

Guatemala, 26 de febrero, 2021



Señor Director  
Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera  
Director General de Investigación  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director:

Adjunto a la presente el informe final “**Resistencia de genotipos comerciales y criollos de cacao ante *Moniliophthora roreri* y sensibilidad de este hongo a fungicidas**” con número de proyecto B28-2020, coordinado por el Ing. Agr. Luis Rodolfo Montes Osorio y avalado por el Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y aval correspondiente.

Así mismo, el coordinador del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por Digi del **informe final y del manuscrito científico**. El manuscrito científico debe enviarse, por el coordinador del proyecto, para publicación al menos en una revista de acceso abierto (*Open Access*) indexada y arbitrada por expertos en el tema investigado.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

“Id y enseñad a todos”



Firma  
Ing. Agr. Luis Rodolfo Montes Osorio  
Coordinador del proyecto de investigación



Firma y sello  
Director del Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA)  
Facultad de Agronomía

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

## INFORME FINAL

Resistencia de genotipos comerciales y criollos de cacao ante *Moniliophthora roreri* y  
sensibilidad de este hongo a fungicidas

### Equipo de investigación

**Ing. Agr. Luis Rodolfo Montes Osorio<sup>1</sup>**

**M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután<sup>1,2</sup>**

**Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval<sup>1</sup>**

**M.Sc. Carlos Enrique Villanueva González<sup>2,3</sup>**

Guatemala febrero de 2021

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales<sup>1</sup>

Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences<sup>2</sup>

Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, Universidad Rafael Landívar<sup>3</sup>

Dr. Félix Aguilar Carrera  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar  
Coordinador del Programa de Ciencias Básicas

Ing. Agr. Luis Rodolfo Montes Osorio<sup>1</sup>  
Coordinador del Proyecto

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután<sup>1,2</sup>  
Investigador

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval<sup>1</sup>  
Investigador colaborador

M.Sc. Carlos Enrique Villanueva González<sup>2,3</sup>  
Investigador colaborador

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales<sup>1</sup>  
Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences<sup>2</sup>  
Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, Universidad Rafael Landívar<sup>3</sup>

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2019. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores. Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.4.45. durante el año 2019 en el Programa Universitario de Investigación de Ciencias Básicas. Financiamiento aprobado por Digi: Q.249,019.1 Financiamiento ejecutado: Q. 211,353.71

## Índice

1	Resumen.....	1
2	Palabras clave.....	1
3	Abstract .....	2
4	Introducción .....	3
5	Planteamiento del problema.....	4
6	Delimitación en tiempo y espacio .....	5
7	Marco teórico .....	6
7.1	Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> , L).....	6
7.2	Enfermedades que afectan al cacao.....	7
7.3	<i>Moniliophthora roreri</i> .....	8
8	Estado del arte .....	10
8.1	Diversidad genética de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	10
8.2	Resistencia de genotipos de cacao ante <i>Moniliophthora roreri</i> .....	11
9	Objetivos .....	12
10	Hipótesis.....	13
11	Materiales y métodos .....	13
11.1	Enfoque y tipo de investigación.....	13
11.2	Recolección de información.....	14
11.3	Técnicas e instrumentos .....	15
11.4	Procesamiento y análisis de la información .....	17
12	Vinculación, difusión y divulgación .....	19
13	Productos, hallazgos, conocimientos o resultados .....	20

13.1	Describir la estructura genética de las poblaciones de <i>Moniliophthora roreri</i> presentes en las principales zonas productoras de cacao de Guatemala. ....	20
13.2	Identificar el clon de cacao que presenta mejor resistencia genética a los grupos filogenéticos de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	24
13.3	Determinar el fungicida de acción preventiva y curativa, bajo evaluación, más efectivo para el control de <i>Moniliophthora roreri</i> . ....	30
14	Análisis y discusión de resultados.....	43
15	Conclusiones .....	48
16	Impacto esperado .....	49
17	Referencias .....	49
18	Apéndices .....	58

## Indice de figuras

Figura 1. Mapa de ubicación de las poblaciones de <i>Moniliophthora roreri</i> analizadas con el marcador molecular AFLP. ....	14
Figura 2. Dendrograma de tipo Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages UPGMA generado a partir de 69 aislados de <i>Moniliophthora roreri</i> mediante el marcador molecular Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	21
Figura 3. Análisis de coordenadas principales que revela el patrón de agrupación de los 69 individuos de <i>Moniliophthora roreri</i> . Los puntos representan los individuos de cada población indicada por cada color.....	22
Figura 4. Valores de diagnóstico de L(K) y Delta-K del análisis de STRUCTURE de las poblaciones de <i>Moniliophthora roreri</i> . ....	23
Figura 5. Resultados del análisis de STRUCTURE de las poblaciones de <i>Moniliophthora roreri</i> para K = 2 con modelo sin mezcla (a) y modelo de mezcla (b) de ascendencia. Cada color representa un grupo definido por Structure. Las barras verticales representan los aislamientos, y la longitud de cada segmento coloreado en cada barra vertical representa la proporción aportada por las poblaciones ancestrales. ....	24
Figura 6. Incidencia de frutos enfermos por <i>Moniliophthora roreri</i> a nivel de genotipos de cacao. La proporción general de frutos enfermos se indica mediante la línea punteada. ....	25
Figura 7. Incidencia de frutos enfermos por los grupos filogenéticos de <i>Moniliophthora roreri</i> . La proporción general de frutos enfermos se indica mediante la línea punteada.	26
Figura 8. Prueba de Chi cuadrado de la incidencia de frutos enfermos de cada genotipo de cacao al ser inoculado con los tres grupos filogenéticos de <i>Moniliophthora roreri</i> . ..	27
Figura 9. Prueba de Chi cuadrado sobre la severidad interna de los frutos de cacao enfermos en función de las escalas de daño generadas por cada grupo filogenético de <i>Moniliophthora roreri</i> . ....	28
Figura 10. Prueba de Chi cuadrado sobre la severidad interna de los frutos de cacao enfermos en función de los genotipos de cacao inoculados por cada grupo filogenético de <i>Moniliophthora roreri</i> . ....	29

Figura 11. Prueba de Chi cuadrado sobre la severidad interna de los frutos de cacao enfermos en función de las escalas de daño generadas observadas en cada genotipo de cacao.....	29
Figura 12. Proporción de frutos de cacao clasificados por escala de daño en función del genotipo de cacao inoculado con los diferentes grupos filogenéticos de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	30
Figura 13. Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de <i>Moniliophthora roreri</i> en respuesta a la exposición in vitro de diferentes fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ . ....	31
Figura 14. Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de <i>Moniliophthora roreri</i> en respuesta a la exposición in vitro de diferentes dosis de fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ . ....	32
Figura 15. Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de <i>Moniliophthora roreri</i> en función a los grupos filogenéticos del hongo. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza. ....	32
Figura 16. Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de <i>Moniliophthora roreri</i> en respuesta a la exposición in vitro de tipos de acción de fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ . ....	33
Figura 17. Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de <i>Moniliophthora roreri</i> en respuesta a la exposición in vitro de distintos fungicidas y variedad de dosis. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ . ....	34
Figura 18. Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de los grupos filogenéticos de <i>Moniliophthora roreri</i> en respuesta a la exposición in vitro de distintos fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ . ....	35
Figura 19. Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de <i>Moniliophthora roreri</i> en respuesta a la exposición in vitro de fungicidas de acción preventiva. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ . ....	36

Figura 20. Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de fungicidas de acción curativa. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ . .....36

Figura 21. Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de diferentes fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ . .....37

Figura 22. Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de diferentes dosis de fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ . .....38

Figura 23. Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en función a los grupos filogenéticos del hongo. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza.....39

Figura 24. Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de tipos de acción de fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ . .....39

Figura 25. Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de distintos fungicidas y variedad de dosis. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ . .....40

Figura 26. Diagrama de cajas del crecimiento micelial de los grupos filogenéticos de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de distintos fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ . .....41

Figura 27. Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de fungicidas de acción preventiva. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ . .....42

Figura 28. Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de fungicidas de acción curativa. Se muestra el detalle

del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ . .....43

### Índice de Tablas

Tabla 1. Parámetros de la variación genética de las poblaciones de *M. roreri*. Número de aislados por población (N), porcentaje de loci polimórfico (PLP), número de alelos diferentes ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), Índice de información de Shannon (I), diversidad genética de Nei ( $H_j$ ). Los valores entre paréntesis indican el error estándar. 20

Tabla 2. Resumen del análisis de la varianza molecular de los 69 aislados de *M. roreri*. .....23

Tabla 3. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la incidencia de frutos enfermos de los genotipos de cacao evaluados. ....25

Tabla 4. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la incidencia de frutos enfermos por cada grupo filogenético de *Moniliophthora roreri*. .....26



## 1 Resumen

La moniliasis, causada por *Moniliophthora roreri*, es una de las enfermedades del cacao más devastadoras del hemisferio occidental. Desde su centro de origen en el Valle de Magdalena, Colombia; el patógeno se ha dispersado hacia once países, entre los que se encuentra Guatemala, causando graves pérdidas en la producción. A pesar de que se informa de la dispersión de *M. roreri* hacia Centroamérica a partir de un solo clon, la diversidad genética del patógeno no ha sido estudiada en Guatemala, descociéndose la evolución biológica del patógeno. Para esclarecer este aspecto, se analizaron 69 aislados de *M. roreri* obtenidos de cuatro departamentos productores de cacao y se evaluó la diversidad genética mediante el marcador molecular AFLP. También se evaluó la resistencia de seis genotipos de cacao entre comerciales y criollos y la eficiencia de 4 fungicidas entre preventivos y curativos. Mediante el índice de Shannon (0.0578) y la proporción de loci polimórfico (12.28%) se identificó un bajo nivel de diversidad genética. El análisis molecular de varianza mostró una varianza entre regiones, poblaciones y dentro de poblaciones de 3, 6 y 91% respectivamente. El análisis de agrupación bayesiana implementado en STRUCTURE reveló que el número más probable de grupos genéticos en los datos era de dos, aunque no se observó diferenciación geográfica. Los genotipos de cacao evaluados fueron igualmente susceptibles a *M. roreri*. El fungicida preventivo Clorotalonil y curativo Azoxystrobin en dosis de 100 y 150 mgL<sup>-1</sup> fueron los más efectivos en el control del patógeno. Dada la alta tasa de mutación de *M. roreri* se sugiere el constante monitoreo de su evolución, así como prácticas de cuarentena que limiten su dispersión y evaluaciones de clones de cacao tolerantes a los nuevos genotipos de *M. roreri* previniendo así incrementos en las pérdidas de los productores guatemaltecos.

### Palabras clave

moniliasis, AMOVA, flujo genético, AFLP

## 2 Abstract

Moniliasis, caused by *Moniliophthora roreri*, is one of the most devastating cocoa diseases in the western hemisphere. From its center of origin in the Magdalena Valley, Colombia, the pathogen has spread to eleven countries, including Guatemala, causing severe production losses. Although *M. roreri* is reported to have spread to Central America from a single clone, the genetic diversity of the pathogen has not been studied in Guatemala, and the biological evolution of the pathogen is unknown. To clarify this aspect, 69 isolates of *M. roreri* obtained from four cocoa-producing departments were analyzed, and genetic diversity was assessed using the AFLP molecular marker. The resistance of six cocoa genotypes, including commercial and creoles, and the efficiency of four fungicides, including preventive and curative fungicides, were also evaluated. The Shannon index (0.0578) and the proportion of polymorphic loci (12.28%) identified a low genetic diversity level. Molecular analysis of variance showed a variance between regions, populations, and within populations of 3, 6, and 91%, respectively. Bayesian clustering analysis implemented in STRUCTURE revealed that the most likely number of genetic clusters in the data was two, although no geographical differentiation was observed. The cocoa genotypes evaluated were equally susceptible to *M. roreri*. The preventive fungicide Chlorothalonil and curative Azoxystrobin at doses of 100 and 150 mgL<sup>-1</sup> were the most effective in controlling the pathogen. Given the high mutation rate of *M. roreri*, We suggest constant monitoring of its evolution and quarantine practices that limit its spread and evaluations of cocoa clones tolerant to the new *M. roreri* genotypes, thus preventing increased losses for Guatemalan producers.

**Key words:** moniliasis, AMOVA, gene flow, AFLP

### 3 Introducción

*Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) es un hongo que pertenece a la familia Marasmiaceae y a la clase de los basidiomicetos (Evans, 2007) siendo considerada como la enfermedad más preocupante en el cultivo de cacao por encima de *Phytophthora spp.* y *Crinipellis carniciosa* (Ploetz, 2007) con quienes conforma el complejo denominado como “*trilogy of crippling fungal diseases*” (Fulton, 1989). En Guatemala, la pérdida en la producción de cacao, a causa del ataque de *M. roreri*, ha alcanzado valores del 85% en la región sur (Reyes, 2012). A pesar de existir diversidad de estudios que detallan la diversidad genética del patógeno en países suramericanos, (Ali et al., 2015; Jaimes et al., 2016; Suárez, 2017) Guatemala carece de este tipo de información básica y fundamental. Esta es de suma importancia, sobre todo, porque según el estudio de Evans, Holmes, y Reid (2003) se considera que la enfermedad se encuentra aún en una fase invasiva, debido a la movilización que ha mostrado desde el centro de origen, hasta países centroamericanos como Nicaragua (1980), Honduras (1997) y Guatemala (2002).

Debido a la agresividad del patógeno, la cual ha llegado a causar la desaparición de la producción rentable de cacao en Costa Rica (Solís-Bonilla et al., 2015), el control de este patógeno exige el desarrollo de información sobre la genética de las poblaciones existentes en el territorio nacional. Dichas poblaciones pueden ser por completo diferentes a las presentes en Guatemala por la recombinación genética que se presenta en condiciones distintas, como se ha demostrado con otros patógenos en el país (Berdúo-Sandoval, Ruiz Chután, & Sánchez-Perez, 2019; Ruiz-Chután, Berdúo Sandoval, & Sánchez-Pérez, 2018). Sin dicha información, es imposible conocer el comportamiento de los clones de cacao disponibles en el país, producto del mejoramiento genético, llevado a cabo principalmente por CATIE en Costa Rica (Phillips-Mora et al., 2005) ante el ataque de los grupos filogenéticos de *M. roreri*, resultando en un mal aprovechamiento de esta estrategia, así como el recurso químico, para lograr el control de patógeno.

La presente investigación es de alcance exploratorio, enfoque cuantitativo y buscó determinar la diversidad genética de las poblaciones de *M. roreri* presentes en las principales zonas productoras de cacao del país, para realizar un agrupamiento filogenético. Posteriormente, se evaluó la resistencia de 3 genotipos de cacao comerciales y 3 genotipos criollos obtenidos de la colección de materiales criollos en el municipio de Lanquín, Alta Verapaz. También se evaluó la sensibilidad de los aislados del patógeno ante fungicidas de acción preventiva y curativa. Para llevar a cabo dicho trabajo se realizó

el aislamiento del patógeno in vitro, seguido de la confirmación de la especie a través de métodos moleculares. Posteriormente, se empleó el marcador molecular AFLP para conocer la diversidad genética de los aislados de *M. roreri*, a partir de los cuales se prepararon suspensiones de esporas para realizar inoculaciones sobre frutos de cacao de los diferentes clones. Así mismo, se evaluó la sensibilidad de los aislados del patógeno ante fungicidas de acción preventiva y curativa a través de inoculaciones sobre medios de cultivo que contendrán diferentes dosis de varios fungicidas.

#### **4 Planteamiento del problema**

*Moniliophthora roreri* (Cif) H. C. Evans, Stalpers, Samson y Benny es el agente causal de la enfermedad internacionalmente conocida como frosty pod rot (FPR) en cacao (*Theobroma cacao* L.) (Evans et al., 1978) y en Guatemala como moniliasis del cacao. Dicho patógeno se encuentra presente en la mayor parte de plantaciones de los países del hemisferio oeste, (Phillips-Mora et al., 2007) convirtiéndose en un serio problema al llegar a provocar pérdidas que alcanzan el 80 % de la producción (Hidalgo et al., 2003). A partir del año 2002 se reportó la presencia de *M. roreri* en territorio guatemalteco (Aránzazu et al., 2009; Phillips-Mora et al., 2006, 2007) llegando a convertirse en un factor que limita la producción de cacao al generar pérdidas estimadas en el 85 % en la región sur del país (Reyes, 2012) poniendo en riesgo la competitividad del país en la producción de cacao.

Existen registros sobre el detalle de la diversidad genética de poblaciones de *M. roreri* en otras regiones, principalmente en suramérica, los cuales han confirmado como el centro de origen del patógeno a la región del Valle de Magdalena en Colombia, así como la alta diversidad genética presente en otras regiones suramericanas (Ali et al., 2015; Jaimes et al., 2016; Suárez, 2017). Dichas poblaciones, pueden ser por completo diferentes a las presentes en Guatemala por la recombinación genética que se presenta en condiciones distintas, como se ha demostrado con otros patógenos en el país (Berdúo-Sandoval, Ruiz Chután, & Sánchez-Pérez, 2019; Ruiz-Chután, Berdúo Sandoval, & Sánchez-Pérez, 2018) . Según Evans, Holmes, y Reid (2003) se considera que la enfermedad se encuentra aún en una fase invasiva debido a la movilización que ha mostrado desde el centro de origen hasta países centroamericanos como Nicaragua (1980), Honduras (1997) y Guatemala (2002).

En Costa Rica, la invasión de *M. royeri* acabó con la producción rentable de cacao, convirtiéndolo en un país importador de este grano (Solís-Bonilla et al., 2015), situación que se torna alarmante, sobre todo por la falta de información relacionada a la diversidad genética del patógeno en Guatemala, ya que, a pesar de existir clones tolerantes al ataque del patógeno desarrollados principalmente por CATIE (Phillips-Mora et al., 2005) no existen registros a nivel nacional del comportamiento de estos clones ante los grupos filogenéticos del patógeno que se encuentran presentes en el país.

De la misma forma, tampoco existen registros sobre la eficiencia de fungicidas para el control del patógeno, lo que resulta en un mal aprovechamiento del mejoramiento genético y del control químico como estrategias de control para este patógeno. La caracterización molecular de *M. royeri* es de suma importancia, debido a que la diversidad genética trae consigo cambios en las poblaciones. Dichos cambios pueden resultar en la ineficiencia del mejoramiento genético y el control químico, a causa de brotes aún más severos generados por nuevas cepas con mayor agresividad y resistencia (Danies et al., 2013; Fry et al., 2015), por lo que el monitoreo de las poblaciones a nivel genético debe ser considerado como una fase fundamental en cualquier estrategia de control.

## **5 Delimitación en tiempo y espacio**

La investigación se realizó durante el periodo comprendido de febrero a diciembre del año 2020 constando de tres fases: campo, laboratorio y gabinete. En la fase de campo se realizó la colecta de las muestras de frutos afectados por *M. royeri* en plantaciones ubicadas en los departamentos de Alta Verapaz, San Marcos, Suchitipéquez e Izabal en el periodo de marzo a octubre.

La fase de laboratorio, la cual incluyó las extracciones de ADN, confirmación de la especie por PCR, estandarización del protocolo y desarrollo del marcador molecular AFLP. También se trabajó en el aislamiento y multiplicación del patógeno para las evaluaciones de resistencia genética sobre los distintos genotipos de cacao y las pruebas de sensibilidad a los diferentes fungicidas bajo evaluación. Por último se desarrolló el informe final de investigación y el manuscrito científico para su publicación. La fase de laboratorio y gabinete se llevará a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía.

## 6 Marco teórico

### 6.1 Cacao (*Theobroma cacao*, L)

El cacao (*Theobroma cacao*, L.) es un árbol pequeño entre 4-8 metros de altura de la familia Malvaceae. Su origen está localizado en los bosques de la región amazónica (Alverson et al., 1999). Los Mayas y Aztecas cultivaron el cacao incluso antes del descubrimiento del continente americano y fue considerado de origen divino, debido a que el nombre de género *Theobroma* significa comida de los dioses. El género *Theobroma* incluye cerca de 25 especies, pero solo *T. Cacao* es comercialmente cultivada (Sánchez, 2004).

El hábitat natural del cacao se localiza en la parte baja de la selva tropical y factores climáticos como la temperatura y la lluvia influyen fuertemente en el desarrollo de la especie. Las plantas de cacao responden bien a temperaturas relativamente altas con un promedio máximo anual de 30 – 32 °C. Cuando se presentan promedios de temperatura por debajo de 23 °C la floración se reduce (Sánchez, 2004). El cacao tienen la capacidad de adaptarse a un amplio rango de tipos de suelo, sin embargo, es muy susceptible a la deficiencia de agua e insuficiencia de aereación, el cacao necesita de partículas gruesas con una razonable cantidad de nutrientes a una profundidad de 1.5 metros para permitir el desarrollo de un buen sistema radicular, además requiere de una adecuada capacidad de retención de agua con buen drenaje debido a que el cacao no es resistente a inundaciones. La especie se desarrolla bien a un pH de 5-8 con una cantidad de materia orgánica alrededor de 3.5% (Wood, 1975)

El cacao es cultivado en los países comprendidos entre la franja tropical a partir de la línea del Ecuador, donde el clima es apropiado para el desarrollo de la especie. Los mayores productores son Costa de Marfil, Ghana e Indonesia (ICCO, 2012) siendo el promedio de producción de 440 kg.ha<sup>-1</sup> con una producción total superior a las 4.4 millones de toneladas (FAO, 2010). Existen algunos modelos que predicen datos de producción de hasta 6,000 kg.ha<sup>-1</sup> pero esto se ha logrado alcanzar en muy pocos casos.

La mayor producción es llevada a cabo por pequeños productores y la proporción de cacao alrededor del mundo que proviene de fincas pequeñas de menos de 5 ha es cercano al 90 % (de Lattre-Gasquet et al., 1998) con un promedio de producción de 350 kg.ha<sup>-1</sup> existiendo registro de 200 kg.ha<sup>-1</sup> en Ecuador hasta 1500 kg.ha<sup>-1</sup> en Indonesia (ICCO, 2012). La mayoría de la producción de cacao es utilizada para exportación y solo una

pequeña porción es para consumo local. Los mayores importadores son Holanda, Estados Unidos, Malasia y Bélgica (FAO, 2010)

## 6.2 Enfermedades que afectan al cacao

Aunque el cacao puede ser afectada por una diversidad de enfermedades, las más importantes son las causadas por hongos. La especie es atacada, principalmente, por el complejo denominado “trilogy of crippling fungal diseases” compuesto por *Phytophthora spp.*, *Crinipellis carniciosa* y *Moniliophthora roreri* afectando severamente la producción en la región neotrópica (Fulton, 1989).

Las pérdidas a causa del complejo de especies de *Phytophthora* se han estimado en 450,000 toneladas métricas por año (Bowers et al., 2001) que representan cerca del 25% de la producción esperada por los agricultores, convirtiendo a este patógeno en la mayor complicación a nivel de enfermedades. El síntoma típico es la necrosis del fruto la cual puede ser atacada en cualquier fase de desarrollo, siendo la sintomatología típica son manchas negras, duras y pequeñas en cualquier parte de la vaina. El tejido interno es colonizado y marchitado hasta formar una vaina momificada (Evans et al., 1998).

Las pérdidas a causa de *Crinipellis carniciosa* se han estimado en 250,000 toneladas métricas por año, siendo la región de la bahía en Brazil la más afectada, llegando a reducir su producción anual en 150,000 toneladas métricas tras una década después de la llegada del patógeno (Pereira et al., 1990). Por otra parte, las pérdidas reportadas en la región caribeña y suramericana alcanzan valores de 30 - 90%. El patógeno (*Crinipellis carniciosa*) infecta todo el tejido meristemático aéreo de crecimiento activo, lo que resulta en hipertrofia.

Las escobas vegetativas (estructuras del hongo) se desarrollan a partir de la infección de los brotes terminales y axilares. La infección de la flor causa escobas o vainas en forma de fresa. La infección temprana de las vainas destruye granos en desarrollo. La infección tardía de las vainas da lugar a algunos granos utilizables, mientras que otros pueden estar infectados. Después de 5-6 semanas, las partes infectadas de la planta se vuelven necróticas. La infección es causada por basidiosporas, que mueren por la exposición a la luz solar y la desecación (Frison, Diekmann & Nowell, 1999)

La moniliasis, causada por *Moniliophthora roreri*, es la enfermedad más preocupante de las enfermedades fúngicas del cacao. Aunque actualmente es responsable de menos daños que *Phytophthora spp.* y *Crinipellis carniciosa* esto se debe a su ausencia

en los principales países productores. En Perú, donde ocurre junto con *Phytophthora spp.* y *Crinipellis carniciosa*, la moniliasis es más prevalente y grave en términos de pérdidas de rendimiento (Ploetz, 2007). En condiciones naturales, la enfermedad afecta solo a los frutos. La infección puede ocurrir en etapas muy tempranas del desarrollo y la susceptibilidad disminuye con el aumento de la edad de la vaina.

Los síntomas iniciales se caracterizan por una o más hinchazones que aparecen en la vaina, o pequeñas lesiones empapadas en agua que se agrandan en áreas necróticas con bordes irregulares. Un estroma fungoso blanco cubre el área en 3-5 días, y la infección de las vainas resulta en una maduración prematura. En las vainas infectadas las semillas se vuelven necróticas y compactas en una masa. Las vainas están infectadas por conidios que son viables durante varias semanas y pueden resistir la exposición a la luz solar. La diseminación es por viento. En condiciones naturales, la transmisión de enfermedades por semillas infectadas no se ha observado y es muy poco probable (Frison et al., 1999).

### **6.3 *Moniliophthora roreri***

*Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) (Evans, 2007) pertenece a la familia Marasmiaceae y a la clase de los basidiomicetos. Sin embargo, estudios moleculares recientes han demostrado que los hongos causantes de moniliasis y escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) presentan cierto grado de parentesco y genéticamente conforman un linaje separado dentro de la familia Marasmiaceae, lo que hace suponer que *M. roreri* es el estado asexual de *M. perniciosa* (Aime & Phillips-Mora, 2005; Phillips-Mora et al., 2007).

El centro de origen para este patógeno ha sido situado en Colombia de donde se ha dispersado a otros países de Centro América y Sudamérica. Hasta el momento ha sido reportado en Colombia, en 1817; Ecuador, en 1917; Venezuela, en 1941; Panamá, en 1956; Costa Rica, en 1978; Nicaragua, en 1980; Perú, en 1988; Honduras, en 1997; Guatemala, en 2002; Belice, en 2004, y México, en 2005. Igualmente se ha identificado cerca de la frontera entre Brasil y Bolivia (Aránzazu et al., 2009; Phillips-Mora et al., 2006, 2007).

## Ciclo de vida

Las esporas germinan en una película de agua sobre las vainas de cacao y penetran directamente (Suárez, 1972). Las esporas necesitan varias horas de condiciones húmedas para completar la mayoría de las infecciones. Luego, transcurren de 3 a 8 semanas desde la infección hasta la aparición de los síntomas externos, dependiendo principalmente de la edad de la vaina (Evans, 1981; Ram, 1989). Las vainas que son muy jóvenes cuando se infectan (<1 mes) desarrollan hinchazones y distorsión en aproximadamente un mes, seguidas de una necrosis total; mientras que las vainas infectadas a los 3 meses desarrollan necrosis internas y externas limitadas 2 o 3 meses después, casi maduras.

Las vainas en el medio se someten a una extensa necrosis interna y luego externa, llegando a una parte o a la totalidad de la superficie. El micelio externo aparece unos días después en esas lesiones, convirtiéndose rápidamente en una estera densa, blanca y helada. Las estructuras esporógenas se forman y esporulan profusamente en unos pocos días, y el pseudoestroma se vuelve de color crema desde el centro hacia afuera (Evans, 1981; Suárez, 1972). *M. royeri* puede producir hasta 7.000 millones de esporas dispersadas por el viento durante un período de nueve meses en una sola vaina que permanece suspendida en el dosel debido a la falta de fitosanización (Evans, 1977).

## Estrategias de control

Numerosas estrategias para el control de *M. royeri* han sido investigadas y algunas recomendadas, entre las que se encuentran las prácticas culturales, control biológico y aplicaciones de productos químicos (Bateman, Holmnes, et al., 2005) dependiendo del estado de desarrollo de la enfermedad. Existen registros de evaluaciones de fungicidas modernos como triazoles y oxathiinas en comparación con productos tradicionales a base de cobre como el hidróxido de cobre, el cual ha mostrado cierto tipo de control sobre la enfermedad, sin embargo, estas aplicaciones resultan ser no viables en términos económicos para los productores. Sobre los fungicidas sistémicos, el uso de oxathiin flutolanil mejoró los rendimientos, sin embargo, no es completamente efectivo en el control de *M. royeri*, por lo cual se sugiere realizar aplicaciones combinadas de fungicidas sistémicos al inicio de la temporada y continuar con fungicidas de contacto (Bateman, Hidalgo, et al., 2005).

Una mejor alternativa desde el punto de vista económico y ambiental es el desarrollo de materiales con resistencia genética. Esta alternativa reduce

considerablemente el uso de factores como fungicidas, logrando así un cultivo más amigable con el ambiente y más atractivo para los productores según lo menciona Johnson, Bonilla y Agüero (citado por Dorado-Orea et al., 2016). Sin embargo, la resistencia o tolerancia a *M. royeri* es una característica extraña, debido a que solo ha sido encontrada en 5 genotipos de cacao entre más de 600 accesiones evaluadas en el programa de mejoramiento genético de cacao de CATIE, las cuales provienen de Costa Rica (UF-273, UF-712) Ecuador (EET-75), Perú (PA-169) y Trinidad y Tobago (ICS-95)(Debouck et al., 2008; Phillips-Mora et al., 2005).

Los estudios han revelado que 6 de los 7 genes estudiados muestran diferencias significativas en su expresión, existiendo una respuesta distinta entre hojas jóvenes y maduras, así como el uso de crioprotectantes como el etileno (Bailey et al., 2005). En los últimos años los estudios sobre resistencia genética han dado grandes avances debido al uso de técnicas moleculares (Mora & Fiallos, 2012).

En cuanto al control biológico, existen registros sobre el uso de *Trichoderma sp.* *Clonostachys rosea* y *Clonostachys byssicola* en países como Colombia, México y Costa Rica (Cuervo-Parra, Ramírez-Suero, Sánchez-López, & Ramírez-Lepe, 2011; Cuervo-Parra, Sánchez-López, Romero-Cortes, & Ramírez-Lepe, 2014; Krauss, ten Hoopen, Hidalgo, Martínez, & Arroyo, 2003; Mora & Fiallos, 2012; Suarez-Contreras, 2006) Factores implicados en la diversidad genética

## 7 Estado del arte

### 7.1 Diversidad genética de *Moniliophthora royeri*

El estudio en la variabilidad de los ácidos nucleicos ha sido empleada para la identificación de especies de hongos (Taylor et al., 2000). La variabilidad genética de las cepas *M. royeri* ha sido estudiada en norteamérica (Cuervo-Parra, Sánchez-López, Ramirez-Suero, & Ramírez-Lepe, 2011) y centro y suramérica (S. Grisales-Ortega & Afanador-Kafuri, 2007). Un estudio en Perú evaluó la diversidad genética de 21 aislados de *M. royeri* mediante el marcador molecular RAPD, con el cual se demostró la presencia de más de un grupo genético (Gutarra et al., 2013) lo que contradice la teoría que en Perú existe solo un grupo genético denominado Bolívar de la provincia de Napo en Ecuador (Phillips-Mora, 2003).

Por otra parte, también se han desarrollado investigaciones relacionadas al estudio de la transferencia horizontal de genes relacionadas a la patogenicidad durante la evolución de especies de *Moniliophthora* (Tiburcio et al., 2010). De forma más reciente se ha estudiado y secuenciado el genoma mitocondrial con el cual se ha descrito la evolución de especies relacionadas (Costa et al., 2012). También se reporta la secuenciación y ensamblaje de 52.3 Mb entre 3,298 contigs que representan el genoma o secretoma de *M. royeri* (Meinhardt et al., 2014). Es importante resaltar que la variación genética permite a los patógenos incrementar su adaptación y resistencia en los cultivos (Gutarra et al., 2013). El conocimiento relacionado a la diversidad genética del patógeno es un punto crucial para el desarrollo de programas dirigidos a la prevención y control de la enfermedad que este pueda causar (Dorado-Orea et al., 2016).

El estudio a nivel de polimorfismos de nucleótido simple en combinación con secuenciación de ARN demostró ser eficiente en la evaluación de diversidad genética de poblaciones de *M. royeri* determinan como centro de origen del patógeno la región del Valle de Magdalena en Colombia (Ali et al., 2015). El uso de AFLP también ha sido descrito como una herramienta útil en la evaluación de la diversidad genética de *M. royeri* demostrando la alta diversidad del patógeno en el nororiente colombiano (Suárez, 2017). El uso de regiones ITS, así como el uso de RFLP también han sido utilizados para el estudio de la diversidad genética de *M. royeri*. El uso del marcador molecular SSR también ha sido descrito en el estudio de diversidad genética del patógeno, evaluando 23 SSR sobre aislados de las regiones de Santander, Antioquia, Tomila y Huila in Colombia. El estudio sugiere que el radio de mutación encontrado por los SSR puede ser debido al flujo genético, además tras un análisis de conglomerados bayesianos, se definieron 3 grupos genéticos, confirmando así la diferenciación geográfica ( Jaimes et al., 2016).

## **7.2 Resistencia de genotipos de cacao ante *Moniliophthora royeri***

Debido al efecto devastador de *M. royeri* en la producción de cacao en varios países de América Central y del Sur, el estudio de Tarquí-Freire y colaboradores (2017) identificó y seleccionó clones de cacao con una baja incidencia del patógeno, evaluando 21 genotipos de los cuales tres de ellos, resultantes de los cruces amazónico X amazónico, presentaron menor incidencia de la enfermedad y se identificaron como fuentes de resistencia genética a moniliasis. En la misma línea, una investigación realizada en

Chiapas, evaluó el comportamiento de 7 genotipos generados mediante polinizaciones controladas, llegando a concluir que existieron familias de híbridos con bajos porcentajes de la enfermedad, así como altos rendimientos de grano por unidad de superficie (Solís-Bonilla et al., 2015).

Un estudio más complejo dirigido por Phillips-Mora y colaboradores (2005) evaluó la resistencia de cinco genotipos de cacao ante el efecto de siete aislados de *M. royeri*, provenientes de Colombia, que además representaban cuatro grupos genéticos. Los autores reportaron una alta agresividad de todos los aislados del patógeno ante la mayoría de genotipos de cacao, encontrando únicamente un solo genotipo de cacao con un nivel significativo de resistencia ante los siete aislados, remarcando sobre la importancia de la caracterización molecular de las poblaciones del patógeno en las distintas zonas productoras de cacao. Este genotipo fue recomendado para iniciar programas de mejoramiento genético en cacao ante moniliasis. Durante el 2017 en el Simposio Internacional sobre Investigación en Cacao, Lima, Perú se informó sobre un estudio que evaluó la resistencia de 39 genotipos de cacao provenientes del Instituto de Cultivos Tropicales, de los cuales, cerca del 45% de ellos fueron categorizados como resistentes, un 30% como moderadamente resistentes, un 18% como moderadamente susceptibles y 5% susceptibles (Arévalo-Gardini et al., 2017).

Por la limitante que representa el patógeno en la producción del cultivo, las técnicas de biología molecular para lograr un análisis genómico y una selección asistida por marcadores moleculares hacia genotipos de cacao con alta resistencia a *M. royeri* han empezado a ser desarrollados, como es el caso del estudio de McElroy y colaboradores (2018) quienes, tras una asociación amplia del genoma de tres poblaciones de cacao ecuatoriano, reportaron quince mil polimorfismos de nucleótido simple relacionados a la enfermedad moniliasis y a la resistencia genética a *M. royeri*

## 8 Objetivos

### General

1. Evaluar la resistencia de diez genotipos criollos y diez comerciales al ataque de los diferentes grupos genéticos de *Moniliophthora royeri* que se identifiquen en las principales zonas productoras de cacao del país.
2. Evaluar el efecto de la diversidad genética de las poblaciones de *Moniliophthora royeri* ante el efecto de fungicidas de acción preventiva y curativa.

## Específicos

1. Describir la estructura genética de las poblaciones de *Moniliophthora roreri* presentes en las principales zonas productoras de cacao de Guatemala.
2. Identificar el clon de cacao que presenta mejor resistencia genética a los grupos filogenéticos de *Moniliophthora roreri*.
3. Determinar el fungicida de acción preventiva, bajo evaluación, más efectivo para el control de *Moniliophthora roreri*.
4. Determinar el fungicida de acción curativa, bajo evaluación, más efectivo para el control de *Moniliophthora roreri*.

## 9 Hipótesis

Las poblaciones de *Moniliophthora roreri*, aisladas a partir de las zonas productoras de cacao en Guatemala, son genéticamente diversas, por lo cual, los genotipos de cacao bajo evaluación, se verán afectados de formas diferentes en base al grupo filogenético del patógeno, siendo el genotipo de cacao CATIE R-6, el material que manifieste resistencia genética a la mayor parte de grupos filogenéticos del patógeno, siendo el fungicida de acción preventiva mancozeb y acción curativa azoxystrobin los más eficientes en el control del patógeno.

## 10 Materiales y métodos

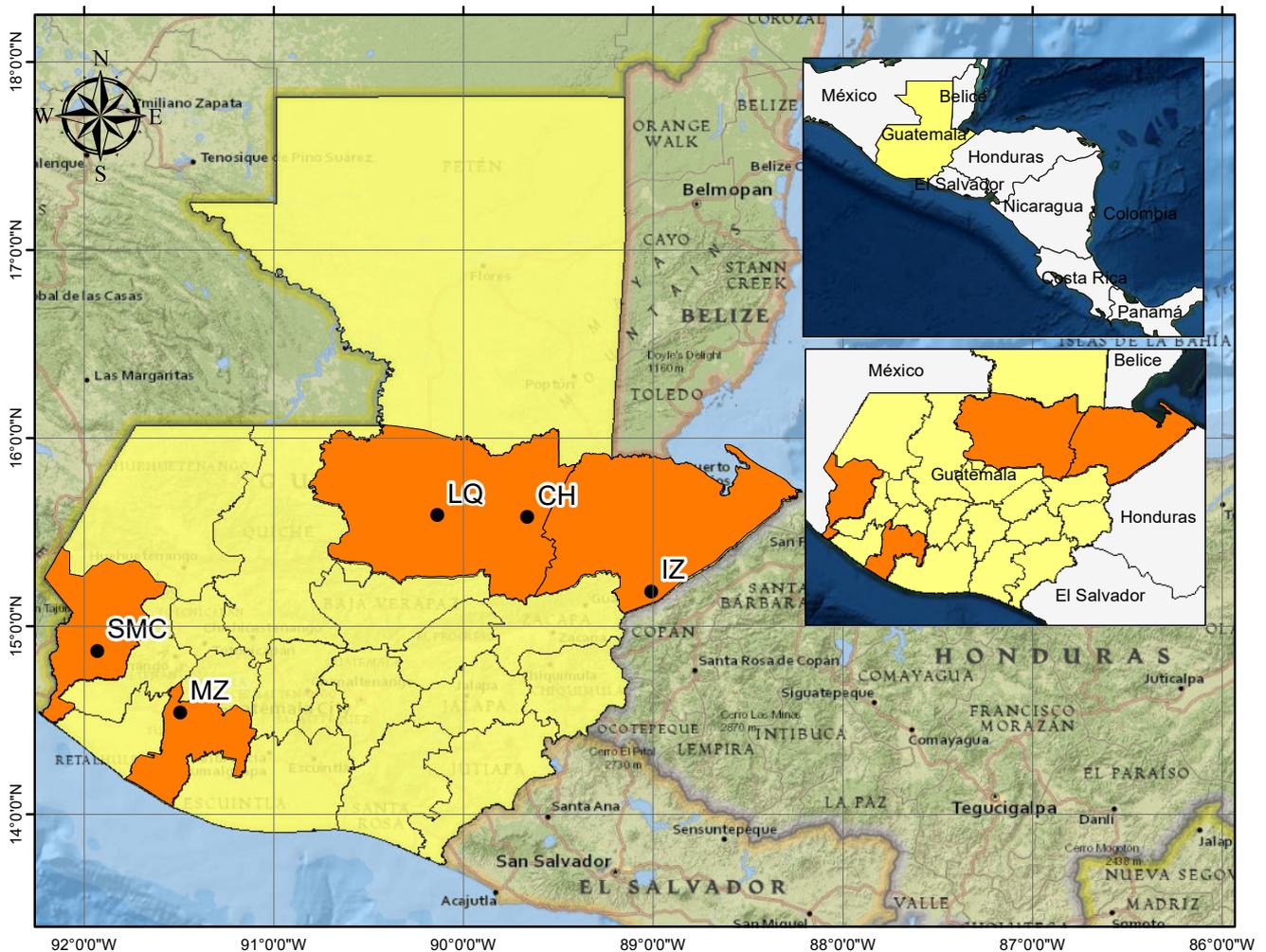
### 10.1 Enfoque y tipo de investigación

La presente investigación es de enfoque cuantitativo debido a la naturaleza de las variables de respuesta, las que sirvieron para evaluar la resistencia genética de los clones de cacao y la sensibilidad del patógeno antes diferentes fungicidas a través de análisis estadístico. El alcance de la investigación fue exploratorio, debido a que no existen registros sobre la diversidad genética de *Moniliophthora roreri* ni evaluaciones de resistencia de genotipos de cacao ante los grupos filogenéticos del patógeno. Posteriormente, la investigación fue de un alcance explicativo al poder relacionar la estructura genética del patógeno con el efecto que tenga sobre la resistencia de los genotipos evaluados.

## 10.2 Recolección de información

La colecta de material afectado por *M. royeri* a partir del cual se realizaron los aislamientos y estudio de diversidad genética se llevó a cabo en los departamentos de Suchitepéquez (San Miguel Panán), San Marcos (El Tumbador), Alta Verapaz (Cahabón, Lanquín) e Izabal (Puerto Barrios) por ser los mayores productores según el Censo Nacional Agropecuario 2003.

Las muestras consistieron de frutos con la sintomatología típica por ataque de *M. royeri*. Las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas, identificadas y trasladadas en condiciones de frío hacia el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía donde se inició el proceso de aislamiento.



**Figura 1.** Mapa de ubicación de las poblaciones de *Moniliophthora royeri* analizadas con el marcador molecular AFLP.

### 10.3 Técnicas e instrumentos

#### **Aislamiento, purificación y conservación de *M. royeri***

Para llevar a cabo el aislamiento, purificación y conservación del patógeno se empleó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) suplementado con lacto-fenol y sulfato de estreptomicina siguiendo el protocolo desarrollado por Carrera-Sánchez, Mosquera-Paredes, y Leiva-Mora(2014).

#### **Confirmación de *M. royeri* a través de Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Se procedió a realizar el aislamiento y extracción del ADN genómico a partir del micelio desarrollado sobre el medio de cultivo utilizando el kit comercial Pure gene Core Kit A(QUIAGEN), siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante. La cantidad y calidad fueron evaluados a través de la visualización con luz ultra violeta previo a una tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1%. Se emplearon los cebadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') esperando fragmentos de 600 – 750 pb correspondientes a la especie *M. royeri*. Los cebadores se anclan en los ADNr 25S y 18S, respectivamente, por lo que incluyen también el 5.8 S. Las condiciones para llevar a cabo la reacción fueron las descritas por Contreras (2016).

#### **Análisis de diversidad genética de los aislados de *M. royeri***

Se tomaron muestras de ADN de los diferentes aislados de *M. royeri*, de cada localidad, provenientes de los cultivos puros generados a partir de los medios de cultivo selectivos. La técnica de AFLPs se basa en la digestión de fragmentos de ADN usando las enzimas EcoRI/MseI y la posterior ligación de adaptadores y luego estos son amplificados con cebadores que no tienen nucleótidos selectivos en el extremo 3' del cebador, posteriormente se realiza otra amplificación con cebadores que contienen uno o dos nucleótidos selectivos en el extremo 3' del cebador. El análisis se realizó mediante el Kit AFLP Análisis System for Microorganism de Invitrogen®.

En resumen, la metodología utilizada fue la siguiente: se utilizó ADN a una concentración de 25 ng/μl, el cual fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI/MseI e incubado por 2 h a 37°C, después a 70°C por 15 min. La ligación de los adaptadores se hizo con los reactivos del kit y se incubó 2 horas a 20°C. Seguidamente se hizo una preamplificación usando la reacción en cadena de la polimerasa con el

siguiente perfil térmico en el termociclador: 94°C por 30 seg, 56°C por 60 seg, 72°C por 60 seg, el termociclador será programado para 20 ciclos. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2%. Se realizó una amplificación selectiva con los cebadores M-C + E-AC por haber mostrado el mayor polimorfismo. Los productos de PCR se corrieron en una gel de poliacrilamida al 5% en la cual se visualizaron las bandas amplificadas.

### **Preparación del inóculo.**

Partiendo de los grupos filogenéticos se procedió a escoger 1 aislado representativo de dichos grupos. A partir de estos aislados se preparará una suspensión de esporas a una concentración de  $10^9$  esporas/mL de acuerdo a metodología propuestas por Phillips-Mora y colaboradores (2005).

### **Ensayo de inoculación sobre frutos de cacao**

El experimento tuvo 2 factores (a) clones de cacao y (b) grupos filogenéticos del hongo, bajo un diseño completamente al azar con 5 repeticiones y cada unidad experimental estará compuesta por un fruto de cacao. El factor (a) estuvo compuesto por 6 niveles que corresponden a los 6 genotipos de cacao bajo evaluación, los cuales fueron CATIE R-1, CATIE R-4, POUND 7, y 3 genotipos criollos colectados en la zona de Lanquín, Alta Verapaz. El factor (b) estuvo compuesto de tres grupos filogenéticos.

Las inoculaciones se llevaron a cabo en frutos de cacao, sobre los cuales se realizó una aplicación de 1 mL de la suspensión de esporas utilizando un aspersor de gota fina. Los frutos asperjados fueron cubiertos con bolsas plásticas conteniendo un trozo de papel toalla y 50 mL de agua para mantener la humedad. Se procedió a hacer la lectura de datos a la 1, 2 y 3 semanas posterior a la inoculación.

Se tomaron como variables de respuesta (a) Incidencia de la enfermedad (IE), a través del porcentaje de frutos enfermos y (b) severidad interna (SI) medida por el porcentaje de necrosis interno in cada fruto, para la cual se procedió a seccionarlo en forma longitudinal y evaluando mediante la siguiente escala: 0, 0%; 1, 1-20%; 2, 21-40%; 3, 41-60%; 4, 61-80% y 5, mayor al 80% (Sánchez & González, 1989).

## **Evaluación de sensibilidad a fungicidas**

Como fungicidas preventivos se evaluaron: (a) hidróxido de cobre y (b) clorotalonil. Como fungicidas curativos se evaluarán: (a) azoxystrobin y (b) benomyl. Los factores evaluados fueron (i) dosis de fungicidas, (ii) grupos filogenéticos del patógeno. El experimento tuvo un diseño completamente al azar con 5 repeticiones. Cada unidad experimental estuvo compuesta de 1 caja de Petri. Las variables a evaluar fueron (a) Porcentaje (%) de germinación de conidios y (b) crecimiento micelial. Las dosis evaluadas fueron las siguientes: 0, 1, 10, 100, 150, 300 y 500 mg L<sup>-1</sup>. El número de grupos filogenéticos se estableció en 3.

De cada grupo filogenético se preparó una suspensión a una concentración de 10<sup>4</sup> esporas/mL. De cada suspensión se tomaron 10 uL con los cuales se llevó a cabo la inoculación sobre cada uno de los tratamientos de fungicidas (fungicida:dosis). La toma de datos para la variable % de germinación se llevó a cabo cada 24 horas hasta que el tratamiento testigo alcanzó el 90 % de germinación de conidios. Para la variable de crecimiento micelial se sembró una sección de 3X3 mm de medio de cultivo con micelio del hongo, preparado previamente. El crecimiento micelial fue medido a través del diámetro en cm y se llevó a cabo cada 24 horas hasta que el tratamiento testigo llenó la caja de Petri que lo contenía.

### **10.4 Procesamiento y análisis de la información**

Con el perfil de bandas se generó una matriz binaria de presencia (1) ausencia (0) para cada uno de los loci amplificados. La matriz se exportó al programa Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis PAST v3.18 (Ryan et al., 2001) para generar una matriz de distancias genéticas con el índice de Dice y posterior análisis con el algoritmo *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* (UPGMA) (M Nei & Kumar, 2000) generando un dendrograma en formato Nexus, el cual fue exportado hacia el programa FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2008) para una mejor visualización del dendrograma a nivel de los aislados de *M. royeri*.

Con la matriz de datos binarios se calcularon varios parámetros relacionados con la diversidad genética,  $H_j$  (diversidad genética de Nei) (Masatoshi Nei, 1973),  $H_t$  (diversidad genética total) and  $H_w$  (promedio de la diversidad genética dentro de las poblaciones), con el programa AFLP-SURV v.1.0 (Vekemans et al., 2002). El número total de bandas, el número de loci polimórficos, el porcentaje de loci polimórficos

(%), el número observado de alelos por loci ( $N_a$ ), el número efectivo de alelos por locus ( $N_e$ ) (Kimura & Crow, 1964), el índice de información de Shannon (I) (Shannon & Weaver, 1949) y el Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA, Phi) (Excoffier et al., 1992), se calcularon utilizando el programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2006, 2012). El flujo genético ( $N_m$ ) entre poblaciones se estimó usando la ecuación  $N_m = [(1 / F_{st}) - 1] / 4$ . El análisis de las coordenadas principales (PCoA) de todos los aislados de *M. rozeri* se llevó a cabo utilizando el programa GenAlEx 6.5

Para inferir la estructuración genética de las poblaciones muestreadas, se utilizó un método de agrupación basado en un modelo bayesiano, implementado por el programa STRUCTURE versión 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). El programa se ejecutó con 10,000 repeticiones, seguidos de 100,000 iteraciones MCMC para el número de agrupaciones  $K=1$  a 10, con diez repeticiones para cada  $K$ . El modelo asumió una frecuencia alélica correlacionada para las poblaciones y se evaluaron los modelos de mezcla (los individuos pueden tener una ascendencia mixta, lo que sería coherente con un escenario en el que históricamente se ha producido algún grado de recombinación) y sin mezcla de ascendencia para los individuos (Falush et al., 2003). Debido a que se asumió una estructuración débil, se implementó el modelo *LOCPRIOR*, que utiliza los lugares de muestreo como información previa para ayudar a la agrupación (Hubisz et al., 2009). Debido a la desigualdad del muestreo en las poblaciones geográficas, los parámetros alfa se fijaron en  $1/K$ , siguiendo las recomendaciones (Wang, 2017).

Los archivos de salida fueron analizados con STRUCTURE HARVESTER, un programa para compilar los resultados generados por el programa STRUCTURE (Earl & vonHoldt, 2012), que aplica el método de Evanno (Evanno et al., 2005), para detectar el número óptimo de  $K$  que mejor se ajusta a los datos. Las Q-matrices replicadas resultantes para el  $K$  óptimo fueron alineadas en el programa CLUster Matching and Permutation Program CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg, 2007) y se visualizó un gráfico de barras usando el programa Distruct, un programa para la visualización gráfica de la estructura de la población (Rosenberg, 2004).

Con las pruebas de inoculación de los frutos para determinar la incidencia, así como la severidad interna se realizó un análisis de tablas de frecuencia mediante la prueba de Chi cuadrado con un nivel de significancia del 5 %. Para las pruebas estadísticamente significativas se realizó un posterior análisis de los residuos estandarizados para identificar las interacciones con mayor aporte a la desviación entre

los valores observados y esperados. Para esto se empleó el programa estadístico R v3.6.3. y los paquetes stats (R core Team, 2020) y agricolae (de Mendiburu, 2020).

Para el caso de los ensayos de efectividad de los diferentes fungicidas, los análisis de varianza se realizaron con un nivel de significancia del 5 % y el cálculo del tamaño del efecto se hizo mediante el valor de eta cuadrado ( $\eta^2$ ). Posteriormente, se realizaron pruebas de comparación por pares con la prueba de t de Student con 5 % de significancia aplicando la corrección de Bonferroni. Las pruebas anteriormente descritas se realizaron en el programa R v3.6.3 con el paquete stats (R core Team, 2020) y agricolae (de Mendiburu, 2020). La visualización de los resultados de las pruebas del análisis de varianza y comparaciones pareadas, se realizaron con el paquete ggstatsplot (Patil, 2018).

## **11 Vinculación, difusión y divulgación**

Se contó con la vinculación de la Czech University of Life Sciences y la Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas de la Universidad Rafael Landívar.

## 12 Productos, hallazgos, conocimientos o resultados

### 12.1 Describir la estructura genética de las poblaciones de *Moniliophthora roreri* presentes en las principales zonas productoras de cacao de Guatemala.

#### *Análisis polimórfico*

Las cuatro combinaciones de cebadores selectivos de AFLP produjeron un total de 140 loci amplificados a partir de 69 muestras representativas de cinco poblaciones de *M. roreri*. El número de loci polimórficos estuvo en el rango de 14 a 23 con un valor promedio de 17.4. La proporción de loci polimórficos tuvo un valor mínimo, máximo y medio de 9.29, 16.42 y 12.28%, respectivamente. La población con el mínimo y máximo número y proporción de loci polimórficos fue SMC e Izabal, respectivamente (Tabla 1). Todos estos resultados indicaron que existió un bajo polimorfismo en las poblaciones de *M. roreri*.

Tabla 1. *Parámetros de la variación genética de las poblaciones de M. roreri. Número de aislados por población (N), porcentaje de loci polimórfico (PLP), número de alelos diferentes (Na), número de alelos efectivos (Ne), Índice de información de Shannon (I), diversidad genética de Nei (H<sub>j</sub>). Los valores entre paréntesis indican el error estándar.*

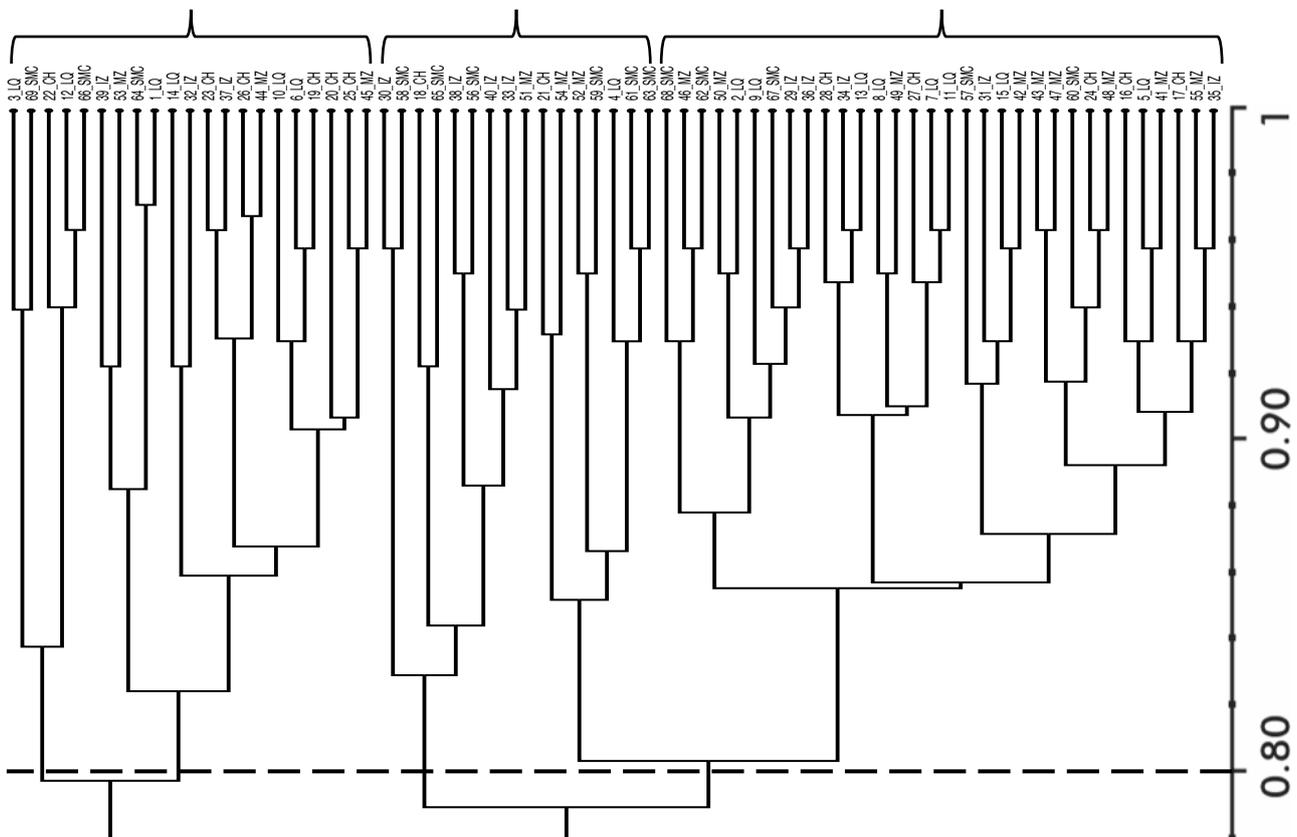
Población	Departamento	Región	N	Loci polimórficos	PLP	Na	Ne	I	H <sub>j</sub>
LQ	Alta verapaz		15	15	10.71	0.80 (0.213)	1.232 (0.081)	0.027 (0.064)	0.143 (0.048)
CH	Alta verapaz	Nororiente	13	16	11.43	1.15 (0.221)	1.243 (0.057)	0.072 (0.055)	0.172 (0.039)
IZ	Izabal		15	23	16.42	0.95 (0.223)	1.195 (0.066)	0.067 (0.055)	0.136 (0.041)
MZ	Suchitpéquez	Suroccidente	12	19	13.57	1.30 (0.206)	1.272 (0.068)	0.052 (0.058)	0.188 (0.042)
SMC	San Marcos		14	14	9.29	1.30 (0.206)	1.360 (0.088)	0.071 (0.065)	0.226 (0.049)
Promedio			13	17.4	12.28	1.10 (0.096)	1.259 (0.032)	0.0578 (0.009)	0.173 (0.020)

### *Diversidad genética*

El análisis de la diversidad genética mostró que la diversidad genética general ( $H_i$ ) fue de 0.1289, la diversidad genética media dentro de las poblaciones ( $H_w$ ) fue de 0.1310. La diversidad genética de Nei ( $H_j$ ) de las diferentes poblaciones osciló entre 0.136 (IZ) y 0.226 (SMC) con un valor medio de 0.173. El índice de información de Shannon (I) estuvo en el rango de 0.027 (LQ) hasta de 0.071 (SMC) con un valor promedio de 0.246. (Tabla 2).

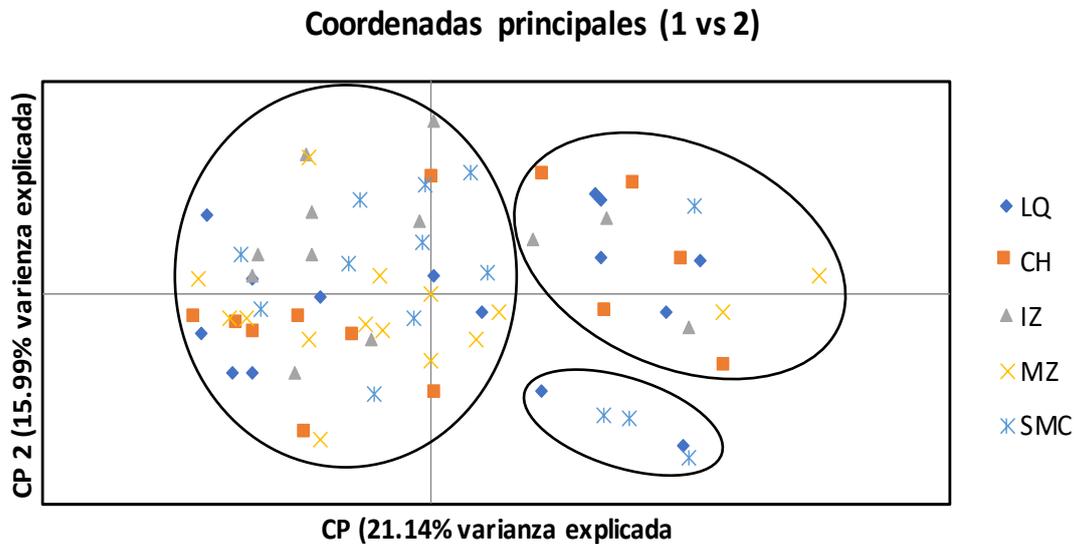
### *Análisis de grupos*

El dendrograma (Figura 2) basado en la similitud genética de Dice reveló tres grupos principales con un coeficiente de similitud de 0.8. El primer grupo (A) incluyó 21 aislados, el segundo grupo (B) estuvo compuesto de 16 aislados y el tercer grupo (C) incluyó 32 aislados de *M. roreri*. En los tres grupos se identificó la presencia de aislados provenientes de las cinco poblaciones analizadas.



**Figura 2.** Dendrograma de tipo Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages UPGMA generado a partir de 69 aislados de *Moniliophthora roreri* mediante el marcador molecular *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP).

El PCoA basado en la matriz de distancia genética también reveló tres grupos principales (Figura 3). En los dos grupos mayores se incluyeron aislados de las cinco poblaciones. El tercer grupo estuvo compuesto por aislados de LQ y SMC. Los dos vectores principales revelaron el 21.14% y 15.99% de la variación genética, respectivamente.



**Figura 3.** Análisis de coordenadas principales que revela el patrón de agrupación de los 69 individuos de *Moniliophthora roreri*. Los puntos representan los individuos de cada población indicada por cada color.

### ***Estructura genética***

Sobre la base del AMOVA (Tabla 2), la variación dentro de las poblaciones representó el 91% de la variación total. La variación entre regiones y entre poblaciones representó el 3% y 6% de la variación total, respectivamente, lo que indica que la diferenciación existía principalmente dentro de las poblaciones. El flujo genético ( $N_m$ ) entre las poblaciones fue de 3.52, lo que revela una mayor comunicación genética entre las poblaciones.

El algoritmo bayesiano implementado en STRUCTURE asignó las 69 aislados a dos (sin mezcla) y dos (con mezcla) grupos genéticos distintos en base a los valores óptimos del  $\Delta K$  en base al método de Evanno (Evanno et al., 2005) (Figura 4).

Tabla 2. Resumen del análisis de la varianza molecular de los 69 aislados de *M. roreri*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Varianza estimada	Porcentaje %	Estadísticos Phi	Valor P
Entre regiones	1	2.473	2.473	0.062	3%	PhiRT	0.028 0.181
Entre poblaciones	3	6.779	2.260	0.145	6%	PhiPR	0.056 0.148
Dentro de poblaciones	64	143.240	2.039	2.246	91%	PhiPT	0.247 0.001

Nota: \* PhiRT = proporción de la varianza genética total que se debe a la varianza entre regiones, PhiPR = proporción de la varianza genética total que se debe a la varianza entre poblaciones dentro de una región, PhiPT = proporción de la varianza genética total que se debe a la varianza entre individuos dentro de una población, P = valor de probabilidad mediante una prueba de aleatorización con 999 permutaciones.

El grupo 1 y grupo 2 están representados por los colores naranja y celeste, respectivamente. Cuando se implementó el modelo de mezcla, los aislados de *M. roreri* de las poblaciones IZ y MZ presentaron una mayoría de ascendencia del grupo 2. Los restantes aislados de las poblaciones LQ, CH y SMC presentaron una mezcla proporcional de los grupos genéticos 1 y 2 (Figura 5a). Cuando se aplicó un modelo sin mezcla, los aislados de las poblaciones LQ, IZ presentaron una mayoría de ascendencia del grupo 2. Los aislados de la población CH tuvieron una predominancia de ascendencia del grupo 1. Finalmente, los aislados de las poblaciones MZ y SMC presentaron una mezcla proporcional de los grupos genéticos 1 y 2 (Figura 5b).

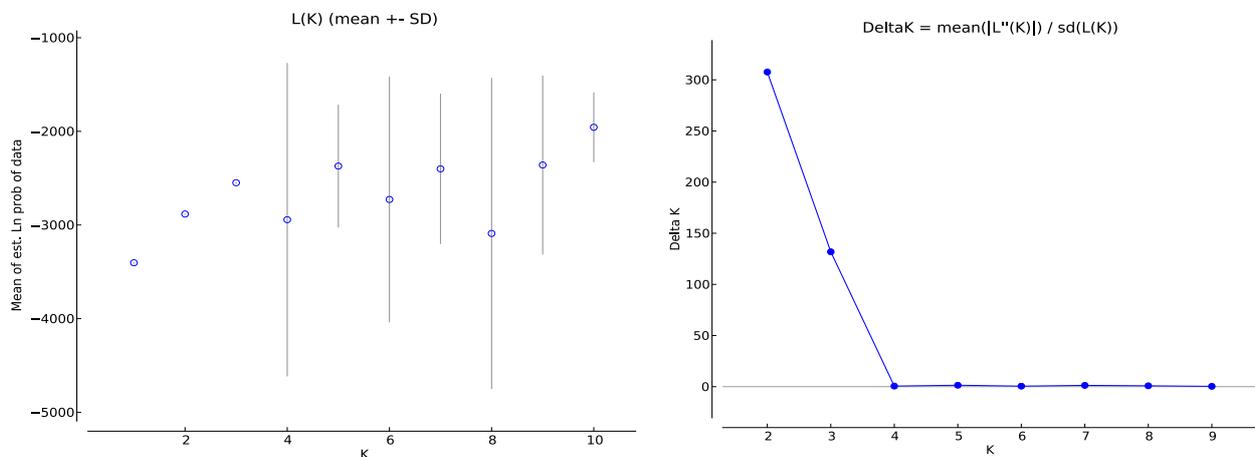
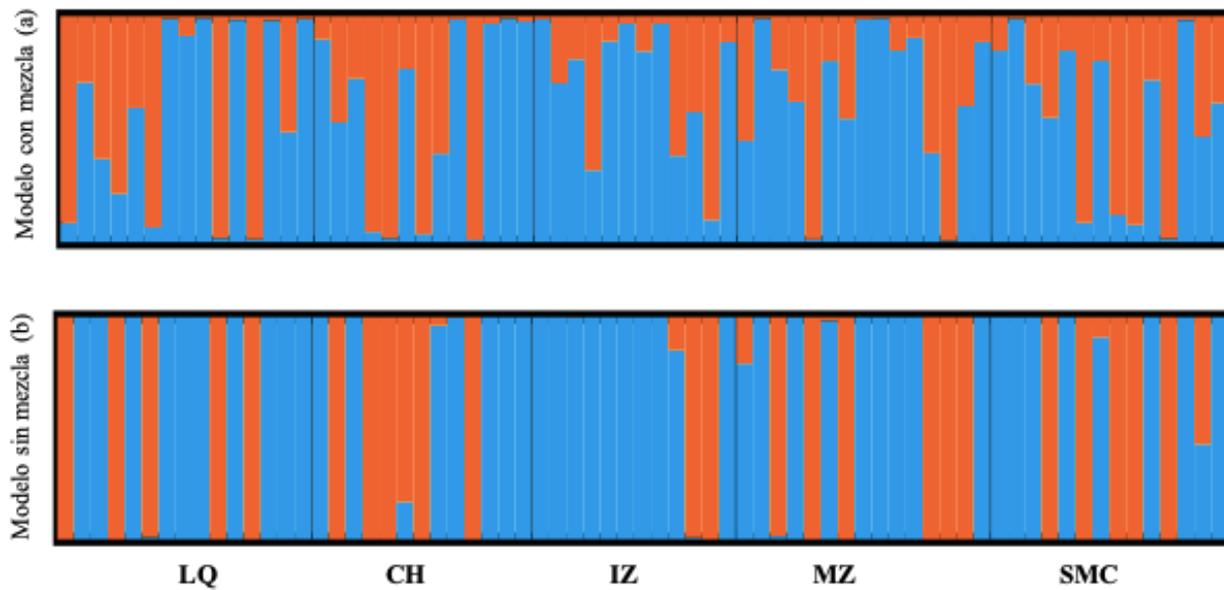


Figura 4. Valores de diagnóstico de L(K) y Delta-K del análisis de STRUCTURE de las poblaciones de *Moniliophthora roreri*.



**Figura 5.** Resultados del análisis de STRUCTURE de las poblaciones de *Moniliophthora roreri* para  $K = 2$  con modelo sin mezcla (a) y modelo de mezcla (b) de ascendencia. Cada color representa un grupo definido por Structure. Las barras verticales representan los aislamientos, y la longitud de cada segmento coloreado en cada barra vertical representa la proporción aportada por las poblaciones ancestrales.

### 12.2 Identificar el clon de cacao que presenta mejor resistencia genética a los grupos filogenéticos de *Moniliophthora roreri*.

La evaluación de resistencia a través de la incidencia de frutos sanos y enfermos demostró que sin importar el genotipo utilizado, la proporción de plantas enfermas no mostró diferencia estadística ( $p = 0.9577$ ), siendo los seis genotipo igualmente susceptibles a la presencia de *M. roreri*. El detalle de la evaluación se muestra en la Tabla 3. En la Figura 6 se puede observar que a pesar de que el genotipo criollo 2 presenta mayor proporción de plantas enfermas, esta diferencia no está estadísticamente significativa dado el bajo valor de Chi cuadrado ( $\chi^2 = 1.0588$ ). Por tal razón, al examinar los residuos estandarizados, ninguno de ellos marca un aporte sensible en favor o en contra de la proporción de plantas enfermas.

Tabla 3. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la incidencia de frutos enfermos de los genotipos de cacao evaluados.

Genotipo de cacao	Plantas enfermas	Plantas sanas	Proporción enfermas	Residuos estandarizados	
Criollo_1	14	1	0.93	0.2057983	-0.205798
Criollo_2	15	0	1.0	-1.028991	1.028991
Criollo_3	14	1	0.93	0.205798	-0.205798
CATIE_R1	14	1	0.93	0.205798	-0.205798
CATIE_R4	14	1	0.93	0.205798	-0.205798
POUND_7	14	1	0.93	0.205798	-0.205798
$\chi^2 = 1.0588$	Grados de libertad = 5		Valor $p = 0.9577$		

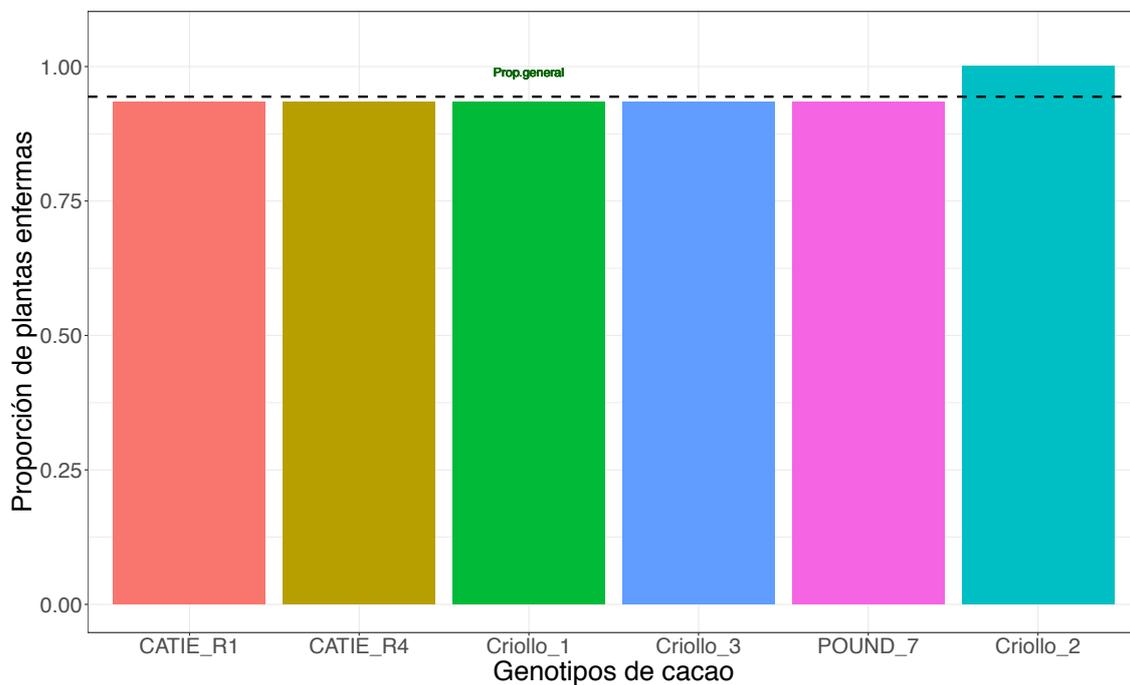
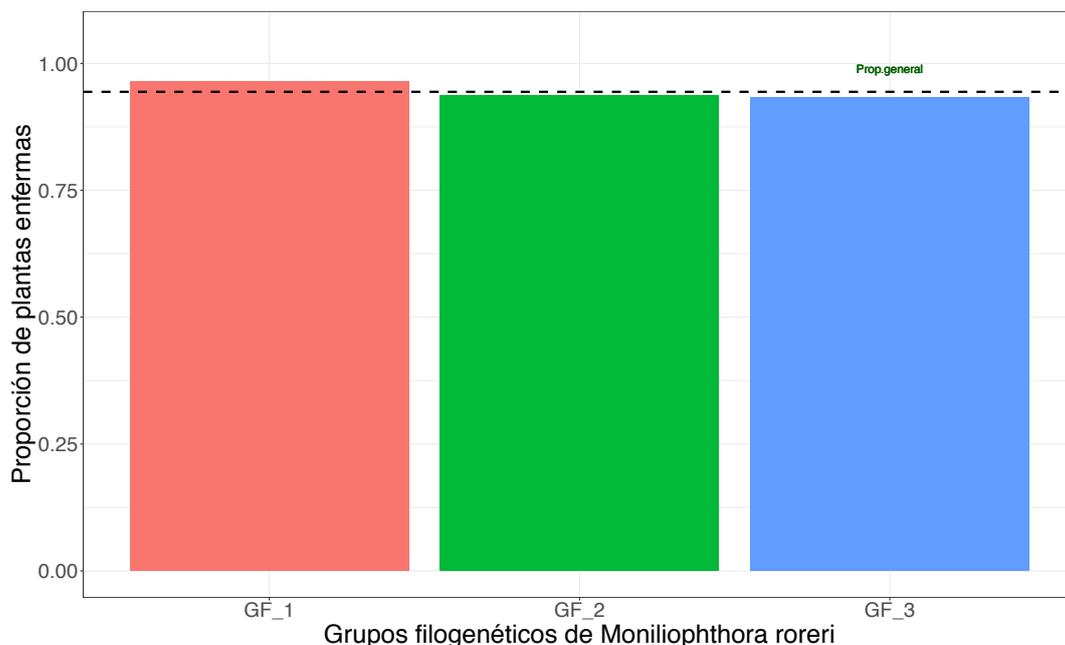


Figura 6. Incidencia de frutos enfermos por *Moniliophthora roreri* a nivel de genotipos de cacao. La proporción general de frutos enfermos se indica mediante la línea punteada.

Al examinar el comportamiento de la incidencia de plantas enfermas causado por los diferentes grupos filogenéticos de *M. royeri*, se observó que la prueba de Chi cuadrado no mostro diferencia significativa ( $p = 0.8564$ ), por lo que los tres grupos evaluados causaron un daño de igual magnitud en cuanto a la proporción de plantas enfermas (Tabla 4). En la Figura 7 se puede observar que a pesar de que loss grupo filogenéticos 1 y 2 presenta mayor proporción de plantas enfermas, esta diferencia no esta estadísticamente significativa dado el bajo valor de Chi cuadrado ( $\chi^2 = 0.31008$ ). Por tal razón, al examinar los residuos estandarizados, ninguno de ellos marca un aporte sensible en favor o en contra de la proporción de plantas enfermas.

Tabla 4. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la indicencia de frutos enfermos por cada grupo filogenético de *Moniliophthora royeri*.

Grupo de anastomosis	Plantas enfermas	Plantas sanas	Proporción enfermas	Residuos estandarizados	
GF_1	29	1	0.97	-0.55223	0.55223
GF_2	28	2	0.96	0.325395	-0.325395
GF_3	28	2	0.93	0.325395	-0.325395
$\chi^2 = 0.31008$		Grados de libertad = 2		Valor $p = 0.8564$	



**Figura 7.** Incidencia de frutos enfermos por los grupos filogenéticos de *Moniliophthora royeri*. La proporción general de frutos enfermos se indica mediante la línea punteada.

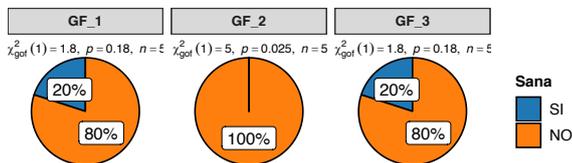
Al detallar sobre la incidencia de frutos enfermos tomando en cuenta la interacción de cada genotipo con los grupos filogenéticos de *M. royeri*, se observa que para ninguno de los casos (genotipo:grupo filogenético) no se evidenció ninguna diferencia significativa ( $p > .05$ ). Sin embargo, dentro de los genotipos comerciales, el genotipo CATIE\_R4 mostró una diferencia sensible sobre la proporción de plantas sanas al ser expuestas al grupo filogenético 3.

En cuanto a la respuesta de los genotipos no comerciales, el Criollo\_2 mostró una incidencia de plantas enfermas de 1.0 sin importar el grupo filogenético al cual fue expuesto durante el proceso de inoculación. El detalle de las pruebas de Chi cuadrado para cada una de las interacciones genotipo:grupo filogenético se muestra en la Figura 8.

**Incidencia de frutos enfermos**

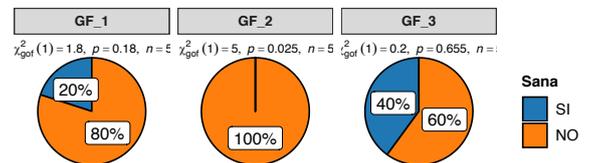
**Resistencia de genotipos de cacao: CATIE\_R1**

$\chi^2_{Pearson}(2) = 1.15, p = 0.562, \hat{V}_{Cramer} = 0.00, CI_{95\%} [0.00, 0.00], n_{obs} = 15$



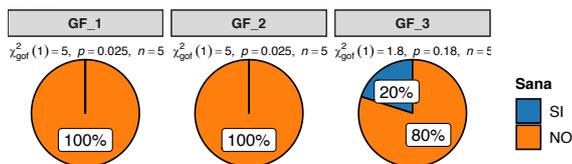
**Resistencia de genotipos de cacao: CATIE\_R4**

$\chi^2_{Pearson}(2) = 2.50, p = 0.287, \hat{V}_{Cramer} = 0.16, CI_{95\%} [0.00, 0.52], n_{obs} = 15$



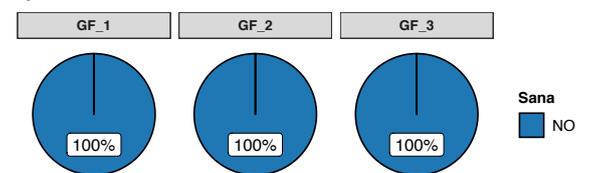
**Resistencia de genotipos de cacao: Criollo\_1**

$\chi^2_{Pearson}(2) = 2.14, p = 0.343, \hat{V}_{Cramer} = 0.00, CI_{95\%} [0.00, 0.00], n_{obs} = 15$



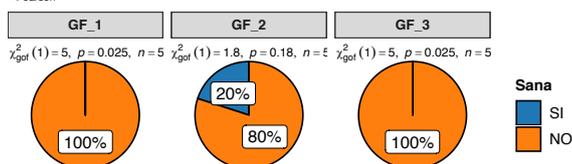
**Resistencia de genotipos de cacao: Criollo\_2**

$\chi^2_{Pearson}(2) = 0.00, p = 1.000, \hat{V}_{Cramer} = 0.00, CI_{95\%} [0.00, 0.00], n_{obs} = 15$



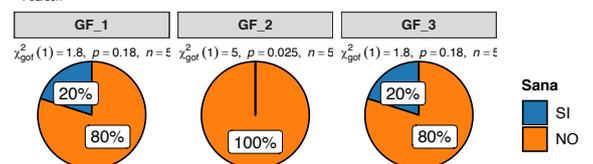
**Resistencia de genotipos de cacao: Criollo\_3**

$\chi^2_{Pearson}(2) = 2.14, p = 0.343, \hat{V}_{Cramer} = 0.00, CI_{95\%} [0.00, 0.00], n_{obs} = 15$



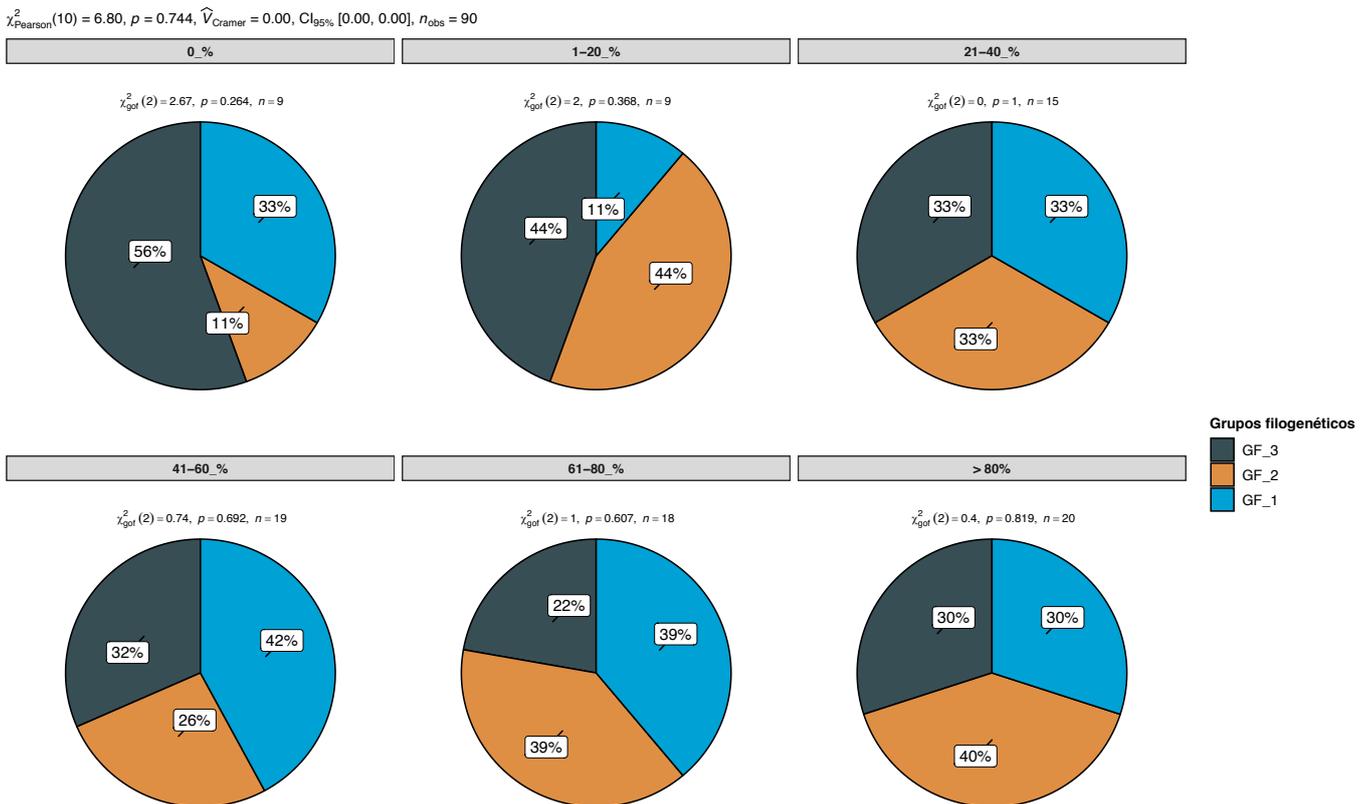
**Resistencia de genotipos de cacao: POUND\_7**

$\chi^2_{Pearson}(2) = 1.15, p = 0.562, \hat{V}_{Cramer} = 0.00, CI_{95\%} [0.00, 0.00], n_{obs} = 15$



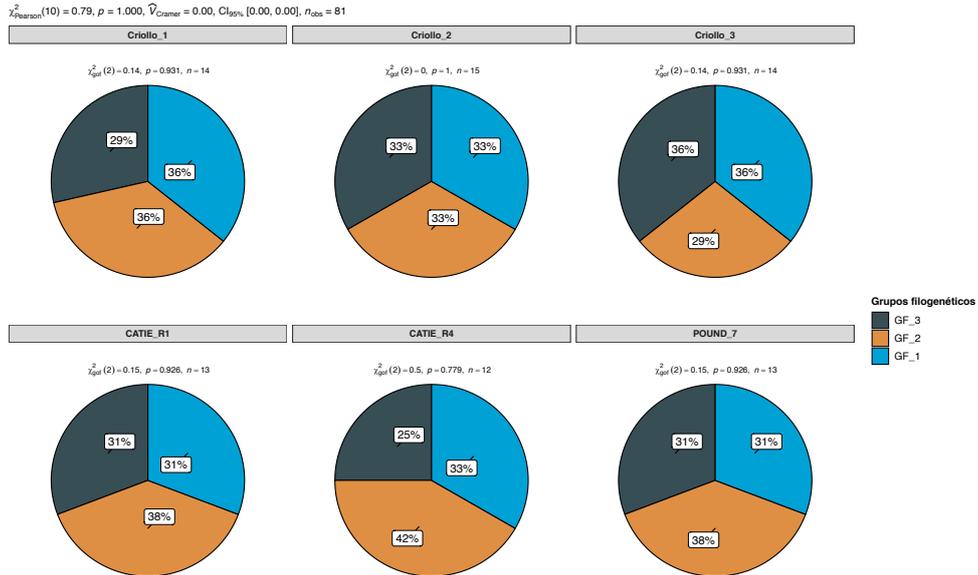
**Figura 8.** Prueba de Chi cuadrado de la incidencia de frutos enfermos de cada genotipo de cacao al ser inoculado con los tres grupos filogenéticos de *Moniliophthora royeri*.

Al examinar el grado de severidad de los frutos enfermos ocasionado por cada uno de los grupos filogenético de *M. roreri*, no se observó diferencia significativa entre los niveles de escalas de severidad tras la prueba de Chi cuadrado ( $p = .744$ ). Al analizar el efecto de cada grupo filogenético sobre la proporción de plantas enfermas en cada una de las escalas de severidad, tampoco se evidenció diferencia estadísticamente significativa tras la prueba de asociación de variables de Chi cuadrado ( $p > .05$ ). Sin embargo, en las escalas del 61-80% y > 80% el grupo filogenético 2 generó el mayor porcentaje de plantas enfermas, por lo que es un punto para tener en consideración para planes de manejo. El detalle de la evaluación descrita se muestra en la Figura 9.

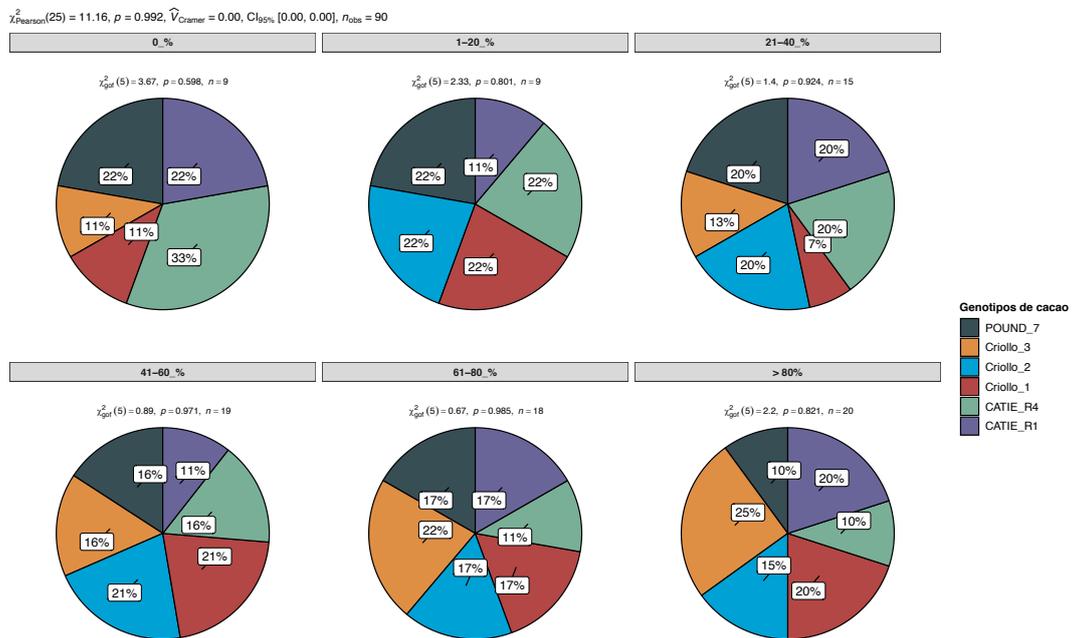


**Figura 9.** Prueba de Chi cuadrado sobre la severidad interna de los frutos de cacao enfermos en función de las escalas de daño generadas por cada grupo filogenético de *Moniliophthora roreri*.

Al examinar el porcentaje del grado de severidad de los frutos enfermos ocasionado por cada uno de los grupos filogenético de *M. roreri*, no se observó diferencia significativa entre los seis genotipos de cacao, tanto comerciales como criollos, tras la prueba de Chi cuadrado ( $p > .05$ ). El detalle de la evaluación se muestra en la Figura 10.



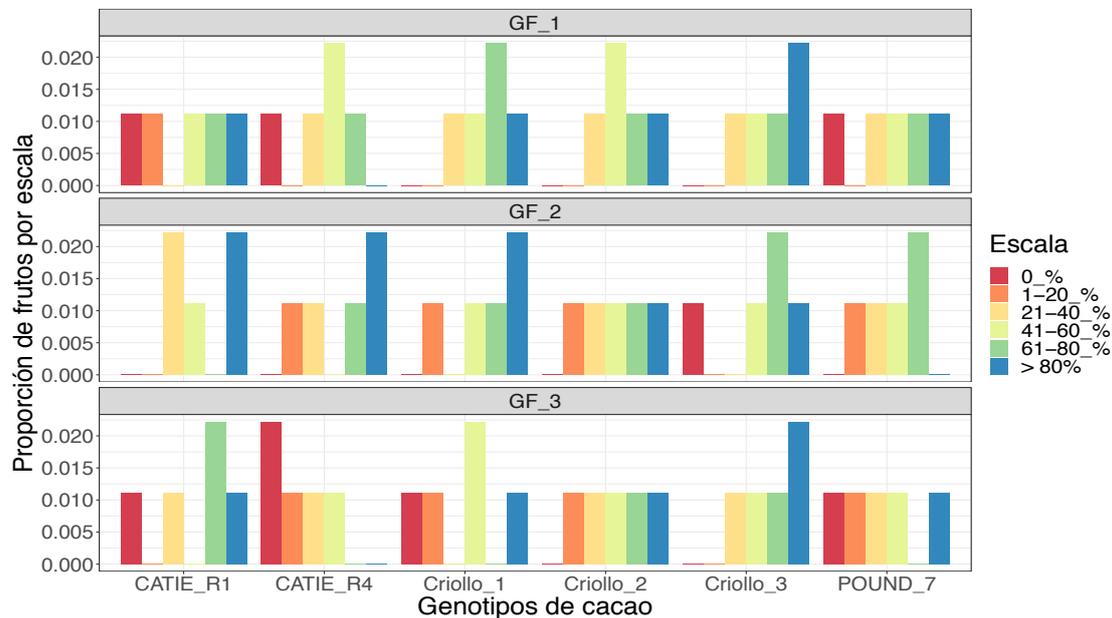
**Figura 10.** Prueba de Chi cuadrado sobre la severidad interna de los frutos de cacao enfermos en función de los genotipos de cacao inoculados por cada grupo filogenético de *Moniliophthora roreri*.



**Figura 11.** Prueba de Chi cuadrado sobre la severidad interna de los frutos de cacao enfermos en función de las escalas de daño generadas observadas en cada genotipo de cacao.

Al evaluar el comportamiento de cada uno de los genotipos de cacao dentro de las diferentes escalas de severidad, no se encontró diferencia significativa ( $p > .05$ ) tras la prueba de asociación de variables de Chi cuadrado. Esto indica que los genotipos comerciales y criollos se comportan de forma homogénea en cada una de las escalas de

severidad. Sin embargo, en las escalas más altas de severidad, los genotipos comerciales Pound 7 y CATIE R4 mostraron menores porcentajes de frutos enfermos en dichas escalas. El detalle de la evaluación se muestra en la Figura 11. Para el caso del detalle de la proporción de plantas enfermas dentro de cada escala de severidad causada por cada grupo filogenético en todos los genotipos evaluados, se muestra en la Figura 12.

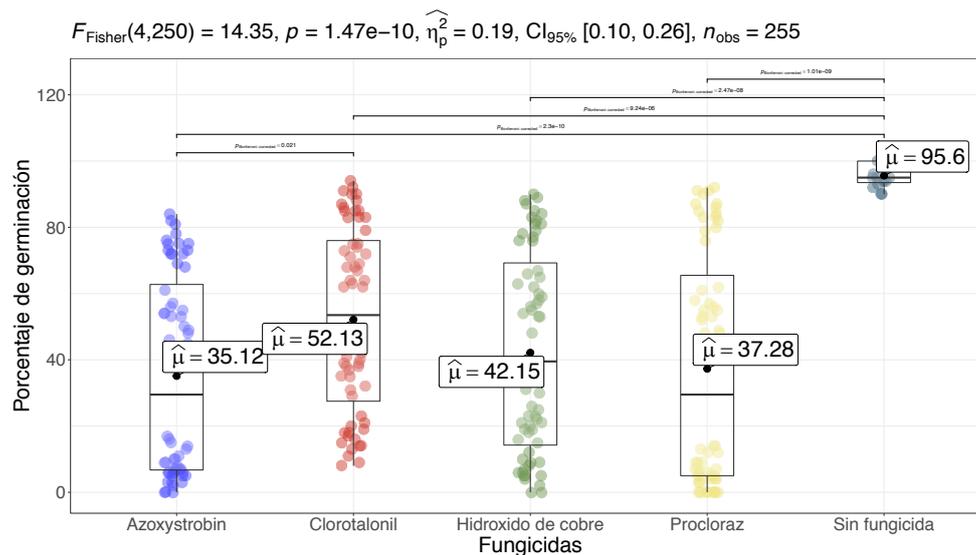


**Figura 12.** Proporción de frutos de cacao clasificados por escala de daño en función del genotipo de cacao inoculado con los diferentes grupos filogenéticos de *Moniliophthora roreri*.

### 12.3 Determinar el fungicida de acción preventiva y curativa, bajo evaluación, más efectivo para el control de *Moniliophthora roreri*.

En las evaluaciones de eficiencia de fungicidas para el control de los diferentes grupos filogenéticos de *M. roreri*, fue común encontrar que los tratamientos testigos, en los cuales no se utilizó ningún fungicida, el crecimiento micelial y germinación de conidias in vitro fue estadísticamente superior a los tratamientos con aplicación de fungicidas en las diferentes dosis evaluadas. También fue común encontrar que el incremento en la dosis, sin importar el tipo de fungicida utilizado, produjo redujo tanto el crecimiento micelial como la germinación de conidias en las pruebas in vitro.

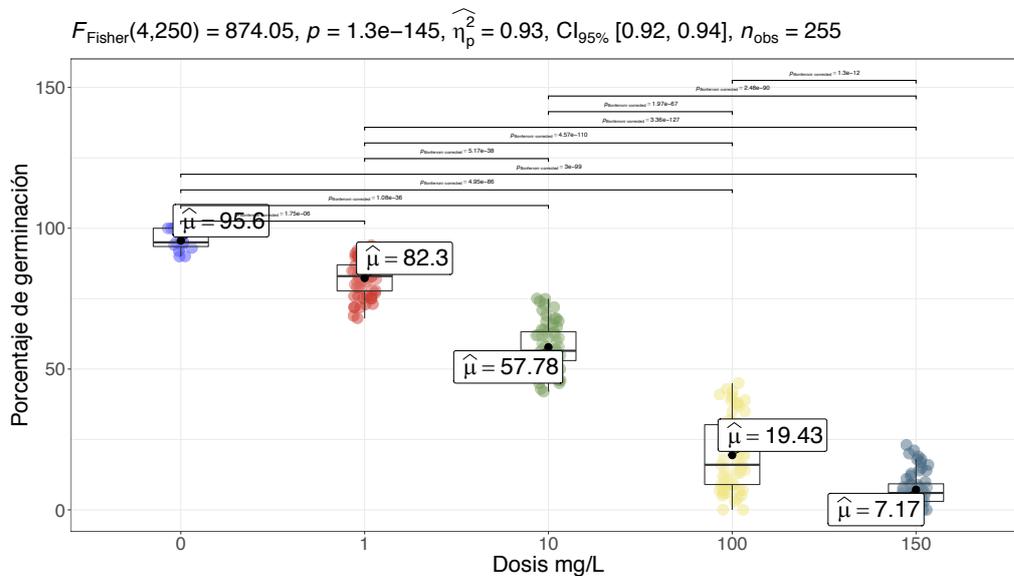
Al evaluar el efecto de los diferentes fungicidas sobre la germinación de conidias de *M. roreri* in vitro, se encontró diferencia significativa ( $p < .001$ ), siendo el fungicida clorotalonil el más efectivo con una media de 52.13% de conidias germinadas. En contraste, el tratamiento testigo mostró un 95.6% de germinación de conidias. El tamaño del efecto fue bajo ( $\eta^2 p = 0.19$ ) lo que supone que la diferencia encontrada no es únicamente debida a los diferentes fungicidas, ya que como se verá más adelante, el factor de las dosis es un elemento que influencia fuertemente la germinación de las conidias. El detalle de la efectividad in vitro de los fungicidas puede observarse en la Figura 13.



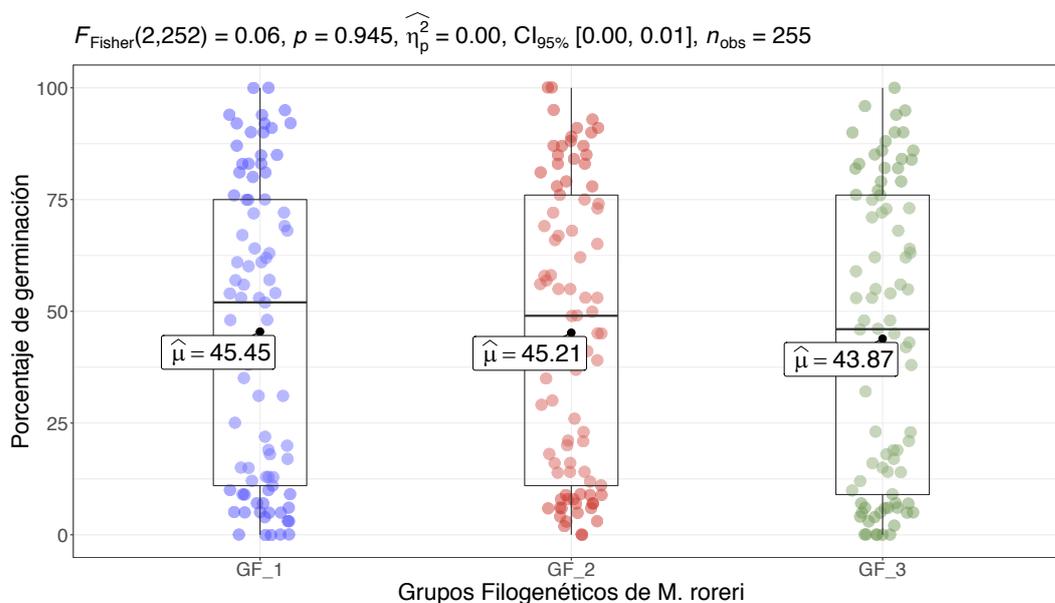
**Figura 13.** Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de diferentes fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

Al examinar el efecto de las cinco dosis evaluadas in vitro, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < .001$ ) con un tamaño del efecto alto ( $\eta^2 p = 0.93$ ) siendo el tratamiento equivalente a  $0 \text{ mgL}^{-1}$  el menos efectivo, mientras que a medida que las dosis fueron aumentando, la germinación de conidias se vio considerablemente disminuida. Los menores porcentajes de germinación de conidias se dieron con la dosis de  $150 \text{ mgL}^{-1}$  la cual fue estadísticamente diferente en cada una de las comparaciones por pares con el resto de las dosis evaluadas. El detalle de la evaluación se observa en la Figura 14.

En cuanto al comportamiento de la germinación de conidias en función de los grupos filogenéticos de *M. roreri*, no se encontró evidencia de que existiera diferencia significativa ( $p > .05$ ), lo que supone que los tres grupos filogenéticos son igualmente agresivos y no presentan diferencia entre ellos Figura 15.

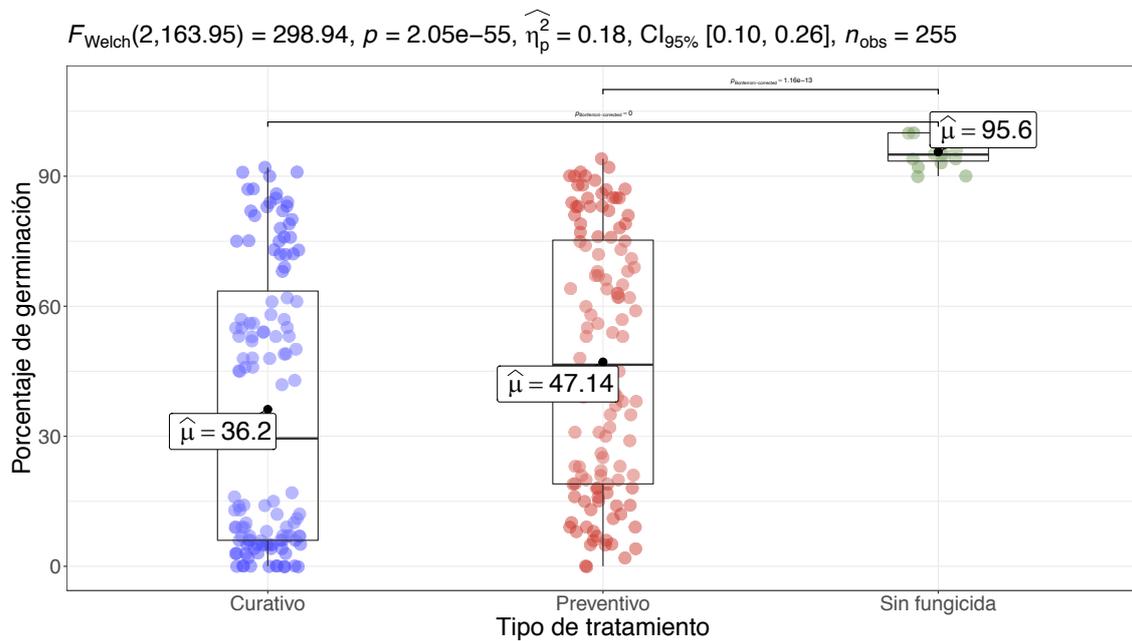


**Figura 14.** Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de diferentes dosis de fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .



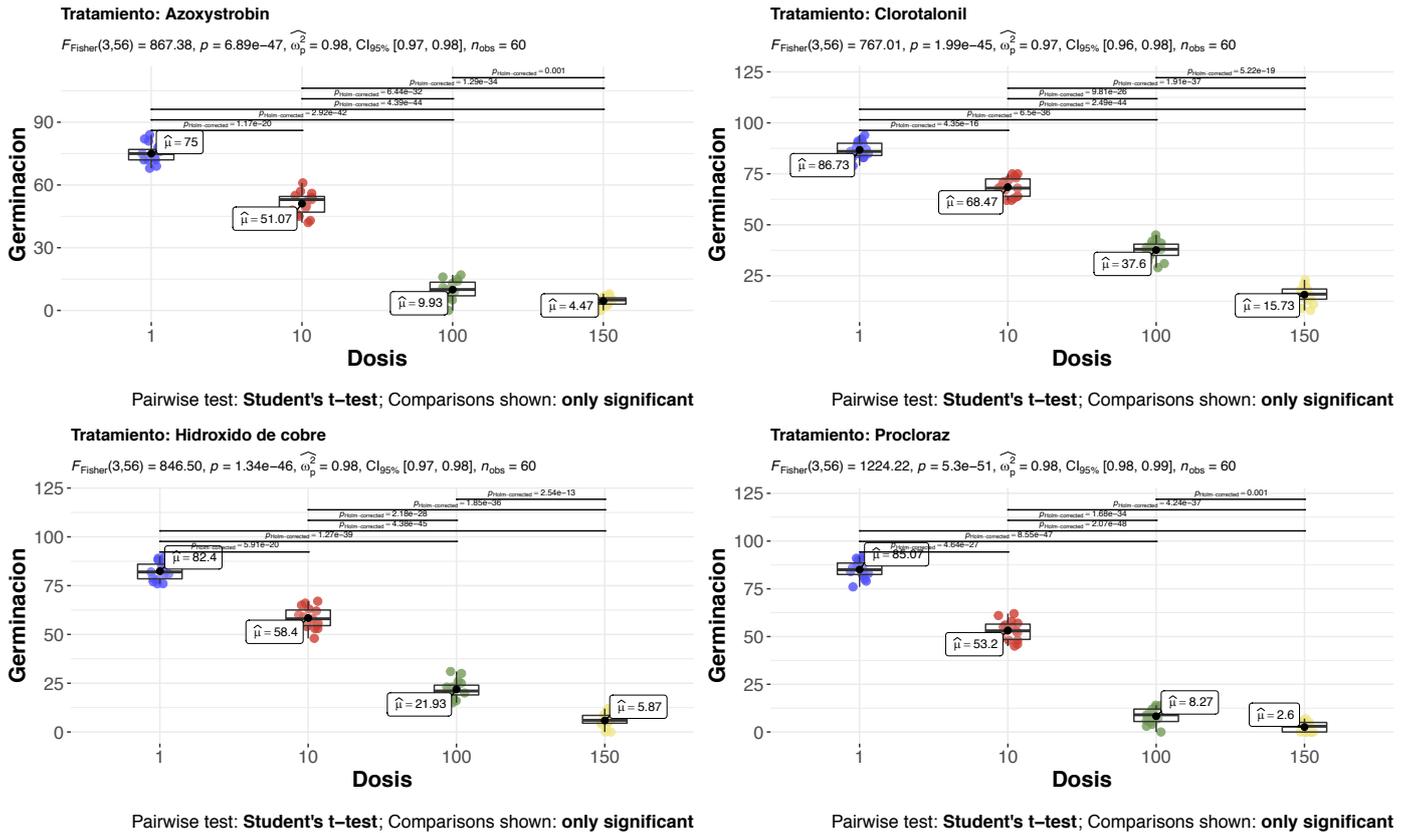
**Figura 15.** Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de *Moniliophthora roreri* en función a los grupos filogenéticos del hongo. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza.

Sobre los resultados de la germinación de conidias según el modo de acción de los fungicidas utilizados, se encontró diferencia altamente significativa ( $p < .001$ ), sin embargo, el tamaño del efecto fue bajo ( $\eta^2p = 0.16$ ). Esto es debido a que el mayor efecto es debido a la dosis utilizadas en cada uno de los fungicidas. En la evaluación de modos de acción de los fungicidas, destaca que no existe diferencia entre ambos, ya que la diferencia está en función de la comparación de estos contra el tratamiento control en donde no existe el uso de fungicida (Figura 16).



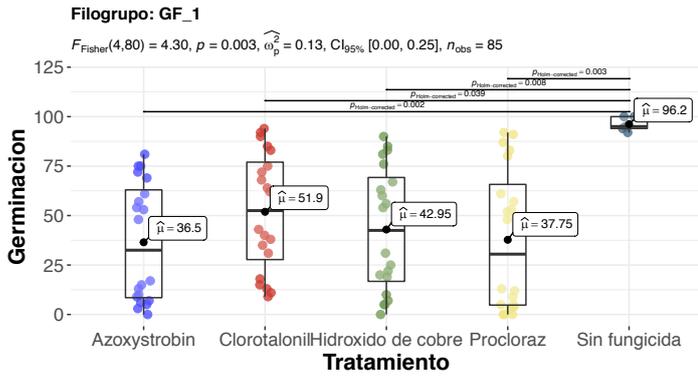
**Figura 16.** Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de tipos de acción de fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

Al detallar sobre el efecto directo de la combinación de cada una de las dosis con los fungicidas utilizados, se encuentra que para todos los tipos de comparación existe una diferencia estadística altamente significativa ( $p < .001$ ) con un tamaño del efecto catalogado como alto ( $\eta^2p > 0.97$ ). Estos resultados demuestran que la efectividad de cada uno de los fungicidas está estrechamente relacionado con la dosis empleada. Para todos los casos de evaluación, los porcentajes de germinación de conidias mostró un marcado descenso en función al aumento de la dosis de fungicidas utilizadas en los medios de cultivo. El detalle de la evaluación puede observarse en la Figura 17.

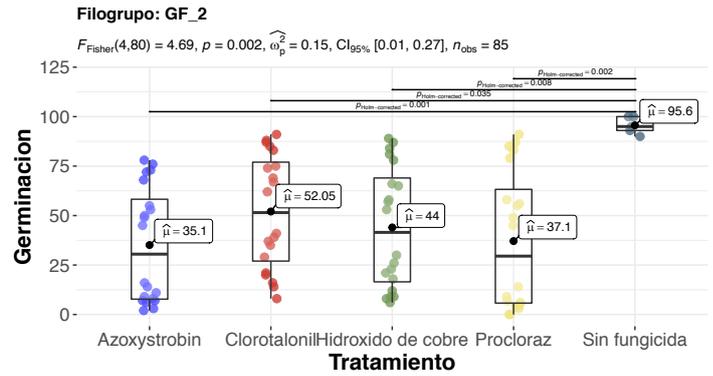


**Figura 17.** Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de distintos fungicidas y variedad de dosis. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

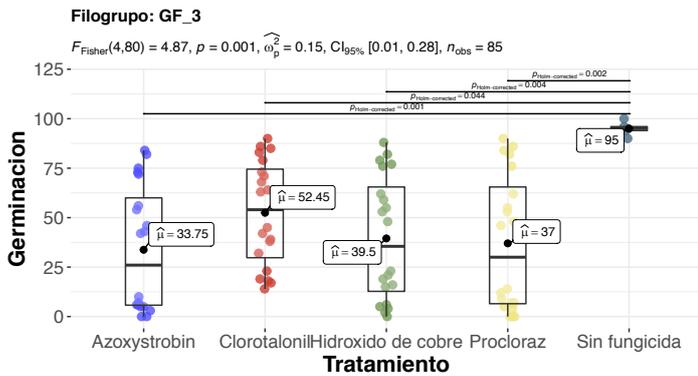
Al particularizar sobre el efecto directo de la eficiencia de cada fungicida sobre los tres grupos filogenéticos de *M. roreri*, se encontró que para todos los tipos de comparación existe una diferencia estadística significativa ( $p < .05$ ) con un tamaño del efecto catalogado como bajo ( $\eta^2 p = 0.15$ ). Estos resultados demuestran que la efectividad de cada uno de los fungicidas se relaciona más con la dosis de aplicación y no tanto con el grupo filogenético del hongo. A pesar de no existir diferencia significativa al realizar las comparaciones pareadas entre los fungicidas, fue común encontrar que el fungicida Azoxyestrobina presentó los valores más bajos de germinación de esporas durante las evaluaciones in vitro. Las diferencias se dieron en el orden de la comparación pareada del tratamiento testeo contra cada uno de los fungicidas. El detalle de la evaluación puede observarse en la Figura 18.



Pairwise test: **Student's t-test**; Comparisons shown: **only significant**



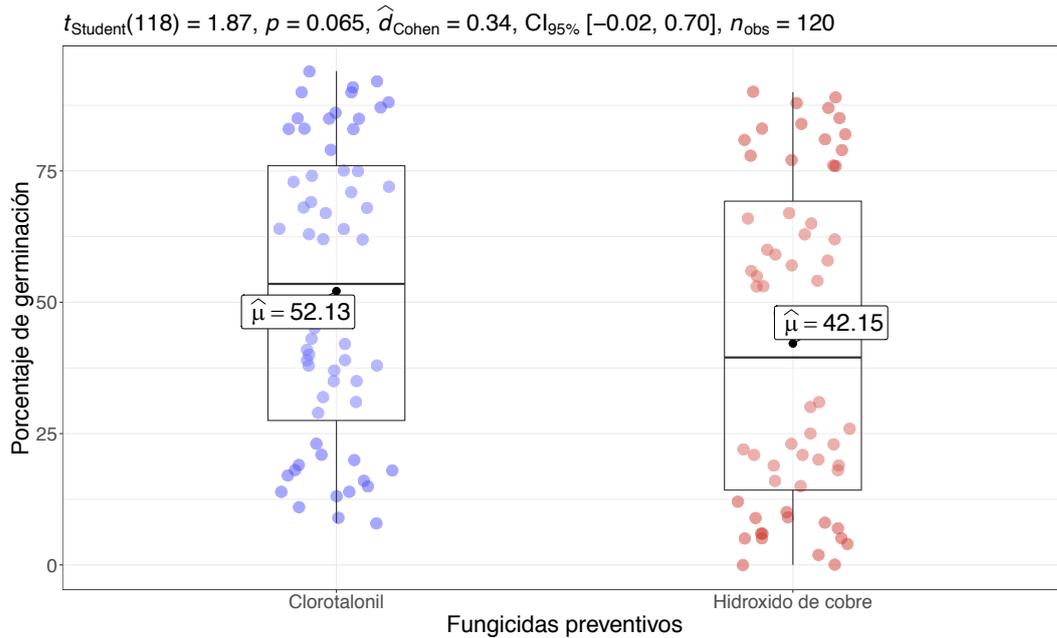
Pairwise test: **Student's t-test**; Comparisons shown: **only significant**



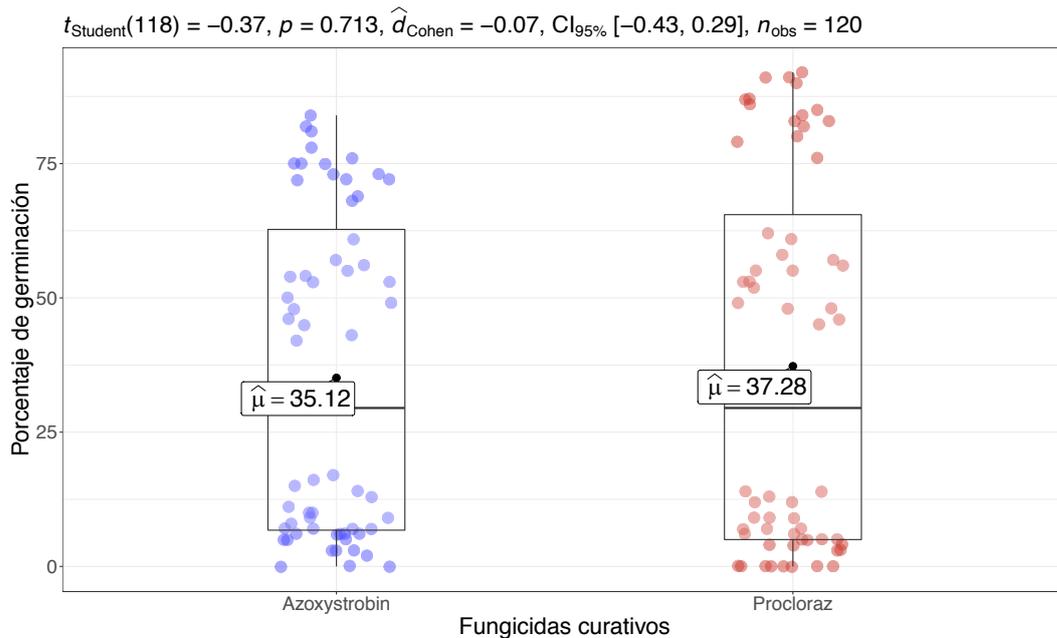
Pairwise test: **Student's t-test**; Comparisons shown: **only significant**

**Figura 18.** Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de los grupos filogenéticos de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de distintos fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

Cuando la comparación se realizó sobre los nivel dentro de tipos de acción de fungicidas se observó que la diferencia encontrar tras la realización de la prueba de T de Student no fue significativa ( $p > .065$ ) para los fungicidas preventivos. El valor de porcentaje de germinación de conidias en el tratamiento con aplicación de Clorotalonil fue de 52.13% mientras que para el caso del fungicida Hidróxido de cobre el valor fue de 42.15%. El detalle de la evaluación se muestra en la Figura 19. Para el caso de la comparación de los fungicidas con tipo de acción curativa, la comparación de medias por la prueba de T de Student, tampoco fue estadísticamente significativa ( $p = .713$ ). El valor de porcentaje de germinación de conidias en el tratamiento con aplicación de Azoxystrobin fue de 35.12% mientras que para el caso del fungicida Hidróxido de cobre el valor fue de 37.28% (Figura 20).

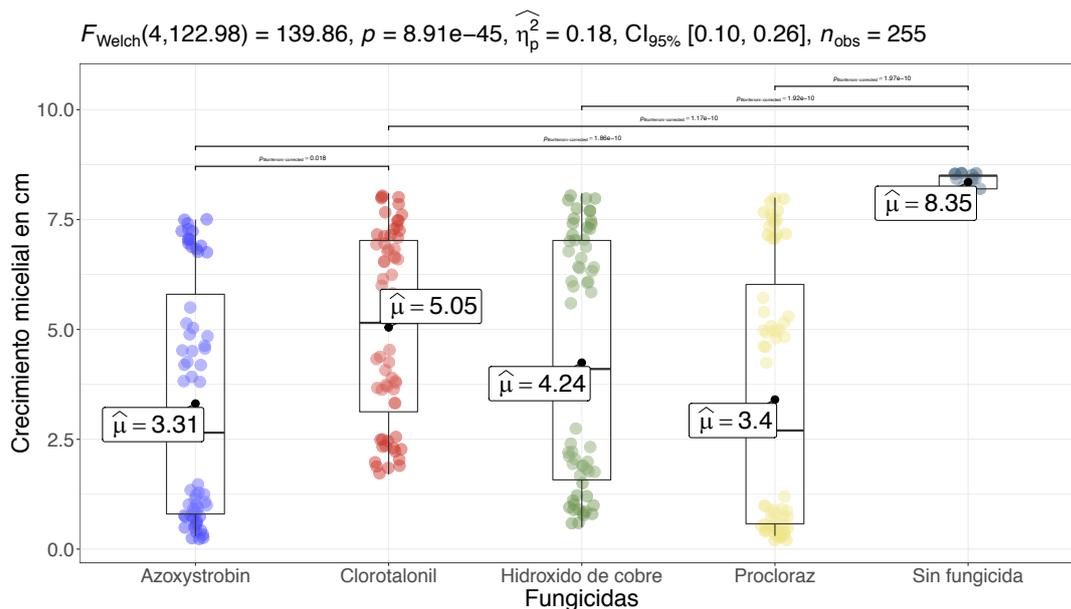


**Figura 19.** Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de fungicidas de acción preventiva. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .



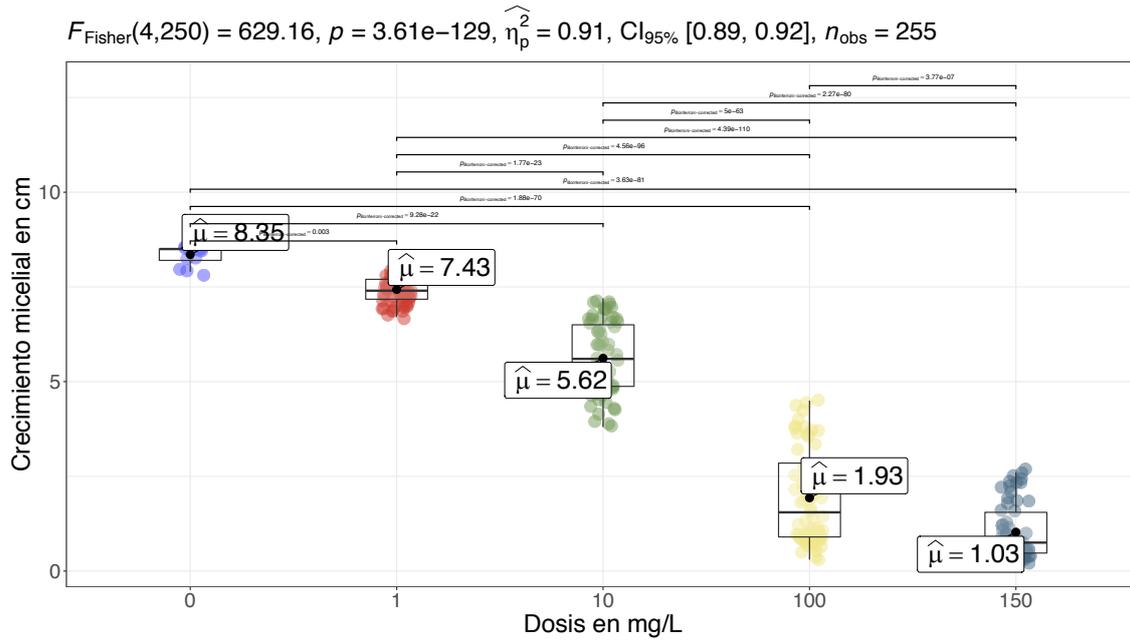
**Figura 20.** Diagrama de cajas del porcentaje de germinación de conidias de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de fungicidas de acción curativa. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

Al evaluar el efecto de los diferentes fungicidas sobre el crecimiento micelial in vitro de *M. royeri*, se encontró diferencia significativa ( $p < .001$ ), siendo el fungicida clorotalonil el más efectivo con una media de crecimiento de 5.05 cm. En contraste, el tratamiento testigo mostró una media de 8.35 cm de crecimiento. El tamaño del efecto fue bajo ( $\eta^2 p = 0.18$ ) lo que supone que la diferencia encontrada no debe ser atribuída únicamente a los diferentes fungicidas, ya que el factor de las dosis es un elemento que influencia fuertemente el desarrollo micelial. El detalle de la efectividad in vitro de los fungicidas puede observarse en la Figura 21.



**Figura 21.** Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora royeri* en respuesta a la exposición in vitro de diferentes fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

Al explorar el efecto de las cinco dosis evaluadas in vitro, se observó una diferencia estadística es altamente significativa ( $p < .001$ ) con un tamaño del efecto alto ( $\eta^2 p = 0.91$ ) siendo el tratamiento con aplicación de  $0 \text{ mgL}^{-1}$  el menos efectivo, mientras que a medida que tras el aumento de las dosis, el crecimiento micelial se vio considerablemente disminuido. Los diámetros de crecimiento se dieron con la dosis de  $150 \text{ mgL}^{-1}$  la cual fue estadísticamente diferente en cada una de las comparaciones por pares con el resto de las dosis evaluadas. El detalle de la evaluación se observa en la Figura 14.

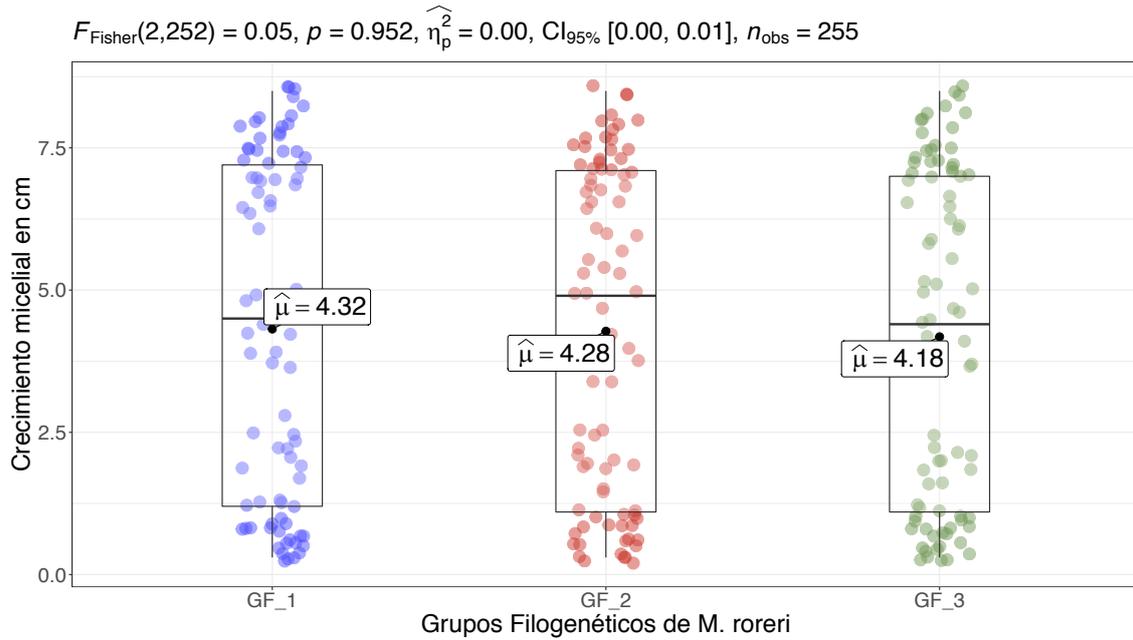


**Figura 22.** Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de diferentes dosis de fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

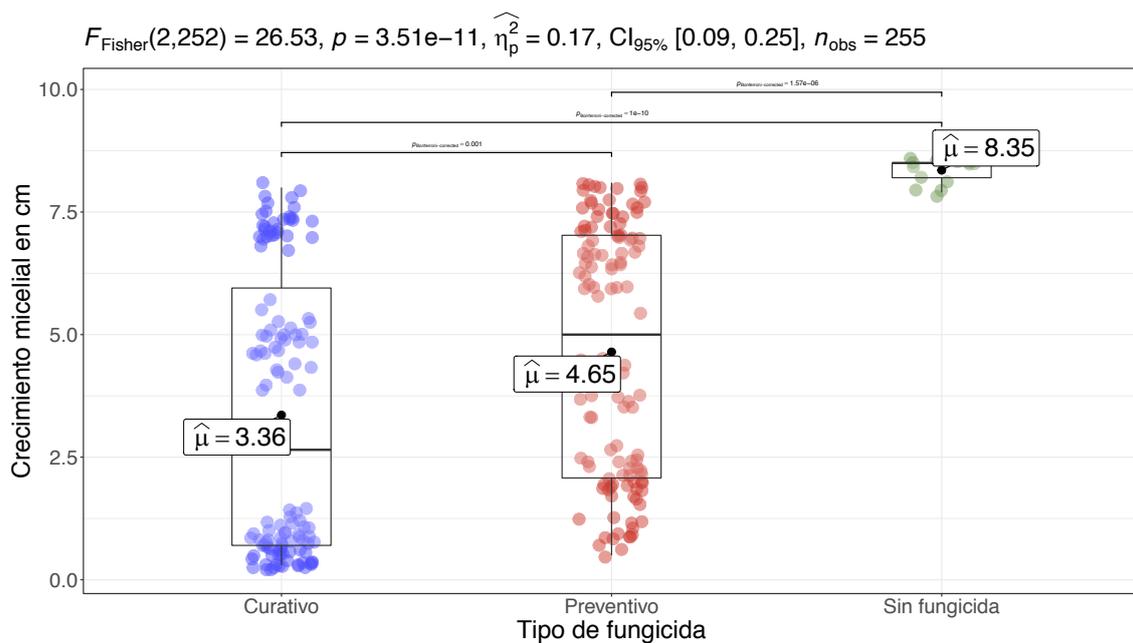
En cuanto al comportamiento del crecimiento micelial del diametro de las colonias en función de los grupos filogenéticos de *M. roreri*, no se encontro evidencia de que existiera diferencia significativa ( $p > .05$ ), lo que supone que los tres grupos filogenéticos son igualmente agresivos y no presentan diferencia entre ellos (Figura 23).

Sobre los resultados del crecimiento micelial de *M. roreri* bajo condiciones in vitro, según el modo de acción de los fungicidas utilizados, se encontró diferencia altamente significativa ( $p < .001$ ). A pesar de esto, el tamaño del efecto fue bajo. Esto es debido a que, como se observó anteriormente, el mayor efecto es debido a la dosis utilizadas en cada uno de los fungicidas.

En la evaluación de modos de acción de los fungicidas, destaca que si existe diferencia entre ambos ( $p < .001$ ), siendo el modo de acción curativo el que mostró mayor eficiencia en la reducción del desarrollo micelial (3.36 cm) en comparación al modo de acción preventivo (4.65 cm). El detalle de la evaluación puede observarse en la Figura 24.

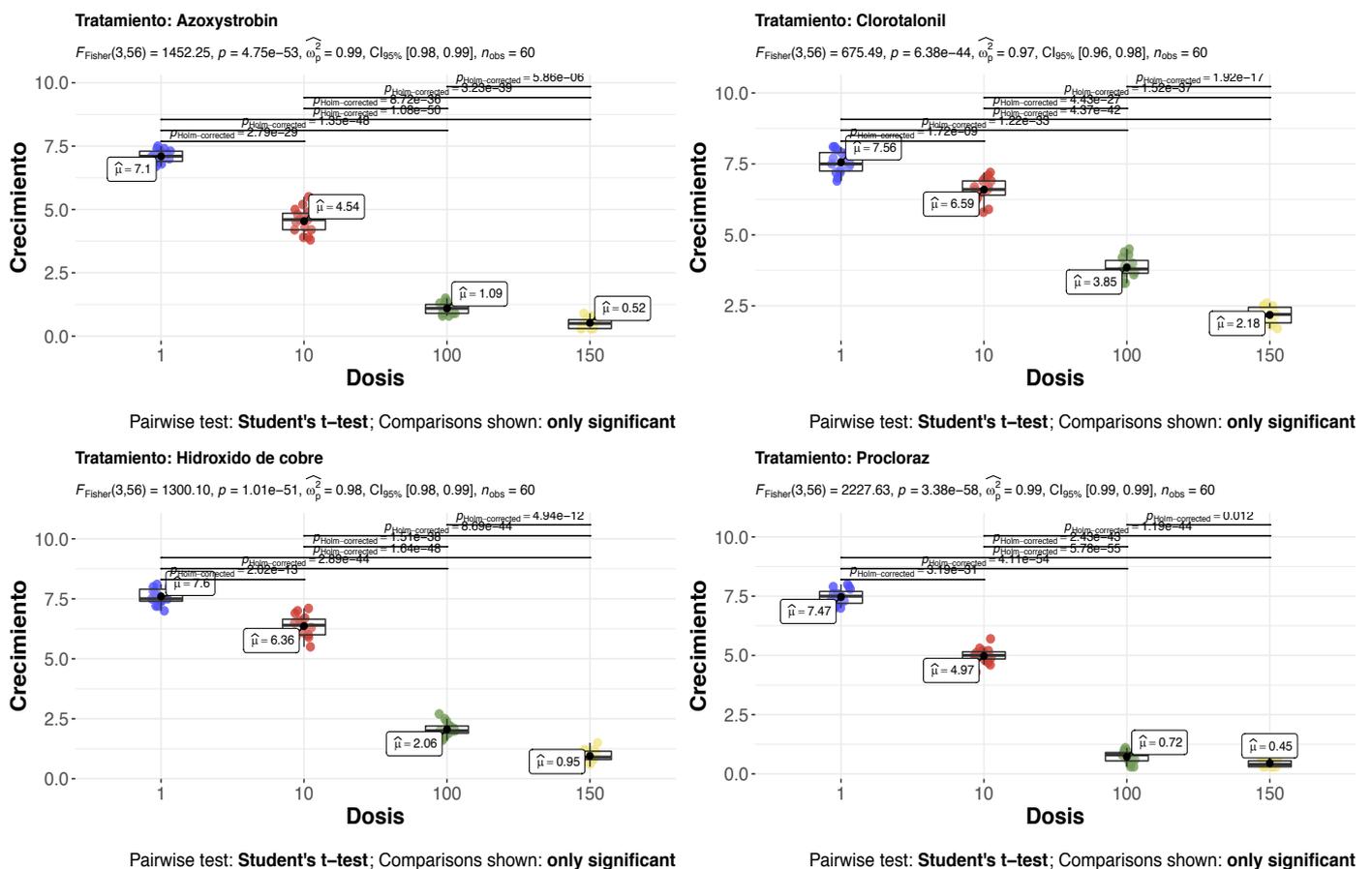


**Figura 23.** Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roleri* en función a los grupos filogenéticos del hongo. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza.



**Figura 24.** Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roleri* en respuesta a la exposición in vitro de tipos de acción de fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

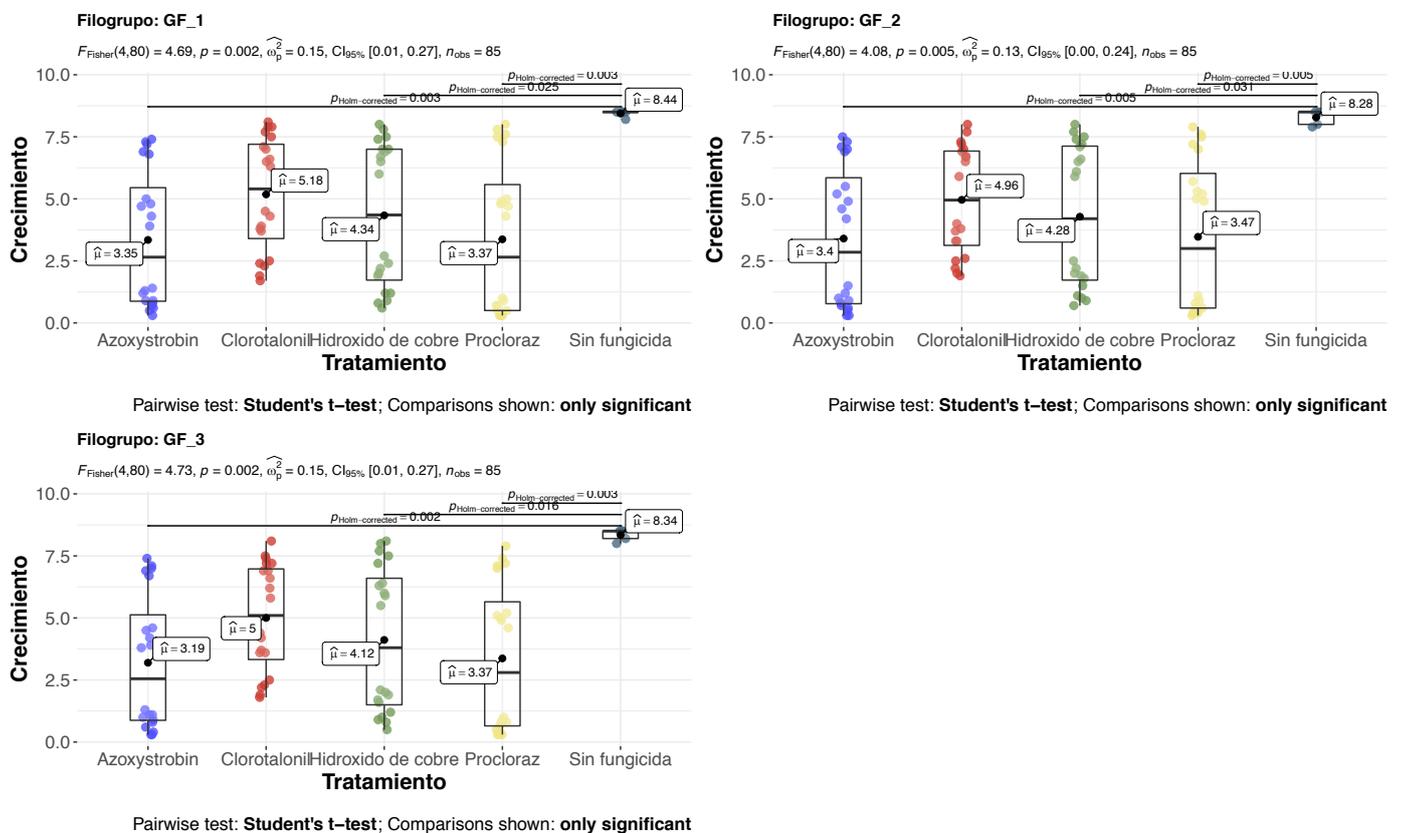
Al precisar sobre el efecto directo de la combinación de cada una de las dosis con los fungicidas utilizados, se encuentra que para todos los tipos de comparación existe una diferencia estadística altamente significativa ( $p < .001$ ) con un tamaño del efecto clasificado como alto ( $\eta^2 p > 0.97$ ). Estos resultados demuestran que la efectividad de cada uno de los fungicidas está estrechamente relacionado con la dosis empleada. Para todos los casos de evaluación, los porcentajes de crecimiento micelial mostró un destacado descenso en función al incremento de la dosis de fungicidas utilizadas en los medios de cultivo. El detalle de la evaluación puede observarse en la Figura 25.



**Figura 25.** Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de distintos fungicidas y variedad de dosis. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

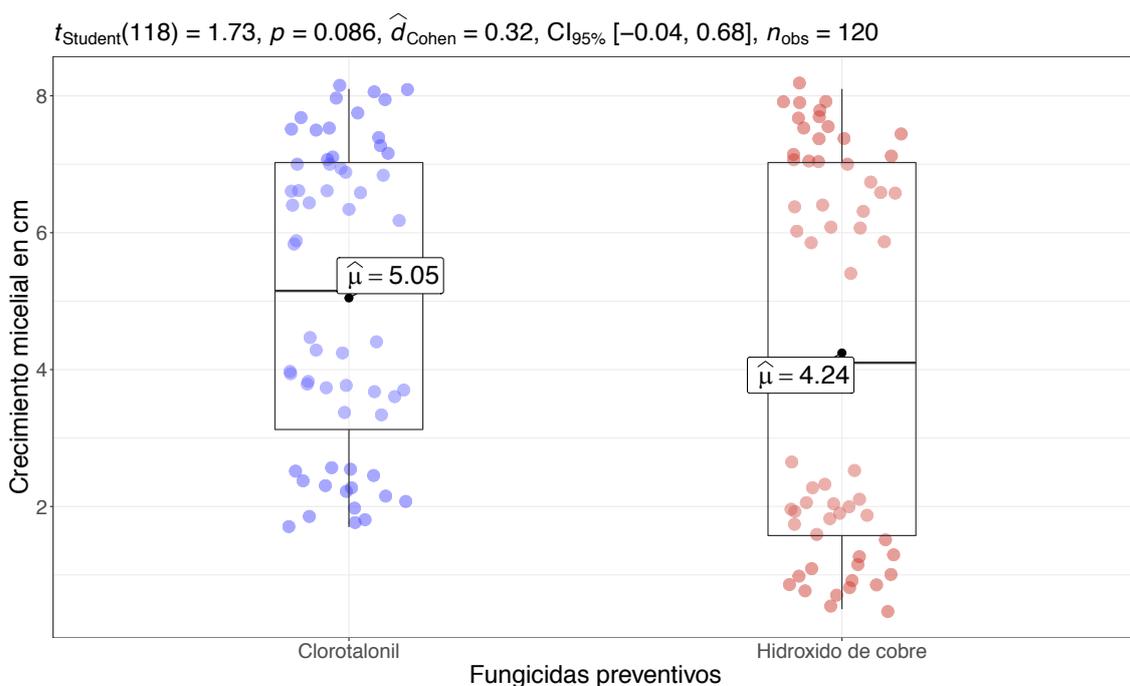
Al precisar en el efecto directo de la eficiencia de cada fungicida sobre los tres grupos filogenéticos de *M. roseri*, se encontró que para todos los tipos de comparación existe una diferencia estadística significativa ( $p < .05$ ) con un tamaño del efecto catalogado como bajo ( $\eta^2 p > 0.13$ ). Estos resultados demuestran, nuevamente, que la efectividad de cada uno de los fungicidas se relaciona más con la dosis de aplicación que con el grupo filogenético del hongo. A pesar de no existir diferencia significativa al realizar las comparaciones pareadas entre los fungicidas, fue común encontrar que el fungicida Azoxystrobin junto con Procloraz presentaron los valores más bajos de crecimiento micelial durante las evaluaciones in vitro. Las diferencias se dieron en el orden de la comparación pareada del tratamiento testigo contra cada uno de los fungicidas. El detalle de la evaluación puede observarse en la

**Figura 26.**



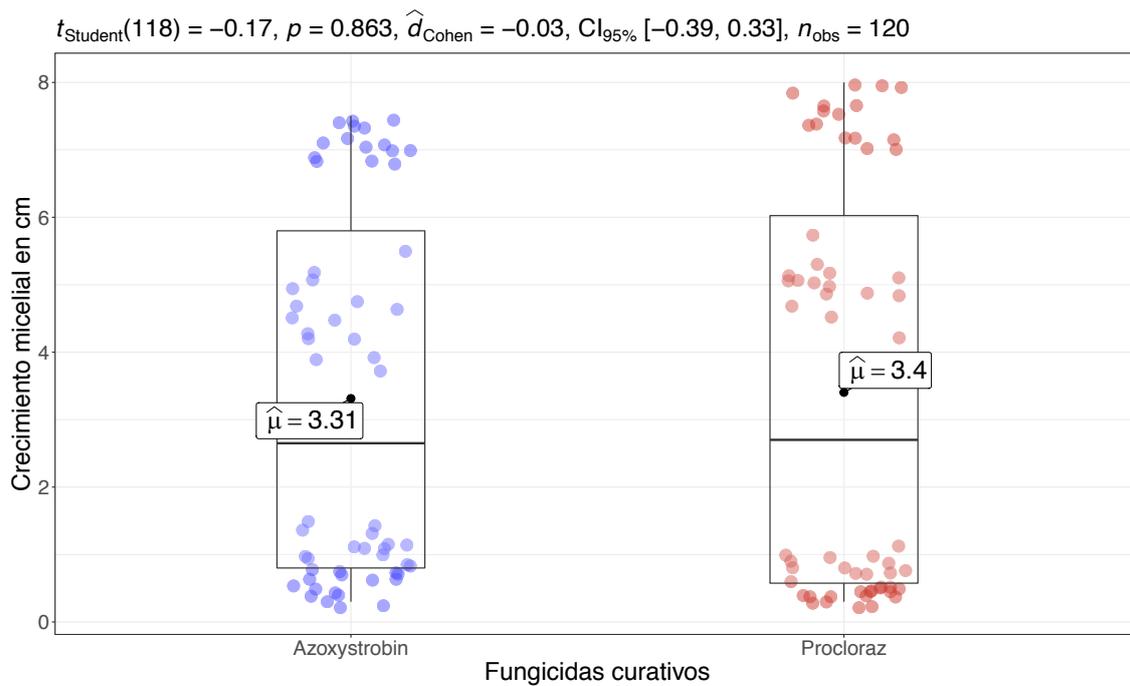
**Figura 26.** Diagrama de cajas del crecimiento micelial de los grupos filogenéticos de *Moniliophthora roseri* en respuesta a la exposición in vitro de distintos fungicidas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

Cuando la comparación se realizó sobre los nivel dentro de los tipos de acción de fungicidas se observó que la diferencia encontrar tras la realización de la prueba de T de Student no fue significativa ( $p > .086$ ) para los fungicidas preventivos. El valor de crecimiento micelial en el tratamiento con aplicación de Clorotalonil fue de 5.05 cm, mientras que para el caso del fungicida Hidróxido de cobre el valor fue de 4.24 cm. El detalle de la evaluación se muestra en la Figura 27.



**Figura 27.** Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de fungicidas de acción preventiva. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

Para el caso de la comparación de los fungicidas con tipo de acción curativa, la comparación de medias por la prueba de T de Student, la diferencia tampoco fue estadísticamente significativa ( $p = .713$ ). El valor de crecimiento micelial en el tratamiento con aplicación de Azoxystrobin fue de 3.31 cm, mientras que para el caso del fungicida Hidróxido de cobre el valor fue de 3.4%. El detalle de la evaluación se observa en la Figura 28.



**Figura 28.** Diagrama de cajas del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en respuesta a la exposición in vitro de fungicidas de acción curativa. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas  $p < .05$ .

### 13 Análisis y discusión de resultados

Este es el primer estudio para caracterizar las poblaciones de *M. roreri* en Guatemala, haciendo especial énfasis en los parámetros de diversidad genética y estructura poblacional de aislados colectados de diversas áreas productoras de cacao en el país. Al comparar los valores obtenidos del análisis polimórfico, se observa que estos son significativamente más bajos que los reportados por Phillips-Mora y colaboradores (2007), quienes informan de valores de polimorfismo de 46% y 38.1% para aislados de Colombia y Ecuador utilizando el mismo marcador molecular. De igual forma, en Perú, los valores de polimorfismo (73%) (Gutarra et al., 2013) son mayores a los encontrados en este estudio. Sin embargo, Phillips-Mora y colaboradores (2007) reportan valores de 5% de polimorfismo al analizar aislados de *M. roreri* provenientes de Centroamérica (grupo Co-Central) lo cual es concordante con los valores obtenidos en este estudio. De

esta forma, es evidente que los niveles de polimorfismo encontrados en aislados originarios de Suramérica son significativamente mayores a los de la zona centroamericana.

La diversidad genética, basada en el índice de Shannon, muestra que los niveles encontrados en las poblaciones de *M. royeri* en Guatemala son bajos (0.0578). En Colombia se reportan valores de 0.20 (Phillips-Mora et al., 2007), 0.177 (S. P. Grisales-Ortega & Afanador-Kafuri, 2007) y 4.75 (Jaimes et al., 2016). No obstante, Phillips-Mora y colaboradores (2007) también reportan de valores en el índice de Shannon sumamente bajos (0.005) para los aislados del grupo Co-Central, sugiriendo la dispersión del patógeno hacia esta región se dio a partir de un solo clon de *M. royeri*. Los altos valores de diversidad genética reportados para Colombia, sostienen la teoría de que este puede ser considerado como el centro de origen de *M. royeri*, específicamente en el Valle de Magdalena (Ali et al., 2015; Jaimes et al., 2016; Phillips-Mora et al., 2007), desde donde se dispersó hacia otras regiones de Suramérica y Centroamérica. Esta situación explicaría los bajos niveles de diversidad encontrados en este estudio, los cuales son resultados de la reciente introducción y fase invasiva del hongo desde su identificación en el país en 2002.

En cuanto al análisis de agrupamiento del dendrograma (Figura 2), los resultados de este estudio indican una alta similitud (80%) entre los aislados, al igual que lo reportado para otros aislados de Centroamérica provenientes de Honduras y Costa Rica (94%) (Phillips-Mora et al., 2007). Los valores de similitud genética para la región de Suramérica son significativamente menores, reportándose en Colombia valores de 67% (Phillips-Mora et al., 2007), 64% (Gutarra et al., 2013) y 58% (Suárez-Contreras, 2017) y 60% para Ecuador (Phillips-Mora et al., 2007), evidenciándose una amplia diversidad genética en esta parte del continente.

A pesar de que para Centroamérica se reporta solo un grupo genético, tanto el dendrograma (Figura 2) como el análisis de coordenadas principales (Figura 3) muestran tres grupos distintos, aunque con una alta similitud genética entre 69 los aislados analizados. Estos resultados concuerdan con lo reportado en Perú, en donde estudios previos reportan la existencia de un solo grupo genético (Phillips-Mora et al., 2007), sin embargo, tanto el dendrograma de similitud genética como el PCoA, mostraron la existencia de tres grupos genéticos, suponiendo una mayor diversidad y diferenciación genética según Gutarra y colaboradores (2013).

Aún cuando la dispersión del patógeno hacia Centroamérica se haya presentado a partir de un solo clon de una región de Colombia (Phillips-Mora et al., 2007) y la reproducción del patógeno se considere mayormente de forma clonal (Ali et al., 2015; Díaz-Valderrama & Aime, 2016) los aislados analizados en este estudio nunca presentaron una identidad genética del 100%. Esta incipiente diferenciación genética puede ser atribuida a una alta tasa de mutación en el genoma de *M. royeri* para responder a la presión de selección natural, en donde nuevos ambientes presionan para enriquecer a poblaciones introducidas con nuevas variantes genéticas (S. P. Grisales-Ortega & Afanador-Kafuri, 2007; Gutarra et al., 2013; Jaimes et al., 2016).

Aún cuando se asume una reproducción predominantemente clonal en *M. royeri*, es sabido que las poblaciones de hongos que carecen de un ciclo sexual son todavía capaces de una rápida evolución, la cual se refleja en el incremento de la virulencia (Michelmore & Hulbert, 1987). Este factor debe ser considerado seriamente, ya que esto podría explicar situaciones observadas en Costa Rica como el incremento en la virulencia de los aislados de *M. royeri*, la limitada resistencia o los bajos niveles de tolerancia observados contra este hongo entre el germoplasma de cacao, y el aumento en las pérdidas por moniliasis en algunos clones tolerantes en Costa Rica (Ali et al., 2015). Esta situación es de especial importancia para Guatemala, ya que la mayoría de clones de cacao utilizados en el país son provenientes del programa de mejoramiento de CATIE en Costa Rica. Esto supone, que por un aumento en la virulencia del patógeno, producto de la evolución por mutación, terminaría superando la tolerancia de los clones de cacao, aumentándose las pérdidas por moniliasis.

Aunque la baja diversidad genética encontrada en los aislados de *M. royeri* es consistente con una rápida y reciente propagación del hongo de una población fundadora común, el análisis de estructura genética sugiere que los aislados tienen una ascendencia a partir de dos grupos genéticos (Figura 5a y 5b). Esta situación puede ser explicada nuevamente por una rápida tasa de mutación como fuente de diferenciación genética, o bien, podría ser resultado de la introducción de un nuevo grupo genético, ya que las actividades humanas, en lugar de los modos naturales de dispersión, han sido la principal fuerza responsable de la dispersión de *M. royeri* en las nuevas zonas y países afectados (Phillips-Mora et al., 2007).

Según los resultados del AMOVA, la mayor fuente de variación se produjo dentro de las poblaciones. Por otra parte, la baja diferenciación y estructura entre poblaciones

podría ser el resultado del flujo de genes entre las poblaciones, ya que a pesar de existir distancias entre 150 y 200km entre las poblaciones, la diferenciación entre estas fue solo del 6%. Esto puede ser explicado por el constante intercambio de frutos de cacao entre los productores, quienes de forma involuntaria estarían siendo el vector de dispersión de las esporas de *M. royeri*, favoreciendo el flujo genético. También es claro que no se presenta una diferenciación geográfica, ya que en la asignación de los grupos genéticos se observa la presencia de ambos en cada una de las poblaciones en proporciones similares (Figura 5a y 5b). En este estudio el flujo genético identificado ( $Nm = 3.52$ ) explica el hecho de que las poblaciones no mantienen un aislamiento por distancia, presentándose una homogeneidad genética entre las poblaciones. Además, según Allendorf (1983) un  $Nm > 1$  es suficiente para superar los efectos de la deriva genética, impidiendo así la disminución de la diversidad genética.

Debido al rol humano en la dispersión del patógeno, Jaimes y colaboradores (2016) sugiere que las medidas de control, como las aplicaciones de fungicidas o la selección y utilización de los principales genes de resistencia, deben aplicarse con cautela, y las medidas de control deben tratar de reducir al mínimo el flujo de genes.

Los resultados del estudio muestran que existe un bajo nivel de diversidad genética y una débil estructura genética entre las poblaciones de *M. royeri* en Guatemala. Esta situación es consistente con los informes de una reciente introducción y fase invasiva del patógeno en el país. No obstante, esto no descarta el apareamiento de nuevos genotipos más virulentos que pueden superar la tolerancia de los clones de cacao actualmente utilizados, incrementando aún más las pérdidas por moniliasis. Por esta razón, se sugiere el constante monitoreo de la evolución biológica del patógeno, prácticas de cuarentena que limiten al mínimo la dispersión del patógeno, tanto a zonas con presencia del hongo como a zonas aún no afectadas, así como evaluaciones de distintos clones de cacao tolerantes a los nuevos genotipos de *M. royeri*.

La incidencia de frutos enfermos sobre cada uno de los genotipos concuerda con anteriores reportes que siguen la tendencia hacia altas proporciones de frutos enfermos o susceptibles a la presencia de *M. royeri* sobre siete genotipos evaluados (Phillips-Mora et al., 2005). Además, dado que las pruebas de incidencia a nivel de grupo filogenético no mostraron diferencia entre sí, esto demuestra que la capacidad y agresividad de infección del patógeno es homogénea y a la vez alta. Los resultados de incidencia contrastan con lo reportado Tarquí-Freire y colaboradores (2017) quienes sugieren el uso de tres genotipos

que mostraron bajos niveles de incidencia de *M. royeri* tras las evaluaciones de inoculación con el patógeno. De igual forma, los reportes de Arévalo-Gardini y colaboradores (2017) sobre un alto porcentaje de genotipos de cacao provenientes del Instituto de Cultivos Tropicales de Perú, contrastan con la respuesta de los genotipos criollos y comerciales evaluados en este estudio. Esta situación se ajusta a la alta diversidad genética de cacao en la región de América del sur por ser centro de origen de dicha especie, por lo cual existen una mayor probabilidad de identificar genotipos más resistentes.

Respecto a la evaluación de fungicidas para el control de *M. royeri* la eficiencia en el uso de Clorotalonil, tanto para la inhibición de germinación de conidias como el crecimiento micelial, los hallazgos son similares a lo reportado en la reciente evaluación de control cultural, biológico y químico sobre el genotipo CCN-51 en Bolivia (Toala et al., 2019). Esto resultados sustentan la vigencia en el uso de Clorotalonil ya que evaluaciones en la década de los 80's ya reportan la efectividad de dicho fungicida (González et al., 1983).

Cuando la evaluación se centro sobre el efecto en la inhibición del crecimiento micelial, el fungicida más efectivo resultó ser Azoxystrobin de acción curativa. Esto comportamiento es comparable con lo reportado en México, tanto en el fungicida como en la dosis, en donde se reporta una dosis óptima de 138 mgL<sup>-1</sup> mientras que en este estudio se recomiendan 150 mgL<sup>-1</sup> (Torres et al., 2013). Otros estudios también reportan sobre la efectividad del Azoxystrobin para el control de *M. royeri* ya que puede inhibir el crecimiento del patógeno hasta en un 47% (Tirado-Gallego et al., 2016).

Sin embargo, aunque el Azoxystrobin ha demostrado ser eficiente en el control del patógeno, pues mejoran la producción de las mazorcas de cacao; este tipo de control puede generar altos costos y, en algunos casos, puede ser ineficaz, debido a la resistencia que pueden desarrollar los microorganismos a este tipo de compuestos, además del impacto negativo en la salud ambiental y humana (Ulrike Krauss et al., 2010; Loguercio et al., 2009). Por tal razón, la alternativa de control más eficiente ante *M. royeri* será el uso integrado de prácticas culturales sumado al control biológico, uso de genotipos resistentes y el acompañamiento de control químico, sin desarrollar una total dependencia hacia este último factor.

## 14 Conclusiones

1. Las poblaciones de *Moniliophthora roreri* en las zonas de producción de cacao evaluadas presentaron una diversidad genética general ( $H_t$ ) de 0.1289, mientras que dentro de las poblaciones ( $H_w$ ) fue de 0.1310. El porcentaje de la variación molecular debido a la diferencia entre las regiones, entre poblaciones y dentro de las poblaciones fue de 3, 6 y 91% respectivamente. El análisis de inferencia bayesiana mostró que la estructura poblacional más probable presenta un arreglo de dos clusters.
2. Los tres genotipos comercial y tres genotipos criollos fueron igualmente susceptibles al ataque de cada uno de los tres grupos filogenéticos de *M. roreri*. Sin embargo, los genotipos CATIE R4 y POUND 7 mostraron un menor porcentaje de incidencia de frutos enfermos, aunque sin marcar una diferencia estadísticamente significativa. Esto sugiere que la diversidad genética del hongo incrementa la facilidad de adaptación del patógeno a distintas factores ambientales, manteniendo su alto nivel de agresividad.
3. Las evaluaciones in vitro mostraron que entre los fungicidas preventivos Clorotalonil e Hidróxido de cobre no se presentó diferencia significativa. No obstante, el factor de las dosis sí marcó una diferencia altamente significativa, siendo la dosis de 150 mgL<sup>-1</sup> la más recomendada para la inhibición tanto de la germinación de conidias como el desarrollo micelial. Los grupos filogenéticos de *M. roreri* no mostraron diferencia ante los fungicidas y las dosis evaluadas, ya que la diversidad genética encontrada en las poblaciones fue baja.
4. Las evaluaciones in vitro mostraron que entre los fungicidas curativos Azoxystrobin y Prochloraz no se presentó diferencia significativa. La diferencia en la efectividad de ambos fungicidas estuvo relacionada a las dosis utilizadas, siendo la dosis entre 100 y 150 mgL<sup>-1</sup> la más recomendada para la inhibición, tanto de la germinación de conidias como el desarrollo micelial. Al igual que con los fungicidas preventivos, los grupos filogenéticos de *M. roreri* no mostraron diferencia ante los fungicidas ni las dosis evaluadas. Sin embargo, dada la facilidad de mutación del patógeno, esta situación podría cambiar en el futuro, recomendándose el monitoreo constante de la efectividad de los fungicidas y dosis, así como estrategias de control integrado del patógeno.

## 15 Impacto esperado

Se ha detallado la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *M. roreri* en las zonas de producción evaluadas. Esta información es un recurso invaluable para conocer el proceso de invasión del patógeno en el país, así como sus cambios evolutivos que resulten en brotes más severos de la enfermedad conocida como moniliasis. La evaluación de la resistencia de los distintos genotipos de cacao evaluados ha evidenciado la necesidad de iniciar programas de mejoramiento que respondan a la agresividad de las poblaciones de *M. roreri* caracterizadas en el país. En cuanto a la estrategia de control del patógeno, se hacen aportes sustanciales sobre la efectividad en el uso de diversos fungicidas de acción preventiva y curativa con la finalidad de brindar apoyo técnico para una estrategia integrada en el manejo de la moniliasis.

## 16 Referencias

- Aime, M., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97(5), 1012–1022:doi: 10.3852/mycologia.97.5.1012.
- Ali, S. S., Shao, J., Strem, M. D., Phillips-Mora, W., Zhang, D., Meinhardt, L. W., & Bailey, B. A. (2015). Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Frontiers in Microbiology*, 6, 850. doi:10.3389/fmicb.2015.00850
- Allendorf, F. W. (1983). Gene flow and genetic differentiation among populations. *Conservation Genetics*, 18, 51–65.
- Alverson, W. S., Whitlock, B. A., Nyffeler, R., Bayer, C., Baum, D. A., Alverson, W. S., Whitlock, B. A., Nyffeler, R., Bayer, C., & Baum, D. A. (1999). Phylogeny of the Core Malvales : Evidence from ndhF Sequence Data. *American Journal of Botany*, 86(10), 1474–1486.
- Aránzazu, H., Martínez, G., & Martínez, D. (2009). Estado actual de las investigaciones sobre la moniliasis del cacao en Colombia *Moniliophthora roreri* (Cif. Evans et al.). *Congreso Internacional de Cacao: Investigación, Transferencia de Tecnología y Comercialización, Presente y Futuro*.
- Arévalo-Gardini, E., Sánchez-Torres, G. P., Flores, E., Markes, K., León-Ttacca, B.,

- Zhang, D., Meinhardt, L. W., & Baligar, V. (2017). Comportamiento de los clones de cacao de la colección del ICT frente a *Moniliophthora roreri* en Tarapoto, Peru. *International Symposium on Cocoa Research (ISCR)*, 13–17.
- Bailey, B., Strem, M., Bae, H., de Mayolo, G., & Gultinan, M. (2005). Gene expression in leaves of *Theobroma cacao* in response to mechanical wounding, ethylene and/or methyl jasmonate. *Plant Science*, 168, 1247–1258.
- Bateman, R., Hidalgo, E., García, J., Arroyo, C., Ten Hoopen, G., Adonijah, V., & Krauss, U. (2005). Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology*, 147(2), 129–138. doi:10.1111/j.1744-7348.2005.00012.x
- Bateman, R., Holmnes, K., Kraus, U., & Padi, B. (2005). Future tactics and tools for pest management. In J. Flood & R. Murphy (Eds.), *Cocoa Futures* (pp. 77–93). CABI Commodities Press.
- Bowers, J., Bailey, B., Hebbbar, P., Sanogo, S., & Lumsden, R. (2001). The impact of plant diseases on world chocolate production. *Plant Health Progress*. doi: 10.1094/PHP-2001-0709-01-RV
- Carrera-Sánchez, K., Mosquera-Paredes, L., & Leiva-Mora, M. (2014). Protocolo para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* ( Cif y Par ) Evans et al . en frutos de cacao cv . ‘ Nacional ’ de la Amazonía ecuatoriana. *Biotecnología Vegetal*, 14(3), 147–150.
- Costa, G. G. L., Cabrera, O. G., Tiburcio, R. A., Medrano, F. J., Carazzolle, M. F., Thomazella, D. P. T., Schuster, S. C., Carlson, J. E., Gultinan, M. J., Bailey, B. A., Mieczkowski, P., Pereira, G. A. G., & Meinhardt, L. W. (2012). The mitochondrial genome of *Moniliophthora roreri*, the frosty pod rot pathogen of cacao. *Fungal Biology*, 116(5), 551–562. doi:10.1016/j.funbio.2012.01.008
- Cuervo-Parra, J. A., Sánchez-López, V., Ramírez-Suero, M., & Ramírez-Lepe, M. (2011). Morphological and molecular characterization of *Moniliophthora roreri* causal agent of frosty pod rot of Cocoa tree in Tabasco, Mexico. *Plant Pathology Journal*, 10(3), 122–127. doi:10.3923/ppj.2011.122.127
- Cuervo-Parra, J., Ramírez-Suero, M., Sánchez-López, V., & Ramírez-Lepe, M. (2011). Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. *African Journal of Biotechnology*,

10, 10657–10663.

- Cuervo-Parra, J., Sánchez-López, V., Romero-Cortes, T., & Ramírez-Lepe, M. (2014). *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif & Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*. *African Journal of Microbiology Research*, 8, 1704–1712.
- Danies, G., Small, I. M., Myers, K., Childers, R., & Fry, W. E. (2013). Phenotypic Characterization of Recent Clonal Lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Plant Disease*, 97(January), 873–881. doi: 10.1094/PDIS-07-12-0682-RE
- de Lattre-Gasquet, M., Despréaux, D., & Barel, M. (1998). Prospective study of the cocoa commodity chain. *Plantations, Recherche, Développement*, 5(6), 423–434.
- Debouck, D., Ebert, A., Peralta, E., Barandiaran, M., & Ramírez, M. (2008). The importance of the use of plant genetic diversity in agricultural research programs in Latin America. *Recursos Naturales y Ambiente*, 53, 46–53.
- Díaz-Valderrama, J. R., & Aime, M. C. (2016). The cacao pathogen *Moniliophthora roreri* (Marasmiaceae) possesses biallelic A and B mating loci but reproduces clonally. *Heredity*, 116(6), 491–501. doi:10.1038/hdy.2016.5
- Dorado-Orea, M., Romero-Cortes, T., Lopez-Pérez, P., Pérez España, V., Ramírez-Lepe, M., & Cuervo-Parra, J. (2016). Current Status of Cocoa Frosty Pod Rot Caused by *Moniliophthora roreri* and a Phylogenetic Analysis. *Plant Pathology Journal*, 16(1), 41–53. doi:10.3923/ppj.2017.41.53
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Evans, H. (1977). Research on cocoa diseases in Ecuador: past and present. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 23(1), 68–80.
- Evans, H. (1981). Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. *Phytopathological Papers*, 24, 44.
- Evans, H. (2007). Cacao diseases - The trilogy revisited. *Phytopatology*, 97, 1640–1643.
- Evans, H., Holmes, K., & Reid, A. (2003). Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology*, 52(476–485).

- Evans, H., Krauss, U., Rutz, R., Acosta, T., & Arévalo-Gardini, E. (1998). Cocoa in Peru. *Cocoa Growers Bulletin*, 51, 7–22.
- Evans, H., Stalpers, J., Samson, R., & Benny, G. (1978). On the taxonomy of *Monilia roleri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*, 56, 2528–2532. doi: 10.1139/b78-305
- Excoffier, L., Smouse, P., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- FAO. (2010). *The second report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*.
- Fry, W. E., Birch, P., Judelson, H., Grünwald, N., Danies, G., Everts, K., Gevens, A., Gugino, B., Johnson, D., Johnson, S., McGrath, M., Myers, K., Ristaino, J., Roberts, P., Secor, G., & Smart, C. (2015). Five Reasons to Consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen. *Phytopathology*, 105(7), 966–981. doi:10.1094/PHYTO-01-15-0005-FI
- Fulton, R. H. (1989). The Cacao Disease Trilogy: Black Pod, *Monilia* Pod Rot, and Witches~Broom. *Plant Disease*, 73(7), 601–603. doi:10.1094/PD-73-0601
- González, L. ., Sánchez, J. ., Porras, V. ., Umana, S., & Murillo, D. (1983). Evaluación del fungicida clorotalonil y de la destrucción de mazorcas enfermas en el combate de la moniliasis del cacao. *Agronomía Costarricense*, 7(1), 1–7.
- Grisales-Ortega, S., & Afanador-Kafuri, L. (2007). Analysis of genetic variability in *Moniliophthora roleri* with AP-PCR and RAPD in Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 15–32.
- Grisales-Ortega, S. P., & Afanador-Kafuri, L. (2007). Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roleri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2(2), 15–32.
- Gutarra, C., Silva, M., Marquez, K., & Leon, B. (2013). Genetic diversity analysis of 21 *Moniliophthora roleri* fungus' isolations based on RAPD markers. *Apuntes Ciencia Sociedad*, 03, 100–110.
- Hidalgo, E., Bateman, R., Krauss, U., ten Hoopen, M., & Martínez, A. (2003). A field

- investigation into delivery systems for agents to control *Moniliophthora roreri*. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 953–961. doi:10.1023/B:EJPP.0000003746.16934.e2
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology*, 9, 1322–1332. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x
- ICCO. (2012). *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*.
- Jaimes, Y. Y., Gonzalez, C., Rojas, J., Cornejo, O. E., Mideros, M. F., Restrepo, S., Cilas, C., & Furtado, E. L. (2016a). Geographic differentiation and population genetic structure of *Moniliophthora roreri* in the principal cocoa production areas in Colombia. *Plant Disease*, 100(8), 1548–1558. doi:10.1094/PDIS-12-15-1498-RE
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801–1806. doi:10.1093/bioinformatics/btm233
- Kimura, M., & Crow, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49(4), 725–738.
- Krauss, U., ten Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., & Arroyo, C. (2003). Integrated management of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of cacao (*Theobroma cacao*) in Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería En Las Américas*, 10, 52–58.
- Krauss, Ulrike, Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., García, J., Crozier, J., Brown, N. A., ten Hoopen, G. M., & Holmes, K. A. (2010). Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cacao (*Theobroma cacao*). *Biological Control*, 54(3), 230–240. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.05.011
- Loguercio, L. L., de Carvalho, A. C., Niella, G. R., De Souza, J. T., & Pomella, A. W. V. (2009). Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. *Biological Control*, 51(1), 130–139. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.06.005
- McElroy, M. S., Navarro, A., Mustiga, G., Stack, C., Gezan, S., Peña, G., Sarabia, W., Saquicela, D., Sotomayor-Cantos, I. A., Douglas, G., Migicovsky, Z., Amores, F., Tarquí-Freire, O. M., Myles, S., & Motomayor, J. (2018). Prediction of cacao (*Theobroma cacao*) resistance to *Moniliophthora* spp. diseases via genome-wide

- association analysis and genomic selection. *Frontiers in Plant Science*, 9, 343.  
doi:10.3389/fpls.2018.00343
- Meinhardt, L. W., Costa, G. G. L., Thomazella, D. P. T., Teixeira, P. J. P. L., Carazzolle, M. F., Schuster, S. C., Carlson, J. E., Guiltinan, M. J., Mieczkowski, P., Farmer, A., Ramaraj, T., Crozier, J., Davis, R. E., Shao, J., Melnick, R. L., Pereira, G. A. G., & Bailey, B. A. (2014). Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: Mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics*, 15(1).  
doi:10.1186/1471-2164-15-164
- Michelmore, R. W., & Hulbert, S. H. (1987). Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 383–404.  
doi:10.1146/annurev.py.25.090187.002123
- Mora, F., & Fiallos, F. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. in the crop of cocoa. *Scientia Agropecuaria*, 3, 249–258.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press.
- Nei, Masatoshi. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321–3323.  
doi:10.1073/pnas.70.12.3321
- Peakall, R., & Smouse, P. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Pereira, J., Ram, A., Figueiredo, J., & Almeida, L. (1990). The first occurrence of witches' broom disease in the principal cacaogrowing region of Brazil. *Tropical Agriculture*, 67(2), 188–189.
- Phillips-Mora, W. (2003). *Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (Theobroma cacao L.) fungus Moniliophthora roreri (Cif.) Evans et al. as determined using molecular, phytopathological and morphophysiological evidence*. The University of Reading.
- Phillips-Mora, W., Aime, M., & Wilkinson, M. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America.

- Plant Pathology*, 56(911), 922. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x
- Phillips-Mora, W., Castillo, J., Krauss, U., Rodríguez, E., & Wilkinson, M. J. (2005). Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology*, 54(4), 483–490. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01210.x
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortiz, C., López, A., Hernández, J., & Aime, M. (2006). First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot ( moniliasis disease) of cacao in Mexico. *Plant Pathology*, 55, 584.
- Ploetz, R. (2007). Important threats to chocolate production worldwide. *Phytopatology*, 97, 1634–1639.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Ram, A. (1989). *Biology, epidemiology and control of moniliasis (Moniliophthora roreri)*. University of Londo.
- Rambaut, A. (2008). *FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool*.
- Reyes, G. (2012). *Diagnóstico de la situación actual del Cultivo de Cacao T. cacao en la Aldea Barrios I, del municipio de San Antonio Suchitepéquez*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x
- Ryan, P. D., Hammer, Ø., & Harper, D. A. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 5–7. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025
- Sánchez, A. (2004). *Cultivos de plantación*.
- Sánchez, J., & González, L. (1989). Metodología para evaluar la susceptibilidad a moniliasis en cultivares de cacao. *Turrialba*, 39, 461–480.
- Solís-Bonilla, J., Zamarripa-Colmenero, A., Pecina-Quintero, V., Garrido-Ramírez, E., & Hernández-Gómez, E. (2015). Evaluación agronómica de híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) para selección de alto rendimiento y resistencia en campo a moniliasis. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(1), 71–82.
- Suarez-Contreras, L. (2006). Isolation and identification of *Moniliophthora roreri* causing

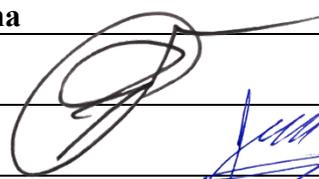
- moniliasis in municipalities of northeastern Colombia and preliminary trials for their biological control. *Revista Respuestas*, 11, 3–8.
- Suarez-Contreras, L. (2016). Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta Agronomica*, 65(1), 51–57. doi:10.15446/acag.v65n1.47994
- Suárez-Contreras, L. Y. (2017). Diversidad genética de *Moniliophthora roreri* mediante Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados Genetic diversity of *Moniliophthora roreri* using Amplified Fragment Length Polymorphism ( AFLPs ). *Revista Colombiana de Ciencias Agrícolas*, 11(2), 425–434. doi:dx.doi.org/10.17584/rcch.2017v11i2.7342 Diversidad
- Suárez, C. (1972). Mecanismos de penetración y proceso de infección de *Monilia roreri* Ciferri & Parodi en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *4th International Cocoa Research Conference*, 506–510.
- Tarquí-Freire, O. M., Sotomayor-Cantos, I. A., Casanova-Mendoza, T. de J., Rodríguez-Zamora, G. A., Plaza-Avellán, L. F., & Zambrano-Flores, F. G. (2017). Selección de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con resistencia a escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en Los Ríos, Ecuador. *Cencias Agrícolas*, 10(1), 17–26.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., & Fisher, M. C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31(1), 21–32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228
- Tiburcio, R. A., Costa, G. G. L., Carazzolle, M. F., Mondego, J. M. C., Schuster, S. C., Carlson, J. E., Guiltinan, M. J., Bailey, B. A., Mieczkowski, P., Meinhardt, L. W., & Pereira, G. A. G. (2010). Genes acquired by horizontal transfer are potentially involved in the evolution of phytopathogenicity in *moniliophthora perniciosa* and *moniliophthora roreri*, two of the major pathogens of cacao. *Journal of Molecular Evolution*, 70(1), 85–97. doi:10.1007/s00239-009-9311-9
- Tirado-Gallego, P. A., Lopera-Álvarez, A., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 417–430.
- Toala, V. A., Ventura, R. B., Huamán, L. A., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2019). Cultural, biological and chemical control of *Moniliophthora roreri* and *Phytophthora* spp in *Theobroma cacao* ‘CCN-51.’ *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 511–520. doi:10.17268/sci.agropecu.2019.04.08

- Torres, M., Cruz, D., Académica, D., Biológicas, D. C., Juárez, U., Carretera, D. T., Cp, V., Fredy, C., García, O., Postgraduados, C. De, Tabasco, C., Cárdenas, H., Ortiz, D. T., Mora, A., Nava, C., Fitosanidad, I. De, Postgraduados, C. De, Montecillo, C., & México-, C. (2013). Efecto del Azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología*, *31*(1), 65–69.
- Vekemans, X., Beauwens, M., Lemaire, M., & Ruiz-Roldán, I. (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size X. *Molecular Ecology*, *11*, 139–151. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01415.x
- Wang, J. (2017). The computer program structure for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse. *Molecular Ecology Resources*, *17*, 981–990. doi:10.1111/1755-0998.12650
- Wood, G. (1975). *Cacao* (Third Edit). Longman Group Limited.

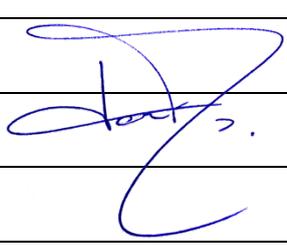
## 17 Apéndices

### Listado de los integrantes del equipo de investigación (en una sola hoja)

#### Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Luis Rodolfo Montes Osorio	
Julio Ernesto Berdúo Sandoval	

#### Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
José Alejandro Ruiz Chután	Investigador	20101034	X		

Guatemala \_\_\_\_ 26 \_\_\_\_ de febrero \_\_\_\_ 2021 \_\_\_\_

  
**Ing. Agr. Luis Rodolfo Montes Osorio**  
Coordinador del proyecto de Investigación

  
**Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar**  
Programa Universitario de Investigación

  
**Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar**  
Coordinador General de Programas