por ciento (incidencia). Al respecto, Phillips (1986), asocia este tipo de respuestas a la poca presencia de genes de resistencia. En este grupo se encuentran los siguientes cultivares regionales CAUC 43, CAUC 39, CCN 51, FLE 2, FSV 155, FSV 153, FTA 2, FSV 41.

El cultivar clasificado como susceptible (TSH 565) no mostro variación genética respecto a las variables. Sus valor fue superior a 3.1 (severidad externa); 4,3 (severidad interna) y 100 por ciento de incidencia, evidenciando ausencia de contenido genético necesario para la resistencia genética a *M. roreri,* condición que facilita por completo los factores de virulencia del patógeno. En este grupo se incluyeron los cultivares regionales ICS 39 y TSH 565.

Los resultados obtenidos en el material FEC 2, fueron estables durante las cuatro repeticiones sin indicar un efecto de la época sobre las variables, pero si, evidenciando una frecuencia en la expresión de los síntomas y los signos. Resultados que coinciden con los publicados por autores como Porras (1985); Phillips (1986) y Suarez (2006), en el sentido que los cultivares que tienen comportamiento extremo (resistente o suceptible) muestran mucha estabilidad en su condición, en tanto que los cultivares intermedios tiene gran variación debida principalmente a factores medio ambientales y presión de inóculo. Al respecto, Vanderplank (1984) y López (2006), mencionan la resistencia genética de herencia Poligénica cuantitativa como más estable y duradera debido al efecto amortiguador del sistema Poligénico. En tanto que los cultivares intermedios tienen gran variación debida principalmente a condiciones medio ambientales y las características del patógeno.

El empleo de la técnica del sensidisco en papel filtro No.2 y las condiciones de cámara húmeda creadas por el embolsado y el vinipel, proporcionaron las condiciones óptimas de infección al patógeno y demostraron su eficiencia junto al método de inoculación artificial de *M. roreri*, manteniendo una incidencia del patógeno superior al 85% y una respuesta de susceptibilidad en los cultivares evaluados como testigos. Al respecto, autores como (Porras *et al*., 1984; Phillips, 1986; Suarez *et al.*,2006, Aránzazu, 2012), mencionan el uso del embolsado de los frutos, metodología que asegura la humedad y el tiempo necesario para permitir la germinación y la infección del patógeno. Así mismo autores como Suarez (1971); Mechan (1981) y Phillips (1986; 2005) resaltan la importancia de la película de agua para el proceso germinativo de la espora del patógeno.

Por otra parte, Evans, (1981), menciona la temperatura óptima para la germinación de los conidios (22 y 24) ^{o}C, resaltando como temperaturas por debajo de 17^{o}C pueden retrasar el establecimiento y desarrollo del hongo. Al respecto, en la anexo 5, se puede observar la temperatura promedio (24.5 ^{c}C) durante el proceso de infección en los tres últimos años, período en el cual se realizaron las cuatro repeticiones. En cuanto a descriptores morfológicos como el color del fruto y el grosor y la dureza del mesocarpo, autores como Díaz, (1957); Brenes, (1983) y Phillips (1986) mencionan que no existe ningún tipo de relación de entre estos descriptores con la resistencia a *M. roreri.*

La expresión de los primeros síntomas (puntos iniciales) para los cultivares TSH 565, CAUC 39 y FEC 2 representantes de los tres grupos (suceptible, intermedio y resistente) fue de 28 días en promedio, nueve días después se presentó el primer signo (esporulación) en los cultivares TSH 565 y CAUC 39, contrastado con la aparición de la mancha del cultivar FEC 2, que solo se presentó 15 días después de la aparición de los puntos iniciales sin alcanzar el signo de esporulación por cumplir los frutos el punto de madurez para cosecha. Resultado que indica la presencia de una mayor cantidad de genes de resistencia (Phillips *et al*., 2008) y una dilatoriedad en los síntomas y los signos que le confieren a la planta una protección permanente pero incompleta contra *M. roreri*. Este comportamiento concuerda con lo publicado por Phillips (1986) para el cultivar UF 273, material genético trinitario seleccionado en Costa Rica.

La respuesta de estos cultivares clasificados como resistentes demuestra un componente genético importante que está permitiendo la infección del patógeno pero igualmente condiciona o limita su crecimiento y desarrollo. Así mismo, los resultados indican que cultivares clasificados como intermedios (CAUC 43, CAUC 39, FLE 2, CCN 51) tienen la capacidad tanto de dilatar considerablemente la expresión de los síntomas con una frecuencia baja en los valores de severidad externa e interna, como de discriminar la infección del patógeno. Contrastado con el cultivar FEC 2 que evidencia un efecto mayor en la discriminación de la infección del patógeno, reduciendo su incidencia al menos del 53%.

La fuente de resistencia genética del cultivar FEC 2 actualmente es incierta, no obstante, este marterial fue seleccionado por el técnico de Fedecacao Rafael Cordoba en la Finca el Libano de la vereda Barranco Amarillo en el municipio de El Carmen de Chucuri en el departamento de Santander. Seguramente este material podria provenir de los clones utilizados como parentales para la producción de semilla hibrida a partir de 1965, entre ellos, los más importantes fueron SCA 6, SCA 12, PAUND 7, IMC 67, PA 46, los clones ecuatorianos EET 96 y 62, y los clones introducidos ICS 1, ICS 6, ICS 39, ICS 50 UF 613 (Aránzazu, comunicación verbal). Entre los cultivares anteriores se puede resaltar el clon IMC 67, clon introducido que tradicionalmente se ha utilizado como patrón para la injertación y donador universal de polen, distribuido en Colombia durante los últimos 80 años y considerado uno de los padres del materail CCN 51; F1 que proviene del cruce entre los materiales ICS 95 x IMC 67.

Por otra parte, una de las fuentes de resistencia a la infección por *M. roreri,* proviene del cultivar UF 273, parental considerado como padre de la resistencia para la determinación de QTLs asociados a la resistencia contra *M. roreri* (Brown *et al*., 2009), no obstante, en Colombia no existe ningún reporte de la presencia de este cultivar en el País. En ese sentido, la fuente de resistencia al patógeno por parte del FEC 2 podria considerarse como única en el país y constituir el primer paso para estudios de mejoramiento genético y concentración génica de caracteres como la resistencia a la Moniliasis. En el capítulo III se discutirá según el análisis molecular, la distancia genética que existe entre estos cultivares.

Es importante resaltar como materiales como el FEC 2, CAUC 39 y CAUC 43 pueden evitar en gran medida la infección de *M. roreri*, manteniendo sanos más del 40% de los

frutos a lo largo de su madurez fisiológica (FEC 2). Por otra parte, materiales como el FSV 41, FSV 153, FSV 155, FLE 2, CCN 51 y ICS 95 mantienen una incidencia cercana al 100% a pesar que variables como la severidad externa e interna los clasifican con una resistencia de grado intermedio. Resultados que demuestran la habilidad de *M. roreri* para causar infección, explicando la gravedad de la enfermedad y el efecto destructivo que puede tener para la producción del grano (Roger, 1926, Enríquez et al, 1982, *Krauss* y *Soberanis*, 2001). Al respecto, autores como (*Whitlock et al*., 1999) y (Costa *et al*., 2001), atribuyen este tipo de infección a la presencia de plásmidos en el genoma del hongo, lo que le brindaría a *Moniliophthora roreri* un alto grado de diferenciación frente a sus hospedantes.

Los registros productivos y fitosanitarios registrados por la Federación Nacional de Cacaoteros a algunos de los cultivares regionales más importantes del país, sumado a las dos pruebas de resistencia genética realizadas en los dos últimos años, muestran respuestas diferenciales de los cultivares evaluados a la incidencia de Monilia, destacando estadísticamente (Tukey<0,005) al cultivar FEC 2 que, además de ser productivo (superior a 1.500Kg/ha/año) presentó porcentaje de infeccion a *M. roreri*, del 53%. Este porcentaje podría deberse a genes de resistencia y no a una resistencia aparente (Agrios, 2008) producida por las condiciones ambientales predominantes al momento de la infección e incubación del patógeno (condiciones climáticas desfavorables para el patógeno, ubicación de la planta en el lote). El descubrimiento de este cultivar resistente genéticamente a la Moniliasis establece un gran aporte para futuras investigaciones en el sentido que las inoculaciones artificiales del patógeno en campo comprueban una expresión de resistencia genética del cultivar a la enfermedad y no constituyen mecanismos de escape por el patógeno.

El nivel de resistencia que actualmente presenta el cultivar FEC 2, sumado al nivel de producción, adaptación y calidad que está mostrando el genotipo en las diferentes regiones productoras del Colombia, constituyen una fuente de investigación futura para programas de mejoramiento, entre ellas, la trasmisión de genes de resistencia a esta enfermedad en nuevos cultivares de Cacao de cacao.

Los resultados clasifican al cultivar FEC 2 como resistente a la infección por *Moniliophthora roreri* y contribuyen al conocimiento agronómico de clones regionales élite de cacao, fortaleciendo un componente importante dentro de la exploración de alternativas para el manejo integral del patógeno, entre ellos, la implementación de modelos de siembra para zonas bajas. Así como consolida el clon FEC 2 como un parental basico para ampliar la estrecha base genética que tiene el país, creando la posibilidad de un programa de mejoramiento con caracteres de interés para la búsqueda de la resistencia.

3. Evaluación de polimorfismos SSR en materiales regionales introducidos con énfasis en resistencia genética a monilia

INTRODUCCION

En Colombia existe una de las bases genéticas de cacao más amplias y diversas del mundo, cultivares que han estado bajo alta presión de *Moniliophtora roreri* ipor casi 200 años, (Aranzazu *et al*., 2013) interacciones que favorecen eventos de coevolución del Patosistema Cacao-Monilia. Eventos genéticos ocasionados por presiones de selección que permiten la diversidad genética de la planta y al mismo tiempo fortalecen la expresión respuestas de defensa a la infección por Monilia. La diversidad o variabilidad genética se puede definir como, la capacidad a responder tanto a variaciones de índole ambiental como a cambios en los objetivos de selección (Rochambeau, 2001).

Al respecto, algunos de los cultivares que conforma la amplia diversidad genética de cacao que tiene el país (Aranzazu *et al*., 2013), fueron evaluados y caracterizados en el capítulo dos según su respuesta de resistencia genética a la enfermedad, encontrando fuentes de resistencia como el FEC 2 y resistencia moderada como el CAUC 43 y CAUC 39. Estos cultivares permitirán el fortalecimiento de programas tanto de mejoramiento genético como de métodos alternativos para el control de la Moniliasis.

En el presente capítulo se presentan los resultados de evaluación y determinación de la huella molecular SSR de los cultivares colombianos que fueron usados durante cuatro pruebas de resistencia genética a la infección por *M. Roreri*. Estos patrones moleculares constituyen una herramienta de identificación para materiales colombianos y contribuye al conocimiento del banco internacional de germoplasma en Cacao.

El estudio permitió la identificación molecular de los siguientes clones regionales: FEC 2, CAUC 43, CAUC 39, FLE 2, FLE 3, FLE 4, FSV 25, FSV 155, FSV 41, FMA 7, FQUIP 1, FGI 4, FRN 5, FSA 13, FMAC 11, CR 40, CR 41 y CR 42. No obstante, en el capítulo dos durante las pruebas de resistencia genética en campo se evaluaron 13 de estos cultivares regionales reconocidos por su susceptibilidad y resistencia a *M. roreri*. El presente estudio se orientó a calcular e interpretar algunos parámetros genéticos importantes para los marcadores evaluados.

Se emplearon marcadores moleculares tipo microsatélites, algunos reconocidos por su alto contenido de polimorfismos y otros por su asociación a características cuantitativas QTLs de resistencia a Monilia. Asociación que permitió la identificación de grupos de cultivares según sus cercanías genéticas, así como la definición de grupos por su respuesta de resistencia a la enfermedad, logrando observar la variación genética de la población evaluada. Durante el análisis se utilizaron tres cultivares criollos tipo guasare, originarios de la Sierra Nevada de Santa Marta y la Serranía del Perijá, recolectados por la "Unión temporal Cacao de Colombia I" entre Fedecacao y Corpoica en el año 2005. En tal sentido los objetivos planteados en el presente capítulo son los siguientes: 1. Determinar la huella molecular de algunos de los materiales regionales evaluados en el segundo capítulo 2. Estimar la diversidad genética presentada por la población de cultivares regionales evaluados y algunos materiales introducidos.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Localización

El presente estudio se realizó en la colección de cultivares de la granja Villa Monica de la Federación Nacional de Cacaoteros, en el municipio de San Vicente de Chucuri en Santander, y en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia – sede Bogotá.

3.1.2 Toma de muestras

Las muestras fueron tomadas de la colección de cultivares que poseé 32 genotipos seleccionados en fincas de agricultores, en donde son evaluados por sus características sensoriales, productivas y fitosanitarias. Para la investigación se seleccionaron 24 genotipos de esta colección, 15 hibridos de origen regional (provenientes de los departamentos de Santander, Antioquia, Arauca), 6 hibridos de origen introducido (Perú,

Ecuador, Trinidad) y 3hibridos criollos provenientes de la Sierra Nevada de Santa Marta y Serranía del Perijá, todos propagados de forma asexual. Trece de estos cultivares seleccionados fueron evaluados en el capítulo II según su respuesta de resistencia a *M. roreri.* En la tabla 7, presentada en el segundo capítulo se mostraron las características más importantes de estos materiales.

Las muestras para procesar se tomaron de hojas en los estados más jóvenes, las cuales se guardaron en bolsas de papel Kraff identificadas según el material. Posteriormente se depositaron en neveras de icopor con hielo químico (-20^{0}C) para ser transportadas al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias en la Universidad Nacional de Colombia, donde fueron almacenadas a -70^{0}C hasta su procesamiento. Luego las muestras fueron maceradas en Nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se transfirió a tubos ependorff de 2 ml rotulados y previamente fríos para evitar la hidratación del macerado. Finalmente fueron nuevamente almacenadas a -70^{0}C hasta la extracción de ADN.

3.1.3 Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN se realizó con el Kit DNeasy Plant System (Quiagen Inc., Valencia, CA, USA). El ADN obtenido se cuantificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se utilizaron 12 µl de muestra, cargados de la siguiente forma: 2 µl de ADN, 2 µl de Agua ultra pura y 8 µl de búfer 1X. Como marcador de peso molecular para la cuantificación se utilizó ADN de fago λ (invitrogen) a diferentes concentraciones. La migración del ADN en el gel fue por 40 minutos a 100 watts. La visualización se realizó con bromuro de etidio en un equipo de foto documentación BioRad. En el anexo 1, se muestra el protocolo de extracción descrito por el fabricante.

La cuantificación de la concentración de ADN mediante espectrofotometría se realizó en un equipo NanoDrop - Shimatzu, con 1 µl del extracto de ADN y utilizando como muestra blanco el buffer 3 de extracción; el cálculo se realizó a través de la relación de absorbancia a 260 y 280 nm. Las bases nitrogenadas en oligonucleótidos tienen su máxima absorbancia a 260 nm y la absorbancia máxima de las proteínas es aproximadamente de 280 nm. La relación de 260/280, por lo tanto es una relación de pureza y debe permanecer

aproximadamente entre 1.5 y 1.9, valores inferiores a esto sugieren una contaminación de proteínas.

3.1.4 Análisis de Microsatelites SSR

La amplificación de ADN se realizó utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en multiplex (varios primers por reacción) para correr en electroforesis capilar. Para esta técnica se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: temperaturas de anillamiento, diferencia en tamaño y marcaje de los primers. En la tabla 17, se presenta el nombre, las secuencias, temperaturas de anillamiento y el marcaje con fluorocromos de cada uno de los microsatélites usados. En la misma tabla se observan los diferentes iniciadores usados con el fin de amplificar 19 Microsatelites reportados por Saunders *et al*., (2005); Brown, *et al*., (2007). Los iniciadores fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos).

.

Tabla 17. Nombre, secuencias, temperatura de anillamiento y marcaje con fluorocromos de cada uno de los microsatélites usados.

Nombre del marcador	Cromosoma	Secuencia Primer (5´-3´)	Secuencia reversa	Ta (°C)	Secuencia repetida	Marcaje	Rango esperado	Autor
MTcCIR7	7	ATGCGAATGACAACTGGT	GCTTTCAGTCCTTTGCTT	51	(GA)11	VERDE (VIC)	150-167	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR18	4	GATAGCTAAGGGGATTGAGGA	GGTAATTCAATCATTTGAGGATA	51	(GA)12	AZUL (6-FAM)	333-357	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR40	3	AATCCGACAGTCTTTAATC	CCTAGGCCAGAGAATTGA	51	(AC)15	VERDE (VIC)	262-288	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR22	1	ATTCTCGCAAAAACTTAG	GATGGAAGGAGTGTAAATAG	46	(TC)12N146(CT)10	AMAR (NED)	276-301	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR24	9	TTTGGGGTGATTTCTTCTGA	TCTGTCTCGTCTTTTGGTGA	46	(AG)13	AZUL (6-FAM)	186-207	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR15	1	CAGCCGCCTCTTGTTAG	TATTTGGGATTCTTGATG	46	(TC)19	AZUL (6-FAM)	234-263	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR33	4	TGGGTTGAAGATTTGGT	CAACAATGAAAATAGGCA	51	(TG)11	ROJO (PET)	265-348	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR1	8	GCAGGGCAGGCTCAGTGAAGCA	TGGGCAACCAGAAAACGAT	51	(CT)14	AZUL (6-FAM)	128-146	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR60	2	CGCTACTAACAAACATCAAA	AGAGCAACCATCACTAATCA	51	(CT)7(CA)20	VERDE (VIC)	190-218	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR11	2	TTTGGTGATTATTAGCAG	GATTCGATTTGATGTGAG	46	(TC)13	VERDE (VIC)	286-321	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR12	4	TCTGACCCCAAACCTGTA	ATTCCAGTTAAAGCACAT	46	(CATA)4N18(TG)6	ROJO (PET)	165-256	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR26	8	GCATTCATCAATACATTC	GCACTCAAAGTTCATACTAC	46	(TC)9C(CT)4TT(CT)11	AZUL (6-FAM)	285-310	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR37	10	CTGGGTGCTGATAGATAA	AATACCCTCCACACAAAT	46	(GT)15	AMAR (NED)	136-187	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR6	6	TTCCCTCTAAACTACCCTAAAT	TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	46	(TG)7(GA)13	AMAR (NED)	224-253	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR8	9	CTAGTTTCCCATTTACCA	TCCTCAGCATTTTCTTTC	46	(TC)5TT(TC)17TTT(CT)4	ROJO (PET)	290-307	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR-10 Y16984	5	ACAGATGGCCTACACACT	CAAGCAAGCCTCATACTC	46	(TG)13	AZUL 6-FAM	30 - 220	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR-46	7	TATGCTCTCTCTCGTATAAT	CAAGAATGTTTTGATACTGA	46	(CT)15(CA)13	VERDE-VIC	203	Zahng *et al* ., 2010b
MTcCIR-145	9	CAGACTTCCAACTCAAAACT	TGAGAATAGATGGACCGAT	51	(CT)17	AZUL 6-FAM	169 - 267	Brown *et al* ., 2007
MTcCIR-168	4	GGTAGTATTGAGGTGCGTAT	GTGAATGAATGGATGTGAAA	46	(TC)9	VERDE-VIC	175	Brown *et al* ., 2007
MTcCIR-176	2	TCACCAATTCTCTGCTC	AATGAAATTACCTCCTTAC	46	(TG)16	AMARILLO-NED	106	Brown *et al* ., 2007
MTcCIR-179	7	TTTCCATTTCTCATTTCTCAAG	ATGTTTTCATTTTCGTATCCAA	51	(GT)16	ROJO-PET	288	Brown *et al* ., 2007
MTcCIR-225	8	AAGACAAAGGGAAGAAGA	AGGGGAAGAGCAAATC	51	(TC)10	AMARILLO-NED	302	Brown *et al* ., 2007
MTcCIR-236	8	GAAGTCAAAGGAAAGTCAA	TCAGAAAACGCAAATAAA	51	(CT)5 TT (CT)14 T (CT)2	ROJO-PET	193	Brown *et al* ., 2007
MTcCIR-252	1	AATGTGTGCTTTGTTTCTA	TTCAAGGGCGTAACTC	46	(AC)10	AZUL 6-FAM	155	Brown *et al* ., 2007

Las condiciones para la amplificación de los fragmentos fueron las descritas por Pugh *et al*., 2004; Motamayor *et al*., (2008) y Hernández (2013) con algunas modificaciones durante el proceso de estandarización; las cuales se describen a continuación: una reacción multiplex con un volumen final de 25 µl con 6.25 ng/ul de ADN, 0.05U/ µl de Taq polimerasa, 0,2 mM de dNTPs, 0.4 µM de cada primer forward y reverse, 2 mg/ml BSA, 1.5 mM de $MgCl_2$ y 1x de buffer de PCR.

Los ciclos de amplificaciones fueron los reportados por Saunders *et al*., 2004; Motamayor *et al*., 2008 y Hernández (2013), igualmente fueron modificados y descritos a continuación: Se utilizó un termociclador PTC 100 (MJ. Research) con un paso de denaturalización a 94ºC por 30 segundos, 1 minuto a la temperatura de anillamiento de cada par de cebadores, 1 minuto a 65 °C y finalmente un paso de extension de 7 minutos a 72 °C .

Los productos de PCR fueron verificados en gel de agarosa al 2.5%, en cámara de electroforesis marca BioRad. Se utilizaron 5 µl de muestra, cargados de la siguiente forma: 3 µl de producto de PCR, 2 µl de Buffer de carga 1X y 2 µl de Marcador de Peso. La migración de ADN en el gel fue por 60 minutos a 100 watts. La visualización se realizó con bromuro de etidio en un equipo de foto documentación marca BioRad con luz UV.
La amplificación de los productos de PCR se realizó inicialmente en forma de Monoplex y más adelante en Multiplex. La amplificación de un único ADN con los 19 microsatélites permitió optimizar la migración de los fragmentos en el equipo ABI3500 Genetic Analyzer, secuenciador para la electroforesis capilar. La optimización fue realizada por duplicado en los laboratorios de genética de la Universidad Nacional de Bogota y la Universidad Industrial de Santander.

3.1.5 Estimación de las distancias genéticas

Según la estimación de las distancias genéticas, el método Neighbor Joining (NJ) es un algoritmo de agrupamiento simple, (Unwighted pair Group method using aritmetic averages) (Sneath y Sokal, 1973); (Neighbor-joining) (Saitou y Nei, 1978), usados en los modelos de programas informáticos para construir matrices de distancias genéticas en los arboles filogenéticos. Estos árboles se construyen agrupando primero parejas de poblaciones con las mínimas diferencias alélicas, sumando las siguientes más distantes y

repitiendo este proceso hasta que todas las poblaciones están incluidas (Hernández, 2013)

Para la evaluación de la distancia genética entre los individuos se realizaran dos análisis por separado, uno para 9 loci asociados a QTL de resistencia (Brown, *et al*., 2007), y otro para 10 loci microsatélites reconocidos por su informatividad en el reconocimiento y clasificación de *Theobroma cacao*. Actividad con la cual se logró una asociación de los cultivares según la clasificación de la respuesta a la infección por *M. roreri* realizada en el segundo capítulo.

Al respecto, autores como Santos 2007 y Brown *et al*., 2007 evaluaron marcadores microsatélites asociados a características cuantitativas QTLs de resistencia a *Moniliophthora roreri*; los resultados indicaron que los microsatélites MTCcIR 24 y MTCcIR 33 fueron potencialmente ligados a genes de resistencia a Escoba de bruja, mientras que los microsatélites MTCcIR (10, 46, 145, 168, 176, 179, 225, 236 y 252) se encontraron ligados a características de resistencia a la Moniliasis en los cultivares con severidades externas e internas muy bajas, respecto a los cultivares encontrados como susceptibles.

En la tabla 18 se presentan los marcadores microsatelites encontrados para los QTLs y sus respectivos grupos de ligamiento. Según la misma tabla, autores como (Lanaud *et al*., 2000; Clement *et al*., 2003b; Brown *et al*., 2007) coinciden en asociar genes de resistencia a *Phytophthora* sp y *M. roreri* con QTLs en el grupo de ligamiento 2,4,5,7 y 8 en clones como el DR1, IMC 78 y UF 273 encontrando una asociación entre los QTLs y sus efectos en la respuesta de la planta más aún cuando existe una relación genética cercana entre los clones evaluados. Al respecto, se decidió tomar la huella molecular del UF 273 publicada en la base de datos internacional de germoplasma en Cacao (ICGD-Zhang, *et al*., 2010b) y utilizarla para el análisis de distancias geneticas con el fin de conocer la cercanía genética de este cultivar con los clones regionales colombianos que evidenciaron una respuesta de resistencia a *M. roreri*, detallada en el capítulo dos.

Tabla 18. Microsatelites encontrados para los QTLs y sus respectivos grupos de ligamiento.

QTLs	Linkage Group									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Cofactores									
***M. roreri* Severidad Externa**		mTcCIR252			mTcCIR 10		mTcCIR 46	mTcCIR 236	mTcCIR 145	
***M. roreri* Severidad Interna**		mTcCIR 176 mTcCIR 252		mTcCIR 168	mTcCIR 10		mTcCIR 179	mTcCIR 225		
***Phytophthora* sp**		mTcCIR 73		mTcCIR 168	mTcCIR 111 mTcCIR 248			mTcCIR 236		mTcCIR 37 mTcCIR 91

Fuente: Brown *et al*., 2007.

3.1.6 Electroforesis capilar

Una vez amplificados los fragmentos de ADN, la lectura fue realizada por medio de la técnica de electroforesis capilar, para lo cual, estandarizadas las condiciones de PCR en multiplex, se cambiaron los iniciadores por oligonucleótidos forward marcados en el extremo 5” con fluorocromos de 4 colores diferentes (NED, 6-FAM, PET, VIC). En la figura 20, se presenta el rango de alelos en (pb) esperado de 14 de los 19 loci presentados en la tabla 17, donde cada microsatélite se encuentra con el color del fluorocromo con que se marcó. Como se detalla en la misma figura, para la preparación de las reacciónes se evitó el sobrelapamiento de los cebadores, separándolos según el fluorocromo, rango de bases y temperatura de anillamiento, utilizando los fluorocromos en una matriz G:5 y un marcador testigo tipo GenScan 600 LIZ.

.

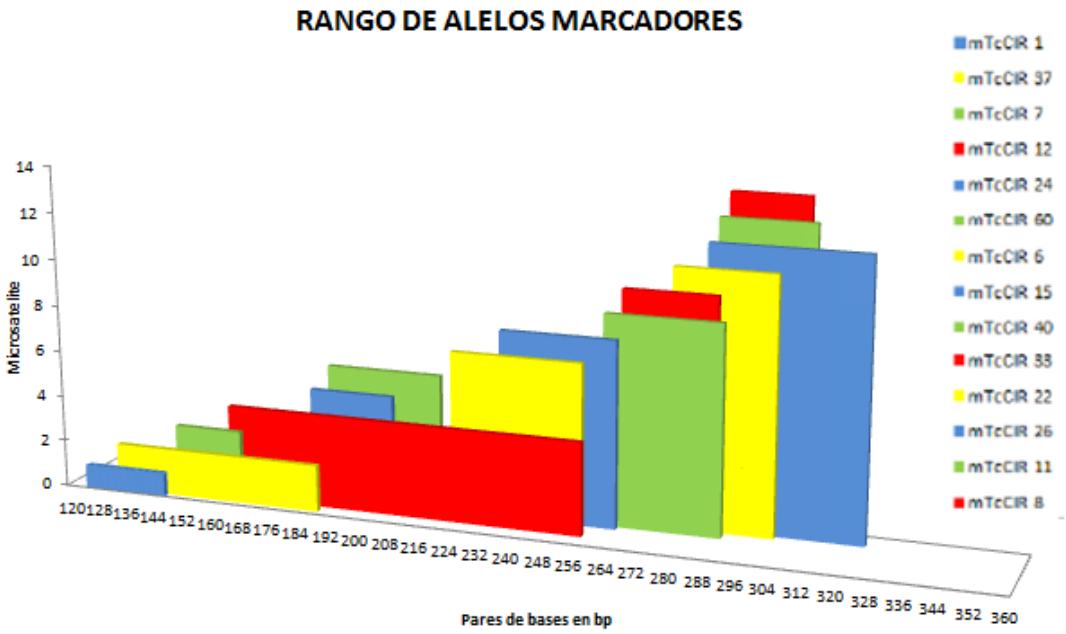


Figura 20. Rango de alelos (pb) esperado de cada microsatélites con el color del fluorocromo con que se marcó.

En la figura 20, también se pueden observar los fluorocromos utilizados para marcar los extremos 5' del primer forward de cada marcador separados según el rango de pares de bases (Saunders *et al*., 2004), permitiendo la separación de los microsatélites que amplificaron en el mismo rango de pares de bases y admitiendo la mezcla en una reacción de amplificación por multiplex.

Las muestras se prepararon usando 0.5µl del amplificado de PCR, 12 µl de formamida como agente denaturante y, 0.5µl del marcador de peso LIZ 600 de color naranja de 50 a 600pb. En la figura 21, se presenta el marcador Size standard LIZ 600. En la misma figura se puede detallar cómo el electroferograma del marcador de peso utilizado permitió definir los pesos de cada una de los alelos amplificados.

La separación de fragmentos por electroforesis capilar se realizó en el equipo ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, secuenciador de ADN de Applied Bio systems con filtro 65 (1ml) 65 mds, soporte restrictivo, polímero POP 4 con un capilar de 47 cmx 50µm pln: 402839. Los electroferogramas se visualizaron utilizando el software GENE MAPPER ID

version 3.2. El servicio de electroforesis capilar fue prestado por el instituto de genetica de la Universidad Nacional de Colombia.

Para evitar la presencia de artefactos durante las lecturas del capilar, las muestras fueron procesadas por dupolicado utlizando dos equipos de secuenciación, el primero ubicado en el Insitituto de Genetica de la Universidad Nacional de Colombia y el segundo ubicado en el laboratorio de genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander UIS. Una vez se logro eliminar la presencia de artefactos y amplificaciones inespecíficas se procedio a realizar la lectura final y el análisis de la información.

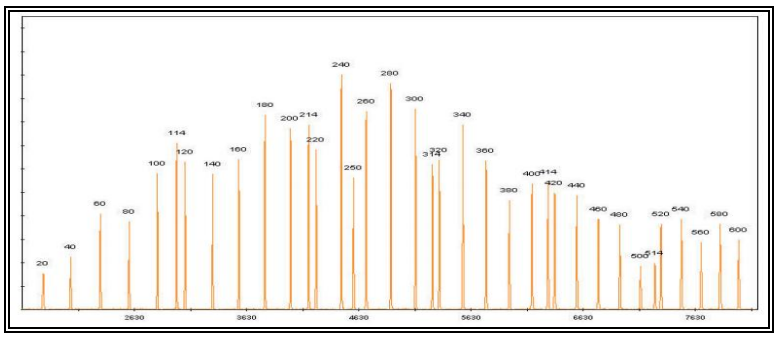


Figura 21. Size standard LIZ 600.

3.1.7 Análisis de datos moleculares

Se realizo una genotipificacion de los cultivares en un conjunto de 19 loci SSR donde se calcularon e interpretaron los parámetros genéticos más importantes para los marcadores evaluados, entendiendo que la cantidad de genotipos no representan una muestra significativamente importante para determinar estudios completos de estructura poblacional. Para facilitar el manejo de la información se determinó el número de alelos por locus, la heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho), el índice de contenido polimórfico (PIC), la estimación de las distancias geneticas poblacionales y el análisis de componentes principales.

Se definieron 3 poblaciones identificadas de la siguiente forma: Introducidos, Regionales y Criollos, las cuales fueron delimitadas *a priori* con base en las regiones geográficas de donde son originarios los cultivares evaluados. Estas regiones conservan un interés relevante pues hacen parte la de base genética regional y comercial que actualmente

tiene el país (Aranzazu *et al*., 2013). Asi mismo, se exploro la organización de la diversidad genética en estas poblaciones con base en algunos métodos de ordenación como los análisis clúster basados en distancias genéticas y el PCA.

3.1.8 Numero de alelos por locus

Esta medida depende mucho del número de individuos analizados, aunque este parámetro molecular se usó para determinar el número medio de alelos presentados por cada locus en la población y aportar un idea de la heterogeneidad de la muestra.

3.1.9 Heterocigosidad esperada (He)

La herocigosidad esperada es la proporción de heterocigotos que se esperarían encontrar si una población está en equilibrio de Hardy Weiberg (Crow, 1970). En el presente trabajo se usó como estadístico molecular para estimar la variabilidad, ya que es ampliamente usado para reflejar la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes, pudiéndose aplicar en cualquier especie independientemente de su estructura reproductiva o genética, característica que le permite establecer diferencias entre individuos (Crow, 1970). Su cálculo se realizó de acuerdo con Nei (1978) de la siguiente forma:

$He = \frac{2n\,(1- \Sigma Pi^2)}{2n - 1}$ Dónde ; n= Tamaño poblacional y *Pi*= la frecuencia del alelo *i*

3.1.10 Heterocigosidad observada (Ho)

La herocigosidad observada para un locus se define como el número de individuos heterocitos observados respecto al total analizado (Crow, 1970). Se usó para definir la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci. En cada población fue calculado como la porción de todos los genotipos heterocigotos en un *locus,* dado que es expresado en función a cada *locus* y en promedio a todos los *loci.*

3.1.11 Índice de contenido polimórfico (PIC)

Para determinar la informatividad de los marcadores microsatélites evaluados en los cultivares según las frecuencias de alelos, se calculó el PIC o índice de contenido polimórfico, parámetro similar a la heterocigosidad que puede variar entre 0 y 1. Para

obtener esta información se hizo uso de los algoritmos incluidos en el programa GenALEX 6.1 (Peakall y Smouse, 2006). Los criterios utilizados por este software para determinar dichos parámetros fueron los siguientes: se realizó la estimación mediante la frecuencia relativa entendida como: p + q = 1, con el fin de hallar la frecuencia alélica (f), dónde:

p= N° de alelos p/ N° total de alelos
q= N° de alelos q/ N° total de alelos

Para determinar el tipo de relaciones de similaridad genética existentes entre los materiales de Cacao, se determinaron las distancias geneticas de Nei (1972), la cual se basa en la distancia genética estándar y usa el cálculo de la Identidad Genética para el procesamiento de los datos de la homocigosis esperada calculada a partir de frecuencias alélicas. Esta distancia asume que la diferenciación entre poblaciones es el resultado de la mutación y la deriva genética. Parámetros que ayudaron a comprender las relaciones evolutivas entre poblaciones.

Los valores obtenidos fueron posteriormente agrupados con el programa GENETIX versión 4.05, para la generación de un dendograma final se usó MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0), algoritmo que promedia todas las distancias entre los individuos, así como las distancias entre los grupos que se van formando a partir del índice de similaridad genética. Así mismo, a través del software (SPAD versión 2.11L.) se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (ACP), que permitió corroborar a través de la distribución multidimensional en un sistema de coordenadas X,Y,Z, el grado de similitud entre los individuos y su agrupación.

3.1.12 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Para estudiar la variación molecular dentro de los cultivares evaluados se realizó un análisis AMOVA o análisis de varianza molecular, el cual permitió calcular además de los componentes de la varianza, los estadístico F_{ST} y $R_{ST,}$ el primero reconocido como el grado de diferenciación genética, (considerando la identidad de alelos bajo el modelo de alelos infinitos (IAM) y el segundo a partir de los tamaños alélicos bajo un modelo gradual de mutación (SMM), medida de distancia adaptada para microsatélites R_{ST}, análoga al F_{ST} de Wright (1965) y propuesta por Slatkin (1965). Las fuentes de variación, fueron

definidas según la diferenciación dentro de individuos, entre individuos y finalmente entre grupos (F_{ST} y R_{ST}).

$$R_{ST} = \frac{S_{bar} - S_w}{S_{bar}}$$

Donde Sw es la suma sobre todos los loci de dos veces el peso medio de la varianza, dentro de poblaciones V(A) y V(B), y Sbar es la suma sobre todos los loci de dos veces la varianza de las poblaciones combinadas V(A+B). Hernández 2013.

En tal sentido, autores como Slatkin, 1995; Rousset, 1997; Weir, 1984; Park, 2001, Hernández, 2013) mencionan la equivalencia de los R-estadísticos con los F-estadísticos sobre la base de los tamaños alélicos en lugar de la identidad del alelo, así mismo los definen tanto como los coeficientes de correlación intra clase de los tamaños de alelos en genes dentro de los individuos en relación con todas las poblaciones (R_{IT}), como los genes dentro de los individuos en relación con una población (R_{IS}), y los genes en las poblaciones con respecto a todas las poblaciones (R_{ST}), desarrollados para los loci en un proceso gradual de mutación. Al mismo tiempo señalan como en virtud de un proceso de mutación al azar (IAM, KAM), las expectativas para los R-estadísticos son equivalentes a los correspondientes F-estadísticos, pero sufren mayores variaciones de muestreo (Balloux, 2002). Los cálculos se realizaron a través de programa GENETIX versión 4.05, mediante la metodología de Weir *et al*., 1984; Belkhir *et al*., 1998.

3.1.13 Comparacion con la base de datos ICGD

La base de Datos Internacional de Germoplasma de cacao (ICGD) es un servicio informativo para la comunidad científica cacaotera. Se fundó en la Universidad de Reading con el único objetivo de compilar información sobre el origen, las tipologías y el recurso de la base genética del germoplasma en Cacao, dejándola a disposición de la comunidad científica en el mundo. Actualmente, es una base de datos de consulta permanente, la cual cada año se fortalece con trabajos de relevancia mundial para el estudio genético del Cacao.

Con el fin de comparar el tamaño observado de los alelos encontrados en los cultivares, con el tamaño esperado para algunos de los materiales reportados en bibliografía, se consultara la base de Datos Internacional de Germoplasma de cacao (ICGD). De esta

comparación se espera no obtener grandes diferencias en entre los tamaños esperados y reportados por autores como Zhang D., (2010b) y los observados en los resultados del presente capitulo.

3.2 Resultados

3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN

En la figura 22, se presenta la verificación de la extracción de ADN de genotipos regionales mediante electroforesis en gel de Agarosa al 0.8% teñida con bromuro de etidio utilizando el Kit Quiagen. En la misma figura se puede observar a través de las bandas detectadas la buena calidad del ADN extraído.

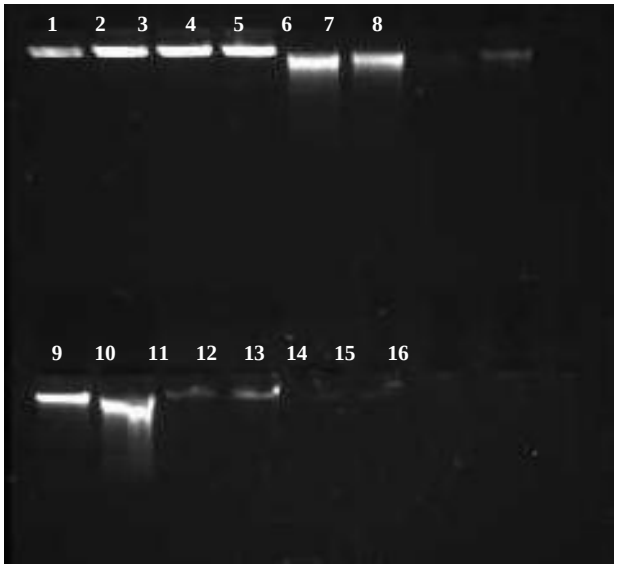


Figura 22. Electroforesis de verificación de extracción de ADN de genotipos regionales con el Kit Quiagen en gel de Agarosa al 0.8% teñida con bromuro de Etidio.

En la figura 23, se presenta la electroforesis de cuantificación de ADN en gel de Agarosa 0.8%. En la misma figura se puede observar la verificación de la extracción realizada a los genotipos evaluados, una cuantificación inicial se realizó por comparación del brillo que se observa de cada muestra con relación al brillo de las diluciones con contenido conocido de ADN del bacteriófago Lambda. Se obtuvieron aproximadamente 10 ng/ul de ADN.

.

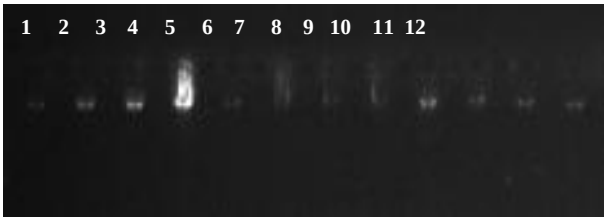


Figura 23. Electroforesis de cuantificación de ADN en gel de Agarosa. Del carril 5 al 12 se encuentran los cultivares: FEC 2, ICS 95, CAUC 43, CAUC 39, FLE 2, CCN 51, ICS 39, FSV 155.

Según la figura 23, el carril 1, contenía una dilución de 10 ng del marcador; el carril 2, una dilución de 25 ng; el carril 3, una dilución de 50 ng; el carril 4, una dilución de 100 ng y los carriles del 5 al 12, diferentes muestras de ADN de cacao introducido y regional.

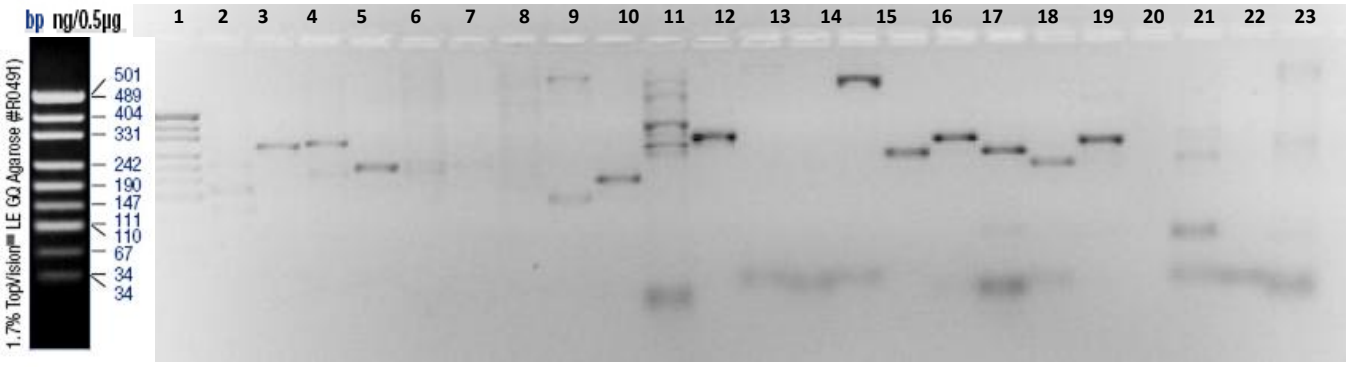
En la tabla 19, se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación a través de la absorbancia de 6 de los cultivares regionales FEC 2, FLE 2, FSV 153, FSV 41, FSA 13 y CR 46. En la misma tabla se puede detallar la concentración obtenida de ADN (rango entre 4 y 10 ng), considerado de buena pureza para todas las muestras. La concentración de ADN obtenida fue suficiente para generar la huella molecular de los genotipos regionales evaluados, pues los marcadores moleculares tipo microsatélites tiene como cualidad el no requerimiento de altas concentraciones del ADN para su amplificación.

Tabla 19. Resultados obtenidos de la cuantificación midiendo la absorbancia en un equipo Nanodrop de los cultivares regionales FEC 2, FLE 2, FSV 153, FSV 41 FSA 13 y CR 46**.**

#	Muestra	Concentración en ng/µl	Relación 260/280
1	FEC 2	8,1	1,79
2	FLE 2	9,1	1,86
3	FSV 153	5,6	1,77
4	FSA 13	9,4	1,75
5	FSV 41	6,3	1,75
6	CR 42	10	1,5

3.2.2 Análisis de Microsatélites SSR

En La figura 24, se presenta la electroforesis de verificación en gel de agarosa al 2.5%. En la misma figura se puede visualizar la amplificación en Monoplex y la separación de las bandas con una distinción entre homocigotos y heterocigotos en electroforesis de agarosa al 2.5%. Los microsatélites se amplificaron con ADN de CAUC 39 según los parámetros mencionados.



El marcador de peso fue el pUC 19 DNA Mspl (Hpall) Marker 23, con un rango de 13 fragmentos entre 34 y 501 pb; la amplificación de todos los microsatélites se observó entre 67 y 331 pb aproximadamente, valores que coinciden cercanamente con el rango de alelos reportados por Zhang *et al*., 2010b para los microsatélites utilizados en la determinación de la huella molecular de los genotipos de Cacao. En la tabla 20 se presentan los microsatélites amplificados del ADN del material CAUC 39 según su temperatura de anillamiento. Para evitar la presencia de artefactos durante la electroforesis capilar, producto de temperaturas de anillamiento bajas (46-51), se realizaron pruebas por duplicados en dos laboratorios diferentes y con los mismos parámetros de corrida. Una vez se logró la detección confiable de los picos según el tamaño esperado, se procedio al procesamiento y análisis de la información.

.

Tabla 20. Microsatélites amplificados del ADN CAUC 39 según su temperatura de anillamiento.

Carril	Microsatélite	Ta	Carril	Microsatélite	Ta
1	Marcador de peso		13	MTcCIR 168	46
2	MTcCIR 145	51	14	MTcCIR 176	46
3	MTcCIR 179	51	15	MTcCIR 252	46
4	MTcCIR 225	51	16	MTcCIR 60	46
5	MTcCIR 236	51	17	MTcCIR 11	46
6	MTcCIR 1	51	18	MTcCIR 15	46
7	MTcCIR 18	51	19	MTcCIR 24	46
8	MTcCIR 33	51	20	MTcCIR 26	46
9	MTcCIR 40	51	21	MTcCIR 8	46
10	MTcCIR 60	46	22	MTcCIR 12	46
11	MTcCIR 10	46	23	MTcCIR 22	46
12	MTcCIR 46	46	24	MTcCIR 37	46

Una vez ajustadas las migraciones de los fragmentos se realizó una amplificación en Multiplex de todas las muestras en evaluación, la verificación del producto amplificado se realizó en electroforesis en gel de Agarosa al 2.5%. En la figura 25, se presenta la electroforesis de verificación en gel de agarosa al 2.5%, con una amplificación en Multiplex de ADN de los materiales CAUC 39 y FEC 2. En la misma figura se puede observar la amplificación en Multiplex de 4 muestras evaluadas, resultados que permitieron la separación de las bandas y una visualización de los productos de PCR. Los microsatélites amplificados fueron los MTcCIR 145, 179, 225 y 236. En el carril 1: Marcador de peso pUC 19 DNA Mspl (Hpall) Marker 23. Carril 2: CCN 51 a Ta 46^0C. Carril 3: FEC 2 a Ta 46^0C. Carril 4: CCN 51 a Ta 51^0C. Carril 5: FEC 2 a Ta 51^0C. En la misma figura se puede observar la amplificación de los microsatélites entre 67 y 331 pb aproximadamente, valores que coinciden cercanamente con el rango de alelos reportados por Motamayor, *et al*., 2008 para los microsatélites utilizados en la determinación de la huella molecular de los genotipos de Cacao.

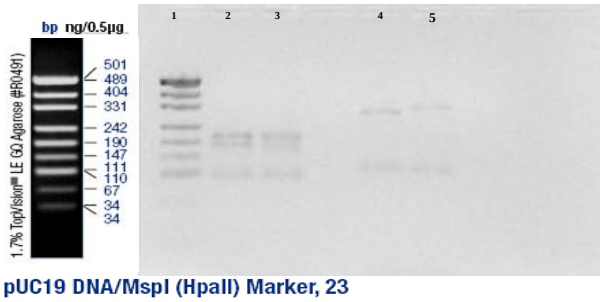


Figura 25. Electroforesis de verificación en gel de agarosa al 2.5%, con una amplificación en Multiplex.Nota: El producto amplificado en Multiplex corresponde a ADN de CAUC 39 FEC 2 con 4 microsatélites amplificados según su temperatura de anillamiento.

En la figura 26, se presenta el electroferograma detectado por 9 microsatélites evaluados para el cultivar FEC 2. En la misma figura se detalla el perfil obtenido de la separación por electroforesis capilar del genotipo FEC 2 en una reacción de multiplex con microsatélites amplificados a una temperatura de anillamiento de 46 °C, donde los picos representan pares de alelos amplificados para los marcadores MTCcIR 10 y MTCcIR 168.

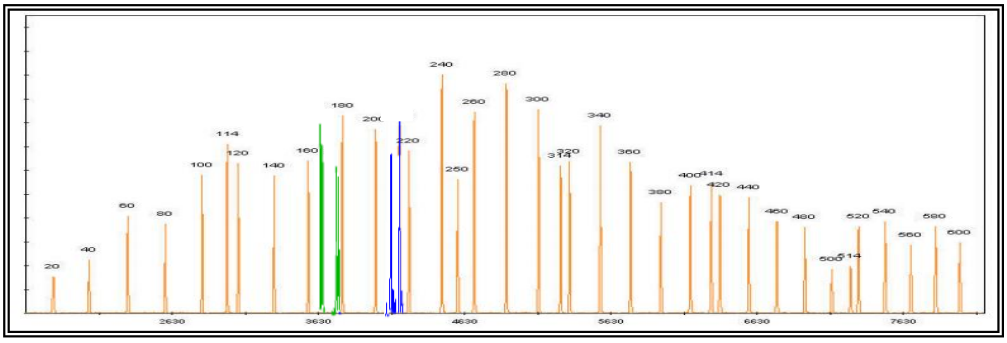


Figura 26 Electroferograma detectado por los microsatélites MTCcIR 10 y MTCcIR 168 evaluados para el cultivar FEC 2.

Según los resultados, todos los marcadores fueron amplificados en los genotipos evaluados, al mismo tiempo al comparar los resultados anteriores con los obtenidos por Martínez, (2007) y Hernández, (2013) se puede observar un comportamiento alterno en la amplificación de los marcadores MTCcIR 22, MTCcIR 24 y MTCcIR 40, pues no

funcionaron en los trabajos de los primeros autores pero amplificaron bien el ADN de cultivares regionales colombianos. Los datos obtenidos a partir de la electroforesis arrojaron menos del 5% de datos perdidos para lo cual se procedió a realizar los análisis de datos moleculares.

3.2.3 Análisis de datos moleculares

Según los análisis de los datos moleculares se determinaron los alelos para cada uno de los 19 microsatélites en los 24 cultivares evaluados. En la tabla 21, se presenta el número de alelos observados, el rango de tamaño de alelos esperados, rango de tamaño de alelos observados y PIC de los 19 locus evaluados. En la misma tabla se puede observar como para algunos microsatélites, el número de pares de bases (bp) encontrados son iguales a los reportados en los estudios de (Hernández 2013; Motamayor 2008; Saunders 2004; Lanaud 1999) en otros casos no presentaron el mismo número de bp, posiblemente debido a las diferencias genéticas y orígenes de los cultivares evaluados.

En la tabla 22, se presentan los alelos identificados en los cultivares para los 19 loci evaluados. Según la misma tabla, todos los sistemas analizados fueron altamente polimórficos; el número promedio de alelos por locus para todos los marcadores analizados fue 20.42, donde los microsatélites MTCcIR 12 y MTCcIR 11, presentaron los sistemas más polimórficos con el mayor número de alelos en los loci analizados (32 y 30 respectivamente), mientras que los MTCcIR 145 y MTCcIR 225, presentaron el más bajo (12 y 16). Resultados que coinciden con los datos reportados (Saunders, 2004; Martínez, 2007; Hernández, 2013) quienes señalan los mismos marcadores (MTCcIR 11, 12 y 37) usados en este estudio como los sistemas más polimórficos para la especie Cacao.

Tabla 21. Numero de alelos observados, rango de tamaño de alelos esperados, rango de tamaño de alelos observados y PIC de los 19 locus evaluados.

Cromosoma	Alelos Reportados	Tamaño esperado	Tamaño observado	PIC
MTcCIR10	14	30 - 220	210	0,64239618
MTcCIR252	22	150	157	0,7165064
MTcCIR46	18	203	203	0,68930202
MTcCIR168	22	175	172	0,81732397
MTcCIR176	16	106	108	0,67079303
MTcCIR145	13	169 - 267	117	0,68704277
MTcCIR225	14	302	298	0,71904115
MTcCIR236	17	193	193	0,7799448
MTcCIR179	16	288	287	0,70039115
MTcCIR1	21	128-146	145	0,71738819
MTcCIR60	21	190-218	200	0,7107824
MTcCIR40	17	262-288	278	0,67345203
MTcCIR33	24	265-348	290	0,70699925
MTcCIR24	20	186-207	194	0,70774052
MTcCIR11	28	286-321	301	0,72612913
MTcCIR37	31	136-187	164	0,81065466
MTcCIR22	26	276-301	286	0,70209617
MTcCIR8	18	290-307	294	0,69981197
MTcCIR12	29	165-256	197	0,71865069

.

Tabla 22. Alelos identificados (bp) de los microsatélites amplificados en los diferentes cultivares de cacao criollo evaluados.

| Marcador | Cromosomoa | Alelo reportado | Alelos Identificados | | |

En la tabla 23, se presentan los parámetros genéticos para los marcadores microsatélites. En la misma tabla, se pueden detallar los valores de heterocigosidad esperada (He=0.7017) y la heterocigosidad observada (Ho=0.6997) para todos los loci evaluados; evidenciando levemente una diferencia entre la diversidad genética observada con respecto a la esperada en algunos de los diferentes marcadores estudiados. Así mismo, de los 19 marcadores utilizados los más informativos tomando en cuenta el parámetro de heterocigosidad esperada fueron MTcCIR 176 (He = 1) y MTcCIR 236 (He =1); MTcCIR 11 (0,76) los menos informativos MTcCIR 10 (He =0,548) y MTcCIR 145 (0,596). En el anexo 7, se muestran los valores de las frecuencias alélicas para cada locus evaluado.
En la tabla 23, también se pueden observar los parámetros moleculares evaluados, entre ellos, el número de alelos, Índice de diversidad, estadísticos F o de Wright (Fst) y PIC. Según los resultados, la capacidad informativa que presentaron los 19 marcadores analizados, revelaron un comportamiento similar según el índice de contenido polimórfico PIC, en donde se observó que el locus con mayor capacidad de discriminación fue MTcCIR 37 (0,95) y MTcCIR 11 (0,951).

El índice de contenido polimórfico (PIC) fue un parámetro introducido por Botstein *et al*., (1980) como un indicador de la calidad de un marcador en estudios de cartografía génica. Según el autor, los marcadores con valores de PIC superiores a 0.5 se consideran muy informativos, los que tienen valores entre 0.25 y 0.5 medianamente informativos y los que muestran valores inferiores a 0.25 poco informativos.

Según la misma tabla, el valor promedio del índice de contenido polimórfico PIC para los 19 marcadores evaluados fue de 0,90, donde marcadores como el MTcCIR 37, MTcCIR 8, MTcCIR 12, MTcCIR 60 y MTcCIR 33 superan el promedio con valores entre 0,926 y 0,9517, resultados que evidencian la informatividad y utilidad de los microsatélites para detectar variabilidad genética en *Theobroma cacao* L. Autores como Hernández, (2013), citando a Moazami *et al*., (1994) menciona el uso del PIC para obtener una valoración de la calidad de un marcador para estudios genéticos (de segregación, de identificación - control de paternidad y de población) pues refleja el polimorfismo detectado. Sin embargo, es importante mencionar su dependencia del número de alelos y de sus frecuencias, no siendo suficiente la información que aporta para basar en ella la elección de un marcador u otro.

.

Estos resultados coinciden con los publicados por Hernández, 2013, quien reporta los microsatélites MTcCIR 37, MTcCIR 8, MTcCIR 12, MTcCIR 60 y MTcCIR 33 como los más informativos.

Tabla 23. Parámetros genéticos para los marcadores microsatélites.

Marcador	No de Alelos	Ho	He	Fst	PIC
MTcCIR -10 Y16984	**14**	0,000	0,679	0,159	0,642
MTcCIR-252	**22**	0,679	0,734	0,147	0,717
MTcCIR 46	**18**	0,607	0,710	0,195	0,689
MTcCIR-168	**22**	1,000	0,841	0,087	0,817
MTcCIR-176	**16**	0,440	0,694	0,178	0,671
MTcCIR-145	**13**	0,631	0,714	0,155	0,687
MTcCIR-225	**14**	0,655	0,760	0,113	0,719
MTcCIR-236	**17**	0,952	0,809	0,100	0,780
MTcCIR-179	**16**	0,607	0,720	0,157	0,700
MTcCIR 1	**21**	0,726	0,735	0,171	0,717
MTcCIR 60	**21**	0,500	0,738	0,171	0,711
MTcCIR 40	**17**	0,310	0,706	0,187	0,673
MTcCIR 33	**24**	0,476	0,731	0,170	0,707
MTcCIR 24	**20**	0,560	0,727	0,138	0,708
MTcCIR 11	**28**	0,726	0,743	0,180	0,726
MTcCIR 37	**31**	0,952	0,835	0,116	0,811
MTcCIR 22	**26**	0,655	0,722	0,197	0,702
MTcCIR 8	**18**	0,631	0,720	0,171	0,700
MTcCIR 12	**29**	0,679	0,737	0,182	0,719

En la tabla 24, se presenta el numero de muestras por población y los valores de Heterocigosidad observada y esperada según las poblaciones evaluadas. En la misma tabla se puede observar como la población de Criollos presentó la menor diversidad de

todas las poblaciones. Esta población corresponde a una selección de materiales realizada en la Sierra Nevada de Santa Marta y la Serrania del Perija por instituciones como Fedecacao y Corpoica; resultados que concuerdan con los publicados por Hernández, 2013 quien menciona como el cacao criollo puede presentar signos de depresión endogámica (Rufino, 2008; Hernández, 2013) que es la pérdida de adaptación (vigor, viabilidad, fecundidad) producida por la pérdida de variación genética debido a la homocigosidad, eventos que podrían afectar la supervivencia de la especie. Así mismo, menciona como la expresión de alelos recesivos podría ser una de las razones por las cuales el cacao criollo presenta índices de baja de productividad y fitosanidad. Según Barret y Kohn (1991), la endogamia permite la expresión de alelos recesivos perjudiciales procedentes de ambos progenitores, ya que suele producirse por el cruzamiento entre parientes próximos.

Tabla 24. No de Muestras, heterocigosidad observada y esperada según las poblaciones evaluadas.

Poblaciones	**No Muestras**	**Ne**	**Na**	**Ho**	**He**	**Fst**
Regionales	14	11,2049	14,8421	0,7519	0,8980	0,0357
Introducidos	7	7,7733	9,3684	0,7669	0,8641	0,1759
Criollos	4	1,9703	2,9474	0,3421	0,4572	0,1250

En la tabla 24, también se puede observar como la población de criollos genero los menores valores de heterocigocidad, seguramente como resultado de una autofecundación regular, efecto que se podría esperar, pues además de ser el Cacao una planta autógama, esta población se ha caracterizado por ser originaria de la Sierra Nevada de Santa Marta y la Serranía del Perijá, condición que ha clasificado sus cultivares como criollos tipo Gusare. Así mismo, para las demás poblaciones se obtuvo una mayor heterocigocidad, indicando una aumento en la diversidad de las poblaciones evaluadas.

En la tabla 25, se presentan los rangos de interpretación (Wright, 1965**).** Según los resultados MTcCIR 60 presentó valores de F_{ST} que oscilaron entre 0,25 y 1, indicando una diferenciación muy grande por parte del marcador (Hartl, 2000). No obstante el marcador

.

MTcCIR 22 (0,0003) presento la menor variabilidad; análisis importantes cuando se desea abordar trabajos de tipificación masiva, reduciendo los marcadores a aquellos que proporcionan la máxima información.

La diferenciación genética entre las poblaciones de los cultivares evaluados (Regionales, Introducidos y Criollos) fue muy grande (ver tabla 25) ya que el F_{ST} fue de 0.2918 ($p > 0.001$), con una alta diversidad por locus y una alta variabilidad entre los loci, lo cual podría deberse a que en las regiones existen materiales de diferentes orígenes que están contrastando genéticamente. Resultados que coinciden con los publicados por Motamayor, *et al*., (2008), quien encontró diferenciación genética en 10 grupos poblacionales con un Fst=0,25, indicando una diferenciación genética en una población superior a los 900 cultivares.

Tabla 25. Rangos de interpretación (Wright, 1965).

Rangos de FST	**Grado de diferenciación poblacional**
0.00 – 0.05	Indicativo de poca diferenciación genética.
0.05 – 0.15	Indica una diferenciación genética moderada.
0.15 – 0.25	Indica gran diferenciación genética.
0.25 – 1.00	Indica una diferenciación genética muy grande

3.3 Comparación con la base de datos ICGD y huella molecular

En la tabla 26, se presenta la comparación entre los alelos obtenidos. En la misma tabla se puede observar el contraste entre los alelos obtenidos en el presente estudio y los obtenidos por Zhang, 2010b para los cultivares TSH 565(testigo de la susceptibilidad), CCN 51(clasificado como moderadamente resistente), ICS 95 (Testigo de la resistencia), genotipos reconocidos como susceptibles, moderadamente resistentes y resistentes a la

infección de *M. roreri,* información que se encuentra publicada en la base de datos internación del germoplasma en Cacao. Los resultados indican que no existen grandes diferencias entre los tamaños reportados por Zhang D, 2010b y los presentados en el presente capitulo. Es importante mencionar que los microsatélites elegidos para la generación de la huella molecular fueron seleccionados por presentar los mayores polimorfismos en la base genética.

Tabla 26. Comparación entre los alelos obtenidos en el presente capitulo y los reportados por Zhang, D., 2010b en el banco Internacional de Germoplasma ICGD.

Accesión		**mTcCIR1**		**mTcCIR8**		**mTcCIR11**		**mTcCIR12**		**mTcCIR22**		**mTcCIR24**		**mTcCIR37**		**mTcCIR40**		**mTcCIR60**		**Reference**
TSH565	**ICGD**	128	142	292	292	317	317	190	213	282	290	187	187	136	179	262	282	196	216	Zhang, D., 2010b
	TSH565	151	158	292	292	310	317	194	213	278	290	180	198	132	179	273	283	206	206	
CCN51	**ICGD**	128	140	290	306	291	305	203	207	282	290	187	187	136	149	282	282	216	216	Zhang, D., 2010b
	CCN51	153	157	290	306	291	315	203	207	282	288	187	187	134	143	230	230	181	195	
ICS95	**ICGD**	128	140	306	306	291	291	190	215	290	294	199	199	179	179	274	282	196	216	Zhang, D., 2010b
	ICS95	149	163	302	302	303	317	187	211	286	289	196	196	176	176	274	282	199	208	

Tomado de ICGD, reportado por Zhang, D., 2010b

.

En la tabla 27, se presenta la huella molecular de 18 materiales regionales y 7 cultivares introducidos. En la misma tabla se puede encontrar la huella molecular de los materiales introducidos utilizados como testigos durante la evaluación del segundo capítulo, entre los más importantes el ICS 95 (clasificado como resistente), CCN 51 (clasificado con respuesta moderada) y TSH 565 (clasificado como susceptible); resaltados con un color diferente se observan aquellos marcadores que fueron polimórficos según el material genético evaluado.

Tabla 27. Huella molecular de los cultivares regionales colombianos evaluados.

	MTcCIR10	MTcCIR252	MTcCIR46	MTcCIR168	MTcCIR176	MTcCIR145	MTcCIR225	MTcCIR236	MTcCIR179	MTcCIR1	MTcCIR60	MTcCIR40	MTcCIR33	MTcCIR24	MTcCIR11	MTcCIR37	MTcCIR22	MTcCIR8	MTcCIR12
FEC 2	228	106	229	100	102	117	290	183	289	150	187	286	275	191	282	140	278	284	165
	228	106	229	104	104	121	291	200	291	150	193	289	287	201	301	181	295	295	218
CAUC 39	210	154	191	171	104	118	282	183	282	149	195	278	279	187	284	141	277	288	177
	210	158	204	184	104	121	282	201	293	163	195	288	279	204	304	168	281	292	206
CAUC 43	211	148	202	174	106	115	299	183	282	149	194	278	285	206	283	138	279	288	179
	211	159	209	176	106	121	301	201	283	163	194	288	285	209	305	186	281	294	206
FLE 2	208	149	201	168	105	114	299	184	289	149	199	353	286	190	289	140	278	290	181
	208	163	209	178	107	122	299	200	290	163	208	353	286	204	301	186	288	302	203
ICS 95	208	147	188	174	104	115	290	186	282	149	199	274	295	196	303	176	286	302	187
	208	159	211	175	104	123	299	198	293	163	208	282	346	196	317	176	289	302	211
CCN 51	205	149	202	167	113	118	288	191	286	129	197	283	292	187	290	134	282	290	203
	205	184	204	182	118	121	301	193	292	141	216	283	311	187	306	143	288	306	207
FSV 155	209	145	191	169	105	118	299	191	281	149	195	195	210	190	289	148	281	289	166
	209	262	209	185	106	121	299	193	292	163	195	195	210	197	311	188	284	302	207
FLE 4	208	149	202	168	103	114	300	182	292	124	192	262	273	184	317	136	276	282	187
	208	162	207	184	106	118	302	197	292	137	210	282	345	190	317	181	292	289	210
FSV 41	187	140	196	172	115	116	301	186	280	149	203	277	285	186	296	138	275	285	166
	187	163	196	182	116	122	315	202	292	163	203	277	285	208	301	186	301	306	242
IMC 67	218	144	202	174	106	101	300	191	283	141	185	278	285	183	302	146	286	286	199
	218	167	202	177	106	127	300	193	283	175	210	288	297	195	314	157	286	290	213
ICS 39	226	141	202	167	90	110	299	191	270	128	194	274	300	187	301	165	292	290	192
	226	165	205	185	115	110	307	193	300	140	215	284	345	199	318	187	296	306	213
TSH 565	206	148	201	170	104	111	299	186	292	128	196	262	275	190	310	132	278	292	194
	206	167	204	184	104	116	300	200	292	142	216	282	345	190	317	179	290	292	213
FMA 7	215	140	196	172	121	117	284	192	280	125	185	275	295	183	282	155	270	280	207
	215	163	196	182	122	122	284	207	284	135	205	280	330	201	312	167	281	290	207
FSV 25	208	140	204	164	104	117	299	198	279	140	196	270	291	188	297	146	285	287	186
	208	164	207	182	104	124	299	198	293	167	196	270	291	194	311	177	291	306	259
FQUIP 1	208	149	196	166	106	116	301	186	280	150	194	270	281	184	298	136	275	285	166
	208	161	207	169	106	116	301	203	280	164	204	270	283	204	316	186	302	306	205
FLE 3	207	156	204	169	106	117	299	193	282	145	208	277	283	186	283	141	275	289	172
	207	147	204	185	106	117	301	193	283	151	217	277	283	206	298	185	288	305	201
FGI 4	206	149	202	167	113	118	299	191	286	137	198	276	273	185	295	143	280	289	171
	206	184	204	182	118	121	301	193	292	152	198	276	293	206	304	185	293	293	205
FRN 5	207	148	202	168	105	117	291	191	288	145	211	287	272	185	285	131	275	294	170
	207	184	213	183	105	118	291	193	289	150	211	287	293	203	306	185	293	294	206
FSA 13	213	148	202	171	106	118	301	184	288	150	192	277	282	187	301	145	273	293	177
	213	184	206	183	107	118	311	200	289	166	211	277	293	209	306	184	289	313	202
FMAC 11	206	150	192	174	104	117	299	186	288	142	215	288	275	191	281	162	274	284	178
	206	184	207	175	104	118	299	202	289	166	215	288	289	210	308	174	283	314	209
UF 613	212	136	192	165	118	117	284	189	277	130	190	280	304	190	287	164	278	286	211
	212	161	197	171	125	122	284	207	284	142	209	284	340	206	314	176	286	294	211
CR 40	208	159	203	175	107	116	294	190	289	125	193	270	275	187	299	170	298	298	193
	208	159	203	178	107	116	319	196	289	125	193	270	275	187	299	190	298	298	193
CR 41	208	159	203	175	107	116	294	190	289	125	193	270	275	187	299	170	298	298	193
	208	159	203	178	107	116	319	196	289	125	193	270	275	187	299	190	298	298	193
CR 42	208	159	203	175	107	116	294	190	289	125	193	270	275	187	299	170	298	298	193
	208	159	203	178	107	116	319	196	289	125	193	270	275	187	299	190	298	298	193
UF 273	212	159	195	160	100	115	290	186	282	145	195	288	310	203	291	149	282	290	207
	212	159	210	180	110	123	299	198	293	165	210	288	310	203	317	165	282	298	215

.

3.3.1 Análisis de componentes principales

En las figura 27 y 28, se presentan los gráficos de Análisis de Componentes principales realizados con 10 marcadores microsatélites asociados a la diversidad genética de *Theobroma cacao* L y 9 marcadores microsatelites asociados a QTLs de resistencia a *M. roreri*. Según los resultados, la contribución de los dos primeros componentes de la figura 27, evidencia un 50% de la inercia total, mientras que el analisis realizado en la figura 28 evidencia un aporte superior al 60% de la incercia para los dos primeros componentes principales.

En las mismas figuras se pueden detallar los análisis de correspondencia con las subpoblaciones como fuente de variación (componente principales por subpoblaciones) y observar la formación de cluster según las características de los marcadores microsatélites utilizados, los cuales son reconocidos por su potencial para la generación de la huella molecular de materiales de cacao (Motamayor *et al*., 2008) y por asociarse a QTLs de resistencia a *M. roreri* (Brown *et al*., 2009).

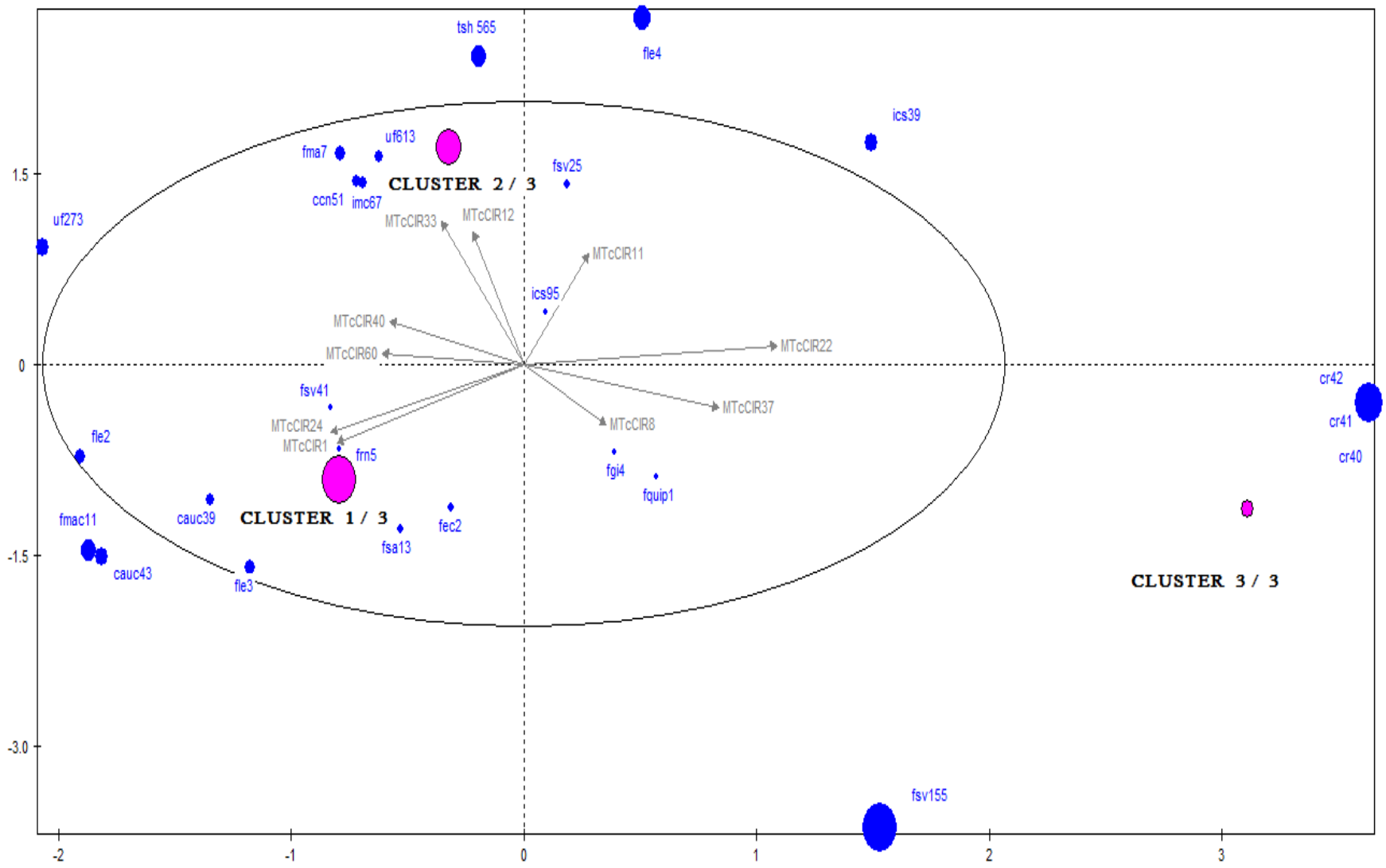


Figura 27. Gráfico de Análisis de Componentes principales según los 10 marcadores microsatélites asociados a la diversidad genética de *Theobroma Cacao* L.

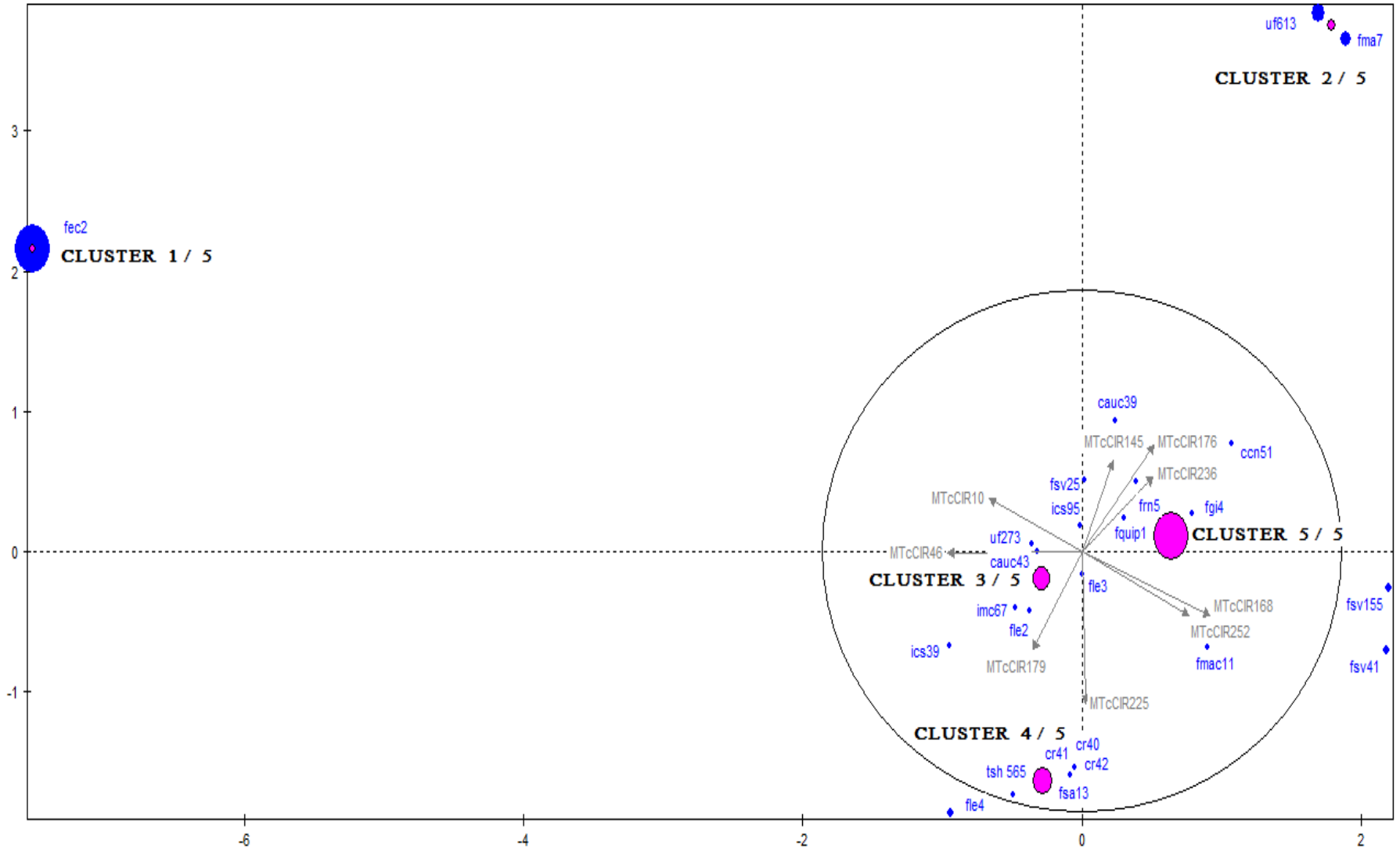


Figura 28. Grafico de Analisis de Componentes principales segun 9 marcadores microsatelites asociados a QTLs de resistencia a *M. roreri*.

.

3.3.2 Análisis de distancias genéticas

3.3.3 Distancias entre poblaciones

A partir del análisis del cálculo de las frecuencias alélicas se estimaron las distancias genéticas estándar (Ds) utilizando la medida propuesta por Nei (1927). En la figura 29, se presenta el árbol de distancias de las 5 poblaciones DSA construido con el método neighbor joining (NJ). En la misma figura se puede observar gráficamente la técnica de agrupamiento, generando un árbol de distancias considerado en algunos casos como una representación de filogenia y observando claramente un espectro de heterogeneidad entre los individuos, aunque no suficiente para lograr una alta estructura genética.

En la figura 29, se presenta el árbol de distancias individuales DSA construido según el método de estimación de distancias geneticas Neighbor Joining (NJ)**.** En la misma figura se puede observar como los materiales CR 40, 41, 42 y FSV 155 se agrupan en el clúster 1; los materiales CCN 51, FLE 4, TSH 565, FSV 25, IMC 67, FSV 41, FMA 7, UF 613 y UF 273 se agrupan en el cluster 2 y los materiales ICS 39, ICS 95, FSA 13, FQUIP 1, FGI 4, FLE 3, FRN 5, FMAC 11, FLE 2, CAUC 39, CAUC 43 y FEC 2 en el clúster 3.

Según los resultados el primer conjunto de materiales se agrupan en el clúster 1, los cuales son muy similares en cuanto a tipologías productivas y morfológicas, compartiendo características de grano criollo y origen genético, pues fueron seleccionados en la Sierra Nevada y la Serranía del Perijá, a diferencia del material FSV 155 quien se origino a partir de un cruce entre un criollo y un desconocido.

A una distancia mayor se unen los materiales agrupados en el clúster 2, quines comparten características asociados a descriptores morfológicos de los frutos como características bioquímicas, porcentajes de grasa, fibra y proteína, acidos esteáricos, oleicos, palmíticos y linoleico (Aranzázu *et al*., 2013). Un poco mas distantes se encuentran los materiales agrupados en el clúster 3 quienes comparten una cercanía dada por la similaridad en características de tipo morfológicas y de componentes del rendimiento, como color y forma del fruto, características de las flores, color y medidas de la semilla o grano (Aránzazu *et al*., 2013) y en donde seguramente estan participando con una porción importante de sus alelos, en frecuencias similares.

En clúster 3 se puede resaltar la cercanía genética de los materiales ICS 39 y ICS 95, los cuales son materiales que provienen de una sola pobalcion genéticamente homogénea que puede ser considerada como una variedad local con un ancestro común tipo criollo y de origen centroamericano (Aranzázu *et al*., 2013; Johnson *et al*., 2009; Belele *et a*l., 1994). Del mismo clúster también se puede resaltar la cercanía genética entre los materiales CAUC 39 y CAUC 43, los cuales son originarios de una selección de 17 arboles hibridos con aparente resistencia a Monilia, realizada dentro de un lote que sobresalio por alta producción en la hacienda Palmeras en el municipio de Caucacia en Antioquia (Sanchez & Cubillos 1976) y quienes son muy similares en cuanto a características morfológicas y agronómicas.

De los materiales FRN 5, FLE 4, FQUIP 1, aún no se conocen descriptores morfológicos, productivos, ni características de sabor y aroma por las cuales se puedan asociar a los demás genotipos que se encuentran agrupados en los diferentes clústers.

Los cultivares de origen criollo se agruparon y alejaron de los demás clúster, indicando que son materiales muy diferentes a los demás genotipos evaluados. La línea vertical que atraviesa el dendograma delimita la formación de los tres clúster presentados durante el análisis.

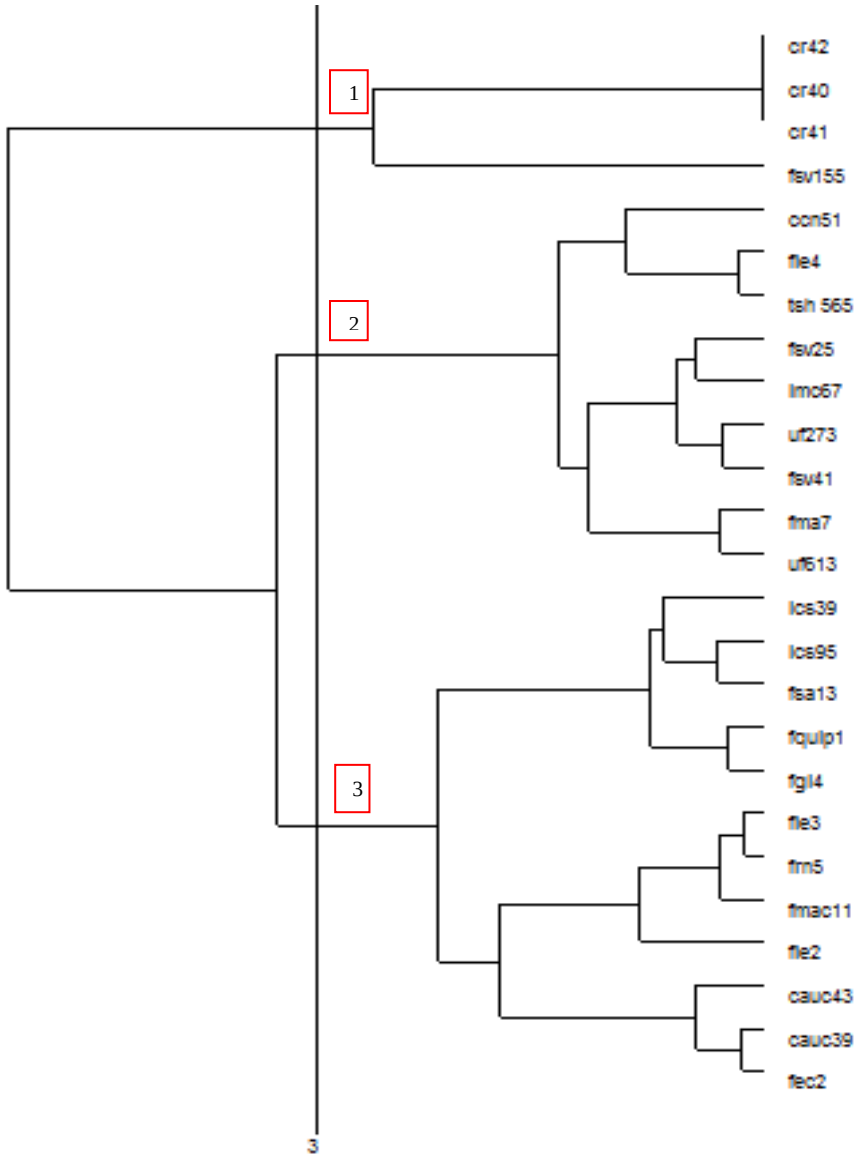


Figura 29. Árbol de distancias individuales DSA construido según el método de estimación de distancias geneticas Neighbor Joining (NJ).

3.3.4 Distancias entre individuos utilizando marcadores moleculares asociados a QTLs de resistencia a *M. roreri*.

La determinación de las distancias genéticas entre individuos es importante para contrastar los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales, confirmando o rechazando la información. En la figura 30, se presenta el arbol de distancias individuales DSA construido según el método de estimación de distancias geneticas Neighbor Joining (NJ) y utilizando los marcadores moleculares microsatélites asociados a QTLs de resistencia a *M. roreri*. Según la figura, se observa una tendencia a la formación de varios subgrupos donde los materiales con la menor distancia podrían tener una relación genética según la respuesta de resistencia a *M. roreri*, manteniendo ciertas diferencias entre el cacao criollo tipo guasare de Colombia (clúster 4) y las demás poblaciones, posiblemente debido al origen y a las diferencias genéticas entre clones; resultados que concuerdan con el estudio de Aránzazu *et al*., 2009, quien evaluó 52 genotipos elite de Fedecacao y Corpoica, mostrando una población con una alta variabilidad genética.

Al verificar los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales (ver figura 28) con las distancias individuales de la figura 30, se confirma las distancias geneticas que existen entre el cultivar FEC 2 y los demás materiales de evaluados (clúster 2, 3, 4 y 5), pues el mismo se encuentran en el clúster más distante del dendograma, entendiendo por qué en el capitulo anterior el material fue clasificado como único cultivar resistente a *M. roreri.* No obstante, el material FEC2 se mostró distante de los demás, tanto con los loci no asociados como con los loci asociados a QTL de resistencia, seguramente debido a un origen genético diferente y no solo a sus características de resistencia.

Por su parte, el material TSH 565, fue clasificado en el capítulo anterior como susceptible a *M. roreri,* mientras que el FSA 13, fue reportado por su respuesta moderada de suceptibilidad al hongo (Aranzázu *et al*., 2013), donde los materiales de origen criollos son reconocidos por su suceptibilidad a plagas y enfermedades (Motamayor *et al*., 2008). Resultados que conciden con la agrupación presentada en el clúster 4, quien refleja una respuesta de suceptibilidad al patógeno similar según los marcadores moleculares microsatalites asociados a QTLs de resistencia a Monilia.

Según la figura 30, el clúster 3 agrupó los materiales FLE 3, CAUC 43, IMC 67, ICS 39 y FQUIP 1, agrupamiento que coincide con una respuesta de resistencia moderada a la infección por *M. roreri* reportada en el capítulo anterior. Es importante mencionar que los materiales IMC 67 y FLE 3 en el presente estudio no fueron evaluados por su respuesta de resistencia al patógeno, sin embargo, han sido reportados por autores como Aránzazu *et al*., (2009, 2013), por su respuesta moderada a la infección por Monilia.

Igualmente, los materiales ICS 95, FLE 2, CAUC 39, FSV 155, FSV 41 y CCN 51 agrupados en el clúster 5, seguramente pueden estar compartiendo algún tipo de componente genético asociado a la resistencia genética a Monilia, pues los mismos cultivares fueron clasificados en el capítulo anterior con una respuesta de resistencia moderada al hongo, a execpción de los cultivares ICS 95 y UF 273, el primero por ser utilizado como testigo de la resistencia en el capítulo anterior y el segundo por ser un cultivar evaluado como parental resistente durante la determinación de QTLs asociados a la resistencia a *M. roreri* (Brown *et al*., 2009). Materiales como FGI 4, FRN 5, FSV 25, no fueron evaluados en el segundo capítulo, sin embargo, Aránzazu *et al*., 2013 en su publicación catálogo de cultivares los clasifica con una respuesta de resistencia al patógeno moderada, mientras que materiales como el FMAC 11 aún no se conocen datos de su respuesta de resistencia.

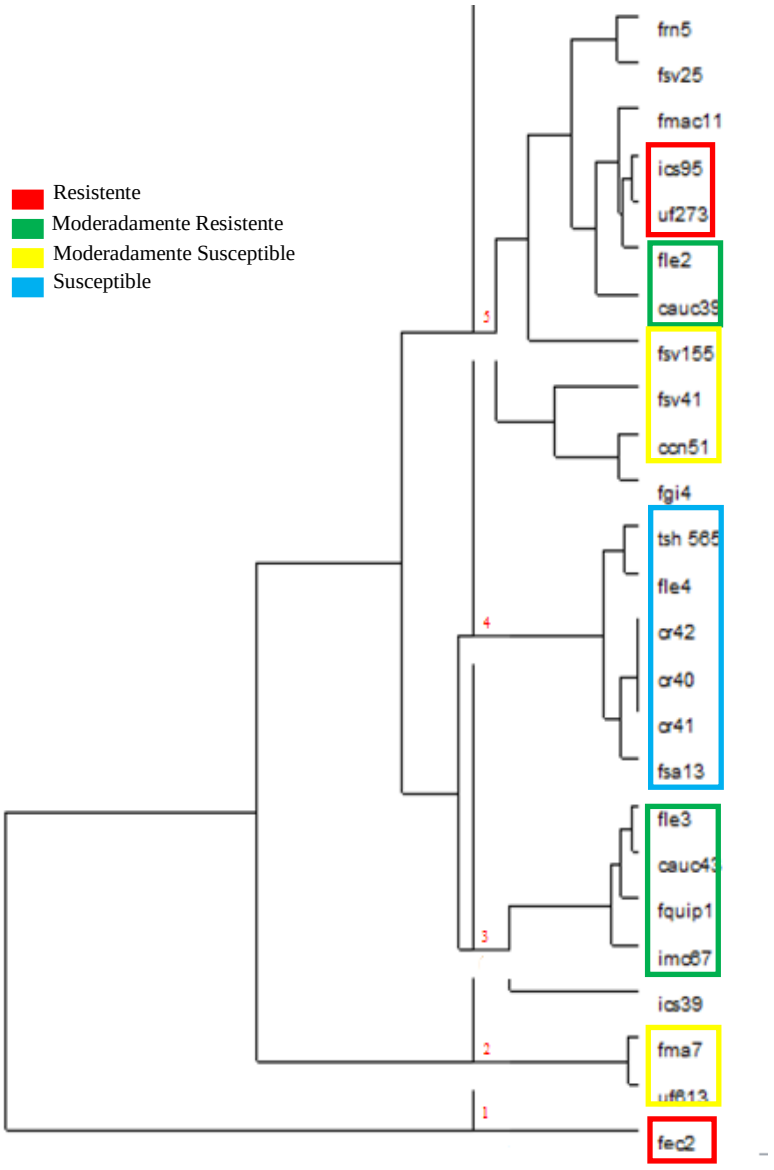


Figura 30. Árbol de distancias individuales DSA construido según el método de estimación de distancias geneticas Neighbor Joining (NJ) y utilizando los marcadores moleculares microsatélites asociados a QTLs de resistencia a *M. roreri*.

3.4 Discusiones

3.4.1 Analisis de microsatélites

El análisis de los locus amplificados fue realizado una vez se logró ajustar la metodología de electroforesis capilar a través del ajuste de la concentración adecuada del producto

amplificado y de la eliminación de artefactos durante la amplificación de los alelos, los cuales pueden interferir con la clara interpretación de los resultados al presentar amplificaciones inespecíficas y preferenciales de algunos loci, e inhibición de la amplificación por formación de dímeros de primers. En ese sentido, hubo presencia en algunas muestras de artefactos, para lo cual se realizaron repeticiones sucesivas del producto amplificado con ajuste de concentración para tener la mayor seguridad en el tamaño de los alelos amplificados. Asi mismo se realizaron ajustes y lecutras en equipos secuenciadores diferentes, ubicados en los laboratorios de genética tanto de la Universidad Nacional de Colombia, como en la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

La genotipificacion se realizó con el fin de conocer, por medio de las herramientas moleculares, algunos aspectos de la diversidad genética presente en los 24 materiales evaluados, información que complemento los resultados del capítulo 2 donde tambien se evalúron aspectos de la diversidad genética pero a través de la respuesta de los materiales a la inoculación con el patógeno.

El etiquetado erróneo de algunos cultivares y la falta de identificación genética de los mismos ha provacado que en Colombia existan muchos jardines clonales con materiales introducidos y regionales de los cuales no se tiene claridad en su identificación. La determinación de la huella genomica de cada uno de los materiales regionales evaluados en este capitulo y la determinación de parámetros genéticos como el Indice de Contenido Polimorfico PIC para todos los loci evaluados, representa un avance importante dentro de la identificación clara de cada uno de los cultivares regionales que se quieran distribuir en las diferentes zonas productoras del país.

3.4.2 Análisis de datos moleculares

Los valores de diversidad son directamente proporcionales a la heterocigosidad, donde la población de regionales presentó una mayor diversidad He (0,85) y Ho (0,72) que las demás poblaciones evaluadas, mientras la población de criollos presentó la menor diversidad He (0,60) y Ho (0,42).

En una población la diversidad genética, que puede ser estimada a partir de He, es un producto de muchos procesos por los cuales ha pasado la población, por ejemplo procesos demográficos (cuellos de botella por ejemplo) y efecto de fuerzas evolutivas (mutación, selección, deriva genética, etc.). En el presente estudio al no tener muestras de grandes poblaciones la He fue estimada y analizada como un parámetro que esta afectado por las frecuencias alélicas y el numero de alelos, brindando una idea de la heterogeneidad de la muestra y de los subrupos dentro de ella; mas no fue analizada dentro del contexto de poblaciones como comúnmente se hace.

Generalmente para comparar la diversidad de diferentes loci se usa la H_e o el PIC, ya que la H_o en una población depende de muchos factores propios de cada una y por lo cual no es un buen estadístico para comparar entre loci y entre poblaciones, por el contrario la H_E al ser el % de heterocigotos esperado en una población ideal con ciertas frecuencias alélicas, se puede usar para comparar entre diferentes loci y poblaciones, ya que no va a depender de los diferentes procesos que ocurren en una población y que afectan H_O al asumir poblaciones ideales. Según los resultados, de los 19 marcadores utilizados los más informativos y diversos tomando en cuenta el parámetro de heterocigosidad esperada fueron MTcCIR 176 (He = 1) y MTcCIR 236 (He =1); MTcCIR 11 (0,76), mientras que los loci MTcCIR 10 (He =0,548) y MTcCIR 145 (0,596) fueron los menos informativos, es decir, son los sistemas más diversos (ver tabla 23). En el anexo 7, se muestran los valores de las frecuencias alélicas para cada locus evaluado.

En promedio todos los marcadores evaluados reflejaron un Indice de Contenido Polimorfico de 0,90 donde los locus MTcCIR 37, MTcCIR 8, MTcCIR 12, MTcCIR 60 y MTcCIR 33 superan el promedio con valores entre 0,926 y 0,9517, reflejando mayor capacidad informativa y poder de discriminación, resultado que evidencia su calidad como marcadores para estudios de discriminación entre cultivares.

Las huellas moleculares de algunos de los materiales comerciales de mayor distribución en en latinoamerica que se encuentran publicadas en la base de datos internaciónal de germoplasma en Cacao (ICGD), permitieron la comparación entre los alelos obtenidos en el presente estudio con los publicados y reportados por autores como Zangh *et al*., 2010b y Motamayor *et al*., 2008. Donde los cultivares universales utilizados como testigos (TSH 565, ICS 96, CCN 51), evidenciaron que los alelos obtenidos en el presente estudio y los

publicados en el ICGD se encuentran dentro el rango de amplificación reportado para cada uno de los loci, resultado que demuestra la buena calidad de las amplificaciones y la confiabilidad de la electroforesis capilar como técnica que permite evaluar varios marcadores en una sola muestra de ADN.

La generación de la huella molecular de los materiales regionales constituye una etapa fundamental para su conocimiento y caracterización, donde la Federación Nacional de Cacaoteros ha realizado un papel importante al seleccionarlos y evaluarlos en fincas de agricultores bajo parcelas demostrativas. Una vez se conoce la estabilidad productiva y fitosanitaria de los materiales regionales se solicita la aprobación de la comisión de Fomento Cacaotero; entidad del estado que junto a la certificación comercial de cultivares otorgada por el ICA, autorizan la aprobación y distribución de los materiales a la comunidad cacaotera en Colombia (Fedecacao, 2014).

Con la identificación molecular de los cultivares, la Federacion Nacional de Cacaoteros podrá garantizar la distribución correcta del material genético de interés, evitando asi el etiquetado incorrecto de genotipos y la favoreciendo la buena distribución del material vegetal a las diferentes zonas productoras del país.

Materiales como el FEC 2, FLE 2, FLE3, FSA 13, FSA 41 ya pueden ser distribuidos en las diferentes regiones productoras de Cacao en el país, pues ya cuentan con una caracterización morfoagronomica y molecular completa, permitiendo la aprobación de la comisión de fomento cacaotero (Ente regulador de la cacaocultura en Colombia (Fedecacao, 2014) y el registro comercial de cultivares del ICA. Una vez materiales como FGI 4, FQUIP1, FSV 155, FSV 153, FLE 2, FSV 25, cumplan con el tiempo necesario de evaluación y seguimiento, serán postulados para recibir el permiso para la posterior distribución a todas las regiones productoras del país, pues son materiales que ya pueden identificarse a través de su huella molecular.

3.4.3 Análisis de componentes principales

Las distancias genéticas presentadas entre los materiales evaluados reflejaron alta heterogeneidad y diversidad entre los cultivares, donde los grupos de genotipos definidos previamente *a priori* con base en las regiones geográficas fueron soportados aunque no

de una forma significativa por los estadísticos evaluados, entre ellos, los métodos de ordenación como clúster y ACP; resultados similares a los encontrados por (Aránzazu *et al*., 2009) quien evaluo 23 marcadores SSR en 52 genotipos de Cacao provenientes de selecciones regionales, clones introducidos y cultivares de origen criollo, obteniendo como resultado similaridad entre las accesiones de origen criollo y alta Heterocigocidad y variabilidad en los demás cultivares evaluados.

Materiales como el ICS 39 y 95 clasificados de forma *a priori* en el grupo Introducidos, se agruparon en el análisis por componentes con los materiales regionales. Asi mismo, materiales como el FSV 25, FSV 41, FLE 4 y FMA 7, clasificados *a priori* en el grupo de Regionales, fueron agrupados según el analis de componentes principales en el grupo de los Introducidos. Al respecto, los cultivares FSV 25, 41 y FLE 4 comparten una similaridad pues corresponden a un mismo origen geográfico, selecciones realizadas en el departamento de Santander por Fedecacao (Fedecacao, 2014).

Este comportamiento seguramente se debe a que materiales como los ICS corresponden a una población genéticamente homogénea, que a su vez fueron utilizados como parentales para entregar semilla hibirida en las diferentes regiones productoras de Colombia (Aranzazu *et al*., 2013) contribuyendo seguramente de forma constante a la diversidad genética que se encuentra actualmente en esta región geográfica, razones que explican su similaridad en cuanto a características morfológicas y agronómicas con los cultivares Regionales.

3.4.4 Distancias entre poblaciones

Según los resultados obtenidos, las agrupaciones formadas por los materiales evaluados pueden estar condicionadas a la respuesta de resistencia genética a *M. roreri*, la cual está clasificada como de tipo cuantitativa o Poligénica (Phillis, 2008), evento que permite que todos los genes de resistencia en la planta estén distribuidos como características cuantitativas en la totalidad del genoma y que a su vez pueden determinar la respuesta de un cultivar a la carga genética de resistencia que tenga la misma. Es así como un cultivar con la totalidad de los genes de resistencia podrá condicionar una respuesta completa de defensa frente al patógeno, pero un cultivar con un mínimo del componente genético de resistencia no podrá ejercer la misma respuesta de defensa frente a la

infección de *M. roreri*, pero si podrá alternar eventos moderados tanto de resistencia como de susceptibilidad a la enfermedad (Sánchez, 1982; Brenes, 1983; Vanderplank *et al*., (1984); Phillips 1986; Suarez *et al*., 2006, (Brown *et al*., 2006, 2009 en Cacao); Aránzazu *et al*., 2009; (Daolin *et al*., 2009 en trigo), (Fukuoka *et al*., 2009 en Arroz), (Krattinger *et al*., 2009 en Cereales).

En ese sentido, materiales como el FEC 2, ICS 95 y UF 273 seguramente presentan una mayor carga genética de resistencia que materiales como FLE 2, CAUC 39, CAUC 43, FQUIP 1 y IMC 67, clasificados con una respuesta de resistencia Moderada y quienes a su vez pueden tener mayor carga genética de resistencia que materiales como FSV 41, FSV 155, CCN 51, FMA 7, ICS 39 y UF 613, quienes fueron clasificados con una respuesta moderada de susceptibilidad o de materiales como el TSH 565 clasficado como el material mas susceptible de todos los cultivares evaluados.

Por otra parte, según el análisis de coordenadas principales, es posible que los cultivares UF 273 y FEC 2, únicos híbridos reconocidos por su resistencia a *M. roreri* (Brown, 2007; Aránzazu, 2013), no comparten un ancestro en común, a pesar de ser considerados como de origen trinitario, producto de cruces entre forasteros y criollos; donde posiblemente tanto las barreras geográficas como las presiones de selección en estos genotipos (Hedrick, 1985), obligaron a los cultivares a generar fuentes de resistencia alternas al patógeno, conllevándolos a cambios en las frecuencias alélicas que fueron suficientes para diferenciarlos genéticamente como población.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

El cultivar FEC 2 por sus características de resistencia genética a Monilia puede servir como material parental en un proceso de mejoramiento genético que busque la identificación de QTLs asociados a la resistencia genética a Monilia, con lo cual a un futuro se podrán iniciar trabajos de búsqueda y selección de genes de resistencia asociados a la resistencia de la enfermedad.

Existieron amplias diferencias según la respuesta de la planta a la infección por *Moniliophthora roreri*, entre los 13 cultivares evaluados.

La determinación de la respuesta de cultivares de *Theobroma cacao* L, a la infección por *Moniliophthora roreri*, permitio clasificar el material regional FEC 2 como el único material regional con una respuesta de resistencia genética al patogeno.

Los cultivares clasificados como resistentes mostraron una mayor estabilidad en la expresión de los síntomas y signos de la enfermedad, frente a los cultivares clasificados como intermedios y suceptibles que mostraron mayores variaciones en los valores de las variables evaluadas.

Los cultivares ICS 95 y FEC 2 fueron clasificados como resistentes a *M. roreri* seguido por los cultivares CAUC 43, CAUC 39, CCN 51, FLE 2, FSV 153, FSV 155, FSV 41, FTA 2 y IMCS 67, ICS 39 quienes fueron clasificados con una respuesta moderada de resistencia, mientras el material TSH 565 fue clasificado como susceptible

Se debe evaluar la respuesta del cultivar FMAC 11, a la infección por *M. roreri*, pues se agrupo muy cerca de los materiales como el ICS 95 y UF 273 cultivares que presentaron respuesta de resistencia al patógeno.

Los marcadores moleculares microsatélites asociados a las características cuantitativas QTLs permitieron la agrupación de los cultivares evaluados según sus características de resistencia.

Las agrupaciones presentadas en los análisis de componentes principales utilizando los marcaradores microsatélites asociados a QTLs de resistencia a *M. roreri*, permitio separar los cultivares evaludos en 5 cluster diferentes que correspondieron con las respuestas de resistencia genética reportados en el capitulo dos del presente trabajo. Resultados que evidencian un efecto positivo en el empleo de los 9 marcadores microsatélites asociados a la resistencia, y utilizados para buscar un tipo de relación con los resultados de la respuesta de resistencia genética en campo.

4.2 Recomendaciones

Según la estabilidad en la resistencia del cultivar FEC 2, se puede utilizar como parental básico para ampliar la estrecha base genética comercial que tiene el país frente a Moniliasis, creando la posibilidad de un programa de mejoramiento con caracteres de interés para la búsqueda de la resistencia.

Es importante observar el desarrollo intracelular del patógeno, y la respuesta de la planta a la infección, pues los diferentes mecanismos que ejerce la planta de cacao para defenderse de la infección por patógenos aún son motivo de estudio en el patosistema Cacao-Monilia.

Según el análisis de distancias geneticas individuales y la clasificación de las respuesta de resistencia a *M. roreri*, es importante realizar inoculaciones dirigidas del patógeno a los cultivares FMAC 11 y FGI 4, los cuales por estar agrupados con cultivares reconocidos por su respuesta de defensa, podrían compartir algún tipo de carga genética que les permita activar mecanismos de defensa frente a la infección por *M. roreri.*

Es importante conocer cuál es el componente genético que están compartiendo cultivares como el FEC 2, ICS 95, CAUC 39, CAUC 43, CCN 51 y FLE 2, pues en la evaluación de la respuesta a la infección por *M. roreri*, mostraron un comportamiento de

resistencia y resistencia moderada, asociándose en el análisis de distancias individuales DSA por su cercanía genética y de cierta forma por su respuesta de resistencia en campo; mostrando la importancia de iniciar un proceso de mejoramiento genético que busque la identificación de QTLs asociados a la resistencia genética a Monilia, con lo cual a un futuro se podrán iniciar trabajos de búsqueda y selección de genes de resistencia asociados a la resistencia de la enfermedad.

La selección de materiales que estén evidenciando algún comportamiento de resistencia frente a la infección por *M. roreri*, es un proceso que deberá seguir adelante, pues la variedad genética que posee el país es amplia, donde es posible que se encuentre cultivares iguales o superiores al FEC 2.

Es importante profundizar en el estudio de estos marcadores con el fin de buscar nuevos marcadores que se encuentren a un corta distancia de posibles genes de resistencia, característica que permitirá dar inicio a la selección asistida por marcadores moleculares en Cacao.

Anexos:

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN.

1.) Adicionar 400µL de buffer AP1 y 4 µL de Rnasa de (100mg/ml) a 20mg de tejido pulverizado de la planta y dar vortex vigorosamente.

2.) Incubar la mezcla por 10 min a 65°C Mezclar 2 o 3 v eces durante la incubación por inversión. Este paso es para la lisis de la célula.

3.) Adicionar 130 µL de buffer AP2 al lisado anterior, mezclar e incubar en hielo por 5min.

4.) Centrifugar por 5 min a 20000g o 14000rpm.

5.) Pasar el sobrenadante a la columna lila QIA shredde mini spin y centrigugar 2 min a 20000 g o 14000 rpm.

6.) Transferir el flujo que pasa a través de la columna en el paso anterior a un nuevo tubo evitando el pellet, se recolectan aproximadamente 450 µL de sobrenadante.

7.) Adicionar 1.5 volumenes de buffer AP3/E del sobrenadante.

7.) Adicione 650 µL de la mezcla del paso anterior, incluyendo el precipitado que se pudo haber formado en la columna Dneasy mini spin y centrifugar por 1 min a 6000 g o 8000 rpm y descartar el flujo que pase a través.

9.) Repetir el paso anterior en el mismo tubo.

10.) Colocar la mini spin columna en un nuevo tubo y adicionar 500 µL de Buffer AW y centrifugar por 1 min a 6000g o 8000rpm descartar el flujo y reusar el tubo en el paso 11.

11.) Adiciones 500µL de Buffer AW y centrifugue por 2 min a 20000g o 14000rpm para secar la membrana.

12.) Transferir la mini spin columna a un tubo de 2 ml y pipetear 50 µL de Buffer AE directamente sobre la mambrana de la columna. Incubar por 5 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min a 6000g o 8000rpm.

13.) Repetir el paso 12.

Anexo 2. Heterocigosidad observada y esperada para cada población evaluada

POBLACION	(H)	MTcCIR-10 Y16984	MTcCIR-252	MTcCIR-46	MTcCIR-168	MTcCIR-176	MTcCIR-145	MTcCIR-225	MTcCIR-236	MTcCIR-179	MTcCIR 1	MTcCIR 60	MTcCIR 40	MTcCIR 33	MTcCIR 24	MTcCIR 11	MTcCIR 37	MTcCIR 22	MTcCIR 8	MTcCIR 12	ẋ
Regionales	He	0,847	0,908	0,867	0,926	0,829	0,839	0,806	0,913	0,888	0,901	0,931	0,885	0,921	0,929	0,934	0,929	0,934	0,929	0,946	0,8980
	Ho	0,000	0,929	0,714	1,000	0,500	0,786	0,500	0,857	0,857	0,929	0,500	0,357	0,571	1,000	0,929	1,000	1,000	0,929	0,929	0,7519
Introducidos	He	0,816	0,888	0,857	0,908	0,847	0,898	0,816	0,827	0,867	0,898	0,908	0,857	0,898	0,847	0,888	0,888	0,827	0,827	0,857	0,8641
	Ho	0,000	0,857	0,857	1,000	0,571	0,857	0,714	1,000	0,714	1,000	1,000	0,571	0,857	0,429	1,000	0,857	0,714	0,714	0,857	0,7669
Criollos	He	0,375	0,406	0,406	0,688	0,406	0,406	0,656	0,688	0,406	0,406	0,375	0,375	0,375	0,406	0,406	0,688	0,406	0,406	0,406	0,4572
	Ho	0,000	0,250	0,250	1,000	0,250	0,250	0,750	1,000	0,250	0,250	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	1,000	0,250	0,250	0,250	0,3421

Anexo 3. Distancias geneticas estimadas basada en Nei 1972

Pob.	Santander	Interior	Centroamérica	Suramérica	Arauca	Sierra nevada
Santander	0.000	0.681	0.911	1.562	1.398	1.574
Interior	0.681	0.000	1.000	1.397	1.441	1.929
Centroamérica	0.911	1.000	0.000	1.289	2.122	2.332
Suramérica	1.562	1.397	1.289	0.000	1.892	2.533
Arauca	1.398	1.441	2.122	1.892	0.000	1.980
Sierra nevada	1.574	1.929	2.332	2.533	1.980	0.000

Anexo 4. Cultivares evaluados según la poblacio a la que pertenecen.

POBLACIONES					
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Santander	**Interior**	**Centroamérica**	**Suramérica**	**Arauca**	**Sierra Nevada**
FEC 2	CAUC 39	ICS 95	CCN 51	FSA 13	CR 40
FLE 2	CAUC 43	ICS 39	IMC 67		CR 41
FLE 4	FMA 11	TSH 565			CR 42
FSV 155	FMA 7	UF 613			
FSV 41	FQUI 1	UF 273			
FSV 25	FGI 4				
FLE 3					
FRN 5					

Bibliografía

1. Atlantic Ocean. 2010. Enciclopedia Británica.

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnicj, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao,H., Cerril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCobie, W.R. yVenter, J.C. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed tags and human genome Project. *Science*, 252: 1651–1656.

Ajmone-Marsan, P., Negrini, R., Milanesi, E., Bozzi, R., Nijman, I.J., Buntjer, J.B., Valentini, A. y Lenstra, J.A. 2002. Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP markers. *Animal Genetics*, 33: 280–286.

Abbas BS, Dja'far D 1989. Sensitivity analysis of cacao cultivation: relative profitability of coconut and *Leucaena glauca* L. (*L. leucocephala*) as shade plants, based on a case study at Bah Lias Plantation, North Sumatra. Bull. Perkebunnan 20:97-103.

Afoakwa E, Paterson A, Fowler M & Ryan A. 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit. Rev. Food Sci*. 48: 840-857.

Agrios G. N. Fitopatólogia. 8ta Edición 2008. Trad. De la ed. Inglesa por Manuel Guzman Ortiz. México. Limusa,. Pp 48 – 136.

Aime y Phillips 2005. The causal agents of witches broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, Theobroma cacao) form a new lineage of Marasmiaceae. Mycologia 97 (5): 1012-1022

Almeida A. Alan F. Raúl R. Valle. 2007. Ecophysiology of the cacao tree.*Centro de Pesquisas do Cacau, CEPLAC. Brasil.*. Plant Physiol., 19(4):425-448.

Ampuero, E. 1967. Monilia pod rot of Cocoa. Cocoa Growers Bulletin 9: 15 – 18.

Amaya, L. M. Bustamante E. Navarro R. 1976. Estudio histopatológico de mazorcas de Cacao (*Theobroma cacao* L) infectadas con el hongo Monilia roreri Cif. Par. Noticias Fitopatológicas. Colombia. 5 (2): 97 -98.

Amores, F.; Agama, J.; Suárez, C.; Quiroz, J.; Motato, N. 2009a. EET 575 y EET 576 nuevos clones de cacao nacional para la zona central de Manabí. Boletín divulgativo N 346. Estación Experimental Tropical "Pichilingue". Quevedo, Ecuador. 28 p.

An account of the genetic basis of cocoa tree resistance to *Phytophthora* using molecular markers. *In* Proc. 13th Int. Conf. on Cocoa Research, Kota Kinabalu, Malasia. 9–14 Oct. 2000. Cocoa Producer's Alliance, Lagos, Nigeria. p. 127–134

Aránzazu F. Cubillos G. 1977. Observaciones sobre control y sintomatología de Monilia roreri Cif y Par. En la zona de Urabá. Colombia. Cacaotero Colombiano No. 2: p24 – 25.

Aránzazu, F. Cubillos, G. 1979. Comparacion de remoción de frutos enfermos en el control de Monilia roreri Cif. Par Cacaotero Colombiano No. 8: 27-34.

Aránzazu F. 1987. Comportamiento de los frutos de cacao afectados por Monilia dejados sobre el suelo. 10ª Conferencia internacional de investigación en Cacao. Santo Domingo, Santo Domingo. República Dominicana. P 457 – 460.

Aránzazu, H. F. Palencia C.G.; Coronado, R.; Rincón, G.D. 2009. Mejoramiento genético para incrementar la producción y productividad del sistema de Caca en Colombia. Capítulo 5. p49.

Aránzazu, H. F. Rincón, G. D. Palencia, C. G. 2009. Materiales de Cacao en Colombia, su compatibilidad sexual y modelos de siembra. Unión Temporal Cacao de Colombia Uno. Fedecacao-Corpoica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. p22

Aránzazu, H. F. Rincón, G. D. Palencia, C. G. 2009. Manejo de recurso genético para incrementar la producción y productividad del sistema de Cacao en Colombia. Unión temporal Cacao de Colombia Uno. Fedecacao-Corpoica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. p22

Argout X, Salse J, Aury J, Guiltinan M, Droc G, Gouzy J, Allegre M, Chaparro C, Legavre T, Maximova S, Abrouk M, Murat F, Fouet O, Poulain J, Ruiz M, Roguet Y, Rodier-Goud M, Barbosa-Neto J, Sabot F, Kudrna D, Ammiraju J, Schuster S, Carlson J, Sallet E, Schiex T, Dievart A, Kramer M, Gelley L, Shi Z, Bérard A, Viot C, Boccara M, Risterucci A, Guignon V, Sabau X, Axtell M, Ma Z, Zhang Y, Brown S, Bourge M, Golser W, Song X, Clement D, Rivallan R, Tahi M, Akaza J, Pitollat B, Gramacho K, D'Hont A, Brunel D, Infante D, Kebe I, Costet P, Wing R, McCombie W, Guiderdoni E, Quetier F, Panaud O, Wincker P, Bocs S & Lanaud C (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nat.Genet*. 43(2): 101-109.

Arguello O. 2000. Manejo integrado de la Moniliasis del Cacao en Santander. Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de Cacao. Impresores colombianos. P74-84

Arruda de, M. C. C., Sepulveda, G. F., Miller, R. N. G., Ferreira, M. A. S. V., Santiago, D. V. R., Resende, M. L. V., Dianese, J. C., and Felipe, M. S. S. 2005. *Crinipellis brasiliensis*, a new species based on morphological and molecular data. Mycology 97:1348-1361.

Alvim R, Nair PKR .1986. Combination of cacao with other plantation crops: an agroforestry system in Southeast Bahia, Brazil. Agrofor. Syst. 4:3-15.

Alvim PT. 1989a. Tecnologías apropiadas para a agricultura nos trópicos úmidos. Agrotrópica 1:5-26.

Alvim R. 1989b. O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) em sistemas agrossilviculturais. Agrotrópica 1:89-103.

Alverson WS, Whitlock BA, Nyffeler R, Bayer C, Baum DA. 1999. Phylogeny of the core Malvales: evidence from sequence data. Am. J. Bot. 86:1474-1486.

Ausbel F. 2005. " Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. Nature Immunology 6, 973 – 979. EE.UU.

Avilés, D. 2012. Estudio de la influencia de los bovinos andaluces en la formación de las razas bovinas criollas de Latinoamérica, in Zootecnia y Gestión sostenible. Universidad de Córdoba. Córdoba. p.19

Azofeifa A. D. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomia Mesoamericana. 17(2): 221-242.

Backman P, Wilson M. Murphy J. 1997. Bacterial for biological control of plant disease. In: Rechcigl, N.A., Rechcigl, J:E. (Eds), Environmentally Safe Approaches to Plant Disease Control. CRC/Lewis Press, Boca Raton, FL, pp. 95-109.

Backman P. Sikora R. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. Biological Control. 46: 1-3

Báez A. N. 2012. Manejo de la arquitectura del árbol de cacao (*Theobroma cacao* L). a través de la Poda de Cono Natural en Federación Nacional de Cacaotero.

Balloux, F. 2002. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. Molecular Ecology. P: 771-783:11

Bartley, G. (2005). The genetic diversity of cacao and its utilization. Cambridge: CABI

Barros, O. 1977, Investigaciones sobre el hongo *Monilia roreri* Cif. & Par, causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao: sus daños y su control. Cacaotero Colombiano No 3: 42 - 51

Barros, O. 1966. Valor de las prácticas culturales como métodos para reducir la incidencia de Monilia en plantaciones de Cacao. Agricultura tropical 22 (12): 605-612.

Barros, O. 1977. Investigaciones sobre el hongo Monilia roreri Cif. Par. Causante de la pudrición acuosa de la mazorca del Cacao: sus daños y su control. Cacaotero Colombiano No 3: 42 – 51.

Barros, O. 1980. El control de la Moniliasis en "Cacaoteras del Dique". Cacaotero Colombiano No. 15: 31 – 44.

Barrett, S. 1991. The genetic and evolutionary consequences of small population size in plant: implications for conservation. Genetics and Conservation of Rare Plants (Eds. D. Falk & K.E. Holsinger). Oxford University Press: p. pp. 3–30.

Bastos, C. N., and Anderbrhan, T. 1986a. Urucu (*Bixa orellana*): Nova espécie hospedeira da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacaueiro. Fitopatol. Bras. 11:963-965.

Baker E. Cope W, Holliday C, Barthey G, Taylor J. 1954. The Anglo-Colombian Cacao-collecting expedition. Report of Cacao Research. Trinidad v1953. P. 8-29.

Bakoumé, C.; Wickneswari, R.; Raijanaidu, N.; Kushairi, A.; Amblard, P. Y billotte, N. 2007. Diversidad Alélica de poblaciones naturales de palma (*Elaeis guineensis Jacq*.) detectada por marcadores microsatelitales. Implicación en conservación. PALMAS Vol.28 N° Especial, Tomo 1.

Bartlett D. W., Clough, J.M.., Godwin, J.R., Hall, A.A. Hamer, M., Parr-Dobrzansk, B.,2002. The strobilurin fungicides. Pest Manag. Sci. 58: 649-662.

Bastos, C. N., Fonseca, S. E. A., and Melo, W. F. 1998b. *Mascagania* cf. *sepium*, cipó nativo da Amazonia Brasileira, hospedeiro de *Crinipelllis perniciosa.* Fitopatol. Bras. 23:504.

Belkhir, K; Borsa, P. 1996 – 1998. Genetix, logicielsous Windows TM pour la génétique despopulations., L. d. G. et and C.U. Populations Editors. Universite de Montpellier II. Montpellier France.

Benhamou N. 1996. " Elicitor-induced plant defence pathways. Trends in Plant Science, 1: 233-239. EE.UU.

Bekele, F. L., Kennedy, A. J., Mc David, C., Lauckner, F. B., Bekele, I. 1994. Numerical taxonomic studies on cacao (Theobroma cacao L) in Trinidad. EDuphytica, 75 (3), 231-240. Doi: 10.1007/BF00025608.

Bogdanove A.; D. Voytas. 2001. TAL Effectors: Customizable Proteins for DAN Targeting. Science 333: (6051) 1843 – 1846. EE.UU. 2011

Botstein D; Raymond L; White, M; Skolnick, R. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. Am JHum Genet 32:314-331.

Bowers, J. H., Bailey, B. A., Hebbar, P. K., Sanogo, S., and Lumsden, R. D. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. Published online. Plant Health Prog. doi:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV

Bradeau, J. 1969. Le Cacaoyer. Paris, Maisonneuve et Larose.

Brasier, C. M., and Griffin, M. J. 1979. Taxonomy of *Phytophthora palmivora* of cocoa. Trans. Br. Mycol. Soc. 72:111-143.

Bravo, N. Victoria, J. I. 1978. Control biológico de la Moniliasis (Monilia roreri) del cacao (Theobroma cacao L) mediante sustancias inhibidoras producidas por algunos microorganismos. Ascolfi Informa (Colombia) 4 (4): 8 -10.

Bravo, N. Victoria, J. I. 1979. Control biológico de la Moniliasis del Cacao. Ascolfi Informa (Colombia) 5 (5): p 57 -59.

Brenes, O. E. 1983. Evaluación de la resistencia a *Monilia roreri* y su relación con algunas características morfológicas del fruto de cultivares de Cacao (*Theobroma cacao* L). Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica. UCR-CATIE. p60

Brito AM, Silva GCV, Almeida CMVC, Matos PGG 2002. Sistemas agroflorestais com o cacaueiro: uma tentativa de busca do desenvolvimento sustentável do estado do Amazonas, Brasil. Agrotrópica 14:61-72.

Brown J, Phillips-Mora W, Power E, Krol C, Cervantes-Martinez C, Motamayor J & Schnell J. 2007. Mapping QTLs for resistance to frosty pod and black pod diseases and horticultural traits in *Theobroma cacao* L. *Crop Sci*. 47: 1851-1858.

Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A., and Watson, L. (eds.). 1996. Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database. CAB International, Wallingford, UK.

Boller T.; S.Y. He. 2009. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. Science 324:742 – 744. Suiza

Bogdanove A.; D. Voytas. 2011. "TAL Effectors: Customizabel Proteins for DNA Targeting". Science 333: (6051) 1843-1846. EE.UU.

Campuzano, H. 1976. Fluctuación de poblaciones de esporas de *Monilia roreri* Cif. Et Par., y viabilidad durante un ciclo completo de afección. Noticias fitopatológicas (Colombia) 5 (2): 107

Campuzano, H. 1981. Influencia de la temperatura y la humedad en la germinación de esporas de Monilia roreri. In Conferencia internacional de Investigación en Cacao, 8a., Cartagena. Resúmenes. Bogotá, Colombia, Fedecacao, p. irr.

Castagnino, J. Electroforesis capilar. Reimpresión del artículo publicado en Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 1999. Vol. XXXIII, No. 3: p. 297-329.

Caplan J.; P. Mamillapalli; T. Burch – Smith; K Czymmek; S. Dinesh-Kumar. 2008. Chloropastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. Cell. 8; 132(3): 449 – 462. EE.UU.

Cheesman EE. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. Trop Agricult 21: 144–159.

Cervantes-Martinez C, Brown J & Schnell R. 2006. Combining ability for disease resistance, yield, and horticultural traits of cacao (*Theobroma cacao* L.) clones. *J.Am. Soc. Hort. Sci*. 131(2): 231-241.

Ciferri R & Ciferri F. 1957. The evolution of cultivated cacao. *Evolution* 11: 381-397.

Clapperton J (1994) A review of research to identify the origins of cocoa flavor characteristics. Cocoa Growers' Bull. 48: 7-16.

Clegg y colaboradores 1999. The use of molecular markers in the management and improvement of avocado (*Persea amaricaca* Mill.). Chapingo, Seri horticultura 5, No.Especial: 227-231

Clement D, Risterucci A, Motamayor J, N'Goran J & Lanaud C. 2003a. Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. *Genome* 46: 204-212.

Clement D, Risterucci A, Motamayor J, N'Goran J & Lanaud C. 2003b. Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. *Genome* 46: 103-111.

Chisholm S.; G. Coaker; B. Day; B. Staskawicz. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124: 803-804. EE.UU. 2006.

Cocoa-Atlas 2010. German Cocoa and Chocolate Foundation.

Coe, S.D. & Coe, M.D. 1996. The True History of Chocolate. Thames and Hudson Ltd., London, England.

Cope F.W. 1976. Cacao. *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae). In:Simmonds NW (ed) *Evolution of Crop Plants*, Longman: London.pp 207–213.

Costa G. L; Cabrera O.G; Tiburcio R.A; Medrano F,J; Carazzolle M. F; Thomazella D.P; Schuster S.C.; Carlson J.E; Guiltinan M.J; Baile M.A: Mieczkowski P; Pereira G.A; Meinhardt L.W; Couch J, Zintel H & Fritz P. 1993. The genome of the tropical *theobroma cacao* l. *Mol. Gen. Genet*. 237(1-2): 123-128.

Crow, J. 1970. An introduction to populationgenetics theory. Harper and Row publisher: p. 83-98.

Crouzillat D, Lerceteau E, Petiard V, Morera J, Rodriguez H, Walker D, Phillips W, Ronning C, Schnell R, Osei J & Fritz P (1996) *Theobroma cacao* L.: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. *Theor. Appl. Genet*. 93:205-214.

Crouzillat D, Menard B, Mora A, Phillips W & Petiard V. 2000. Quantitative trait analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. *Euphytica* 114: 13-23.

Cuatrecasas J (1964). Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma. Contrib US Herbarium* 35: 379–614.

Cubillos G. 1981. Exploraciones acerca de la importancia que tienen los frutos enfermos dejados sobre el suelo como fuentes primarias de infecciones de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans et al. El Cacaotero Colombiano. 18: p 38-43.

Cuhn R. 2006. Estructura genética de populaçoes de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR (tesis de doutoradado) Universidad e Estadual Paulista. Sao Paulo, Brasil. 117p.

Dangl JL, Jones JDG. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411:826–833.

Daswir HAS, Dja'far D. 1988. Analysis of cacao shaded with coconut (*Cocos nucifera*) compared with *Leucaena glauca* in North Sumatra. Bull. Perkebunan 19:99-106.

De la Cruz M, Whitkus R, Gómez-Pompa A, Mota-Bravo L. 1995. Origins of cacao cultivation. *Nature* 375: 542–543.

Delgado, J. Brenes, O. 1982. Informe sobre la situación de la Moniliasis del Cacao en Costa Rica y recomendaciones para los grupos de discusión. La Moniliasis del Cacao: Compendio. CATIE. Serie técnica. Informe técnico No. 28. pp 18 -36

Delgado J.C., Ampuero E. Doak K. 1960. Posible evidencia de resistencia a la Monilia roreri Cif. Par. En algunos clones de la Estación Experimental Tropical de Pichilingue. Interamerican Cocoa Conference, 8th, Trinidad and Tobajo, Proceedings. Trinidad, Goberment Press. Pp184-192.

De vicente, M. Y Fulton, T. 2003. Using molecular marker technology in Studies on plant genetic diversity. Illus. Nelly giraldo. Ipgri, rome, italy and Institute for genetic diversity, ithaca, new york, usa. Isbn: 92-9043-589-5. Ipgri and cornell university.

De Vicente, M.; López, C; Fulton, T. 2004. Genetic Diversity Analysis with Molecular Marker Data: Learning Module. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy.

Desrosiers, R. Buchwald A. Von y Bolaños C. 1955. Efectos de la precipitacion pluvial sobre los casos de Moniliasis del cacao en el Ecuador. Boletin fitosanitario de la FAO 3(11): 161-164

Díaz, M. J. 1957Observaciones sobre la incidencia de Moniia del Cacao en el Ecuador. Turrialba. Costa Rica 7 (4): p95-99.

Dichkichinson, M. (2003). Molecular Plant Pathology. Bios Scientific Publishers. London.

Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., The, T., Wang, C. I., Ayliffe, M. A., Kobe, B., Ellis, J. G. 2006. Direct protein interaction underlies gen for gene specificity and coevolution of the flax resistance gnes and flax ruts avirlence genes. Proc Natl Acad Sci USA 103: 8888-93.

Dodds P.; J. Rathjen. 2010. Plant immynity: towards an integrate view of plant – pathogen interactions. Nature Reviews, Genetics 11: 539 – 548. EE.UU.

Dongo L, Aigbekaen E, Jayeola C, Emaku L & Orisajo S (2009) Influence of farmers practices on cocoa bean quality: Nigeria field experience. *Afr. Crop Sci. Conf. Proc*. 9: 299-302.

Durrant W.; X. Dong. 2004. Systemic Acquired Resistance. Annual Review of Phytopathology, 42: 185-2009. EE.UU.

Efombagn M, Nyassé S, Sounigo O, Kolesnikova-Allen M & Eskes A (2007) Participatory cocoa (*Theobroma cacao*) selection in Cameroon: *Phytophthora* pod rot resistant accessions identified in farmers' fields. *Crop Prot*. 26: 1467-1473.

Entwistle, P. F. 1972. Pests of Cocoa. Longman, London.

Enríquez, G. A. 1981. La Moniliasis irrumpe en las zonas cacaoteras en Costa Rica. Actividades en Turrialba 9: 8-9.

Enríquez, G. A. 1983. El cuiltivo del Cacao. Turrialba, Costa Rica, CATIE. Departamento de producción vegetal. p162.

Erwin, D. C., and Ribiero, O. K. 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Eskes A, Guarda D, García L & García P (2007) Is genetic variation for sensory traits of cocoa pulp related to fine flavor cocoa traits?. *INGENIC Newsl*. 11: 22-28.

Espinel C. *et al*. 2005. La cadena del Cacao en Colombia. Observatorio Agrocadenas Colombia. MADR. , p. 2.

Evans, H.C. 1978. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. I. The fungus. *Annals of Applied Biology* 89, 185–192.

Evans, H.C. 1980. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society* 74,515–532.

Evans, H.C. 1981a.Witches' broom disease – a case study. *Cocoa Growers' Bulletin* 32,5–19.

Evans, H.C. 1981b. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri.* London, Commonwealth Mycological Institute. Phytopathological Papers 24, p1–44.

Evans, H.C. (1986) A reassessment of *Moniliophthora (Monilia)* pod rot of cocoa. *Cocoa Growers' Bulletin* 37, 34–43.

Evans, H. C., and Prior, C. 1987. Cocoa pod diseases: Causal agents and control. Outlook on Agriculture 16:35-41.

Evans, H. C. 1978. On the taxonomy of Monilia roreri, an important pathogen of theobroma cacao in South America. Canadian Jorunal fo Botany 56: 2528-2532.

Evans, H. C. 1981. Pod rot of Cacao caused by *Moniliophthora roreri*. London, Commonwealth Mycological Institute. Phytopathogical papers No 24. P 44.

Evans, H. C. 1981b. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. Phytopathol. Pap. 24:1-44.

Evans, H. C. 2002. Invasive Neotropical Pathogens of Tree Crops. Pages 83-112 in: Tropical Mycology: Volume 2, Micromycetes. R. Watling, J. Frankland, M. Ainsworth, S. Isaac, and C. Robinson, eds. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Evans H. C. Holmes K. Reid A. 2003. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. Plant Pathology. 52: 476-485.

Evans, H. C. . Holmes K. Thomas S. 2003. Endophytotes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biological agents of Cocoa diseases. Mycological progress 2 (2): 149-160.

Evans, H. C. 2007. Cacao diseases—The trilogy revisited. Phytopathology 97:1640-1643.

Falconer, D: ; Ackay, T. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. 4 ed. E. Harlow, Essex, UK: Longmans Green.

Faostat online database. 2006. http://faostat.fao.org/

Fao. 2008. Estado de la cuestión en la cuestión en la gestión de los recursos zoogenéticos. Sección C. p398.

Fedecacao. 1998. Censo Nacional Cacaotero. Federación Nacional de Cacaoteros-Fondo Nacional del Cacao. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Fedecacao 2012. Guía técnica del cultivo de del Cacao. Federación Nacional de Cacaoteros. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Fedecacao 2013. Situación mundial y nacional del Cacao. Septiembre, Bucaramanga, Colombia.

Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN, documento 20. pp 220.

Feltus F, Saski C, Mockaitis K, Haiminen N, Parida L, Smith Z, Ford J, Staton M, Ficklin S, Blackmon B, Cheng C, Schnell R, Kuhn D & Motamayor J. 2011. Sequencing of a QTL-rich region of the *Theobroma cacao* genome using pooled BACs and the identification of trait specific candidate genes. *BMC Genomics* 12: 379.

Flor, H.H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680 – 685.

Flores-Mora, D.M 1989. Estudio ultramicroscópico del proceso de infección de *Moniliophthora roreri*, en frutos de Cacao. Tesis de Maestría en ciencias. Universidad de Costa Rica. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza CATIE. Departamento de producción vegetal. Turrialba. Costa Rica. p84.

Flood J. Murphy R. 2004. Cocoa futures: A source book of some important issues facing the cocoa industry. The commodities Press. p163.

Fu, D. Uauy C. Distelfeld, A. Blechl A. Epstein L. Chen X. Sela H. Fahima T. Dubcovsky J. 2009. AKinase-START Gene Confers Temperature-Dependent Resistance to Wheat Stripe Rust. Science Vol 323. p1357.

Fukuoka S. Saka N. Koga H. Ono K. Shimizu T. Ebana K. Hayashi N. Takahashi A. Hirochika H. Okuno K. Yano M. 2009. Loss of Function of a Proline-Containing Protein Confers Durable Disease Resistance in Rice. Science. Vol 325. p998.

Fulton R. H. The Cacao disease trilogy: Black pod, Monilia Pod Rod, and witches broon. Plant disease 73: 601 – 603.

Frison, E. A., Diekmann, M., and Nowell, D. (eds.) 1999. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 20. Cacao (1st revision). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

García, C. y Naundorf, G. 1952. Un año de experimentos sobre control de la Moniliasis del Cacao. Cacao en Colombia 1: 31-40.

Gómez-Pompa A, Flores JS, Fernández MA (1990). The sacred cacao groves of the Maya. Latin Am Antiquity 1: 247–257.

Gomez-Gomez L.; T. Booller. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. Molecular Cell 5. 1003-1011. Suiza.

Gonzales L.C. 1981. Efectos de las Fuentes de inoculo sobre las posibilidades de combate de la Moniliasis del Cacao. Primera jornada de investigación. San José de Costa Rica: Vicerrectoría de investigación de la Universidad de Costa Rica. pp. 28-29

Gorgensen 1970. Monilia pod rot of Cacao in Ecuador. Cacao–Costa Rica. 15 (4): 4 – 13 p 2.

Gotsch, N. 1997. Cocoa crop protection: An expert forecast on future progress, research priorities and policy with the help of the Delphi survey. Crop Prot. 16:227-233.

Guest, D. 2007. Black pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. Phytopathology 97:1650-1653.

Glottieb, D. 1950. The Physiology of spore germination in fungi. Botanical Review 16 (5): 229 – 257.

Griffith G. Nicholson J. Nenninger A. Birch R. 2003. Witches brooms and frosty pods: two mayor pathogens of Cacao. New Zealand Jorunal of Botany 41: 423-435.

Grisales, O.S.; Afanador L.K.; 2007. Análisis de variabilidad genética en Moniliophthora roreri con AP-PCR y RAPD en Antioquia. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. IX, núm. 2. Universidad Nacional de Colombia. pp. 15-32.

Grisales Ortega, Sandra Patricia; Afanador Kafuri, Lucía. (2007). Análisis de variabilidad genética en Moniliophthora roreri con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología,* diciembre, 15-32.

Hammond-Kosack, K., Jones, J. 2000. Responses to plant pathogens. In *Biolochemistry and Molecular Biology of Plantas*. Buchanan, Gruissem and Jones Eds. Rockville.

Hansen, A. J. 1963. The role of *Fusarium decemcellulare* and *Fusarium roseum* in the greenpoint cushion gall complex of cacao. Turrialba 13:80-87.

Hardy, G.H. (1908). Mendelian proportions in a mixed population (letter). Science. 28: p. 49–50.

Hartl, D. 2000. A primer of population genetics,. Sinauer associates ed. Vol. 3rd edition. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

Hebbar, P. K. 2007. Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. Phytopathology 97:1658-1663.

Henderson, J.S., Joyce, R.A., Hall, G.R., Hurst, W.J. & McGovern, P.E. 2007. Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 18937–18940

Hedrick, P.W. 1985. Genetics of Populations. Jones and Barlett Publishers, Boston, MA.

Hernandez, G. J. 2013. Genotipificacion de Cacao Criollo Colombiano usando marcadores de ADN tipo Microsatelites. Tesis de Maestria.Universidad Industrial de Santander. p37.

He, Shan y Sheen (2007). Elicitation and suppression of microbe associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. Cellular Microbiology 9: 1385-1396. EE.UU.

Hoopen M., Rees R., Aisa P., Stirrup T., Drauss U., 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of Blcak pod (*Phytophthora palmivora*) and Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on Cocoa (*Theobroma cacao* L). Mycological Research 107: 587-596.

Holmes, K. A., Schroers, H.-J., Thomas, S. E., Evans, H. C., and Samuels, G. J. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. Mycol. Prog. 3:199-210.

Holliday P. 1970a. *Crinipellis perniciosa*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 223.

Holliday P. 1980b. Fungus Diseases of Tropical Crops. New York: Dover Publications, Inc. 607 p.

Hoyos, C. L. 2012. Enfermedades de plantas: Control biológico. Universidad Nacional de Colombia. Colección. Ciencias Naturales. p4.

Huston, K. 1998. Statistical Analysis of STR Data. Profiles in DNA. Defining microsatellite alleles by genotyping global indigenous human populations and nonhuman primates. Forensic Sci. 1(3): p. 14-15.

ICA. 2013. Subgerencia de protección vegetal. Dirección técnica de epidemiologia y vigilancia fitosanitaria. Alerta Fitosanitaria. CARFOR 131009.

ICCO. Organización Mundial del Cacao. Boletín trimestral de estadísticas del cacao. Vol. XXXVI No. 2.

ICCO, Quarterly Bulletin of Statistics. International Cocoa Organization. Agosto, 2013.

Ingle, R. A. Carstens M., Katherine., Denby J. 2006. PAMP recognition and the plant–pathogen arms race. Wiley Periodicals. BioEssays 28:880–889.

Iwaro AD, Singh V, Barath S, Jugmohan N 2001. Germplasm evaluation at the International Cocoa Genebank. Trinidad for resistance to *Phytophthora* pod rot. In: Annual Report 2000 of the Cocoa Research Unit., University of the West Indies, Trinidad, pp.34-40.

Jaimes Y. Aránzazu H. 2010. Manejo de las enfermedades del Cacao *Theobroma cacao* L en Colombia, con énfasis en Monilla *Moniliophthora roreri*. p25.

Janny G. M. Vos; Ritchie B. J; Flood Julie. 2003. Discovering and learning about cocoa. CABI, Bioscience. UK centre. p46.

Jiménez, J. M. 1985. Combate biológico de *Monilia roreri* mediante bacterias antagonistas. Turrialba, Costa Rica. CATIE. Departamento de Producción Vegetal. p2.

Jiménez P., Collada C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad Genética y su uso en los programas de Conservación. Universidad Politécnica de Madrid. Investigación Agropecuaria. Sistemas de Recursos Forestales. Serie N.º 2. p241.

Jonhson, E.S.; Bekele, F. L.; Brown, J.S.; Qijian S.; Zhang, Dapeng.; Meinhardt, L.W.; and Schnell, R. J. 2009. Population Structure and genetic diversity of the Trinitario Cacao (*Theobroma cacao* L) from Trinidad and Tobago. Crop Sci. 49: p564-572

Jones J.; J. Dangl. The plant immune system. Nature 444:323-329. EE.UU. 2006.

Johnson, E., Bekele, F. L., Brpwm. S. J., Song, Q., Zhang, D., Meinhardt, L. W., Schnell, R. J. 2009. Population structure and genetic diversity of the trinitario cacao (L) from Trinidad and Tobago. Crop science, 49 (2), 564-572. Doi: 10.2135/cropsci2008.03.01.28.

Karp A.; Kresovich S; Bghat, K; Ayad W.; Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies.International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma Italia. 47p.

Keen N. 1990. "Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions" Annual Review of Genetics 24: 447-463. EE.UU

Kiraly, Barna y Kiraly. 2007. Plant resistance to pathogen infection. Annyak Review Journal of Phytopathology, 155: 385-396. EE.UU

Krauss, U.; Hoopen, M.; Hidalgo, E.; Martínez, A.; Arroyo, C.; García, J.; Portuguez, A.; Sánchez V. 2003. Manejo integrado de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca, Costa Rica. Agroforestería en las Américas 10: 37-38.

Krauss., and Soberanis, W. 2001. Rahabilitation of diseased Cacao fields in Peru through shade regulation and timing of biocontrol measurs. Agroforestry system 53: p179-184.

Krauss., and Soberanis, W. 2002. Effect of fertilization and biocontrol application frecuency on Cocoa pod diseases. Biological control. p24: 82-89.

Krauss, U. ten Hopen, M., Hidalgo, E. Martínez, A., Arroyo, C., García, J., Portugués, A., Sanchez, V. 2003. Manejo integrado de la Moniliasis (Moniliophthora roreri) del Cacao (*Theobroma cacao* L) en Talamanca, Costa Rica. Agroforestería en las Américas. 10: p52-58.

Krattinger, G,S; Lagudah, Evans S; Spielmeyer W; Singh R. P; Espino H. J; McFadden H; Bossolini E; Selter L. L; Keller B. 2009. A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistanceto Multiple Fungal Pathogens in Wheat. Science. Vol 323. p1360.

Lachenaud P, Mooleedhar V, Couturier C. 1997. Les cacaoyers spontanés de Guyane. Nouvelles prospections. Plant Rech. Dévelop. 4:25-30.

Laurent V, Risterucci AM, Lanaud C (1994). Genetic diversity in cocoa revealed by cDNA probes. Theor Appl Genet 88: 193–198.

Lanaud, C. 1999. Isolation y characterization of Microsatellites in *Theobroma cacao* L. PJL Mol Ecol. 8: p 2141 -2143

Lanaud, C., M; Flament, S; Nyassé, A.M; Risterucci, M; Fargeas, I; Kébé, L; Motilial, J.-M; Thévenin, D; Paulin, M; Ducamp, D; Clément, J.A; N'Goran, and C. Cilas. 2000.

Lanaud, C., Motomayor, J.-C., and Sounigo, O. 2003. Pages 125-156 in: Genetic Diversity of Cultivated Tropical Crops. P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier, and J. C. Glaszmann, eds. CIRAD, SPI, Enfield, NH.

Lanaud C, Fouet O, Clément D, Boccara M, Risterucci A, Surujdeo-Maharaj S, Legavre T & Argout X (2009) A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Mol. Breeding* 24: 361-374.

Liyanage LVK (1985) Rationale for intercropping.Coconut Bull. 2:31-35.

Lockhart, B. E. and Sachey, S. T. 2001. Cacao swollen shoot. Pages 172- 173 in: Encyclopedia of Plant Pathology. O. C. Maloy and T. D. Murray, eds. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Longworth, J. F. 1963. The effect of swollen-shoot disease on mature cocoa in Nigeria. Trop. Agric. (Trinidad) 40:275-283.

Lorang J.; T. Kidarsa; C. Bradford; B. Gilbert; M. Curtis; S. Tzeng; C. Maier; T. Wolpert. 2008. Trichking the Guard: Exploiting Plant Defense for Disease Susceptibility. Science 338. 659 – 662. EE.UU

Lopez M. Martins E. 2005. Principales doencas do cacaueiro no Brasil. IIheus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. p 132

López C. E. 2007. Fitopatología Molecular. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Biología. p39.

Mackey, D. Ben F. Holt III, Aaron Wiig, Jeffery L. Dangl. 2002. RIN4 Interacts with Pseudomonas syringae Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in Arabidopsis, Cell, Volume 108. p 743-754.

Melnick R., Zidack N., Bailey B., Maximova S, Guitilnan M, Backman P. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. From annual crops as potential biological control agents of black pod rot of Cacao. Biological control 46: 46-56.

Merchán, V. 1981. Avances de la investigación de la Moniliasis del Cacao en Colombia. Cacaotero Colombiano No. 16: 26-41.

Miranda F. 1962. Wild Cacao in the Lacandona Forest, Chiapas, México. Cacao Turrialba, CATIE: Costa Rica. 7: 7.

Mysore K.; Ryu C. 2004. " Nonhost resisteance: How much do we know?. TRENDS in Plant Science. 9: 2. EE.UU.

Moazami, K. 1994. Analysis of Genetic diversity in Frech cattle breeds by the use of microsatellites – preliminary-results. Genetics Selection Evolution. 26: p. S155 – S165.

Monaghan J.; C. Zipfel. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. Current Opinion in plant Biology Volume 15, issue 4, August. Pages 349-357. United Kingdom.

Moroni, R. 2008. Effects of reference population and number of STR markers on paternity testing. . Forensic Science International-Genetics. Supplement Series. 10: p. 102 p.

Motamayor J. *et al*. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. Nature Publishing. Heredity., 89: p. 380–386.

Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Loor R, *et al*. 2008 Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (Theobroma cacao L). PLoS ONE 3(10): e3311. doi:10.1371/journal.pone.0003311

Murillo, D. González L.C. 1984. Evaluación en laboratorio y campo de fungicidas para el combate de la Moniliasis del Cacao. Agronomia Costarricense 8: 83-89.

Muñoz A.; A. Bernal; B. Szurek; C. López. 2012. Tell Me a Tale of TALEs. Mol Biotechnol DOI 10.1007/s12033-012-9619-3. Colombia.

Naundorf, G. 1954. Contribuciones al problema de la Moniliasis en Cacao. Cacao en Colombia 3: 35-61.

Nacional de Chocolates Grupo Nutresa. Economía del Cacao. Perspectivas de la Compañía Nacional de Chocolates. Junio. Bucaramanga, Colombia.

Nagamine, Y. 2001. Genetic distance and classification of domestics animals using genetic markers. journal of Animal Breeding and Genetics. 118: p. 101-109.

Navarro L; C. Zipfel; O. Rowland; L. Keller; S. Robatzek; T. Boller y J. Jones. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene dependent denfense responses and bacterial pathogenesis. Plant135: 1113 – 1128. United Kingdom

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat.106: 283–292.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl.
Acad. Sci. USA. 70, 3321- 3323.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individual. Genetics.89:583-590.

Nei, M. y LI, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci.76(10):5269-5273

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York

Noutoshi Y.; M. Okazaki; T. Kida; Y. Nishina; Y. Morishita; T. Ogawa; H. Suzuki; d. Shibata; Y. JIkumaru; A. Hanada; Y. Kamya; K. Shirasuc. 2012. Novel Plant Immune priming compounds identified via High-Throughput Chimical Screening Target Salicylic Acid Glucosyltransferases in Arabidopsis. The Plant Cell. 1 – 10. Japon.

Nu¨rnberger T, Lipka V. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Mol Plant Pathol 6:335–345.

Ogata, N. 2007. El Cacao. Biodiversitas 72: 1 - 5

Paliwal R. L. 2001. **El Maíz en los trópicos, mejoramiento y producción.** Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. FAO. Producción y protección de plantas. Roma. Versión 28.

Papalexandratou Z, Camu N, Falony G & De Vuyst L (2011a) Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microb*. 28: 964-973.

Papalexandratou Z, Vrancken G, De Bruyne K, Vandamme P & De Vuyst L (2011b) Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microb*. 28: 1326-1338.

Park, S. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. University of Dublin.

Parodi E. 1936. E. Sulle cause della decandeza della cultura del Cacao all Ecuador e possiblili rimedi. L' agricultura Coloniale 30: 121-127.

Paterson A. 1996. Genome mapping in plants. Academic Press. California, USA. p330.

Parlevliet, J. E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. Annual Review of Phytopathology 17: 203-222.

Petrini, L. E., and Petrini, O. 2005. Morphological studies in *Rosellinia* (*Xylariaceae*): The first step towards a polyphasic taxonomy. Mycol. Res. 109:569-580.

Peshin R. Dhawan A. 2009. Integrated pest management: Innovation-Development process. DOI 10. 1007/978-1-4020-8992-3 15.

Purdy, L. H., Schmidt, R. A., and Gramacho, K. P. 1998. Diseases of Cacao (*Theobroma cacao* L.). APSnet Online at http://www.apsnet.org/ online/common/names/cacao.asp.

Porras, V. H. 1982. Epifitiologìa de la Moniliasis (Monilia roreri Cif. Par.) del Cacao y su relación con la producción del árbol en la zona de Matina. Tesis Ing. Agr. San José. Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomia, p 51.

Porras, V. H. 1985. Determinación de la estabilidad de la resistencia a *Monilia roreri* Cif. & Par. en cultivares de Cacao en dos zonas de Costa Rica. Tesis M.Sc. Turrialba. Costa Rica. UCR-CATIE. p124.

Phillips (1986). Evaluación de la resistencia de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) a *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et al. Tesis M.Sc. Turrialba. Costa Rica. CATIE. p62.

Phillips-Mora, W. Rodríguez, P; Fritz. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigación en Cacao (*Theobroma cacao* L). Turrialba, Costa Rica. CATIE p183. Serie técnica. Informe técnico No. 252

Phillips-Mora, W. 1998. Biología molecular y marcadores moleculares en la agricultura. Memoria II Congreso Nacional de Estudiantes del Sector Agropecuario Costarricense. IICA-EARTH-CATIE. p77-87

Phillips-Mora, W. 2003. Origen, Biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the Cacao (*Theobroma cacao* L) fungus Moniliophthora roreri (Cif.) Evans *et al*. as determined using molecular phytopathological and morpho-physiological evidence. Thesis Ph.D. Reading Uk: University of Reading. p349.

Phillips-Mora, W. 2004. La Moniliasis del Cacao: Una seria amenaza para el Cacao en México. In. Simposio Nacional sobre enfermedades tropicales. Resumenes de ponencia. Tabasco. México.

Phillips-Mora, W; Castillo, J; Krauss U; Rodriguez, E; and Wilkinson, M.J. 2005. Evaluation of Cacao (*Theobroma cacao* L) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. Plant Pathology 54 (3): p483-490.

Phillips-Mora, W; Cawich, J; Garnett, W. and Aime M.C. 2006a. First report of frosty pod caused by *Moniliophthora roreri* on Cacao in Belize. Plant Pathology 55:584.

Phillips-Mora, W; Coutiño, A.; Ortiz, C.F.; Lopez, A.P.; Hernandez, J, Aime, M.C. 2006b. First report and Moniliophthora roreri, causing frosty pod rot of Cacao in Mexico. Plant Pathology 55: 584.

Phillips-Mora, W.; Ortiz, C.F.; Aime, M.C. 2007. Fifty years of frosty pod rot in Central America: Chronology of its spread and impact from Panama to Mexico. Proceeding of the 15th International Cocoa Research Conference, Vol I pp 1039-1047.

Phillips-Mora, W., and Wilkinson, M. J. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. Phytopathology 97:1644-1647.

Phillips-Mora, W. 2008. Jefe Programa Mejoramiento Genético de Cacao.Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).Apartado 7170, Turrialba, Costa Rica. wphillip@catie.ac.cr

Phillips-Mora, W., Leal A. A., Mata A.Q., Motamayor A.JC. 2012. Catálogo de Clones de Cacao. CATIE. Manual técnico. Turrialba-Costa Rica. No. 155

Ploetz, R. C. 2007. Cacao diseases: Important threats to chocolate production worldwide. Phytopathology 97:1634-1639.

Pugh T, Fouet O, Risterucci A, Brottier P, Abouladze M, Deletrez C, Courtois B, Clement D, Larmande P, N´Goran J & Lanaud C. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 108 (6): 1151-1161.

Ram A. 1989. Biology, Epidemiology and control of Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of Cacao. Thesis PhD. London, UK: University London. P286

Ram A. Valle R. Arevalo E. 2004. A Monilia do Cacaueiro. Sau Paulo. SP. Fundacao cargil. p 36

Ramage, C.; Sando, L.; Peace, C.P.; Carroll, B.L.; Drew, R. 2004. Genetic diversity revealed in the apomictic fruit species *Garcinia mangostana* L.(mangosteen). Euphytica 136(1):1-10.

Renfro, B.L. 1985. Breeding for disease resistance in tropical maize and its genetic control. *In* A. Brandolini & F. Salamini, eds. *Breeding strategies for maize production improvement in the tropics*. Rome, FAO, Florence, Italy, Istituto Agronomico per L'Oltremare. p. 341-365

Risterucci A, Paulin D, Ducamp M, N´Goran J & Lanaud C. 2003. Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of Phytophtora. *Theor. Appl. Genet*. 108(1): 168-174.

Rodríguez-Campos J, Escalona-Buendía H, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E & Jaramillo-Flores M (2011) Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res. Intern*. 44: 250-258.

Romero, C.; Pedryc, A.; Muñoz, V.; Llácer, G., y Badenes, M. 2003. Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. Genome 46: 244–252. doi: 10.1139/G02-128

RomeroA.; D. Ritchie. 2004. Systemic acquired resistance delays race shifits to major resistnace genes in bell pepper. Phytopathology, 94: 1376 – 1382. EE.UU. 2004.

Rochambeau, H, 2001. Measuring and managing genetic variability in small populations. Annales de Zootechnie. 49: p. 77-93.

Rorer, J. B. 1918. Enfermedades y plagas del Cacao en el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo del Cacao. Trad. Por A. Pacheco. Guayaquil, Ecuador. Asociación de Agricultores, pp. 17 -40

Ruiz, J. C.; Gamboa, R. O.; Arguello, I.M. 2011. Molecular ecology of genetic diversity of Cacao cultivate in the south-east, region de Nicaragua. International Research Journal Agricultural Science., 1 (1): p6-13.

Rufino, L. 2008. Fortalecimiento de la cadena productiva de cacao, en las provincias de San Ignacio, Jaén y Celendín. Expediente técnico. Cajamarca.

Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C.,Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., Hunt, S.E., Cole, C.G., Coggill, P.C., Rice, C.M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D.R., Kwok, P.Y., Mardis, E.R., Yeh, R.T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R.H., McPherson, J.D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W.J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M.J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M.C., Linton, L., Lander, E.S. y Altshuler, D.; International SNP Map Working Group. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409: 928–933.

Saxena, S.; Chandra, R.; C.; Srivastav , A.P.; Mishra, M.; Pathak, R.K.; Ranade, S.A. 2005. Analysis of genetic diversity among papaya cultivar using Single Primer Amplification Reaction (SPAR) methods. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 80(32):291-296.

Sánchez J. A. 1982. Reacción de cultivares de Cacao a la inoculación artificial con *Monilia roreri*. Tesis M. Sc. Turrialba, Costa Rica. UCR-CATIE p55,

Saunders, J. L.; Hemeida, A. 2004. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao* L. Theor Appl Genet. 110: p 41-47

Schulze-Lefert P.; Panstruga R. 2011. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen hos range, and pathogen speciation. Trends Plant Science. 16: 117 – 125. Alemania.

Smulders M, Esselink D, Amores F, Ramos G, Sukha D, Butler D, Vosman B & Van Loo E (2010) Identification of cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties with different quality attributes and parentage analysis of their beans. *INGENIC Newsl.*12: 1-13.

Suarez. C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri*. Cif. Par en frutos de Cacao (*Theobroma cacao* L), Tesis de Ing. Agrónomo. Guayaquil. Universidad de Guayaquil. Facultad de Agronomia. p59.

Suarez. C.C. Amores F; López O;2006. New sources to resistance to Moniliophthora roreri. Following the 15th International Cocao Research Conference, ICRC. Costa Rica

Sukha D & Butler D (2005) The CFC/ICCO/INIAP Cocoa Flavour Project - Investigating the spectrum of fine flavor within genotypes and between origins. *INGENIC Newsl*. 10: 22-25.

Schmitz W. H. 1985. Investigaciones en la costa Atlántica de Costa Rica sobre la epidemiologia del hongo *Monililophthora roreri.* Evans *et al*., en Cacao (*Theobroma cacao* L). Tesis Ph.D. Gottngen, Alemania Federal, Universidad Georg August. Facultad de ciencias agrícolas.

Schnell RJ, Olano CT, Brown JS, Meerow AW, Cervantes-Martı´nez C (2005) Retrospective determination of the parental population of superior cacao (Theobroma cacao L) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. J Am Soc Hortic Sci 130(2):181–190.

Schultes RE. 1984. Amazonian cultigens and their northward and westward migrations in pre-Columbian times. In: Stone D (ed) *Pre-Columbian plant migration*, *Papers of the Peabody Museum of Archaeology and Ethnology*. Vol 76: Mass.: Harvard University Press: Cambridge. pp 69–83.

Schulze-lefert P.; Panstruga R. 2011. “A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation”. Trends Plant Science. 16: 117-125. Alemania

Slatkin, M. 1463. Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. p:139.

Sotomayor F. 1965. Estudios preliminares sobre la Resistencia de algunos clones de Cacao a la Moniliasis provocada por la inoculación artificial. Tesis Ing. Agr. Guayaquil. Ecuador. Universidad de Gayaquil. Facultad de Agronomia y Veterinaria. P56

Syvanen, A.C. 2001. Accessing genetic variation genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, 2: 930–941.

Stern, J. 2011. Chocolate & Cacao. The History of CCN -51 in Ecuador. Http://jeffeygstern.com/ecuadorian-cacao-varieties/the-history-of-ccn-51/·sthash.867RFtlY.dpuf

Spoel S.; X. Dong. How do plants achieve immunity. Defence Without specialized immune cells. Nature Reviews, Immunology, 12: 89 – 100. Edimburgo. 2012.

Takken, F.L.; Joosten, M.H. 2000. Plant resistance genes:their structure,function and evolution.European Journal ofPlant Pathology 106:699-713.

Ten Hoopen, G. M., and Krauss, U. 2006. Biology and control of *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix* and *Rosellinia pepo*: A review. Crop Prot. 25:89-107.

Torres de la Cruz. M. 2010. Progreso temporal y manejo integrado de la Moniliasis (Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al.,) del Cacao (Theobroma cacao L) en Tabasco- México. p 19.

Thomma B.; T. Nurnberger; M. Joosten (2011). Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. The Plant Cell 23: 4 -15. Holanda.

Ueda H.; Y. Yamaguchi: H. Sano. 2006. "Direct interaction beween the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP bound resistance protein, N factor, during the hypersensitive response in tobacco plants". Plant Mol. Biol. 61: 31 – 45. Japon.

Vladez y Kahl 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundi-Prensa México

Van Hall CJJ. 1914. Cocoa. Macmillan: London.

Vanderplank, J.E. 1984. *Disease resistance in plants,* 2nd ed. Academic Press. Orlando, FL, USA.

Vignal, A., Milan, D., San Cristobal, y Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel Evol*., 34: 275–305.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. y Kuiper, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–1444.

Weir, B. 1984. Estimating F-statistics for the analys of population structure. Evolution., 38:: p 1358-1370.

Whitkus R, De la Cruz M, Mota-Bravo L (1998). Genetic diversity and relationships of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. Theor Appl Genet 96: 621–627.

Whitlock B.A. Baum D.A. 1999. Phylogenetic relationships of Theobroma and Herrania (Sterculiaceae) based on sequences of the nuclear gene viciclin. Systematic Botanic 24: 128-138.

Wittstock, U., Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 300 – 7.

Wood GAR, Lass RA (1985). Cocoa. Longman: London.

Wrigth, S. 1965. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. Evolution., 19. p395 – 420.

Jaimes S.Y. Aránzazu H. F. 2010. Manejo de las enfermedades del Cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia. Con énfasis en Monilia (*Moniliophthora roreri*). p73.

Zhang, D. (2010b). Microsatellite profiles for cocoa accessions held at CATIE (Cabiria farm), Costa Rica. Personal communication (e-mail), USDA-ARS, Beltsville.

Zipfel C. 2009- Early molecular events in PAMP-triggered immunity. Current Opinion in Plant Biology 12: 414-420. United Dingdom.