



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMIA

MAESTRÍA EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL

Identificación de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con resistencia a *Moniliophthora roreri* [(Ciferri & Parodi) Evans et al.] en plantaciones del departamento de Río San Juan, Nicaragua.

Autor

Raúl Ariel Santos Cordonero

Asesores

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Ing.MSc. Claudia Vanessa Rivera Zeledón

Managua, Nicaragua

Agosto, 2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

MAESTRÍA EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL

Identificación de fuentes de resistencia a *Monilothphora roreri* [(Ciferri & Parodi) Evans et al.], en poblaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) del departamento de Rio San Juan, Nicaragua.

Autor

Raúl Ariel Santos Cordonero

Asesores

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Ing.MSc. Claudia Vanessa Rivera Zeledón

Tesis sometida a la consideración del Honorable Tribunal Examinador como requisito parcial para optar al grado de:

Maestro en Ciencias en Mejora Genética Vegetal

Managua, Nicaragua

Agosto, 2017

Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito parcial para optar al título profesional de:

Maestro en Ciencias en Mejora Genética Vegetal

Miembros del Tribunal Examinador

Dr. Guillermo Reyes Castro

Presidente

Dra. Carolina Vega Jarquín

Secretario

Dr. Aldo Rojas Solís

Vocal

Managua, Nicaragua, 04 de Agosto 2017

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE CUADROS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE ANEXOS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. MATERIALES Y METODOS.....	4
3.2. Identificación de genotipos de cacao con resistencia aparente a <i>M. royeri</i>	4
3.2.1. Selección de las comunidades y productores.....	5
3.2.2. Recolección de muestras.....	5
3.2.3. Selección de genotipos de cacao con resistencia aparente.....	6
3.3. Selección de genotipos asociados con genes de resistencia a <i>M. royeri</i> mediante el uso de Loci de rasgos cuantitativos (QTL's).....	7
3.3.1. Extracción de ADN.....	7
3.4. Respuesta de los genotipos seleccionados a la inoculación con <i>M. royeri</i>	9
3.4.1. Obtención e identificación de cultivos puros del hongo <i>M. royeri</i>	9
3.4.2. Inoculación de frutos de cacao en el laboratorio.....	10
3.6. Análisis de datos.....	13
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1. Identificación de genotipos de cacao con resistencia aparente a <i>M. royeri</i>	14
4.2. Selección de genotipos asociados con genes de resistencia a <i>M. royeri</i> mediante el uso de Loci de rasgos cuantitativos (QTL's).....	19
4.3. Determinación de la respuesta de los genotipos seleccionados a la inoculación con <i>M. royeri</i>	23
V. CONCLUSIONES.....	26
VI. RECOMENDACIONES.....	27
VII. LITERATURA CITADA.....	28
VIII. ANEXOS.....	33

DEDICATORIA

Esta dedicatoria va dirigida primeramente a Dios nuestro creador, por brindarme la vida y la sabiduría para emprender en este estudio, a mi familia que la amo con toda el alma, mis hijos; Raulito, Ariela y Arielys, a mi esposa Mercedes Lilieth Morraz a mis padres: Raúl Ariel Santos Días y Elisa del Carmen Cordonero Gracia que me educaron y mostraron la importancia de la voluntad de trabajar y hacer el bien por mí y los demás, a mis hermanos; Oscar y Arlex y todos mis amigos y compañeros de trabajo que han puesto en manifiesto su apoyo y consejos.

Dedicada con amor, atentamente

Raúl Ariel Santos Cordonero

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a la institución donde laboro: Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA) con atención al Centro de Desarrollo Tecnológico El Recreo, donde me he formado como profesional, humano y compañero. Con mucha atención a mi asesora MSc. Claudia Rivera por toda su voluntad por apoyarme, por su paciencia, comprensión y entrega para culminar con esta investigación, al doctor Jorge Ulises Blandón Díaz por su acompañamiento, seguimiento, asesoramiento y por compartir sus conocimientos para con este estudio y mi persona, a los compañeros del laboratorio de agrobiotecnología del CNIA; MSc. Andrea Zamora por todo el apoyo logístico y aporte para los procesos, al MSc. Donald Gámez por poner a su disposición los medios y equipos a su cargo para llevar a cabo este proceso, al compañero Jonhy Roque técnico del INTA San Carlos por el apoyo en las visitas a las fincas a los productores de cacao del departamento de Rio San Juan que brindaron con voluntad muestras de sus parcelas para este estudio muy agradecidos este trabajo es para ustedes y se les agradece con dos nuevas accesiones resistentes a Monilia del Cacao, muchas gracias a todos.

Muy agradecidos con todos, atentamente

Raúl Ariel Santos Cordonero

INDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Comunidades y cantidad de fincas en donde se llevó a cabo la identificación de fuentes de resistencia al hongo <i>Monilothphora roreri</i> , en los municipios de San Carlos y El Castillo, Río San Juan, Nicaragua 2015-2016.	11
2.	Marcadores moleculares utilizados en la identificación de genotipos de cacao resistentes a <i>Monilothphora roreri</i> (Phillips et al., 2007).	15
3.	Escala de evaluación ordinal para la estimación de la severidad externa de <i>M. roreri</i> en mazorcas de cacao.	18
4.	Escala de enfermedad para la estimación de la severidad interna de <i>M. roreri</i> en mazorcas de cacao.	18
5.	Comunidades en los municipios de San Carlos y El Castillo del departamento de Río San Juan donde se identificaron accesiones con resistencia aparente a <i>M. roreri</i> en cacao.	20
6.	Accesiones de cacao identificadas en el departamento de Río San Juan, que presentan alelos asociados a la resistencia a <i>M. roreri</i>	25
7.	Tamaño de los alelos (pares de bases) en accesiones de cacao procedentes de plantaciones del departamento de Río san Juan, asociados con genes de resistencia a <i>M roreri</i> .	26

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Proceso de inoculación de esporas de <i>M roreri</i> , en 3 accesiones RSJ 0116, RSJ 0216 y RSJ 0316 selección asistida por marcadores moleculares tipo QTLs, estudio de identificación de fuentes de resistencia foto cortesía INTA.	16
2.	Frutos de las accesiones RSJ 0116, RSJ 0216, RSJ 0316 y los controles positivos (UF 296) y negativo (POUND 12) inoculados con suspensión de esporas del patógeno <i>M. roreri</i> en laboratorio y colocados en cámara húmeda.	17
3.	Municipios, comunidades y coordenadas geográficas (UTM) de 72 accesiones de cacao con resistencia aparente a moniliasis de cacao.	21
4.	Análisis de agrupamiento de las accesiones de acuerdo a las comunidades donde fueron recolectadas.	22
5.	Distribución porcentual de tres formas encontradas del verticilio en 72 accesiones de cacao.	23
6.	El color rojo de la mazorca representó un 34.7% (A), mientras que el color verde fue el predominante con un 65.3% (B). Con respecto al color de las almendras, el que predominó fue el color morado con un 75% (C).	23
7.	Características morfológicas de 72 accesiones de cacao. Forma de la base del fruto (A), rugosidad (B), forma del fruto (C) y forma del ápice del fruto (D).	24
8.	Análisis de componentes de 72 accesiones de cacao con resistencia aparente y real a moniliasis de cacao, identificadas en el departamento de Rio San Juan, Nicaragua.	28
9.	En el punto de inoculación (señalado con la flecha en A) no se observa crecimiento del patógeno, mientras que en el interior del fruto se observa una leve necrosis (señalado con la flecha en B) en el fruto de la accesión RSJ 0316.	30
10.	Presencia de mancha color chocolate rodeado por un halo amarillo (A) y pudrición interna en un fruto del clon POUND 12 (B).	31

INDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Comunidades en los municipios de San Carlos y El Castillo, departamento de Río San Juan donde se recolectarán las muestras y se realizaron las inoculaciones artificiales con el hongo <i>M. roreri</i> .	42
2.	Ficha para la recolección de información de las fincas participantes en el estudio de identificación de fuentes de resistencia a moniliasis (<i>M. roreri</i>) en cacao.	43
3.	Electroforesis en gel de agarosa 1% teñida con bromuro de etidio de producto PCR de 72 accesiones de cacao, utilizando marcadores moleculares tipos QTLs.	45
4.	Electroforesis de 9 de 72 accesiones de cacao y control positivo (UF 296) marcador MTcCIRAD 145.	45
5.	Vista de gel de garosa con luz ultravioleta.	46
6.	Preparación de carcasas para iniciar barrido de producto PCR, proceso de electroforesis.	46
7.	Características distintivas como tipo de esporulación, borde de la colonia, tipo de micelio (textura), presencia de sectores y color de la colonia del hongo <i>Moniliothphthora roreri</i> (Phillips et al., 2006).	47

RESUMEN

La moniliasis causada por *Moniliophthora roreri* es la enfermedad más importante en el cultivo de cacao en Nicaragua, representa el 60% de las pérdidas totales y constituye una seria amenaza económica para los productores de cacao. Por lo tanto el presente estudio tuvo como objetivo general el de contribuir al fortalecimiento de los planes de manejo de *M. roreri*, a través de la identificación de genotipos de cacao resistentes a la enfermedad. El estudio se realizó a nivel de campo y laboratorio. En el campo, a través de entrevistas a productores se realizó una prospección de accesiones de cacao que presentaban resistencia aparente a moniliasis. Las accesiones promisorias fueron sometidas a análisis molecular con marcadores microsátélites para identificar los alelos de resistencia. Las accesiones en las cuales se identificaron alelos de resistencia fueron inoculadas artificialmente para corroborar los resultados de laboratorio. Un total de 72 accesiones fueron identificadas en 20 de 50 fincas visitadas. El análisis de agrupamiento formó seis grupos a una distancia de 0.84, lo que corrobora la existencia de una fuente de variabilidad genética. Los resultados de los análisis moleculares indican que las accesiones RSJ 0116, RSJ 0216 y RSJ 0316 presentan la mayor cantidad de alelos asociados a resistencia al hongo *M. roreri*. Por otro lado, se encontraron otras 15 accesiones que presentaron 1 alelo asociado a resistencia a la moniliasis. Los resultados de inoculación determinaron un valor en la escala de severidad externa de 0 grados para las accesiones RSJ 0216 y RSJ 0316, y valores en los grados de severidad interna de 0 para la accesión RSJ 0216 y un valor de 1 en las accesiones RSJ 0116 y RSJ 0316. Estas tres accesiones que se identificaron con alta resistencia a moniliasis deberían ser incluidas en futuros programas de mejoramiento del cultivo de cacao.

Palabras claves: Cacao, resistencia genética, *Moniliophthora roreri*, QTL's

ABSTRACT

Moniliasis caused by *Moniliophthora roreri* is the most important disease in cocoa cultivation in Nicaragua, accounts for 60% of total losses and constitutes a serious economic threat to the country's cocoa producers. Therefore, the present study had as a general objective to contribute to the strengthening of management plans of *M. roreri*, through the identification of cocoa disease resistant genotypes. The study was conducted at the field and laboratory level. In the field, through interviews with producers, a survey of cocoa accessions that presented apparent resistance to moniliasis was carried out. Promising accessions were subjected to molecular analysis with microsatellite markers to identify resistant alleles. Accessions in which resistant alleles were identified were artificially inoculated to corroborate the laboratory results. A total of 72 accessions were identified in 20 of 50 farms visited. The clustering analysis formed six groups at a distance of 0.84, which corroborates the existence of a source of genetic variability. The results of the molecular analyzes indicate that the accessions RSJ 0116, RSJ 0216 and RSJ 0316 present the highest number of alleles associated with resistance to *M. roreri*. On the other hand, it was found another 15 accessions that presented 1 allele associated with resistance to moniliasis. The inoculation results determined an external severity scale value of 0 degrees for the accessions RSJ 0216 and RSJ 0316, and values of internal severity of 0 for the accession RSJ 0216 and a value of 1 in the accessions RSJ 0116 And RSJ 0316. These three accessions identified with high resistance to moniliasis should be included in future cocoa improvement programs.

Key words: Cacao, genetic resistance, *Moniliophthora roreri*, QTL's

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol importante de la selva tropical, previamente clasificado en la Familia Sterculiaceae y actualmente reconocido como miembro de la Familia Malvaceae (Bayer y Kubitzki, 2003) que se originó en la cuenca del Alto Amazonas en Sudamérica tropical (Bartley 2005). Esta especie abarca muchas poblaciones morfológicamente variables con un marcado potencial de intra e intercrucamiento (Bartley 2005). Aunque la autofecundación es posible en plantas autocompatibles, la fecundación cruzada es la estrategia predominante en esta especie vegetal (Zhang y Motilal, 2016).

A medida que el centro de producción de cacao se ha desplazado de un lugar a otro, una pequeña fracción de cultígenos de cacao ha sido transportada a nuevos sitios de producción. La diversidad genética representada en esos cultígenos es en realidad una pequeña fracción de la diversidad genética disponible en la reserva genética primaria de cacao en América del Sur. Por consiguiente, este bajo nivel de diversidad genética no tiene la capacidad de afrontar la presión ejercida por las plagas y enfermedades (Zhang y Motilal, 2016).

El hongo *Moniliophthora roreri* es un fitopatógeno neotropical que todavía está confinado a América tropical (Aime y Phillips-Mora, 2005). Este patógeno causa la pudrición cenicienta de la mazorca de cacao, también conocida como moniliasis, una enfermedad económicamente importante del cacao (*Theobroma cacao*) y que es una amenaza permanente para todos los países productores de cacao. Las pérdidas actuales causadas por el hongo *M. roreri* varían en un rango que va del 10 al 100%. Los brotes epidémicos severos de la enfermedad han llevado al abandono total del cultivo del cacao en extensas áreas, como ha ocurrido en la mayoría de los países afectados (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Phillips-Mora *et al.*, 2007).

Para el manejo de la moniliasis se han probado varias estrategias las cuales incluyen el uso de prácticas culturales, control químico y el uso de microorganismos antagonistas tanto a nivel de laboratorio como a nivel de campo (Krauss y Soberanis, 2001; Mejía y Alvarado, 2016; Porras *et al.*, 1990; Villamil *et al.*, 2012; Villamil *et al.*, 2015). Algunas de estas estrategias de manejo han sido efectivas únicamente a nivel experimental, mientras que otras,

como las prácticas culturales, han sido ampliamente adoptadas por los pequeños productores de cacao. Una estrategia de manejo de largo plazo ambiental y económicamente aceptable es el uso de material genético resistente a la enfermedad (Phillips-Mora *et al.*, 2005; Phillips-Mora, 2007).

Estudios recientes de Loci de Rasgos Cuantitativos (Quantitative trait loci or QTL, por sus siglas en inglés) y de diversidad funcional han mostrado que diferentes grupos de germoplasma de cacao albergan diferentes genes/alelos de resistencia a *M. royeri* (Lanaud *et al.*, 2009). Estos hallazgos constituyen una valiosa oportunidad para evaluar el uso potencial de materiales genéticos autóctonos, adaptados a condiciones edafoclimáticas de la región, con características agronómicas sobresalientes y con tolerancia o resistencia a moniliasis (Sterling *et al.*, 2015).

Por un lado, la resistencia permite a las plantas limitar o reducir la cantidad de daño que reciben, mientras que por otro lado, la tolerancia permite a las plantas amortiguar el efecto negativo del daño en términos de adaptación (Núñez-Farfán *et al.*, 2007). Los mecanismos de resistencia pueden ser constitutivos o inducidos, mientras que los mecanismos de tolerancia son siempre desencadenados por ataques de organismos nocivos (Garrido *et al.*, 2017).

Al igual que en otros países de Mesoamérica, en Nicaragua el principal problema de origen biótico en el cultivo de cacao es la “moniliasis”. Esta enfermedad se supone que arribó a Nicaragua en el año 1980 por la frontera sur (López y Enríquez, 1980) y desde entonces se ha dispersado a las distintas áreas geográficas donde se cultiva cacao. Estudios realizados por Aragón (2008) y Marín-Argüello y Negaresh (2009), indican que la mayor variabilidad y riqueza genética de cacao en Nicaragua se encuentra en el departamento de Rio San Juan, en donde se pueden encontrar un mosaico genético. Por otro lado Rivera y Aragón (2010), identificaron cinco accesiones en el departamento de Rio San Juan asociados con genes de resistencia a moniliasis. La presente investigación se emprendió con el objetivo de hacer una combinación de herramientas de investigación cuantitativa e investigación cualitativa empírica que puedan proporcionar elementos importantes en la búsqueda de fuentes verdaderas y duraderas de resistencia a *M royeri*.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Contribuir al fortalecimiento de los planes de manejo del patógeno *Monilothphora roreri* [(Ciferri & Parodi) Evans et al.], a través de la identificación de genotipos de cacao resistentes a la enfermedad.

2.2. Objetivos específicos

- a) Identificar genotipos de cacao con resistencia aparente al hongo *M. roreri* en base al nivel de tolerancia percibido por los productores.
- b) Seleccionar genotipos asociados con genes de resistencia al hongo *M. roreri* mediante el uso de marcadores moleculares de tipo loci de Rasgos Cuantitativos (QTL's, por sus siglas en ingles).
- c) Determinar la respuesta de los genotipos seleccionados a la inoculación de *M roreri*, en condiciones de laboratorio y en campo.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación del estudio y diseño experimental

El estudio constó de dos fases y se llevó a cabo en los municipios de San Carlos y El Castillo, departamento de Río San Juan, Nicaragua. En esta región, el clima se caracteriza por precipitaciones promedio que oscilan entre 1800 y 3000 mm, las cuales se incrementan de Oeste a Este, hasta alcanzar el rango de 4000-6000 mm. En el municipio de San Carlos, las precipitaciones promedian los 1800 mm anuales y predominan los suelos franco arcillosos y el uso es exclusivamente agropecuario. En el municipio de El Castillo, las precipitaciones sobrepasan los 3000 mm y los suelos son mayormente arcillosos. La erosión de los suelos es leve. En el departamento de Río San Juan existen condiciones edafoclimáticas que son aptas para muchos cultivos perennes como el cacao (CENAGRO, 2013).

Diseño experimental

Esta investigación fue de carácter experimental transversal en la que se tuvo como hipótesis que en las plantaciones de cacao del departamento de Río San Juan existían árboles que tenían resistencia natural al hongo *Moniliophthora roreri*, causante de la enfermedad conocida como “moniliasis”. Esta hipótesis fue corroborada mediante experimentos de laboratorio y de campo. En el laboratorio se emplearon técnicas moleculares para la localización de los Loci de rasgos cuantitativos (Quantitative trait loci o QTL’s, por su acepción en inglés) haciendo uso de asociaciones de marcadores de ADN con fenotipos y posteriormente, en campo se hicieron inoculaciones con el hongo *M. roreri* en árboles o accesiones que resultaron positivos bajo condiciones de laboratorio.

3.2. Identificación de genotipos de cacao con resistencia aparente a *M. roreri*

En esta primera etapa del estudio se realizaron visitas a varias comunidades de los municipios de San Carlos y El Castillo que tienen acción directa en la producción de cacao.

3.2.1. Selección de las comunidades y productores

Para la selección de las comunidades se utilizó la base de datos de dos cooperativas COOPROCAFUC y COSEMUCRIM y de la oficina del INTA San Carlos, para después hacer la selección de 50 productores de cacao de forma aleatoria. Las fincas fueron georreferenciadas para trazar su ubicación en un mapa (Cuadro 1; Anexo 1).

Cuadro 1. Comunidades y cantidad de fincas en donde se llevó a cabo la identificación de fuentes de resistencia al hongo *Moniliophthora roreri*, en los municipios de San Carlos y El Castillo, Rio San Juan, Nicaragua 2015-2016.

Comunidad	Municipio	Número de fincas
Buena Vista	El Castillo	10
Las Colinas	El Castillo	5
Las Maravilla	El Castillo	10
El Castillo	El Castillo	5
Las Azucenas/La Esperancita	San Carlos	5
Laurel Galán/Melchorita	San Carlos	10
Papaturro	San Carlos	5
Total		50 Fincas

Se utilizó la técnica de la entrevista para la recolección de información básica acerca del productor y su núcleo familiar, las condiciones generales de la finca y de las plantaciones de cacao, el estado fitosanitario de las plantaciones de cacao y también se recogió información acerca de la presencia de árboles de cacao que presentarán buenas características agronómicas y de tolerancia a la enfermedad “moniliasis” (Anexo 2).

3.2.2. Recolección de muestras

En las comunidades antes mencionadas se recolectaron tres tipos de muestras:

- a) Muestras de hojas: se cortaron tres hojas sanas, preferiblemente inmaduras (el color verde rojizo es el indicador), estas fueron limpiadas con etanol al 70% e introducidas

en bolsas plásticas y transportadas en un termo. Las muestras foliares fueron puestas en resguardo y conservadas en refrigeración a -10°C, hasta su utilización.

- b) Frutos infestados por la enfermedad moniliasis: se cortó un fruto con síntomas de la enfermedad en estado inicial (presencia de bubas o inicio de formación de mancha de micelios).
- c) Tres frutos sanos para medir características morfológicas de las diferentes accesiones incluidas en el estudio.

3.2.3. Selección de genotipos de cacao con resistencia aparente

Los genotipos de cacao con resistencia aparente fueron seleccionados por valoración consensuada con el agricultor, tomando en consideración las características productivas, repuesta al medio ante *M royeri*, en general, se seleccionaron plantas que en presencia del hongo en la plantación, no mostraban incidencia, por lo tanto esos árboles fueron marcados con cintas, georreferenciados, se registraron sus características más relevantes (Anexo 2), simultáneamente se tomaron las muestras foliares (3 hojas sanas/árbol seleccionado).

Esta actividad se realizó por un periodo de 6 meses, en donde se discriminó 2 de cada 3 fincas visitadas y 8 de cada 10 árboles propuestos por los siguientes criterios: arboles improductivos, no hay presencia del hongo en la plantación y el entorno, arboles con frutos aparentemente sanos/con daño muy severo a lo interno.

Los genotipos identificados por valoración de campo, fueron caracterizados a fin de conocer el grado de variación que había entre ellos, para lo cual se midieron las características con menos influenciadas por el ambiente como la forma del fruto, ápice, base y color del fruto, también se incluyeron las características cualitativas de semilla y flor (Amores *et al.*, 2009).

3.3. Selección de genotipos asociados con genes de resistencia a *M. royeri* mediante el uso de Loci de rasgos cuantitativos (QTL's)

En esta etapa del estudio se utilizó cuatro fuentes de materiales vegetales: i) material foliar que se recolectó en las comunidades de los municipios de San Carlos y El Castillo, en el cual se determinaría si había o no presencia de QTL's asociados con resistencia a moniliasis; ii) material vegetal del clon UF-296, el cual según la Base de Datos Internacional de Germoplasma de Cacao (International Cocoa Germplasm Database, ICGD, por sus siglas en inglés, <http://www.icgd.rdg.ac.uk>), posee resistencia a *M. royeri* y por lo tanto se utilizó como control positivo; iii) material vegetal de una planta con afectación total de frutos procedente de la finca El Guayabo, Comunidad La Venada del municipio de San Carlos; y iv) material vegetal del clon Pound 7 reportado por el ICGD como susceptible al hongo *M. royeri*. Estos dos últimos materiales fueron utilizados como controles negativos.

3.3.1. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1990), cuya metodología consistió en lo siguiente: se cortó un centímetro cuadrado de hoja y se colocó en tubo un Eppendorf de 1.5 ml, que contenía 500 µl de CTAB – Buffer (2% de CTAB, 1.4 mM, Tris pH 8, 1% de PVP al 0.2%) con 2 µl de β-mercaptoetanol previamente calentado en baño maría durante 30 minutos. Se utilizó arena esterilizada para macerar el tejido auxiliado con pistilo azul para tubos de 1.5 ml. Los tubos se incubaron en baño maría durante 45 minutos, agitándolo cada 15 minutos en un vortex. Se aplicó 500 µl de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico en una relación de 24:1 y se centrifugó por 10 minutos a 14800 revoluciones por minuto (rpm). Se extrajo nuevamente el sobrenadante asegurando 300 µl para agregarle 200 µl de isopropanol helado (2/3 de la cantidad del sobrenadante). Se dejó en reposo durante una hora en refrigeración a -20° C, para luego centrifugarlo por 10 minutos a 14800 rpm. Se extrajo el sobrenadante sin distorsionar el pellet y se agregaron 200 µl de etanol al 70% y se centrifugó por 10 minutos a 14800 rpm. Se extrajo el sobrenadante sin distorsionar el pellet y se dejó secar a temperatura ambiente durante una hora. Se agregó 200 µl de Tris-EDTA-Buffer (TE-Buffer) para diluir el pellet agitándolo en el vortex durante cinco minutos y posteriormente se adicionó 2 µl de ARNasa (enzima que degrada ARN).

Para corroborar la efectividad de la extracción de ADN, se visualizó las muestras en luz ultravioleta en gel de agarosa simple al 1% teñidas con bromuro de etidio.

3.3.2. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)

Para la amplificación del ADN se utilizó un volumen total de 25 μ l que contenía 12.5 μ L master mix (1X buffer de PCR, 1 U *Taq* polimerasa, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$), 2 μ L del cebador delantero (0.2 μ M), 2 μ L del cebador reverso (0.2 μ M), 3 μ L de ADN genómico (10 ng de cacao) y 5.5 μ L de agua ultra pura calidad PCR. Las secuencias de los cebadores utilizados en este estudio se describen en el Cuadro 2. Antes de llevar a cabo la amplificación se realizó un proceso de optimización de la condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa a fin de determinar cuál era la temperatura óptima para el anillamiento de cada uno de los marcadores.

La amplificación del ADN se realizó en un termoclicador MyGene thermal Cycler modelo MG96G con la siguiente programación: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, anillamiento a 46°C o 51°C durante 40 segundos dependiendo del cebador, extensión a 72°C durante un minuto y extensión final a 72° C por 8 minutos.

La electroforesis se llevó cabo con una mezcla de 5 μ l de ADN amplificado y 1 μ l de buffer de carga 6x que fue inyectada en gel de agarosa simple al 4.5% teñida con bromuro de etidio en una cámara de electroforesis que contenía buffer TBE (Tris, ácido bórico, EDTA). A la par de la muestra amplificada se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (pb), para identificar el tamaño de las bandas. Las muestras se mantuvieron en la cámara de electroforesis durante 60 minutos a 400 watts y 120 voltios, la visualización se hizo en cámara de luz ultravioleta (Transluminator High Performance UV) y se tomó una fotografía. Para medir el tamaño de las bandas se utilizó un programa transluminador ultravioleta de transporte y de esta manera determinar la calidad del ADN (Anexos 3, 4, 5 y 6).

Cuadro 2. Marcadores moleculares utilizados en la identificación de genotipos de cacao resistentes a *Moniliophthora roreri* (Phillips *et al.*, 2007).

SSR	Accesion	5'3' Forward primer	5'3' Reverse primer	LG	Tamaño (pb)	Repeats
mtcCIR145	AJ566480	CAGACTTCCAACCTCAAACT	TGAGAATAGATGGACCGAT	9	117	(CT)17
mtcCIR100	AJ5665444	TGATGGAATAAACTAAGAACA	TAAGAAGCCAGGTCAGG	2	244	(AG)6C
mtcCIR252	AJ566573	AATGTGTGCTTTGTTTCTA	TTCAAGGGCGTAACTC	2	155	(AC)10
mtcCIR240	AJ566561	CATACCTACTACTGCTCTCT	AGTGATTTATGGGACTTT	2	158	(CT)22
mtcCIR176	AJ566504	TCACCAATTCTCTGCTC	AATGAAATTACCTCCTTAC	2	106	(TG)16

3.4.Respuesta de los genotipos seleccionados a la inoculación con *M. roreri*

3.4.1. Obtención e identificación de cultivos puros del hongo *M. roreri*

Los frutos colectados con síntomas iniciales de la enfermedad se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 5 min. Las mazorcas se partieron por la mitad con un cuchillo estéril, evitando el contacto del cuchillo con el interior del cacao. Con una pinza estéril se tomaron tres porciones del endocarpio del fruto de cacao de 0.5 cm que presentaba síntomas iniciales de la enfermedad. Estos pequeños trozos de endocarpio se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 min. Luego se lavaron en agua estéril durante 2 minutos para eliminar los restos del hipoclorito de sodio.

Se utilizaron tres medios de cultivo diferentes para la siembra de los trozos de endocarpio desinfectados. Uno de los trozos fue depositado en el centro de una placa Petri que contenía el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), el segundo trozo se colocó en el centro de una placa Petri con el medio Agar Sabouraud (AS) y el último trozo se depositó en una placa Petri con medio de cultivo Agar V8. Los dos primeros medios de cultivo son específicos para el aislamiento de hongos, mientras que el tercero induce la esporulación. Todos los medios de cultivo utilizados fueron suplementados con 800 $\mu\text{l L}^{-1}$ del antibiótico sulfato de gentamicina. Las placas Petri con las muestras se incubaron a 27°C en la oscuridad durante 15 días. (Suárez y Rangel, 2014). A los 15 días del crecimiento, se hizo un repique en Agar V8 por duplicado para obtener colonias puras. Estos cultivos puros se incubaron a 27°C durante 15 días en oscuridad hasta su utilización. La identificación de los cultivos puros fue

necesaria para confirmar que se trataba del hongo *M. roreri*. De tal manera que el proceso de identificación se realizó utilizando la clave taxonómica de Barnett y Hunter (1999) y evaluando características macroscópicas descritas por Phillips-Mora *et al.*, (2006) como color de la colonia, borde de la colonia, tipo de micelio (textura), tipo de esporulación, etc. (Anexo 7).

3.4.2. Inoculación de frutos de cacao en el laboratorio

Las comunidades donde se encontraron accesiones que poseían genes asociados con resistencia a moniliasis, según los resultados del análisis molecular, fueron nuevamente visitadas para recolectar mazorcas y realizar la inoculación del agente patógeno bajo condiciones de laboratorio. Con los cultivos puros de *M. roreri*, previamente obtenidos en el laboratorio, se preparó una suspensión de esporas en agua destilada más Tween 80 al 0.01% (dispersante). La suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^5 esporas ml^{-1} . Antes de la inoculación, se delimitó un área aproximada de 4 cm^2 con esmalte en la parte ecuatorial del fruto. Por cada accesión se seleccionaron cinco frutos inmaduros (2-3 meses de edad), los cuales se inocularon con 2 ml de la suspensión de esporas de *M. roreri* a la concentración de 1×10^5 esporas ml^{-1} (Figura 1). Los frutos inoculados se cubrieron durante dos días con bolsas plásticas transparentes que contenían algodón humedecido con 50 ml de agua para crear una cámara húmeda (Figura 2) y que la infección se pudiera concretar (Phillips-Mora *et al.*, 2005).



Figura 1. Demarcación del área de inoculación en el fruto de cacao (A) y corte en el área (B) para depositar la suspensión de esporas de *M. roreri*, en 3 accesiones RSJ 0116, RSJ 0216 y RSJ 0316.



Figura 2. Frutos de las accesiones RSJ 0116, RSJ 0216, RSJ 0316 y los controles positivos (UF 296) y negativo (POUND 12) inoculados con suspensión de esporas del patógeno *M. royeri* en laboratorio y colocados en cámara húmeda.

3.5. Variables evaluadas

a) Descriptores morfológicos de frutos de las plantas sin afectación de *M. royeri*

Esto se realizó en tres frutos seleccionados por cada una de las accesiones que se incluyeron en el estudio. Las características que se midieron fueron: forma del verticilio, color de fruto, forma, rugosidad, constricción basal, forma del ápice, color de cotiledones.

b) Cantidad de pares de bases por alelo y frecuencia alélica

Este valor se calculó utilizando el Software UVPF Framework, marcando con el cursor la banda y arrastrando hasta la cajilla donde se depositó el producto PCR y la frecuencia alélica con el Software GENE ALEX.

c) Severidad externa e interna del fruto inoculado

Para la estimación la severidad externa se utilizó una escala de evaluación ordinal de seis grados (de 0 a 5) y para la severidad interna se utilizó una escala de enfermedad constituida por grados de severidad (de 0 a 5) y por rangos de severidad (de 0% a > 80%) (Sánchez *et al.*, 1987; Sánchez y González, 1989; Phillips-Mora *et al.*, 2005) (Cuadro 3 y Cuadro 4).

Cuadro 3. Escala de evaluación ordinal para la estimación de la severidad externa de *M. royeri* en mazorcas de cacao.

Grados de severidad	Descripción de la severidad externa
0	Fruto sano
1	Presencia de puntos aceitosos (hidrosis)
2	Hinchazón y/o maduración prematura
3	Necrosis (mancha chocolate)
4	Presencia de micelio que cubre menos de la cuarta parte de la necrosis
5	Presencia de micelio que cubre más de la cuarta parte de la necrosis

Cuadro 4. Escala de enfermedad para la estimación de la severidad interna de *M. royeri* en mazorcas de cacao.

Grados de severidad	Descripción en porcentaje de la severidad interna (necrosis)
0	0%
1	1%-20%
2	21%-40%
3	41%-60%
4	61%-80%
5	>80%

Con el fin de determinar con mayor exactitud la severidad externa e interna, los valores de los grados de severidad de la escala fueron transformados a porcentajes a través de la fórmula de Townsend-Heuberger (1943):

$$I = \left(\frac{\sum n \times v}{iN} \right) \times 100$$

Dónde.

I = % de intensidad de ataque del patógeno

$(n \times v)$ = total de mazorcas con un grado por su respectivo grado de la escala

N = total de mazorcas evaluadas

i = grado máximo de la escala ($i = 5$)

3.6. Análisis de datos

Los datos de las características morfológicas de las plantas identificadas fueron sometidas a un análisis multivariado; Análisis de agrupamiento para determinar similitudes entre ellas.

Los datos provenientes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron analizados con el programa GENE ALEX SOFTWARE, para estimar frecuencia de genes, la cantidad de pares de base con ayuda del programa UVPF Framework, presente en los materiales en estudio por cada locus, por otro lado se realizó análisis de componentes principales para determinar la distribución de la muestra en los diferentes ejes de acuerdo a su composición genética.

Los datos provenientes de las inoculaciones fueron analizados utilizando escala de evaluación ordinal para la estimación de la severidad externa e interna de *M. royeri* en mazorcas de cacao (Sánchez *et al.*, 1987; Sánchez y González, 1989; Phillips-Mora *et al.*, 2005).

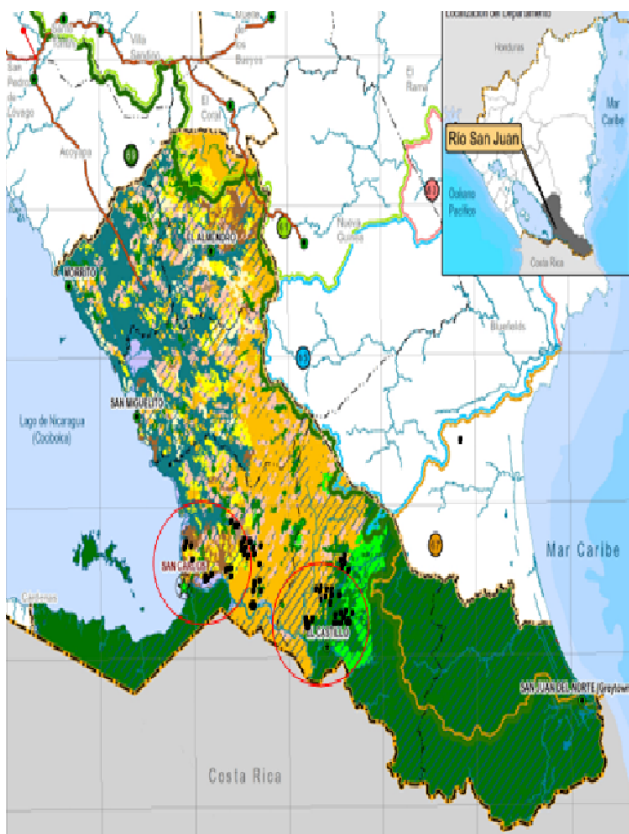
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de genotipos de cacao con resistencia aparente a *M. royeri*

Se identificaron y seleccionaron 72 accesiones de cacao procedentes de 20 fincas de productores de las 50 fincas que habían sido seleccionadas previamente. Estas fincas se encuentran dispersas en 12 comunidades de los municipios de San Carlos y El Castillo (Cuadro 5; Figura 3), departamento de Río San Juan (40 accesiones en el municipio de San Carlos y 32 en el municipio de El Castillo). Las plantas fueron seleccionadas por valoración consensuada con el agricultor, tomando en consideración sus características productivas, adaptación edafoclimática, respuesta al ataque del hongo *M. royeri*. En general, se seleccionaron plantas que en presencia del hongo en la plantación no mostraban incidencia de la enfermedad.

Cuadro 5. Comunidades en los municipios de San Carlos y El Castillo del departamento de Río San Juan donde se identificaron accesiones con resistencia aparente a *M. royeri* en cacao.

Municipios	Comunidades	Número de accesiones por comunidad
San Carlos	Las Esperanza	3
	El Limón	5
	La Venada	6
	Monte Piedad	4
	Las Azucenas	6
	Melchorita	4
	Los Chiles	10
	Laurel Galán	2
El Castillo	Las Colinas	6
	Buena Vista	14
	La Quezada	6
	Las Maravillas	6



Estudio de identificación de fuentes de resistencia a monilia

Ubicación de 72 accesiones de cacao con resistencia aparente a moniliasis en el departamento de Rio San Juan, Nicaragua

ID arbol identificado	Ubicación de finca UTM		ID arbol identificado	Ubicación de finca UTM		ID arbol identificado	Ubicación de finca UTM	
	X (16P)	Y (UTM)		X (16P)	Y (UTM)		X (16P)	Y (UTM)
RSJ 0116	0761398	1238602	RSJ 2516	0750083	1233707	RSJ 4916	0761072	1237410
RSJ 0216	0761398	1238602	RSJ 2616	0759777	1233738	RSJ 5016	0761072	1237410
RSJ 0316	0761398	1238602	RSJ 2716	0759777	1233738	RSJ 5116	0780020	1235159
RSJ 0416	0761072	1237410	RSJ 2816	0759777	1233738	RSJ 5216	0780020	1235159
RSJ 0516	0761072	1237410	RSJ 2916	0759777	1233738	RSJ 5316	0780111	1235522
RSJ 0616	0761072	1237410	RSJ 3016	0759777	1233738	RSJ 5416	0780111	1235522
RSJ 0716	0761072	1237410	RSJ 3116	0781029	1233550	RSJ 5516	0780114	1236023
RSJ 0816	0761072	1237410	RSJ 3216	0781029	1233550	RSJ 5616	0780114	1236023
RSJ 0916	0761073	1237411	RSJ 3316	0781029	1233550	RSJ 5716	0780114	1236023
RSJ 1016	0761074	1237412	RSJ 3416	0780020	1235159	RSJ 5816	0780020	1235159
RSJ 1116	0761075	1237413	RSJ 3516	0780020	1235159	RSJ 5916	0780020	1235159
RSJ 1216	0761076	1237414	RSJ 3616	0780020	1235159	RSJ 6016	0780111	1235522
RSJ 1316	0761077	1237415	RSJ 3716	0780020	1235159	RSJ 6116	0780111	1235522
RSJ 1416	0768229	1234480	RSJ 3816	0780020	1235159	RSJ 6216	0761072	1237410
RSJ 1516	0768229	1234480	RSJ 3916	0780111	1235522	RSJ 6316	0761072	1237410
RSJ 1616	0768229	1234480	RSJ 4016	0780111	1235522	RSJ 6416	0761253	1254452
RSJ 1716	0768229	1234480	RSJ 4116	0780111	1235522	RSJ 6516	0780020	1235159
RSJ 1816	0768229	1234480	RSJ 4216	0780111	1235522	RSJ 6616	0780020	1235159
RSJ 1916	0768229	1234480	RSJ 4316	0780111	1235522	RSJ 6716	0780111	1235522
RSJ 2016	0768229	1234480	RSJ 4416	0780114	1236023	RSJ 6816	0780111	1235522
RSJ 2116	0750083	1233707	RSJ 4516	0780114	1236023	RSJ 6916	0780020	1235159
RSJ 2216	0750083	1233707	RSJ 4616	0780114	1236023	RSJ 7016	0761072	1237410
RSJ 2316	0750083	1233707	RSJ 4716	0780114	1236023	RSJ 7116	0761072	1237410
RSJ 2416	0750083	1233707	RSJ 4816	0780114	1236023	RSJ 7216	0780020	1235159

Figura 3. Municipios, comunidades y coordenadas geográficas (UTM) de 72 accesiones de cacao con resistencia aparente a moniliasis de cacao.

4.1.1. Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento entre las accesiones por comunidad fue basado en su frecuencia alélica y caracteres morfológicos. El análisis forma tres grupos a una distancia de 0.54, el primer grupo está conformado por las accesiones procedentes de las comunidades Los Cocos y Los Chiles, el segundo por las accesiones procedente de la comunidad La Venada y el tercer grupo por las accesiones procedentes de las comunidades Las Azucenas, San Carlos, Laurel Galán, Melchora, Melchorita, El Limón (Figura 4). Esto puede tener una explicación en base al historial del cómo estas comunidades se han iniciado en el cultivo y la fuente de las semillas según la época y la organización que lo fomentó. En primera instancia el sector de Los Chiles (La Venada, Los Cocos) posee árboles de edades mayores a los 20 años, según fueron beneficiados por un mismo proyecto (2016). En el caso de los otros cacaos, proceden de proyectos recientes, donde su origen es El Recreo.

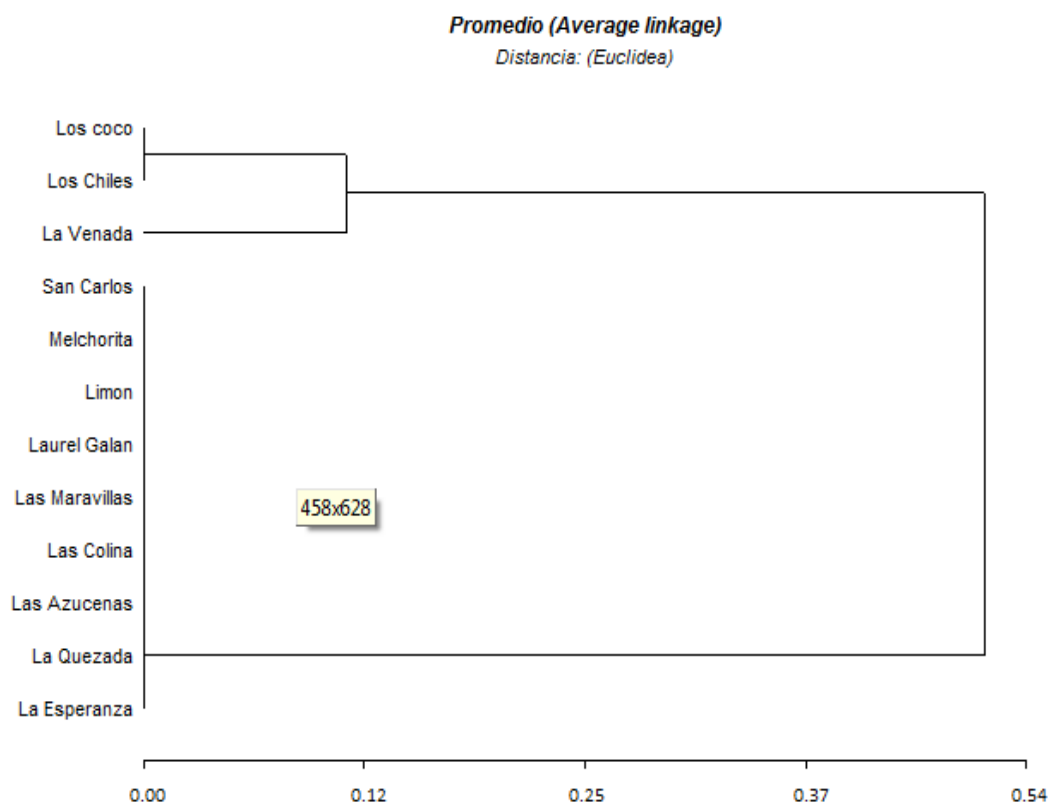


Figura 4. Análisis de agrupamiento de las accesiones de acuerdo a las comunidades donde fueron recolectadas.

4.1.2. Características morfológicas más relevantes

El 17% de las accesiones presentaron un verticilo compacto y 53% de forma intermedia, entre estas las accesiones RSJ 0116, RSJ 0216 que están asociados a resistencia a *M. royeri* (3 y 4 alelos) al igual que 7 de las 15 accesiones que presentaron 1 alelo (Figura 5). Es probable que la forma en que se desarrollan los ejes del verticilo limita las condiciones óptimas para el patógeno, aunque esta condición puede parecer un escape (resistencia aparente) podría existir una correlación positiva entre esta expresión y los genes que determinan la resistencia.



Figura 5. Distribución porcentual de tres formas encontradas del verticilio en 72 accesiones de cacao.

El color que mas predominó fue el verde con 65.3% de las accesiones y el rojo con 34.7% (Figura 6). Sin embargo, dos de las tres accesiones (RSJ 0216 y RSJ 0316) presentaron un color rojo intenso, algo similar con el color del fruto del clon UF 296, utilizado como control positivo. El color rojo intenso en esas dos accesiones hace suponer que contienen altas cantidades de compuestos ricos en antocianinas que determinan este color y su efecto sobre el patogeno en otros estudios a nivel bioquimico, algo similar fue lo encontrado con el color de la almendra, entre mas intenso el color violeta mas accesiones estaban en este grupo que los agricultores seleccionaron por su poca afectacion.



Figura 6. El color rojo de la mazorca representó un 34.7% (A), mientras que el color verde fue el predominante con un 65.3% (B). Con respecto al color de las almendras, el que predominó fue el color morado con un 75% (C).

Otras características morfológicas de relevancia que fueron observadas en las 72 accesiones estudiadas fueron la constricción de la base del fruto donde el porcentaje mayor (28%) estuvo

representado por frutos donde la constricción basal estaba ausente; el mayor porcentaje de frutos (36%) tuvo una rugosidad ligera; la forma del fruto que predominó fue la amelonada (55%) y el ápice agudo del fruto fue el más prevalente con un 25% (Figura 7). Algo muy importante de destacar es la gran gama de variaciones fenotípicas encontradas, es posible que todas las combinaciones y en muchos casos recombinaciones estén proporcionando esta fuente importante de individuos en potencia para diferentes fines de mejoramiento genético, sin embargo, al compararlo con la baja frecuencia de alelos 0.8 en una muestra de 72 accesiones, es un indicativo del panorama real de las plantaciones en Nicaragua, a la vez muestra una alternativa futura de incorporar estos genes a través de nuevos planes de mejoramiento genético con clones nacionales e internacionales seleccionados por alta productividad.

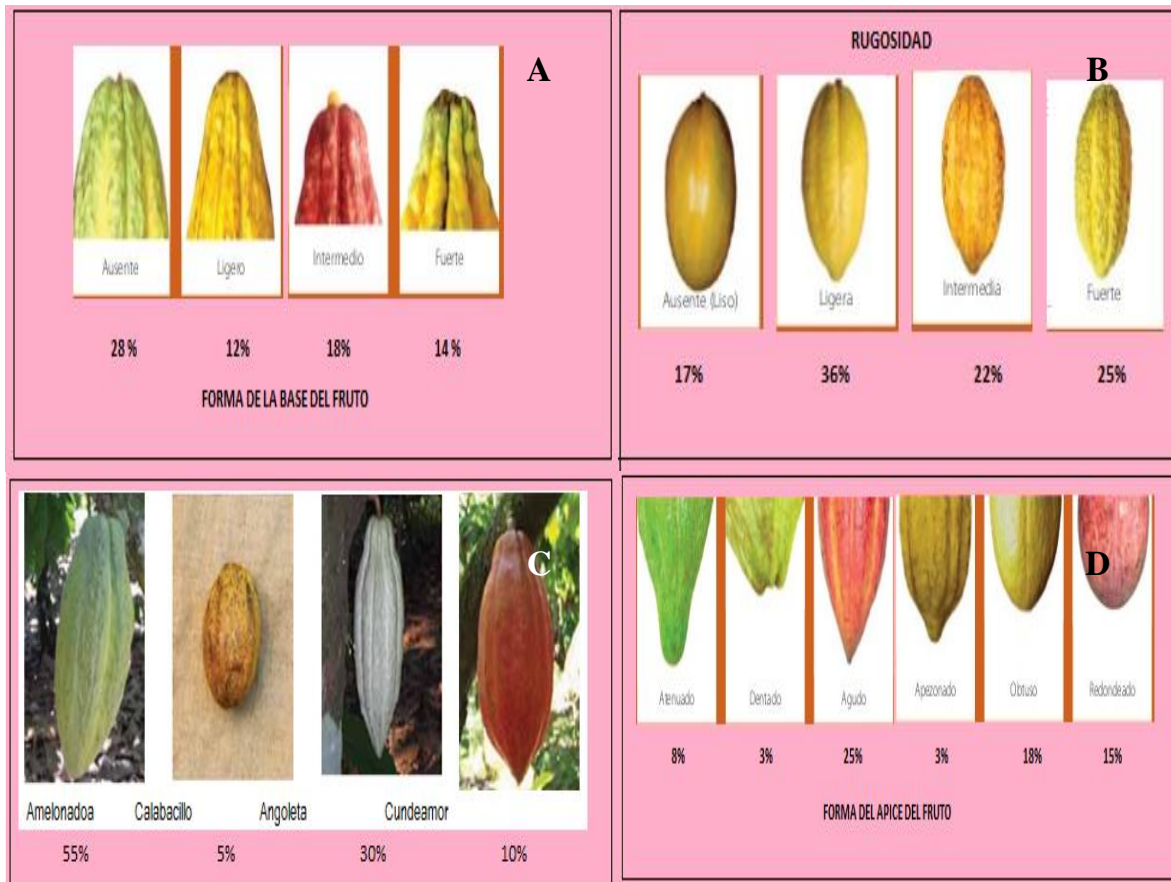


Figura 7. Características morfológicas de 72 accesiones de cacao. Forma de la base del fruto (A), rugosidad (B), forma del fruto (C) y forma del ápice del fruto (D).

4.2. Selección de genotipos asociados con genes de resistencia a *M. royeri* mediante el uso de Loci de rasgos cuantitativos (QTL's)

Según los resultados de los análisis moleculares, 17 accesiones de una muestra de 72 presentaron al menos un alelo que los asocia con resistencia a moniliasis. Sin embargo, las accesiones: RSJ 0116, RSJ 0216 y RSJ 0316 presentaron la mayor cantidad de alelos de interés: RSJ 0116 presentó 3/5 alelos, RSJ 0216 - 4/5 alelos y RSJ 0316 - 3/5 alelos. Por consiguiente, esto indica que la fuente de su resistencia a moniliasis está determinada por 3 a 4 alelos en estas accesiones. Por otro lado existen otras 14 accesiones que presentaron solamente 1/5 alelos asociados a la resistencia a moniliasis (Cuadro 6).

Cuadro 6. Accesiones de cacao identificadas en el departamento de Rio San Juan, que presentan alelos asociados a la resistencia a moniliasis.

No	Accesión	Cantidad de alelos identificados	Valor de frecuencia
1	RSJ 0216	4	0.8
2	RSJ 0116	3	0.6
3	RSJ 0316	3	0.6
4	RSJ 0416	1	0.2
5	RSJ 0516	1	0.2
6	RSJ 0616	1	0.2
7	RSJ 0716	1	0.2
8	RSJ 0816	1	0.2
9	RSJ 0916	1	0.2
10	RSJ 2016	1	0.2
11	RSJ 2116	1	0.2
12	RSJ 2216	1	0.2
13	RSJ 2316	1	0.2
14	RSJ 2416	1	0.2
15	RSJ 2516	1	0.2
16	RSJ 2916	1	0.2
17	RSJ 3016	1	0.2
18	RSJ 3516	1	0.2

Hasta ahora se han detectado un gran número de Loci de Rasgos Cuantitativos (QTLs, por sus siglas en inglés) relacionados con la resistencia a enfermedades en el cacao. Un reto todavía pendiente es la comparación e identificación más precisa de estos QTL's a partir de diferentes fuentes genéticas, con el fin de optimizar la acumulación de alelos favorables en variedades mejoradas a través de una estrategia de selección asistida por marcadores (Lanaud *et al.*, 2009).

El uso de métodos tradicionales para producir cacao es un proceso lento, y la mayoría de los programas de mejoramiento se han basado en una base genética muy estrecha. La selección asistida por marcadores podría mejorar la eficiencia en el mejoramiento para rasgos cuantitativos y cualitativos si se encuentran marcadores moleculares que están vinculados a esos rasgos. Más de 23,000 genotipos están actualmente en evaluación para resistencia a enfermedades e incremento de productividad. Muchas de estos genotipos se han evaluado utilizando marcadores microsatélites (Schnell *et al.*, 2007).

La variabilidad en tamaño de los alelos presentados (Cuadro 7), podrían ser explicado con base en las siguientes hipótesis propuestas por Marín 2009: i) imprecisión en el proceso de la homología recombinante entre cromosomas pares; ii) presencia de secuencias de nucleótidos que marcan señales stop provocando la separación de la polimerasas de la secuencia del ADN blanco; iii) incorporación de sitios de mutación producto del cambio estructural de los nucleótidos esenciales o regiones de la replicación del ADN no reparadas; iv) incorporación de regiones transposómicas que abortan la transcripción.

No obstante, todas las causas hipotéticas señaladas conducen a un solo resultado, acelerar la expresión del factor de transcripción, lo cual indica que entre más corto sea el número de nucleótidos a ser expresados en el factor de transcripción, más rápido puede responder la planta a la presencia del patógeno. En otras palabras, a una mayor velocidad de respuesta de la planta, mayores serán las probabilidades de supervivencia de ésta, y por lo tanto, la planta tendrá mayor capacidad de trasladar su material hereditario a la progenie.

Cuadro 7. Tamaño de los alelos (pares de bases) en accesiones de cacao procedentes de plantaciones del departamento de Rio san Juan, asociados con genes de resistencia a *M royeri*.

Marcador	Accesión	Pares de base/Alelo	
		A	B
MTcCIRAD 100	RSJ 0216	176	176
MTcCIRAD 145	RSJ 0116	120	120
MTcCIRAD 145	RSJ 0216	150	200
MTcCIRAD 145	RSJ 0316	150	205
MTcCIRAD 145	RSJ 0416	165	200
MTcCIRAD 145	RSJ 0516	170	205
MTcCIRAD 145	RSJ 0616	175	175
MTcCIRAD 145	RSJ 0716	200	200
MTcCIRAD 145	RSJ 0816	205	205
MTcCIRAD 145	RSJ 0916	185	185
MTcCIRAD 145	RSJ 2016	165	165
MTcCIRAD 145	RSJ 2116	170	170
MTcCIRAD 145	RSJ 2216	165	245
MTcCIRAD 145	RSJ 2316	180	180
MTcCIRAD 145	RSJ 2416	160	235
MTcCIRAD 145	RSJ 2516	170	170
MTcCIRAD 176	RSJ 0116	175	175
MTcCIRAD 176	RSJ 0216	205	205
MTcCIRAD 176	RSJ 0316	77	77
MTcCIRAD 240	RSJ 0316	140	205
MTcCIRAD 252	RSJ 0116	96	108
MTcCIRAD 252	RSJ 0216	124	124
MTcCIRAD 252	RSJ 2916	92	92
MTcCIRAD 252	RSJ 3016	77	118
MTcCIRAD 252	RSJ 3516	105	105

El análisis de componente principal indica que existe una gran variación entre las accesiones identificadas, esto es importante porque afirma la existencia de una fuente de variabilidad, el componente principal 1 (CP1) acumula 33.20% de la variación total y el componente principal 2 (CP2) el 20.50%. Basados en los resultados de CP1 y CP2, las accesiones que están compartiendo mayor relación con el control positivo UF 296 son las accesiones: RSJ 0116, RSJ 0216 y RSJ 0316, las otras 13 accesiones que comparten un alelo en común, están más relacionadas entre ellas que con las antes mencionadas (Figura 8).

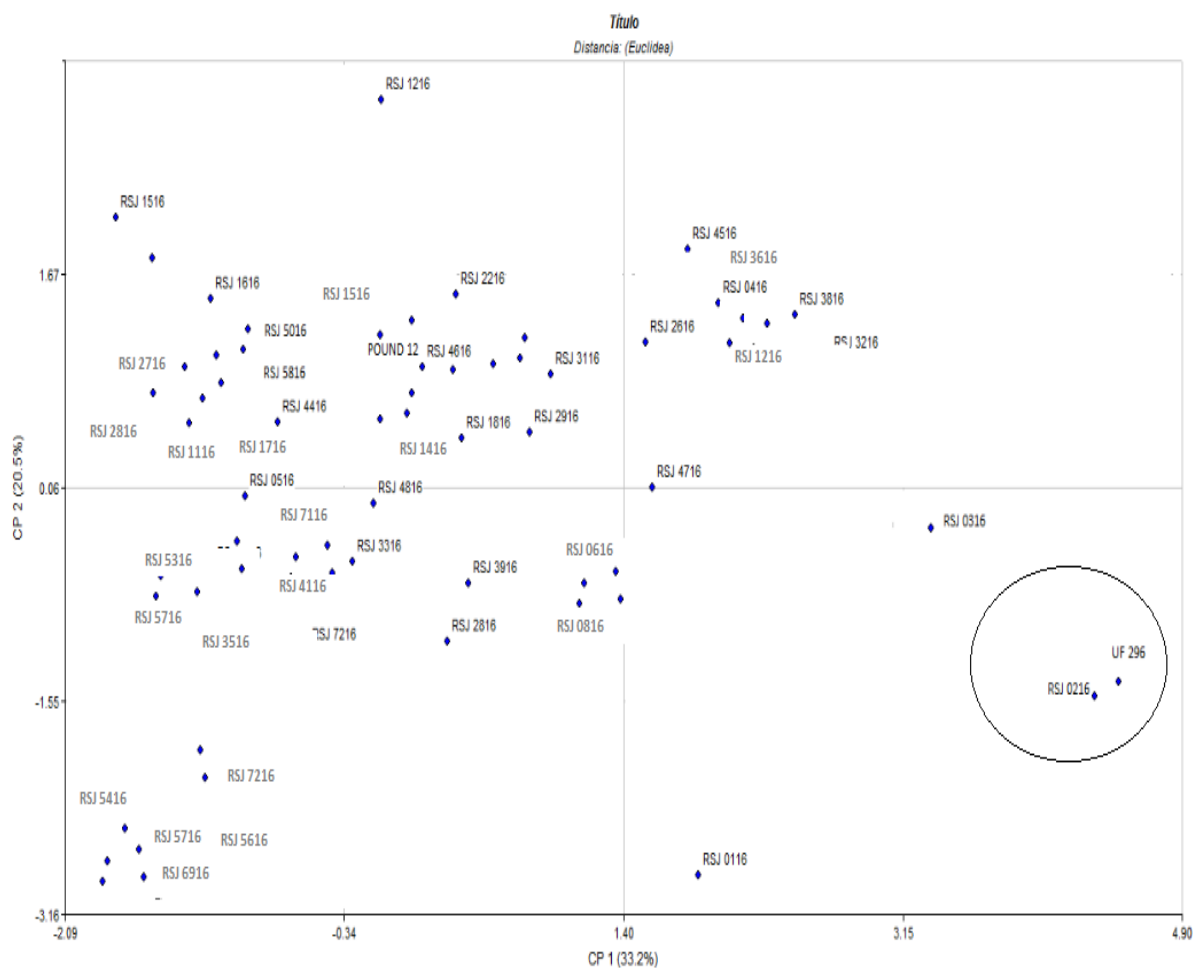


Figura 8. Análisis de componentes de 72 accesiones de cacao con resistencia aparente y real a moniliasis de cacao, identificadas en el departamento de Rio San Juan, Nicaragua.

4.3. Determinación de la respuesta de los genotipos seleccionados a la inoculación con *M. royeri*

4.3.1 Severidad externa

Las inoculaciones fueron realizadas únicamente en las accesiones que presentaron mayor cantidad de alelos asociados a la resistencia a moniliasis y los controles (UF 296 control positivo y POUND 12 control negativo). Los resultados de inoculación determinaron un valor en la escala de severidad de 0 grados para las accesiones RSJ 0216 y RSJ 0316, donde a los 25 y 30 días postinoculación, los frutos estaban completamente sanos (únicamente presentando necrosis por el trauma en la lesión inducida. Según Sánchez y Gonzales (1989) y Phillips-Mora *et al.*, (2005) esto indicaría que estas accesiones antes mencionadas poseen resistencia a la enfermedad. Para el caso específico de este estudio, se puede afirmar que estas tres accesiones poseen los alelos que determinan la resistencia tanto a la fase biotrófica como a la fase necrotrófica del patógeno (Meinhardt *et al.*, 2014).

En el caso de la accesión RSJ 0116, el valor en la escala de severidad es 1 ya que los frutos inoculados presentaron puntos grasientos como indicios para el desarrollo de micelio. En relación a las inoculaciones del control positivo (Clon UF 296) y negativo (POUND 12), estos mostraron valores en la escala de severidad de 1 para el control positivo y 4 para el negativo. De acuerdo a la escala de severidad sugerida por Phillips-Mora *et al.*, (2005) para evaluar la resistencia de clones de cacao a *M. royeri*, la accesión RSJ 0116 y el Clon UF 296 pueden ser categorizados como moderadamente resistentes, mientras que el Clon POUND 12 como susceptible.

4.3.2 Severidad interna

Los frutos bajo estudio fueron cortados transversalmente para medir el daño interno utilizando la escala de severidad (Cuadro 4). Los resultados determinaron un valor en los grados de severidad de 0 para la accesión RSJ 0216 y un valor de 1 en las accesiones RSJ 0116 y RSJ 0316. Es importante destacar que la accesión RSJ 0316 no mostró ningún signo

externo, sin embargo, al partir el fruto este mostró una pequeña necrosis de 4% de daño (Figura 9).

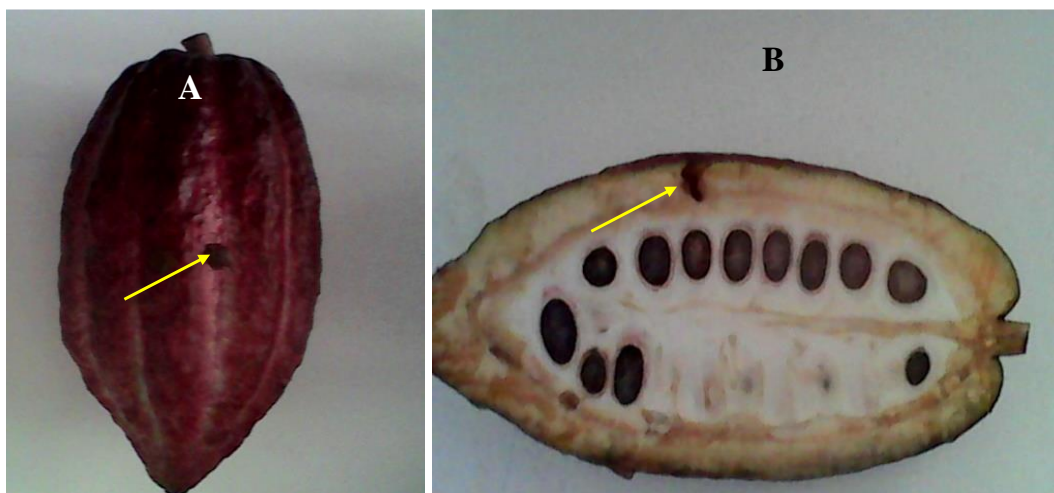


Figura 9. En el punto de inoculación (señalado con la flecha en A) no se observa crecimiento del patógeno, mientras que en el interior del fruto se observa una leve necrosis (señalado con la flecha en B) en el fruto de la accesión RSJ 0316.

Al parecer los clones tolerantes (RSJ 0316, por ejemplo) detectan tempranamente el patógeno en su fase biotrófica e inician la muerte celular programada, descontinuada muchas actividades metabólicas regulares. Este fenómeno fue observado en el presente estudio, ya que en la accesión RSJ 0316 se evidenció una respuesta hipersensible (necrosis) ante la inoculación artificial del patógeno. Los cambios en otras vías, como el metabolismo de la glucosa y la galactosa y la glucólisis, son comunes durante la infección de fitopatógenos (Bolton, 2009), y pueden ser el resultado de cambios hormonales. El hongo *M. roreri* parece persistir como un biótrofo durante un período relativamente largo, alcanzando una carga fúngica (colonización) más alta en los clones susceptibles (POUND 12, por ejemplo) proporcionando el acceso a un sumidero metabólico mucho más grande (Ali *et al.*, 2014).

En el clon que se utilizó como control negativo, es decir que no posee genes de resistencia a *M. roreri*, los valores en la escala de severidad fueron los esperados tanto a nivel externo como a nivel interno del fruto. En la parte exterior del fruto se observó una mancha café rodeado de un halo amarillo, mientras que en el interior del fruto se evidenció la característica pudrición inducida por la acción del patógeno (Figura 10).



Figura 10. Presencia de mancha color chocolate rodeado por un halo amarillo (A) y pudrición interna en un fruto del clon POUND 12 (B).

El uso de germoplasma de cacao mejorado en combinación con mejores prácticas agronómicas, son probablemente la estrategia más factible para un manejo rentable a largo plazo de la moniliasis del cacao. Actualmente no existen clones de cacao totalmente resistentes o inmunes a *M. rozeri*, sin embargo, se han desarrollado clones tolerantes (Phillips-Mora, 2010; Phillips-Mora *et al.*, 2005).

El conocimiento de las diferencias genéticas entre los clones de cacao que generalmente se cultivan por sus características de resistencia a enfermedades, rendimiento, cualidades organolépticas y agronómicas, así como el tipo de acción génica implicada, es esencial para que los fitomejoradores seleccionen efectivamente los clones progenitores. Los criterios cuantitativos tales como la habilidad combinatoria general y específica (HCG y HCE) también constituyen parámetros extremadamente útiles que permiten a los fitomejoradores hacer elecciones de progenitores más eficientes, proporcionando información acerca del valor potencial del progenitor en cruces, así como describiendo la acción del gen o genes involucrados. Esta información también puede ser de gran relevancia para los genetistas cuantitativos en el diseño y mejora de las estrategias de localización de los Loci de Rasgos Cuantitativos (QTL, por sus siglas en inglés) (Cervantes-Martínez *et al.*, 2006). Un conocimiento más profundo de la interacción huésped-patógeno a nivel molecular debería mejorar el éxito de los programas de mejoramiento de cacao.

V. CONCLUSIONES

1. Se logró la identificación de 72 accesiones con resistencia aparente al hongo *M. royeri* en base al nivel de incidencia valorado por los productores.
2. Se seleccionaron 3 de las 72 accesiones identificadas en campo, a través de los análisis moleculares donde indican la presencia de alelos asociados con resistencia al hongo *M. royeri*.
3. La accesión RSJ 0216 presenta los valores en escala de severidad externa e interna más bajos, lo que indica que su respuesta a la enfermedad está dado por los genes que posee y su expresión.

VI. RECOMENDACIONES

1. Colectar material vegetativo para la conservación de las accesiones en la colección nacional de cacao en el CDT El Recreo e incorporarlas a reproducción para estudios de validación y cruzamientos.
2. Validar las tres accesiones en las zonas cacaoteras con mayor presencia de moniliasis, para brindarles una alternativa a los productores.
3. Realizar estudios para determinar habilidad combinatoria general y específica de las accesiones RSJ 0116, RSJ 0216, RSJ 0316 en cruces con clones de alta productividad como PACAYITA e ICS 95.

VII. LITERATURA CITADA

- Ali, S.S., Melnick, R.L., Crozier, J., Phillips-Mora, W., Strem, M.D., Shao, J., Zhang, D., Sicher, R., Meinhardt, L., and Bailey, B.A. 2014. Successful pod infections by *Moniliophthora roreri* result in differential *Theobroma cacao* gene expression depending on the clone's level of tolerance. *Molecular Plant Pathology* 15:698-710.
- Aime, M. C., and Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97:1012-1022.
- Amores, F., Agama, J., Suárez, C., Quiroz, J., Motato, N. 2009. EET 575 y EET 576 nuevos clones de cacao nacional para la zona central de Manabí. Boletín divulgativo No. 346. Estación Experimental Tropical "Pichilingue", Quevedo, Ecuador. 28 p.
- Herrera, K y Aragon, E. 2012. Caracterización molecular de 105 accesiones de cacao en Nicaragua utilizando 10 marcadores tipo microsatélites (SSR). INTA CNIAB, Programa nacional de semilla y agrobiotecnología, Nicaragua.46p
- Barnett, H; and Hunter, B. 1999. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. Minnesota, United States of America. The American Phytopathological Society. 218 p.
- Bartley, B. G. D. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. Wallingford: CABI Publishing. 368 p.
- Bayer, C., and Kubitzki, K. 2003. Malvaceae. In K. Kubitzki (Ed.). The families and genera of vascular plants. Dicotyledons: Malvales, Capparales and non-betalain Caryophyllales, Volumen 5. pp. 225–311). Berlin: Springer.
- Bolton, M.D. 2009. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 22:487–497.

- CENAGRO. 2013. Departamento de Río San Juan y sus municipios: uso de la tierra y el agua en el sector agropecuario. En: IV Censo Nacional Agropecuario. Managua, Nicaragua. Instituto Nacional de Información de Desarrollo (INIDE) y Ministerio Agropecuario y Forestal (MAGFOR).
- Cervantes-Martínez, C., Brown, J.S., Schnell, R.J. Phillips-Mora, W., Takrama, J.F., and Motamayor, J.C. 2006. Combining ability for disease resistance, yield, and horticultural traits of Cacao (*Theobroma cacao* L.) clones. *Journal of American Society of Horticultural Sciences* 131:231-241.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Krauss, U., and Soberanis, W. 2001. Rehabilitation of diseased cacao fields in Peru through shade regulation and timing of biocontrol measures. *Agroforestry Systems* 53:179-184.
- Lanaud, C., Fouet, O., Clément, D., Boccara, M., Risterucci, A. M., Surujdeo-Maharaj, S., Legavre, T., and Argout, X. 2009. A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Molecular Breeding* 24:361–374.
- López, G. M. A., and Enríquez, V. O. 1980. Presencia de *Monilia roreri* Cif. et Par., en el cacao, *Theobroma cacao* L. en la frontera de Costa Rica, Nicaragua. Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Managua, Nicaragua.
- Marín-Argüello, I., y Negaresh, S. 2009. Presencia de genes (wrky) asociados a la respuesta al estrés biótico en cacao de Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana* 20:41-46.
- Meinhardt, L.W., Lacerda Costa, G.G., 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., Jonathan Shao, J., Rachel L Melnick, R.L.,

- Pereira, G.A.G., and Bryan A 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* 15:1-25.
- Mejía Betancourt, F.A., y Alvarado Rodríguez, R.Y. 2016. Evaluación in vitro de hongos nativos antagonistas de *Moniliophthora roreri* [(Cif. & Par.) Evans et al.] en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Ingeniero Agronomo. Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. 72 p.
- Núñez-Farfán, J., Fornoni, J., Valverde, P.L. 2007. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 38:541–566.
- Phillips-Mora, W., Castillo, J., Krauss, U., Rodríguez, E., and Wilkinson, M. J. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao* L.) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al., representing four major genetic groupings of the pathogen in cacao. *Plant Pathology* 54:483-490.
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortíz, C.F., López, A.P., Hernández, J., Aime, M.C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology* 55:584.
- Phillips-Mora, W., and Wilkinson, M. J. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential of damage. *Phytopathology* 97:1644-1647.
- Phillips-Mora, W., Aime, M.C., and Wilkinson, M.J. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56:911-922.
- Phillips-Mora, W. 2010. The cacao breeding program at CATIE, Costa Rica. In: The 18th Plant and Animal Genome Conference, p. 115. San Diego, CA: Scherago Inc.

- Porras, V., Cruz, C. A., y Galindo, J. J. 1990. Manejo integrado de la mazorca negra y la moniliasis del cacao en el Trópico Húmedo Bajo de Costa Rica. *Turrialba* 40:238-245.
- Rivera, C., y Aragón, E. 2010. Identificación de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) resistentes a *Moniliophthora roreri* (CIF & PAR) (Evans et al) mediante marcadores tipo QTLs. INTA Nicaragua, Programa Nacional de Semilla y Agrobiotecnología. pp. 1-6.38 p
- Sánchez J.A., Brenes, O., Phillips-Mora, W., Enríquez, G. 1987. Metodología para la inoculación de mazorcas de cacao con el hongo *Moniliophthora roreri*. (Monilia) Proceedings of the Tenth International Cocoa Research Conference, 1988. Santo Domingo, Dominican Republic: Cocoa Producers' Alliance. pp. 467–472.
- Sánchez, J.A., González, L.C. 1989. Metodología para evaluar la susceptibilidad a moniliasis en cultivares de cacao (*Theobroma cacao*). *Turrialba* 39: 461-468.
- Schnell, R. J., Kuhn, D. N., Brown, J. S., Olano, C. T., Phillips-Mora, W., Amores, F. M., and Motamayor, J. C. 2007. Development of a marker assisted selection program for cacao. *Phytopathology* 97:1664-1669.
- Sterling, C.A., Hermida-Daza, M.A., Rodríguez-León, C.H., Salas-Tobón, Y. M., Nieto-Guzmán, M.N., Caicedo-Rodríguez, D.F. 2015. Reacción a *Moniliophthora roreri* en *Theobroma* spp., en Caquetá, Colombia. *Summa Phytopathologica* 41:183-190.
- Suárez, L. y Rangel, A. 2014. Aislado de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica, Santander, CO* 62:370-378.
- Townsend, G.R., and Heuberger, I.W. 1943. Methods for estimating losses caused by disease in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter* 27:340-343.

- Villamil, J., Viteri, S., y Villegas, W. 2015. Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par., en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, CO, 68:7441-7450.
- Villamil, J., Blanco, J., y Viteri, S. 2012. Evaluación in vitro de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, CO, 65:6305-6315.
- Zhang, D., and Motilal, L. 2016. Origin, dispersal, and current global distribution of cacao genetic diversity. In B.A. Bailey, L.W. Meinhardt (eds.), Cacao Diseases. Springer International Publishing Switzerland. Chapter 1, pp. 1-30.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Comunidades en los municipios de San Carlos y El Castillo, departamento de Río San Juan donde se recolectarán las muestras y se realizaron las inoculaciones artificiales con el hongo *M. roleri*.



Anexo 2. Ficha para la recolección de información de las fincas participantes en el estudio de identificación de fuentes de resistencia a moniliasis (*M. royeri*) en cacao.

1. INFORMACION GENERAL

FICHA No. _____

Nombre del productor _____

Ubicación geográfica (Coordenadas) _____

Comunidad _____ Municipio _____ Departamento _____

Constitución familiar (Niños entre 0 a 10 años) _____ (Jóvenes entre 11 a 18 años) _____
(Adultos entre 19 a 55 años) Adultos mayores _____

2. INFORMACION GENERAL DE LA FINCA

Nombre de la finca _____ Área (Manzanas) _____

Distribución de cultivos (Manzanas): Granos Básicos _____ Ganadería _____

Cacao _____ Forestales _____ Otros _____

3. INFORMACION BASICA DE LA PLANTACION DE CACAO

Edad _____ Densidad poblacional _____ Arreglo de siembra _____

Ubicación _____

Origen _____ Procedencia _____ Tipo SAF en que se encuentra _____

Especies dentro del sistema

4. INFORMACION ESPECÍFICA DE LA PLANTACION

Presencia de enfermedades: Si _____ No _____ Cuales _____

Nivel de incidencia en el momento _____

Fecha de la observación: _____

Existen individuos que no presentan mucha incidencia _____

Nivel de sombra _____

Humedad relativa _____

Temperatura _____

5. INFORMACION BASICA DE INDIVIDUOS SELECCIONADOS

Ubicación (Coordenadas) _____

Marcaje con cinta: Azul _____ Amarilla _____ Roja _____

Cuanta con frutos (Cantidad) _____

Frutos enfermos en el entorno Si _____ No _____ a que distancia _____ Orientación del viento _____ Arquitectura _____ Porte _____

Nivel de follaje _____ ha sido sometido a manejo Cual _____

6. CARACTERISTICAS GENERALES DE FRUTO

Tipo de fruto (Forma) _____ Color de fruto _____

Ápice de fruto _____ Constricción basal _____ Rugosidad _____

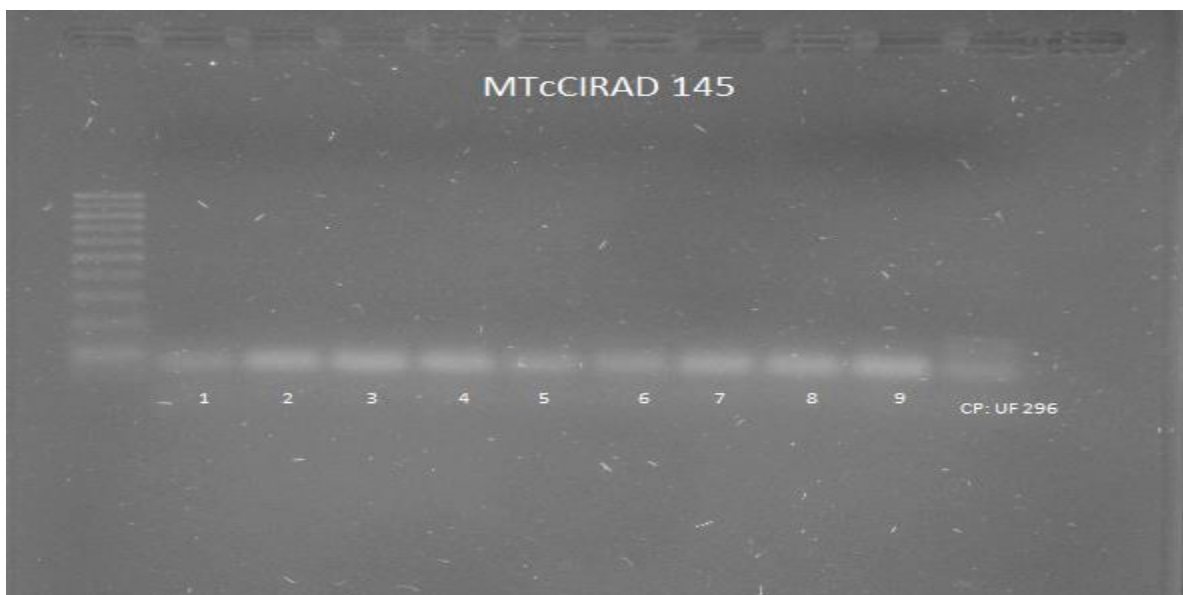
Cantidad de semilla _____ Color de semilla _____

Peso de semilla _____

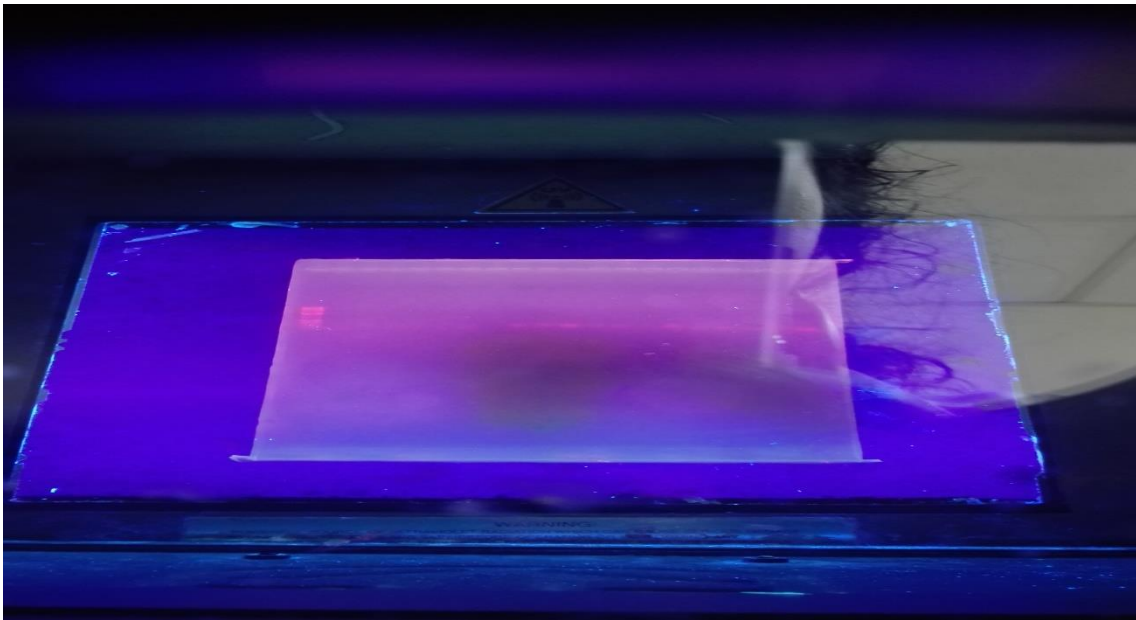
Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñida con bromuro de etidio de producto PCR de 72 accesiones de cacao, utilizando marcadores moleculares tipos QTLs.



Anexo 4. Electroforesis de 9 de 72 accesiones de cacao y control positivo (UF 296) marcador MTcCIRAD 145.



Anexo 5. Vista de gel de garosa con luz ultravioleta.



Anexo 6. Preparación de carcasas para iniciar barrido de producto PCR, proceso de electroforesis.



Anexo 7. Características distintivas como tipo de esporulación, borde de la colonia, tipo de micelio (textura), presencia de sectores y color de la colonia del hongo *Moniliophthora roreri* (Phillips et al., 2006).

Parámetro	Categoría
Tipo de esporulación	Uniforme
	Anillos en toda la colonia
	Uniforme con anillos terminales
	Uniforme con anillos centrales
Borde de la colonia	Disperso
	Entero
	Ondulado
Textura de la colon	Plumoso
	Afelpada
	Polvosa
	Estriada
	Algodonosa
Sectores	Aterciopelada
	Presencia
Color	Ausencia
	Café claro
	Café claro-blanco
	Café oscuro- café claro-blanco
	Crema-café oscuro-café claro-blanco
	Café oscuro-blanco
Café oscuro-crema-blanco	
	Crema-café claro-blanco