

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA



Determinación de la variabilidad genética por AFLP de los hongos *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* aislados de cacao provenientes de las principales zonas cacaoteras del Perú entre los meses de Marzo y Mayo del 2012 y de muestras conservadas en el cepario del ICT.

Tesis para optar el grado profesional de
Ingeniero Biotecnólogo

Presentado por la Bachiller:
Bertha Irene Melgar Rios

Asesora:
Dra. Maria Valderrama Valencia

Arequipa – Perú
2013

INDICE

ABREVIATURAS.....	XV
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XX
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS.....	4
OBJETIVOS	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
I. MARCO TEORICO	7
1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS HONGOS Y DE LAS ENFERMEDADES QUE CAUSAN	7
1.1.1 <i>Moniliophthora roreri</i> (Cif. y Par). Evans et al., (1978).....	7
1.1.1.1 Ubicación taxonómica según Aime C. y Phillips W., (2005).....	8
1.1.1.2 Morfología	8
1.1.1.3 Ciclo de vida	9
1.1.1.4 Mecanismo de dispersión.....	11
1.1.1.5 Moniliasis.....	13
1.1.1.5.1 Origen.....	13
1.1.1.5.2 Distribución geográfica.....	15
1.1.1.5.3 Sintomatología	16
1.1.1.5.4 Epidemiología	20
1.1.1.5.5 Control de la enfermedad.....	20

1.1.2 <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Stahel) Aime C. y Phillips W., (2005).....	24
1.1.2.1 Ubicación taxonómica según SINAVEF, (2012).....	25
1.1.2.2 Morfología	25
1.1.2.3 Ciclo de vida	26
1.1.2.4 Mecanismos de dispersión	28
1.1.2.5 Escoba de bruja	28
1.1.2.5.1 Origen.....	28
1.1.2.5.2 Distribución geográfica:.....	29
1.1.2.5.3 Sintomatología	30
1.1.2.5.4 Epidemiología	33
1.1.2.5.5 Control de la enfermedad	35
1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	37
1.3 SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD DE HONGOS	40
1.3.1 Diversidad genética de hongos.....	40
1.3.2 Análisis de diversidad genética de hongos.....	42
1.3.3 Filogenia de hongos	43
1.4 ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE HONGOS FITOPATÓGENOS	45
1.4.1 Factores que influyen en la estructura genética de poblaciones	46
1.4.1.1 Mutación	46
1.4.1.2 Recombinación.....	46
1.4.1.3 Deriva genética.....	47
1.4.1.4 Flujo de genes	47
1.4.1.5 Selección Natural	48

1.5 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS	48
1.5.1 Aislamiento y preparación de muestras	49
1.5.1.1 Empleo de medios selectivos	50
1.5.2 Técnicas de caracterización.....	50
1.6 TÉCNICA MOLECULAR USADA PARA ANÁLISIS GENÉTICO DE HONGOS	50
1.6.1 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	51
1.6.2 AFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados).....	51
1.6.2.1 Consideraciones generales	51
1.6.2.2 Descripción del análisis AFLP.....	53
1.6.2.3 Ventajas y desventajas de la técnica	55
1.6.2.4 Aplicaciones de la técnica de AFLP en micología.....	57
II. MATERIALES Y METODOS	59
2.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS HONGOS	59
2.1.1 Zona de trabajo.....	60
2.1.2 Muestreo de material vegetal infectado	60
2.1.3 Aislamiento de los hongos	61
2.1.3.1 Protocolo para aislamiento del hongo <i>Moniliophthora roreri</i>	61
2.1.3.2 Protocolo para aislamiento del hongo <i>Moniliophthora perniciosa</i>	62
2.1.4 Siembra de la muestra	64
2.1.5 Caracterización morfológica de los hongos	64
2.1.5.1 Análisis macroscópico	64
2.1.5.2 Análisis microscópico	64
2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO	65

2.2.1 Producción de micelio en medio líquido.....	65
2.2.2 Extracción de DNA genómico	66
2.2.3 Cuantificación del DNA.....	67
2.3 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AFLP EN TODOS LOS AISLADOS	67
2.3.1 Digestión del DNA genómico.....	68
2.3.2 Ligación con los adaptadores	68
2.3.3 Reacción de pre amplificación (+1/+1).....	68
2.3.4 Amplificación selectiva (+3/+3)	68
2.3.5 Preparación de la muestra	69
2.3.6 Preparación de las placas de vidrio	70
2.3.7 Preparación del gel de poliacrilamida 10%.....	70
2.3.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	70
2.3.9 Tinción y revelado del gel de poliacrilamida.....	71
2.4 ANÁLISIS DE DATOS	72
2.4.1 Registro de datos	72
2.4.2 Determinación del Índice de contenido polimórfico (PIC).....	72
2.4.3 Análisis de distancia genética	73
2.4.4 Análisis de la variabilidad poblacional	75
III. RESULTADOS Y DISCUSION	77
3.1 AISLAMIENTO DEL HONGO	77
3.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	80
3.2.1 Análisis macroscópico	82
<i>Moniliophthora roreri</i>	82
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	84

3.2.2 Análisis microscópico	85
<i>Moniliophthora roreri</i>	85
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	87
3.3 PRODUCCIÓN DE MICELIO, EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA	90
3.3.1 Determinación de la concentración y pureza del DNA.....	92
3.3.2 Determinación de la calidad del DNA	95
3.4 RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE AFLP.....	96
3.5 ANÁLISIS DE DATOS.....	104
3.5.1 Determinación del Índice de contenido polimórfico (PIC).....	104
<i>Moniliophthora roreri</i>	105
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	107
3.5.2 Análisis de distancia genética	109
3.5.3 Análisis de agrupamiento.....	113
<i>Moniliophthora roreri</i>	113
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	120
3.5.4 Análisis de la variabilidad poblacional	124
<i>Moniliophthora roreri</i>	124
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	130
IV. CONCLUSIONES	136
V. RECOMENDACIONES	137
VI. BIBLIOGRAFIA	138
VII. ANEXOS.....	155
Anexo N°1: Preparación de medios de cultivo	155

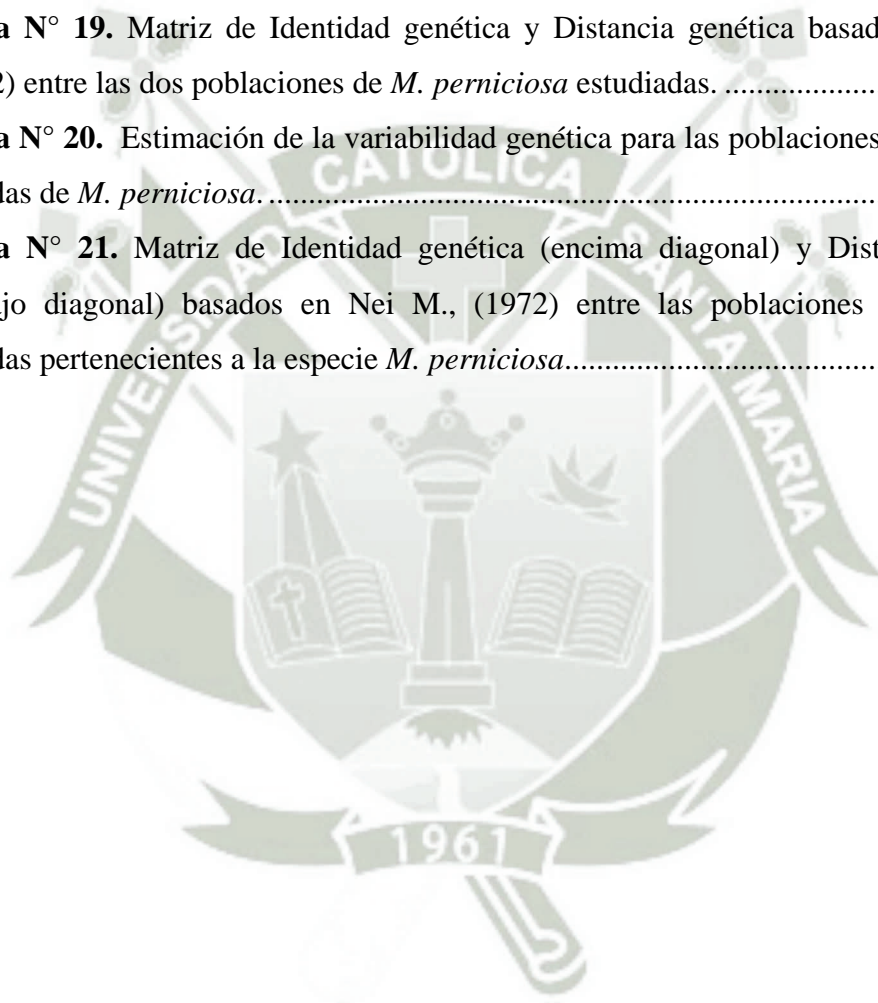
Anexo N°2: Secuencias de los adaptadores, Pre cebadores y cebadores específicos utilizados en la técnica de AFLP.....	156
Anexo N°3: Lista de combinaciones de cebadores utilizados en la búsqueda de cebadores que nos brinden mayor polimorfismo.	157
Anexo N°4: Preparacion de componentes utilizados en la aplicación de la técnica de AFLP.....	157
Anexo N°5: Dendogramas generados para los aislamientos de <i>M. roleri</i> y <i>M. pernicioso</i> usando la técnica AFLP a partir del coeficiente de similitud de Dice.	160



INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Programa PCR usado para la amplificación de AFLP selectiva.	69
Tabla N° 2. Rango de colores para evaluar color de micelio a los aislados de <i>Moniliophthora roreri</i>	83
Tabla N° 3. Lista de aislados de <i>M. roreri</i> utilizados para el estudio con la técnica AFLP.	89
Tabla N° 4. Lista de aislados de <i>M. pernicioso</i> utilizados para el estudio con la técnica AFLP.	90
Tabla N° 5. Tabla de valores de absorbancia de <i>M. roreri</i>	93
Tabla N° 6. Tabla de valores de absorbancia de <i>M. pernicioso</i>	94
Tabla N° 7. Listado de las combinaciones de cebadores de AFLP usados para cada especie de hongo.	98
Tabla N° 8. Número de fragmentos amplificados utilizando la técnica AFLP para los aislamientos de <i>M. roreri</i> y <i>M. pernicioso</i>	101
Tabla N° 9. Lista de combinaciones de cebadores con su grado de polimorfismo y PIC promedios obtenidos a partir de los 21 aislamientos de <i>Moniliophthora roreri</i>	105
Tabla N° 10. Lista de combinaciones de cebadores con su grado de polimorfismo y PIC promedio obtenidos a partir de los 12 aislamientos de <i>Moniliophthora pernicioso</i>	107
Tabla N° 11. Valores de Coeficiente de correlación fenética para cada coeficiente de similitud utilizando el programa Past versión 2.17b.	110
Tabla N° 12. Matriz de distancias genéticas entre los aislamientos de <i>Moniliophthora roreri</i> según el modelo de distancia de Jaccard.	111
Tabla N° 13. Matriz de distancias genéticas entre los aislamientos de <i>Moniliophthora pernicioso</i> según el modelo de distancia de Jaccard.	118
Tabla N° 14. Estimación de la variabilidad genética para tres poblaciones de <i>M. roreri</i>	124
Tabla N° 15. Matriz de Identidad genética y Distancia genética basados en Nei M., (1972) entre las tres poblaciones de <i>M. roreri</i> estudiadas.	127

Tabla N° 16. Estimación de la variabilidad genética para las poblaciones conservadas y aisladas de <i>M. roreri</i>	128
Tabla N° 17. Matriz de Identidad genética (encima diagonal) y Distancia genética (debajo diagonal) basados en Nei M., (1972) entre las poblaciones conservadas y aisladas pertenecientes a la especie <i>M. roreri</i>	129
Tabla N° 18. Estimación de la variabilidad genética para dos poblaciones de <i>M. pernicioso</i>	130
Tabla N° 19. Matriz de Identidad genética y Distancia genética basados en Nei M., (1972) entre las dos poblaciones de <i>M. pernicioso</i> estudiadas.	132
Tabla N° 20. Estimación de la variabilidad genética para las poblaciones conservadas y aisladas de <i>M. pernicioso</i>	134
Tabla N° 21. Matriz de Identidad genética (encima diagonal) y Distancia genética (debajo diagonal) basados en Nei M., (1972) entre las poblaciones conservadas y aisladas pertenecientes a la especie <i>M. pernicioso</i>	135



INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Estructuras morfológicas de <i>Moniliophthora roreri</i> causante de la Moniliasis del cacao. (A) Micelio septado. Fuente: Isai D., (2012) (B) Esporas de tipo globosa y pocas de tipo ovaladas o elipsoide (100X). Fuente: Arbelaez L., (2010).....	9
Figura N° 2. Ciclo de vida del hongo <i>Moniliophthora roreri</i> . Fuente: FHIA, (2012)....	11
Figura N° 3. Distribución de la Moniliasis en el Perú. Fuente: Arévalo E., (1999).	15
Figura N° 4. Presencia de Moniliasis en America del Sur. Fuente: Arévalo E., (1999).16	
Figura N° 5. Gibas que causan deformación en frutos jóvenes de cacao, síntoma típico del ataque de Moniliasis. Fuente: FHIA, 2012.	17
Figura N° 6. Síntomas y signos de la enfermedad. (A) mancha café y madurez prematura como síntomas típicos de la Moniliasis en fruto a mitad de su desarrollo. (B) fruto con micelio y esporas como signos de la enfermedad, que contribuyen a la propagación de la Moniliasis a otros frutos sanos. Fuente: FHIA, 2012.	18
Figura N° 7. La pudrición de las almendras hasta dejarlas completamente inservibles es el daño principal que causa la Moniliasis. Aquí, frutos con almendras completamente inservibles que fueron inoculados artificialmente con el hongo a los dos meses de edad aproximadamente. Fuente: FHIA, 2012.....	19
Figura N° 8. Síntomas internos de la moniliasis en mazorcas de cacao (A) y (B) puntos necróticos. (C) pudrición acuosa de la mazorca. Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010).....	19
Figura N° 9. Estructuras microscópicas de <i>M. perniciosa</i> . (A) Basidiosporas. (B) Micelio biotrofo. (C) Estroma. Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010).	26
Figura N° 10. Ciclo de vida de <i>Moniliophthora perniciosa</i> . Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010).....	27
Figura N° 11. Distribución mundial del hongo causante de la escoba de bruja (<i>Moniliophthora perniciosa</i>). Fuente: SINAVEF, 2012.	29
Figura N° 12. Síntoma de escoba verde en (A) cojines florales (B) ramas y (C) brotes terminales afectados por <i>M. perniciosa</i> . Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010)..	30

Figura N° 13. Síntomas en frutos causados por <i>M. perniciosa</i> (A) y (B) protuberancias (C) mancha chocolate (D) fruto chirimoya. Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010).	31
Figura N° 14. Formación de basidiocarpos sobre tejido necrosado (A) Basidiocarpos en ramas; (B) Hojas; (C) y en frutos secos. Fuente: SINAVEF, 2012.	32
Figura N° 15. Principales zonas cacaotaleras del Perú. Fuente: MINAG, 2003	38
Figura N° 16. Esquema del procedimiento de la técnica AFLP. Fuente: GIBCO BRL.	56
Figura N° 17. Mazorca y tallo de cacao recolectado en campo, mostrando síntomas típicos de las enfermedades moniliasis (A) y escoba de bruja (B).	60
Figura N° 18. Procedimiento para la obtención de aislamientos puros de <i>M. roreri</i> . Fuente: Elaboracion propia.	62
Figura N° 19. Cámara húmeda utilizada para la extracción del hongo <i>M. perniciosa</i> . Fuente: Elaboracion propia.	63
Figura N° 20. Crecimiento de las muestras en cámara húmeda (A) hongos con síntoma de moniliasis en mazorca (B) hongos con síntoma de escoba de bruja en mazorca.	78
Figura N° 21. Aislamiento del hongo que generan síntomas de la enfermedad escoba de bruja a partir de tallos secos de cacao.	79
Figura N° 22. Medio PDA modificado, muestra el desarrollo micelial del hongo <i>M. roreri</i>	79
Figura N° 23. Características morfológicas de los aislamientos de <i>M. roreri</i> sembrado en Medio a base de cacao IMC-67.	83
Figura N° 24. Características morfológicas de los aislamientos de <i>M. perniciosa</i> sembrado en medio extracto de levadura. (A) Borde regular de la colonia (B) Borde irregular.	85
Figura N° 25. Vista al microscopio del hongo <i>M. roreri</i> (A) Esporas donde se destaca una mayoría de esporas de tipo globosa 100X (B) Hifas ramificadas mostrando el desarrollo de esporas en forma basipetala. Fuente: Isai D., (2012).	86
Figura N° 26. Vista al microscopio del hongo <i>M. perniciosa</i> . (A) Micelio binucleada del hongo causante de la enfermedad escoba de bruja. Fuente: Elaboración propia. (B) que	

se unen por intermedio de clampas o abrazadera (flecha blanca) Fuente: Meinhardt L., et al., (2006).	87
Figura N° 27. Producción de micelio en medio líquido PS (papa sacarosa).	91
Figura N° 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la calidad de ADN.	95
Figura N° 29. Cámara de electroforesis vertical utilizada para correr las muestras amplificadas con AFLP.	97
Figura N° 30. Patrón de fragmentos amplificados usando la combinación EcoRI-AGG MseI-CAA con los 21 aislamientos de <i>M. roreri</i> cuyos códigos se muestran en el lado superior del carril. Marcador de peso molecular en ambos extremos: GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).	99
Figura N° 31. Patrón de fragmentos amplificados usando la combinación EcoRI-ACA MseI-CAA con los 12 aislamientos de <i>M. perniciososa</i> cuyos códigos se muestran en el lado superior del carril. Marcador de peso molecular en ambos extremos: GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).	100
Figura N° 32. Dendograma generado para 21 aislamientos de <i>Moniliophthora roreri</i> usando la técnica AFLP. El dendograma se ha obtenido utilizando el método de agrupamiento UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Jaccard a un valor de 0.84 de similitud.	112
Figura N° 33. Principales zonas productoras de donde fueron recolectados los aislamientos de <i>M. roreri</i> . Fuente: Elaboración propia.	115
Figura N° 34. Dendograma generado para 12 aislamientos de <i>Moniliophthora perniciososa</i> usando la técnica AFLP. El dendograma se ha obtenido utilizando el método de agrupamiento UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Jaccard a un valor de 0.72 de similitud.	119
Figura N° 35. Dendograma construido con el método UPGMA para <i>Moniliophthora roreri</i> basado en la distancia genética de Nei M., (1972).	127
Figura N° 36. Dendograma construido con el método UPGMA para <i>Moniliophthora roreri</i> entre las poblaciones conservadas y aisladas, basado en la distancia genética de Nei M., (1972).	130

- Figura N° 37.** Dendograma construido con el método UPGMA para *Moniliophthora perniciosa* basado en la distancia genética de Nei M., (1972).....133
- Figura N° 38.** Dendograma construido con el método UPGMA para *Moniliophthora perniciosa* entre las poblaciones conservadas y aisladas, basado en la distancia genética de Nei M., (1972).....135





DEDICATORIA

A mis padres por todo su esfuerzo y dedicación, a mis hermanos y cuñado por la motivación que siempre me brindaron desde mis inicios en la Universidad contribuyendo a que yo alcance mis metas y objetivos propuestos.

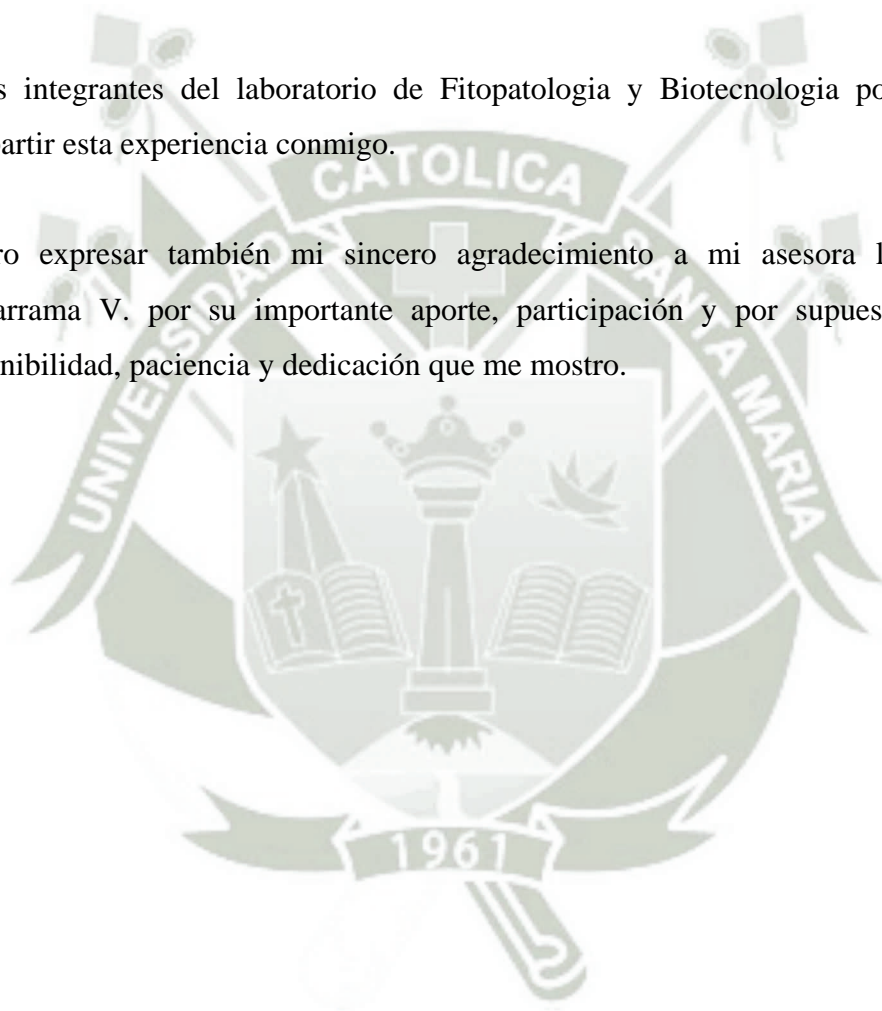
AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo al Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) por permitirme el desarrollo de mi tesis en sus laboratorios de Fitopatología y Biotecnología.

A mi asesor en el Instituto Msc. Boris Gutarra por brindarme su orientación.

A los integrantes del laboratorio de Fitopatología y Biotecnología por su apoyo y compartir esta experiencia conmigo.

Quiero expresar también mi sincero agradecimiento a mi asesora la Dra. Maria Valdarrama V. por su importante aporte, participación y por supuesto destacar la disponibilidad, paciencia y dedicación que me mostro.



ABREVIATURAS

- **ADN** Acido desoxirribonucleico
- **AFLP** Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados
- **ARN** Ácido ribonucleico
- **CATIE** Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza
- **CTAB** Cetil trimetil de bromuro de amonio
- **DDBJ** Banco de datos de ADN de Japón
- **DNTP** Desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- **EDTA** Acido etilendiamino tetra acético
- **FHIA** Fundación Hondureña de investigación agrícola
- **Gst** Coeficiente de diferenciación genética
- **h** Diversidad genetica de Nei
- **IBT** Instituto de Biotecnología
- **ICT** Instituto de Cultivos Tropicales
- **IIAP** Instituto de investigaciones de la Amazonía Peruana
- **IPGRI** Instituto Internacional para los Recursos Fitogenéticos
- **ISSR** Secuencias intercaladas entre microsatelites
- **ITS** Espaciadores internos transcritos
- **MINAG** Ministerio de agricultura del Perú
- **na** Número de alelos observados
- **NCBI** Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
- **ne** Número efectivo de alelos
- **PAGE** Electroforesis en gel de poliacrilamida
- **PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PIC** Indice de contenido polimórfico
- **PPL%** Porcentaje de loci polimórfico
- **RAPD** Polimorfismo en el ADN amplificado al azar
- **RFLP** Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

- **SINAVEF** Sistema nacional de vigilancia epidemiológica fitosanitaria
- **SSR** Secuencias simples repetitivas o microsátélites
- **TBE** Tris borate EDTA buffer
- **UNALM** Universidad Nacional Agraria La Molina
- **UPGMA** Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages





RESUMEN

Las dos enfermedades con mayor impacto económico que afectan a las plantaciones de cacao y están presentes en la mayoría de países productores del Continente Americano son Moniliasis y Escoba de bruja causadas por los hongos *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*, respectivamente.

Tradicionalmente los métodos para identificar, caracterizar y clasificar a los hongos se ha realizado usando caracteres morfológicos y fisiológicos los cuales han proporcionado información útil pero muchas veces incompleta de estos organismos.

La determinación de la variabilidad genética de estos fitopatógenos es fundamental, para el desarrollo de programas de mejoramiento que buscan resistencia genética a estas enfermedades. El presente estudio utilizó la técnica AFLP para determinar la variabilidad genética de 21 aislamientos de *Moniliophthora roreri* y 12 aislamientos de *Moniliophthora perniciosa* que fueron aislados de seis de las principales zonas productoras de cacao reportadas por el MINAG. Para el aislamiento de los hongos, el material vegetal recolectado fue desinfectado y colocado en cámaras húmedas,

posteriormente se realizó la caracterización morfológica de los hongos, para luego realizar la extracción del ADN y aplicar la técnica de AFLP a cada uno de los aislados.

El análisis de distancia genética fue obtenido con el programa Past versión 2.17b, se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard para graficar los dendogramas generados para cada especie de hongo. Para la especie *Moniliophthora roreri* se generaron 3 grupos a 0.84 de similitud y para la especie *Moniliophthora perniciosa* se generaron 3 grupos a 0.72 de similitud.

Para hallar la variabilidad poblacional se utilizó el programa Popgene versión 1.32. Los resultados obtenidos para la especie *M. roreri* muestra que este hongo presenta una moderada variabilidad medida a partir del porcentaje de loci polimórfico (41,67%) y entre las poblaciones, la zona de Tocache es la que presenta el mayor porcentaje de loci polimórficos (26,14%) comparado con las zonas productoras de Mariscal Cáceres y Leoncio Prado. El valor del coeficiente de diferenciación genética (G_{st}) entre las poblaciones de *M. roreri* fue de 0.2950 lo que significa que existe mayor variabilidad dentro de las poblaciones que entre ellas.

Para el caso de la especie *M. perniciosa* esta presenta un valor de variabilidad alta siendo su valor de porcentaje de loci polimórfico de 67,39% y la población de Tocache fue la que presentó mayor porcentaje de loci polimórfico (65.94%) que las muestras aisladas de la zona productora de Tarapoto. El coeficiente de diferenciación genética (G_{st}) entre las poblaciones de *M. perniciosa* fue de 0.2787 presentando al igual que *M. roreri* mayor variabilidad dentro de una misma población.

Por último se realizó un análisis entre la población conservada y las muestras que fueron aisladas recientemente para cada especie de hongo estudiada y los resultados muestran que existe mayor variabilidad en las poblaciones que fueron aisladas recientemente medida a partir del porcentaje de loci polimórfico siendo 39.77% para la población aislada de *M. roreri* y 65.22% para la población aislada de *M. perniciosa*; los valores de

Gst obtenidos muestran que existe mayor variabilidad dentro de cada población aislada que entre ellas.

Palabras Clave: *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa*, variabilidad genética, AFLP.



ABSTRACT

The two most devastating diseases with economic impact affecting cacao plantations are moniliasis disease or frosty pod rot and witches' broom disease caused by the fungi *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa*, respectively.

Traditionally, methods to identify, characterize and classify fungi has been done using morphological and physiological characters which have provided useful information but often incomplete of these organisms.

The determination of the genetic variability of these pathogens is critical for the development of breeding programs that seek genetic resistance to these diseases. The present study used AFLP to determine the genetic variability of 21 isolates of *Moniliophthora roreri* and 12 isolates of *Moniliophthora perniciosa* that were isolated from six major cocoa producer areas reported by MINAG. For fungi isolation were collected vegetable material, these were disinfected and placed in humid chambers, subsequently performed morphological characterization of fungi and then performed DNA extraction and finally applied AFLP technique to each one of them.

The genetic distance test was obtained with Past program version 2.17b, was used Jaccard similarity coefficient to plot dendrograms generated for each species of fungi. For *Moniliophthora roreri* species were generated 3 groups at 0.84 of similarity and for *Moniliophthora perniciosa* species were generated 3 groups at 0.72 of similarity.

To find the population variability Popgene program version 1.32 was used. The results for the species *M. roreri* shows that this fungus has a moderate variability measured from the percentage of polymorphic loci (41.67 %) and among populations Tocache area is the one with the highest percentage of polymorphic loci (26.14 %) compared to producing areas Mariscal Caceres and Leoncio Prado. The coefficient of gene differentiation (G_{st}) among *M. roreri* populations was 0.2950 which means that there is greater variability within populations than between them.

In the case of *M. perniciosa* species, these presents a high variability value being the value of percentage of polymorphic loci 67.39 % and Tocache population was the highest percentage of polymorphic loci (65.94 %) than isolates from Tarapoto. The coefficient of gene differentiation (G_{st}) among *M. perniciosa* populations was 0.2787, like *M. roreri* the greater variability was within populations.

Finally, a test was conducted among the populations of the two species preserved with the one that were recently isolated and the results show that there is greater variability in populations recently isolated, the polymorphic loci percentage was 39.77% for isolated population of *M. roreri* and 65.22% for the isolated population of *M. perniciosa*; G_{st} values show that there is greater variability within each isolated population than between them.

Key words: *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa*, genetic variability, AFLP.

INTRODUCCION

Los hongos *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* son los causantes de las dos enfermedades más devastadoras del cacao (*teobroma cacao L.*) en América del Sur y el Caribe.

En el Perú, durante la década de los ochenta e inicios de los noventa, la producción nacional de cacao se vio afectada por la influencia de diversos factores como la falta de seguridad personal en el campo por la violencia narcoterrorista, caída internacional de los precios del cacao, auge de los precios de la coca y la creciente diseminación de plagas del cultivo (Moniliasis y Escoba de Brujas) (MINAG 2003). Por ejemplo los departamentos de San Martín y Huanuco ven afectada su producción cacaotera por Moniliasis en un 30 %; mientras que la zona del VRAE en un 60% y Jaen – San Ignacio departamento de Cajamarca en un 80%. Para el caso de la enfermedad Escoba de bruja el porcentaje afectado fluctúa entre el 15 y 30% entre las principales zonas cacaoteras según cifras del MINAG.

A menudo el cultivo del cacao es descrito como un “cultivo huérfano”, debido a que su explotación no está respaldada con adecuados soportes técnico–científicos. En efecto,

existen debilidades en la financiación de un buen servicio de extensión y en disponer de materiales o clones tolerantes a las enfermedades y con alto potencial productivo y de calidad, pilares para afrontar la modernización de este sistema de producción. Esta situación se considera alarmante, teniendo en cuenta la agresividad de los patógenos y la susceptibilidad aparente de más genotipos de cacao cultivados en el mundo.

Los hongos poseen más diversidad genética que otros grupos de patógenos microscópicos. Esta variación puede afectar a todos los aspectos de la biología de estos organismos y rápidamente les permite evolucionar a nuevos tipos de patógenos en respuesta a los avances en la mejora de cultivos. Aunque los niveles de variabilidad de los hongos se pueden estimar usando caracteres morfológicos, esta fuente de información no ha demostrado ser fiable para la identificación y la discriminación de muchos hongos, debido a la dificultad para detectar un número suficiente de caracteres que permitan una solución completa. Además, muchos de los caracteres morfológicos que se utilizan para fines de identificación pueden estar fuertemente influenciados por el medio ambiente.

La aplicación de una serie de técnicas basadas en el ADN ha proporcionado herramientas para la discriminación de los hongos estrechamente relacionados en casi cualquier resolución requerida y también para la detección de especies de hongos en las sensibilidades, mucho más allá de los métodos tradicionales (Mills R., et al., 1998; Tamakatsu S., 1998). La necesidad de un análisis genético es el desarrollo de herramientas que pueden discriminar entre entidades biológicas con diferentes caracteres determinados genéticamente (Wang R. y Schmidt E., 1998). Una serie de técnicas y marcadores genéticos ya están disponibles para medir afinidades genéticas de los taxones, aunque ninguno de ellos es considerado universalmente como ideal, cada uno presenta sus propias fortalezas y debilidades.

La técnica AFLP se utilizó en el presente estudio para generar marcadores moleculares que son de naturaleza dominante y que representa una manera relativamente barata y

eficaz para investigar varios aspectos de la biología molecular de hongos y su diversidad genética, la ventaja de este marcador entre otros es que no requiere información previa de la secuencia del genoma que se desea analizar. La técnica ha demostrado ser un análisis fiable y potente en una variedad de aplicaciones. Este estudio nos permitirá evaluar de una manera más detallada la variabilidad genética de 21 aislamientos de *Moniliophthora roreri* y 12 aislamientos de *Moniliophthora perniciosa* recolectados de las principales zonas cacaoteras del Perú; la cual podría beneficiar a los esfuerzos para controlar estas enfermedades, permitiendo una transferencia racional de la información genética, patológica y biológica de dichos hongos.



HIPOTESIS

Dado que AFLP es una técnica que genera marcadores moleculares o fragmentos del genoma con un alto poder de detección de polimorfismo, es posible que con el uso de esta técnica nos permita determinar la variabilidad genética de los hongos *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* aislados de las principales zonas productoras de cacao en el Perú.



OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la variabilidad genética de los aislamientos de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* provenientes de seis principales zonas productoras de cacao en base a la técnica AFLP.

Objetivos Específicos

1. Aislar y Caracterizar los hongos *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* a partir de tallos y mazorcas de cacaos enfermos.
2. Realizar la extracción y cuantificación del DNA de los hongos *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*.
3. Aplicar la técnica de AFLP a los aislamientos de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*.
4. Analizar la similaridad y agrupamiento de los aislamientos de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* así como la variabilidad entre las poblaciones de cada especie y entre las muestras conservadas en el cepario del ICT.



I. MARCO TEORICO

1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS HONGOS Y DE LAS ENFERMEDADES QUE CAUSAN

1.1.1 *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par). Evans et al., (1978)

Smith L. y Sano M., (1917) identificaron al hongo causante de la moniliasis y observó que este hongo parecía pertenecer al género *Monilia*, similar a *Monilia fructígena*, muy común en Estados Unidos. Por otro lado, Ciferri R. y Paradi E., (1933) confirmaron la identificación hecha por Smith después de describir las características fisiológicas y morfológicas del hongo y lo denominaron *Monilia roreri*. Evans C., et al., (1978) propusieron incluir al hongo en un nuevo género denominado *Moniliophthora*, debido a que observaron la presencia de un septo dolíporo en el micelio vegetativo, haciéndolo afín con los Basidiomicetos (Alexopoulos J., 1919; Phillips W., 1986). Posteriormente, Phillips W., (2003) mediante técnicas moleculares confirmó que el hongo es un Basidiomiceto perteneciente al orden Agaricales. Finalmente, Aime C. y Phillips W., (2005) confirmaron la ubicación de *M. roreri* dentro de la familia Tricholomataceae.

1.1.1.1 Ubicación taxonómica según Aime C. y Phillips W., (2005)

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Basidiomycete

Orden: Agaricales

Familia: Tricholomataceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *roreri*

1.1.1.2 Morfología

Moniliophthora roreri se caracteriza por poseer micelio septado con dolíporos típicos (Figura N°1A). Las esporas provienen de un basidio modificado, con un pseudoestroma denso y carnoso, estas se forman en cadenas de 2 a 20 unidades y su desarrollo se efectúa en forma basipétala, permitiendo así la liberación de las esporas maduras ubicadas en su extremo, ofreciendo continuas cosechas de esporas. Las esporas pueden ser de forma globosas, subglobosas a elípticas (Figura N°1B) y tienen dos formas de germinación a través del poro germinativo o directamente a través de su pared (Urquillas L., 2004). Las esporas son multifuncionales ya que sirven no sólo para el intercambio genético, sino también para la dispersión, la infección y la supervivencia (Evans C., 2007). Las esporas son resistentes a las condiciones ambientales adversas. Presentan una supervivencia por varios meses y sólo germinan en contacto con el agua. Las esporas viejas desarrollan paredes gruesas y se tornan oscuras, las cuales pueden marcar el inicio de la fase de dormancia (Evans C., 2007).

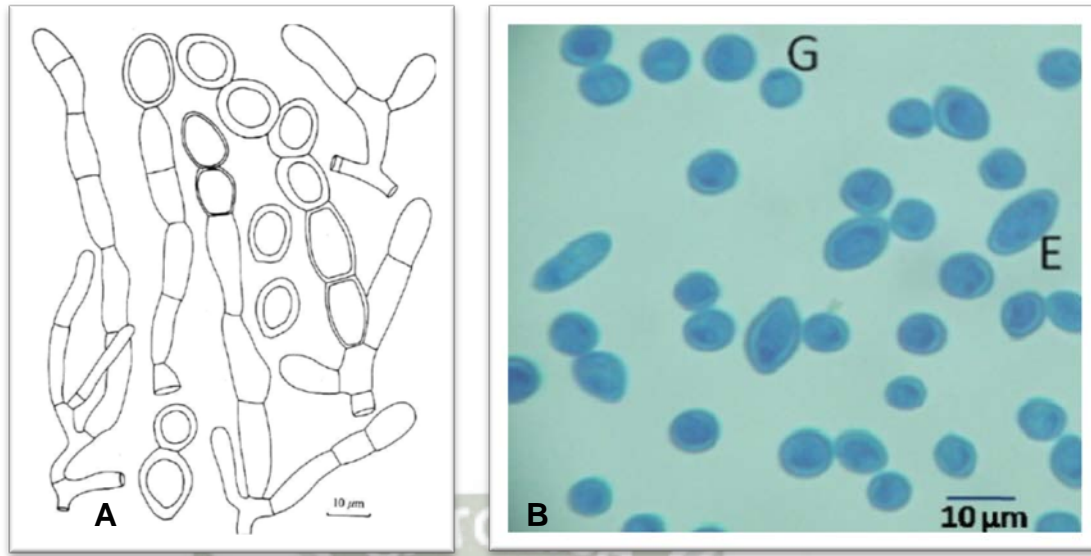


Figura N° 1. Estructuras morfológicas de *Moniliophthora roreri* causante de la Moniliasis del cacao. (A) Micelio septado. Fuente: Isai D., (2012) (B) Esporas de tipo globosa y pocas de tipo ovaladas o elipsoide (100X). Fuente: Arbelaez L., (2010).

1.1.1.3 Ciclo de vida

La sobrevivencia del patógeno empieza en los residuos de cosecha (mazorcas contaminadas). Luego, las esporas son diseminadas por el viento y la lluvia, ocurriendo también contaminación de frutos o mazorcas con moniliasis de una plantación a otra (Navarro M. y Mendoza I., 2006). Algo similar afirmaron Albuquerque S., et al., (2005) quienes mencionaron que la diseminación de las esporas es realizada por el viento, así como también el agua de lluvia, que puede tener un papel importante en las infecciones a corta distancia en la copa del cacao. Además, debido al movimiento producido por las labores de cosecha las esporas se movilizan en el aire y bajo condiciones propicias de humedad y temperatura, infectan constantemente los frutos que recién están formándose (Amores F., et al., 2009). Meléndez L., (1993), en su investigación sobre microambiente menciona que la mayor cantidad de esporas de moniliasis se encuentran a 1 metro de altura en las plantas de cacao.

Phillips W., et al., (2006) indicaron que las esporas se depositan sobre el fruto y pueden germinar si hay agua o morir debido a la radiación/desecación. Phillips W., (2003) indica que la penetración se realiza directamente a través del exocarpo y ocasionalmente por los estomas, avanzando intercelularmente, lo que facilita una esporulación interna de la mazorca. Sin embargo Albuquerque S., et al., (2005) encontraron que su penetración ocurre directamente a través de los estomas, creciendo entre las células del córtex, produciendo esporas dentro y en la superficie de los frutos.

Con el tiempo aparece en la superficie de la mazorca, una mancha parda rodeada por una zona de transición de color amarillento. Esta mancha puede crecer hasta llegar a cubrir una parte considerable o la totalidad de la superficie de la mazorca (Rodríguez D. y Baez M., 2002). Bajo condiciones húmedas crece sobre la superficie de la mancha una especie de felpa dura y blanca de micelios de moniliasis que puede cubrir la totalidad de la mancha, y sobre el micelio se produce gran cantidad de esporas que dan a la masa un color crema o café claro. Desde la penetración superficial de las hifas hasta el apareamiento de los primeros síntomas transcurren aproximadamente de seis a diez semanas, una vez que todos los tejidos han sido consumidos se produce la pudrición y momificación del fruto (Enríquez G., 2004). Johnson J., et al., (2008) observaron que una de las características del patógeno es su largo período de incubación antes de aparecer los síntomas. Cruz S., (1993) relata que el período de incubación (latente) fluctúa entre los 30 y 70 días. Así también FHIA, (2003) encontró que el tiempo de infección puede ser de 3 a 8 semanas, pudiendo variar según la edad del fruto, la severidad del ataque, la susceptibilidad del árbol y las condiciones del clima, principalmente presencia de lluvias, mientras que en frutos tiernos, en días lluviosos y calurosos, el período de incubación se acorta a tres semanas.

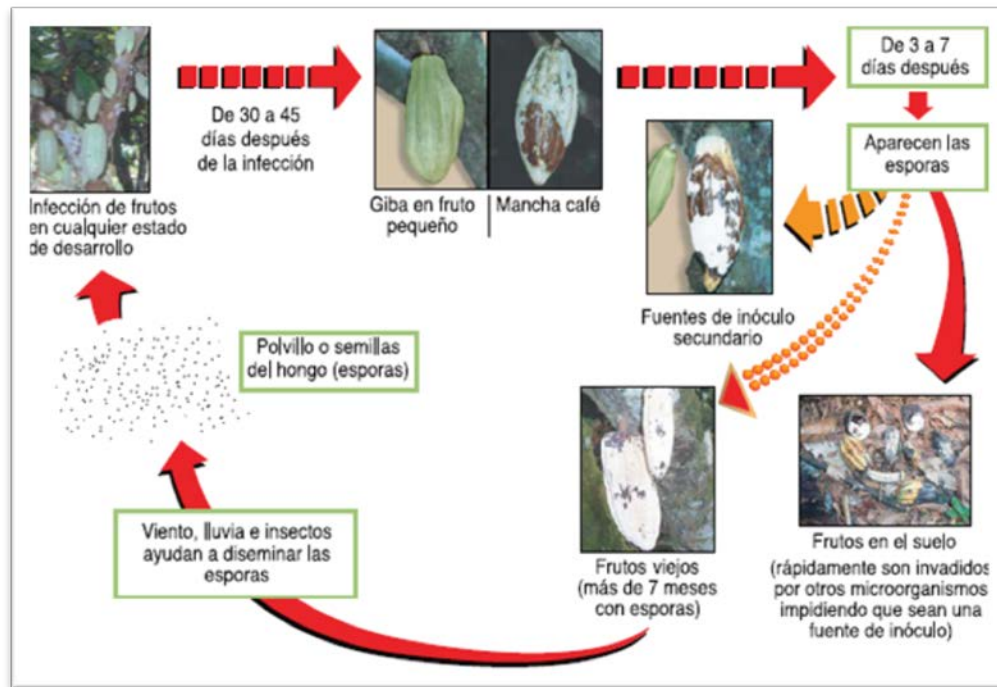


Figura N° 2. Ciclo de vida del hongo *Moniliophthora roreri*. Fuente: FHIA, (2012).

1.1.1.4 Mecanismo de dispersión

- **Dispersión por viento:** La densidad de las esporas en la vaina es tal que con sólo soplar en la superficie, las nubes de esporas se liberan y son libremente llevadas por el viento. Evans C., (1981) afirmó que existe una amplia evidencia de esporas en la Cordillera Oriental de los Andes y Perú; y que el patógeno una vez libre de barreras naturales se mueve rápidamente sobre distancias considerables de esporas en el aire. Sin embargo, a pesar que *M. roreri* se adapta bien a la dispersión en el aire, al parecer, las esporas no son capaces de viajar largas distancias debido a su peso y porque son susceptibles a la exposición al sol, la sequía o frío excesivo.
- **Dispersión por seres humanos:** Los seres humanos se consideran como uno de los agentes de dispersión más eficaces de la moniliasis porque el hongo es admirablemente adecuado para este método indirecto de difusión. El largo

período de colonización de la vaina antes de la manifestación de los síntomas visibles permite ver aparentemente una mazorca sana; o la infección sistemática de la vaina para ser seccionada o transportada para su uso como una fuente de material de siembra o más peligrosamente para fines comerciales o de demostración para amigos o familiares en los que no opera ninguna selección.

El período crítico y latente dentro de la vaina incrementa las posibilidades de difusión de larga distancia por el hombre. La dispersión a larga distancia puede ocurrir de dos maneras: (a) en las vainas, aunque es poco probable que pueda ser trasladado intercontinentalmente, o (b) en injertos o material similar. Las esporas se adhieren fácilmente a dichos tejidos y permanecen viables en esta situación por muchos meses. Sin embargo, el tratamiento con fungicidas, sin duda, puede ayudar a reducir el inóculo y limitar considerablemente las posibilidades de una introducción no deseada (Evans C., 1986).

- **Dispersión por insectos u otros animales:** Wood A. y Lass A., (1985) consideran que el papel de los insectos en la dispersión de moniliasis es probablemente mínimo a pesar de que se han realizado estudios para probar esta hipótesis. Lo que está claro es que la participación de los insectos no es necesario para la penetración del patógeno en las vainas ya que este proceso ocurre de forma natural a través de la entrada directa de hifas en la epidermis (Suárez C., 1971).

Las diferentes especies de animales como monos, ardillas, ratas, murciélagos, venados, loros y otras aves pueden haber tenido un papel importante no sólo en la dispersión de *T. cacao* y sus parientes en América tropical, sino también en la difusión de *M. rozeri*. Los animales podrían favorecer la dispersión del hongo de dos maneras: mediante la realización directa de las esporas en sus cuerpos o en el tracto digestivo o mediante el transporte de vainas enfermas o partes de ellos de un lugar a otro.

- **Dispersión por el agua:** El agua, a través de las lluvias, es eficaz en la liberación de pequeñas nubes de esporas (Evans C., 1981). Las esporas se pueden lavar fácilmente fuera de las vainas de esporulación por la lluvia y distribuidos a la cubierta y en particular al tronco en la que sería más probable para ponerse en contacto con las vainas y así poder inocularlas (Ram A., 1989). Este autor ha demostrado la importancia de la lluvia como un medio de liberar las esporas infectadas.

1.1.1.5 Moniliasis

1.1.1.5.1 Origen: Durante años, Ecuador fue considerado como el centro de origen de la enfermedad, debido a que Rorer B., (1918) logró identificar el agente causal de la reducción de la producción de cacao. Phillips W., (2003) señaló que la moniliasis del cacao pudo aparecer por primera vez en Colombia en el departamento del Norte de Santander en 1817 y en el departamento de Antioquia en 1851. Además, Phillips W. y Wilkinson J., (2007) encontraron reportes de la enfermedad en 1832, 1850 y 1956 para el Norte de Santander y en 1881, 1916 y 1949 para Antioquia. Los estudios moleculares, mediante el Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), perfiles ISSR y datos de secuencias ITS, indicaron que existe gran diversidad genética de *M. rozeri* en Colombia y también evidenciaron que es allí donde se pudo originar la enfermedad, en vez de Ecuador (Phillips W. y Wilkinson J., 2007).

En el Perú, Mc Laughlin H., (1950) reportó la enfermedad en los departamentos de Cajamarca, Huanuco y Cuzco; este reporte fue controversial hasta cuando en 1988 reportaron la presencia del hongo en el departamento de Amazonas considerado por Evans C., et al., (2007) como el primer registro válido de la enfermedad en el Perú, siendo así *M. rozeri* fue detectado en Bagua Grande, Provincia de Utcubamba, departamento de Amazonas (Hernández T., et al., 1990). En 1989, los únicos cultivos afectados estuvieron en los departamentos de Amazonas y Cajamarca; con concentraciones de infecciones altas en plantaciones de Jaén y Bagua. En 1992, el

patógeno llegó al departamento de San Martín por la parte superior del Valle del Huallaga (Ríos R., et al., 1993), al Valle de Apurímac en 1995 y al Valle de Ene en 1996 (Arévalo E. y Ram A., 1997).

Hasta 1998 sólo las áreas productoras de cacao de San Alejandro en el Valle Ucayali, Quillabamba en el Valle de Urubamba y Madre de Dios fueron las que se mantuvieron libres de la enfermedad. Pero en Agosto de ese mismo año la enfermedad fue reportada en San Iriato y Kepiarato del Valle de Urubamba, Cuzco (Arévalo E., 1999). En 1999, se reportaron cultivos infectados por este hongo en las regiones y subregiones de Jaén, Chachapoyas, San Martín, Huánuco y Ayacucho (Valle del río Apurímac y Ene) (MINAG, 1999). Arévalo E., (1999) indicó, que casi el 99% de las plantaciones de cacao en Perú fueron infectadas por moniliasis y que no existían barreras geográficas en ese momento para la dispersión del hongo hacia el departamento de Madre de Dios y Brasil. Teniendo en cuenta la gran susceptibilidad de la mayoría de los genotipos comerciales de cacao, la agresividad de este patógeno, su excepcional capacidad para sobrevivir en diferentes condiciones ambientales y su rápida dispersión natural y mediada por el hombre, se concluye que *M. royeri* representa una gran amenaza para los agricultores de cacao del mundo. Las pocas barreras naturales entre las áreas con presencia de la enfermedad y las que aún no existe, se consideran como la única forma de prevenir la dispersión de la moniliasis, especialmente a Brasil (Evans C., 1986; Phillips W. y Wilkinson J., 2007).



Figura N° 3. Distribución de la Moniliasis en el Perú. Fuente: Arévalo E., (1999).

1.1.1.5.2 Distribución geográfica: La enfermedad se encuentra en todos los países cacaoteros de América del Sur y El Caribe, como son Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Suriname; hasta el 2012 sólo Brasil no reporta la presencia de este patógeno afectando sus plantaciones.

La presencia de *M. rozeri* en Panamá marcó una expansión significativa del hongo a través de Mesoamérica (Orellana G., 1956; Phillips W. y Wilkinson J., 2007). De hecho, durante los últimos 50 años, *M. rozeri* se ha dispersado a lo largo de 2.500 km por las

principales áreas productoras de cacao de esta región: en Costa Rica se detectó en 1978 (Enríquez G. y Suárez E., 1978), Nicaragua en 1980 (López M. y Enríquez O., 1980), Honduras en 1997 (Porras H. y Enríquez G., 1998), Guatemala en 2002 (Phillips W. y Wilkinson J., 2007), Belice en 2004 (Phillips W., et al., 2006) y México en el 2005 (Phillips W., et al., 2006). Con este último reporte, *M. royeri* alcanzó el límite norte de las zonas productoras en el continente de América (Phillips W. y Wilkinson J., 2007).



Figura N° 4. Presencia de Moniliasis en America del Sur. Fuente: Arévalo E., (1999).

1.1.1.5.3 Sintomatología: En condiciones de campo, la enfermedad se ha encontrado sólo sobre frutos. La penetración e infección puede ocurrir en cualquier fase de

desarrollo del fruto, pero son más susceptibles durante los primeros estados. Después de penetrar el fruto, el hongo se desarrolla intercelularmente en las células del parénquima cortical, presentándose normalmente un largo periodo de incubación. Los síntomas de moniliasis varían con la edad del fruto y con la severidad del ataque del patógeno (Merchán V., 1981). Sobre frutos jóvenes se observan áreas de crecimiento anormal, formándose protuberancias pronunciadas sobre la superficie de los frutos (gibas) (Figura N°5).



Figura N° 5. Gibas que causan deformación en frutos jóvenes de cacao, síntoma típico del ataque de Moniliasis. Fuente: FHIA, 2012.

Los síntomas externos pueden estar completamente ausentes hasta la formación de lesiones entre 45 y 90 días después de la penetración del hongo. Evans C., et al., (1978) mencionaron que esta fase se podría considerar como la fase biotrófica del hongo, en cuanto a que la necrótica puede ser precedida por la maduración irregular o prematura, distinguiéndose la aparición de lesiones irregulares de color chocolate o castaño oscuro, que van creciendo gradualmente hasta cubrir con rapidez toda la superficie del fruto (Figura N°6A).



Figura N° 6. Síntomas y signos de la enfermedad. (A) mancha café y madurez prematura como síntomas típicos de la Moniliasis en fruto a mitad de su desarrollo. (B) fruto con micelio y esporas como signos de la enfermedad, que contribuyen a la propagación de la Moniliasis a otros frutos sanos. Fuente: FHIA, 2012.

En infecciones tardías, predominan las lesiones deprimidas de color castaño oscuro. Después del inicio de la lesión, alrededor de los 3 a 7 días, se desarrolla un micelio blanco y crema sobre los frutos infectados, tornándose luego en una densa masa pulverulenta constituida por esporas del hongo (Figura N°6B), que van cambiando gradualmente de ceniza a marrón (Evans C., 1981).

Los síntomas de la enfermedad pueden variar con la edad del fruto o tipo de material genético. Los tejidos internos de la mazorca pueden ser sustituidos por sustancias acuosas o gelatinosas (Figura N°7), razón por la cual esta enfermedad también es conocida y denominada de forma inadecuada como pudrición acuosa de los frutos. Con frecuencia, las almendras se presentan pegadas unas con otras de manera desorganizada, haciendo difícil su remoción.

Los frutos enfermos son normalmente más pesados que los frutos sanos. En algunos materiales o clones de cacao no se presenta esporulación sobre los frutos maduros

infectados, lo cual no permite diferenciarlos de aquellos afectados por escoba de bruja (Evans C., 1981; López M. y Martins E., 2005).

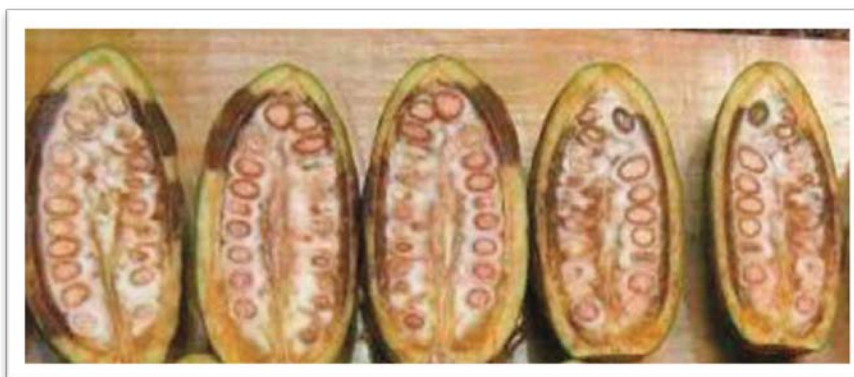


Figura N° 7. La pudrición de las almendras hasta dejarlas completamente inservibles es el daño principal que causa la Moniliasis. Aquí, frutos con almendras completamente inservibles que fueron inoculados artificialmente con el hongo a los dos meses de edad aproximadamente. Fuente: FHIA, 2012.

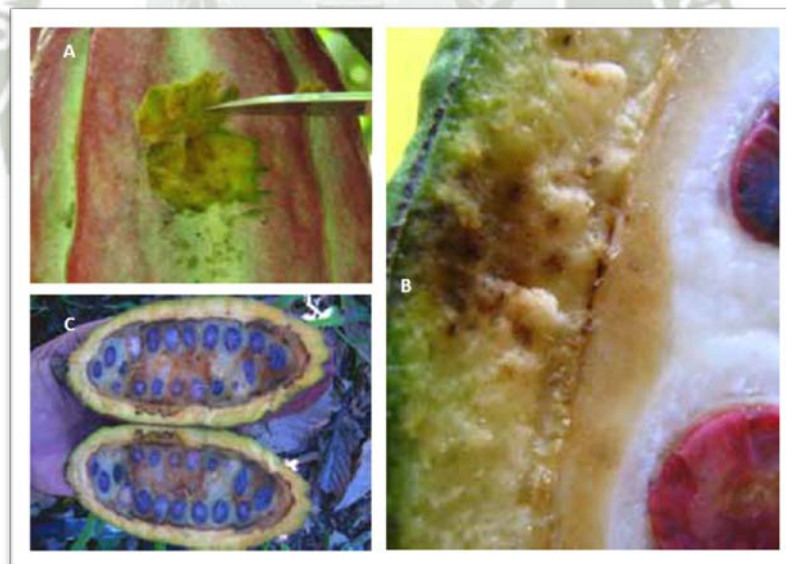


Figura N° 8. Síntomas internos de la moniliasis en mazorcas de cacao (A) y (B) puntos necróticos. (C) pudrición acuosa de la mazorca. Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010).

1.1.1.5.4 Epidemiología: La esporulación del hongo sobre la superficie del fruto es tan intensa que las nubes de esporas son liberadas y transportadas por el viento, la lluvia y en menor proporción por insectos (Evans C., 1986). Se estima que las densidades de esporulación del hongo sobre un fruto pueden alcanzar los 44 millones de esporas por cm^2 de área.

Una mazorca esporulada ubicada a una altura aproximada de dos metros tiene un gradiente de dispersión, con capacidad de infección de 40%, de hasta una distancia de 20 m. (Merchán V., 1981). Las condiciones óptimas para la maduración y penetración del hongo están alrededor de 25 °C y 85 % de humedad relativa. En tanto que tal nivel de esporulación sólo se observa durante pocas semanas después de su inicio, reduciéndose la cantidad de esporas producidas hasta aproximadamente diez semanas, cuando se torna casi insignificante. Las esporas pueden ser aisladas de los mismos frutos momificados, incluso después de un año de la infección, lo que es garantía de la oferta de inóculo durante ese tiempo (Evans C., 1981).

Los frutos momificados y esporulados en la copa del árbol son considerados la principal fuente de inóculo para iniciar la epidemia, diseminando las esporas en sentido descendente. La presencia de agua libre no sólo permite la germinación de las esporas, sino que remueve el inóculo desde estos frutos.

Se ha encontrado que la eliminación y disposición de los frutos con síntomas de la “mancha de chocolate” sobre el suelo, no sólo permite la descomposición por parte de los microorganismos presentes en éste, sino que dejan de ser importantes en la diseminación de *M. royeri* (Aranzazu F., 1987; Cubillos G., 1981).

1.1.1.5.5 Control de la enfermedad: A pesar de las pérdidas que puede ocasionar la moniliasis, el control de esta enfermedad es relativamente fácil, pues se sabe que le benefician las condiciones húmedas de las plantaciones, la oscuridad del cacaotal, el exceso de entrecruzamiento de las ramas dentro del mismo árbol, entre árboles vecinos y

entre árboles de cacao y los árboles que suministran sombra, por lo tanto su control se basa en un manejo adecuado de la plantación, para que no hayan esas condiciones que favorecen el establecimiento y permanencia del hongo que la produce. Así, para un buen control necesitamos atender la plantación con mayor eficiencia de lo que se hacía antes de llegar la enfermedad.

Existen varios métodos o prácticas de control que buscan erradicar o reducir la cantidad de inóculo presente en un área, planta o parte de la planta; estos métodos son:

- **Control cultural**

a. Podas (al menos dos veces al año)

Se realizan para mantener el tronco y ramas principales libres de brotes, chupones o hijos y de ramillas entrecruzadas dentro del árbol o entre árboles vecinos. Esto contribuye a mantener el ambiente seco y fresco (mejor circulación del aire), además de facilitar la ejecución de otras labores como la cosecha. Además de estas podas formales donde se corta una considerable cantidad de ramas, se pueden hacer podas suaves en las que se hace solo despunte de ramas y se eliminan chupones o brotes tiernos.

b. Regulación del sombrío permanente

Con esta práctica (junto con la poda del cacao) se obtiene una apropiada entrada de luz en la plantación y una buena circulación del aire, favoreciendo un rápido escape del vapor de agua. También, la regulación del sombrío es indispensable para un mejor aprovechamiento de los fertilizantes o abonos orgánicos aplicados.

c. Adecuado sistema de drenaje

Es necesario evitar el encharcamiento del agua de las lluvias y reducir la alta humedad relativa dentro del ambiente de la plantación.

d. Control de malezas frecuente y oportuno

Mantener libre de malezas el cacaotal, facilita la libre circulación del aire y contribuye a un ambiente más seco, evitando la condensación del rocío durante las noches, que favorece la germinación y penetración de las esporas en el fruto.

e. Remover del árbol todos los frutos enfermos dos veces por semana en los meses de lluvia

Los frutos con cualquiera de los síntomas de la enfermedad deben retirarse del árbol para que no se conviertan en nuevas fuentes de infección para los nuevos frutos que se formen en el mismo árbol o en árboles vecinos. Esta actividad requiere la revisión minuciosa de cada árbol para detectar cualquier fruto con síntomas aun en estado incipientes (iniciales) de la enfermedad (deformación o mancha). Esta labor se hace cada semana e incluso dos veces por semana en época de lluvias para evitar que el hongo tenga tiempo de formar las estructuras reproductivas (esporas), que son las "semillas" que afectarán otros frutos sanos que estén al alcance del hongo.

Los frutos enfermos que se corten o remuevan de los árboles, deben dejarse donde cayeron. Recogerlos y movilizarlos fuera de la plantación incrementa los costos de mano de obra y la experiencia ha demostrado que no son una fuente importante de inóculo, para nuevas infecciones, en plantaciones donde ya se ha establecido plenamente la enfermedad. Es mejor dedicar mayor tiempo a la revisión minuciosa de los árboles para evitar que se queden arriba en el árbol frutos enfermos, que gastar tiempo en recoger y transportar fuera de la plantación estos frutos cortados, pues el manipuleo durante el acarreo facilita la liberación de las esporas que quedan dispersos en el ambiente. Dentro del suelo o piso de los cacaotales abundan otros microorganismos que descomponen rápidamente los frutos dejados en el suelo, gracias a la humedad (lluvias) y a las altas temperaturas (calor) que normalmente se dan en zonas cacaoteras.

- **Control químico**

Este método depende del uso o empleo de sustancias químicas para reducir la población del patógeno. Puede ir dirigido al tratamiento del suelo, mediante la fumigación del suelo y de las semillas (Agrios G., 2003). También se pueden realizar aplicaciones foliares, tratamiento de frutos, tronco, ramas, y dosel del árbol. El tipo de sustancias químicas a emplear depende del nivel de daño del patógeno, por lo que en algunas ocasiones se usa como medida preventiva sustancias protectantes o terapia local con fungicidas sistémicos como medida curativa.

- **Control biológico**

Este método implica el uso de organismos vivos para reducir el inóculo del patógeno. Un ejemplo de este método es el empleo de plantas trampa y el uso de organismos antagonistas. También implica el empleo de enmiendas que potencien los microorganismos antagonistas nativos presentes en condiciones naturales. En el caso específico de los microorganismos antagonistas, estos actúan inhibiendo el crecimiento del patógeno ya sea mediante la producción de antibióticos o toxinas y mediante el parasitismo de las estructuras del patógeno directamente.

Otra forma de actuar de estos microorganismos es la competencia por espacio o nutrientes, lo cual también limita el crecimiento del patógeno (Agrios G., 2003).

- **Control por medio de resistencia genética**

Entre los cultivares de la especie *Theobroma cacao* hay diferencias en la susceptibilidad a *M. royeri*, lo cual muestra que en esta especie existen fuentes de resistencia al hongo. Aún no se ha descubierto un material inmune a *M. royeri*, pero de las pruebas realizadas en Ecuador, Colombia, Costa Rica y Honduras, se conoce que hay cultivares (clones o híbridos) que, consistentemente muestran menor número de mazorcas infectadas o si son infectadas la severidad de la

enfermedad en estos frutos es menor (daño externo o interno). Ejemplo de cultivares que presentan resistencia a la enfermedad, son los clones: UF-273, UF-712, PA-169, ARF-22, EET-75, EET-233, UF-296, IMC-67, entre otros.

1.1.2 *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime C. y Phillips W., (2005)

En 1901, se llevó a cabo el primer estudio detallado del hongo causante de la enfermedad *krullotten* (debido a su parecido de la rama enferma con un gancho). Las conclusiones fueron que el hongo, que fue llamado anteriormente *Exoascus theobromae* estaba presente en los tejidos infectados, pero las esporas no podían ser observadas. También se confirmó que el mismo hongo estaba presente en frutos infectados donde se encontró el mismo tipo de hifas que en la rama (Rorer B., 1913). Unos años más tarde, otros dos micólogos, Van Host y Drost, completaron un segundo conjunto de estudios y aislaron el hongo que nombraron *Colletotrichum luxificum*, ya que encontraron fructificaciones de este hongo que crecía en la superficie de las vainas. Sin embargo, en el invernadero no fueron capaces de reproducir la enfermedad por infección con esporas de *C. luxificum* en plantas de cacao (Bancroft K., 1910). Rorer B., (1913) expresó serias dudas acerca de que la identidad del hongo fuera *C. luxificum*, desde que se encontró con que la morfología del hongo que crecía dentro de los tejidos infectados y uno aislado de las superficies de la vaina diferían. Dos años después, se extendieron los estudios sobre las observaciones hechas por Rorer, la cual por experimentos de inoculación controlada, se descubrió que el real agente causal del *Krullotten* era un basidiomiceto que producía cuerpos fructíferos en la superficie de las ramas muertas, por tal motivo se cambió el nombre del basidiomiceto a *Marasmius pernicius* (Stahel G., 1915). Posteriormente Singer A., (1942) renombró al hongo como *Crinipellis perniciosa* (Stahel) basado en las características morfológicas. Finalmente, hace unos años Aime C. y Phillips W., (2005) demostraron mediante el uso de la secuenciación de ADN, que este hongo se encuentra muy relacionado con *Moniliophthora roreri*, siendo reubicado taxonómicamente a *Monilophthora perniciosa*.

1.1.2.1 Ubicación taxonómica según SINAVEF, (2012)

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Basidiomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *perniciosa*

1.1.2.2 Morfología

M. perniciosa presenta píleos de color rojo carmesí, generalmente débiles, que se tornan pálidos con la edad y presentan una mancha en el centro de color rojo a negro. Estos se encuentran dispuestos de forma radial y del mismo color, acanalados y acampanados, los cuales se expanden con una margen cóncava o convexa aplanada con un centro deprimido. Los píleos presentan diámetro que va desde 2 hasta 25 mm., su promedio está entre 5 y 15 mm.; subpileopellis de pared gruesa, con hifas no amilodes, con escasez de pelos, numerosos en el centro, con una pared roja cuando son frescos, los cuales se tornan hialinos con la edad y en la medida que se secan. Estas estructuras tienen un tamaño de 80-150 x 4-12 μm . Lamelas blanquecinas, muy gruesas (0,2 mm.), medianamente gruesas o muy anchas (1-2 mm.), distantes (8 – 20 mm. lamelas), con ranuras que corresponden a los píleos. Cheilocistidias muy regulares, en forma de botella con un tamaño de 35-50 x 9-14 μm . Pleurocistidias ausente. Estipe blanco, excepto en la base sub-bulbosa engrosada, la cual es ligeramente verde o amarilla. El estipe mide entre 5-10 mm de largo x 0,5–0,7 mm de ancho y la base mide 0,7 x 1,1 mm. Hifas con conexiones de gancho o clampa. Basidios con un tamaño de 31–32 μm de largo x 7–9 μm de ancho con 4 esporas. Basidiosporas hialinas con un tamaño de 7–11 μm de largo x 4-5 μm de ancho (Holliday P., 1998).

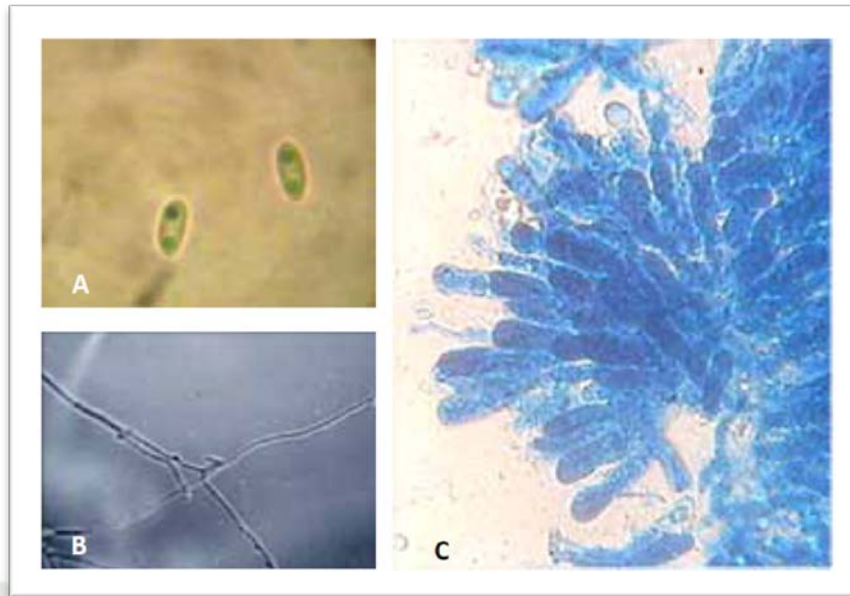


Figura N° 9. Estructuras microscópicas de *M. pernicioso*. (A) Basidiosporas. (B) Micelio biotrofo. (C) Estroma. Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010).

1.1.2.3 Ciclo de vida

La infección provocada por las basidiosporas sólo ocurre en tejidos con crecimiento activo (Porrás H. y Sánchez J., 1991). Existen dos fases en el ciclo de la enfermedad de *Moniliophthora pernicioso*. En primer lugar, el patógeno invade el tejido joven en crecimiento, induce hipertrofia e hiperplasia y vive como un parásito obligado de forma intracelular. En la segunda fase, el tejido hipertrofiado muere y el hongo cambia sus hábitos y crece como un saprófito. Cuando las condiciones son favorables producen los basidiocarpos de los cuales se forman las basidiosporas (CABI, 2011).

El proceso de infección en los tejidos jóvenes de cacao comienza cuando los tubos germinativos de las basidiosporas penetran a través de los estomas o directamente atravesando la epidermis. Después de la penetración, las hifas del hongo colonizan intercelularmente el tejido del hospedante. El tiempo para que los síntomas aparezcan puede variar considerablemente (3-14 semanas), pero generalmente se presentan a las 5

ó 6 semanas. El hongo causa un desequilibrio hormonal, por lo que las células del hospedante son más grandes de lo normal, particularmente las de la corteza y médula, y los tejidos se hinchan. En los brotes vegetativos la dominancia apical se pierde, yemas axilares se desarrollan generando brotes laterales que finalmente conllevan al síntoma de “escoba de bruja en cacao” (CABI, 2011).

Las escobas generalmente permanecen verdes durante un período relativamente corto. Comienzan a secarse a partir de los ápices y adquieren una tonalidad de color marrón en aproximadamente 5-6 semanas y luego se secan progresivamente; durante el proceso de infección el micelio del hongo cambia de monocariótico a dicariótico por anastomosis; pero, cuando el tejido muere el micelio se fragmenta generando clamidosporas, y del síntoma ocurrirá la formación de basidiocarpos que ocurre después de 4 semanas de incubación (CABI, 2011).



Figura N° 10. Ciclo de vida de *Moniliophthora perniciosa*. Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010).

1.1.2.4 Mecanismos de dispersión

El patógeno puede permanecer en el hipocótilo de una semilla sin germinar y seguirá siendo viable mientras la semilla esté viva (Evans C., et al., 1978). Se ha demostrado que las basidiosporas pueden ser distribuidas por el agua de lluvia cuando entran en contacto con las partes bajas de ramas y de troncos de árboles enfermos (CABI, 2011). Otra manera de dispersión de las esporas puede ser por el viento, siendo arrastradas sin necesidad que sea su mecanismo activo de su dispersión.

1.1.2.5 Escoba de bruja

1.1.2.5.1 Origen: La escoba de bruja del cacao es una enfermedad endémica, originaria del valle alto del Amazonas del lado Este de los Andes (Purdy L. y Schmidt R., 1996), se ha expandido casi paralelamente con el incremento de la superficie dedicada al cultivo de cacao en América del Sur.

La enfermedad fue registrada por primera vez con el nombre de lagarto por el brasileño Alexander Rodrigues Ferreira, constituyendo posiblemente el registro más antiguo, estas observaciones lo hizo en árboles de cacao de la Amazonía en 1785 y 1787, lo cual es consistente con la idea generalmente aceptada de que *M. pernicioso* al igual que su principal anfitrión *T. cacao*, se desarrollaron en esta región (Tovar G., 1991).

En el Perú, no se tiene un registro específico de cuando fue que la enfermedad llegó a nuestro país, pero se dice que probablemente el primer reporte fue hecho en la expedición amazónica realizada por Pound F., (1938) quien visitó las regiones de Ucayali, Pucallpa, Río Urubamaba, Río Marañón, Río Morona y Río Huallaga y encontró árboles fuertemente infectados con escoba. En una segunda expedición Pound F., (1943) reportó presencia de escoba en los alrededores del departamento de Iquitos, Río Nanay y Río Napo. Por otro lado un reporte hecho por Bazan C., (1952), confirma la presencia de la enfermedad a partir de 1951.

1.1.2.5.2 Distribución geográfica: Escoba de bruja tiene una amplia distribución geográfica en los países productores de cacao de América Central y del Sur, como Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guyana, Perú, Venezuela, Panamá y las islas del Caribe como Trinidad y Tobago, Granada, Santa Lucía y San Vicente.

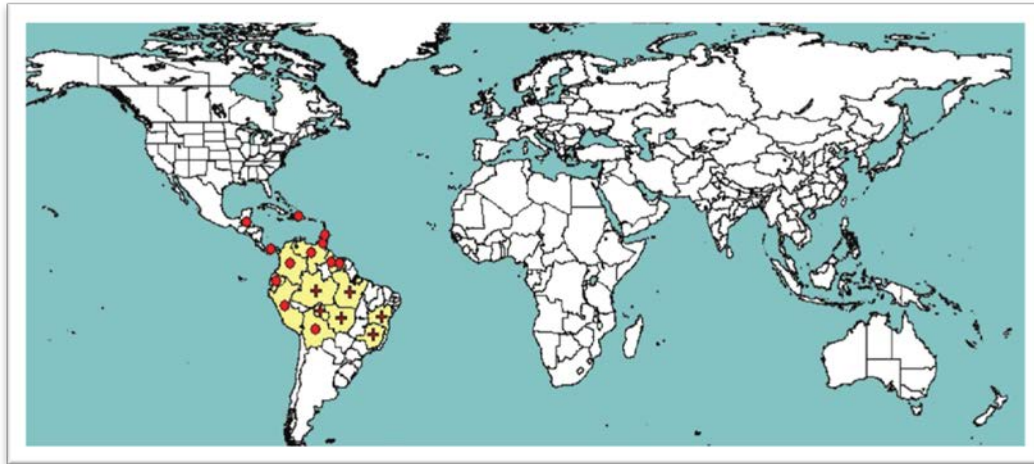


Figura N° 11. Distribución mundial del hongo causante de la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*). Fuente: SINAVEF, 2012.

Después del primer aislamiento de la enfermedad en Suriname en 1895, se informó en la Guayana en 1906, Colombia en 1917 y Ecuador en 1918 (Holliday P., 1952). Stahel G., (1919) detectó la enfermedad en el Río Cutari frontera fluvial entre Brasil, Guyana y Suriname. En la misma expedición, se identificó la enfermedad en la región del Río Tapajós, afluente del río Amazonas en la Amazonía brasileña, lo que sugiere que las plantaciones de cacao en el valle del Amazonas estaban en su mayoría infectadas por la enfermedad. Esta hipótesis, según Baker E. y Holliday P., (1957) fue confirmada por Pound J., (1938) quienes afirman que la enfermedad se extendió por toda la cuenca del Amazonas y sus afluentes, que van desde el Este en el estado de Pará a la Sierra, al pie de los Andes. Por lo tanto, las tierras bajas de la amazonía como Bolivia, Perú y Colombia estaban dentro de la zona de ocurrencia de escoba de bruja.

En 1928, se descubrió la enfermedad en Trinidad y Tobago y Venezuela (Stell F., 1928); Granada (Dale T., 1946, 1949) y en Panamá se detectó en 1978 (Pereira L., 2000).

1.1.2.5.3 Sintomatología: La sintomatología de la escoba de bruja es bastante variada; ha sido descrita en detalle por Holliday P., (1952); Baker E. y Holliday P., (1957); Evans C., (1981). Cuando el hongo infecta ramas y brotes vegetativos, provoca hinchazón en la parte afectada, acompañada de la proliferación de pequeños brotamientos próximos a los otros, donde se forman las hojas con apariencia de una escoba de bruja (Figura N°12).

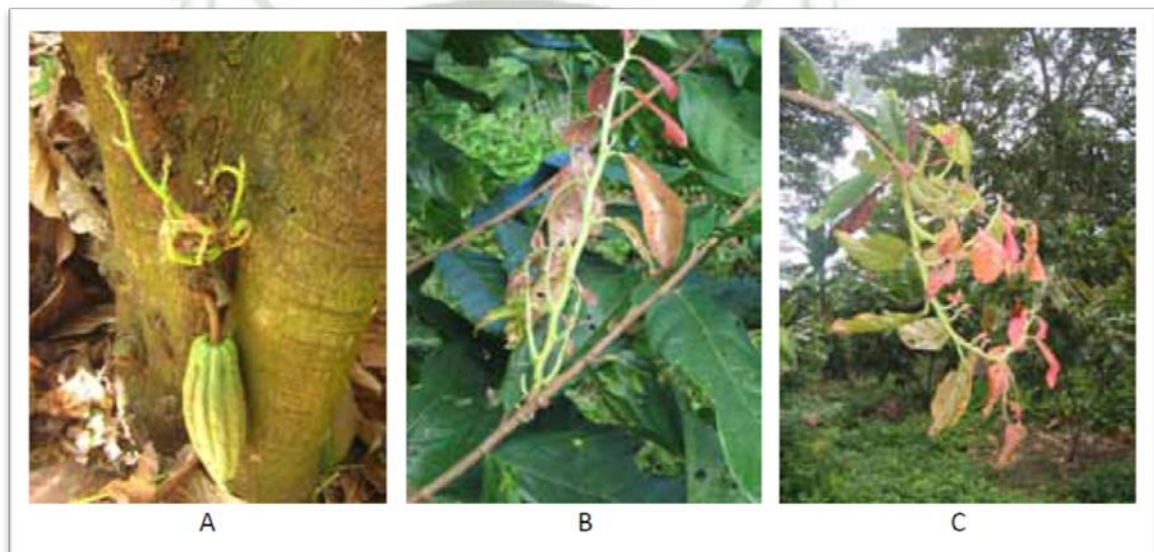


Figura N° 12. Síntoma de escoba verde en (A) cojines florales (B) ramas y (C) brotes terminales afectados por *M. pernicioso*. Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010).

La infección de los cojines florales se manifiesta con la formación de escobas, con la presencia o no de pequeños frutos partenocárpicos (frutos chirimoya) (Figura N°13D). También, *M. pernicioso* causa la pudrición de los frutos de cacao, los cuales son susceptibles durante todo su desarrollo.

Cuando el patógeno infecta los frutos durante las primeras semanas de edad, se detiene su crecimiento causando la muerte o marchitez prematura. En frutos enfermos de 1 a 4

meses de edad, se presentan deformaciones o hinchazón (Figura N°13A y B) y se forma un área necrótica (Figura N°13C) más oscura que la ocasionada por la pudrición por moniliasis, la cual termina en una pudrición acuosa y en la pérdida total de las semillas. En infecciones tardías, es decir, en frutos mayores de 4 meses, la infección causa una pérdida parcial de las semillas de cacao (Meinhardt W., et al., 2008). Extraordinariamente, después de estos síntomas, la hifa biotrófica de *M. pernicioso* se encuentra en bajas densidades y no produce haustorio; sólo se limita a ocupar el espacio apoplástico y presenta un crecimiento lento.

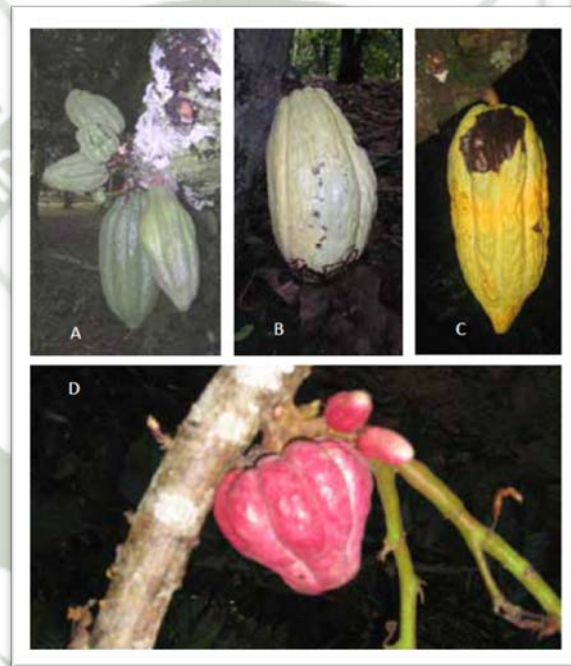


Figura N° 13. Síntomas en frutos causados por *M. pernicioso* (A) y (B) protuberancias (C) mancha chocolate (D) fruto chirimoya. Fuente: Suarez YJ. y Hernandez FA., (2010).

Durante la fase biotrófica, parece ser que el tejido infectado se somete a un intenso estrés oxidativo, que se evidencia por un incremento de la peroxidación de lípidos (Scarpari M., et al., 2005; Do Rio C., et al., 2008). Este evento oxidativo se debe a la producción de peróxido de hidrógeno por la degradación enzimática de cristales de

oxalato de calcio, los cuales se han producido y almacenado durante el progreso de la enfermedad y están presentes en el tejido infectado (Do Rio C., et al., 2008).

Después de 1 ó 2 meses de presentarse las alteraciones, los tejidos enfermos se necrosan y mueren, dando lugar a la formación de una estructura denominada escoba seca (Meinhart W., et al., 2008). En esta fase necrótica, el hongo adquiere unas características distintivas, tales como: un micelio dicariótico saprofítico/necrótico, en el cual se observan las conexiones o clampas. A diferencia de la fase biotrófica, el micelio saprofítico (diámetro de 1 – 3 μm) crece vigorosamente, colonizando rápidamente el material vegetal infectado. Durante esta fase, después de alternar periodos húmedos y secos, tiene lugar la formación de los basidiocarpos sobre el tejido vegetal necrosado (Figura N°14). Esta fase tiene una duración aproximada entre 17 a 25 semanas (Holliday P., 1952; Meirelles S., 2002).

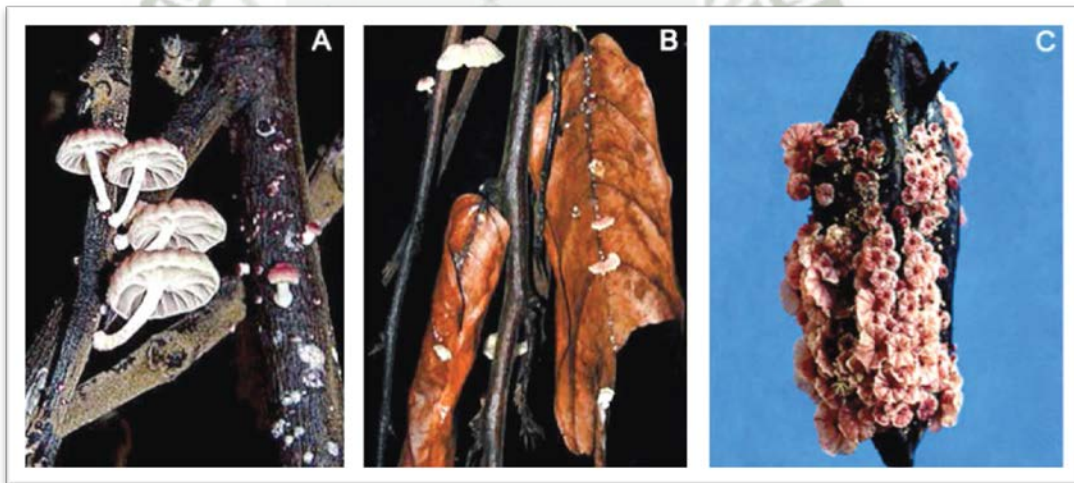


Figura N° 14. Formación de basidiocarpos sobre tejido necrosado (A) Basidiocarpos en ramas; (B) Hojas; (C) y en frutos secos. Fuente: SINAVEF, 2012.

Durante la fase saprófita, el hongo sobrevive en un estado dormante sobre las escobas secas o frutos momificados hasta el inicio de la época de lluvias (Evans C. y Bastos C., 1979; Meirelles S., 2002).

La condición ambiental requerida para la liberación de las basidiosporas es la humedad relativa próxima a la saturación (es decir cercana al 100%), la oscuridad y las temperaturas entre 20° a 30°C (Rocha M. y Wheeler E., 1985). La liberación nocturna garantiza la supervivencia de estos propágulos por más tiempo. La dispersión natural de las basidiosporas se da principalmente por el viento y la lluvia, a partir de fuentes de inóculo como escobas necrosadas y frutos enfermos (Figuras N°12, 13 y 14). La infección tiene lugar cuando las esporas son depositadas sobre las yemas vegetativas, cojines florales o frutos en desarrollo. La infección de yemas dormantes se convierte en infecciones latentes, ya que forman pequeños puntos necróticos que se activan cuando inicia el periodo de brotación (Bastos C., 1994; Meirelles S., 2002).

1.1.2.5.4 Epidemiología: Las basidiosporas son los únicos propágulos capaces de causar infecciones únicamente en meristemos (brotes, yemas florales y frutos jóvenes) (Evans C. y Bastos C., 1980).

Theobroma y *Herrania* que son los hospedantes preferenciales de *M. pernicioso* son especies endémicas de las tierras bajas de selvas del Amazonas y generalmente en condiciones naturales, los síntomas de la enfermedad son críticos. Sin embargo, en bosques alterados, la incidencia de la enfermedad aumenta considerablemente afectando principalmente los árboles soleados. En huertos comerciales sin sombra los rendimientos iniciales son altos, pero posteriormente decrece debido al aumento de la “incidencia de la escoba de bruja del cacao” debido al incremento de la actividad meristemática y desarrollo activo de brotes y botones florales. Se han determinado diferentes biotipos de *M. pernicioso* los cuales se definen con base en su adaptación a diferentes hospedante. El biotipo-C que infecta cacao, biotipo-L asociado a miembros de la familia Bignoniaceae, el biotipo-H que infecta miembros de la familia Malpighiaceae y el biotipo-S que afecta Solacaceae (Marelli P., et al., 2009). Sin embargo; en otros hospedantes diferentes al cacao la enfermedad no ha mostrado un comportamiento epidémico; debido a que el ciclo de vida del hongo no se completa en especies anuales

ya que requiere al menos de un año para completar su ciclo biológico (Evans C. y Barreto W., 1996).

Los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la enfermedad son complejos. El factor más importante es la humedad, ya que la producción de cuerpos fructíferos en las escobas depende de los periodos de humedad y sequía. La mayoría de las escobas forman cuerpos fructíferos con periodos moderados de humedad (8 a 16 horas), menos de cuatro y más de 20 horas inhiben la formación de cuerpos fructíferos. Las temperaturas favorables son 20 a 30 °C (CABI, 2011).

Los basidiocarpos no viven mucho tiempo (3 días después de llegar a la madurez), pero una “escoba” puede originar hasta 30 setas en una semana y continuar produciéndolas durante dos años o más de forma estacional (Porras H. y Sánchez J., 1991). Las basidiosporas son liberadas por los basidiocarpos durante la noche sobre todo entre las 18:00 y las 06:00 h (la mayoría las liberan entre 22:00 y 04:00 h), siempre y cuando la humedad sea lo suficientemente alta para mantenerse turgentes a los basidiocarpos. Las condiciones óptimas para la liberación son temperaturas entre 20-25 °C y 80 % de humedad relativa. Estos factores también influyen en la longevidad y la producción de las esporas, la mayoría de los basidiocarpos permanecen liberando esporas de 2-4 días si las condiciones son favorables, con una producción total de alrededor de 2 a 3.5 millones de esporas (CABI, 2011).

Los rebrotes jóvenes, especialmente aquellos en desarrollo, son los más susceptibles. A medida que los rebrotes se desarrollan, se vuelven más resistentes. Sin embargo, la inoculación de un rebrote endurecido por debajo del punto de crecimiento puede causar un leve abultamiento, lo que lleva a la formación de un cáncer. La susceptibilidad del fruto también varía con el tiempo. El período exacto de susceptibilidad es difícil de determinar debido a que la manifestación de los síntomas (necrosis) es retardada, pero puede ser alrededor de la semana 12 a partir de la formación de los frutos; en frutos inmaduros de más de 6 cm de largo rara vez se presenta. El desarrollo de la infección

está influido por los factores ambientales, uno de los más importantes son las películas de agua sobre los tejidos sensibles. Las basidiosporas de *Moniliophthora perniciosa* germinan rápidamente en agua; la germinación se produce entre 3-4 horas a 22-24 °C (CABI, 2011).

1.1.2.5.5 Control de la enfermedad: El manejo de *M. perniciosa* en cacao ha recibido gran atención desde inicios del siglo XX. En general, se han definido cuatro estrategias principales: control cultural, control químico, la resistencia genética y el control biológico. Con la remoción del 95% de tejido afectado se reduce la pérdida de mazorcas en 50%. Sin embargo, se considera una práctica tediosa y costosa (Rudgard A. y Butler R., 1987; Meinhart W., et al., 2008).

- **Control cultural**

Las prácticas de poda, raleo, deschuponado y mantenimiento de zanjas de drenaje son fundamentales para disminuir la incidencia de la enfermedad. Es factible la extirpación de las escobas individuales, las escobas vegetativas se deben cortar por lo menos 15-20 cm por debajo del punto de infección. Los materiales enfermos sobre los cojines deben ser cuidadosamente removidos, cortándolos lo más cerca posible a la corteza. Las vainas enfermas junto con sus pedúnculos deben ser removidos cada vez que se cosechan las vainas sanas (CABI, 2011).

Los tejidos enfermos se distribuyen en las ramas y copas de los árboles, por lo general la mayor parte de las escobas y vainas enfermas se encuentran en la parte superior de la planta, sólo un número escaso se localiza en el tronco y las ramas inferiores. La eliminación debe ser lo más completa posible para tener mayores posibilidades de éxito (CABI, 2011).

Es importante asegurarse de que todas las escobas y vainas enfermas sean eliminadas y que no permanezcan suspendidas en las ramas. Se recomienda que si el saneamiento se ha extendido por más de un año, las escobas viejas que se

encuentran en el suelo pueden producir basidiocarpos a los pocos días en condiciones de lluvias si no se retiran a tiempo (CABI, 2011).

- **Control químico**

El empleo de fungicidas protectantes y sistémicos no es una práctica rutinaria en la producción de cacao, debido a los altos costos y a los riesgos asociados con la contaminación del grano, la salud de los trabajadores y la conservación del medio ambiente. Además, muchas de las investigaciones concernientes al empleo de fungicidas para el control de las enfermedades de cacao no han sido consistentes ni contundentes (Meinhart W. et al., 2008).

- **Control biológico**

Otro método de control de la escoba de bruja, en el cual se ha avanzado en los últimos años, es el control biológico. Se ha encontrado que especies microbianas endófitas habitan en diferentes tejidos de la planta de cacao, incluidas las raíces, los troncos, los tallos y las flores. Entre los hongos endófitos asociados con cacao se encuentran principalmente *Gliocladium catenulatum*, *Trichoderma stromaticum*, *T. viride* y *T. polysporum*. En el caso de *G. catenulatum* mostró reducir los síntomas de la escoba de bruja en condiciones de invernadero (Rubini et al., 2005). *T. stromaticum* es un micoparásito de basidiocarpos de *M. pernicioso* (Sanogo S., et al., 2002).

- **Control genético**

Existe un número de accesiones tanto de cacaos silvestres como aquellos seleccionados por los agricultores según su resistencia a *M. pernicioso*. Entre los materiales considerados altamente resistentes se encuentran los scavina SCA 6 y SCA 12. La resistencia de los clones SCA parece ser de mayor durabilidad, según observaciones realizadas en Trinidad durante cincuenta años. Sin embargo, también existe un fuerte efecto de la localidad o zona sobre los clones SCA y la progenie derivada de éstos.

Se ha observado que los clones resistentes en Brasil y Trinidad son susceptibles en Ecuador (Meinhart W., et al., 2008), lo que sugiere que el mejoramiento de materiales de cacao se debe realizar teniendo en cuenta las variaciones geográficas entre los aislados del patógeno. Además se encontró que la resistencia del clon SCA 6 está dada por un gen mayor recesivo (Meinhardt W., et al., 2008).

1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA

El Perú ha sido calificado por la Organización Internacional del Cacao, como un país productor y exportador de cacao fino y de aroma, logrando exportar el 36% del cacao fino y de aroma que se produce a nivel mundial. Asimismo, como segundo productor de cacao orgánico, orienta su producción a mercados de comercio justo (MINAG, 2011).

Según el Ministerio de Agricultura, el primer productor a nivel nacional es el departamento de San Martín con una producción de 26 mil TM en el año 2011, le sigue el departamento de Cusco con una producción de 8 mil TM en el año 2011, ambos representan el 68% de la producción nacional. Los departamentos de Ayacucho y Junín se ubican en tercer y cuarto lugar representando el 20% de la producción nacional. Finalmente, los departamentos de Amazonas, Huánuco, Cajamarca y Ucayali son los que tienen menor producción con un 12%.

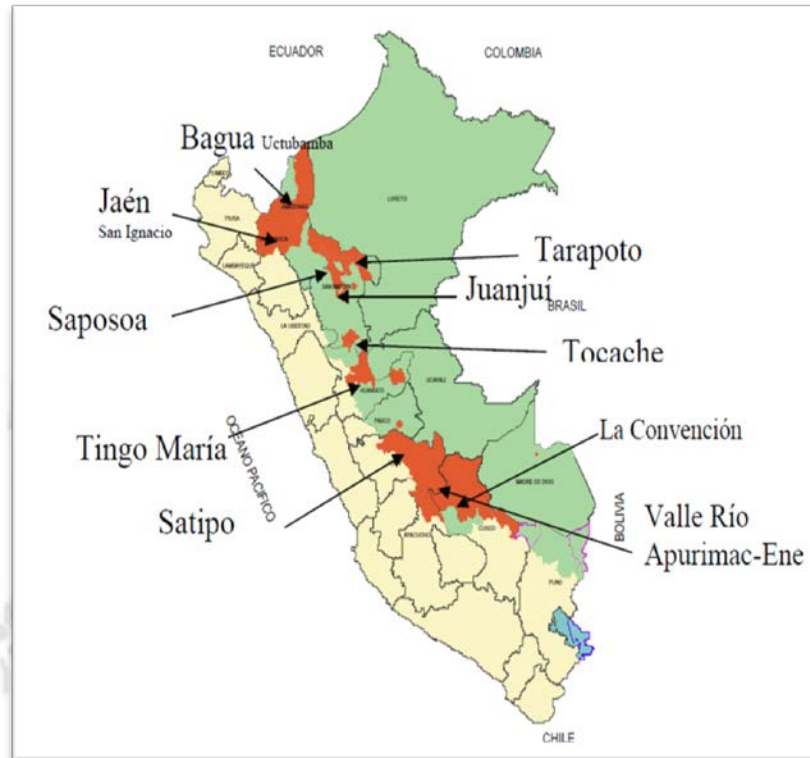


Figura N° 15. Principales zonas cacaoteras del Perú. Fuente: MINAG, 2003

Esto constituye una de las principales actividades productivas en la amazonia peruana, especialmente en zonas de Selva alta. Sin embargo la productividad de este cultivo ha ido descendiendo por la presencia de plagas como la enfermedad escoba de bruja y desde hace unos años siendo reemplazada por una enfermedad más severa como la moniliasis.

- La moniliasis es un problema de suma importancia y es el principal enfoque de los programas nacionales de mejoramiento de germoplasma (Evans C., 2007). Hasta 1990, la principal enfermedad de cacao en Perú era la escoba de bruja, siguiendo en menor proporción la enfermedad causada por el hongo *Phytophthora*. La situación cambió rápida y dramáticamente cuando la moniliasis apareció causando una caída general de la producción del 40-50%, e incluso en algunas zonas la pérdida total de las cosechas, lo que llevó al abandono de las

explotaciones agrícolas (Evans C., et al., 1998). En las zonas afectadas, las pérdidas por moniliasis van desde 10 a 100% (Katip Y., 1994). Por ejemplo, después de la llegada de la moniliasis, la producción del Valle del Huallaga, la principal zona productora de cacao del departamento de Huánuco, se redujo de 1,276 Mt a 745 Mt en 1992 y a 427 millones de toneladas en 1993 (Evans C., et al., 1998). Para 1988 se estimaba que el 88% de las explotaciones de cacao peruanos se vieron afectados por la enfermedad (Evans C., et al., 1998). La magnitud de las pérdidas y la falta de medidas eficaces produjeron el abandono de muchas plantaciones de cacao (Katip Y., 1994; Krauss U. y Soberanis W., 2002).

En Ecuador, se estima que las pérdidas por moniliasis van desde un 15% hasta un 80%. En Colombia se han reportado pérdidas del 55% de la cosecha. En Venezuela se reduce la producción entre el 40 y 50%. En Costa Rica, Enríquez G. y Suárez E., (1978) mencionan que la producción nacional en 1978 fue de 9.500 toneladas por año pero debido a la presencia de la enfermedad, el rendimiento se redujo en 1982 a 3.500 toneladas; en cinco años de ingresada la enfermedad, la producción se redujo al 72%. En Honduras, la producción de cacao en 1997, antes de la llegada de la moniliasis, era de 4.500 toneladas de cacao; en 2003, por efecto de esta enfermedad, la producción tan solo alcanzó 900 toneladas.

- La escoba de bruja se ha expandido en las plantaciones dedicadas a la producción de cacao. En América del Sur causó los primeros daños económicos en Surinam, donde la epidemia de 1985 provocó pérdidas de hasta el 50 % del rendimiento anual (Marelli J., 2008). En Ecuador, la producción descendió 40 % en cinco años, a partir de su aparición en el año 1917. En Trinidad, las pérdidas promedio en cosecha de 1936-1937 fueron del 37.5 %. Para el año 1989 se presentó por primera vez en el Estado de Bahía, Brasil, disminuyendo 60 % los rendimientos desde 1990 a 1994.

En Perú, son 11 las principales zonas cacaoteras, y el porcentaje de pérdida por esta enfermedad fluctúa entre el 15 – 30%. Siendo VRAE, Convención y Satipo las zonas con mayor porcentaje a causa de cultivos totalmente abandonados, plantaciones sin manejo técnico y con variedades altamente susceptibles. En el caso de VRAE los problemas de terrorismo y narcotráfico juegan un papel importante en la diseminación de la enfermedad.

1.3 SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD DE HONGOS

1.3.1 Diversidad genética de hongos

Los hongos se caracterizan por poseer una gran diversidad y complejidad que otros grupos de patógenos microscópicos. Por otra parte, la diversidad genética de los hongos les permite que evolucionen rápidamente en nuevos tipos de patógenos en respuesta ocasionada por los avances en la mejora de cultivos. De ello se desprende que una mejor comprensión del mecanismo de patogenicidad y las fuentes de variación genética de los patógenos en las plantas sea crítico para el futuro control de la enfermedad fúngica (Talbot J., 1998).

Los hongos poseen una amplia variedad de mecanismos para la introducción de la variación genética en su ciclo de vida, ya sea durante la reproducción sexual o independientemente de ella (Wang R. y Schmidt E., 1998). La variabilidad resultante es significativa por un número de razones. Puede afectar a la relación del patógeno con su hospedero en muchos niveles, y la flexibilidad genética permite que los hongos puedan adaptarse fácilmente a las condiciones cambiantes del medio ambiente, incluida la introducción de nuevos genotipos del hospedero.

La recombinación sexual es una de las fuentes de variabilidad más importante, pero no es universal entre los hongos. Un tercio de todos los hongos pueden tener ambas fases, la fase asexual (anamorfo) y la fase sexual (teleomorfo) (Hawksworth L., et al., 1996), este

último a menudo ocurre con poca frecuencia. En muchos otros, sólo se conoce la reproducción asexual o partenocárpica (Duncan M., et al., 1998).

Muchos hongos fitopatógenos no tienen fase sexual o una fase sexual que todavía no se encuentra en la naturaleza (Brygoo Y., et al., 1998). En un extremo del espectro se encuentran tipos de hongos que son completamente asexuales (por ejemplo, los Deuteromycetes) pero sin embargo genera variación modificando la expresión genética o adaptando procesos mitóticos para producir recombinantes o segregantes como propágulos asexuales; la mayoría de los hongos producen abundantes esporas asexuales que son extremadamente eficaces en dispersar el organismo.

En el otro extremo se encuentran las diversas formas de la sexualidad, que van desde sistemas de incompatibilidad bipolar (bifactorial) a sistemas de incompatibilidad (unifactorial), con tipos de apareamiento cambiando en algunos organismos. Existe abundante evidencia para demostrar que out-crossing o cruzamiento ciertamente promueve la variabilidad, y que los linajes asexuales cambian poco en el tiempo, en un aparente apoyo al punto de vista que la variabilidad en las poblaciones permite al organismo sobrevivir los desafíos ecológicos y medioambientales. Bernstein H., et al., (1985) sugirieron que el daño en un cromosoma (causado por mutación o replicación defectuosa) es reparado por recombinación con el cromosoma normal proporcionada por el otro padre, es la causa subyacente del éxito de la reproducción sexual. Out-crossing también podría dar lugar a la ventaja heterocigótica, donde el fenotipo heterocigoto es más que cualquiera de sus padres homocigotos. La evidencia que apoya esta teoría con frecuencia se ha presentado en las plantas, animales e incluso en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Brygoo Y., et al., (1998) compararon la diversidad genética, la diversidad genotípica y otros parámetros de las poblaciones de las diferentes especies de hongos (*Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Botrytis cinerea* y *Erysiphe graminis*). Como era de esperar, este

estudio demostró que exclusivamente las poblaciones asexuales tienden a ser genéticamente menos diversos que las poblaciones sexuales, en particular, al considerar la diversidad genotípica, ya que se componen de un pequeño número de familias compuestas de clones altamente relacionados (linajes clonales). Dentro de tales linajes clonales, se detectó un bajo nivel de polimorfismo, que es, en general, aislado específico. Estos estudios sugieren que el análisis de las estructuras de población es más sencillo con las poblaciones asexuales que con las especies sexuales. Pocas muestras y pocos marcadores moleculares son suficientes para estudiar la estructura de las poblaciones asexuales. En particular, eventos de migración en todo el mundo se pueden rastrear fácilmente cuando se detectan los aislados de los mismos linajes clonales en diferentes partes del mundo. La dinámica de la población en una región específica también podría ser analizado en el tiempo mediante la medición de la fluctuación de la frecuencia de los diferentes linajes clonales residentes (Brygoo Y., et al., 1998).

1.3.2 Análisis de diversidad genética de hongos

El análisis de diversidad genética y la relación entre o dentro de los taxones es una tarea central para muchas disciplinas de la biología. Históricamente, la filogenia, taxonomía y la caracterización de los hongos se han deducido a partir de diversos caracteres fenotípicos, incluyendo caracteres morfológicos, fisiológicos y de desarrollo, y/o componentes químicos, tales como metabolitos secundarios (Mills R., et al., 1998).

Las características morfológicas han sido utilizadas para identificar las especies, familias y géneros. Por otra parte, las características morfológicas, así como rasgos de la historia de vida han sido objeto de numerosos estudios en la genética de poblaciones y la agricultura, donde la aptitud y el rendimiento son biológicamente y evolucionariamente factores importantes. Los niveles de variabilidad pueden estimarse por caracteres morfológicos, la respuesta a la selección y sus antecedentes genéticos se puede determinar, y las correlaciones genéticas y las fuerzas de selección históricos se puede inferir (Weissing K., et al., 1995). Esta estrategia ha demostrado ser exitoso para un gran número de hongos, aunque los caracteres morfológicos no siempre han demostrado ser

fuentes fiables de información para fines de identificación. Por otra parte, para los hongos es con frecuencia difícil encontrar suficientes caracteres morfológicos variables para permitir una resolución sistemática completa de todos los grupos y muchos caracteres que se utilizan pueden ser fuertemente influenciados por el medio ambiente (Weising K., et al., 1995).

Por tanto, la introducción de técnicas de biología molecular ha sido una fuerza importante en las áreas de la biología sistemática y la población de hongos filamentosos (Bridge D. y Arora K., 1998). La aplicación de una serie de técnicas basadas en el ADN ha revolucionado la disciplina sistemática de hongos y ha proporcionado herramientas para ambos, la discriminación de los hongos estrechamente relacionados, en casi cualquier resolución requerida, y también la detección de especies de hongos en las sensibilidades, en algunos casos, mucho más allá de los métodos tradicionales (Mills R., et al., 1998; Tamakatsu S., 1998). El requisito previo para el análisis genético es tener herramientas que pueden discriminar entre entidades biológicas con diferentes personajes genéticamente determinadas (Wang R. y Schmidt E., 1998). Una serie de técnicas y marcadores genéticos han sido desarrollados para estimar la diversidad genética, pero ninguna técnica es universalmente considerada como ideal, cada técnica disponible presenta fortalezas y debilidades. Por lo tanto, la elección de la técnica es a menudo un compromiso que depende de la pregunta que persigue la investigación y la resolución genética necesaria, así como de las limitaciones financieras y la competencia técnica disponible (Mueller J. y Wolfenbarger L., 1999).

1.3.3 Filogenia de hongos

Filogenética es el estudio de las relaciones genealógicas y de los patrones históricos del cambio evolutivo entre los organismos (Oliver P. y Schweizer M., 1999). Los estudios filogenéticos contribuyen a la transferencia inteligente de la información a partir de tres o cuatro especies de hongos mejor conocidos como "sistemas modelo" a los cientos de

miles de otros hongos menos manejables, menos conocidos (Berbee L. y Taylor W., 1999).

Durante cientos de años, la filogenia y taxonomía de hongos se han basado casi exclusivamente en la morfología. Las características morfológicas arrastran rasgos definitorios para muchos grupos de hongos. Los caracteres útiles pueden tener uno o más estados de caracteres alternativos (Berbee L. y Taylor W., 1999). Uno de los supuestos subyacentes en la filogenética es que los patrones de cambio se registran en los caracteres heredados por los organismos de las generaciones anteriores. El registro de cambio puede ser embebido en caracteres que van desde el morfológico a las características genotípicas de secuencias de ADN y proteínas. Típicamente, las relaciones filogenéticas se esquematizan generando arboles en la forma de ramificación dicotómica, por lo general, uno de varios algoritmos informáticos. La mayoría de los estudios de filogenética abordan preocupaciones prácticas, incluida la clasificación de hongos de importancia económica o la detección de hongos de importancia médica o medioambiental (Berbee L. y Taylor W., 1999).

El análisis de las secuencias de ADN se ha convertido en el método más ampliamente utilizado para inferir las relaciones filogenéticas entre organismos. La publicación de las secuencias y su deposición en bases de datos electrónicos (NCBI, GenBank, EMBL, DDBJ) permite la confirmación de los resultados y su aplicación a otros taxones sin la necesidad de obtener cepas o clones, o para repetir los experimentos (Takamatsu, 1998). Hay varios factores a considerar en la selección de una región para el análisis de la secuencia (Bruns D., et al., 1991).

- La región debe estar evolucionando a un ritmo adecuado para la comparación de interés. Lo ideal sería que la región suministre suficientes diferencias consistentes para separar los taxones en grupos monofiléticos apoyados estadísticamente. Las regiones que están muy conservadas proporcionarán muy pocos cambios. Las regiones que son muy variables contendrán demasiados caracteres inconsistentes

debido a múltiples sustituciones en las posiciones individuales, y la alineación puede ser un problema adicional.

- La región debe presentar idealmente una copia única o al menos debería desarrollarse como una región de copia única (por ejemplo, rADN, mtADN). El peligro de las regiones multicopia es que diferentes copias pueden ser comparados en diferentes especies (es decir, las comparaciones parálogos).
- La región debe tener la misma función en todos los taxones. La evolución de una nueva función cambia presiones de selección y por lo tanto altera la velocidad y el perfil de cambio de secuencia.
- El efecto de la composición de la base y el codón bias deben ser examinados. Ambos factores pueden distorsionar las estimaciones de divergencia.

1.4 ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE HONGOS FITOPATÓGENOS

La estructura genética de poblaciones, se refiere a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones (McDonald A., et al., 1989). El conocimiento de la estructura genética de poblaciones de los hongos fitopatógenos como una aplicación directa, es saber la cantidad de la variación genética que se mantiene dentro de una población, indicando que tan rápidamente un patógeno puede evolucionar y esta información podría ser usada para predecir que tan efectivo pueda ser un método de control. Por ejemplo, las poblaciones con un alto nivel de variabilidad genética pueden adaptarse más rápidamente a hospederos resistentes y/o fungicidas. Los estudios de mayor información han usado esquemas de muestreo jerárquico para fraccionar la diversidad genética dentro de varios niveles, correspondientes a diferentes escalas geográficas, cuya escala de muestreo podría ser tan pequeña, como diferentes aislamientos hechos de una sola lesión, en una hoja y tan grande como colecciones

hechas de diferentes regiones sobre el mismo continente o sobre diferentes continentes (McDonald A., et al., 1999).

Según McDonald A. y Linde C., (2002), la estructura genética de una población es la cantidad y distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones y es la consecuencia de la interacción entre cinco fuerzas que afectan la evolución, las cuales son: Mutación, Recombinación, Deriva genética, Flujo de genes y Selección natural; los cuales se describen a continuación.

1.4.1 Factores que influyen en la estructura genética de poblaciones

1.4.1.1 Mutación: La mutación es un factor importante como fuente de variación genética en las poblaciones de hongos fitopatógenos (McDonald A., et al., 1989), cuya causa se atribuye principalmente a la fase sexual, debido a que grandes cantidades de DNA repetitivo provocan la alteración de la meiosis y recombinación dentro de diferentes aislados. Aunque el rango de las mutaciones es generalmente bajo por locus, la mutación es persistente y sobre un tiempo genera mucha variabilidad que es preservada sobre todos los loci. Las mutaciones espontáneas de avirulencia hacia virulencia son bien reconocidas como un medio importante por el cual las poblaciones naturales de un amplio rango de hongos responden a cambios en las resistencias de las poblaciones de su hospedero.

1.4.1.2 Recombinación: La recombinación o el tipo de reproducción tanto sexual, asexual o una combinación de ambas, incrementa la diversidad genética en las poblaciones permitiendo la formación de nuevas combinaciones genéticas (McDonald A., et al., 1989). Los hongos fitopatógenos que se reproducen de forma sexual tienden a ser más diversos genéticamente que las poblaciones asexuales de la misma especie (Milgroom G., 1996).

En muchos casos, la reproducción asexual es baja, pero ocurre más frecuente que la sexual, por esta razón un número limitado de clones o líneas clonales son diseminados a través de un rango geográfico mundial, mientras que las poblaciones que se reproducen sexualmente pueden tener un potencial más evolutivo de largo plazo. Por esta razón las recombinaciones permiten mucho más combinaciones de alelos, mientras que las poblaciones asexuales son limitadas por la mutación que ocurre dentro de líneas clonales (McDonald A., et al., 1999).

La ausencia de recombinación sexual en muchas poblaciones podrían consistir de líneas propagadas clonalmente; sin embargo, en poblaciones donde la recombinación ocurre a través de procesos parasexuales se pueden formar rápidamente nuevas combinaciones de alelos virulentos (Phillips W., 2003).

1.4.1.3 Deriva genética: Es un proceso aleatorio, que lleva a una fijación de alelos y por lo tanto disminuye la cantidad de variación genética en una población. Los efectos de la deriva se acentúan más en poblaciones de tamaño pequeño (reducciones ocasionados por cuellos de botella o eventos fundadores, donde una población nueva se inicia a partir de un número pequeño de individuos). (Phillips W., 2003)

1.4.1.4 Flujo de genes: El flujo de genes se refiere a los mecanismos resultantes en el movimiento de genes de una población a otra, dando como resultado cambios debidos al movimiento de gametos y de individuos o grupos de individuos de un lugar a otro, seguido por la recolonización, o el movimiento de segmentos extranucleares de DNA tales como mitocondria, plásmidos, entre otros (Slatkin M., 1987). Por lo tanto, cuando ocurre un alto flujo de genes, facilita la similitud genética entre poblaciones, actualmente los marcadores de DNA se han utilizado para determinar el flujo de genes entre poblaciones de algunos hongos fitopatógenos (McDermott E. y McDonald A., 1993).

1.4.1.5 Selección Natural: La selección también llamada coevolución se ha definido como "cambios genéticos recíprocos que ocurren en dos o más especies que interactúan ecológicamente" (Slatkin M., 1985). Si la selección natural o coevolución, está presente en poblaciones de hongos fitopatógenos, es posible mantener altos niveles de flujo de genes.

La diferenciación poblacional, definida en términos de diferencias en la frecuencia de alelos dentro de subpoblaciones, puede ser causada por una selección y movimientos genéticos (Slatkin M., 1987), que pueden ocurrir en un gran número de propágulos de patógenos dispersados dentro de campos con diferentes cultivares. Esto genera que los patotipos incompatibles no podrían sobrevivir en poblaciones de hospederos resistentes y por lo tanto el flujo de genes podría ser mínimo (Milgroom M. y Lipari S., 1995), ya que la población de un hongo fitopatógeno es forzada a responder a cualquiera de los cambios hechos en las poblaciones de su hospedero de tal manera que la evolución de las poblaciones del patógeno refleja igualmente la evolución directa hecha por el hombre en el hospedero (McDonald A., et al., 1996).

La introducción de genotipos de hospederos conteniendo un gen mayor de resistencia fue una estrategia común (Vanderplank E., 1963) para mostrar que las poblaciones del patógeno experimentan un rápido incremento en la frecuencia de un gen de virulencia, causando que los genes de resistencia de las plantas pierdan su eficiencia (Staskawicz J., et al., 1995).

1.5 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS

Un requisito previo para el control de cualquier enfermedad es la detección e identificación apropiada del organismo causal. La detección de patógenos en plantas puede ser relativamente simple si se tiene extensa experiencia con el diagnóstico de la

enfermedad; pero cuando ocurre lo contrario se hace uso de técnicas capaces de detectar patógenos en los propágulos.

Antes del desarrollo de técnicas basadas en el ADN, las técnicas utilizadas para la identificación de hongos fitopatógenos era el aislamiento en medios de cultivo y pruebas de patogenicidad (Shaad W., et al., 2002).

1.5.1 Aislamiento y preparación de muestras

El aislamiento consiste en el proceso de separación de microorganismos a partir de su sustrato natural (plantas, hojas, tubérculos, tallo, raíces o suelo) para hacerlas crecer en un medio de cultivo artificial (por ejemplo medio PDA). El aislamiento y cultivo persigue diversos fines, el más común en un laboratorio de fitopatología es para diagnosticar la causa de una enfermedad desconocida. El cultivo de microorganismos tiene enormes ventajas que contribuyen al conocimiento de la biología de estos. Sin embargo, hay que considerar que al cultivar un organismo los hongos pueden o no formar cuerpos fructíferos en medios artificiales o de lo contrario existen hongos que no se pueden cultivar (parásitos obligados) y otros que requieren medios complejos para su desarrollo. El aislamiento en un medio de cultivo es todavía un paso indispensable en los métodos de detección y caracterización de hongos.

En general, las muestras antes de un análisis son lavadas y ligeramente desinfectadas. El material vegetal puede ser aislado mediante la técnica de cámara húmeda o también pueden colocarse fragmentos de tejidos infectados sobre los medios de cultivo. El medio de cultivo debe aportar todos los elementos necesarios para que los microorganismos puedan desarrollarse, así como también agentes selectivos que eliminen gran parte de la microbiota acompañante (Flores A., 1997).

1.5.1.1 Empleo de medios selectivos

Mediante el empleo de medios selectivos se puede realizar una determinación cuantitativa de población. Algunos medios selectivos se basan en las posibilidades de los hongos de utilizar sustratos específicos. Otros medios se basan en la tolerancia del patógeno a cierto número de antibióticos, fungicidas o bactericidas que los microorganismos saprófitos no toleran o no soportan en determinadas concentraciones. La presencia o ausencia de crecimiento y el color de las colonias son aspectos importantes que permiten distinguir fácilmente al patógeno correspondiente.

1.5.2 Técnicas de caracterización

Caracterización macroscópica; el cual se basa en la observación de síntomas. Es muy importante el conocimiento de las variables que inciden en la enfermedad, como por ejemplo el cultivo a investigar, el suelo, clima, patógeno.

Caracterización microscópica; para el caso de hongos fitopatógenos esta observación puede ser directamente al microscopio de luz; es necesario la observación de sus estructuras somáticas y reproductivas como esporas o conidios. La observación de las características de las estructuras producidas y el uso de claves taxonómicas son necesarios para determinar el género y la especie del hongo patógeno.

1.6 TÉCNICA MOLECULAR USADA PARA ANÁLISIS GENÉTICO DE HONGOS

Los estudios sobre la biología y genética en los hongos fitopatógenos se han basado en el análisis de sus características morfológicas, bioquímicas y aloenzimas. Sin embargo, estos métodos han demostrado ser insuficientes (Weising K., et al., 1995), en años recientes, la introducción de las técnicas de hibridación de DNA y las que se basan en la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han usado para tener un diagnóstico muy preciso de las enfermedades causadas por hongos (Henson M. y French R., 1993), para la identificación y taxonomía, la determinación de los modos reproductivos de hongos asexuales (Taylor W., et al., 2000) y su sistemática (Bruns D., et al., 1995). Sin embargo, una de las herramientas disponibles para hacer estudios sobre la genética de las poblaciones de los patógenos son los marcadores de DNA (McDonald A., 2002), estos son las características de uno o mas loci del genoma en estudio, cuya variación es detectable por métodos analíticos (Staub E., et al., 1996).

1.6.1 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye un importante paso en la Biología Molecular (Mullis K., et al., 1986). Esta técnica, basada en la síntesis enzimática de secuencias de ADN comprendidas entre unos oligonucleótidos que actúan como cebadores, permiten amplificar el número de copias de dichas secuencias hasta un nivel visualizable en electroforesis, sin necesidad del empleo de marcadores radioactivos. Es un proceso simple en el que el ADN genómico se desnaturaliza (90-95°C) y se une a un par de oligonucleótidos específicos que suministra extremos 3'-OH a una polimerasa termoestable capaz de replicar el segmento de ADN comprendido entre las secuencias diana de los oligonucleótidos. Esta técnica ha abierto nuevas perspectivas en los estudios poblacionales pues permite amplificar genes, tanto nucleares como mitocondriales, y facilitar así su posterior comparación y secuenciación.

1.6.2 AFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados)

1.6.2.1 Consideraciones generales

AFLP es un análisis de ADN de gran alcance descrito originalmente por Vos P., et al., (1995), que se diferencia de otras técnicas al azar por su robustez y reproducibilidad. La

característica clave del AFLP es su capacidad para la detección simultánea de muchas regiones diferentes de ADN distribuidas al azar en todo el genoma (Mueller J. y Wolfenbarger L., 1999). El análisis se puede aplicar al ADN de cualquier origen o complejidad (Vos P. y Kuiper M., 1998) produciendo un gran número de bandas muy claras de la que hasta el 10% pueden ser polimórficas con patrones reproductivos (Duncan M., et al., 1998).

La técnica de AFLP tiene muchas de las características de un sistema ideal para la detección de la variación genética: la variabilidad se evalúa en un gran número de locis independientes, los marcadores gerados por AFLP son generalmente "neutros" (es decir, no están sujetos a la selección natural) y son extremadamente reproducibles, la variación se revela sobre todo el genoma y los datos se obtienen muy rápidamente (Majer D., et al., 1996). Por otra parte, la relativa facilidad de aplicación, genera gran número de polimorfismos, se requiere una pequeña cantidad de ADN genómico, y la alta reproducibilidad de los perfiles de banda generadas hacen de la técnica AFLP un método atractivo para estudiar la variación entre los genomas de taxones estrechamente relacionados (Innan H., et al., 1999). Otras ventajas de la técnica se mencionan por Mueller J. y Wolfenbarger L., (1999):

- **Ámbito taxonómico:** Marcadores generados por AFLP se pueden obtener con el ADN para cualquier organismo, y no se necesita conocimiento previo acerca de la composición genómico del organismo. Por lo tanto, los AFLP tienen amplia aplicación taxonómica y se han utilizado con eficacia en una variedad de taxones, incluyendo bacterias, hongos, animales y plantas.
- **Niveles de error:** Las amplificaciones de AFLP se realizan bajo condiciones de alta selectividad (alto rigor), eliminando así la variación de artefactos que se ve de forma rutinaria en RAPD-PCR. Repetidas amplificaciones de AFLP muestran casi replicabilidad perfecta y los errores en general (incluyendo mispriming y error de puntuación) representan menos del 2%.

- **Cantidad de tejido o ADN:** AFLP requiere una cantidad mínima de ADN y se puede utilizar muestras parcialmente degradadas. Por lo tanto, las muestras muy pequeñas y los organismos muy pequeños pueden ser examinadas usando esta técnica.
- **Aprovechamiento del tiempo:** La técnica de AFLP se pueden generar a gran velocidad.
- **Herencia mendeliana:** Marcadores generados por AFLP segregan de manera mendeliana y así se puede utilizar para aplicaciones basadas en mapas.
- **Resolución:** Utilizando una serie de diferentes combinaciones de cebadores, se pueden obtener un número casi ilimitado de marcadores generados por AFLP, donde al menos algunos marcadores se encontraran en regiones variables y por lo tanto revelaran diferencias genéticas dentro de cualquier grupo de organismos.

Aunque esta técnica no es una panacea para todos los problemas moleculares en ecología y evolución, esta técnica ofrece muchas ventajas, por lo que probablemente reemplazará varias técnicas estándar (Mueller J. y Wolfenbarger L., 1999). Los AFLPs generan marcadores dominantes pero recientemente se han debatido refinamientos técnicos para distinguir los genotipos homocigotos y heterocigotos (Vos P. y Kuiper M., 1998).

1.6.2.2 Descripción del análisis AFLP

La técnica comprende las siguientes etapas (Vos P. y Kuiper M., 1998) que se muestran en la Figura N°16.

- **Digestión:** el ADN se digiere con dos enzimas de restricción. La combinación óptima de enzimas es aquella formada por uno de corte frecuente, con el que se

obtiene un gran número de fragmentos pequeños de ADN de tamaño adecuado para su posterior amplificación y otro de corte poco frecuente, el cual reducirá el número final de fragmentos amplificados, ya que solo se amplificará aquellos cortados por ambas enzimas. La combinación más utilizada es la formada por *EcoRI*, enzima de corte en la secuencia de 6 nucleótidos G ↓ AATTC, y *MseI*, que reconoce la secuencia de 4 nucleótidos T ↓ TAA.

- **Ligación:** una vez digerido el ADN, este se liga a unos adaptadores específicos a las enzimas de restricción. Estos adaptadores son de doble cadena y están diseñados de manera que en sus extremos contienen una región específica a la diana de restricción de la enzima, por donde se unirán a los fragmentos de ADN digeridos, y que a su vez impedirán que los fragmentos que se vayan ligando sean digeridos nuevamente por las enzimas que continuarán activos durante el proceso de ligación.
- **Amplificación:** para la amplificación de los fragmentos digeridos y ligados se utilizan dos cebadores complementarios a cada uno de los adaptadores. En genomas grandes como los de los organismos eucariotas, la amplificación suele tener lugar en dos pasos. Primero se realiza una amplificación, llamada pre selectiva en la que a cada cebador se le ha añadido un nucleótido adicional selectivo. Posteriormente, el producto de la PCR vuelve a amplificarse (amplificación selectiva) con cebadores que tienen la misma secuencia y a los que se le han añadido varios (habitualmente entre 1 o 3) nucleótidos a continuación del primer nucleótido selectivo.
- **Análisis del perfil de amplicón:** Para este propósito, los productos de reacción se separan por electroforesis a través de geles desnaturalizantes de poliacrilamida (PAGE) o en un capilar. Después de la electroforesis, los geles son teñidos con plata o expuesto a películas radiográficas para visualizar las huellas de AFLP. Diferencias de un solo nucleótido entre los fragmentos AFLP también pueden ser

resueltos con la ayuda de secuenciador automático, pero estos métodos de alta resolución requieren capacitación y algunos costos en la configuración del laboratorio. También es posible analizar marcadores AFLP con electroforesis en gel de agarosa, es técnicamente más simple pero a pesar de la simplicidad es comprado a costa de una menor resolución (Mueller J. y Wolfenbarger L., 1999).

1.6.2.3 Ventajas y desventajas de la técnica

- **Ventajas:** Los AFLPs permiten una exploración rápida de los polimorfismos del genoma entero puesto que se genera un gran número de bandas, cada marcador da una huella identificadora de ADN sumamente informativa. Además son también altamente reproducibles, no se necesita información previa de las secuencias ni hay que generar sondas de hibridación y es una técnica muy útil para crear mapas genéticos en forma rápida; esta técnica permite la generación de “perfiles de transcripción”.
- **Desventajas:** La principal desventaja de los AFLPs es la dificultad en la identificación de marcadores homólogos (alelos), lo que hace este método menos útil para los estudios que requieren la asignación precisa de los estados alélicos (Majer D. et al., 1996; Mueller J. y Wolfenbarger L., 1999). Los AFLPs generan cantidades enormes de información, por lo que pueden requerir un análisis automatizado y por consiguiente, tecnología de computación adecuada. Son de tipo dominante, en los mapas genéticos los AFLPs se agrupan con frecuencia en los centrómeros y telómeros, además requieren bastante técnica en el laboratorio y especialmente en el análisis de los datos.

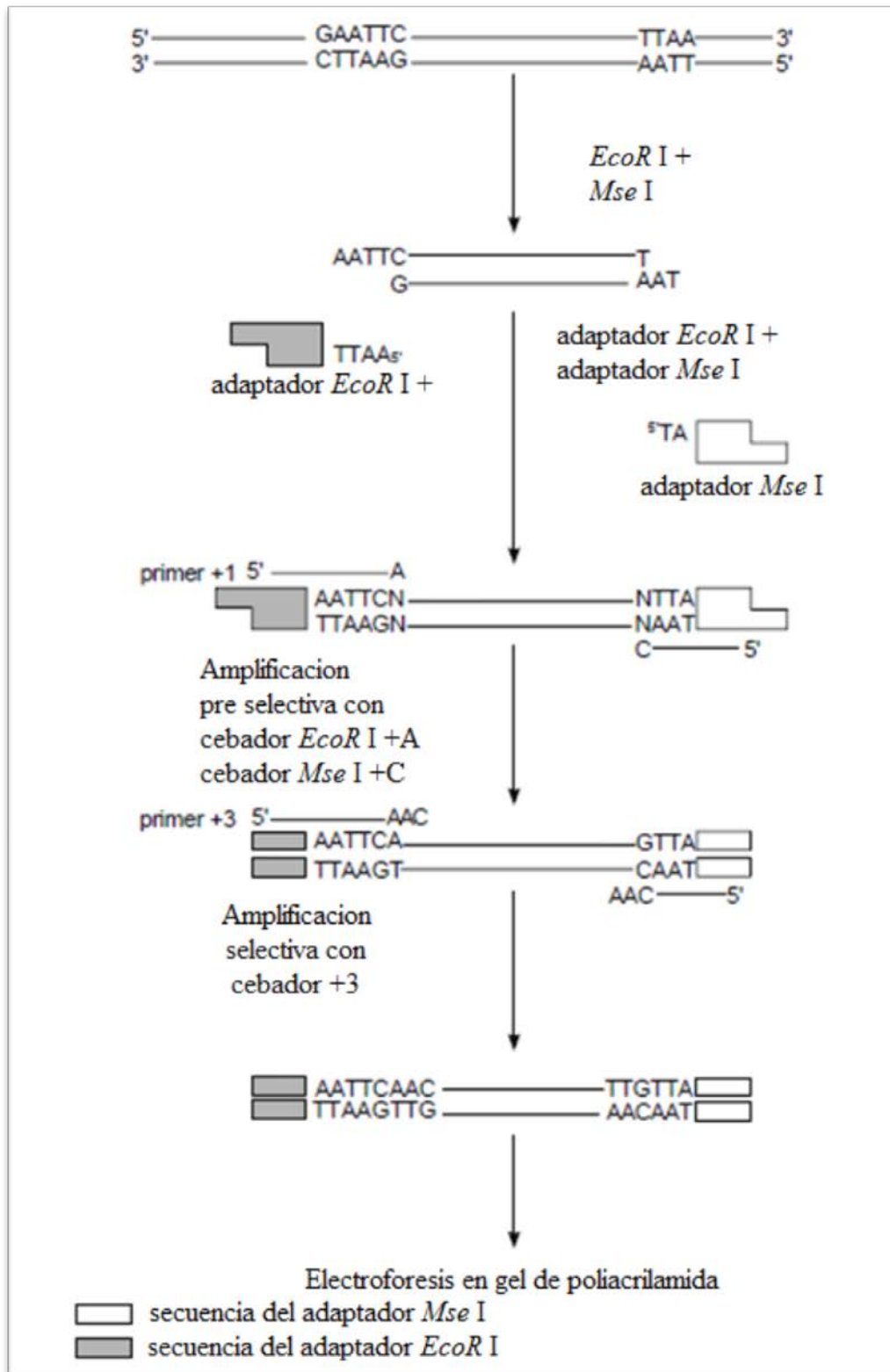


Figura N° 16. Esquema del procedimiento de la técnica AFLP. Fuente: GIBCO BRL.

1.6.2.4 Aplicaciones de la técnica de AFLP en micología

Esta técnica representa una manera relativamente barata y eficaz para investigar varios aspectos de la biología molecular de hongos y la diversidad genética (Majer D. et al., 1996). La técnica ha demostrado ser un análisis fiable y de gran alcance en una variedad de aplicaciones, incluyendo fingerprinting y la identificación de aislados fúngicos (Mueller J., et al., 1996), los estudios de variación genética intraespecífica (Majer D., et al., 1996) e incluso la estimación de relaciones filogenéticas (Tredway P., et al., 1999).

Se ha demostrado en varios estudios la capacidad de los marcadores generados por la técnica AFLP para estudiar pequeñas diferencias genéticas. Por ejemplo, Mueller J., et al., (1996) encontraron que la técnica AFLP fue muy eficiente en la detección de polimorfismo en especies analizadas con RFLP en las que se encontró muy poca variación.

Algunas aplicaciones generales de esta técnica se resumen por Mueller J. y Wolfenbarger L., (1999) de la siguiente manera:

- **Evaluación sistemática, patotipificación y biodiversidad:** los marcadores generados por AFLP se han utilizado para descubrir la variación genética críptica de cepas o especies muy relacionadas entre una amplia gama de grupos taxonómicos más amplios, incluyendo plantas, animales, hongos y bacterias. También se han utilizado para inferir las relaciones genéticas de especies estrechamente relacionadas sobre la base de mediciones de distancia genética. En los niveles superiores taxonómicos, filogenéticos y las inferencias genéticas basadas en similitudes de los perfiles AFLP vuelto problemática, en gran parte debido a la alta variabilidad de los marcadores generados por AFLP.
- **Población y genética de la conservación:** los marcadores generados por AFLP han encontrado la más amplia aplicación en los análisis de la variación genética

por debajo del nivel de especie y ha demostrado ser especialmente populares en las investigaciones de la estructura de la población y la diferenciación. Estos marcadores se han aplicado para evaluar el flujo de genes y la dispersión, polinización cruzada, introgresión y casos de hibridación. Su alta resolución permiten hacer pruebas de identidad clonal entre individuos (es decir, ausencia de recombinación), y por lo tanto permiten hacer inferencias sobre los modos sexuales frente de la reproducción asexual.

- **AFLP fingerprinting y parentesco:** estos marcadores tienen el potencial de resolver las diferencias genéticas para la identificación individual y el análisis de parentesco. En un caso ideal, unas pocas combinaciones de cebadores serán suficientes para generar un número adecuado de marcadores polimórficos. En el peor de los casos, muchos marcadores tienen que ser generados con una serie de combinaciones de cebadores para revelar diferencias entre individuos estrechamente relacionados o líneas cosanguíneas, o para confirmar la falta de diferencias por clonalidad. Sin embargo, todavía no está claro cuántos marcadores se deben generar para asegurar una representación significativa de loci hipervariables y al perfil de un individuo en el nivel de una verdadera toma de ADN fingerprinting. Esto es crucial para la identificación inequívoca de los individuos idénticos por clonación, donde un número insuficiente de los fragmentos podría no distinguir las diferencias genéticas existentes, y por lo tanto conducen a una conclusión incorrecta de la identidad clonal y la reproducción asexual

II. MATERIALES Y METODOS

2.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS HONGOS

Algunas enfermedades que atacan a las plantas se diagnostican al observarlas a simple vista o mediante el microscopio, lo cual hace innecesario el aislamiento del patógeno. Sin embargo, en muchas enfermedades fungosas con impacto económico, es imposible identificar al patógeno por que estas se encuentran mezcladas con uno o más contaminantes, debido a que estos no han producido sus cuerpos fructíferos característicos y esporas, o bien la enfermedad es causada por un patógeno desconocido, el cual con mayor razón conlleva a su aislamiento y estudio. Por tal motivo, los patógenos que ocasionan enfermedades deben aislarse de los tejidos enfermos de una planta, con el propósito de que se pueda llevar a cabo un estudio detallado de sus características y hábitos a fin de su identificación.

2.1.1 Zona de trabajo

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Fitopatología y Biotecnología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) en la Estación Experimental Juan Bernito localizado en el distrito de la Banda de Shilcayo, Tarapoto, departamento de San Martín.

2.1.2 Muestreo de material vegetal infectado

El material vegetal infectado fue recolectado entre los meses de Marzo y Mayo del 2012, por trabajadores del Instituto de Cultivos Tropicales; Programa de Extensión Agrícola; los cuales recolectaron tallos y mazorcas de cacao que presentaban síntomas de las enfermedades moniliasis y escoba de bruja de seis zonas productoras de cacao del Perú (Tocache, Mariscal Cáceres, Tarapoto, Leoncio Prado, Vrae, San Ignacio).



Figura N° 17. Mazorca y tallo de cacao recolectado en campo, mostrando síntomas típicos de las enfermedades moniliasis (A) y escoba de bruja (B).

2.1.3 Aislamiento de los hongos

El trabajo de aislamiento se realizó utilizando protocolos de cámara húmeda estandarizados por el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT, 2012).

2.1.3.1 Protocolo para aislamiento del hongo *Moniliophthora roreri*

- Las mazorcas recolectadas en campo se lavaron con agua de caño.
- Se colocaron en hipoclorito de sodio al 2% para su desinfección por 5 minutos.
- Transcurridos los 5 minutos, la mazorca se enjuagó con agua destilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito.
- Se llevó a la cámara de flujo laminar (Pachane) procediendo al secado de la mazorca.
- Transcurrido aproximadamente 30 minutos del secado se hizo cortes en rodajas y se colocaron en placas Petri asegurando con parafilm.
- Las placas se conservaron al medio ambiente hasta la formación del micelio.

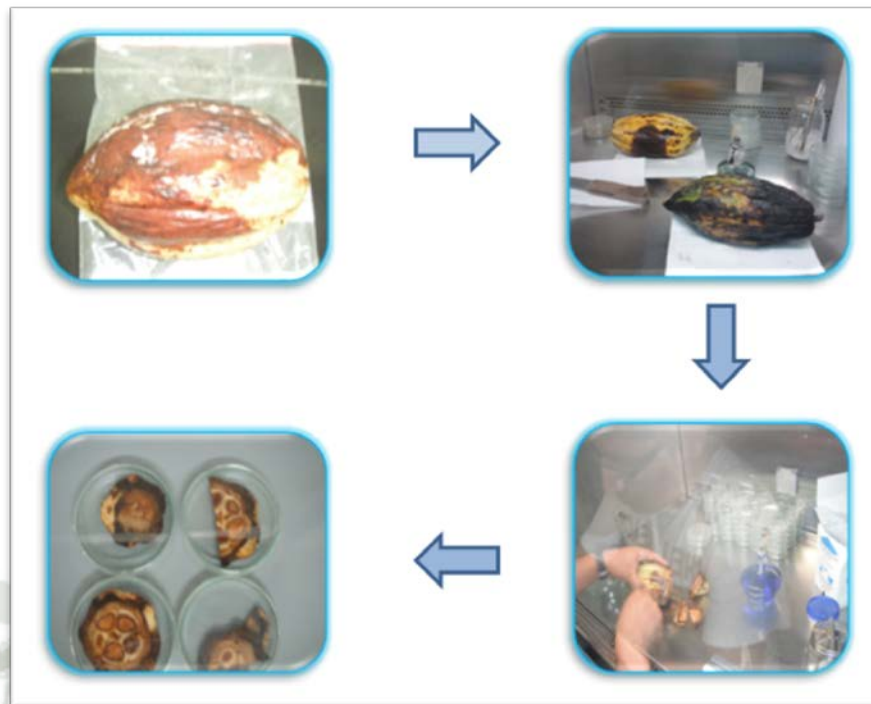


Figura N° 18. Procedimiento para la obtención de aislamientos puros de *M. roreri*. Fuente: Elaboración propia.

2.1.3.2 Protocolo para aislamiento del hongo *Moniliophthora perniciosa*

- Se acondicionó la cámara húmeda con 400 gr. de arena estéril y 80 ml de agua destilada estéril encima se colocó dos capas de papel filtro esterilizados para evitar el contacto de la muestra con la arena.
- Por otro lado se cortaron tallos de aproximadamente 4 cm. de largo y se dejaron sumergidos con agua destilada estéril.
- Transcurrido 30 minutos, los tallos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% por 5 minutos.
- Se lavo con agua destilada estéril asegurandose de eliminar todo los residuos del hipoclorito de sodio.

- Se colocaron los tallos en las cámaras ya acondicionadas, se aseguró con parafilm y se dejó en un recipiente de plástico cerrado con agua destilada estéril al medio ambiente.



Figura N° 19. Cámara húmeda utilizada para la extracción del hongo *M. perniciosa*. Fuente: Elaboración propia.

2.1.4 Siembra de la muestra

Para la purificación y caracterización de los aislados, se efectuaron pruebas de crecimiento en distintos medios de cultivo para cada especie.

Para la purificación de los aislados se transfirió una muestra de micelio con ayuda de un bisturí y se sembró en placas Petri (pyrex 10 ml.) conteniendo medio PDA modificado + penicilina/eritromicina 2 gr/L., las placas fueron colocadas en un recipiente de plástico cerrado a temperatura ambiente. Para la caracterización se procedió a sembrar en medios selectivos siendo así que para el caso del hongo *M. roreri* se sembró en medio a base de cacao IMC – 67 y para el hongo *M. pernicioso* se utilizó el medio extracto de levadura ICT (2012) (Anexo N°1).

2.1.5 Caracterización morfológica de los hongos

2.1.5.1 Análisis macroscópico

Se realizó por medio de observación directa y se evaluaron periódicamente las cepas como el color y borde de la colonia, tipo de micelio; pudiendo distinguir las características morfológicas del crecimiento del hongo.

2.1.5.2 Análisis microscópico

Este análisis se hizo con la finalidad de identificar las estructuras propias de dichos hongos.

Técnica de la cinta adhesiva

- Se colocó una gota de azul de lactofenol sobre el porta objeto.
- Luego se corto un pedazo de cinta y se paso por encima del micelio del hongo de modo de recoger la muestra.
- Se pegó sobre el porta objeto que contiene la gota de azul de lactofenol.
- Por ultimo se observo al microscopio (Olympus).

2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO

La extracción de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de Biología Molecular y de todas las técnicas basadas en el ADN. Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos del resto de células contaminantes, para ello se realizan diferentes procedimientos de purificación como por ejemplo extracción/precipitación, cromatografía, centrifugación y separación por afinidad. La cuantificación de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparandolo con un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un “cociente”; dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. La calidad de las muestras extraídas se pueden visualizar en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, el cual se intercala entre las cadenas de ADN y fluoresce al ser expuesto a una fuente de luz UV.

2.2.1 Producción de micelio en medio líquido

Para el crecimiento de los hongos en medio líquido se utilizó caldo PS (Nanda K., et al., 2001). Una vez esterilizado el medio de cultivo se colocaron dentro de la cámara de flujo laminar (Pachane) y se colocó 5 discos de medio conteniendo micelio que fueron cortados con un sacabocado de 5 mm. de diámetro, los medios permanecieron en un agitador (Barnstead Labline) a 110 rpm a temperatura ambiente por un periodo de 15 días o hasta la formación de micelio suficiente para realizar la extracción de DNA.

2.2.2 Extracción de DNA genómico

La extracción se realizó utilizando el Kit Archive Pure DNA Cell/Tissue – 4g (5Prime) con una ligera modificación en el paso de lisis celular.

- **Lisis celular:** Se colocó en un tubo de extracción de 1.5 ml 0,2 gr. de micelio del hongo que contenía 0,1266 gr. de arena esterilizada y una perla acrílica de 5 mm de diámetro. Se agregó al tubo de extracción 300 μ l de “Cell Lysis Solution” y se llevó al fast prep (Bio 101 Savant FP-120) por 40 segundos. Inmediatamente se colocó la muestra a 65 °C en baño maría (Mettler Wb 07) por tres horas como mínimo, invirtiendo periódicamente el tubo durante la incubación. En este periodo se agregó 3 μ l de Proteinasa K (Fermenta).
- **Precipitación de Proteínas:** Se agregó 100 μ l de “Protein Precipitation Solution”, se hizo un vortex (Labnet VX 100) por 20 segundos y se llevó a la centrifuga (Hettich Micro 22R) a 10 000 rpm por 10 minutos.
- **Precipitación del DNA:** El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo nuevo y se agregó igual volumen de isopropanol; después de invertir el tubo varias veces se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar sobre papel toalla. Luego se lavó el pellet con 300 μ l de etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar en la incubadora (Mettler) toda la noche a temperatura ambiente.
- **Hidratación de DNA:** El DNA seco se diluyó agregando 200 μ l de “DNA Hydration Solution” y se llevó a baño maría (Mettler Wb 07) a 65 °C hasta su disolución.

- **Tratamiento con RNAsa:** Se agregó 3 µl de RNAsa (Fermenta) y se llevó a 37 °C en baño maria.

2.2.3 Cuantificación del DNA

Para cuantificar y determinar la pureza del DNA se leyó en el espectrofotómetro (Thermo Scientiest UV Vis Genesys) a una longitud de onda de 260 y 280 nm utilizando una dilución 1:100 (10 µl de muestra con 990 µl de agua molecular estéril). Estos datos se utilizaron para calcular la pureza y la concentración del DNA (ng/µl) a partir de las siguientes fórmulas:

$$Pureza = \frac{A_{260}}{A_{280}} \dots \dots \dots (Fórmula N^{\circ} 1)$$

$$Conc. = A_{260} \times 50 \times Factor \ de \ dilucion \dots \dots \dots (Fórmula N^{\circ} 2)$$

La calidad del DNA extraído fue evaluado en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.02 µl ml⁻¹) se cargó 10 µl de la muestra con 2 µl de tampón de carga azul de bromofenol y se corrió en una cámara electroforética horizontal (Phero Sub 2632E) a 90 v. por una hora utilizando TBE 1X como tampón de corrida.

2.3 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AFLP EN TODOS LOS AISLADOS

La técnica de AFLP se basa en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción de ADN en condiciones de PCR estrictas (Kardolus P. et al., 1998). El ADN se prepara de una manera ingeniosa pero técnicamente sencilla que combina la fiabilidad de los análisis de los fragmentos de restricción y la potencia de la PCR (Mueller J. y Wolfenbarger L., 1999).

La técnica de AFLP se realizó según protocolo del Instituto de Biotecnología (IBT, 2010) de la UNALM. Este protocolo consta de 4 pasos (Vos P., et al. 1995).

2.3.1 Digestión del DNA genómico

Para la digestión del DNA genómico se usó dos enzimas de restricción EcoRI y MseI (una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente). La reacción se hizo en tubos de PCR que contenía 10 µl DNA (50 ng/µl), 1 µl EcoRI, 0.5 µl MseI, 2 µl de Buffer Fast Digest 10X y 6.5 µl de agua molecular estéril, seguidamente se incubó (Mettler) por 2 horas a 37°C.

2.3.2 Ligación con los adaptadores

La ligación de adaptadores de doble cadena a los extremos de los fragmentos de restricción se realizó inmediatamente añadiendo al mismo tubo 0.4 µl T4 DNA Ligasa, 1 µl de Adaptador EcoRI, 1.25 µl Adaptador MseI y 2.5 µl de Buffer ligasa. La reacción de ligación se realizó a 16 °C por 4 horas.

2.3.3 Reacción de pre amplificación (+1/+1)

La preamplificación se realizó en tubos de PCR conteniendo 5 µl de mezcla de Digestion-Ligación 1:5, 8.5 µl de cada Preamplificador EcoRI y MseI 10 mM, 2.5 µl de Buffer PCR 10X (Fermentas), 0.2 µl Taq DNA polimerasa (Fermentas), 1.25 µl de DNTP mix (dATP, dCTP, dGTP and dTTP Fermentas), 0.6 µl de Cloruro de magnesio 50 mM y 13.4 µl de agua molecular estéril. El termociclador (Nxy technic Amplitronyx 6 gradiente) fue ajustado al siguiente programa: 2 min a 72°C, 4 min a 94°C, 22 ciclos (30 s a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C), 5 min a 72°C y luego la temperatura de la muestra fue reducida a 4°C.

2.3.4 Amplificación selectiva (+3/+3)

La amplificación selectiva se realizó en tubos de PCR conteniendo 2 µl del producto de la preamplificación 1:4, 2 µl EcoRI (50ng/ µl), 0.3 µl MseI (50ng/ µl), 1.1 µl de Buffer PCR 10X (Fermentas), 0.15 µl Taq DNA polimerasa (Fermentas), 0.6 de DNTP mix

(dATP, dCTP, dGTP and dTTP Fermentas), 0.6 µl de Cloruro de magnesio 50 mM, 3.25 µl de agua molecular estéril y 5 µl de aceite natural.

Las condiciones de PCR que se muestran en la Tabla N°1 se aplicó para realizar la amplificación selectiva usando el termociclador Nxy technic Amplitronyx 6 gradiente.

Tabla N° 1. Programa PCR usado para la amplificación de AFLP selectiva.

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	94	4 min.
2	94	20 s.
3	65	30 s.
4	72	2 min.
5	94	20 s.
6	65	30 s. bajando 1°C por ciclo
7	72	2 min
8	Repetir desde el paso 5 al 7 (10 ciclos)	
9	94	20 s.
10	56	30 s.
11	72	2 min.
12	Repetir desde el paso 9 al 11 (20 ciclos)	
13	60	30 min.
14	4	Hold

2.3.5 Preparación de la muestra

Los productos de la amplificación selectiva (10 µl) se mezclaron con 2 µl de tampón de carga azul de bromofenol y se realizó una desnaturalización de la muestra (5 min a 95°C) para luego cargar 4 µl de muestra en el gel de poliacrilamida.

2.3.6 Preparación de las placas de vidrio

- Se limpió las placas de vidrio con alcohol.
- Mientras se dejó secando las placas de vidrio, en un tubo de microcentrifuga se preparó la solución de adhesión mezclando 7.5 μ l de Bind silane, 7.5 μ l de ácido acético glacial y 1.5 ml. de alcohol al 95%.
- La solución de adhesión se esparció sobre toda la placa de vidrio pequeña con ayuda de un pañuelo de papel.
- Por otro lado sobre la placa de vidrio grande usando un pañuelo de papel se esparció la solución repelente lluviex (Simoniz).
- Se dejó secar las placas de vidrio por espacio de 30 min.
- Antes de ensamblar los vidrios se removió las partículas de polvo usando el mismo tipo de pañuelo.
- Para el ensamblaje de los vidrios se colocó los espaciadores laterales sobre la placa de vidrio grande y sobre ella se colocó la placa de vidrio pequeña de modo que los lados tratados quedaron frente a frente.
- Se aseguró los lados con abrazaderas metálicas en los puntos medios de modo que ejercieran igual presión en ambos lados.
- Probamos el peine adecuado (de grosor preciso) en la parte superior del sistema.

2.3.7 Preparación del gel de poliacrilamida 10%

- Se tomó un volumen de 60 ml. de solución de Acrilamida, se adicionó 380 μ l de Persulfato de amonio y 38 μ l de Temed.
- Se vertió la solución del gel a la placa ensamblada por una esquina de manera continua para evitar la formación de burbujas.
- Se colocó el peine probado anteriormente
- Se dejó secar el gel por espacio de tres horas

2.3.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida

- Se retiraron las abrazaderas del vidrio ensamblado y se lavó los residuos de poliacrilamida, se colocó las placas de vidrios en la cámara de electroforesis

vertical Electronyx LFV I 20 x 50cm (nyxtechnik inc.) y se agregó los buffers de corrida (1X arriba y 0.5X abajo), con ayuda de una pipeta se sacó las burbujas formadas al momento de agregar el buffer superior.

- Una vez limpio los pozos se hizo la precorrida a 400 V por 20 min.
- Transcurrido el tiempo de precorrida del gel, se cargó 4 μ l de las muestras ya desnaturalizadas y a ambos lados del gel un marcador de peso molecular: GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus (Fermenta), el tiempo de la electroforesis duró 15 horas a 360 V.

2.3.9 Tinción y revelado del gel de poliacrilamida

- **Fijación del gel:** para la fijación del gel se preparó 1 litro de solución que contenía 5 ml. de ácido acético y 100 ml. de alcohol puro; se vertió en un recipiente y se colocó dentro la placa de vidrio que contenía el gel, manteniéndose en agitación por 30 min. Luego la placa de vidrio se lavó tres veces con agua destilada por el lado no tratado.
- **Tinción del gel:** la placa de vidrio fue puesto en otro recipiente con 1 litro de solución de tinción que contenía 2 gr. de nitrato de plata. La reacción se da en oscuridad y duró 30 minutos en agitación constante. Transcurrido el tiempo la placa de vidrio se lavó tres veces con agua destilada por el lado no tratado.
- **Revelado del gel:** la placa de vidrio fue puesto en un recipiente con 0.8 Litros de solución de revelado que contenía 24 gr. de hidróxido de sodio y 5 ml. de formaldehído. En este paso la agitación fue hasta que las bandas aparecieran bien teñidas. Se lavó la placa de vidrio y se colocó en el recipiente que contenía la solución de fijación por 5 min. para parar la reacción.

2.4 ANÁLISIS DE DATOS

Las metodologías para el análisis estadístico de los datos generados a partir de marcadores moleculares son variadas y permiten hacer múltiples análisis. Uno de ellos es agrupar individuos de acuerdo con la presencia o ausencia de marcadores moleculares utilizando análisis de conglomerados. Otra forma es estudiando la estructura poblacional del patógeno que nos permite identificar el proceso evolutivo de una población, identificando al patógeno con mayor potencial de evolución y por lo tanto con mayor facilidad de escapar a los efectos de resistencia de las plantas o evolucionar para contrarrestar otros métodos de control como la aplicación de fungicidas. Esta información finalmente establecerá criterios racionales que permitan explicar la variabilidad de la especie en estudio; no obstante, los resultados del análisis de datos son solo una estimación de la variabilidad total de la especie.

2.4.1 Registro de datos

Se creó una matriz binaria en una hoja de Excel directamente a partir de los gels fotografiados con una cámara digital (Lumix Panasonic). Después de ser revelados se realizó el trabajo de escoreo asignando los valores de presencia (1) y ausencia (0) a cada banda de ADN. A los fragmentos con tenue amplificación, se les asignó un valor de 9, consignándolos como datos perdidos.

2.4.2 Determinación del Índice de contenido polimórfico (PIC)

Es un parámetro frecuentemente utilizado para medir la capacidad discriminatoria de los loci. Existen varias ecuaciones matemáticas que lo definen y en todas ellas su intervalo teórico varía entre 0.01 y 0.50. En este estudio para conocer la utilidad de los marcadores moleculares se calculó el índice de contenido polimórfico (PIC) utilizando la siguiente fórmula (Ghislain M., et al., 1999):

		Aislamiento j	
		1	0
Aislamiento i	1	a	b
	0	c	d

Para obtener la matriz de similitud se recurren a diferentes coeficientes de asociación (o coeficientes de similitud). Crisci J. y López M., (1983) reportaron que el coeficiente Jaccard y el coeficiente Dice son los más utilizados con datos moleculares. Estos coeficientes no consideran a d (0,0) como elemento a favor de la similitud.

El coeficiente Dice llamado también de Sorensen o Nei-Li (Crisci J. y López M., 1983; De Vicente C., et al., 2004) confiere peso duplicado a los valores de bandas compartidas entre ambos genotipos. Los valores de similitud generados por ambos coeficientes varían desde 0 hasta 1, que equivalen a los valores de mínima y máxima similitud, respectivamente.

$$Jaccard = \frac{a_{(1,1)}}{a_{(1,1)} + b_{(1,0)} + c_{(0,1)}} \quad Dice = \frac{2a_{(1,1)}}{2a_{(1,1)} + b_{(1,0)} + c_{(0,1)}} \dots \dots F\acute{o}rmula N^{\circ}4$$

Luego, se ordenaron estas comparaciones uno a uno entre las aislamientos, y se generó una Matriz de Similitud. Obtenida ésta, se llevó a cabo un agrupamiento UPGMA, que es un algoritmo jerárquico que agrupa a los taxones en grupos similares, teniendo en cuenta las distancias geométricas entre aislamientos. El resultado de este procedimiento se grafica en un dendograma o árbol fenético. (Chia J., 2009)

Finalmente, se comprobó la independencia de ambas matrices y el nivel de confianza, realizando una validación interna (De Vicente C., et al., 2004), determinando el coeficiente de correlación cofenética (r). El criterio de elección del coeficiente de

similitud se baso en determinar el mayor valor del coeficiente de correlación cofenética (r) según las siguientes premisas (Sokal R. y Rohlf F., 1962):

$$r < 0.8, \text{ mala correspondencia}$$

$$0.8 \leq r \leq 0.9, \text{ buena correspondencia}$$

$$r > 0.9, \text{ muy buena correspondencia}$$

2.4.4 Análisis de la variabilidad poblacional

Se realizó el análisis poblacional utilizando el software Popgene versión 1.32, y por el cual se estimaron los siguientes parámetros:

- Porcentaje de Loci polimórficos dentro y entre las poblaciones (**%PPL**) que se halla a partir de la siguiente fórmula:

$$\%PPL = \frac{\text{número de loci polimorficos}}{\text{número total de loci}} \times 100 \dots \dots \dots \text{Fórmula N}^\circ 5$$

- Número de alelos observados (**na**) cuenta el número de alelos con una frecuencia diferente de cero.
- Número efectivo de alelos (**ne**) el cual cuantifica el tamaño de la población ideal en el que la varianza de la frecuencia alélica se mantendrá constante, este valor es muy importante para trazar limites de conservación ya que este influye en la tasa de pérdida de la heterocigosidad en generaciones futuras.
- Diversidad Genética de Nei (**h**) conocida como Heterocigosidad esperada. Es la probabilidad de que en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí.

- Coeficiente de diferenciación genética (**Gst**) que estima la proporción de la variabilidad total observada debida a la variación entre poblaciones.

Cuando el valor de G_{st} es:

> 0.5: se concluye que los individuos son más diversos entre cada grupo que dentro de un mismo grupo.

< 0.5: se concluye que los individuos son más diversos dentro de un mismo grupo que entre grupos (Enríquez A., 2004).

- Identidad genética de Nei (**I**) y Distancia genética de Nei (**D**) las cuales mediante la frecuencia alélica de cada población miden el grado de proximidad genética entre pares de poblaciones de organismos; Nei M., (1972) interpreta la identidad genética como la probabilidad de que al extraer un alelo al azar de una población X y otro alelo al azar de una población Y estos alelos sean iguales. Esta medida va de 0 a 1. Se halla a partir de las siguientes fórmulas:

Entonces si las frecuencias alélicas son las mismas ($J_x = J_y$) y la I_{xy} equivale a 1, esto es identidad máxima posible, pero si I_{xy} equivale a 0, las dos poblaciones tienen distribuciones de frecuencias alélicas completamente diferentes. La Distancia genética (**D**) por lo tanto toma valores de 0 si las poblaciones comparten el 100% de sus alelos, es decir poblaciones idénticas y una distancia mayor nos indica que no comparten similitud de alelos, es decir, que son completamente diferentes.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 AISLAMIENTO DEL HONGO

Las muestras obtenidas a partir de tallos y mazorcas de cacao con síntomas de ataque de escoba de bruja (producida por el hongo *M. pernicioso*) y moniliasis (*M. rozeri*) se llevaron al laboratorio y se sembraron siguiendo el protocolo de cámaras húmedas utilizado en el laboratorio de Fitopatología mostrando un resultado satisfactorio y permitiendo el desarrollo de hongos casi puros, que posteriormente fue llevado a placas con medio PDA modificado para obtener cepas puras y poderlas caracterizar.

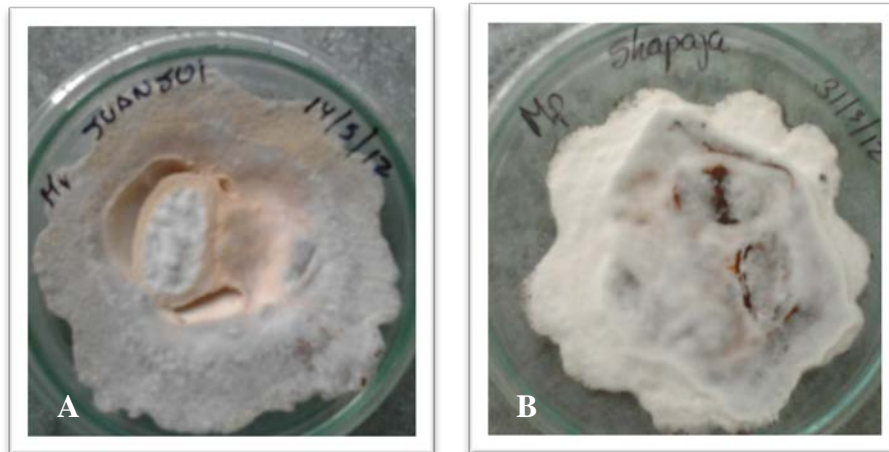


Figura N° 20. Crecimiento de las muestras en cámara húmeda (A) hongos con síntoma de moniliasis en mazorca (B) hongos con síntoma de escoba de bruja en mazorca.

El crecimiento de hifas de las muestras tomadas fue fácil de diferenciar. Para las muestras que vienen con síntomas de moniliasis en cámara húmeda, se pueden visualizar hifas luego del quinto día de siembra en cámara, observando posteriormente un micelio afelpado de color blanco que conforme pasaba los días se tornaba crema a café claro/oscuro a causa de la producción masiva de esporas (Figura N°20A). Por otro lado se tenía una muestra de mazorca con aparentes signos de la enfermedad escoba de bruja, esta presentaba protuberancia y mancha necrótica más oscura que la ocasionada por moniliasis; y por tratarse de una mazorca se realizó la cámara húmeda en placa petri, después de siete días la mazorca desarrollo micelio blanco con aspecto algodonoso (Figura N°20B)

Cuando se toma las muestras obtenidas a partir de tallo que presentaban síntomas de escoba de bruja, bajo condiciones de cámara húmeda en arena estéril se nota a partir del día 9 la formación de una capa delgada de hifas a los extremos del tallo, en cambio al día 14 se puede diferenciar la formación de micelio algodonoso.

Las condiciones de la cámara húmeda permitieron el aislamiento del hongo a partir de tallo seco (Figura N°21). Pires A., et al., (2009) aporta este paso en la técnica de

aislamiento a partir de tallos secos mostrando la presencia de micelio en la superficie de los tallos.



Figura N° 21. Aislamiento del hongo que generan síntomas de la enfermedad escoba de bruja a partir de tallos secos de cacao.

La purificación de los aislados de hongos fue hecha en medio PDA modificado por el laboratorio de Fitopatología del ICT por su bajo costo, al que no se le agregó dextrosa sino sacarosa y al cual llamaremos medio PSA (Figura N°22).



Figura N° 22. Medio PDA modificado, muestra el desarrollo micelial del hongo *M. royeri*.

3.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Para caracterizar nuestras cepas se hace uso de muestras que se encontraban previamente caracterizadas y conservadas en el cepario del laboratorio de Fitopatología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) las que sirvieron como control positivo para la identificación y diferenciación de las especies. Reactivando las cepas de *M. roleri* y *M. perniciosa* en medio PSA y luego en sus medios específicos (Anexo N°1).

Según las comparaciones hechas de nuestras muestras con las muestras conservadas, teniendo en cuenta el crecimiento y la morfología de los micelios se puede concluir que los aislados provenientes de las mazorcas con síntomas de moniliasis pertenecen al hongo *M. roleri* por ser de micelio afelpado y color crema a café claro/oscurito (Castaño J., 1952; Cubillos G., 1981; Suárez C., 2004; Phillips W., 2006) en cambio para la mazorca y tallos que presentaban síntomas de escoba de bruja, pertenecen al hongo *M. perniciosa* con micelio blanco algodonoso que al paso del tiempo llega a tener un color amarillento.

Una vez caracterizado por su morfología para verificar esta clasificación se pasó a sembrar en medios específicos que hacen una mejor diferenciación de los aislados.

En el medio PSA por su bajo costo y selectivo con antibiótico -el que se utilizó para eliminar la contaminación por bacterias- el micelio fue sembrado en dos o tres puntos de la superficie con el fin de poder purificar la muestra haciendo repiques en caso de que ocurra contaminación por otro tipo de hongos; el llenado de la placa con medio PSA para los aislamientos de *M. roleri* fue a los 7 días y para los aislados de *M. perniciosa* fue a los 14 días. Para el caso de *M. perniciosa* el sembrado en medio PSA fue de vital importancia para convertir al hongo en su fase saprófita. Meinhardt W., et al., (2006) reportaron que el micelio del hongo *M. perniciosa* se transforma a su fase saprófita cuando es sembrado en medio PDA, este cambio se evidencia por su crecimiento más

acelerado comparado con su fase biotrófica (sembrado en medio glucosa al 2%) que podía durar de 4 a 6 semanas.

Los hongos purificados fueron sembrados en medios selectivos estandarizados por el ICT en base a muchos ensayos, para ello el medio a base de cacao IMC – 67 que es específico para aislados de *M. roreri* permitió el desarrollo del micelio entre los días 5 y 7; de las muestras traídas para su análisis el 80% llenaban la placa al quinto día y el 20% restante entre los días 6 y 7. El medio extracto de levadura utilizado para aislados de *M. pernicioso* permitió acelerar el desarrollo micelial ya que entre el octavo y décimo día presentaba suficiente micelio en placa para hacer la caracterización de las muestras comparado con los 14 días que se emplean en medio PSA. El 60% de los aislados traídos para su análisis desarrollaron micelio en placa entre los días 8 y 9, y el 40% en el décimo día.

Los medios de cultivo PSA, medio extracto de levadura y medio a base de cacao IMC – 67 presentaron buenos resultados para el crecimiento de los patógenos, sin embargo los medios extracto de levadura y medio a base de cacao IMC – 67 llamados medios específicos para cada especie de hongo, permitieron obtener un micelio más denso y robusto, además la de acelerar el crecimiento del micelio.

Villavicencio M., (2010) reportó el uso del medio PDA para aislar y purificar muestras de *M. roreri*, sin embargo utiliza el medio V8MAA (Jugo V8-Maltosa-Asparagina-Agar) para la caracterización de las mismas. Arbelaez L., (2010) concluye que el medio más indicado para la caracterización morfológica, y que le permitió el crecimiento y esporulación de aislamientos de *M. roreri* de Antioquia fue agar extracto de malta más V8, también indican que el medio menos favorable para el desarrollo del hongo *M. roreri* fue el medio V8 sin ningún aditivo estos resultados difieren a los obtenidos por Phillips W., (2003) quien reportó al agar V8 como el medio más adecuado para el crecimiento y esporulación de aislamientos de *M. roreri* procedentes de diferentes zonas cacaoteras de Sur y Centro América. Meinhardt W., (2006) habiendo realizado estudios

de producción de micelio de *M. pernicioso* para mantener la fase biotrófica, menciona la utilización del medio LMCpL compuesto por extracto de levadura, glicerol, K_2HPO_4 y oligoelementos que le permitió el desarrollo de micelio más vigoroso, también probó otras fuentes de carbono como etanol, fructuosa, glucosa, glicerol, sorbitol y sucrosa, el cual permitieron que el micelio se convierta rápidamente en su fase saprófita excepto con glicerol como fuente de carbono. Resultados que difieren con los obtenidos en este estudio ya que el medio extracto de levadura que contiene glicerol permitió el desarrollo del micelio saprófito del hongo *M. pernicioso*.

De lo anterior se puede inferir que el crecimiento de los hongos está influenciado por el origen de las cepas adaptadas a su ambiente por lo que esto implica encontrar una variabilidad dada por la interacción genotipo ambiente.

El crecimiento de los aislados en medio sólido por lo general mantuvo un comportamiento homogéneo entre sus características visibles, solo diferenciándose entre las dos especies de hongos en la velocidad de crecimiento micelial.

3.2.1 Análisis macroscópico

Moniliophthora roreri: la evaluación macroscópica de esta especie se realizó al sexto día después de ser sembrado, observando en todos los aislamientos micelio que crecía formando una capa delgada tipo afelpada sobre la superficie del medio de cultivo (Figura N°23), característica reportada por Arbelaez L., (2010) quien trabajó con muestras aisladas de Colombia, indicando que el 79,3% de sus aislados de *M. roreri* presentaban la misma característica de micelio afelpado, seguida por la textura pulverulenta (16%) y las texturas estriadas y algodonosas que presentaban frecuencias mínimas de 3,4% y 1,3% respectivamente.

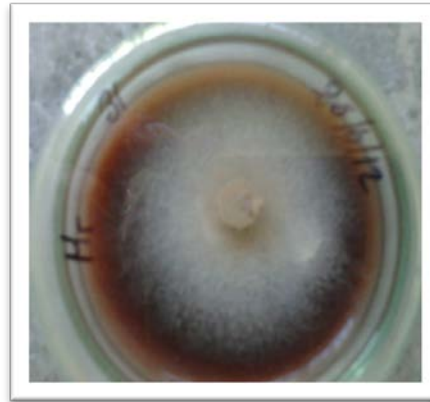


Figura N° 23. Características morfológicas de los aislamientos de *M. roseri* sembrado en Medio a base de cacao IMC-67.

Las tonalidades observadas en la coloración del micelio variaron según los días de crecimiento siendo manifestado por algunos autores (Castaño J., 1952; Cubillos G., 1981; Suárez C., 2004; Phillips W., 2006). Este parámetro color fue calificado según Phillips W., (2006) por los colores de las colonias de *M. roseri* (Tabla N°2). En este estudio los aislamientos de *M. roseri* correspondieron a dos grupos de tonalidades café oscuro - café claro – blanco y crema- café claro – blanco (Figura N°23).

Tabla N° 2. Rango de colores para evaluar color de micelio a los aislados de *Moniliophthora roseri*.

Número	Color
1	Café claro
2	Café claro – blanco
3	Café oscuro - café claro – blanco
4	Crema - café oscuro - café claro – blanco
5	Café oscuro - blanco
6	Café oscuro – crema - blanco
7	Crema – café claro - blanco

Todos los aislamientos presentaron borde plumoso y aspecto pulverulento a causa de la producción de esporas, características descritas por Phillips W., (2003). El total de aislamientos de *M. roreri* iniciaron su esporulación en el día 5. Estos resultados coinciden con lo reportado por Phillips W., (2003) quien habiendo trabajado con un rango de esporulación de diferentes cepas que variaron dentro de 5 – 7.6 días; afirma que los aislados de Perú eran los que más rápido esporulaban, empezando en el quinto día después de su siembra y que los aislados de Colombia esporulaban a los 6.6 días.

Moniliophthora perniciosa: la evaluación macroscópica de esta especie se realizó al noveno día después de ser sembrado; el micelio de todos los aislados crecían formando una capa algodonosa (Figura N°24), la colonia de este hongo es de color blanco y conforme se va envejeciendo estas presentaban algunas tonalidades amarillas, característica también reportada por Pires A., et al., (2009) quienes indican que el micelio sembrado en “Griffith medio”; compuesto por salvado/vermiculita cubierto con una capa de turba y yeso se volvió amarillo claro 4 días después de ser expuesto al ambiente, cambiando a una coloración rosácea después de otros diez días de ser expuesto a las mismas condiciones. Ferreira L., et al., (2012) también corroboraron esta información donde indican que las colonias de *M. perniciosa* sembradas en Agar trigo dextrosa presentaban tonalidades amarillas y rosáceas conforme envejecían.

Se podría concluir con respecto a la variación en las tonalidades del micelio de *M. perniciosa* que no está existiendo factores como condiciones de laboratorio y ambientales que influyan en la expresión de esta característica fenotípica, sino que esta característica se debe a un gen específico que se expresa independiente de las condiciones a las que son expuestas.

Con respecto al borde de la colonia esta no era bien definido, 8 aislamientos crecieron de forma radial (Figura N°24A) y 4 presentaban borde irregular (Figura N°24B). Meinhardt W., et al., (2006) reportaron que los bordes de la colonia representaban la fase saprófita del hongo después de 7 a 10 días de ser sembrado en medio extracto de malta o PDA.

Por otro lado Meinhardt W., et al., (2008) reportaron que la producción de micelio acelerado se debe a que el hongo entra en su fase saprófita.

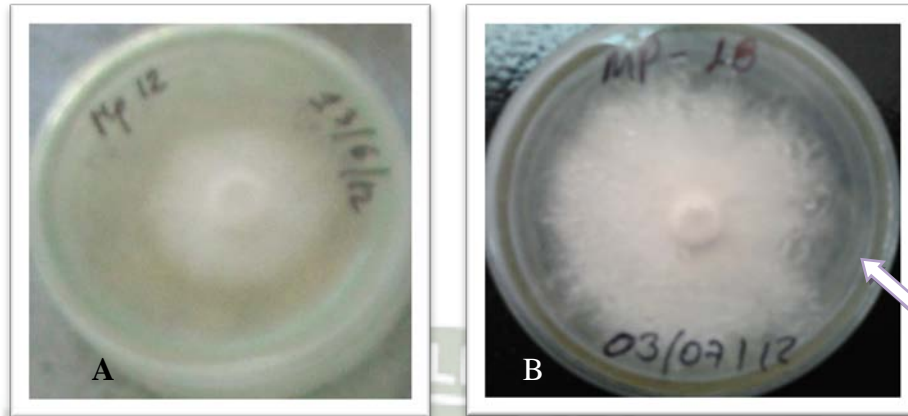


Figura N° 24. Características morfológicas de los aislamientos de *M. perniciosa* sembrado en medio extracto de levadura. (A) Borde regular de la colonia (B) Borde irregular.

3.2.2 Análisis microscópico

Para hacer el análisis al microscopio se utilizó la técnica de la cinta adhesiva con colorante azul de lactofenol, el fenol ayuda matando la porción de cultivo que se examina disminuyendo las posibilidades de infección en el laboratorio; ácido láctico que conserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótica y el azul algodón que tiñe la quitina de las paredes fúngicas.

***Moniliophthora roreri*:** el examen al microscopio se evaluó en el sexto día de crecimiento, el cual mostró esporas en su mayoría con forma globosas y pocas subglobosas y/o elípticas (Figura N°25A). La forma de las esporas coincide con las reportadas por Evans C., et al., (1978) y Suárez L., (2004); quienes describen la forma de esporas de *M. roreri* desde globosas a elipsoidales y por Holliday P., (1970) el que caracteriza a las esporas como variables con forma globosa, sub-globosa o elipsoidal. Phillips W., (2003) analizó las esporas por país de origen y encontró que los aislados de Perú registraban alto porcentaje de esporas globosas y bajo porcentaje de esporas

elípticas igual que Venezuela pero estas tenían menor tamaño que las de Perú y los valores más bajos en tamaño de esporas fueron los aislados pertenecientes a los países de Centro América especialmente Nicaragua y Honduras. También se observó microscópicamente hifas ramificadas, dando lugar a una cadena de esporas de forma globosa (Figura N°25B).

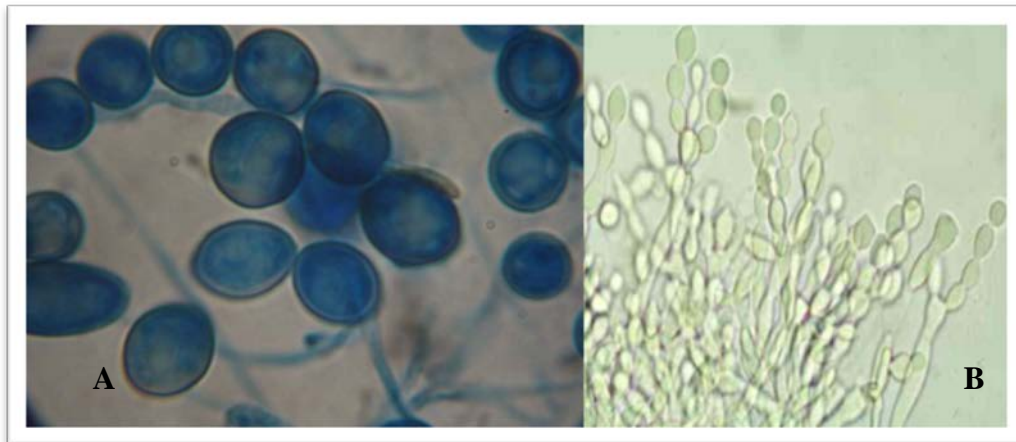


Figura N° 25. Vista al microscopio del hongo *M. roreri* (A) Esporas donde se destaca una mayoría de esporas de tipo globosa 100X (B) Hifas ramificadas mostrando el desarrollo de esporas en forma basipetala. Fuente: Isai D., (2012).

La mayoría de los aislamientos presentaron mayor número de esporas tipo globosas y pocas suglobosas o elípticas. Estos resultados concuerdan con investigaciones de Ciferri R. y Parodi E., (1933); Evans C., et al., (1978); Campuzano H., (1981) y Phillips W., (2003); donde reportaron que en el hongo *M. roreri* predominan las esporas de tipo globoso, presentándose en menor proporción esporas subglobosas o elipsoide. Por otro lado Chacín L., (1975) reporta que para los aislamientos de *M. roreri* provenientes de Venezuela, presentan generalmente esporas de tipo ovoide o elipsoide y muy pocas globosas; y en un estudio realizado por Ram A., (1989), utilizando aislamientos de Colombia, Venezuela, Costa Rica y Ecuador, encontró que los aislamientos de Costa Rica y Colombia presentaban esporas generalmente ovales, mientras que los de Venezuela y Ecuador eran de tipo esférico.

Estas diferencias presentes en la proporción de las esporas de *M. roreri* para cada país, podrían deberse a diferentes condiciones de crecimiento como el medio de cultivo y sus condiciones de incubación; también podría estar influenciando las condiciones del medio ambiente o condiciones nutricionales; estas teorías conllevan a realizar estudios posteriores con mayor número de muestras.

Moniliophthora perniciosa: el examen microscópico se evaluó en el noveno día de crecimiento, en este análisis se observó la fase saprófita pudiendo distinguir micelio binucleado con conexiones o “clampas” (Figura N°26), esta característica también fue reportada por Kilaru A. y Hasenstein K., (2005); Meinhardt W., et al., (2008); Pires A., et al., (2009); Orozco A., et al., (2010) y Ferreira L., et al., (2012); en dicha fase.

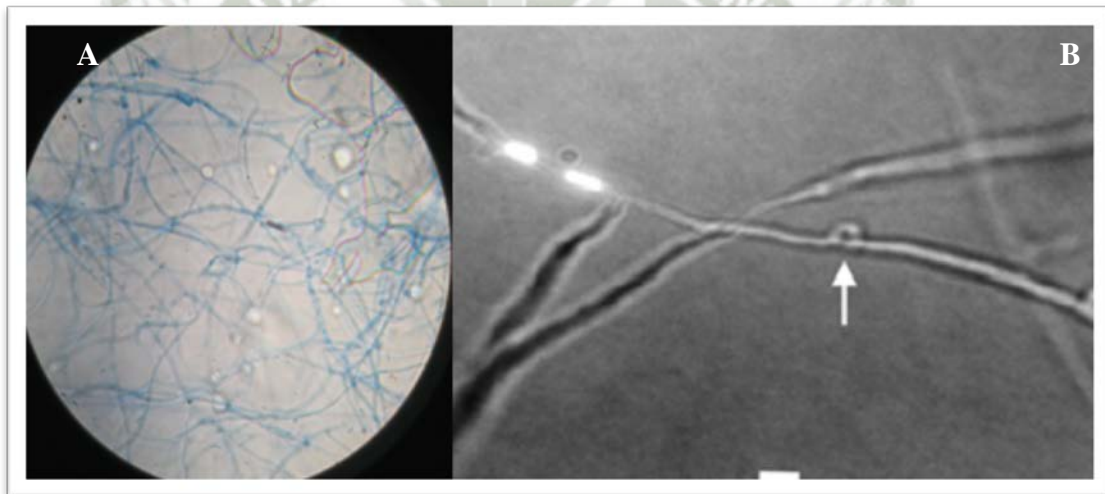


Figura N° 26. Vista al microscopio del hongo *M. perniciosa*. (A) Micelio binucleada del hongo causante de la enfermedad escoba de bruja. Fuente: Elaboración propia. (B) que se unen por intermedio de clampas o abrazadera (flecha blanca) Fuente: Meinhardt L., et al., (2006).

Con respecto a las esporas Garcés D., (2001) reporta que estas son de color blanco, tienen vida corta, son fotosensibles y si no llegan a caer en un lugar apropiado para su desarrollo mueren en menos de una hora. En este estudio no fue posible visualizar las

esporas debido a su colóracion ya que se necesitó de un microscopio de campo oscuro que permitiera hacer contraste.

Orozco A., et al., (2010), reportaron que entre las características microscópicas de este hongo el micelio presenta una morfología variable debido a que el ciclo de la enfermedad se da en dos fases. En la fase biotrófica el hongo se caracteriza por poseer una baja concentración de micelio con hifas mononucleadas, septo doliporo y sin conexiones o clampas (Orchard E. y Hardwick K., 1988); por otro lado en la fase saprófita del hongo se puede observar un crecimiento micelial más acelerado en el borde de las colonias, micelio binucleado con conexiones o “clampas” (Meinhardt W., et al., 2008) tal y como se ha observado en esta investigación.

La caracterización morfológica permitió identificar a los dos patógenos que se deseaban estudiar. Los resultados de esta caracterización en los aislamientos de *M. roreri* indicaron cierta homogeneidad en las características macroscópicas y microscópicas tales como borde de colonia y tipo de esporas existiendo variación solo en el color de esporas; la misma situación ocurre para los aislamientos de *M. perniciososa* evidenciando cierta homogeneidad entre los parámetros estudiados diferenciándose solo en el borde de las colonias; imposibilitando de tal manera la realización de una caracterización morfológica cuyos datos puedan servir de apoyo para luego determinar la variabilidad genética de los hongos.

Por otro lado, todos los aislados utilizados en este trabajo pasaron a ser almacenadas en el Laboratorio de Fitopatología con la finalidad de conformar un cepario con aislados de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciososa*; el almacenamiento del hongo se realizó en medio de cultivo PSA inclinado el cual se encuentra establecido por duplicado.

El número total de muestras caracterizadas para el análisis de variabilidad genética fue 21 aislamientos de *M. roreri* y 12 aislamientos de *M. perniciososa*. El detalle del origen de

los aislados utilizados se muestra en la tabla N°3 y 4. Cabe recalcar que las cepas de *M. pernicioso* que se encontraban conservadas fueron aisladas a partir de basidiocarpos por el fitopatólogo encargado del área; para el caso de las cepas conservadas de *M. roreri* estas fueron aisladas de mazorca ya que la enfermedad solo ataca al fruto.

Tabla N° 3. Lista de aislados de *M. roreri* utilizados para el estudio con la técnica AFLP.

Código	Departamento	Provincia
MR1	San Martin	Tocache
MR2	San Martin	Tocache
MR3	San Martin	Tocache
MR4	San Martin	Tocache
MR5	San Martin	Mariscal Cáceres
MR6	San Martin	Mariscal Cáceres
MR7	San Martin	Mariscal Cáceres
MR8	San Martin	Mariscal Cáceres
MR9	San Martin	Mariscal Cáceres
MR10	San Martin	Mariscal Cáceres
MR11	Huanuco	Leoncio Prado
MR12	Huanuco	Leoncio Prado
MR13	Huanuco	Leoncio Prado
MR14	Huanuco	Leoncio Prado
MR15	Huanuco	Leoncio Prado
MR16	Huanuco	Leoncio Prado
MR17	Huanuco	Leoncio Prado
MR18	Huanuco	Leoncio Prado
MR19	Huanuco	Leoncio Prado
MR20	Ayacucho, Cusco, Junin	Vrae
MR21	Cajamarca	San Ignacio

Tabla N° 4. Lista de aislados de *M. pernicioso* utilizados para el estudio con la técnica AFLP.

Código	Departamento	Provincia	Genotipo	Aislados de
MP1	San Martín	Tocache	CCN-51	Tallo
MP2	San Martín	Tocache	Hibrido verde	Tallo
MP3	San Martín	Tocache	CCN-51	Tallo
MP4	San Martín	Tocache	TSH-565	Tallo
MP5	San Martín	Tocache	CCN-51	Tallo
MP6	San Martín	Tocache	CCN-51	Tallo
MP7	San Martín	Tocache	CCN-51	Basidiocarpo
MP8	San Martín	Tocache	Hibrido amarillo	Tallo
MP9	San Martín	Tocache	Hibrido	Tallo
MP10	San Martín	Tocache	T1	Mazorca
MP11	San Martín	Tarapoto	T2	Tallo
MP12	San Martín	Tarapoto	T3	Basidiocarpo

*T1, T2, T3 muestras recolectadas en campo.

3.3 PRODUCCIÓN DE MICELIO, EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA

Una vez hecha la caracterización morfológico y habiéndose verificado que los aislados sembrados en placas eran los patógenos que se deseaban estudiar y estaban puros y libres de contaminantes, se procedió a preparar los inóculos para la producción de micelio, el medio que se utilizó fue caldo PS (papa sacarosa) utilizado por su bajo costo.



Figura N° 27. Producción de micelio en medio líquido PS (papa sacarosa).

Se realizó una modificación a la primera etapa del protocolo de extracción de DNA de los hongos haciendo uso del equipo fast prep, arena estéril y perla acrílica para lisar la pared celular, este procedimiento de lisis celular se había trabajado antes en el laboratorio solo con material vegetal como hojas de cacao y piñon. El uso de este equipo permitió que por acción mecánica rompa las paredes celulares de los hongos con ayuda del choque de la perla y la arena. Este paso puso en contacto la solución de lisis con las células liberadas que permitieron la destrucción de las membranas celulares quedando disponibles los ácidos nucleicos acompañados de otros compuestos como proteínas, enzimas, carbohidratos, para su posterior procesamiento.

Otros autores como Somma M., (2008) y Rodriguez C., et al., (2006) concluyeron que el uso de detergentes catiónicos como el cetil trimetil de bromuro de amonio (CTAB) es altamente eficaz en tejidos vegetales pero inútiles cuando se aplican a tejidos de origen fúngico, dato que se pudo confirmar en el laboratorio ya que el reactivo CTAB fue utilizado para extraer DNA de plantas de cacao y piñon pero no fue eficaz para hongos. Por otra parte también concluyen que el detergente aniónico dodecil sulfato de amonio

(SDS) proporciona buenos resultados cuando se aplican a hongos filamentosos y son medianamente eficientes sobre tejidos vegetales, este reactivo también se utilizó en pruebas preliminares de extracción de hongos mostrando eficacia en sus resultados.

Por otro lado González C., (2012) propone hacer una previa digestión del micelio con la enzima quitinasa, para ayudar a la lisis de la pared celular que esta principalmente constituida por quitina. Sugiere que este método enzimático puede mejorar la lisis de las paredes de los hongos las cuales a menudo son resistentes a los procedimientos de lisis que se emplean en los protocolos de extracción.

3.3.1 Determinación de la concentración y pureza del DNA

En la Tabla N°5 y 6 se aprecian los valores de pureza y concentración de DNA de todos los aislamientos trabajados.

Tabla N° 5. Tabla de valores de absorbancia de *M. roreri*.

Código	260 nm	280 nm	Pureza 260/280	Conc. DNA ng/μl
MR 1	0.256	0.164	1.6	1280
MR 2	0.234	0.134	1.7	1170
MR 3	0.110	0.067	1.6	550
MR 4	0.020	0.018	1.1	100
MR 5	0.030	0.023	1.3	150
MR 6	0.040	0.031	1.3	200
MR 7	0.076	0.066	1.2	380
MR 8	0.026	0.023	1.1	130
MR 9	0.032	0.028	1.1	160
MR 10	0.026	0.022	1.2	130
MR 11	0.105	0.099	1.1	525
MR 12	0.088	0.050	1.8	440
MR 13	0.075	0.065	1.2	375
MR 14	0.026	0.021	1.2	130
MR 15	0.226	0.123	1.8	1130
MR 16	0.028	0.021	1.3	140
MR 17	0.132	0.074	1.8	660
MR 18	0.042	0.025	1.7	210
MR 19	0.089	0.077	1.2	445
MR 20	0.152	0.082	1.9	760
MR 21	0.041	0.027	1.5	205

Tabla N° 6. Tabla de valores de absorbancia de *M. pernicioso*.

Código	260 nm	280 nm	Pureza 260/280	Conc. DNA ng/μl
MP 1	0.105	0.061	1.7	525
MP 2	0.296	0.160	1.9	1480
MP 3	0.419	0.344	1.2	2095
MP 4	0.224	0.167	1.3	1120
MP 5	0.170	0.088	1.9	850
MP 6	0.222	0.139	1.6	1110
MP 7	0.303	0.158	1.9	1515
MP 8	0.466	0.245	1.9	2330
MP 9	0.198	0.117	1.7	990
MP 10	0.021	0.011	1.9	105
MP 11	0.189	0.099	1.9	945
MP 12	0.260	0.134	1.9	1300

Las concentraciones halladas para *M. roreri* muestran valores desde 100 hasta 1280 ng/μl y para *M. pernicioso* desde 105 hasta 2330 ng/μl, mientras que los valores de pureza varían desde 1.1 hasta 1.9 para *M. roreri* y desde 1.2 hasta 1.9 para *M. pernicioso*.

Habiéndose empleado la misma técnica de extracción de DNA para todos los aislamientos se puede observar que la mitad de los aislados de *M. roreri* poseen menor pureza comparado con la especie *M. pernicioso* la cual solo dos aislados presentan valores bajos de pureza. Se puede sugerir que estos resultados estarían ligados a la cantidad de quitina en la pared celular de los hongos, la cual estaría influenciando directamente con estos valores, ya que al presentar más contenido de quitina la relación

de pureza baja. Este contenido de quitina nos está indicando la variabilidad de los hongos, ya que en algunos se presenta en mayor proporción y en otros con baja proporción haciendo una pared celular más gruesa o de lo contrario más delgada, por lo que siendo un carácter cuantitativo están regulados por varios genes, lo que se traduciría en diferencia de número de genes por grosor de pared.

3.3.2 Determinación de la calidad del DNA

A continuación se muestra el gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio ($0.02 \mu\text{l ml}^{-1}$) con tres muestras de ADN por triplicado.

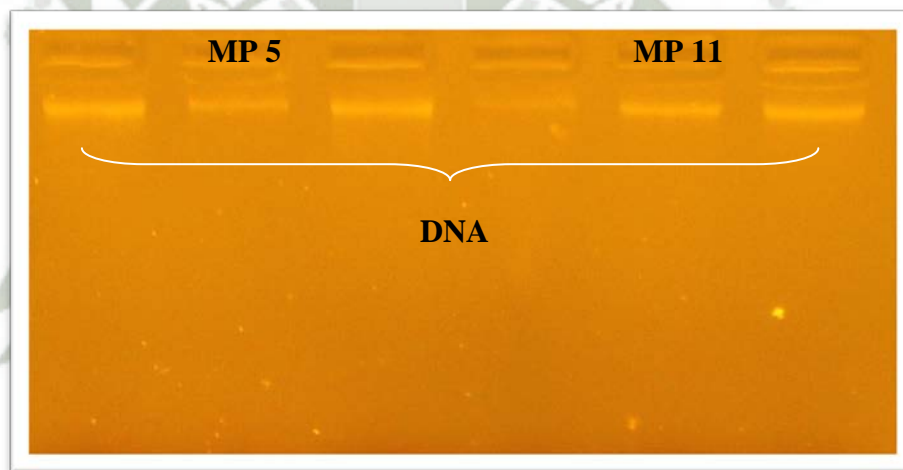


Figura N° 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la calidad de ADN.

En la Figura N°28, se puede observar la calidad del DNA extraído por medio de la integridad de sus moléculas con una banda bien definida y sin la presencia de smirt o barrido lo que indica que no hay degradación de la molécula de DNA, solo se visualizó bandas de ARN en tres aislados pertenecientes a la especie *M. pernicioso* (MP2, MP7 y MP8) para tal caso se procedió a incubar otra vez la muestra con $3 \mu\text{l}$ de la enzima ARNasa por 30 minutos a 37°C .

A pesar de la presencia de proteínas en los aislados de *M. roreri* y *M. pernicioso* y valores bajos de concentración en algunos aislados estos no influenciaron en la siguiente etapa de digestión con enzimas de restricción.

3.4 RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE AFLP

La técnica de AFLP aplicada a todos los aislados se siguió según protocolo IBT (2010) que solo había sido probado antes con material vegetal y que también para nuestro caso mostraron buenos resultados con los hongos analizados. En el anexo N°2 se encuentran las secuencias de los adaptadores, pre cebadores y cebadores específicos utilizados en la amplificación.

Se realizó una pre selección de los cebadores con cuatro aislados de cada especie, para esta elección se trabajó con una total de 24 combinaciones realizadas al azar (Anexo N°3), esto debido a que el laboratorio contaba con secuencias de cebadores diferentes a los que se encontraron en trabajos previos que brindaban buena información; las combinaciones probadas en este estudio permitieron obtener más bandas de las ya descritas en trabajos previos entregando mayor información a la descrita para cada especie.

Para la amplificación de DNA de todos los aislados se eligieron los que dieron mejor respuesta en el proceso de pre selección tomando como criterio el número de bandas marcadoras, siendo el caso que para los 21 aislamientos de *M. roreri* se utilizaron 16 combinaciones de cebadores y para los 12 aislamientos de *M. pernicioso* se utilizó 7 combinaciones de cebadores. Los pares de cebadores utilizados para cada especie de hongo se pueden observar en la Tabla N°7. Los patrones de fragmentos amplificados de las dos especies de hongos se muestran en la Figura N°30 y 31.



Figura N° 29. Cámara de electroferesis vertical utilizada para correr las muestras amplificadas con AFLP.

Tabla N° 7. Listado de las combinaciones de cebadores de AFLP usados para cada especie de hongo.

N°	Combinaciones de cebadores	<i>M. roreri</i>	<i>M. perniciososa</i>
1	<i>EcoRI</i> -ACC <i>MseI</i> -CAA	X	X
2	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CAA	X	X
3	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CTT	X	
4	<i>EcoRI</i> -AGC <i>MseI</i> -CAA	X	
5	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CTG	X	
6	<i>EcoRI</i> -ACC <i>MseI</i> -CAG	X	
7	<i>EcoRI</i> -ACC <i>MseI</i> -CTT	X	
8	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CTC	X	X
9	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CAG	X	X
10	<i>EcoRI</i> -ACT <i>MseI</i> -CAA	X	X
11	<i>EcoRI</i> -ACA <i>MseI</i> -CAA	X	X
12	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CAC	X	
13	<i>EcoRI</i> -AAG <i>MseI</i> -CTC	X	
14	<i>EcoRI</i> -AAG <i>MseI</i> -CAC	X	
15	<i>EcoRI</i> -AGG <i>MseI</i> -CAA	X	X
16	<i>EcoRI</i> -ACG <i>MseI</i> -CAA	X	

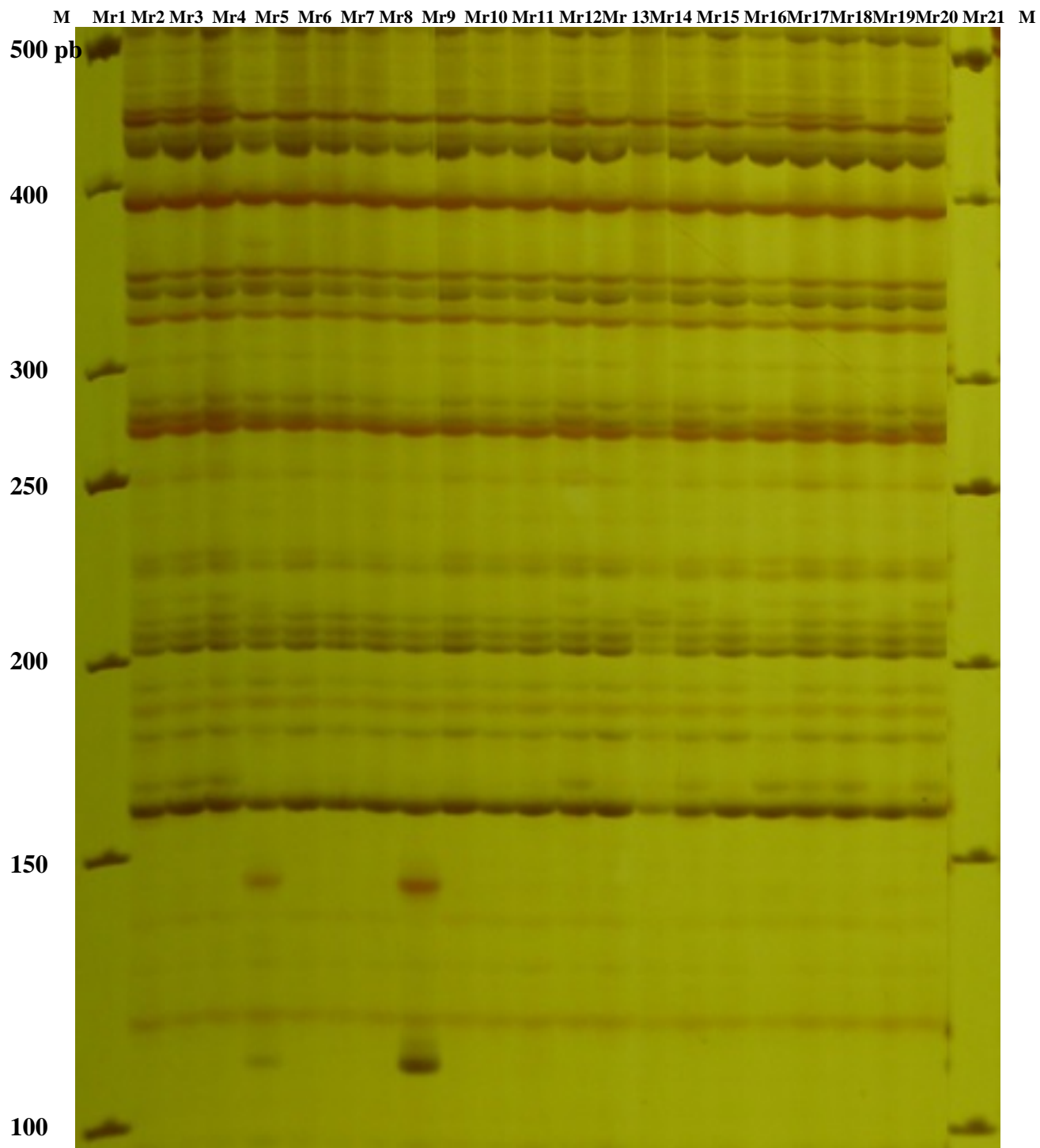


Figura N° 30. Patrón de fragmentos amplificados usando la combinación EcoRI-AGG MseI-CAA con los 21 aislamientos de *M. royeri* cuyos códigos se muestran en el lado superior del carril. Marcador de peso molecular en ambos extremos: GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

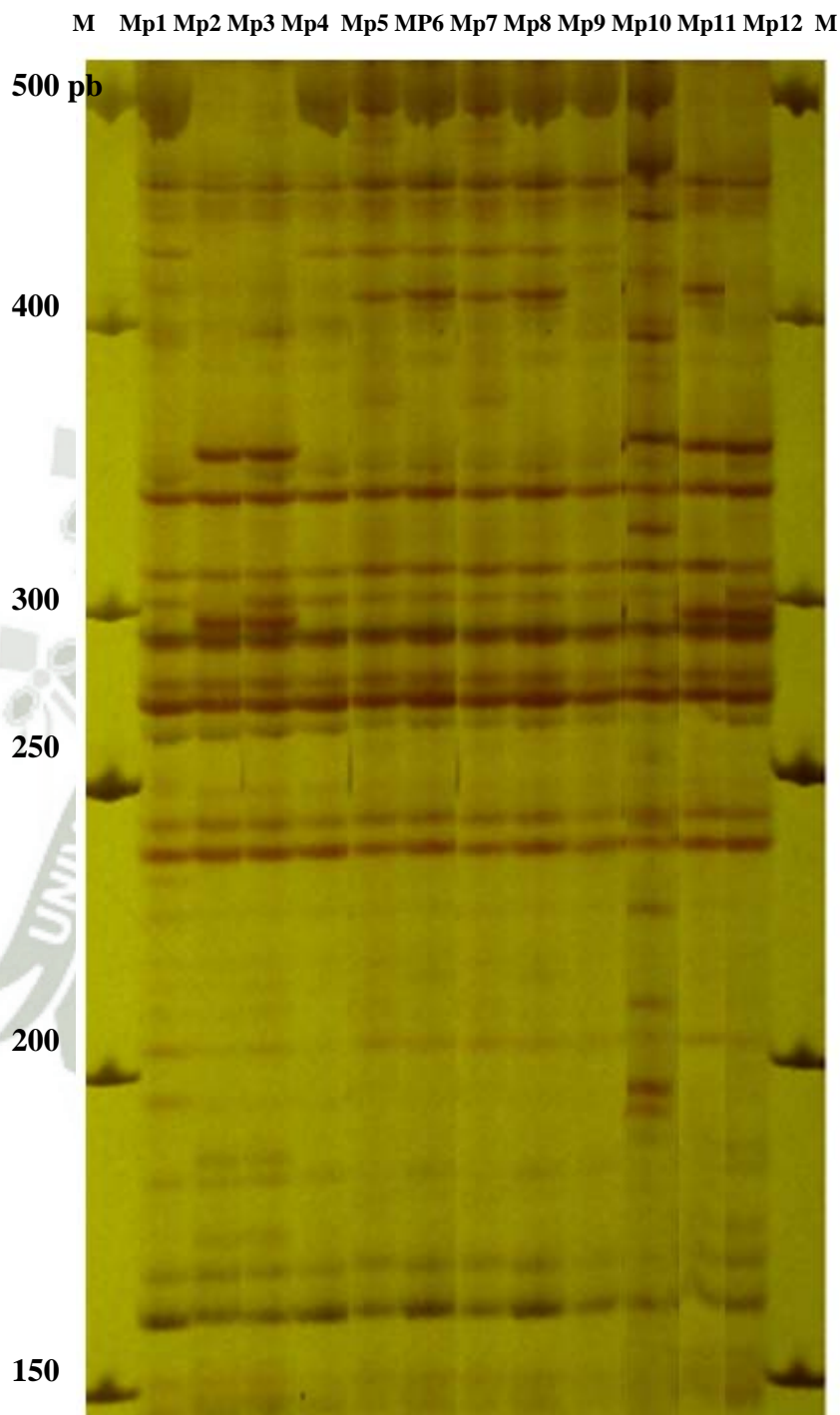


Figura N° 31. Patrón de fragmentos amplificados usando la combinación EcoRI-ACA MseI-CAA con los 12 aislamientos de *M. pernicioso* cuyos códigos se muestran en el lado superior del carril. Marcador de peso molecular en ambos extremos: GeneRuler 50 pb DNA Ladder Plus (Fermentas).

En la Figura N°30 se muestra los patrones de fragmentos amplificadas del hongo *M. roreri* que fueron revelados en los geles de poliacrilamida al 10% usando la combinación *EcoRI-AGG MseI-CAA*, en este gel se puede observar la presencia de bandas definidas y separadas de acuerdo a su peso molecular, pero bajo contenido de fragmentos polimórficos.

La Figura N°31 muestra los patrones de fragmentos amplificados en aislados de *M. pernicioso* que fueron revelados en los geles de poliacrilamida al 10% usando la combinación *EcoRI-ACA MseI-CAA*, en este se puede observar la presencia de bandas bien definidas y mayor cantidad de polimorfismo en la longitud de los fragmentos que en la especie *M. roreri*. La técnica AFLP ha podido utilizarse con éxito con la especie *M. pernicioso*, obteniéndose numerosos fragmentos polimórficas con las diferentes combinaciones de cebadores utilizadas.

El análisis del total de fragmentos amplificados para cada especie se muestra en la Tabla N°8.

Tabla N° 8. Número de fragmentos amplificados utilizando la técnica AFLP para los aislamientos de *M. roreri* y *M. pernicioso*.

	<i>Moniliophthora roreri</i>	<i>Moniliophthora pernicioso</i>
N° de fragmentos amplificados	264	138
N° de fragmentos polimórficos	110	93
N° de fragmentos monomórficos	154	45

La variabilidad de las 21 muestras de *M. roreri* se evaluó mediante el uso de 16 combinaciones de cebadores de AFLP. Estas 16 combinaciones generaron 264 fragmentos de DNA amplificados, de las cuales solo 110 fueron polimórficas. Para los 12 aislamientos de *M. pernicioso* se utilizó 7 combinaciones de cebadores y se recopiló un total de 138 fragmentos de DNA amplificados, de las cuales 92 fueron polimórficos. Los fragmentos polimórficos fueron tratados como loci individuales debido a la naturaleza dominante de los marcadores generados por la técnica AFLP.

Los fragmentos amplificados se separaron conforme a sus pesos moleculares, estas bandas presentes en algunos aislados y ausentes en otras representan la variabilidad genética entre los individuos de cada especie que se pudieron visualizar gracias a la buena resolución de los geles, los cuales facilitaron el trabajo del escoreo. El criterio para considerar a partir de que tamaño de banda tomar para el escoreo es decisión del investigador basándose en la calidad del gel revelado y la separación de los productos amplificados. Para este estudio las bandas utilizadas para el escoreo fueron las bandas de peso molecular entre 80 y 500 pb sugerido por Blas, 2010; debido a que las bandas amplificadas menores a 500 pb presentaban fragmentos polimórficos entre las diferentes especies las cuales son útiles para estudios de variabilidad. En nuestro estudio las bandas entre 500 y 1000 pb presentaban bandas monomórficas, la cual no aportaban información para los estudios de variabilidad.

A pesar de los valores bajos de pureza que presentaron algunos aislados de *M. roreri* y *M. pernicioso* estos no interfirieron en la amplificación de las muestras usando la técnica AFLP, debido probablemente a que la quitina presente en una especie en mayor cantidad se encontraba disuelta en la solución y no enrollando el DNA por lo que tampoco interfirieron en la digestión de las enzimas de restricción.

Tradicionalmente los métodos para identificar, caracterizar y clasificar a los hongos se ha realizado usando caracteres morfológicas y fisiológicas los cuales han proporcionado información útil pero muchas veces incompleta de estos organismos. Los avances en las técnicas de biología molecular pueden ayudar a conseguir este propósito.

Los marcadores moleculares generados por la técnica AFLP, son de naturaleza dominante y tienen la capacidad de detectar varios polimorfismos que se refieren a la longitud de fragmentos en diferentes regiones genómicas simultáneamente. Fory A., (2005) describe a estos marcadores como altamente sensibles y reproducibles. Estos polimorfismos de ADN se heredan típicamente en forma mendeliana y por lo tanto puede ser utilizado para tipificación, mapeo genético de loci, estudios de parentesco y variabilidad dentro y entre poblaciones.

Es importante mencionar que el protocolo de AFLP propuesto por el IBT para especies vegetales, fue aplicado en este estudio y mostró resultados efectivos al utilizarlo con los hongos *M. roreri* y *M. pernicioso*, este hecho se puede considerar como aporte de la obtención de bandas polimórficas por el protocolo de AFLP empleado en este estudio para estas dos especies de hongos.

En términos generales el revelado del gel de poliacrilamida mostró un material satisfactorio para el trabajo de análisis de datos (Figura N°30 y 31), a pesar de valores bajos de pureza en algunos aislados estos no interfirieron en el desarrollo de la técnica. Los marcadores moleculares generados por la técnica AFLP proporcionaron fragmentos marcadores suficientes para hacer uso de estos y obtener los resultados de análisis de distancia genética y estudio de la variabilidad de las poblaciones de cada especie de hongo, aislados de las principales zonas productoras de cacao en Perú.

3.5 ANÁLISIS DE DATOS

La construcción de la matriz binaria se realizó en una hoja de cálculo de Excel a partir de los geles fotografiados asignándole los valores de 1 y 0 a la presencia y ausencia de la banda.

Comparando los fragmentos amplificados entre las dos especies, *M. roreri* no presentó bandas tenues en cambio *M. pernicioso* si las tuvo y se le asignó el símbolo “?” ya que de esta manera es como reconoce el programa Past los datos perdidos; Chia J., (2009) considera que los datos perdidos no deben sobrepasar el 15% de lo contrario se debería excluir los loci para garantizar la confiabilidad del estudio de variabilidad, otros autores como Warburton M. y Crossa J., (2002) consideran que los datos perdidos no deberían sobrepasar el 5% pero finalmente la toma de decisión depende del criterio del investigador. En este estudio los datos perdidos no fueron mayores al 3% por lo que no se tuvo que discriminar ningún locus.

3.5.1 Determinación del Índice de contenido polimórfico (PIC)

Los datos se muestran en la Tabla N°9 y 10. Los valores más altos de PIC nos indicarán mayor información de la banda marcadora a fin de clasificarla como variable o no en la población de cada grupo de aislados.

Moniliophthora roreri

Tabla N° 9. Lista de combinaciones de cebadores con su grado de polimorfismo y PIC promedios obtenidos a partir de los 21 aislamientos de *Moniliophthora roreri*.

N°	Par de Cebadores	N° de Loci Polimórficos	PIC Promedio
1	<i>EcoRI</i> -ACC <i>MseI</i> -CAA	6	0.31
2	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CAA	6	0.24
3	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CTT	9	0.16
4	<i>EcoRI</i> -AGC <i>MseI</i> -CAA	3	0.21
5	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CTG	8	0.24
6	<i>EcoRI</i> -ACC <i>MseI</i> -CAG	6	0.10
7	<i>EcoRI</i> -ACC <i>MseI</i> -CTT	7	0.17
8	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CTC	10	0.28
9	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CAG	3	0.15
10	<i>EcoRI</i> -ACT <i>MseI</i> -CAA	9	0.27
11	<i>EcoRI</i> -ACA <i>MseI</i> -CAA	8	0.15
12	<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CAC	9	0.19
13	<i>EcoRI</i> -AAG <i>MseI</i> -CTC	12	0.15
14	<i>EcoRI</i> -AAG <i>MseI</i> -CAC	2	0.29
15	<i>EcoRI</i> -AGG <i>MseI</i> -CAA	10	0.24
16	<i>EcoRI</i> -ACG <i>MseI</i> -CAA	2	0.44

Los marcadores con promedio de PIC más altos hallados en los aislamientos de *M. roreri* los tienen las combinaciones números 1, 8,10, 14 y 16, por lo tanto se pueden constituir como bandas marcadoras que permitan la determinación de la variabilidad del grupo de aislados en estudio.

La combinación número 6 fue la que presentó el promedio PIC más bajo, lo que indica que este par de cebadores están amplificando la misma longitud de fragmentos compartidas entre el grupo de aislados.

Con los 16 pares de cebadores utilizados se obtuvieron 110 bandas polimórficas representando el 42%; siendo las combinaciones de cebadores N°8 y 15 las que generaron 10 bandas polimórficas y la combinación N° 13 la que generó 12 bandas polimórficas. Phillips W., (2003) en un estudio de variabilidad de *M. roleri* empleando la técnica AFLP y habiendo utilizado cuatro combinaciones de cebadores obtuvo 106 bandas polimórficas representando el 65% del total de bandas. Cabe recalcar que no se utilizó las mismas combinaciones de cebadores por lo cual los resultados generados en la determinación del PIC podrían ser un aporte para el estudio de variabilidad del hongo *M. roleri*.

Haciendo una comparación entre marcadores dominantes generados por las técnicas AFLP y RAPD, un estudio realizado por Cunha R., (2006) quien habiendo trabajado con aislados de *M. roleri* y cinco cebadores RAPD, obtuvo 24 bandas polimórficas representando el 25% de polimorfismo. Resultados similares fueron obtenidos por Silva M., (2011) quien habiendo utilizado también marcadores generados por RAPD, con 24 cebadores obtuvo 75 bandas polimórficas representando 76% del total de bandas analizadas.

Estos datos indican que a pesar que los marcadores generados por las técnicas RAPD y AFLP de naturaleza dominante, los marcadores generados por la técnica AFLP muestran más ventajas, como por ejemplo tienen una alta reproducibilidad comparado con los marcadores generados por la técnica RAPD y entregan mayor información por cada reacción que RAPD. Como se puede observar en los trabajos realizados por Silva y Cunha se necesita utilizar más cebadores RAPD para obtener mayor información de loci amplificados.

Moniliophthora perniciosa

Tabla N° 10. Lista de combinaciones de cebadores con su grado de polimorfismo y PIC promedio obtenidos a partir de los 12 aislamientos de *Moniliophthora perniciosa*.

N°	Par de Cebadores	N° de Loci Polimórficos	PIC Promedio
1	<i>EcoRI-ACC MseI-CAA</i>	12	0.33
2	<i>EcoRI-AAC MseI-CAA</i>	11	0.34
3	<i>EcoRI-AAC MseI-CTC</i>	11	0.31
4	<i>EcoRI-AAC MseI-CAG</i>	16	0.22
5	<i>EcoRI-ACT MseI-CAA</i>	11	0.28
6	<i>EcoRI-ACA MseI-CAA</i>	17	0.26
7	<i>EcoRI-AGG MseI-CAA</i>	15	0.24

Los marcadores con promedio de PIC más altos hallados en los aislamientos de *M. perniciosa* los tienen las combinaciones número 1, 2, y 3 por lo tanto se pueden constituir como bandas marcadoras que permitan la determinación de la variabilidad para esta especie.

La combinación número 4 fue la que presentó el promedio PIC más bajo, lo que indica que este par de cebadores están amplificando la misma longitud de fragmentos compartidas entre esta especie.

Hubo un alto nivel de loci polimórficos entre los perfiles de los aislados, teniendo en cuenta el modo de reproducción asexual de este basidiomiceto. En efecto, 67.4% (93/138 bandas) de los productos generados fueron polimórficos, las combinaciones N°4, 6 y 7 fueron las que mostraron mayor cantidad de bandas polimórficas siendo 16, 17 y 15 bandas respectivamente, en concordancia con lo planteado por Valdés J., (2009)

esto demuestra la eficiencia de los marcadores generados por la técnica AFLP para generar un gran número de loci. Los porcentajes de polimorfismo obtenidos en este estudio fueron altos, con valores superiores a los reportados por Ploetz R., et al., (2005) en un estudio de diversidad genética de *M. pernicioso*, donde obtuvieron 498 bandas de las cuales el 37% fueron polimórficas, empleando nueve combinaciones de cebadores AFLP. Del mismo modo que con *M. roreri* el uso de estas combinaciones fueron tomadas al azar ya que no habían sido reportadas anteriormente la cual representa un aporte para estudios de variabilidad de esta especie.

En general el índice de contenido polimórfico (PIC) para las bandas marcadoras de *M. roreri* fluctuó en un rango de 0,1 a 0,5 y para las bandas marcadoras de *M. pernicioso* de 0,2 a 0,5 por lo que estos fragmentos de amplificación pueden ser usados como referencia en subsecuentes investigaciones.

El índice de contenido polimórfico (PIC) evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos de cada aislamiento, indicando de esta manera el poder de discriminación de cada marcador, parámetro también utilizado en otros estudios como Silva M., (2011) en aislados de *M. roreri*; Reategui F., (2007) y Chia J., (2009) quienes utilizaron muestras de cacao e indicaron la efectividad y discriminación de sus marcadores para estudios de variabilidad.

Para la construcción de la matriz de similitud se tomó en cuenta el criterio de Ghislain M., et al., (1999); para los marcadores cuyos valores de PIC se encuentra dentro de este rango, $0,1 < \text{PIC} < 0,5$ considerados como los que proporcionan niveles informativos.

3.5.2 Análisis de distancia genética

Para determinar cuan relacionados están los aislados de cada especie se determinó la variabilidad de las longitudes de los fragmentos amplificados utilizando un análisis de distancia genética, para los 21 aislamientos de *M. royeri* se trabajó con 264 loci (marcadores) y para los 12 aislamientos de *M. pernicioso* con 138 loci (marcadores), ordenados en una “matriz binaria” (siendo las filas los loci y las columnas los aislamientos).

Se trabajó con el software Past versión 2.17b, se introdujo la matriz de datos binarios construida a partir de los datos de AFLP y se obtuvo dos matrices de similitud usando los coeficientes de similitud de Jaccard y Dice, a su vez estas matrices se utilizaron para agrupar a los aislamientos de cada tipo de hongo en un análisis basado en el procedimiento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average), que agrupa a los taxones teniendo en cuenta las distancias geométricas entre aislamientos. El resultado de este procedimiento se graficó en un dendrograma o árbol fenético.

Se realizó una validación interna utilizando el coeficiente de correlación cofenética (r), que indica si el valor de la correlación es alto, se puede concluir que el dendrograma sí refleja las distancias en la matriz original y por tanto, no existe ninguna distorsión originada por el método de agrupación, indicando de esta manera la confiabilidad del dendrograma graficado, los valores de los coeficientes de correlación cofenética “ r ” para las dos especies fueron altos cayendo dentro del rango de buena correspondencia (Tabla N°11), pero sin embargo se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard ya que reflejaba un mejor ajuste del análisis de agrupamiento por los dendogramas obtenidos.

Tabla N° 11. Valores de Coeficiente de correlación cofenética para cada coeficiente de similitud utilizando el programa Past versión 2.17b.

Coeficiente de similitud	Coeficiente de correlación cofenética “r”	
	<i>M. roreri</i>	<i>M. pernicioso</i>
JACCARD	0.9554	0.9371
DICE	0.9538	0.9331

Otra forma de realizar una validación de los análisis de agrupamiento es realizando una validación relativa y/o Bootstrapping (Sokal R. y Rohlf F., 1994). Por ejemplo autores como Phillips W., (2003) y Ploetz R., et al., (2005) utilizaron los valores Bootstrap como soporte de los grupos generados en sus dendogramas para aislados de *M. roreri* y *M. pernicioso* respectivamente.

De esta manera los dendogramas obtenidos para caracterizar a las poblaciones de hongos de *M. roreri* y *M. pernicioso* son a partir del coeficiente de similitud de Jaccard (Figura N°32 y 34).

Tabla N° 12. Matriz de distancias genéticas entre los aislamientos de *Moniliophthora roreri* según el modelo de distancia de Jaccard.

	MR1	MR2	MR3	MR4	MR5	MR6	MR7	MR8	MR9	MR10	MR11	MR12	MR13	MR14	MR15	MR16	MR17	MR18	MR19	MR20	MR21	
MR1	1.00																					
MR2	0.97	1.00																				
MR3	0.96	0.98	1.00																			
MR4	0.74	0.72	0.72	1.00																		
MR5	0.84	0.86	0.88	0.75	1.00																	
MR6	0.86	0.88	0.89	0.76	0.94	1.00																
MR7	0.87	0.89	0.89	0.76	0.93	0.97	1.00															
MR8	0.85	0.87	0.87	0.77	0.91	0.94	0.96	1.00														
MR9	0.85	0.87	0.89	0.75	0.94	0.97	0.97	0.94	1.00													
MR10	0.86	0.87	0.89	0.76	0.94	0.98	0.98	0.94	0.98	1.00												
MR11	0.84	0.85	0.85	0.78	0.91	0.93	0.94	0.91	0.94	0.94	1.00											
MR12	0.93	0.95	0.97	0.73	0.86	0.88	0.88	0.85	0.88	0.89	0.88	1.00										
MR13	0.87	0.89	0.91	0.77	0.95	0.97	0.96	0.93	0.97	0.97	0.94	0.91	1.00									
MR14	0.77	0.79	0.80	0.68	0.83	0.87	0.86	0.83	0.87	0.87	0.82	0.79	0.86	1.00								
MR15	0.90	0.92	0.93	0.71	0.82	0.87	0.86	0.83	0.86	0.86	0.84	0.95	0.87	0.82	1.00							
MR16	0.85	0.87	0.88	0.76	0.92	0.97	0.96	0.93	0.96	0.96	0.93	0.88	0.96	0.88	0.89	1.00						
MR17	0.91	0.93	0.94	0.72	0.83	0.88	0.87	0.85	0.87	0.87	0.85	0.97	0.88	0.81	0.97	0.89	1.00					
MR18	0.92	0.93	0.93	0.71	0.83	0.87	0.87	0.84	0.86	0.87	0.84	0.95	0.87	0.79	0.95	0.88	0.96	1.00				
MR19	0.86	0.88	0.89	0.77	0.91	0.96	0.95	0.92	0.95	0.95	0.92	0.89	0.96	0.88	0.89	0.97	0.90	0.89	1.00			
MR20	0.93	0.95	0.96	0.72	0.85	0.89	0.89	0.86	0.88	0.89	0.86	0.97	0.89	0.81	0.97	0.90	0.99	0.98	0.91	1.00		
MR21	0.92	0.94	0.94	0.73	0.83	0.88	0.88	0.85	0.87	0.87	0.85	0.95	0.87	0.80	0.97	0.88	0.97	0.97	0.90	0.98	1.00	

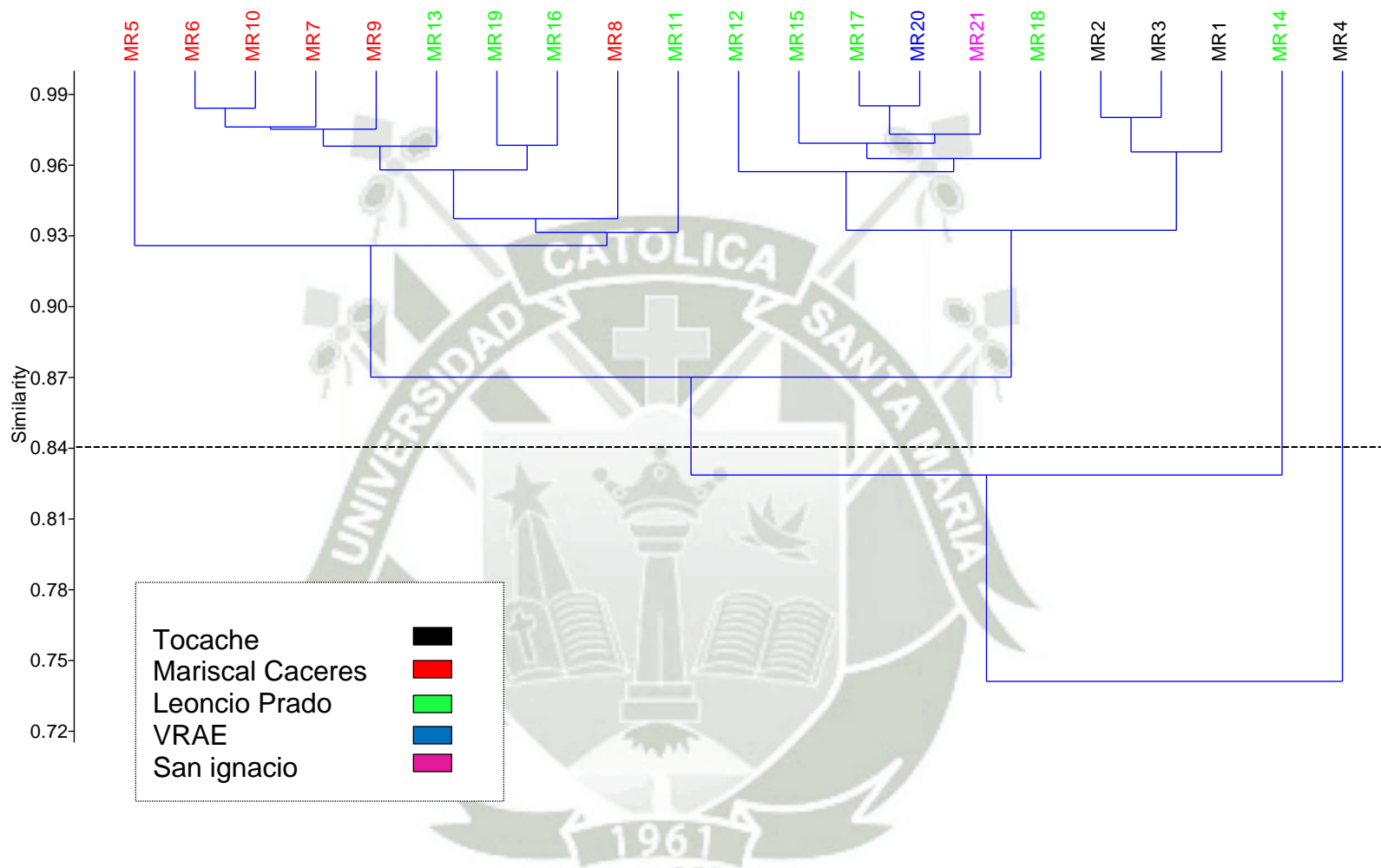


Figura N° 32. Dendrograma generado para 21 aislamientos de *Moniliophthora roreri* usando la técnica AFLP. El dendrograma se ha obtenido utilizando el método de agrupamiento UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Jaccard a un valor de 0.84 de similitud.

3.5.3 Análisis de agrupamiento

Moniliophthora roreri

El dendograma obtenido para el hongo *M. roreri*, generado a partir de la matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard (Tabla N°12), proporcionó una buena representación de la clasificación del material en estudio. En este dendograma podemos visualizar a 0.84 de similitud 3 grupos (I, II y III) los cuales se observan en la Figura N°32.

Grupo I, conformado por la mayoría de los aislados provenientes de cinco zonas cacaoteras pertenecientes a las provincias de Tocache, Mariscal Cáceres, Leoncio Prado, San Ignacio y la zona del VRAE. Contiene dos sub grupos a 0.87 de similitud; sub grupo IA conformado por MR5, MR6, MR7, MR8, MR9 MR10, MR11, MR13, MR16 y MR19 pertenecientes a las provincias de Mariscal Caceres y Leoncio Prado; y sub grupo IIB contiene aislamientos de Leoncio prado, Vrae, San Ignacio y Tocache conformado por MR1, MR2, MR3, MR12, MR15, MR17, MR18, MR20 y MR21.

Grupo II compromete un solo aislamiento MR14 perteneciente a la provincia de Leoncio Prado, departamento de Huanuco.

Grupo III de igual manera compuesto por un solo aislamiento MR4 perteneciente a la Provincia de Tocache, departamento de San Martin.

Todos los aislados estudiados de *M. roreri* comparten un porcentaje de similitud de 74%, este porcentaje también podría expresarse como disimilitud representado por el 26% de diferencia en el tipo de tamaño de fragmentos polimórficos. En este punto se disgregan dos ramas una de ellas esta conformada por el aislamiento que compromete al Grupo III y la otra rama conformada por el resto de aislados. En esta segunda rama los aislados comparten un 83% de similitud y es el punto donde ocurre otra bifurcación y

separándose el Grupo I y Grupo II. El grupo I conformado por la mayoría de los aislados presenta 87% de similitud y esta dividido en dos sub grupos, uno de ellos Sub grupo IA que presenta 92% de similitud entre los aislados y Sub grupo IB que comparten el 93% de similitud.

Los aislados que conforman el grupo II y III muestran un moderado nivel de diferenciación dentro del grupo total de *M. roreri*. Estos resultados muestran que algunos aislamientos pertenecientes a Leoncio Prado y Tocache posiblemente estén generando una variabilidad genética importante.

En general el dendograma indica que las muestras de *Moniliophthora roreri* no muestran un patrón sólido de agrupación con respecto al origen geográfico de las muestras, ya que podemos observar en cada grupo o cluster individuos cuyos orígenes geográficos son heterogéneos lo que podría estar indicando que existe intercambio genético entre las poblaciones ya que el movimiento de genes facilita la similitud entre las poblaciones, de todos modos no se puede afirmar del todo ya que se tendría que trabajar con una mayor cantidad de aislamientos sobretodo de las zonas productoras de San Ignacio y VRAE ya que precisamente de estos lugares solo se trabajó con un aislamiento de cada zona. Lo mencionado anteriormente podría estar apoyando la hipótesis de Dias L., (2001) y Bartley B., (2005); con respecto a la distribución del cacao quienes afirman que los agricultores son los responsables de la selección de los clones de cacao el cual posiblemente estaría influenciando en la distribución de la enfermedad.

A continuación en la Figura N°33 se encuentran marcados los puntos de cada zona cacaotera de donde fueron recolectados cada aislamiento de *M. roreri*, de este modo se tuvo en cuenta la adaptabilidad del patógeno en cada ambiente.

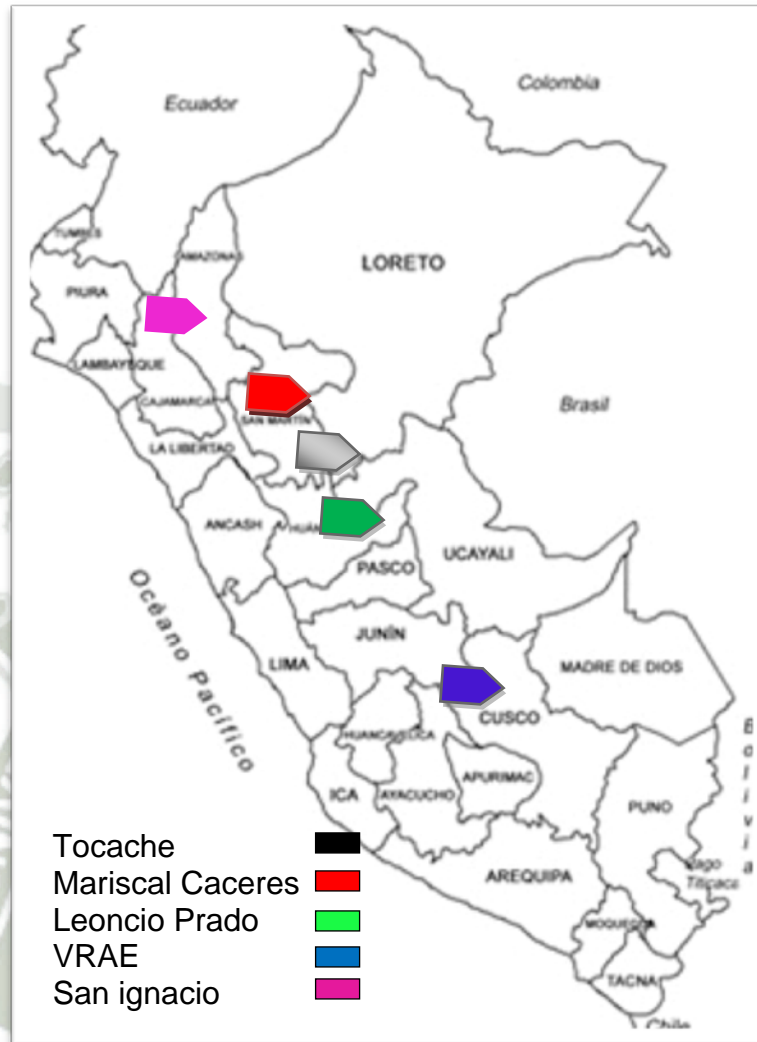


Figura N° 33. Principales zonas productoras de donde fueron recolectados los aislamientos de *M. roreri*. Fuente: Elaboración propia.

Evans C., (1981) afirma que las esporas del hongo *M. roreri* están en el aire y son fácilmente dispersados por el viento. Esta teoría también es corroborada por Phillips W., (2003) ya que describe que las esporas del hongo podrían ser transportadas por el hombre, agua, viento y/o animales. Es importante resaltar que estas provincias selváticas están interconectadas por vías terrestres y fluviales (principalmente por el río Huallaga), lo que llevaría a pensar que la enfermedad estaría siendo también transportada por estas vías.

Por otro lado Rios R., (2004) menciona que desde que surgió la enfermedad al norte del Perú, los organismos gubernamentales responsables del control fitosanitario no se preocuparon por establecer medidas de cuarentena para evitar la propagación de esta enfermedad, por lo tanto otra teoría del modo de dispersión de este hongo en nuestro territorio pudo haber sido a causa del intenso comercio y tráfico en la región fronteriza con Ecuador.

Habiéndose obtenido el dendograma se puede observar que si existe variabilidad de *M. roreri* en nuestro país por la generación de tres grupos a partir de los marcadores generados por la técnica AFLP, difiriendo con lo propuesto por Phillips W., (2003) quien trabajando con AFLP y SSR, y aislamientos pertenecientes a Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Panamá, Costa Rica, Nicaragua y Honduras, concluye que Perú posee un solo grupo genético habiendo analizado solo dos aislamientos provenientes de los departamentos de Huanuco y San Martín, que estarían incluidos en el grupo V denominado Bolívar junto con otras muestras aisladas de los países de Venezuela, Ecuador y Colombia. En este trabajo Phillips confirma la existencia de cinco grupos genéticos de *M. roreri* reportando a Colombia como el centro origen del hongo basándose en el alto grado de variabilidad entre sus aislados.

Por otro lado el uso de distintas combinaciones de cebadores utilizados en esta investigación podría servir como un aporte más a lo estudiado con referencia a Phillips W., (2003) por lo que se trabajó con otras combinaciones de cebadores que también proporcionaron buena información.

Cunha R., (2006) quien trabajó con marcadores generados por RAPD y SSR con aislados de Perú y Ecuador reportó que existe un elevado índice de diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas, siendo Perú la población que poseía la más alta variabilidad genética, lo que indicaría la buena adaptación del patógeno a las condiciones ambientales y las del hospedero.

Por otro lado Silva M., (2011) quien trabajó con marcadores moleculares generados por RAPD reportó la existencia de tres grupos polimórficos, utilizando aislados de la misma zona geográfica que en esta investigación (Tocache, Mariscal Castilla y Leoncio Prado). En ese estudio Silva utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard para graficar su dendograma y obtuvo un valor de “r” de 0.8807, este valor se encuentra dentro del rango de buena correspondencia pero sin embargo fue menor al hallado en esta investigación. Esta diferencia se puede deber a la técnica utilizada ya que en esta investigación se trabajó con AFLPs que tiene una alta reproducibilidad y entrega mayor información por cada reacción que la técnica RAPD. Esto no significa que el dendograma no se pueda considerar, pero se debe tener en cuenta que los valores bajos de “r” indican alguna distorsión en la gráfica, no reflejando las distancias originales de la matriz.

Es relevante mencionar que existiendo variabilidad de *M. royeri* en nuestro país se podría hacer uso de estos resultados para contribuir con el programa de mejoramiento genético de cacao en Perú, ya que las pérdidas generadas por esta enfermedad son altas por lo que nuestro país no cuenta con un sistema de control fitosanitario controlado y muchas veces los controles culturales como podas no resultan suficientes y los controles químicos son caros para los agricultores de estas zonas que por otro lado podría ocasionar daños en el ambiente. Arguello O., (1999) propone recurrir al control biológico con el uso de micoparásitos o bacterias antagonistas, sin embargo estas alternativas requieren de mayor investigación. Por otro lado en algunos países se esta haciendo uso de variedades resistentes para controlar la enfermedad (Rios R., 2004) pero sin embargo en nuestro país los agricultores se muestran reacios a cultivar otro tipo de clon al CCN-51 ya que es muy usado en dichas zonas por sus características productivas (MINAG, 2003).

Tabla N° 13. Matriz de distancias genéticas entre los aislamientos de *Moniliophthora perniciosa* según el modelo de distancia de Jaccard.

	MP1	MP2	MP3	MP4	MP5	MP6	MP7	MP8	MP9	MP10	MP11	MP12
MP1	1.00											
MP2	0.71	1.00										
MP3	0.92	0.76	1.00									
MP4	0.72	0.87	0.78	1.00								
MP5	0.94	0.73	0.94	0.73	1.00							
MP6	0.76	0.77	0.81	0.77	0.79	1.00						
MP7	0.87	0.66	0.91	0.66	0.90	0.75	1.00					
MP8	0.85	0.65	0.92	0.65	0.88	0.74	0.93	1.00				
MP9	0.71	0.64	0.71	0.60	0.72	0.79	0.70	0.67	1.00			
MP10	0.53	0.44	0.53	0.43	0.50	0.59	0.50	0.48	0.56	1.00		
MP11	0.65	0.89	0.74	0.79	0.69	0.76	0.64	0.70	0.61	0.41	1.00	
MP12	0.72	0.89	0.80	0.87	0.74	0.79	0.67	0.66	0.63	0.45	0.84	1.00

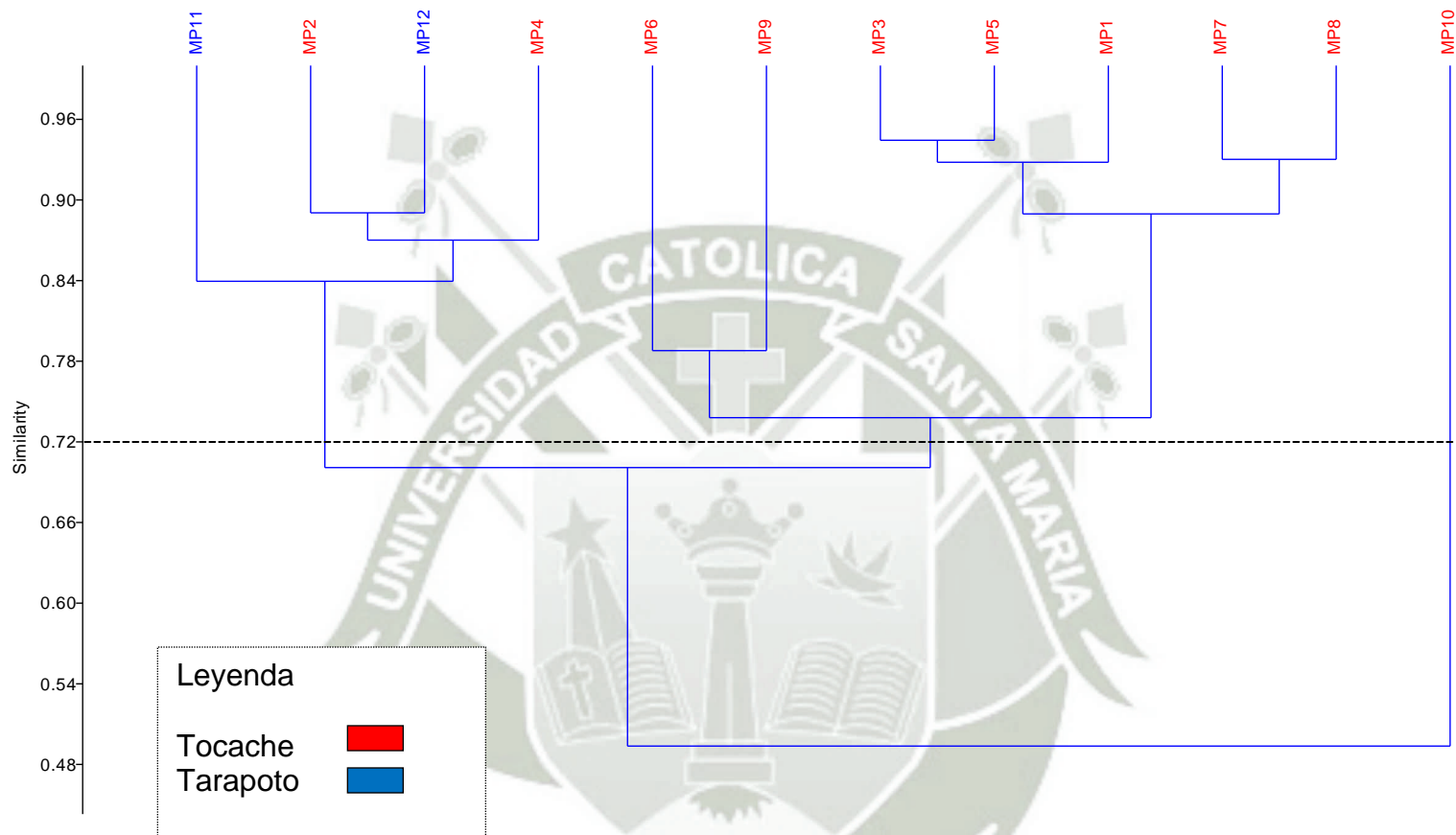


Figura N° 34. Dendrograma generado para 12 aislamientos de *Moniliophthora perniciosa* usando la técnica AFLP. El dendrograma se ha obtenido utilizando el método de agrupamiento UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Jaccard a un valor de 0.72 de similitud.

Moniliophthora perniciosa

Para en caso de *M. perniciosa*, los marcadores moleculares generados por la técnica AFLP fueron útiles para examinar los aislamientos de este importante patógeno. El dendograma generado a partir de la matriz de similitud (Tabla N°13) utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard nos proporcionó una buena representación del material en estudio. En este dendograma podemos visualizar a 0.72 de similitud 3 grupos (I, II y III) los cuales se observan en la Figura N°34.

Grupo I, incluye aislamientos de Tocache (MP2 y MP4) y Tarapoto (MP11 y MP12). Este cluster agrupa aislados de zonas productoras no adyacentes, pero que son conectadas por una serie de vías terrestres y fluviales (principalmente por el río Huallaga) que vienen a ser las vías de transporte de comercio más importante en esta área de estudio. Los dos aislamientos de Tarapoto aunque se estén agrupando con los aislamientos de Tocache no necesariamente pueden representar poca variabilidad, esto podría deberse al poco número de individuos que se pudieron analizar.

Grupo II, este grupo solo compromete aislados de Tocache que a su vez se divide en dos sub grupos a 0.74 de similitud. Sub grupo IIA que contiene los aislamientos MP6 y MP9 y sub grupo IIB que incluye a los aislamientos MP1, MP3, MP5, MP7 y MP8. Es interesante describir que este grupo está conformado por aislamientos obtenidos a partir de tallos provenientes de cacao CCN-51 (MP1, MP3, MP5, MP6 y MP7) con excepción de los aislamientos MP8 y MP9 que fueron aislados de cacaos Híbrido e Híbrido amarillo respectivamente; por lo que se podría asumir que existe alguna afinidad de este tipo de hongo por el clon de cacao CCN-51 y que cabe resaltar que es uno de los clones de cacao de mayor uso por los agricultores del Perú. (MINAG, 2003)

Grupo III, conformado por un solo aislamiento MP10 aislado de la región de Tocache. La peculiaridad de este aislamiento es que fue aislado de mazorca ya que como es sabido la enfermedad escoba de bruja puede atacar tanto al tallo como a la mazorca del cacao,

es interesante como este hecho pueda influir en la marcada separación de este aislado, se podría pensar que este aislado pueda tener alguna especificidad por infectar frutos pero esto solo podría comprobarse con otros estudios.

Todos los aislados estudiados de *M. pernicioso* comparten un porcentaje de similitud de 49%, como ya se había mencionado antes este porcentaje también podría expresarse como disimilitud representado por el 51% de diferencia en el tipo de tamaño de fragmentos polimórficos amplificados. En este punto se disgregan dos ramas una de ellas esta conformada por el aislamiento que compromete al Grupo III y la otra rama conformada por el resto de aislados. En esta segunda rama los aislados comparten un 70% de similitud y es el punto donde ocurre otra bifurcación separándose el Grupo I y Grupo II. El grupo I conformado por aislados de Tarapoto y Tocache presenta 84% de similitud. El Grupo II conformado por aislados solo de Tocache comparten un 74% de similitud y esta dividido en dos sub grupos, uno de ellos Sub grupo IIA que presenta 79% de similitud entre los aislados y Sub grupo IIB que comparten el 88% de similitud. El grupo III que compromete solo un aislamiento muestra un alto nivel de diferenciación dentro del grupo en estudio de *M. pernicioso* a pesar de que estas muestras fueron recolectadas del mismo departamento de San Martín, pertenecientes a las zonas productoras de Tarapoto y Tocache, este aislado posiblemente esté generando una variabilidad genética importante.

El dendograma obtenido para la especie *Moniliophthora pernicioso* muestra un alto nivel de diferenciación dentro del grupo total en estudio; sobretodo el aislamiento que se separó formando el Grupo III (MP10) que fue obtenido a partir de fruto y posiblemente esté generando una variabilidad genética importante comparado con los aislamientos provenientes de tallos y basidiocarpos (MP7 y MP12).

Con respecto al intercambio genético entre las dos poblaciones no se podría dar una idea muy clara ya que se trabajó con pocas muestras que no nos estarían brindando una real

información con respecto a que si cada población presenta un patrón de bandas parecidas o muy distintas.

Para tratar de determinar su modo de expansión Cunha R., (2006) menciona que es muy probable que la distribución de *M. pernicioso* este relacionado con la historia de la introducción del cacao en cada país. Se afirma que la planta de cacao proviene de la cabecera de la cuenca amazónica, dispersándose hacia el Este a lo largo del río Amazonas dando lugar al cacao Forastero, y al Norte y Oeste de los Andes por todo América central hasta el Sur de Mexico denominado Criollo (Dias L., 2001; Motamayor J., et al., 2002). De este modo también se presume que el origen de *M. pernicioso* sea la llanura amazónica la cual geográficamente se distribuyó por los países productores de cacao de América del Sur, Central y las islas del Caribe. Estos acontecimientos sugieren que el hongo se encuentra en condiciones óptimas para reproducirse, mostrando una amplia gama de diferentes poblaciones adaptables a las condiciones medioambientales y genotipos de cacao dispersos en cada país.

Por otro lado, estudios hechos por CABI, (2011) demostraron que las basidiosporas de *M. pernicioso* pueden ser distribuidas por el agua de lluvia, pudiendo ser esta una de las razones por la cual aislados de Tocache y Tarapoto se agrupan; sin dejar de lado el viento ya que ésta sin necesidad de ser un mecanismo activo podría ser una de las formas de dispersión de las esporas; estas hipótesis requieren de mayor investigación para ser afirmadas.

Los resultados obtenidos por Ploetz R., et al., (2005) donde estudiaron aislados de Brasil, Bolivia, Ecuador y Trinidad utilizando la técnica AFLP, revelaron que este fitopatógeno se agrupa de acuerdo a su país de origen pero existe notable similitud entre los aislados de la misma región geográfica, por otro lado los resultados obtenidos por Cunha R., (2006) quien trabajó con aislados de Brasil, Ecuador, Trinidad y Perú, confirman que las poblaciones de *M. pernicioso* son genéticamente distintas de acuerdo a su país de origen pero difiere con Ploetz R., et al., (2005) en la estructura de sus

poblaciones ya que Cunha R., (2006) confirma que también existe variabilidad dentro de sus poblaciones indicando que esta información pueda deberse al uso del marcadores generados por SSR que es más informativo que los AFLPs, utilizado por Ploetz R., et al., (2005). A pesar del tipo de marcador utilizado los resultados en esta investigación apoyan lo propuesto por Cunha R., (2006) ya que existe variabilidad entre las poblaciones de Tocache y Tarapoto.

La existencia de variabilidad tiene una importancia fundamental en el estudio de *M. pernicioso*, por lo que la obtención de un patrón de fragmentos amplificados específico de la especie puede ser de gran interés para la planificación de programas de control integrado de la enfermedad escoba de bruja, incluyendo la resistencia y mejora genética. Al igual que *Monilophthora roreri*, el hecho de observar variabilidad en estos dos patógenos que afectan al cacao podría representar un daño económico en la economía de muchas familias de nuestra amazonia que apuestan por este cultivo.

La técnica de AFLP ya se ha aplicado para estudios en hongos fitopatógenos obteniendo buenos resultados como por ejemplo, para la detección de la diversidad genética de *Cladosporium fulvum* y *Pyrenopeziza* (Majer D., et al. 1996), *Colletotrichum indemutianum* (González M., et al. 1998), Caracterización molecular de *Phaeoacremonium aleophilum* (Martín T., 2012); para el caso de las especies *M. roreri* y *M. pernicioso* esta técnica ha sido poco utilizada para el estudio de la variabilidad genética de estos dos hongos y no existen reportes de haber sido aplicada antes a poblaciones peruanas. Hasta la fecha solo se han reportado dos estudios de variabilidad genética, una de ellas de *Monilophthora pernicioso* utilizando aislados de Bolivia, Brasil, Ecuador y Trinidad (Ploetz R., et al. 2005) y el otro para *Monilophthora roreri* provenientes de Colombia, Ecuador y Centro America (Phillips W., 2003).

3.5.4 Análisis de la variabilidad poblacional

Milgroom G., (1996) y McDonald A., et al., (1996); afirman que el estudio de variabilidad de las poblaciones permite hacer inferencias sobre los procesos de evolución que afectan dentro y entre poblaciones. Estos análisis coadyuvan al conocimiento de los factores que inciden directamente sobre la composición genética y la evolución potencial de las poblaciones de fitopatógenos. Para este análisis se trabajó con el programa Popgene versión 1.32 (Yeh F., et al., 1997), presentando a continuación los resultados para cada especie estudiada.

Moniliophthora roreri

Para el análisis de variabilidad poblacional los aislamientos de *M. roreri* se dividieron en tres poblaciones según su origen geográfico: Tocache, Mariscal Cáceres y Leoncio Prado. Debido a que las muestras aisladas de las zonas del VRAE y San Ignacio son individuos y no constituyen poblaciones estas no se consideraron en el estudio de variabilidad poblacional de esta especie. Los resultados de este análisis se observan en la Tabla N°14.

Tabla N° 14. Estimación de la variabilidad genética para tres poblaciones de *M. roreri*.

	PPL %	na	St. Dev	ne	St. Dev	h	St. Dev	Gst
Tocache	26.14	1.2614	0.4402	1.1659	0.2853	0.1009	0.1708	
Mariscal Cáceres	8.71	1.0871	0.2825	1.0437	0.1537	0.0282	0.0943	
Leoncio Prado	23.48	1.2348	0.4247	1.1241	0.2735	0.0746	0.1497	
Entre Poblaciones	41.67	1.4167	0.4939	1.1371	0.2532	0.0896	0.1415	0.2950

* %PPL = Porcentaje de loci polimórfico, * na = Número de alelos observados, * ne = Número efectivo de alelos, * h = Diversidad genética de Nei, * G_{ST} = Coeficiente de diferenciación genética.

Los resultados arrojaron que el porcentaje de loci polimórfico total (%PPL) fue de 41.67%, mientras que la población donde se encontró mayor polimorfismo fue Tocache con 26.14%, seguida por la población de Leoncio Prado con 23.48% y por último Mariscal Cáceres con 8.71%. El resultado de %PPL entre poblaciones nos indica que existe una moderada variabilidad genética siendo entre las tres poblaciones la perteneciente a Tocache la que posee mayor variabilidad.

El número de alelos observados (**na**) vario de 1.0871 (Mariscal Cáceres) a 1.2614 (Tocache); los resultados obtenidos de “na” ratifican la observación general tal como Bonamico N., et al., (2004); quienes afirman que a medida que aumentan los alelos observados se incrementa el %PPL. Los valores del número efectivo de alelos (**ne**) vario de 1.0437 (Mariscal Cáceres) a 1.1659 (Tocache) ver tabla N°14, siendo la población de Tocache la que poseía valores mas altos con respecto a las dos poblaciones.

Una mejor y generalizada medida de la variación es la heterocigosidad o coeficiente de Diversidad genética de Nei (**h**), el resultado entre las tres poblaciones fue de 0.0896 y dentro de cada población la de Tocache fue la que obtuvo el valor más alto de diversidad genética, seguido por Leoncio Prado y por último Mariscal Cáceres; estos valores se observan en la Tabla N°14. Los valores de este coeficiente varían entre 0 y 1 y se maximiza cuando hay muchos alelos cuyas frecuencias son iguales, por lo tanto se podría asumir que en las tres poblaciones existen poca cantidad de alelos que poseen frecuencias iguales.

El coeficiente de diferenciación genética (**G_{ST}**) es un indicador del grado de diferenciación entre poblaciones, el valor obtenido fue relativamente bajo (0.2950; 29.5%). Los valores de G_{ST} menores de 0.5 nos indica que los aislamientos de *M. roreri*

son más diversos dentro de una misma población que entre poblaciones y que aproximadamente el 29% de la variación detectada se debe a la diferenciación entre los individuos de una misma población.

Los resultados obtenidos en este estudio fluctúan con los reportados por Cunha R., (2006) el cual trabajando con la técnica SSR obtuvo un valor de %PPL de 57,14% para la población de Perú y 28,57% para la población de Ecuador. Por otro lado los resultados de porcentaje de loci polimórfico difieren a los obtenidos por Silva M., (2011) quien trabajó con la técnica RAPD y utilizando muestras que corresponden a la misma área geográfica de este estudio obtuvo un %PPL total de 71% siendo la población de Leoncio Prado la que mayor porcentaje de loci polimórfico presentaba con un 64%.

El valor de diversidad genética de Nei obtenido por Silva M., (2011) para todos los loci estudiados fue de 0.2767 este valor fue más alto que el obtenido en este estudio, pero igual mantiene la frecuencia de alelos diferentes entre las poblaciones.

El valor de G_{st} obtenido por Cunha R., (2006) utilizando SSR difieren ya que su valor fue de 0.74 representando el 74% que indicaría que los aislamientos son más diversos entre poblaciones, la explicación que brinda a ese resultado es que podría ser el alto grado de patogenicidad del hongo y la amplia susceptibilidad del huésped. Por otro lado Silva M., (2011) reportó el valor de 0,1729 coincidiendo dentro del rango obtenido en este estudio que la variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones. Estos resultados conllevan a realizar estudios más específicos para determinar la real variabilidad del hongo entre las poblaciones.

Las distancias genéticas entre las distintas poblaciones se calcularon utilizando la distancia genética de Nei (**D**). Díaz M., (2011); afirma que cuando los valores de distancia se acercan más a 0 significa que las poblaciones comparadas tienen frecuencias alélicas idénticas entre sí, y entre mayores sean los valores, indica que las poblaciones no comparten similitud de alelos. En la Tabla N°15, se muestra la matriz de Identidad

genética (sobre diagonal) y Distancia genética (debajo de la diagonal) basados en Nei M., (1972).

Tabla N° 15. Matriz de Identidad genética y Distancia genética basados en Nei M., (1972) entre las tres poblaciones de *M. roreri* estudiadas.

Pop ID	1	2	3
1	***	0.9340	0.9591
2	0.0682	***	0.9706
3	0.0417	0.0298	***

*Pop1: Tocache, Pop2: Mariscal Cáceres, Pop3: Leoncio Prado.

Los valores de Identidad genética (**I**) reflejaron un alto grado de similitud entre cada población con un valor promedio de 0.9545 mostrando que entre las poblaciones de *M. roreri* existe poca diferencia genética entre sí, esto se puede deber a que el hongo se deba estar desarrollando en una forma clonal.

Con los datos obtenidos de distancia genética de Nei, el programa Popgene generó un dendograma donde nos muestra que la población de Tocache se aísla formando un grupo diferente a las dos poblaciones restantes, mientras que las poblaciones más cercanas son Mariscal Cáceres con Leoncio Prado con una distancia genética de 0.0298 y las poblaciones más alejadas son las poblaciones de Tocache con Mariscal Cáceres con un valor de distancia genética de 0.0682.



Figura N° 35. Dendrograma construido con el método UPGMA para *Moniliophthora roreri* basado en la distancia genética de Nei M., (1972).

Estos datos obtenidos del análisis de población son una herramienta más para determinar el nivel de variabilidad del hongo *M. roreri* demostrando que existe variabilidad entre las poblaciones, siendo Tocache la que se diferencia entre ellas como se observa en la Figura N°35.

Para determinar la variabilidad poblacional entre las muestras que se encontraban conservadas y las muestras que recién fueron aisladas se realizó un estudio entre las dos poblaciones utilizando los mismos parámetros, los resultados se muestran en la Tabla N°16.

Tabla N° 16. Estimación de la variabilidad genética para las poblaciones conservadas y aisladas de *M. roreri*.

	PPL%	na	St. Dev	ne	St. Dev	h	St. Dev	Gst
Población conservada	11.36	1.1136	0.318	1.0584	0.1919	0.0359	0.1084	
Población aislada	39.77	1.3977	0.4904	1.1057	0.1822	0.0775	0.1134	
Entre Poblaciones	41.67	1.4167	0.4939	1.1381	0.2663	0.0882	0.1442	0.3324

* %PPL = Porcentaje de loci polimórfico, * na = Número de alelos observados, * ne = Número efectivo de alelos, * h = Diversidad genética de Nei, * Gst = Coeficiente de diferenciación genética.

Los resultados obtenidos indican que la población aislada presenta mayor porcentaje de loci polimórfico (%PPL) con un 39.77% que la población conservada con un 11.36%.

Los valores más altos del número de alelos observados (**na**) y número efectivo de alelos (**ne**) los posee la población aislada, estos valores fueron 1.3911 y 1.1057 respectivamente (Tabla N°16).

Para medir que población es más heterocigota o la que presenta mayor diversidad, se halló la diversidad genética de Nei (**h**), siendo la población aislada la que presentó mayor diversidad con un valor de 0.0775.

Habiendo obtenido un valor de 0.3324 para el coeficiente de diferenciación genética (**Gst**) indica que las poblaciones son más diversas dentro de una misma población.

Estos resultados nos podrían indicar que el genoma de esta especie a través del tiempo va desarrollando mayor variabilidad, un dato bastante alarmante tratándose de un hongo que desde su aparición viene ocasionando pérdidas alarmantes en el cultivo del cacao.

Las poblaciones aisladas y conservadas presentan 0.9404 de Identidad genética (Tabla N°17), lo que estaría indicando que existe poca diferencia entre estas dos poblaciones. Con los datos de distancia genética el programa Popgene generó un dendograma (Figura N°36) donde indica que estas poblaciones son distantes en un 0.0614.

Tabla N° 17. Matriz de Identidad genética (encima diagonal) y Distancia genética (debajo diagonal) basados en Nei M., (1972) entre las poblaciones conservadas y aisladas pertenecientes a la especie *M. royeri*.

Pop ID	1	2
1	***	0.9404
2	0.0614	***

*Pop1: Conservada, Pop2: Aislada.

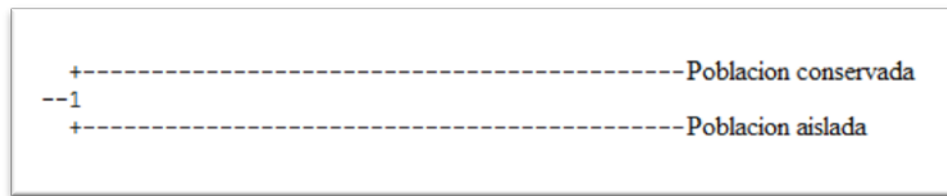


Figura N° 36. Dendrograma construido con el método UPGMA para *Moniliophthora roreri* entre las poblaciones conservadas y aisladas, basado en la distancia genética de Nei M., (1972).

Moniliophthora perniciosa

Para el análisis de variabilidad poblacional de los aislamientos de *M. perniciosa* se trabajó con dos poblaciones, Tocache y Tarapoto. Los resultados se observan en la Tabla N°18.

Tabla N° 18. Estimación de la variabilidad genética para dos poblaciones de *M. perniciosa*.

	PPL%	na	St. Dev	ne	St. Dev	h	St. Dev	Gst
Tocache	65.94	1.6594	0.4756	1.2837	0.2918	0.1854	0.1616	
Tarapoto	8.70	1.0870	0.2828	1.0870	0.2828	0.0435	0.1414	
Entre Poblaciones	67.39	1.6739	0.4705	1.2937	0.3166	0.1866	0.1696	0.2787

* %PPL = Porcentaje de loci polimórfico, * na = Número de alelos observados, * ne = Número efectivo de alelos, * h = Diversidad genética de Nei, * Gst = Coeficiente de diferenciación genética.

El porcentaje de loci polimórfico (%PPL) obtenido entre las poblaciones de *M. perniciosa* estudiadas fue de 67.39%. La población de Tocache posee el 65.94% y Tarapoto el 8.7%. Este valor de %PPL en Tarapoto podría deberse a que solo se hizo el análisis con dos aislados.

Los valores de número de alelos observados (**na**) fueron de 1.0870 y 1.6594 para Tarapoto y Tocache respectivamente, estos resultados ratifican la observación general tal como Bonamico N., et al., (2004); quienes afirman que a medida que aumentan los alelos observados se incrementa el %PPL. Para el caso del número efectivo de alelos (**ne**) los valores obtenidos fueron de 1.0870 y 1.2837 para las poblaciones de Tarapoto y Tocache respectivamente.

El coeficiente de Diversidad genética de Nei (**h**) entre las dos poblaciones fue de 0.1866 y para las poblaciones provenientes de Tocache y Tarapoto fueron de 0.1854 y 0.0435 respectivamente. El valor total de **h** indica que en las dos poblaciones existen poca cantidad de alelos que poseen frecuencias iguales.

El coeficiente de diferenciación genética (**Gst**) fue de 0.2787 (27.87%) este valor nos indica que los aislamientos de *M. pernicioso* son mas diversos dentro de un mismo grupo que entre grupos y que aproximadamente el 27% de la variación detectada se debe a la diferenciación entre los individuos de una misma población.

El %PPL total para *M. pernicioso* indica un alto grado de variabilidad genética entre las poblaciones de Tocache. Este resultado podría deberse a que nos encontramos cerca del posible centro de origen del hongo. Sin embargo según los datos obtenidos por Cunha R., (2006) que utilizando la técnica SSR muestran valores bajos, obteniendo 0.85% de %PPL del total de las poblaciones estudiadas, correspondiéndole a Perú y Trinidad 0.43%, Ecuador 0.57% y Brasil 0.86%. Hay que tener en cuenta que los marcadores generados por SSR o microsatélites analizan secuencias específicas del genoma que en esta especie no serian altamente variables lo que impediría a nivel de estos cebadores realizar un estudio de variabilidad, mientras que la técnica AFLP cubre varias partes del genoma, haciéndolo también específico debido al uso de enzimas de restricción y adaptadores y tiene como ventaja que no se necesita conocer previamente la secuencia del genoma, contrario a los microsatélites que si se trata de adecuar para especies en los cuales no existen cebadores disponibles los costos de desarrollo se elevan.

Los valores de G_{st} obtenido por Cunha R., (2006) para sus poblaciones de Brasil, Ecuador, Trinidad y Perú fueron bajos siendo que para la población de Perú fue de 0.03 más bajo que el obtenido en este estudio. Cunha explica que quizá no fue muy efectiva la estrategia de muestreo en cada país ya que los aislamientos pertenecen a la parte occidental donde no se detecta variación o también podría deberse a lo mencionado anteriormente que pueden haberse analizado secuencias que no son variables en esta especie. Sin embargo estos valores caen dentro del rango menor a 0.5 que indica que las poblaciones son más diversas dentro de las poblaciones que entre ellas, indicando que las posibles causas de esta diferenciación genética entre cada país podrían ser atribuidas a las barreras topográficas, la vegetación, las diferencias climáticas, las barreras genéticas seguida por eventos de colonización del hongo o una combinación de estos factores que estarían influenciando en el poco flujo de genes.

Las distancias genéticas entre las dos poblaciones se calcularon utilizando la distancia genética de Nei (**D**). En la Tabla N°19, se muestra la matriz de Identidad genética (sobre diagonal) y Distancia genética (debajo de la diagonal) basados en Nei M., (1972). Díaz M., (2011) menciona que cuando los valores de distancia se acercan más a 0 significa que las poblaciones comparadas tienen frecuencias alélicas idénticas entre sí, y entre mayores sean los valores, indica que las poblaciones no comparten similitud de alelos.

Tabla N° 19. Matriz de Identidad genética y Distancia genética basados en Nei M., (1972) entre las dos poblaciones de *M. pernicioso* estudiadas.

Pop ID	1	2
1	***	0.9030
2	0.1020	***

*Pop1: Tocache, Pop2: Tarapoto.

Los valores de identidad genética (**I**) reflejaron un alto grado de similitud entre las poblaciones de Tocache y Tarapoto con un valor de 0.9030; este valor nos dice que entre

las poblaciones de *M. perniciosa* existe poca diferencia genética entre sí, el valor obtenido se puede deber a que se utilizó poco número de muestras en la población de Tarapoto la cual no estaría representando correctamente dicha población o también otra causa podría ser que el hongo se pueda estar reproduciendo en forma clonal.

Con los datos obtenidos de distancia genética de Nei M., (1972), el programa Popgene generó un dendograma donde nos muestra que la población de Tocache y Tarapoto son distantes en 0.1020 (Figura N°37).



Figura N° 37. Dendograma construido con el método UPGMA para *Moniliophthora perniciosa* basado en la distancia genética de Nei M., (1972).

En el presente estudio se encontró una alta variabilidad entre poblaciones de *M. perniciosa* debido a su %PPL, siendo la población de Tocache la que poseía la mayor parte del total de variabilidad, MacDonald A. y McDermott J., (1993) afirman que este alto nivel de variabilidad genética brinda al patógeno la posibilidad de adaptarse más rápidamente a hospederos resistentes y/o fungicidas, lo cual si no se lleva un control de la enfermedad el porcentaje de incidencia del hongo podría aumentar.

La importancia de haber observado variabilidad entre los aislados de cada especie de hongo puede hacer posible la utilización de estos datos en Programas de mejoramiento genético del cacao, haciendo uso de las diferencias genéticas de cada patotipo con cada clon de cacao, que permita seleccionar clones que brinden resistencia a estas enfermedades, ya que este cultivo ha cobrado gran importancia en estos últimos años en nuestro país.

Para determinar la variabilidad poblacional entre las muestras que se encontraban conservadas y las muestras que recién fueron aisladas se realizó un estudio entre las dos poblaciones utilizando los mismos parámetros así como se realizó anteriormente; los resultados se muestran en la Tabla N°20.

Tabla N° 20. Estimación de la variabilidad genética para las poblaciones conservadas y aisladas de *M. pernicioso*.

	PPL%	na	St. Dev	ne	St. Dev	h	St. Dev	Gst
Población conservada	21.74	1.2174	0.414	1.2174	0.414	0.1087	0.207	
Población aislada	65.22	1.6522	0.478	1.3062	0.3152	0.1939	0.1723	
Entre Poblaciones	67.39	1.6739	0.4705	1.2937	0.3166	0.1866	0.1696	0.0798

* %PPL = Porcentaje de loci polimórfico, * na = Número de alelos observados, * ne = Número efectivo de alelos, * h = Diversidad genética de Nei, * Gst = Coeficiente de diferenciación genética.

La población con mayor porcentaje de loci polimórfico (**%PPL**) fue la población aislada con un 65.22% que la población conservada con un 21.74%.

Los valores más altos del número de alelos observados (**na**) y número efectivo de alelos (**ne**) los posee la población aislada, siendo los valores obtenidos 1.6522 y 1.3062 respectivamente (Tabla N°20).

El coeficiente de Diversidad genética de Nei (**h**) mide que población es más heterocigota o la que presenta mayor diversidad, siendo la población aislada la que presentó mayor diversidad con un valor de 0.1939.

Habiendo obtenido un valor de 0.0798 para el coeficiente de diferenciación genética (**Gst**) indica que las poblaciones son más diversas dentro de una misma población.

Al igual que con la especie *M. roseri*, estos resultados indican que el genoma del hongo *M. pernicioso* a través del tiempo va desarrollando mayor variabilidad, la cual como se indicó anteriormente tratándose de dos hongos fitopatógenos que afectan al cultivo del cacao, esta variabilidad podría sugerir mayor agresividad para atacar a su huésped.

Las poblaciones aisladas y conservadas presentan 0.9703 de Identidad genética (Tabla N°21), lo que indica que existe poca diferencia entre estas dos poblaciones. Con los datos de distancia genética el programa Popgene generó un dendograma (Figura N°38) donde indica que estas poblaciones son distantes en un 0.0302.

Tabla N° 21. Matriz de Identidad genética (encima diagonal) y Distancia genética (debajo diagonal) basados en Nei M., (1972) entre las poblaciones conservadas y aisladas pertenecientes a la especie *M. pernicioso*.

Pop ID	1	2
1	***	0.9703
2	0.0302	***

*Pop1: Conservada, Pop2: Aislada.

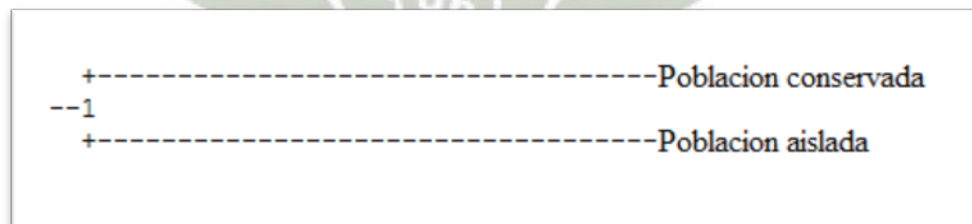


Figura N° 38. Dendograma construido con el método UPGMA para *Moniliophthora pernicioso* entre las poblaciones conservadas y aisladas, basado en la distancia genética de Nei M., (1972).

IV. CONCLUSIONES

1. De las 13 muestras infectadas con moniliasis se aisló al hongo *M. royeri* con micelio de color crema-café claro/oscuro y textura afelpada; y de las 10 muestras infectadas con escoba de bruja se logró aislar al hongo *M. pernicioso* con micelio de color blanco en forma algodonosa; microscópicamente también se observaron las características propias de cada especie perteneciente a los basidiomicetos.
2. En la técnica de extracción de DNA el uso de arena estéril, perla acrílica y del equipo fast prep permitieron la obtención exitosa del DNA considerándose como aporte a futuras investigaciones con dichas especies. El promedio de la cuantificación de DNA de los aislados fue para la especie *M. royeri* 441.4 ng/ μ l y para la especie *M. pernicioso* 1197.1 ng/ μ l.
3. Se aplicó la técnica de AFLP empleada para vegetales estableciéndose como protocolo para estas dos especies, así como la utilización de nuevas combinaciones de cebadores como la N°8, 13 y 15 para *M. royeri* y las combinaciones N°4, 6 y 7 para *M. pernicioso*; que fueron las que generaron mayor cantidad de fragmentos polimórficos, considerándose como un nuevo aporte al estudio de estas especies.
4. Para los 21 aislamientos de *M. royeri* se generaron tres grupos a 0.84 de similitud y para los 12 aislamientos de *M. pernicioso* se generaron tres grupos a 0.72 de similitud; las poblaciones de Tocache de cada especie fueron las que presentaron mayores fragmentos polimórficos y los valores de diferenciación genética (Gst) para las dos especies estuvieron dentro del rango que indica que los individuos de una población presentan mayor variabilidad que entre poblaciones. Los análisis realizados a las poblaciones conservadas y aisladas de cada especie indican que las poblaciones aisladas fueron las que poseían mayor variabilidad.

V. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda ampliar el estudio con muestras significativas recolectadas de las 11 zonas productoras de cacao que con ayuda de los marcadores moleculares nos permitirá obtener una visión más general sobre la variabilidad genética de estas dos especies de hongos en nuestro país.
2. Caracterizar la relación patógeno – huésped con el objetivo de encontrar la interacción entre planta y patotipo y también la interacción patotipo – ambiente, a fin de poder diferenciar clones de cacao resistentes de los susceptibles, ya que es un carácter muy importante para el mejoramiento y selección que junto con otros caracteres agronómicos llevaría al desarrollo de programas de mejoramiento genético del cacao.
3. Para futuros estudios de variabilidad genética de estas dos especies de hongos, se recomendaría el uso de técnicas que generen marcadores codominantes ya que contienen mayor información genética por locus.
4. Se recomendaría implementar análisis de mapeo genético enfocado a la búsqueda de genes como patogenicidad y también secuenciación del genoma de estos hongos fitopatógenos el cual permitirá conocer los recursos moleculares con que cuentan estos dos hongos para poder invadir y provocar daños a su hospedero.

VI. BIBLIOGRAFIA

- **Agrios G.** Plant Pathology. Fifth edition. (London, UK). Elsevier Academic. 2005; 922p.
- **Aime MC, Phillips W.** The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao L.*) form a new lineage of Marasmiaceae. Mycologia (Lawrence). 2005; 97: 1012-22p.
- **Albuquerque S, Bastos CN, Luz MN, Silva VM.** Doenças do cacauero (*Theobroma cacao*). Manual de Fitopatologia. (Livroceres, Piracicaba, Brasil). 2005; 2: 151-163p.
- **Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell.** Introductory Mycology. Fourth edition. (New York). 1996; 868p.
- **Amores F, Agama J, Mite F, Jiménez J, Loor G, Quiroz J.** EET 544 y EET 558 nuevos clones de cacao nacional para la producción bajo riego en la Península de Santa Elena. Estación Experimental Tropical "Pichilingue". (Quevedo, Ecuador) Boletín divulgativo 134. 2009; 45 p.
- **Ampuero E.** Monilia pod rot of cocoa. Cocoa Grower's Bulletin. 1967; 9: 15-18p.
- **Aranzazu F.** Comportamiento de los frutos de cacao afectados por monilia dejados sobre el suelo. 10ª Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. (Santo Domingo, República Dominicana). 1987; 457-460p.
- **Arbelaez L.** Analisis de la diversidad intraespecie de *Moniliophthora roreri* (cif.) Evans et al. por medio de marcadores morfologicos y geneticos. Tesis de Magister. Medellin: Universidad de Colombia. 2010.
- **Arévalo E, Hernández A.** La moniliasis, una nueva enfermedad del cacao en el Perú. Fitopatología (ALF). 1990; 4: 25p.
- **Arévalo E, Ram A.** La moniliasis del cacao en el Perú. Pura Selva. 1997; 156: 35-39p.
- **Arévalo E.** La moniliasis del cacao en el Perú. Reseña Histórica. Instituto de Cultivos Tropicales. (San Martín, Perú). 1999. 2 p.

- **Arguello O.** Moniliasis. Seminario Nacional de Actualización en Cacao con Énfasis en Rehabilitación de Plantaciones. Convenio Ministerio de Agricultura e ICA. (Manizales, Colombia). 1990; 98-110p.
- **Baker ED, Holliday P.** Witches' broom disease of cacao. The Common wealth Mycological Institute. 1957; 2: 39p.
- **Bancroft K.** Colletotrichum luxifucum, Van Hall and Drost. In A handbook of the fungus diseases of West Indian plants. (London). 1910.
- **Bartley B.** The genetic diversity of cacao and its utilization. CABI International, (Wallingford). Tropical Plant Biol. 2005.
- **Bastos C.** Capacidade de *Crinipellis pernicioso* producir basidiósporos viáveis em vassouras com três anos de idade e de infectar tecidos do cacaeiro com gemas dormentes. Fitopatologia Brasileira. 1994; 19: 585-587p.
- **Bazan C.** Escoba de brujas del cacao em Bagua. Centro Nacional de Investigacion y Experimentacion Agrícola "La Molina" (Lima). 1952; 13p.
- **Berbee ML, Taylor JW.** Fungal Phylogeny. Molecular fungal biology (UK). 1999; 21-71p.
- **Bernstein H, Byerly HC, Hopf FA, Michod RE.** Genetic damage, mutation and the evolution of sex. Science. 1985; 229: 1277-81p.
- **Blair M, Díaz J, Hidalgo R, Díaz L, Duque M.** Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). TAG Theoretical and Applied Genetics. 2007.
- **Bonamico N, Aiassa J, Ibañez M, Di Renzo M, Díaz D, Salerno J.** Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. 2004.
- **Bridge PD, Arora DK.** Interpretation of PCR methods for species definition. Applications of PCR in mycology. (London: CAB International). 1998; 63-84p.
- **Bruns TD, White TJ, Taylor JW.** Fungal molecular systematics. Annual Review Ecology Systematic. 1991; 22: 525-564p.
- **Bruns TD, White TJ, Taylor JW.** Fungal molecular systematics. Annual Review of Phytopathology. 1995; 22: 525-564p.

- **Brygoo Y, Caffier V, Carlier J, Fabre JV, Fernández D, Giraud T, Mourichon X, Neema C, Notteghem JL, Pope C, Tharreau D, Lebrun MH.** Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. Molecular variability of fungal pathogens. (UK: CAB International). 1998. 133-148p.
- **CABI.** Crop Protection Compendium. CAB International. (UK). 2011; 7.
- **Campuzano H.** Influencia de la temperatura y la humedad en la germinación de esporas de *M. roreri*. Eighth International Cocoa Research Conference. Cartagena. (Colombia: Cocoa Producers' Alliance). 1981.
- **Castaño J,** Moniliasis del cacao en una región del departamento de Caldas. *Agricultura Tropical*. 1952, 8: 21-25p.
- **Chacin L.** Algunos aspectos biológicos y patogénicos del hongo *Monilia roreri* (Cif. y Par.) agente causal de la moniliasis del cacao. Tesis Ingeniería Agrónoma. Venezuela: Universidad del Zulia. 1975; 61p.
- **Chia J.** Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS. Tesis de Maestría. Tingo María: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2009.
- **Ciferri R, Parodi E.** Descrizione del fungo che causa la "moniliase" del cacao. *Phytopathologische Zeitschrift*. 1933; 6, 539-542.
- **Crisci J, López M.** Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. (Washington D.C.). 1983; 26.
- **Cruz, S.** Determinación de fuentes de resistencia de cacao de origen nacional al ataque de *Monilia roreri* (Cif. y Par.). Tesis Ingeniería Agrónoma. Ecuador: Universidad de Guayaquil. 1993; 101p.
- **Cubillos G.** 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. 1981; 18: 38-43p.
- **Cuervo JA, Sanchez V, Ramirez M, Ramirez M.** Morphological and Molecular Characterization of *Moniliophthora roreri* Causal Agent of Frosty Pod

Rot of Cocoa Tree in Tabasco, Mexico. *Plant Pathology Journal*. 2011; 10: 122-27.

- **Cunha MR.** Estructura genética de populações de *Crinipellis pernicioso* e *Moniliophthora roreri* utilizando Marcadores RAPD e SSR. Doctorado. Sao Paulo: Universidad Estatal Paulista. 2006.
- **Dale WT.** Witches' broom disease investigations. XII: further studies on the infection of cacao pods. *Tropical Agriculture*. (Guildford). 1946; 12: 217-221p.
- **De Vicente MC, López C, Fulton T.** Genetic diversity analysis with molecular marker data. International Plant Genetic Resources Institute (Rome, Italy), Universidad Nacional Agraria La Molina (Perú) y Institute for Genomic Diversity - Cornell University (NY, USA). 2004.
- **Dias L.** Genetic improvement of Cacao. Editora Folha de Vicoso Ltda. Xii. 2001; 578p.
- **Díaz L, Buendía HF, Duque MC, Blair MW** Genetic diversity of Colombian landraces of common bean as detected through the use of silver-stained and fluorescently labelled microsatellites *Plant Genetic Resources*. 2011; 9: 86-96p.
- **Do Rio C, De Oliveira B, Tomazella D, Fracassi J, Pereira G.** Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of Witches' broom disease of Cacao. *Current Microbiology*. 2008; 56: 363-370p.
- **Dudley JW.** Comparison of Genetic Distance Estimators using Molecular Marker Data. 1998.
- **Duncan JM, Cooke D, Birch P, Toth R.** Molecular variability in sexually reproducing fungal plant pathogens. Molecular variability of fungal pathogens. (UK: CAB International). 1998; 19-40p.
- **Enríquez A, Brenes O, Delgado C.** Desarrollo e impacto de la moniliasis del cacao en Costa Rica. Proceedings of the Eighth International Cocoa Research Conference. (Cartagena, Colombia: Cocoa Producers Alliance). 1982; 375-380p.
- **Enríquez A.** La Moniliasis: irrumpe en las zonas cacaoteras en Costa Rica. *Actividades en Turrialba*. 1981; 9: 8-9p.

- **Enríquez A.** Cacao Orgánico: Guía para productores ecuatorianos. Instituto Nacional Autonomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito, Ecuador. 2004; 360 p.
- **Enríquez A, Suárez C.** Monília disease of cacao in Costa Rica. (Turrialba, San José). 1978; 5: 339-340p.
- **Evans C.** Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. (London, UK: Common wealth Mycological Institute). Phytopathological papers. 1981; 24: 44p.
- **Evans C.** Reassessments of *Moniliophthora (Monilia)* pod rot of cocoa. Cocoa Growers' Bulletin. 1986; 37: 34-43p.
- **Evans C, Stalpers JA, Samson RA, Benny GL.** On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany. 1978; 56: 2528-32p.
- **Evans C.** Cacao diseases - The trilogy revisited. Phytopathology (Berkshire). 2007; 97: 1640-43.
- **Evans C, Bastos C.** Uma reavaliação do ciclo da vida da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacau. Fitopatologia Brasileira. 1979; 4:104p.
- **Evans C, Bastos C.** Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis perniciosa* (Witches broom disease) in cocoa cultivars. British Mycological Society. 1980; 74: 525-36p.
- **Evans C, Barreto RW.** *Crinipellis perniciosa*: a much investigated but little understood fungus. Mycologist. 1996; 10: 58-61p.
- **Evans C, Krauss U, Rios R, Zeceovich T, Arévalo E.** Cocoa in Peru. Cocoa Growers' Bulletin. 1998; 51: 7-22p.
- **Evans C.** Cacao diseases - The trilogy revisited. Phytopathology (Berkshire). 2007; 97: 1640-43.
- **Ferreira L, Duarte K, Gomes L, Carvalho R, Leal Junior G, Aguiar M, Armas R, Tavares F.** Genetic diversity of polysporic isolates of *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae). Genetics and Molecular Research. 2012; 11: 2559-2568.

- **FHIA.** Identificación y control de la moniliasis del cacao. (Cortés, Honduras). 2003; 24p.
- **FHIA.** La moniliasis del cacao: el enemigo a vencer. Proyecto promoción de sistemas agroforestales de alto valor con cacao en Honduras. (Cortés, Honduras). 2012; 36p.
- **Flores A.** Nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. 1997; 56p.
- **Fory A.** Caracterización y análisis molecular de la diversidad genética de la colección colombiana de lulo (*Solanum quitoense lam*) y seis especies relacionadas de la sección *Lasiocarpa*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional De Colombia, Sede Palmira. 2005.
- **Fulton RH.** The Cacao Disease Trilogy: Black Pod, Monilia Pod Rot, and Witches Broom. The American Phytopathological Society. 1989; 73: 601-603.
- **Garcés D.** Escoba de bruja del cacao. *Revta. Agronomía*. 2001; 24: 329-369p.
- **Ghislain M, Zhang D, Fajardo D, Huamann Z, Hijmans RH** Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genet. Resour.* 1999; 46: 547-555p.
- **González BC.** Identificación de *Coccidioides Spp* en muestras de tejidos parafinizados utilizando tres tipos de marcadores moleculares. Tesis maestría. Universidad Autónoma de Baja California. 2012.
- **Gonzalez CJ.** Identificación de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de cacao (*theobroma cacao L.*) en la finca bulbuxya, San Miguel Panan Suchitepéquez. Tesis de Grado. Guatemala: Universidad de San Carlos. 2007.
- **Griffith GW, Nicholson J, Nenninger A, Birch RN, Hedger JN.** Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*. 2003; 41: 423-35.
- **Griffith GW.** Witches' brooms and frosty pods: threats to world cacao production. *Biologist*. 2004; 51: 71-75.

- **Grisales OS, Afanador KL.** Analisis de variabilidad en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología. 2007; 2: 15-32.
- **Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN.** Ainsworth y Bisby's Dictionary of the Fungi. 8^a edition. 1996; 616p.
- **Henson JM, French R.** The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annual Review of Phytopathology. 1993; 31: 81 -109p.
- **Hernández TA, Aranzazu F, Arévalo E, Ríos R.** La moniliasis del cacao en el Perú. Agrotrópica International. 1990; 125-152p.
- **Holliday P.** *Crinipellis perniciosus*. CMI Description of pathogenic fungi and bacteria. 1998.
- **Holliday P.** Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). (London: H. M. Stationery Office). 1952; 8p.
- **IIAP.** Estudios Temáticos para la Zonificación Ecológica y Económica del departamento de San Martín, Forestal. 2007.
- **Innan H.** A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. Journal of Experimental Medicine Online. 1999; 151: 1157-64p.
- **Isai D.** Evaluacion de fungicidas sistémicos y de contacto en el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*theobroma cacao*). Tabasco, Mexico: Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. 2012; 86p.
- **Johnson J, Bonilla J, Agüero L.** Manual de manejo y producción del cacaotero. (Leon, Nicaragua). 2008; 40p.
- **Kardolus JP, Van Eck HJ, Van den Berg RG.** The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). Plant Systematics and Evolution. 1998; 210: 87-103p.
- **Katip JY.** Prospeccion y estudio de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) (Cif. y Par.) Evans et al., del cacao en la cuenca del Rio Marañon. Tesis Ingenieria Agronoma. Tingo Maria, Perú: UNAS. 1994; 94p.

- **Kilaru A, Hasenstein HK.** Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis perniciosa* on Interaction with Cacao Leaves. *Biochemistry and Cell Biology* (Luoisiana). 2005; 95: 101-107.
- **Krauss U, Soberanis W.** Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biological Control*. (Orlando). 2002; 24: 82-89p.
- **López MA, Martins E.** Principais doenças do cacaeiro no Brasil. Iihéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 2005. 132 p.
- **López MA, Enríquez VO.** Presencia de *Monília roreri* (Cif. y Par.) en el cacao (*Theobroma cacao* L.), en la frontera de Costa Rica, Nicaragua. Manágua. Laboratório de Fitopatologia. (Nicarágua: Ministério de Desarrollo Agropecuário). 1980; 150p.
- **Majer D, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP,** The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research*. 1996; 110: 1107- 1111p.
- **Marelli JP.** *Solanum lycopersicum* as a model system to study pathogenicity mechanisms of *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *theobroma cacao*. Thesis PhD. USA: The Pennsylvania State University. 2008.
- **Marelli JP, Maximova SN, Gramacho KP, Kang S, Guiltinan MJ.** Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate Solanaceous hosts. *Tropical Plant Biol.* 2009; 2: 149–160p.
- **Martín MT, Cobos R, Martín L, Lopez L.** Real time PCR detection of *Phaeoacremonium chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; 78: 3985-91p.
- **Martínez O, Simpson J.** Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology*. 1998; 88: 292-299p.
- **McDermott JE, Mc Donald BA.** Gen flow in plants pathosystems. *Annual Review of Phytopathology*. 1993; 31: 353-373p.

- **McDonald BA, Linde C.** Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 2002; 40: 349–379p.
- **McDonald BA, McDermott JE.** Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*. 1993; 43: 311-319p.
- **McDonald BA, McDermott JE, Goodwin SB, Allard RW.** The population biology of host-pathogen interactions. *Annual Review Phytopathology*. (Palo Alto). 1989; 27: 77-94p.
- **McDonald BA, Zhan J, Yarden O, Hogan K, Garton J, Pettway RE.** The populations genetics of *Mycosphaerella graminicola* and *Stagnospora nodorum*. *Septoria on Cereals: a study of pathosystems*. (Wallingford: CABI Publishers). 1999; 44-69p.
- **McDonald BA, Mundt CC, Chen RS.** The role of selection on the genetic structure of pathogen populations: Evidence from field experiments with *Mycosphaerella graminicola* on wheat. *Euphytica*. 1996; 92: 73-80p.
- **McDonald BA, Pettway RE, Chen RS, Boeger JM, Martinez JP.** Thebropulation genetics of *Septoria tritici* (teleomorph *Mycosphaerella graminicola*). *Cannadian Journal of Botanic*. 1995; 73: 292-301p.
- **McLaughlin H.** Observation on Cacao in Peru. *Cacao Inform. Bulletin*. 1950; 2: 3-4p.
- **Meinhardt LW, Bellato C, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo J, Pereira G.** In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis pernicioso*, the Causal Agent of Witches Broom Disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology*. 2006; 52: 191-96.
- **Meinhardt LW, Rincones J, Bailey BA, Aime MC, Griffith GW, Dapeng Z, Pereira GA.** *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe. *Molecular plant Pathology*. 2008; 9: 577-588.
- **Meirelles S.** Epidemiologia da vassoura-debruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer) em cacauerios enxertados em Uruçuca. Tesis de Maestría. Universidad de Saõ Paulo. 2002; 53p.

- **Meléndez L.** Microambiente, cantidad de esporas en el aire e incidencia del hongo *Moniliophthora roreri* (CifyPar). Evans et al. Bajo tres sistemas de manejo de sombra leguminosa en cacao (*Theobroma cacao L.*). Tesis de Magister Scientiae en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Universidad de Costa Rica. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1993; 98p.
- **Merchán VV,** Avances en la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. El Cacaotero Colombiano. 1981; 16: 25-44p.
- **Milgroom MG,** Recombination and the multilocus structure of fungal populations. Annual Review of Phytopathology. 1996; 34: 457-477p.
- **Milgroom MG, Lipari S.** Population differentiation in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in eastern North America. Phytopathology. 1995; 85: 155-160p.
- **Mills PR, Sreenivasaprasad S, Muthumeenakshi S.** Molecular variability of fungal pathogens. (Local: CAB International). 1998; 105-120p.
- **MINAG.** Caracterización de las zonas productoras de cacao en el Perú y su competitividad. (Lima). 2003; 207p.
- **Motamayor J, Risterucci A, Lopez P, Ortiz C, Moreno A, Lanaud C.** Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. Nature. 2002; 89: 380–386P.
- **Mueller G, Wolfenbarger L.** AFLP genotyping and fingerprinting. Tree 1999; 14; 389-394P.
- **Mueller G, Lipari S, Milgroom MG,** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmes minutus*. Molecular Ecology. 1996; 5: 119-122p.
- **Mullis K, Faloona S, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium Quant Biology. 1986; 51: 253-273p.
- **Nanda K, Taniguchi M, Ujike S, Ishihara N, Mori H, Ono H, Murooka Y.** Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of

- rice vinegar (komesu) and unpplisho rice vinegar (kurosu) produced in Japan. Applied Environ. Microbiol. 2001; 67: 986-990p.
- **Navarro M, Mendoza I.** Cultivo del cacao en sistemas agroforestales. Guía técnica para promotores. (Río San Juan, NI). 2006; 67p.
 - **Nei M.** Genetic distance between populations. The American Naturalist. 1972; 106: 283-292p.
 - **Orchard JE, Hardwick K.** Photosynthesis, carbohydrate translocation and metabolism of host and fungal tissues in cacao seedlings infected with *Crinipellis pernicioso*. In: 10th International Cocoa Research Conference. (Cocoa Producers Alliance, Lagos, Nigeria). 1988; 325–330p.
 - **Orellana RG.** La moniliosis y otras enfermedades del cacao en el este de Panamá. Boletín Fitosanitario de la FAO. 1956; 4: 168-169p.
 - **Orozco CA, Osorio C, Botero MJ, Rivera FA, López GA.** Evaluación microbiológica y molecular de *Moniliophthora pernicioso* (agaricales: marasmiaceae). Boletín Científico. (Caldas). 2010; 15: 41-47.
 - **Pereira LM.** Manegement of witches' broom disease of cocoa: a contemporary retrospective. Lagos: Cocoa Producers' alliance. 2000; 36p.
 - **Phillips W, Aime MC, Wilkinson MJ.** Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. Plant Pathology. 2007; 56: 911–922.
 - **Phillips W.** Origin, Biogeography, Genetic Diversity and Taxonomy affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al as determined using Molecular, Phytopatological and Morphophysiological evidence. Thesis PhD. London: University of Reading. 2003.
 - **Phillips W.** Evaluación de cultivares de cacao a *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al. 1986; 100p.
 - **Phillips W, Castillo J, Krauss U, Rodríguez E, Wilkinson MJ.** Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. Plant Pathology. (Oxford). 2005; 54: 483-490p.

- **Phillips W.** La moniliasis del cacao: un enemigo que podemos y debemos vencer. Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. (Quevedo, Ecuador). 2006; 21-25p
- **Phillips W, Wilkinson MJ.** Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology*. 2007; 97: 1644-47p.
- **Piñero D, Barahona A, Eguiarte L, Rocha A, Salas R.** La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en Capital natural de México, Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. 2008; 1: 415-435.
- **Pires A, Gramacho K, Silva D, Góes A, Silva M, Muniz J, Porto R, Villela C, Brendel M, Cascardo J, Pereira G.** Early development of *Moniliophthora perniciosa* basidiomata and developmentally regulated genes. *BMC Microbiology*. 2009; 9: 18p.
- **Ploetz RC, Schnell RJ, Ying Z, Zheng Q, Olano CT, Motamayor JC, Johnson ES.** Analysis of molecular diversity in *Crinipellis perniciosa* with AFLP markers. *European Journal of Plant Pathology*. (Dordrecht). 2005; 111: 317-26p.
- **Porras VH, Sánchez LJ.** Enfermedades del Cacao. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Serie: Tecnología, Comunicación y Desarrollo. (La Lima, Cortes, Honduras). 1991; 14-16p.
- **Porras VH, Enríquez A.** Spread of monília pod rot of cocoa through Central América. (San José, Costa Rica: IICA). 1998; 20p.
- **Pound FJ.** Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosa*) of South America. Report on a visit to Ecuador, the Amazon Valley and Colombia. Department of Agriculture, Trinidad and Tobago. 1938; 58p.
- **Pound FJ.** Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosa*). Report on a recent visit to the Amazon Territory of Peru. Department of Agriculture of Trinidad and Tobago. (Trinidad: Yuille's Printerie). 1943; 14p.

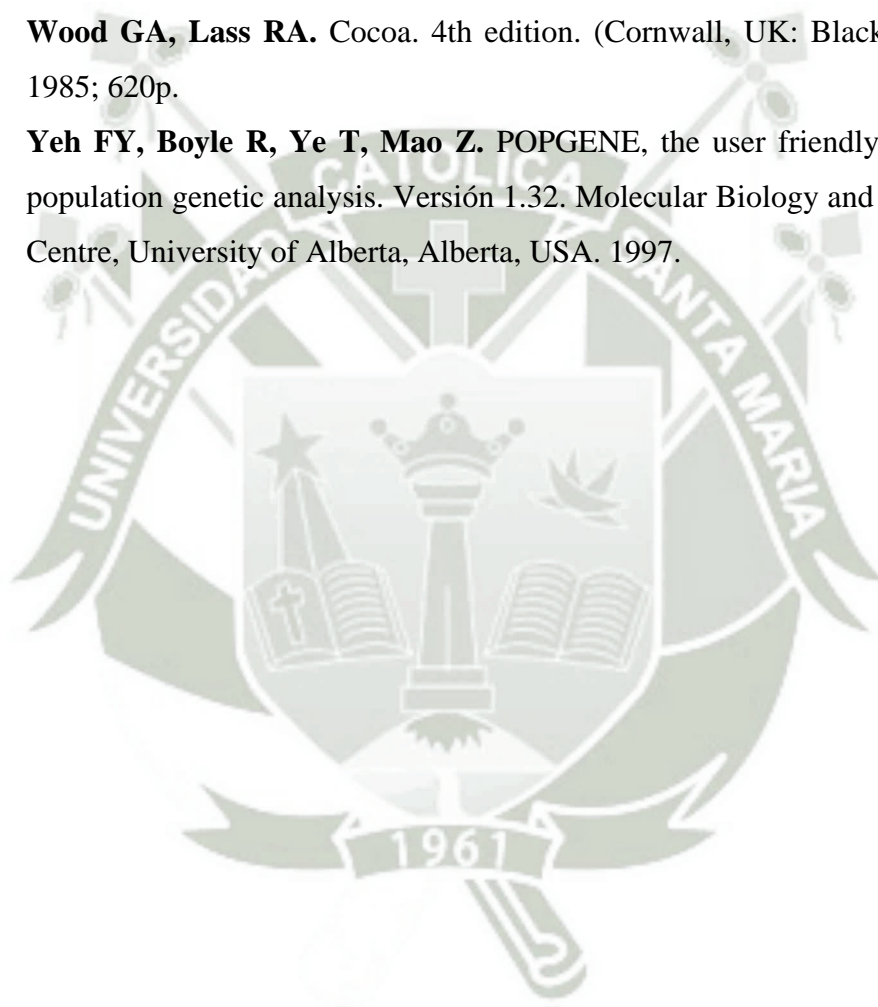
- **Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A.** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 1996; 2: 225-238p.
- **Purdy LH, Schmidt RA.** Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Phytopathology*. 1996; 34: 573-594p.
- **Ram, A.** Biology, epidemiology and control of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of cacao. Thesis PhD. University of London, London. 1989; 286p.
- **Ríos R, Hernández TA, Sánchez D.** La Moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif. and Par.) Evans) del cacao en Juanjui-Saposoá. *Directivas de Erradicación. Tropicultura*. 1993; 5: 17-23p.
- **Rios RA.** Epidemiologia e manejo da monilíase do cacauero no Peru. Tese Doutorado em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa. 2004; 80p.
- **Rocha HM, Wheeler EJ.** Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Plant Pathology*. 1985; 34: 319-328p.
- **Rodríguez D, Baez M.** Manejo agronómico del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Escuela Técnica Agropecuaria Santa Bárbara de Zulia. 2002; 55-58p.
- **Rodríguez CM, Islas I, Peraza L, Canto B.** Extraction of high-quality, melanin-free RNA from *M. fijiensis* for cDNA preparation. *Molecular Biotechnology*. 2006; 34: 45-50p.
- **Rorer B.** The Suriname Witch-broom Disease of Cacao. (Trinidad and Tobago: Board of Agriculture). 1913; 10p.
- **Rorer B.** Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos modernos y apropiados al cultivo del cacao. (Guayaquil, Ecuador: Asociación de Agricultores). 1918; 17-40p.
- **Rubini MR, Silva RT, Pomella WV, Maki CS, Araujo WL, Dos Santos DR, Azevedo JL.** Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. 2005; 1: 24-33p.

- **Rudgard SA, Butler DR.** Witches' broom disease in Rondonia, Brazil: pod infection in relation to pod susceptibility, wetness, inoculum, and phytosanitation. *Plant Pathol.* 1987; 36: 515–522p.
- **Sanogo S, Pomella A, Hebbar P, Bailey B, Costa J, Samuels G, Lumsden R.** Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on Cacao. *Phytopathology.* 2002; 92: 1032-37p.
- **Santander D, Oliva R, Solís K, Gramacho K, Suárez C.** Caracterización de aislados ecuatorianos de *Crinipellis pernicioso* y *Moniliophthora roreri* mediante marcadores microsátélites. 7p.
- **Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella WV, Schiavinato MA, Cascardo MC.** Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *Journal of Experimental Botany.* 2005; 56: 865-877p.
- **Shaad W, Reid D, Frederick A.** Real-time and its application for rapid plant disease diagnostics. *Plant Pathology.* 2002; 24: 250-258p.
- **Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF).** Ficha Técnica Escoba de bruja del cacao *Moniliophthora pernicioso*. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México, DF. 2012; 21p.
- **Slatkin M.** Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 1985; 16: 393-430p.
- **Slatkin M.** Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science.* 1987; 236: 787-792p.
- **Smith L. y Sano M.** Moniliasis with meningeal involvement. *The Journal of Infectious Diseases.* 1917; 53: 187-196p.
- **Sokal RR, Rohlf JF.** The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon.* 1962; 11: 33-40p.

- **Somma M.** DNA extraction and purification, session 4th. he analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. Research Centre, European Commission. 2008; 1-18p.
- **Stahel G.** *Marasmius perniciosus* (nov. spec.), the cause of Krulloten disease of cocoa in Suriname. Dept. van den Landbouw in Surinam Bulletin 33. 1915; 5–49p.
- **Stahel G.** Contribution to the knowledge of witch broom disease. Tropical Agriculture. (Guildford). 1919; 9: 167-176p.
- **Staskawicz BJ, Ausubel FM, Jones DG.** Molecular genetics of plant disease resistance. Science. 1995; 268: 661-667p.
- **Staub JE, Serquen F, Gupta M.** Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience. 1996; 31: 729-740p.
- **Stell F.** Witches' broom disease of cacao and its control. Bulletin Department Agriculture. (Trinidad Tobago). 1928; 21: 3-14p.
- **Suárez C.** Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri* Cif. y Par. en frutos de cacao (*Theobroma cacao L.*). Thesis Ing. Agr. Guayaquil, Ecuador: Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad de Guayaquil. 1971; 59p.
- **Suárez YJ, Hernández FA.** Manejo de las enfermedades del cacao (*theobroma cacao L*) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). (Caldas). 2010; 90p.
- **Talbot NJ,** Molecular variability of fungal pathogens: using the rice blast fungus as a case study. Molecular variability of fungal pathogens. (UK: CAB International). 1998; 1-18p.
- **Tamakatsu S.** PCR applications in fungal phylogeny. Applications of PCR in mycology. (UK: CAB International). 1998; 125-152p.
- **Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fishe MC.** Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genet. Biol. 2000; 31: 21-32p.

- **Tovar G.** Contribución al estudio de la variabilidad de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, agente causante de la Escoba del Bruja del cacao. Agronomía Colombiana, Bogotá. 1991; 8: 83-93p.
- **Tredway LP, White JF, Gaut BS, Reddy PV, Richardson MD, Clarke BB.** Phylogenetic relationships within and between *Epichloe* and *Neotyphodium* endophytes as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. Mycological Research. 1999; 103: 1593-1603p.
- **Urquillas L.** Inducción de la germinación para mejorar la eficiencia de dos agentes antagónicos para el control de la monilia (*Crinipellis roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 2004; 72p.
- **Valdés J.** Utilización de caracteres morfo-agronómicos y de marcadores de ADN para el desarrollo de una metodología que contribuya al mejoramiento genético del guayabo (*Psidium guajava L.*) en Cuba. Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. 2009; 110p.
- **Vanderplank, J.E.** Plant Disease: Epidemics and Control. Academic Press, New York. 1963.
- **Villamil CJ, Blanco VJ, Viteri RS.** Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) en Cacao (*Theobroma cacao L.*) Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. 2012; 65:10p.
- **Villavicencio VM.** Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana. Tesis de grado. Guayaquil: Escuela Politecnica; 2010.
- **Vos P, Kuiper M.** AFLP analysis. DNA markers, protocols, applications and overviews. (New York, USA). 1998; 115-131p.
- **Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee Van de T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M,** AFLP: a new technique for DNA. 1995.

- **Wang R, Schmidt E.** Population genetic analysis of pathogenic forest fungi. Sweden: Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences. 1998.
- **Warburton M, Crossa J.** Data Analysis in the CIMMYT Applied Biotechnology Center. For Fingerprinting and Genetic Diversity Studies. 2002.
- **Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W.** DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. (Boca Raton). 1995; 322p.
- **Wood GA, Lass RA.** Cocoa. 4th edition. (Cornwall, UK: Blackwell Science). 1985; 620p.
- **Yeh FY, Boyle R, Ye T, Mao Z.** POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis. Versión 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Alberta, USA. 1997.



VII. ANEXOS

Anexo N°1: Preparación de medios de cultivo

Medio PDA modificado (PSA)

- Papa pelada en trozos 250gr
- Azúcar (sacarosa) 10 gr
- Agar 18 gr
- Agua destilada 1000 ml

* Para la preparación del inóculo se preparó caldo PS.

Medio a base de Cacao

- IMC – 67 (2 o 3 meses) 250 gr
- Agua destilada 1000 ml.
- Se autoclava a 15 lb por 15 minutos
- Se filtra el extracto y se agrega 18 gr de agar por litro de extracto (pero primero el agar se disuelve en ½ litro de extracto)
- Se autoclava por segunda vez

Medio Extracto de levadura

- Yeast extrat 2,5 gr
- Agar (oxid) 8,75 gr
- Glicerol 10 ml
- Agua destilada 500 ml

Anexo N°2: Secuencias de los adaptadores, Pre cebadores y cebadores específicos utilizados en la técnica de AFLP.

N°	Adaptadores y Cebadores	Secuencias
1	<i>EcoRI</i> adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
2	<i>MseI</i> adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
3	Pre- <i>EcoRI</i>	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
4	Pre- <i>MseI</i>	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
5	<i>EcoRI</i> -AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
6	<i>EcoRI</i> -AAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
7	<i>EcoRI</i> -ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
8	<i>EcoRI</i> -ACC	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'
9	<i>EcoRI</i> -ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'
10	<i>EcoRI</i> -ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'
11	<i>EcoRI</i> -AGC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
12	<i>EcoRI</i> -AGG	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'
13	<i>MseI</i> -CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
14	<i>MseI</i> -CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
15	<i>MseI</i> -CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
16	<i>MseI</i> -CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
17	<i>MseI</i> -CTA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
18	<i>MseI</i> -CTC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
19	<i>MseI</i> -CTG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'
20	<i>MseI</i> -CTT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'

Anexo N°3: Lista de combinaciones de cebadores utilizados en la búsqueda de cebadores que nos brinden mayor polimorfismo.

Cebadores	MseI- CAA	MseI- CTG	MseI- CTT	MseI- CAT	MseI- CTC	MseI- CTA	MseI- CAG	MseI- CAC
<i>EcoRI</i> -AGC							X	
<i>EcoRI</i> -ACT	X							
<i>EcoRI</i> -ACC	X		X			X	X	
<i>EcoRI</i> -ACA	X	X					X	
<i>EcoRI</i> -AAG			X		X		X	X
<i>EcoRI</i> -AAC	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>EcoRI</i> -AGG	X							X
<i>EcoRI</i> -ACG	X							

Anexo N°4: Preparación de componentes utilizados en la aplicación de la técnica de AFLP.

Buffer PCR 10X

Stock	Final	100 ml
Tris HCl 1M, Ph 8.3	100 mM	10 ml
KCl 1M	500 mM	50 ml
MgCl ₂ 1M	15m M	1.5 ml
H ₂ O _(d)		Completar 100 ml

Cloruro de magnesio

Stock	10 ml
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.10 gr
H ₂ O destilada	10 ml

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP)

Stock	1000 µl
dATP 100 Mm, 25µmol	50 µl
dTTP 100 Mm, 25µmol	50 µl
dCTP 100 Mm, 25µmol	50 µl
dGTP 100 Mm, 25µmol	50 µl
Agua molecular estéril	800 µl

Agarosa al 1,5%

Stock	Final	100 ml
Agarosa		1.5 gr
TBE 10X	1 X	90 ml

Acrilamida al 10%

Stock	Final	1 L
Urea	7 M	420 gr
Acrilamida	10 %	100 gr
Bisacrilamida		5 gr
TBE 10X	10X	50 ml
H ₂ O destilada		Completar 1000 ml

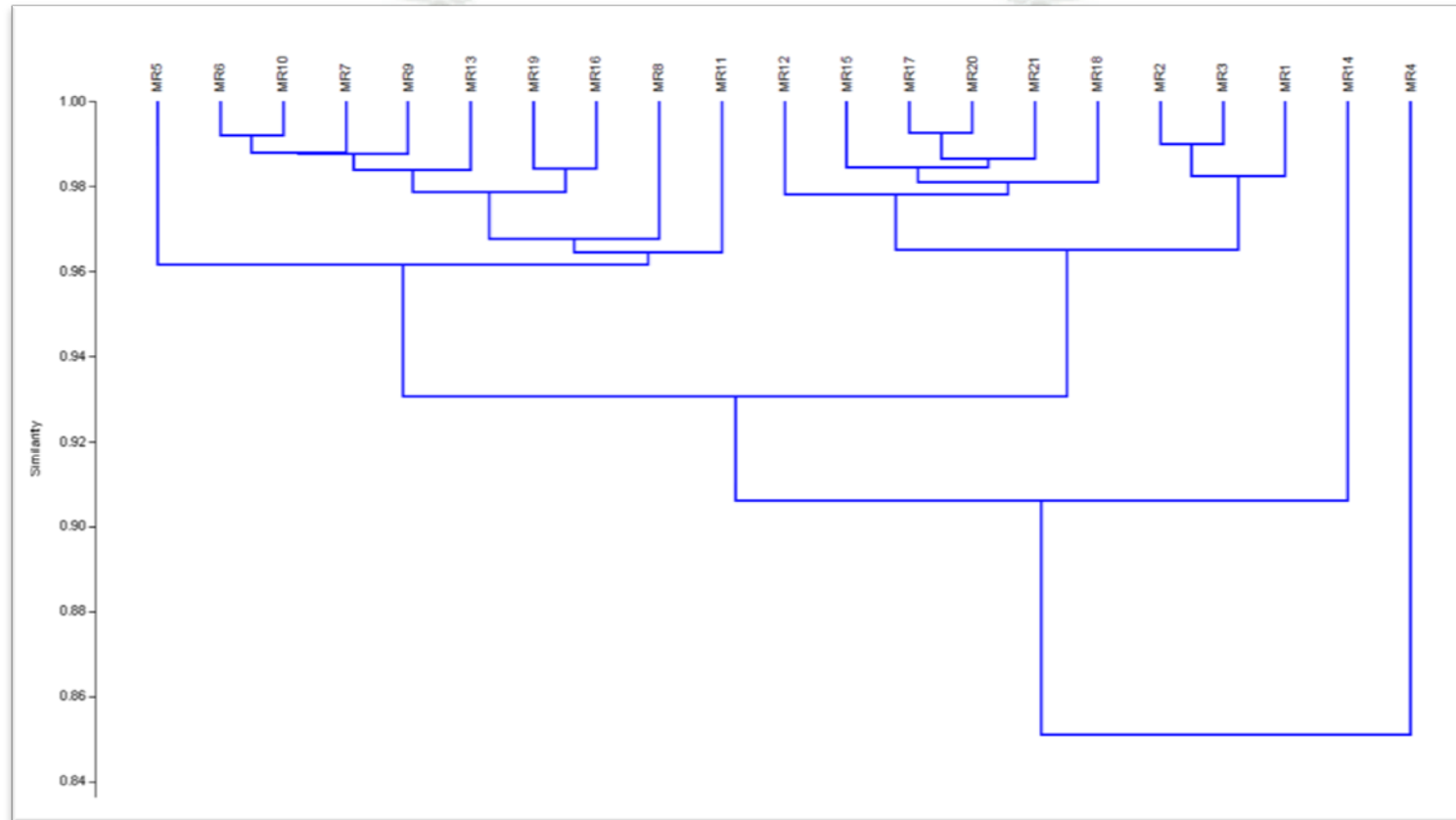
Buffer TBE 10X

Stock	1 L
Tris - base	108 gr
Acido bórico	55 gr
EDTA 0.5M, pH 8.0	40 ml
H ₂ O destilada	Completar 1000 ml

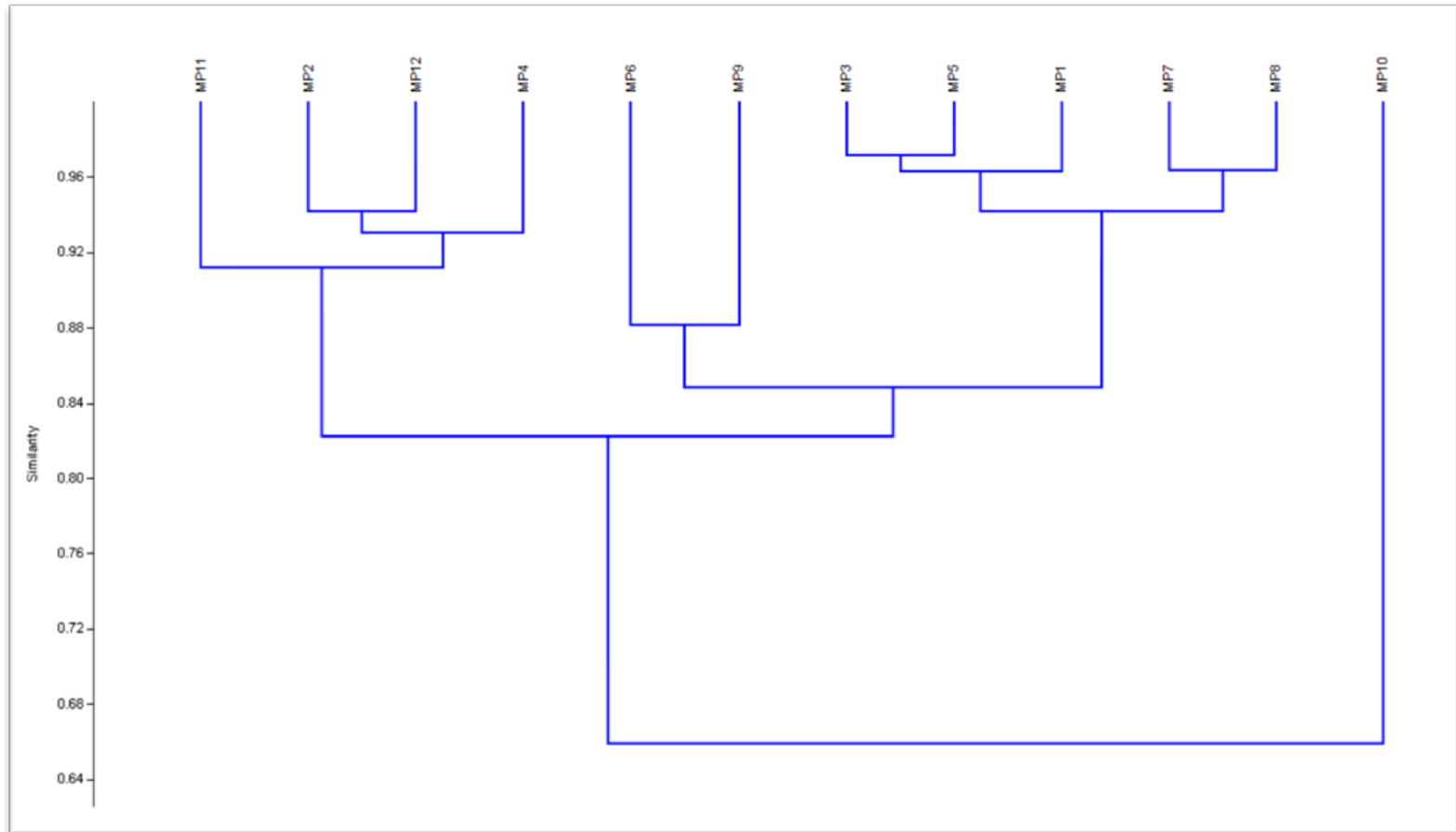
Buffer de carga

Stock	100 ml
Azul de bromofenol 0.25%	0.25 gr
Sucrosa 40% w/v	40 gr
H ₂ O destilada	Completar a 100ml

Anexo N°5: Dendogramas generados para los aislamientos de *M. royeri* y *M. perniciososa* usando la técnica AFLP a partir del coeficiente de similitud de Dice.



Dendrograma generado para 21 aislamientos de *Moniliophthora royeri* usando la técnica AFLP por el método de agrupamiento UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Dice.



Dendrograma generado para 12 aislamientos de *Moniliophthora perniciosa* usando la técnica AFLP por el método de agrupamiento UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Dice.