

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES



TESIS

DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, COLECTADOS EN ZONAS PRODUCTORAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DEL NORTE Y SUR DE GUATEMALA, C.A.

DANILO FERNANDO VILLANUEVA OSORIO

GUATEMALA, MARZO DE 2022

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES

TESIS

“DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans,
Stalpers, Samson & Benny, COLECTADOS EN ZONAS PRODUCTORAS DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.) DEL NORTE Y SUR DE GUATEMALA, C.A.”

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

DANILO FERNANDO VILLANUEVA OSORIO

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, MARZO DE 2022

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



RECTOR EN FUNCIONES
M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
VOCAL I	Dr. Marvin Roberto Salguero Barahona
VOCAL II	Dra. Gricelda Lily Gutiérrez Álvarez
VOCAL III	Ing. Agr. M.A. Jorge Mario Cabrera Madrid
VOCAL IV	Br. Carmen Aracely García Pirique
VOCAL V	Pr. Agr. Mynor Fernando Almengor Orenos
SECRETARIO	Ing. Agr. Walter Aroldo Reyes Sanabria

GUATEMALA, MARZO DE 2022

Guatemala, marzo de 2022

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Distinguidos miembros:

De acuerdo con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración, el documento de graduación titulado:

“DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, COLECTADOS EN ZONAS PRODUCTORAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DEL NORTE Y SUR DE GUATEMALA, C.A.”

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el presente documento llene los requisitos necesarios para su aprobación agradeciendo la atención prestada a la presente.

Atentamente

“Id y enseñad a todos”



DANILO FERNANDO VILLANUEVA OSORIO

ACTO QUE DEDICO

A

- DIOS:** Por darme sabiduría e inteligencia para alcanzar esta meta
- MIS PADRES:** Glendy Osorio y Edwin Villanueva, por ser un ejemplo de esfuerzo, responsabilidad y dedicación. Y por darme apoyo incondicional toda mi vida.
- MIS HERMANOS:** Edwin Vicente Villanueva y Gabriela Villanueva, por motivarme a seguir adelante y los buenos momentos compartidos.
- MI FAMILIA:** Por sus consejos, amor, muestras de cariño y consejos durante mi vida y por siempre desearme lo mejor en vida personal y profesional.
- MIS AMIGOS:** Por todo su apoyo y los buenos tiempos juntos, principalmente a Eduardo Rodríguez, Eswin Zamora, Francisco Salvador, Kilder Tut, Josué Monroy, Juan Pablo Figueroa, Omar Moreno, Cristian Tepeu.

TESIS QUE DEDICO
A

GUATEMALA: Por ser el país que me vio nacer, orgulloso de ser guatemalteco y poder haberme formado en tan grandioso país.

USAC: Mi alma mater, orgulloso de formar parte de tan grandiosa casa de estudios.

FAUSAC: Por formarme como profesional en el ámbito agrícola y ambiental, brindarme la oportunidad de conocer grandes amistades y ser instruido por catedráticos con excelencia académica.

AGRADECIMIENTOS

A

- DIOS:** Por darme sabiduría e inteligencia para alcanzar esta meta y ser mi refugio.
- MIS CATEDRÁTICOS:** Gracias por haber compartido sus conocimientos adquiridos a lo largo de su vida profesional.
- MI SUPERVISORA:** Ing. Leea Blas, por su apoyo durante la realización de mi respectivo EPS.
- MI ASESOR:** Ing. Agr. Luis Montes, por el aporte, conocimiento, amistad y confianza brindada para la realización de este documento.
- BAYER S.A.:** Por darme la oportunidad de realizar mi EPS en tan prestigiosa empresa y en especial a la Inga. Brenda García por su apoyo brindado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	3
2.1 Marco conceptual.....	3
2.1.1 Generalidades del cacao.....	3
2.1.2 Generalidades de la moniliasis.....	6
2.1.3 Marcadores moleculares	12
2.1.4 Extracción de ADN	15
2.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
2.1.6 Electroforesis.....	15
2.1.7 Región ITS	16
2.1.8 Estimadores de la diversidad genética.....	16
2.2 Marco referencial.....	19
2.2.1 Localización de las muestras	19
2.2.2 Descripción de las áreas de estudio.....	21
2.2.3 Localización de la investigación	24
2.2.4 Estudios de diversidad genética de <i>M. royeri</i> (Cif.) H.C. Evans et al.	24
2.2.5 Estudios de diversidad genética de fitopatógenos en Guatemala	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo general.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 HIPÓTESIS.....	29
5 METODOLOGÍA.....	30
5.1 Identificación de la similitud genética entre aislados de <i>M. royeri</i> (Cif.) H.C. Evans et al.....	30
5.1.1 Recolección de muestras	30
5.1.2 Aislamiento y purificación	32
5.1.3 Confirmación de <i>M. royeri</i> (Cif.) H.C. Evans et al.	33

	PÁGINA
5.1.4 Protocolo AFLP	34
5.1.5. Análisis de similitud	35
5.2. Determinación la diversidad genética entre poblaciones de <i>M. roreri</i> (Cif.) H.C. Evans et al. recolectadas de zonas productoras de cacao	36
5.3. Determinación de la variación molecular entre regiones, poblaciones e individuos de <i>M. roreri</i> (Cif.) H.C. Evans et al	36
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. Identificación de la similitud genética entre aislados de <i>M. roreri</i> (Cif.) H.C. Evans et al	37
6.2. Determinación de la diversidad genética entre poblaciones de <i>M. roreri</i> (Cif.) H.C. Evans et al	42
6.3. Determinación de la variación molecular entre regiones, poblaciones e individuos de <i>M. roreri</i> (Cif.) H.C. Evans et al	45
7 CONCLUSIONES	48
8 RECOMENDACIONES	49
9 BIBLIOGRAFÍA	50
10 ANEXOS	57

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del cacao.	4
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Moniliophthora</i>	7
Cuadro 3. Descripción biofísica de las diferentes áreas de estudio del área sur.	21
Cuadro 4. Descripción de las muestras del área norte.	21
Cuadro 5. Descripción biofísica de las áreas de estudio de la región sur.	22
Cuadro 6. Descripción biofísica de las áreas de estudio de la región norte.	23
Cuadro 7. Estudios de diversidad genética de <i>M. roreri</i> (Cif.) H.C. Evans et al.	27
Cuadro 8. Ciclo de PCR utilizado durante el protocolo del marcador AFLP.	35
Cuadro 9. Parámetros de la variación genética de las poblaciones.	42
Cuadro 10. Resumen del análisis de la varianza molecular.	46
Cuadro 11A. Características físicas para las diferentes series de suelos.	60
Cuadro 12A. Distribución de muestras por localidad.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Mapa de localización de para las áreas de estudio.	20
Figura 2. Mapa de poblaciones de <i>M. royeri</i> (Cif.) H.C. Evans et al.	31
Figura 3. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular AFLP.....	38
Figura 4. Análisis de coordenadas principales.....	39
Figura 5A. Mapa de departamentos productores de cacao.	57
Figura 6A. Producción promedio de cacao por país para el periodo 2008-2018.	58
Figura 7A. Ciclo de la enfermedad causada por <i>M. royeri</i> (Cif.) H.C. Evans et al.	58
Figura 8A. Síntomas de la enfermedad moniliasis.....	59
Figura 9A. Proceso de los marcadores tipo AFLP.	59
Figura 10A. Planta de cacao con frutos presentando moniliasis.....	61
Figura 11A. Colecta de material utilizado (frutos de cacao).....	65

DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny COLECTADOS EN ZONAS PRODUCTORAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DEL NORTE Y SUR DE GUATEMALA, C.A.

GENETIC DIVERSITY OF *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny ISOLATES COLLECTED FROM CACAO (*Theobroma cacao* L.) PRODUCING AREAS OF NORTH AND SOUTHERN GUATEMALA, C.A.

RESUMEN

La moniliasis es una enfermedad que afecta a las plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Guatemala, esta enfermedad es causada por el patógeno *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny.

Esta enfermedad es una de las enfermedades que más daño causan en América Latina, causando pérdidas comerciales mayores al 90 % en producciones de cacao de diversos países como Perú, Colombia y Ecuador, siendo estos algunos de los principales países productores de cacao en América (Phillips-Mora *et al.* 2007). La dispersión de este patógeno en Guatemala es relativamente reciente, ya que fue reportado por primera vez en el año 2002, siendo su dispersión principalmente de forma clonal.

Esta enfermedad no ha sido estudiada en Guatemala a nivel de diversidad, por lo cual se desconoce la evolución biológica del patógeno. Por lo tanto, para definir la diversidad de este patógeno se utilizó el marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP), y se analizaron 69 aislados de *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans *et al.*, provenientes de las zonas productoras de cacao del sur (San Miguel Panán, El Tumbador) y norte (San Agustín Lanquín, Santa María Cahabón y Puerto Barrios), para definir la diversidad genética de las poblaciones de este patógeno.

A través de un análisis de agrupaciones unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) y el análisis de coordenadas principales, agrupo tres grupos con aislados de las diferentes regiones con una similitud de 0.80. Se determinó a partir del índice Shannon de 0.05, índice de Nei de 0.02, la proporción genética general de 0.12 y una proporción de loci polimórfico de 12.28 %, un nivel bajo de diversidad genética. El análisis molecular de varianza mostro una diferencia entre regiones del 3 %, entre poblaciones del 6 % y dentro de las poblaciones de un 91 %, estos valores confirmaron una baja variabilidad genética asociada al reciente ingreso del patógeno al país, dispersión clonal y la transmisión de semilla entre productores de cacao dentro del país.

Logrando beneficiar a 25 asociaciones productoras de cacao reportadas dentro del país, con un total de 2,942 familias socias y aumentando a su vez el área de producción de este cultivo que actualmente es de 4,334 ha (Agrocadena de Cacao de Guatemala 2016).

La investigación fue realizada en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala durante los meses de noviembre 2020 a marzo del 2021 y es una contribución para la determinación de la variabilidad genética de poblaciones de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al de regiones productoras de cacao de Guatemala, A su vez es parte del proyecto de investigación “Resistencia de genotipos comerciales y criollos de cacao ante *Moniliophthora royeri* y sensibilidad de este hongo a fungicidas”, promovida por la Dirección General de Investigación (DIGI), de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

1 INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie cultivada dentro Guatemala debido a que es una fuente primaria para elaboración de chocolate. Según Say et al. (2013) la generación y distribución de ingresos percibidos en el sector cacao por concepto de empleo, se aproxima a los Q. 9,340,000 anuales, de ellos alrededor del 45.36 % son distribuidos en el área rural.

Para el año 2018, se estimaron 4,334 ha sembradas de cacao en Guatemala, con una producción promedio de 2,778.26 kg/ha (FAO 2020). Esta producción se encuentra distribuida en dos regiones geográficas: dentro de la región sur los departamentos de Suchitepéquez y San Marcos poseen un 31 % y 25 % de la producción nacional y en la región norte el departamento de Alta Verapaz posee un 31 % de la producción nacional (MAGA 2017).

Esta producción se ve gravemente afectada por la moniliasis, enfermedad causada por el basidiomiceto *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny. Pese a que en la década de 1950 se limitaba a Colombia, Ecuador y Venezuela, se ha dispersado en otros países de Sudamérica y América Central, llegando a Guatemala en el año 2002 (Phillips y Cerda 2013).

Esta enfermedad ha causado pérdidas mayores al 90 % de la producción total en países como Colombia. Y en Guatemala, en la región sur, existen reportes de pérdidas en producción, estas alcanzan hasta un 85 % de la producción para dicha región (Reyes 2012).

El conocer la variabilidad genética de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans en Guatemala permite identificar si existen nuevos grupos con resistencia a la aplicación de fungicidas y a las condiciones ambientales diversas. A su vez también es importante conocer la variabilidad del patógeno para realizar evaluaciones de materiales de cacao que presentan resistencia genética ante el ataque de dicho patógeno.

Por lo que a través del presente estudio se buscó determinar la diversidad genética de las poblaciones de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al., presentes en las localidades de San Miguel Panán, El Tumbador, Cahabón, Lanquín y Puerto Barrios pertenecientes a las cuatro principales regiones productoras del país (Suchitepéquez, San Marcos, Alta Verapaz e Izabal) a través del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP), el cual es uno de los marcadores más eficientes para los estudios de diversidad genética.

Encontrándose una alta similitud entre los aislados con un coeficiente “Dice” de 0.80 agrupando los aislados en tres grupos. Se determinó a partir del índice Shannon de 0.05, un índice de Nei de 0.02, la diversidad genética general de 0.12 y una proporción de loci polimórfico baja de 12.28 %, índices los cuales aseguraron un nivel bajo de diversidad genética. En cuanto a la estructura genética, el análisis molecular de varianza indicó una varianza solo entre poblaciones asociada al reciente ingreso del patógeno del país y a su distribución clonal.

Dicha investigación se realizó en búsqueda de la mejora de estrategias de control para la enfermedad con lo que se logra a la producción cacaotera del país, beneficiando a 25 asociaciones productoras de cacao reportadas dentro del país, con un total de 2,942 familias socias (Agrocadena de Cacao de Guatemala 2016).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Marco conceptual

2.1.1 Generalidades del cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta perteneciente a la familia Malvaceae, de la cual se extrae el grano de cacao como comercialmente se le conoce, esta planta sitúa su origen en la Amazonia, extendiéndose gracias al intercambio comercial entre nativos hasta el sur de México, encontrándose en toda la región tropical y subtropical (MAGA 2014).

Esta es aparentemente silvestre en el sur de México, Guatemala, Belice y en la cuenca amazónica, así mismo actualmente se disponen de variedades, híbridos y clones los cuales siembran a nivel mundial (Arvelo et al. 2016).

2.1.2 Descripción morfológica

Árboles o arbustos de 2 m - 10 m de alto. Hojas ovalado-lanceoladas u ovado-lanceoladas, 18 cm - 34 cm de longitud y 5 cm - 11 cm de ancho, ápice agudo, base asimétrica, glabras o subglabras, tricomas sobre los nervios principales. Inflorescencias sobre prominencias del tronco; lámina de los pétalos obovada-lanceolada: 10 estambres, en cinco haces, dos anteríferos; estaminodios largamente subulados, de la misma longitud que los pétalos. Fruto tipo baya, (WFO 2020).

2.1.3 Taxonomía

Las plantas de cacao pertenecen a la familia Malvaceae la cual agrupa al género *Theobroma* en la cual se encuentra agrupada la especie (cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del cacao.

Clasificación taxonómica	
Reino	Vegetal
División	Magnoliopsida
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Genero	Theobroma
Especie	<i>Theobroma cacao</i> L.

Fuente: elaborado con base en WFO, 2020.

2.1.4 Requerimientos edafoclimáticos

El desarrollo óptimo del cultivo se consigue entre los 400 m s.n.m. - 1,000 m s.n.m. a temperaturas entre 20 °C - 30 °C. La precipitación óptima para el cacao es de 1,600 mm - 2,500 mm. Otro factor importante para su desarrollo es el tipo de suelo, los aluviales, los francos profundos con subsuelo permeable son los mejores para el cultivo, siendo los suelos arenosos poco recomendables porque no permiten la retención de humedad (Arvelo *et al.* 2017).

2.1.5 Resistencia enfermedades

Existen diversos clones con resistencia a la moniliasis, CAUCASIA-34, -37, -39, -43, IMC-67 y EET, a su vez el programa de mejoramiento genético de cacao del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) ha desarrollado algunos clones los cuales

proviene de Costa Rica (UF-273, UF-712), Ecuador (EET-75), Perú (PA-169) y Trinidad y Tobago (ICS-95) (Phillips y Cerda 2013).

2.1.6 Cultivo de cacao en Guatemala

En Guatemala la producción de cacao se desarrolla en 2 zonas muy específicas, el norte y sur del país. Según FAO (2020) se estimó que para el año 2018 la producción de cacao equivalía a 12,041 T, registrándose en 4,334 ha sembradas del cultivo, registrando un rendimiento de 2,778.26 kg/ha.

2.1.7 Producción nacional

La producción nacional se encuentra distribuida según MAGA (2017) de la siguiente forma: Alta Verapaz (31 %), Suchitepéquez (31 %) y el resto del país suma el 13 % faltante, según el mapa de distribución de cacao a nivel nacional (figura 5A). En cuanto al precio del cacao, se tiene registros que durante los años del 2008 al 2016 el precio de la tonelada de cacao se ha mantenido entre \$ 2,195 y \$ 3,144 (MAGA 2014).

2.1.8 Exportaciones e importaciones del cacao

Según el periodo de 2010 a 2018 se ha importado el equivalente a \$ 6,755,39 de cacao (BANGUAT 2020b), exportando solamente \$ 3,371,547 (BANGUAT 2020a). Según estos valores el producto presenta una demanda insatisfecha dentro del país.

2.1.9 Producción internacional

La producción mundial de cacao supera las 4,000,000 T de granos, producción obtenida en 5 países (Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria y Camerún) donde se concentra el 84 % de la producción mundial, según las producciones promedio de los países con mayor producción a nivel mundial (figura 6A).

2.1.10 Impacto del cacao en Guatemala

La distribución del cacao desde la producción agrícola hasta el consumidor final toma en cuenta muchos factores tanto de materia prima como de servicios pasando por importadores, distribuidores mayoristas y los minoristas que ponen el producto en las manos de los consumidores.

Considerando el área que actualmente es dedicada a la producción, según MARN (2016) se estima una generación de empleo de 75,438 jornales anuales, equivalentes a 328 empleos formales. La generación y distribución de ingresos pertenecientes al sector cacao por concepto de empleo, se aproxima a los Q. 9,340,000 anuales, de ellos alrededor del 45.36 % son distribuidos en el área rural.

En la región de la franja Transversal del Norte existen recursos hídricos importantes como lo son el río Chixoy, laguna de Lachuá, río Cahabón, río Polochic y lago de Izabal, cuyas áreas de recarga pueden ser protegidas por cultivos agroforestales como el cacao (MARN 2016).

2.1.11 Generalidades de la moniliasis

La enfermedad es conocida como moniliasis o pudrición helada de la vaina, la cual ocurre en las principales áreas productoras de cacao del hemisferio occidental.

Es causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, fitopatógeno ubicado dentro del phylum Basidiomycota (cuadro 2) (Fungorum Species 2020).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Moniliophthora*.

Clasificación taxonómica	
Reino	Fungi
Phyllum	Basidiomycota
Clase	Agarycomycetes
Subclase	Agarycomycetidae
Orden	Agaricales
Familia	Marasmiaceae
Genero	Moniliophthora
Especie	<i>Moniliophthora roreri</i> (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny.

Fuente: elaborado con base en Species Fungorum 2020.

Este es un hongo altamente especializado el cual ataca solo a los frutos de las especies de los géneros *Herrania* y *Theobroma*, causando daño externo e interno provocando la pérdida total del fruto (Jaimes *et al.* 2016).

A. Morfología

Posee micelio septado con doliporos. Las esporas se producen en cadenas con maduración basipétala y se desprenden fácilmente del micelio, su pared es gruesa y con coloración amarilla o café cuando forman masas de esporas.

Las esporas principalmente globosas y elipsoides poseen un diámetro promedio de 9 μm y de 8.6 μm x 11.8 μm respectivamente (Phillips-Mora *et al.* 2006).

B. Dispersión

La distribución de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.* está actualmente restringida a América, donde este ha sido sucesivamente reportado en 11 países sobre un periodo de casi 200 años, comenzando en Colombia en 1817, Ecuador en 1917, Venezuela en 1941, Perú en 1950, Belice en el 2004, y México en el 2005. A su vez fue reportada en Guatemala en el 2002 (Phillips-Mora *et al.* 2007).

C. Reproducción

Aunque se cree que *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.* es un hongo anamórfico, Evans *et al.* (2002) informan que puede haber un mecanismo citológico que permite que el hongo se reproduzca sexualmente.

Se ha documentado la aparición de lo que parecía ser meiosis durante la esporogénesis y germinación de los conidios del hongo. Además, la hibridación entre *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.* y el biotipo L de la especie estrechamente relacionada *M. perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora también puede ser posible (Phillips-Mora *et al.* 2007).

D. Hospedantes

Este patógeno tiene como hospederos únicamente a los frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) y de parientes cercanos como el pataste (*T. bicolor* Humb. & Bonpl.) y el cupuacu (*T. grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.) y otras especies del género *Herrania* (Sánchez y Garcés 2012).

E. Condiciones favorables para el patógeno

Este hongo presenta una esporulación influenciada por la humedad y temperatura. La germinación de las conidias es favorecida sobre temperaturas medias de 22 °C y humedad relativa superior al 71 % (Leandro-Muñoz *et al.* 2017). Siendo las temperaturas constantes inferiores a 18 °C limitantes del crecimiento y la esporulación del patógeno.

F. Ciclo de la enfermedad

El hongo está presente durante todo el año como componente del aire en forma de spora con frecuencia más alta durante la temporada de lluvias después de la estación seca.

Las esporas sobreviven durante 9 meses bayas en la plantación, pero aproximadamente 1 mes en las bayas cosechadas dejadas en el suelo, estas esporas germinadas penetran en las bayas a través de la cutícula o las estomas y colonizan tejidos intercelularmente. Se conoce que la densidad de esporulación es de 44,000,000 esporas/cm² y una baya madura puede llegar a producir hasta 7×10^9 esporas (Bailey *et al.* 2018).

Las esporas germinadas penetran a través de la cutícula y las estomas, colonizando los tejidos intercelularmente. El micelio es monocariótico con forma voluminosa y septado. Este patógeno causa mayor efecto cuando las bayas de la planta tienen menos de 1 mes de maduración expresándose los síntomas con mayor daño. Este patógeno es considerado hemibiotrófico es decir que tiene una fase biotrófica y una fase necrotrófica.

La fase biotrófica dura 45 días a 90 días, después el hongo cambia a fase necrotrófica (figura 7A), durante la primera fase abarca desde que las esporas infectan las bayas inmaduras, creciendo y alimentando del huésped vivo sin activar los mecanismos de defensa del hospedero, hasta que los frutos desarrollan malformaciones, la segunda fase denominada necrotrófica empieza con la formación de una pared delgada intracelular de micelio que provoca la muerte del tejido en unos días.

Las expansiones de las lesiones de color marrón se fusionan, cubriendo típicamente toda la superficie de la baya, seguida por el pseudoestroma blanco y esporulación (Bailey *et al.* 2018). Estas células del micelio necrotrófico son uninucleadas y son consideradas haploides a pesar de que las esporas fueron inicialmente consideradas conidias producidas asexualmente, posteriormente encontraron evidencia de una meiosis modificada.

G. Síntomas y signos

Al poseer la fase biotrófica y necrotrófica produce una severa hipertrofia e hiperplasia en los tejidos del huésped. Los principales síntomas los cuales se encuentran relacionados a la presencia de deformaciones en el fruto, maduración prematura, manchas irregulares de color café, micelio en manchas color café, y la modificación del fruto como tal (figura 8A). El principal signo de *M. roleri* (Cif.) H.C. Evans *et al.*, es la presencia de pseudostroma con coloración blanca sobre el fruto del cual se esparcen millones de esporas.

H. Control de la enfermedad

Entre las prácticas culturales recomendadas se encuentra: realización de podas de rehabilitación, al final de la época de cosecha, regulación de sombra, regulando un nivel de 30 % a 50 %, mediante podas, raleos, realizar podas de mantenimiento, manejo de drenaje, eliminación de malezas, cosecha de frutos con cuchilla o tijera desinfectada, eliminación de todas las los frutos enfermos y sanos al final de la cosecha esto con el fin de eliminar posibles dispersiones del hongo (Phillips y Cerda 2013).

El control químico se realiza a partir de la utilización de productos con base de cobre (Phillips y Cerda 2013). Se destaca que las estrategias más utilizadas para el control de estas enfermedades son la utilización de material con resistencia genética, el empleo de fungicidas a base de cobre y los controladores biológicos de los géneros *Trichoderma* y *Bacillus* (Tirado *et al.* 2016).

M. roreri (Cif.) H.C. Evans et al. tiene una larga cantidad de efectores, que actúan para contrarrestar el sistema inmune de la planta, generalmente son proteínas altas en cisteína, que se dirigen hacia el apoplasto o núcleo de la célula (Marelli *et al.* 2019). En diferentes estudios Bailey *et al.* (2014) encontró que *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al. ataca e infecta con éxito clones de cacao tolerantes en el campo por lo cual el control genético no reducido por completo la dispersión de este patógeno.

I. Daños

Los brotes de enfermedades graves han provocado el abandono del cacao cultivo en extensas áreas de Perú, Costa Rica, Colombia y México. Se ha informado que esta enfermedad es 2 veces más destructiva que la podredumbre de la mazorca negra causada por *Phytophthora* y más peligroso y difícil de controlar la enfermedad de escoba de bruja causada por *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (Phillips-Mora *et al.* 2006).

Las enfermedades del tipo biótico son las que causan un mayor impacto en la producción de cacao en Latinoamérica y el mundo. Esta enfermedad puede causar pérdidas de hasta 90 % en producciones de cacao (Sánchez *et al.* 2015) siendo factor importante de la pérdida de área para producción de esta planta esto debido al abandono ocasionado por el poco control hacia la enfermedad.

El primer brote bien documentado ocurrió a principios del siglo 20, cuando invadió las áreas productoras de cacao de Ecuador causando devastadoras pérdidas de rendimiento. La exportación de cacao de Ecuador cayó de 46,000 T a unas 20,000 T durante el periodo 1917 a 1925 (Phillips-Mora *et al.* 2007).

Las pérdidas informadas en 2001 fueron de 30 % de la producción mundial, con un costo de \$ 51,000,000, así mismo en el año 2013 existió una pérdida más de 50,000 T por la acción de este hongo (Perez 2018). En Ecuador, después de la aparición de la moniliasis,

la producción declinó de 50,000 T a 30,000 T. En Costa Rica, declino de 12,000 T a 708 T durante el periodo 1962 a 2001.

M. royeri (Cif.) H.C. Evans et al. tiene una larga cantidad de efectores, que actúan para contrarrestar el sistema inmune de la planta, generalmente son proteínas altas en cisteína, que se dirigen hacia el apoplasto o núcleo de la célula (Marelli *et al.* 2019). En diferentes estudios Bailey *et al.* (2014) encontró que *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al. ataca e infecta con éxito clones de cacao tolerantes en el campo, siendo este factor importante para la dispersión del patógeno.

J. Diversidad genética

Se ha determinado que existen 5 agrupaciones principales que tienen una amplia distribución en Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Centroamérica (Gutarra *et al.* 2013). Todos los estudios relevantes que utilizan marcadores moleculares indican que el *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al. se propaga clonalmente, por lo cual no tiene tanta diversidad comparada con otros patógenos (Phillips-Mora *et al.* 2007).

2.1.12 Marcadores moleculares

Los estudios de variación genética entre individuos, poblaciones y especies sirven para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos, logrando esto a través del uso de marcadores moleculares (Cornejo *et al.* 2014). Un marcador molecular es un fragmento de ADN, que tiene una posición específica en el genoma de un organismo. Estos fragmentos pueden localizarse cerca de un gen encargado de codificar un carácter de interés o en regiones que no son codificantes (Schlötterer 2004).

A. Marcadores de tipo postranscripción-traducción

Los marcadores del tipo postranscripción-traducción, llamados también bioquímicos como las isoenzimas. Estas son formas alternativas de una enzima, caracterizadas para revelar polimorfismo a nivel de secuencia genética, diferencian homocigotos y heterocigotos, pero son afectados por modificaciones en los procesos de transcripción de las proteínas (Schlötterer 2004).

B. Marcadores de tipo pretranscripción-traducción

Son aquellos capaces de detectar el polimorfismo genético directamente a nivel de ácido desoxirribonucleico (ADN). Según Schlötterer (2004), en este grupo se encuentran los restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), entre otros, funcionando para identificar y mapear genes útiles.

a. AFLP

Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), son un grupo de marcadores de locus múltiple, permiten analizar al azar regiones de ADN, distribuidas en el genoma sin necesidad de tener conocimiento previo de las secuencias genómicas (Gril *et al.* 2008).

Al usar técnica tiene que existir una digestión completa del ADN genómico, esto se realiza con enzimas de restricción, a lo cual le sigue una amplificación selectiva con el fin de obtener polimorfismos, los cuales son derivados de mutaciones en la secuencia de ADN o cerca de los sitios de restricción (figura 10A) donde se observa cómo se logra la amplificación. El polimorfismo es detectado a partir de la realización de una electroforesis, ya que el patrón de bandas nos indicara los fragmentos amplificando y su tamaño (Schnell *et al.* 2007).

Las amplificaciones AFLP repetidas se muestran casi perfectas por lo que su replicabilidad y sus errores son menores al 2 %. Este marcador requiere una cantidad mínima de ADN y parcialmente se pueden utilizar muestras degradadas. Por lo que permite analizar muestras a gran velocidad (Gril *et al.* 2008).

b. RFLPs

Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), detectan polimorfismos producidos al digerir ADN con enzimas de restricción. Si 2 alelos A y B se diferencian a nivel de secuencia de ADN, la digestión con dichas enzimas producirá fragmentos de ADN de diferente tamaño y pueden ser detectados con sondas específicas que hibriden con una parte de estos fragmentos de ADN. Siendo este polimorfismo manifestado por la longitud de los fragmentos detectados (Michelmore 1987).

c. RAPDs

El ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), es una técnica la cual se obtienen por medio de la amplificación del ADN genómico, por la técnica de polimerasa chain reaction (PCR).

Esta técnica permite amplificar de manera aleatoria el genoma del individuo en las regiones que se alinean los cebadores con el ADN molde en ambas cadenas y en direcciones opuestas. Por lo general se encuentran varios lugares de amplificación en el genoma, ya que el cebador es corto y la temperatura de hibridación es menor a 35 °C (Gutarra *et al.* 2013).

2.1.13 Extracción de ADN

La aplicación de técnicas moleculares inicia con una extracción de ADN, para que esta pueda ser confiable es necesario extraer el ADN lo más íntegro y puro. Esta extracción se realiza para lograr el aislamiento y purificación del ADN basándose en características fisicoquímicas de la molécula (Cornejo *et al.* 2014).

2.1.14 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se basa en la replicación celular, donde intervienen diversas proteínas para sintetizar nuevas hebras de ADN a partir de una hebra molde. Estas nuevas cadenas son creadas a partir de la una mezcla del ADN que contiene el fragmento que se van a amplificar; la polimerasa; los cebadores (fragmento de ADN de 15 nucleótidos - 30 nucleótidos), desoxinucleótidos (dNTPs), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), agua y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para la síntesis (Espinosa 2007).

Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas denominado ciclo de PCR. Un ciclo de amplificación consta de 3 etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. Cada una de las etapas está determinada por una temperatura. Un proceso de 30 ciclos permite amplificar 1,073,741,824 copias de ADN a partir de una sola molécula (Cornejo *et al.* 2014).

2.1.15 Electroforesis

La electroforesis es realizada en gel de agarosa o poliacrilamida. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ácido ribonucleico (ARN) en base a su tamaño y lograr visualizarlo mediante una tinción, de esta forma determinar la concentración de ADN de una muestra. Además, es posible extraer del gel fragmentos que sean de interés para utilizarlos en diferentes aplicaciones (Schlötterer 2004).

2.1.16 Región ITS

La región denominada internal transcribed space (ITS) es un área particularmente útil para los estudios de caracterización molecular en hongos, debido a que las regiones son cortas (500 pb - 800 pb) y estas pueden amplificarse fácilmente mediante PCR. La región ITS puede ser muy variable entre especies morfológicamente distintas por lo que se puede usar para estimar distancias genéticas y proporcionar caracteres para análisis sistemático y filogenético (Suarez 2017).

2.1.17 Estimadores de la diversidad genética

La diversidad genética puede ser determinada a partir de diferentes índices que son generados a partir de matrices binarias.

A. Coeficiente Dice

Es un estadístico utilizado para comparar la similitud de 2 muestras, su valor se encuentra entre 0 y 1, donde 1 indica la mayor similitud entre muestras. Se define como:

$$S = 2C / (2A + B + C)$$

Dónde: A y B son el número de especies en las muestras A y B, respectivamente, y C es el número de especies compartidas por las 2 muestras.

Este índice es considerado el más adecuado para determinar similitud genética debido a una mayor eficiencia de proyección en un espacio bidimensional (Duarte *et al.* 1999).

B. Método de grupos de pares no ponderados con aritmética (UPGMA)

Este es un método para análisis filogenético el cual asume que las especies son grupos por sí mismas, luego relaciona los 2 grupos más cercanos basado en la matriz de distancias, recalcula la matriz de distancia y repite el proceso hasta que todas las especies estén conectadas a un único grupo (Dawyndt *et al.* 2006).

C. Análisis de coordenadas principales

El análisis de coordenadas principales es un análisis estadístico multivariante que se utiliza como un método de disminución de las dimensiones de los datos de un estudio.

En genética de poblaciones se utiliza para reducir el número de variables asignadas a cada población y/o especie de manera tal que, con la menor pérdida de información posible, puedan ajustarse los resultados a 2 o 3 dimensiones y lograr así representaciones gráficas para determinar las relaciones genéticas en el espacio de los individuos, las poblaciones y especies estudiadas (Correa Londoño *et al.* 2007).

D. Índice de Shannon

El índice de Shannon es uno de los más comúnmente usados en análisis de diversidad. Este índice de diversidad Shannon mide la probabilidad de seleccionar todas las especies en la proporción con que existen en la población. Se define como:

$$H = -\sum_{i=1}^s p_i \log p_i.$$

Dónde: S es igual al número de especies, i representa cada especie, Pi es la proporción de individuos de la especie. El índice aumenta si se incrementa el número de especies y los individuos se distribuyen homogéneamente (Pla 2006).

E. Diversidad genética media (H_e)

Expresa la heterocigosidad esperada para el locus medio si el apareamiento fuese al azar. Si se asume el equilibrio de Hardy Weimberg, la frecuencia del alelo recesivo puede ser estimada como la raíz cuadrada de la frecuencia de individuos en los que falta la banda (frecuencia de los genotipos homocigotos recesivos).

F. Índice de polimorfismo

Este índice muestra la relación del número de loci polimórficos a número de loci totales, expresado en porcentaje. Se define como:

$$P = \text{loci polimórfico} / \text{loci polimórficos totales} * 100.$$

Un locus se considera polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es igual o inferior a 0.99 (Gonzalez 2008).

G. Diversidad genética de Nei

Índice que sirve para medir la heterocigosidad esperada de una población, es la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población. Cuando las poblaciones están equilibrio Hardy-Weinberg, la heterocigosidad puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica. Se define como:

$$H = \sum 1 - x_i^2(n/n - 1).$$

Donde x es igual a la frecuencia relativa y n representa el número de tipos. Por lo tanto, la heterocigosidad esperada cuantifica la igualdad de las frecuencias alélicas en los loci (Gonzalez 2008).

H. Análisis molecular de varianza (AMOVA)

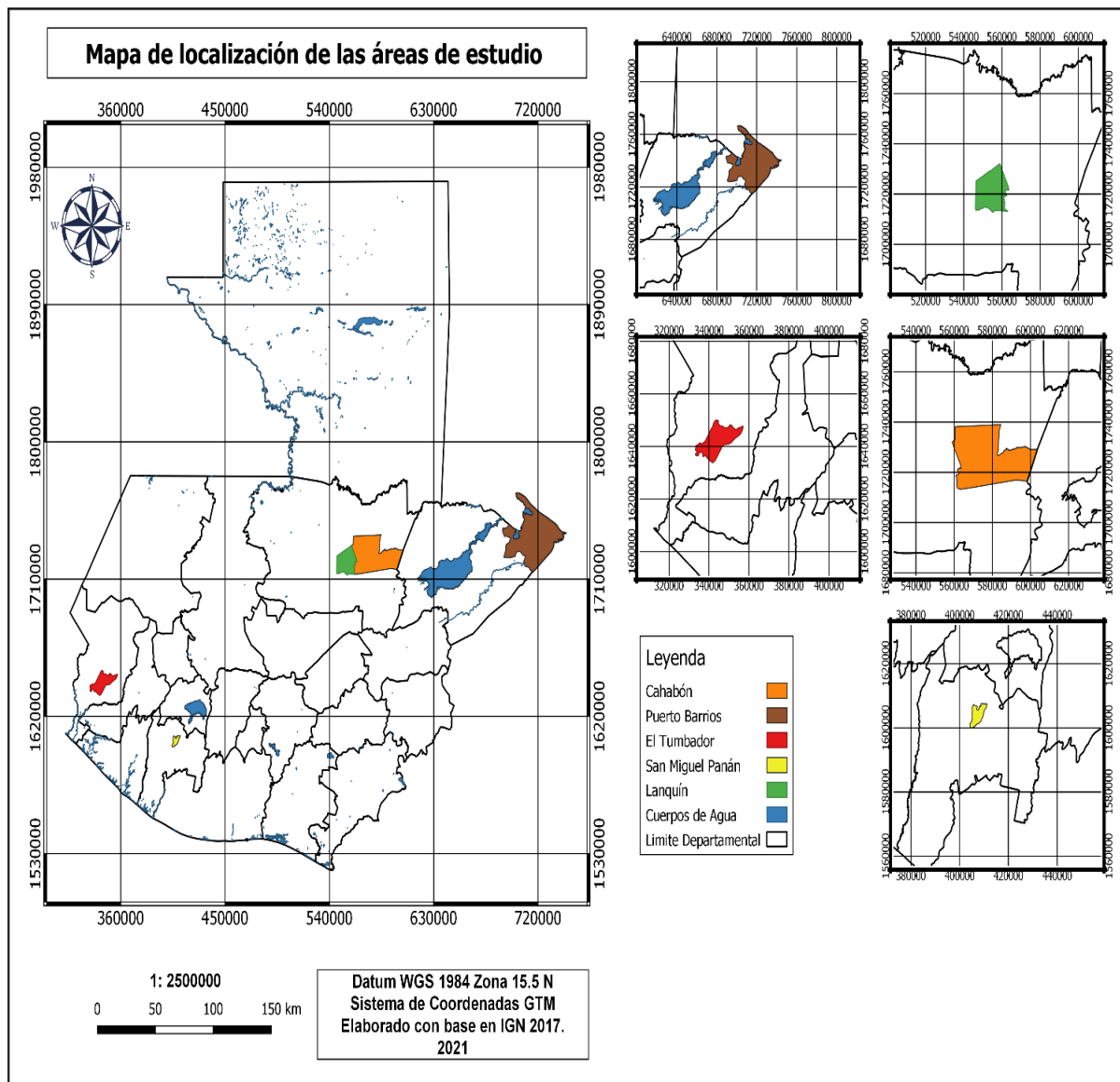
La estructura genética de una especie está relacionada con la distribución de la diversidad entre y dentro de las poblaciones. Su estudio se lleva a cabo normalmente mediante un análisis de varianza que permite comprobar las diferencias en una estructura genética jerárquica.

La varianza molecular total es la suma de los componentes de la covarianza debidos por ejemplo a las diferencias entre los individuos dentro de una población, a las diferencias entre las distintas poblaciones dentro de un grupo y a las diferencias entre distintos grupos de poblaciones (Excoffier *et al.* 1992).

2.2 Marco referencial

2.2.1 Localización de las muestras

Las áreas definidas fueron San Miguel Panán, El Tumbador, Lanquín, Cahabón y Puerto Barrios (figura 1). Estas áreas fueron descritas según sus factores biofísicos de población, zonas de vida, suelos, fuentes hídricas y factores climáticos.



Fuente: elaborado con base en IGN 2017.

Figura 1. Mapa de localización de para las áreas de estudio.

2.2.2 Descripción de las áreas de estudio

Las áreas de estudio de la región sur están comprendidas por los municipios de San Miguel Panán y El Tumbador (cuadro 3).

Cuadro 3. Descripción biofísica de las diferentes áreas de estudio del área sur.

Descripción	Muestra MZ	Muestra SM
Municipio	San Miguel Panán	El Tumbador
Extensión (km ²)	40	84
Numero habitantes	10,320	44,395
Departamento	Suchitepéquez	San Marcos

Fuente: elaborado con base en INE 2018.

Las áreas de estudio de la región norte están comprendidas por los municipios de Lanquín, Cahabón y Puerto Barrios (cuadro 4).

Cuadro 4. Descripción de las muestras del área norte.

Descripción	Muestra LQ	Muestra CH	Muestra IZ
Municipio	Lanquín	Cahabón	Puerto Barrios
Extensión (km ²)	208	900	1,292
Numero habitantes	24,099	64,911	100,593
Departamento	Alta Verapaz	Alta Verapaz	Izabal

Fuente: elaborado con base en INE 2018.

Las características biofísicas fueron descritas observando diferencias para las muestras recolectadas en el área norte (cuadro 5), en cuanto al tipo de suelos, altitud, precipitación y zonas de vida. En cuanto a la región fisiográfica las muestras se encontraron en la misma.

Cuadro 5. Descripción biofísica de las áreas de estudio de la región sur.

Descripción	Muestra MZ	Muestra SM
Zona de vida	Bosque muy húmedo subtropical (cálido) sur	Bosque muy húmedo montano bajo
Precipitación (mm)	1,600	4,100
Biotemperatura (°C)	27	15 - 23
Altitud (m s.n.m.)	0 a 80	2,500 - 3,000
Serie de suelos	Cutzan, Mazatenango, Chicolá	Chuva, Ostunculco, Retalhuleu, Suchitepéquez
Recursos hídricos	Ríos: Boujillá, Panán, Nahualate, Mixpillá, y Cutzán	Ríos: Mopa, La Puerta, Melendrez, El Limón, El Triangulo, Nahuatan, Camaron, Pajapa
Región fisiográfica	Llanura costera, pendiente volcánica reciente	Llanura costera, pendiente volcánica reciente
Área sembrada de cacao (ha)	182	179

Fuente: elaborado con base en SEGEPLAN 2002, MAGA 2014.

Las características biofísicas de las muestras de la región norte fueron descritas (cuadro 6), observando diferencias en cuanto a las zonas de vida y diferentes parámetros de precipitación, altitud, suelos. En cuanto a la región fisiográfica las muestras se ubicaron dentro de la misma categoría.

Cuadro 6. Descripción biofísica de las áreas de estudio de la región norte.

Descripción	Muestra LQ		Muestra CH		Muestra IZ
Zona de vida	Bosque muy húmedo subtropical (cálido) sur	Bosque muy húmedo subtropical (cálido) norte	Bosque muy húmedo subtropical frío	Bosque muy húmedo subtropical (cálido) norte	Bosque muy húmedo tropical
Precipitación (mm)	1,600	1,430	2,280	2,280	6,000
Biotemperatura (°C)	27	22	16 a 23	16 a 23	24 a 30
Altitud (m s.n.m.)	0 a 80	50 a 275	1,100 - 1,800	1,100 - 1,800	0 - 1,267
Serie de suelos	Tamahú, Guapaca, Cobán		Tamahú, Sebach, Guapaca, Chacalte		Tamahú, Toltec
Recursos hídricos	Ríos: Cahabón, La Pasión y Sarstún		Ríos: Cahabón, Actela, Chisay, Oxec		Ríos: Las Escobas, Escondido,
Región fisiográfica	Tierras altas sedimentarias		Tierras altas sedimentarias		Tierras altas sedimentarias
Área sembrada de cacao (ha)	90		906		26

Fuente: elaborado con base en SEGEPLAN 2002, MAGA 2014.

En cuanto al factor suelos se presentan diferentes texturas, pH y profundidades para las diferentes series de suelos en las zonas de estudio donde se recolectaron las muestras (cuadro 11A).

2.2.3 Localización de la investigación

La metodología de laboratorio fue realizada en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad Universitaria, zona 12, Ciudad de Guatemala, Guatemala.

2.2.4 Estudios de diversidad genética de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al.

Este patógeno ha sido estudiado en diversos países de Latinoamérica, principalmente en países como Colombia, Ecuador y Perú, regiones caracterizadas por ser centro de origen del patógeno.

A. Variabilidad genética en usando AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia

Un estudio de la variabilidad genética de 170 aislamientos de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al. Se realizó utilizando marcadores moleculares del tipo RAPD y AP-PCR, colectados en 12 municipios de Antioquia, Colombia.

Según Ortega y Kafuri (2007) el análisis dividió la población en 6 grupos, donde el grupo principal denominado G1, contuvo el 95 % de los aislamientos con un coeficiente de similitud de 0.70 - 1. El análisis de componentes principales mostró una alta similitud genética entre la población excepto entre los aislamientos de Apartadó y Dabeiba, que registraron los más altos niveles de variabilidad genética con valores altos del índice de Shannon y el porcentaje de loci polimórficos, mientras los otros aislamientos registraron una baja variabilidad

genética. De acuerdo con el AMOVA, la mayoría de la variación genética se encontró dentro de los municipios (75.68 %) con solo un 5.94 % presente entre las subregiones (Ortega y Kafuri 2007).

B. Biodiversidad usando AFLP en América

Los perfiles de AFLP de los 94 aislamientos produjeron 163 bandas. Hubo un alto nivel de polimorfismo entre perfiles de aislamientos considerando el presunto modo asexual de reproducción de este basidiomiceto. De hecho, el 65 % de los productos (106 bandas) generados fueron polimórficos entre al menos algunos de los aislamientos.

Los aislamientos colombianos incluyeron la mayor diversidad genética y los niveles más altos de diversidad genética, medidos utilizando el índice de diversidad de Shannon (0.20 ± 0.06) y sobre la base del porcentaje de loci polimórficos (46.60 %) en las muestras. Los aislamientos ecuatorianos mostraron una menor diversidad genética general medida por el índice de diversidad de Shannon (0.15) y el porcentaje de loci polimórficos (38.10 %) (Phillips-Mora *et al.* 2007).

Los aislamientos centroamericanos exhibieron la menor diversidad, con los 36 aislamientos que mostraron un alto nivel de similitud (mayor a 0.94), 33 de los cuales eran idénticos en todos los loci. Todos los aislamientos de esta región pertenecían al grupo Co-West. En consecuencia, esta región generó las estimaciones más bajas de diversidad utilizando el índice de diversidad de Shannon de 0.01 y el porcentaje de loci polimórficos de 5.60 %.

C. Diversidad genética en Perú usando marcadores RAPD

En Perú se realizó un estudio de diversidad genética de 21 aislamientos de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.* En 3 zonas cacaoteras. A partir de la utilización de marcadores

moleculares del tipo RAPD, se construyó un dendrograma usando Jaccard como coeficiente y el algoritmo UPGMA.

Según Gutarra *et al.* (2013), al estimar la estructura genética en función del AMOVA y la diversidad utilizando Shannon y Nej como índices, se obtuvo un 73 % de polimorfismo en 59 bandas obtenidas. El dendrograma dividió en 3 grupos principales con una similitud de 0.70, y los índices de Shannon y Nej presentaron una alta variabilidad.

Por lo que se definió que existen más de un grupo genético en la región estudiada, y que la diversidad pudo ser causada por haber ingresado o realizado intercambio de semillas de forma natural por medio de los ríos en común y estarían originando nuevos grupos genéticos locales.

D. Diversidad genética en el norte de Santander, Colombia usando AFLP

Este estudio muestra los resultados obtenidos utilizando AFLP, en aislados de la región norte de Santander los cuales fueron analizados con el kit para sistema de análisis II, estandarizado y aplicado a 56 muestras de aislados de 9 municipios. Según Suarez (2017) el análisis realizado usando un dendrograma de similitud en base a las distancias genéticas de Nei, definió 5 grupos con una alta variabilidad entre las muestras, el cual se encontró entre 6.50 % - 58 %.

E. Diversidad genética en Perú, usando microsatélites

La diversidad genética fue evaluada en 35 genotipos de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.*, patógeno causante de la moniliasis, una de las enfermedades limitantes en las plantaciones de cacao, con el fin de obtener más información sobre la diversidad de este patógeno en 4 regiones del Perú.

La caracterización molecular se realizó a través de marcadores microsatélites. Usando los marcadores SSR17 y SSR5. Según Quispe (2018) el promedio de alelos por población, patrón de alelos y curva de diversidad, así como el análisis de agrupamiento con 3 clústeres formados a 0.90 de similitud indicaron baja variabilidad genética en las 4 poblaciones estudiadas, lo que confirma la hipótesis de que en el Perú hay una sola línea clonal.

Este patógeno ha sido estudiado en diversos países de Latinoamérica (cuadro 7), los diferentes estudios de diversidad usando marcadores moleculares, estudios los cuales revelan que la mayor parte de los estudios han sido realizados en Sudamérica.

Cuadro 7. Estudios de diversidad genética de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al.

País o región	Año	Número de Muestras	Marcador molecular	Análisis de resultados
Colombia	2007	170	RAPD Y AP-PCR	UPGMA, análisis coordinados principales, índice de Shannon, polimorfismo.
Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Centroamérica	2007	94	AFLP e ISSR	UPGMA, análisis de coordenadas principales
Perú	2013	21	RAPD	UPGMA, AMOVA, índice de Nei, Shannon
Colombia	2017	56	AFLP	UPGMA, análisis de coordenadas principales, índice de Nei
Perú	2018	35	Microsatélites	UPGMA, frecuencias alélicas

Fuente: elaborado con base en Phillips-Mora *et al.* 2007, Ortega y Kafuri 2007, Gutarra *et al.* 2013, Suarez 2017 y Quispe 2018.

2.2.5 Estudios de diversidad genética de fitopatógenos en Guatemala

En Guatemala se realizó un análisis de diversidad genética de aislados de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary colectados en zonas productoras de papa y tomate. Este estudio determinó el nivel de variabilidad genética, a través del marcador molecular AFLP.

Con los 22 aislados se realizó un análisis clúster y un dendrograma con el algoritmo UPGMA usando el índice Dice. Según Ruiz *et al.* (2018) los aislados fueron situados en 3 grupos principales, los cuales responden al lugar de procedencia y al tipo de planta hospedera. Se encontró un valor de similitud de 0.49 entre los aislados analizados, por lo que se concluyó que la variabilidad genética de *P. infestans* en Guatemala es alta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la diversidad genética de aislados *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny en regiones productoras de cacao (*Theobroma cacao* L.) del sur y norte de Guatemala.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar la similitud genética entre aislados de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al, recolectados de zonas productoras de cacao.
2. Determinar la diversidad genética entre poblaciones de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al, recolectadas de zonas productoras de cacao.
3. Determinar la variación molecular entre regiones, poblaciones e individuos de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al. recolectados de zonas productoras de cacao.

4 HIPÓTESIS

Las poblaciones de *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, aisladas de zonas productoras de cacao de San Miguel Panán (Suchitepéquez), El Tumbador (San Marcos), Cahabón, Lanquín (Alta Verapaz) y Puerto Barrios (Izabal), presentan baja diversidad genética. Por lo cual existirán al menos de 3 grupos filogenéticos con una diferenciación geográfica entre poblaciones, pero con similitud mayor 0.70, debido a su reciente ingreso al país y el mecanismo de reproducción asexual que presenta el hongo.

5 METODOLOGÍA

5.1 Identificación de la similitud genética entre aislados de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al.

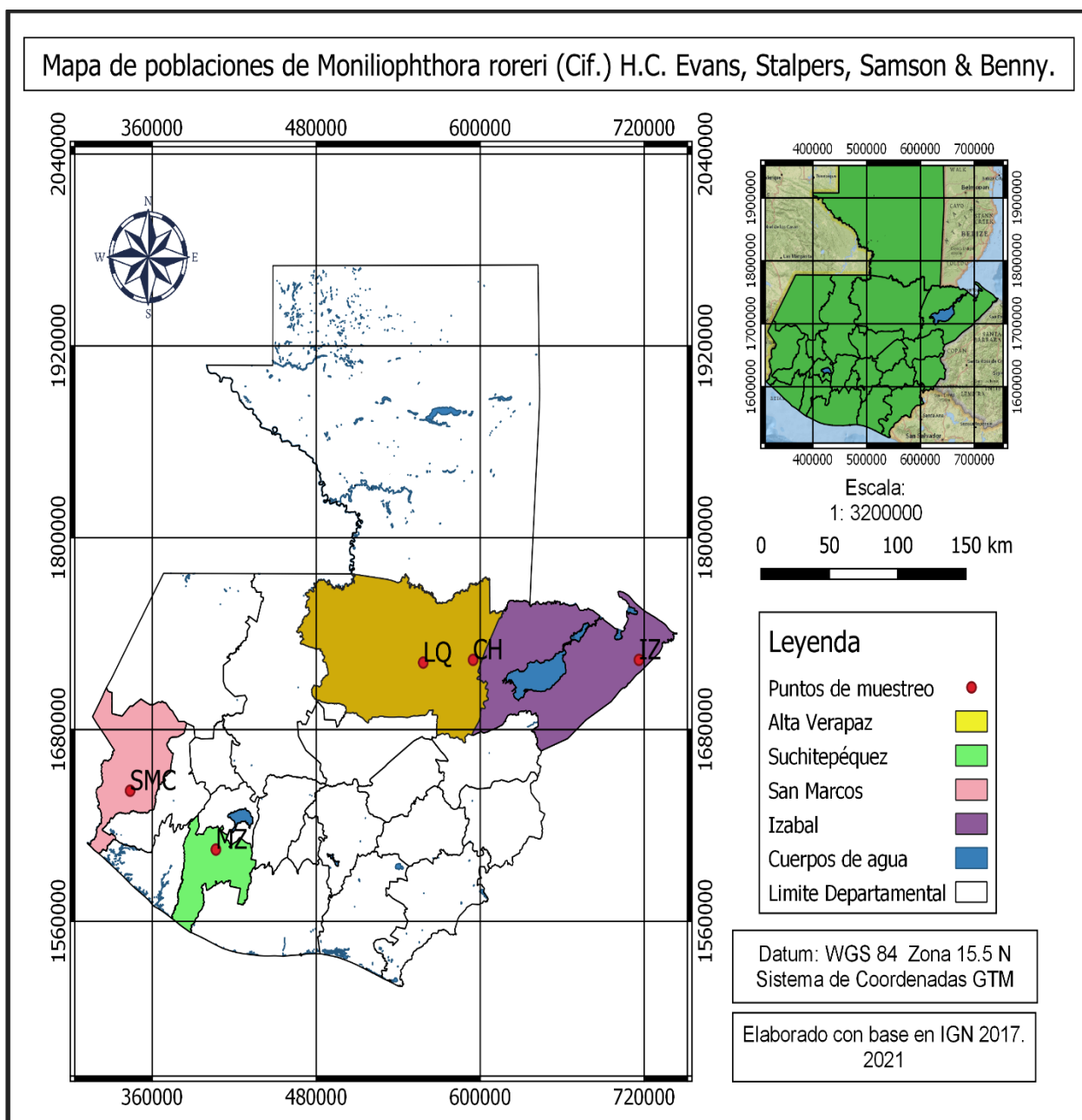
5.1.1 Recolección de muestras

El material recolectado fueron los frutos de la planta de cacao afectado por *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al., estos fueron colectados de árboles de cacao (figura 10A), se llevó a cabo en los departamentos de Suchitepéquez (San Miguel Panán), San Marcos (El Tumbador), Alta Verapaz (Cahabón, Lanquín) e Izabal (Puerto Barrios) (figura 2), por ser de los mayores productores de cacao, las respectivas muestras fueron identificadas según su región en la cual fueron recolectadas (cuadro 12A) donde se encuentran detalladas todas las muestras recolectadas utilizadas para el estudio.

Para cada localidad se recolectaron alrededor de 12 muestras, siendo este número dependiente de las observaciones en campo de plantas con daño del hongo, a su vez el número total de muestras basado en otros estudios de diversidad exploratorios como los presentados por Gutarra *et al.* (2013) y Suarez (2017).

Se realizó una observación visual buscando directamente crecimiento del hongo sobre el fruto. Los frutos fueron colectados con sintomatología típica de la enfermedad: deformaciones, manchas irregulares de color café y presencia de micelio sobre el fruto (figura 11A). En total se recolectaron 69 muestras de las diferentes localidades.

Estas muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas, identificadas con la locación y trasladadas en condiciones de frío al laboratorio de biotecnología vegetal de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, lugar donde se realizó el aislamiento.



Fuente: elaborado con base en IGN 2017.

Figura 2. Mapa de poblaciones de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al.

5.1.2 Aislamiento y purificación

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 *et al.* (2014).

- A. La muestra fue lavada en agua corriente durante 15 min.
- B. Los fragmentos fueron recolectados de los fragmentos de tejido y se realizó su colocación en un erlenmeyer de 100 ml de capacidad con 80 ml de agua desionizada estéril.
- C. Se agito por 5 min y se decantó. Este paso anterior fue repetido 3 veces sucesivas cambiando el agua en cada repetición.
- D. Se realizó la desinfección de los fragmentos de tejido con alcohol al 70 % durante 2 min. Seguido de un lavado de los fragmentos de tejido con agua desionizada estéril durante 2 min.
- E. Se realizó la colocación de los fragmentos de tejido en un papel de filtro estéril en cabina de flujo laminar, para eliminar el exceso de humedad.
- F. Se hizo la colocación de los fragmentos de tejido en cámaras húmedas. Se identificaron las cajas petri con los datos de la muestra (locación, número de la muestra y la fecha de la recolección).
- G. Las cajas petri fueron colocadas en incubadora a 25 °C durante 5 días.
- H. Se realizó la elaboración el medio de cultivo PDA. Antes de ser vertido en la caja, se añadió sulfato de estreptomicina a razón de 0.50 g/l de ingrediente activo.

- I. El medio de cultivo fue vertido en cajas petri dentro de la cámara de flujo laminar, dejándose reposar hasta su solidificación. Estas cajas petri fueron colocadas en incubadora a 25 °C durante 7 días.

5.1.3 Confirmación de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al.

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir del micelio desarrollado en los medios de cultivo preparados. Para dicha extracción se utilizó el kit comercial Pure Gene Core Kit A de QUIAGEN®.

Se tomó micelio de la superficie del medio de cultivo el cual es macerado con micropistilo agregando 400 µL de amortiguador de extracción (200 mM de TrisHCl; 250 mM de NaCl; 25 mM de EDTA, SDS al 0.50 %) en un tubo de 1.50 ml, posteriormente se realizó la metodología descrita por Ruiz *et al.* (2018).

- A. Los tubos fueron incubados a 65 °C durante 1 h.
- B. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente y se agrega 100 µL de acetato de amonio ($C_2H_7NO_2$) 2 M, colocándolas en hielo por 10 min.
- C. Posteriormente se centrifugo a 13,000 rpm durante 4 min y la fase líquida fue transferida a un nuevo tubo al cual se le agrega 300 µL de isopropanol (C_3H_8O), se centrifugo a 13,000 rpm durante 3 min y se descartó la fase líquida.
- D. La pastilla de ADN generada fue lavada con etanol al 70 % y se centrifugo a 13,000 rpm durante 2 min y se descartó la fase líquida.
- E. Tras la evaporación del etanol se suspendió la pastilla en 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA) y se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente.
- F. Finalmente se almaceno a -20 °C.

La calidad y cantidad fue evaluada a través de una visualización con luz ultravioleta, posteriormente se procedió con una tinción con bromuro de etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$).

Se utilizaron los siguientes cebadores: ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'). produciendo fragmentos de 600 pb a 750 pb, estos se anclan en las regiones ADNr 25S y 18S respectivamente, correspondientes a la especie *M. royeri* (Cif.) H. C. Evans et al.

5.1.4 Protocolo AFLP

Se tomaron muestras de ADN de los diferentes aislados del patógeno de cada localidad, provenientes de medios de cultivo selectivos. Se utilizó el marcador molecular AFLP, a través de la utilización del kit AFLP Análisis System I de Invitrogen®, realizándose lo siguiente:

- A. Se utilizó ADN a una concentración de 25 ng/ μ L, el cual es digerido con las enzimas de restricción EcoR1/ Mse1.
- B. Se incubó por 2 h a 37 °C, después a 70 °C por 15 min.
- C. La ligación de los adaptadores se llevó a cabo con los reactivos del kit y se incubó durante 2 h a 20 °C.
- D. Seguidamente se realizó una preamplificación con la reacción en cadena de la polimerasa realizando 20 ciclos siguiendo la programación siguiente de temperatura y tiempo (cuadro 8), con el fin de lograr la amplificación esperada.

Cuadro 8. Ciclo de PCR utilizado durante el protocolo del marcador AFLP.

Temperatura (°C)	Tiempo (s)
94	30
56	60
72	60

Fuente: elaborado con base en Ruiz et al. 2018.

Los productos amplificados se visualizan en un gel de agarosa al 2 %. Se realizó una amplificación selectiva con los cebadores M-C + E-AC. Los productos de PCR se corrieron en un gel de poliacrilamida al 5 % observándose las bandas amplificadas.

5.1.5 Análisis de similitud

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® (Hammer *et al.* 2001).

Para generar una matriz de distancias genéticas con el índice de Dice y posterior análisis con el algoritmo UPGMA generando un dendrograma (Nei y Kumar 2000). El cual fue exportado hacia el programa FigTree v1.4.3® (Rambaut y Drummond 2008). Para lograr una mejor visualización del dendrograma a nivel de los aislados de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al.

El análisis de las coordenadas principales de todos los aislados de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al. Se llevó a cabo utilizando el programa GenAlEx 6.5® (Peakall y Smouse 2012).

5.2 Determinación la diversidad genética entre poblaciones de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al. recolectadas de zonas productoras de cacao

Con la matriz de datos binarios se calcularon varios parámetros relacionados con la diversidad genética. Se calculó la diversidad genética de Nei (Nei 1973), la diversidad genética total y el 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 polimórfico el número observado de alelos por loci (N_a), el número efectivo de alelos por locus (N_e) (Kimura y Crow 1964). Así como el índice de información de Shannon (I), logrando así tener estimadores que ayuden a la determinación de variabilidad genética de las poblaciones del patógeno.

5.3 Determinación de la variación molecular entre regiones, poblaciones e individuos de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al.

Con la matriz de datos binarios se calcularon varios parámetros relacionados con la variación genética, realizando un AMOVA.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992), se calculó utilizando el programa GenAlEx 6.5® (Peakall y Smouse 2012). Para esto se tomaron como parámetros las regiones (norte y sur), como poblaciones (San Miguel Panán, El Tumbador, Cahabón, Lanquín, y Puerto Barrios). A su vez también se calculó el flujo genético entre poblaciones se estimó usando la ecuación:

$$Nm = [(1 / F_{st}) - 1] / 4.$$

Dónde: f_{st} es el valor que mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este es parte del primer estudio para caracterizar las poblaciones de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al., en Guatemala. Por lo cual fue necesario la utilización de diferentes índices de biodiversidad, así como análisis de similitud y coordenadas con el fin de definir la distribución espacial de las muestras y su diferenciación a nivel de asilado, población y región.

6.1 Identificación de la similitud genética entre aislados de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al.

El dendrograma basado en la similitud genética de Dice reveló 3 grupos principales con un coeficiente de similitud de 0.80 (figura 3). Este dendrograma a su vez tuvo diversas ramificaciones a diferentes niveles de similitud estableciéndose entre una similitud de 0.7 - 0.98, sin embargo, ninguna muestra se agrupó con una similitud de 1, lo cual indicio que ninguna de las muestras obtenidas era igual genéticamente.

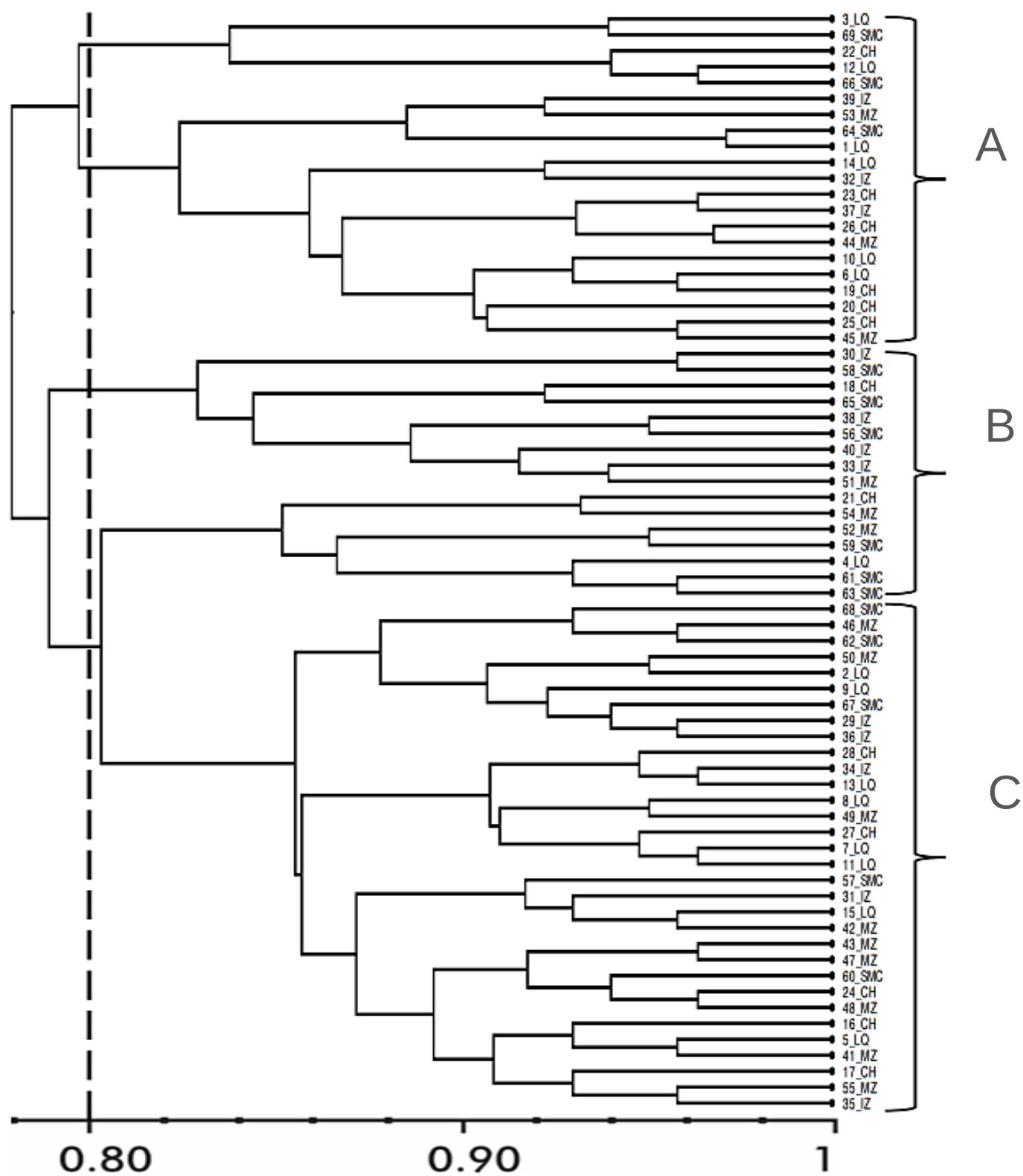


Figura 3. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular AFLP.

El grupo A estuvo compuesto por 21 aislados, el grupo B estuvo conformado por 16 aislados y el grupo C por 32 aislados de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al. En los 3 grupos se identificó presencia de aislados de las diferentes localidades analizadas.

El mapa de coordenadas principales basado en la matriz de distancia genética también reveló 3 grupos principales (figura 4). En los 2 grupos mayores se incluyeron aislados de las 5 poblaciones. El tercer grupo estuvo compuesto por aislados de Lanquín (LQ) y Suchitepéquez (SMC). Los 2 vectores principales revelaron el 21.14 % y 15.99 % de la variación, respectivamente.

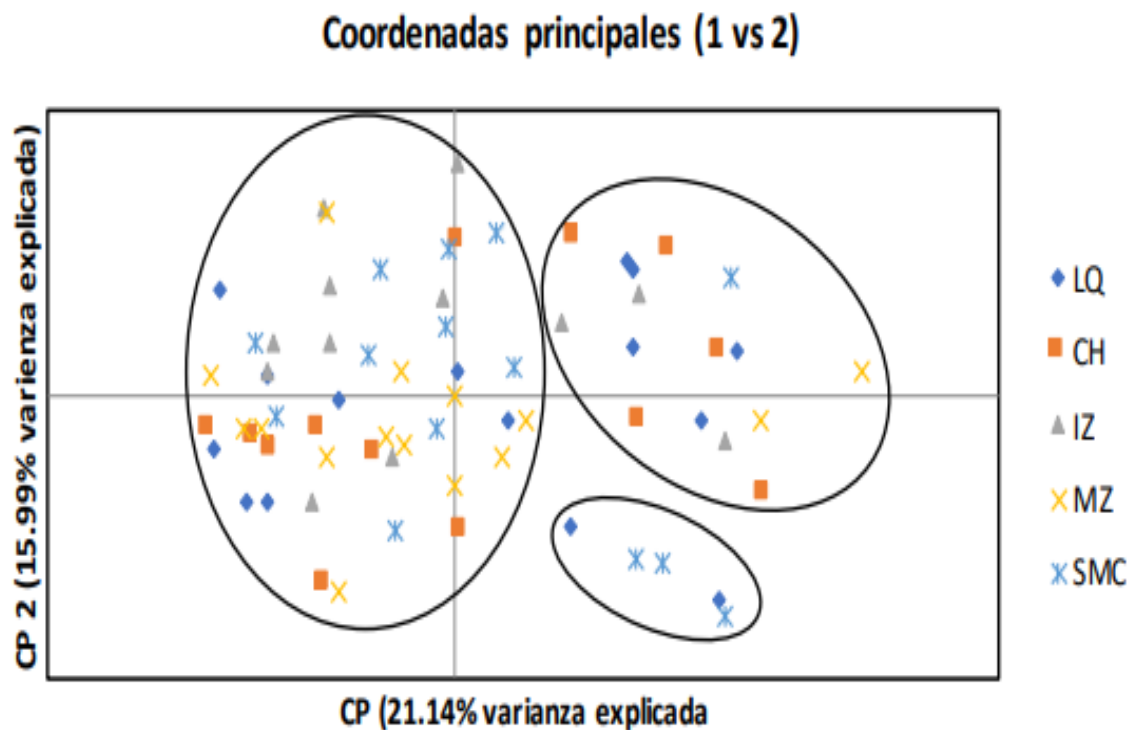


Figura 4. Análisis de coordenadas principales.

En cuanto al análisis de agrupamiento del dendrograma, los resultados indican una alta similitud (80 %) entre los aislados, valor similar al 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 Sudamérica son significativamente menores, reportándose en Colombia y Ecuador valores de 67 % y 60 % respectivamente (Phillips-Mora *et al.* 2007), y según Gutarra *et al.* (2013) para poblaciones de Colombia fue de 64 % y según Suarez (2017) fue de 58 % siempre para el mismo país, evidenciándose una amplia diversidad genética en esta región en contraste con los obtenidos en Guatemala.

A pesar de que para Centroamérica se reporta solo un grupo genético según Phillips-Mora *et al.* (2007), tanto el dendrograma como el análisis de coordenadas principales muestran 3 grupos distintos, grupos los cuales presentaron alta similitud genética en base a los 69 los aislados analizados.

En cuanto a la diferenciación de los aislados según el municipio donde fueron extraídos no se observó ninguna diferenciación genética, siendo una de las muestras de Lanquín (3_LQ) y una de las muestras de Puerto Barrios (35_IZ), las que se encontraron según el dendrograma a una mayor distancia.

Aun cuando la dispersión del patógeno hacia Centroamérica se haya presentado a partir de un solo clon de una región de Colombia y la reproducción del patógeno se considere mayormente de forma clonal (Phillips-Mora *et al.* 2006), los aislados analizados en este estudio nunca presentaron una similitud genética del 100 %.

Esta diferenciación genética puede ser atribuida a una alta tasa de mutación en el genoma de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.*, para responder a la presión de selección natural, en donde nuevos ambientes presionan para enriquecer a poblaciones introducidas con nuevas variantes genéticas (Jaimes *et al.* 2016).

Aun cuando se asume una reproducción predominantemente clonal en *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.*, se sabe 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 (Phillips-Mora *et al.* 2007).

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. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al., provocada por una limitada resistencia o bajos niveles de tolerancia de materiales genéticos de cacao contra este patógeno aumentándose las pérdidas por moniliasis aun con presencia de algunos clones tolerantes en Costa Rica (Ali et al. 2015).

Esta situación es de especial importancia para Guatemala, ya que la mayoría de los clones de cacao utilizados en el país son provenientes del programa de mejoramiento de Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (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. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al., es consistente con una rápida y reciente propagación del hongo de una población, siendo un hongo que se reproduce de forma asexual, existe una diferenciación mayor a la esperada.

Esta situación puede ser explicada 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 de control químico y el movimiento de materiales a zonas con diversidad climática da lugar a modos naturales de dispersión, los cuales han sido la principal fuerza responsable de la dispersión de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al., en las nuevas zonas y países afectados (Phillips-Mora et al. 2007).

6.2 Determinación de la diversidad genética entre poblaciones de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al.

Las 4 combinaciones de cebadores selectivos de AFLP produjeron un total de 140 loci amplificados a partir de 69 muestras representativas de 5 poblaciones de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al. A partir de las cuales se calculó el número de loci polimórficos el cual estuvo entre 14 % - 23 % con un valor promedio de 17.40 % (cuadro 9).

Cuadro 9. Parámetros de la variación genética de las poblaciones.

Población	N	LP	P (%)	Na	Ne	I	Hj
LQ	15	15	10.71	0.80	1.23	0.02	0.14
CH	13	16	11.43	1.15	1.24	0.07	0.17
IZ	15	23	16.42	0.95	1.19	0.06	0.13
MZ	12	19	13.57	1.30	1.27	0.05	0.18
SMC	14	14	10	1.30	1.36	0.07	0.22
Promedio	13	17.40	12.40	1.10	1.25	0.05	0.17

La proporción de loci polimórficos estuvo en un rango de 10 % a 16.42 %, con un promedio de 12.40 %. Siendo la población LQ la que presento la menor proporción de loci polimórfico y la población IZ la que presento la mayor proporción polimórfica. En cuanto a las diferentes muestras todos estos resultados indicaron que existió un bajo polimorfismo en las poblaciones de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al.

Se determinó el número de aislados por población (N) el cual indica el número de muestras utilizadas presentando valores entre 12 y 15. En cuanto al número de alelos diferentes (Na), se encontraron valores entre 0.80 y 1.30, numero de alelos efectivos (Ne) obtenido se distribuyó entre los valores de 1.19 y 1.36.

La diversidad genética de Nei (H_j) de las diferentes poblaciones osciló entre 0.13 (IZ) y 0.22 (SMC) con un valor medio de 0.17. El índice de información de Shannon (I) estuvo en el rango de 0.02 (LQ) hasta de 0.07 (SMC) con un valor promedio de 0.058. La diversidad genética general (H_t) fue de 0.12, la diversidad genética media dentro de las poblaciones (H_w) fue de 0.13.

Al comparar los valores obtenidos del análisis polimórfico, se observa que estos son significativamente más bajos que los reportados por Phillips-Mora *et al.* (2007), quienes informan valores de polimorfismo de 46 % y 38.10 % para aislados de Colombia y Ecuador utilizando el mismo marcador molecular.

De igual forma, en Perú, los valores de polimorfismo (73 %) según Gutarra *et al.* (2013) (son mayores a los encontrados en este estudio. Sin embargo, Phillips-Mora *et al.* (2007) reportan valores de 5 % de polimorfismo al analizar aislados provenientes de Centroamérica (grupo Co-Central) lo cual es similar con los valores obtenidos en este estudio.

Es evidente que los niveles de polimorfismo encontrados en aislados originarios de Sudamérica 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. roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.*, en Guatemala son bajos (0.05).

En Colombia se reportan valores de 0.20 (Phillips-Mora *et al.* 2007), (0.17) (Ortega y Kafuri 2007) y 4.75 (Jaimes *et al.* 2016). No obstante, (Phillips-Mora *et al.* 2007), también reportan valores en el índice de Shannon sumamente bajos (0.01) para los aislados del grupo Co-Central, sugiriendo la dispersión del patógeno hacia esta región se dio a partir de un solo clon del patógeno, los cuales siguen la relación obtenida de los aislados analizados en el presente estudio.

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. roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.*, específicamente en el Valle de Magdalena (Ali *et al.* 2015), desde donde se dispersó

hacia otras regiones de Sudamérica y Centroamérica. Esta situación explicaría los bajos niveles de diversidad encontrados en este estudio para Guatemala, los cuales son resultados de la reciente introducción y fase invasiva del hongo desde su identificación en el país en 2002.

A pesar de que la diversidad no es significativa, si se encuentra presente a pesar de su reproducción asexual, entre las fuentes que intervienen en la generación de mutaciones en los patógenos se encuentra asociada a errores durante el proceso de replicación, provocando que nuevos nucleótidos ingresen en el genoma del patógeno generando las respectivas mutaciones.

Otro factor que puede ser el origen de esta diferenciación es el factor climático, principalmente contribuida por la precipitación de las diferentes regiones del país, la muestra extraída IZ, fue la que presento el mayor polimorfismo, siendo a su vez el área donde existía la mayor precipitación (6,000 mm), sin embargo en el caso de la muestra MZ, muestra la cual indico el segundo mayor polimorfismo encontrado, no tuvo correlación con la precipitación (4,100 mm), ya que esta región presento una de las menores precipitaciones para las diferentes regiones.

A su vez la muestra SM presento una mayor precipitación (2,500 mm - 3,000 mm) y tuvo el menor índice de polimorfismo de las muestras. Por lo cual no se encontró una relación directa en cuanto a la diversidad encontrada y la precipitación de las diferentes localidades.

En cuanto a la biotemperatura la muestra SM que presento el menor polimorfismo fue aquella obtenida en un área donde la biotemperatura se presentó en los rangos menores (15 °C - 23 °C), a su vez la muestra IZ presento el mayor polimorfismo y rango de biotemperatura (24 °C - 30 °C), por lo cual se considera que el rango de temperatura fue un factor para el desarrollo de la biodiversidad de las muestras del patógeno.

La muestra LQ presento suelos con pH promedio de 6.34, con textura franca, arcillosa y limosa a profundidad promedio de 225 cm. La muestra CH presento suelos con pH de 6.34,

texturas francas, franco arcillosa y arcillosa y profundidad de 47.50 cm. La muestra IZ presento suelos francos, franco arcillosos y arcillosos con pH entre los 6.96, a una profundidad promedio de 40 cm. La muestra SMC presento suelos con pH de 6.35, texturas franco arenosas, franco limosas y franco arcillosa, con profundidad promedio de 113.33 cm. Y por último la muestra MZ presento pH de 5.94, texturas franco arenosa, franco arcillosa, francas y limosas con una profundidad de 240 cm.

Ninguno de estos factores determino un patrón en cuanto a la diversidad, sin embargo, en cuanto a la diversidad parece que los suelos con menor cambios en cuanto a su textura (SMC), pudo haber sido un factor importante para la presencia de un menor polimorfismo, a comparación de la muestra (IZ) donde las texturas se presentaron con mayor heterogeneidad.

En cuanto a la combinación de los factores físicos de clima y suelos no existe una correlación directa en cuanto a la diversidad para las muestras, sino es más la combinación de los factores la cual ha provocado esta diversidad.

6.3 Determinación de la variación molecular entre regiones, poblaciones e individuos de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al.

Para determinar la variación genética entre regiones, poblaciones e individuos fue realizado un AMOVA (cuadro 10), aquí se observa que la variación dentro de las poblaciones representó el 91 % de la variación total. La variación entre regiones represento un 3 % y la variación entre poblaciones represento un 6 %, siendo solo la variación dentro de las poblaciones significativa.

Cuadro 10. Resumen del análisis de la varianza molecular.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Varianza estimada	Porcentaje (%)	Valor Phi	P
Entre regiones	1	2.47	2.47	0.06	3	0.03	0.18
Entre poblaciones	3	6.77	2.26	0.14	6	0.06	0.14
Dentro de poblaciones	64	143.24	2.04	2.24	91	0.23	0.001

Se determinó el flujo genético (N_m) entre las poblaciones fue de 3.52, lo que revela una mayor comunicación genética entre las poblaciones.

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 km - 200 km entre algunas de 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* (Cif.) H.C. Evans et al., favoreciendo el flujo genético.

En este estudio el flujo genético identificado fue de 3.52, este 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 N_m mayor a 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 *et al.* (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 precauciones y las medidas de control deben tratar de reducir al mínimo el flujo de genes.

Aunque la baja diversidad genética encontrada en los aislados de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al. es consistente con una rápida y reciente propagación del hongo de una población.

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 del patógeno en las nuevas zonas y países afectados (Phillips-Mora et al. 2007).

En general los resultados del estudio muestran que existe un bajo nivel de diversidad genética y una débil estructura genética entre los aislados de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al., 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* (Cif.) H.C. Evans et al.

7 CONCLUSIONES

1. Con una similitud de 0.80 según el coeficiente Dice, mediante el análisis UPGMA y el análisis de coordenadas principales, se definieron 3 grupos filogenéticos, sin diferenciación geográfica de los diferentes aislados. Este resultado evidencia una alta similitud para las poblaciones de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al., dentro de las regiones de estudio y es asociada a su reciente ingreso al país y su reproducción asexual.
2. La diversidad obtenida a través del índice de Shannon (0.05) y el índice de Nei (0.02), la diversidad genética general (0.12), y el polimorfismo presentado (12.28 %), muestran que la diversidad encontrada en las poblaciones de *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans et al., es baja, debido a que Guatemala no es centro de origen del patógeno, este no es el caso de Colombia donde se observa una mayor diversidad.
3. El análisis basado en la varianza genética presento diferencias entre regiones, poblaciones y dentro de las poblaciones es de 3 %, 6 % y 91 % respectivamente, de las cuales solo la variación entre poblaciones fue significativa, esta diferenciación se debe a que los productores de cacao realizan intercambio de semilla en las diferentes regiones, transmitiendo el patógeno de forma mecánica, esto se encuentra apoyado con el índice de flujo genético (3.52), el cual indica que no hay un aislamiento por distancia.

8 RECOMENDACIONES

1. Profundizar el estudio de la diversidad genética de *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al., con una mayor cantidad de muestras en regiones no utilizadas para el estudio y con esto poder seguir detallando la diversidad en las regiones cacaoteras del norte y del sur de Guatemala.
2. Es necesario realizar evaluaciones de resistencia a fungicidas con los diferentes aislados del patógeno *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al, para desarrollar programas de control químico que no generen mutaciones en los aislados debido a la presión de selección.
3. Es necesario dar seguimiento a la búsqueda de clones de cacao resistentes a los aislados del patógeno *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al., presentes en Guatemala, con el fin de mejorar las estrategias para control de la enfermedad.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Agrocadena de Cacao de Guatemala. 2016. Plan Estratégico de la Agrocadena de cacao de Guatemala (en línea). Guatemala, Guatemala. 63 p. Consultado 11 dic. 2020. Disponible en <https://www.maga.gob.gt/download/enac16-25>
2. Ali, Shahin S.; Shao, Jonathan; Strem, Mary D.; Phillips-Mora, Wilberth; Zhang, Dapeng; Meinhardt, Lyndel W.; Bailey, Bryan 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 (en línea). *Frontiers in microbiology* 6:850-850. Consultado 8 oct. 2020. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26379633>
3. Allendorf, Fred y Gordon, L. 2007. Conservation and the genetics of populations (en línea). Consultado 10 oct. 2020. Disponible en https://books.google.com.gt/books?hl=es&lr=&id=bnJvzcaK0_0C&oi=fnd&pg=PR11&ots=0fRkAupBcz&sig=NFeTAlMKF6zz0W6t1veRbSqZqA&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
4. Alvarez, Javier; Martinez, Sergio; Coy, Jairo. 2014. Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia (en línea). *Acta Agronomica* 63:388-399. Consultado 7 oct. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/273523911_Estado_de_la_Moniliasis_del_cacao_causada_por_Moniliophthora_roreri_en_Colombia
5. Bailey, Bryan A.; Melnick, Rachel L.; Strem, Mary D.; Crozier, Jayne; Shao, Jonathan; Sicher, Richard; Phillips-Mora, Wilberth; Ali, Shahin S.; Zhang, Dapeng; Meinhardt, Lyndel. 2014. Differential gene expression by *Moniliophthora roreri* while overcoming cacao tolerance in the field (en línea). 15(7):711-729. Consultado oct. 2020. Disponible en <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mpp.12134>
6. Bailey, Bryan A.; Evans, Harry C.; Phillips-Mora, Wilbert; Ali, Shahin S.; Meinhardt, Lyndel W. 2018. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot (en línea). 19(7):1580-1594. Disponible en <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mpp.12648>
7. BANGUAT (Banco de Guatemala). 2020a. Exportaciones (FOB) realizadas. Años: 1994-2019 (en línea, sitio web). Consultado 20 de ago. Disponible en https://www.banguat.gob.gt/inc/ver.asp?id=/estaeco/comercio/sercom/2_PROD_PRODUCTO/X_PROD_1994_2019.htm&e=150511



8. BANGUAT(Banco de Guatemala). 2020b. Importaciones (CIF) realizadas, Años: 1994-2019 (en línea, sitio web). Consultado 20 de ago. Disponible en https://www.banguat.gob.gt/inc/ver.asp?id=/estaeco/comercio/sercom/2_POR_PRODUCTO/M_PROD_1994_2019.htm&e=150512
9. Carrera-Sánchez, Karina; Mosquera Paredes, Laura; Leiva-Mora, Michel. 2014. Protocolo para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al . en frutos de cacao cv (en línea). 'Nacional' de la Amazonía ecuatoriana. 2014 14(3). Consultado 10 oct. 2020. Disponible en <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/67/446>
10. Cornejo, Amelia; Serrato, Alejandra; Rendón, Beatriz; Rocha, Martha. 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (en línea). Mexico D.F, Mexico. 274 p. Consultado 10 sep. 2021. Disponible en [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcología.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcología.pdf)
11. Correa Londoño, Guillermo; Lavalett Oñate, Lelia Leonor; Galindo Villardón, María Purificación; Afanador Kafuri, Lucía. 2007. USO DE MÉTODOS MULTIVARIANTES PARA LA AGRUPACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp. CON BASE EN CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y CULTURALES (en línea). Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín 60(1):3671-3690. Consultado 19 sep. 2020. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179914076004>
12. Crozier, J.; Arroyo, C.; Morales, H.; Melnick, R. L.; Strem, M. D.; Vinyard, B. T.; Collins, R.; Holmes, K. A.; Bailey, B. A. 2015. The influence of formulation on *Trichoderma* biological activity and frosty pod rot management in *Theobroma cacao* (en línea). 64(6):1385-1395. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.12383>
13. Dawyndt, Peter; De Meyer, Hans; De Baets, Bernard. 2006. UPGMA clustering revisited: A weight-driven approach to transitive approximation (en línea). International Journal of Approximate Reasoning 42(3):174-191. Consultado 10 oct. 2021. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888613X05000940>
14. Duarte, Jair Moura; Santos, João Bosco dos; Melo, Leonardo 1999. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean (en línea). Genetics Molecular Biology 22(3):427-432. Consultado 10 oct. 2021. Disponible en <https://www.scielo.br/j/gmb/a/CRDp4XC6pYrvTjFwMs9rCsp/?lang=en>
15. Espinosa, L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR (en línea). Ciudad de Mexico, Mexico. 517 p. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en www2.inecc.gob.mx



16. Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data (en línea). *Genetics* 131(2):479-491. Consultado 11 sep. 2020. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1644282>
17. Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study (en línea). *Molecular Ecology* 14(8):2611-2620. Consultado 10 feb. 2021. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
18. Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies (en línea). *Genetics* 164(4):1567-87. Consultado 11 feb. 2021. Disponible en <https://www.genetics.org/content/164/4/1567>
19. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italia). 2020. FAOSTAT (en línea, sitio web). Consultado 31 ago. 2020. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
20. Fungorum Species. 2020. *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny (en línea, sitio web). Consultado 9 sep. 2020. Disponible en <http://www.speciesfungorum.org/Names/GSDSpecies.asp?RecordID=317823>
21. Gonzalez, Edna. 2008. Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae) (en línea). Tesis Biología. Las Palmas de Gran Canaria, España, Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 59 p. Consultado 11 sep. 2020. Disponible en <https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/1941/1/3211.pdf>
22. Gril, Tjasa; Celar, Franci; Munda, Alenka; Javornik, Branka; Jakse, Jernej. 2008. AFLP Analysis of Intraspecific Variation Between *Monilinia laxa* Isolates from Different Hosts (en línea). *Plant Disease* 92(12):1616-1624. Consultado 21 sep. 2020. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-92-12-1616>
23. Gutarra, Boris; Silva, Maria; Marquez, Kadir; Leon, Betsabé. 2013. Análisis de la diversidad genética de 21 aislamientos del hongo *Moniliophthora roreri* basado en marcadores RAPD (en línea). *Apuntes de Ciencia & Sociedad* 3:100-110. Consultado 21 sep. 2020. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5043000>



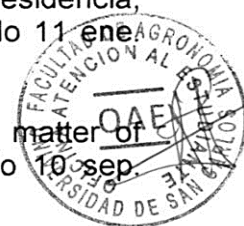
24. Hammer, Oyvind; Harper, David; Ryan, Paul. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis (en línea). *Palaeontologia Electronica* 4:1-9. Consultado 21 nov. 2021. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/259640226_PAST_Paleontological_Statistics_Software_Package_for_Education_and_Data_Analysis
25. IGN (Instituto Geográfico Nacional, Guatemala). 2017. Geoservicios (en línea, sitio web). Consultado 10 sep. 2020. Disponible en <http://www.ign.gob.gt/geoportal.html#>
26. INE (Instituto Nacional de Estadística, Guatemala). 2018. Censo poblacional (en línea, sitio web). Consultado 10 sep. 2020. Disponible en <https://www.censopoblacion.gt/>
27. Jaimes, Yeirme Y.; Gonzalez, Carolina; Rojas, Jairo; Cornejo, Omar E.; Mideros, Maria F.; Restrepo, Silvia; Cilas, Christian; Furtado, E. L. 2016. Geographic Differentiation and Population Genetic Structure of *Moniliophthora roreri* in the Principal Cocoa Production Areas in Colombia (en línea). *Plant Disease* 100(8):1548-1558. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-12-15-1498-RE>
28. Kimura, Motoo; Crow, James F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population (en línea). *Genetics* 49(4):725-738. Consultado 9 sep. 2020. Disponible en <https://www.genetics.org/content/genetics/49/4/725.full.pdf>
29. Leandro-Muñoz, Mariela E.; Tixier, Philippe; Germon, Amandine; Rakotobe, Veromanitra; Phillips-Mora, Wilbert; Maximova, Siela; Avelino, Jacques. 2017. Effects of microclimatic variables on the symptoms and signs onset of *Moniliophthora roreri*, causal agent of *Moniliophthora* pod rot in cacao (en línea). *PLOS ONE* 12(10):1-18. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184638>
30. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala). 2014. Perfil Comercial del Cacao (en línea). Guatemala, Guatemala. 9 p. Consultado 5 sep. 2020. Disponible en https://www.maga.gob.gt/download/Perfil_Cacao.pdf
31. Marelli, Jean-Philippe; Guest, David I.; Bailey, Bryan A.; Evans, Harry C.; Brown, Judith K.; Junaid, Muhammad; Barreto, Robert W.; Lisboa, Daniela O.; Puig, Alina S. 2019. Chocolate Under Threat from Old and New Cacao Diseases (en línea). *Plant Disease* 109(8):1331-1343. Consultado 9 sep. 2020. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHTO-12-18-0477-RVW>
32. Michelmore, Hulbert. 1987. Molecular Markers for Genetic Analysis of Phytopathogenic Fungi (en línea). *Annual Review of Phytopathology* 25(1):389-404. Consultado 11 oct. 2020. Disponible en <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.25.090187.002123>



33. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations (en línea). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70(12):3321-3323. Consultado 10 oct. 2020. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4519626>
34. Nei, Masatoshi; Kumar, Sudhir. 2000. Molecular evolution and phylogenetics (en línea). Consultado 10 oct. 2020. Disponible en <https://www.mimuw.edu.pl/~lukaskoz/teaching/sad2/books/Molecular-Evolution-and-Phylogenetics.pdf>
35. Ortega, Sandra Patricia Grisales; Kafuri, Lucía Afanador. 2007. Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia (en línea). Revista Colombiana de Biotecnología 9:15-32. Consultado 13 sep. 2020. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2512947>
36. Peakall, Rod; Smouse, Peter E. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update (en línea). Bioinformatics 28(19):2537-2539. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22820204>
37. Perez, Luis. 2018. *Moniliophthora roreri* H.C. Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo (en línea). Revista Protección Vegetal 33:1-13. Consultado 10 oct. 2020. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522018000100007
38. Phillips-Mora, W.; Coutiño, A.; Ortiz, 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 (en línea). Plant Pathology 55(4):584-584. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3059.2006.01418.x>
39. Phillips-Mora, W.; Aime, M. C.; Wilkinson, M. J. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America (en línea). Plant Pathology 56(6):911-922. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x>
40. Phillips, Wilbert; Cerda, Rolando. 2013. Catalogo de enfermedades del cacao en Centroamerica (en línea). Turrialba, Costa Rica. Consultado 8 sep. 2020. Disponible en <http://hdl.handle.net/11554/7753>



41. Pla, Laura. 2006. Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza (en línea). *Interciencia* 31(8):583-590. Consultado 8 sep. 2020. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/339/33911906.pdf>
42. Quispe, Zarella. 2018. Análisis de la diversidad genética de monilia [moniliophthora roreri (cif y par) evans et al.] mediante marcadores microsatélites en cuatro regiones del Perú (en línea). Tesis Ing. Agr. Tingo Maria, Perú, Universidad Nacional Agraria de la Selva. Consultado 10 oct. 2020. Disponible en <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1453>
43. 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 (en línea). Tesis Ing. Agr. Suchitepequez, Guatemala, CUNSUROC. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/22/22_0216.pdf
44. Ruiz, Jose; Berduo, Julio; Sanchez, Gregorio. 2018. Diversidad genética de aislados de *Phytophthora infestans* colectados en zonas productoras de papa y tomate de Guatemala. *Ciencia, tecnología y salud* 5: 151-161. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/343514477_Genetic_diversity_of_Phytophthora_infestans_isolates_collected_from_tomato_and_potato_producing_areas_in_Guatemala
45. Sánchez, Fernando; Garcés, Felipe. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao (en línea). *Scientia Agropecuaria* 3:248-258. Consultado 10 sep. 2020. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/3576/357633703006.pdf>
46. Sanchez, M; Jaramillo E; Ramírez, I. 2015. Enfermedades del cacao (en línea). Machala, Ecuador. 152 p. Consultado 10 nov. 2020. Disponible en <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/6921/1/124%20ENFERMEDADES%20DEL%20CACAO.pdf>
47. Say, E; Villalobos, M; Sánchez, S; Somarriba, E. 2013. Uso actual y oferta de tecnologías sostenibles en las cadenas de valor del cacao en Guatemala para mejorar la seguridad alimentaria (en línea). Guatemala, Guatemala. 38 p. Consultado 5 sep. 2020. Disponible en http://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/Informe_Guatemala.pdf
48. SEGEPLAN (Secretaría de Planificación y Programación de la Presidencia, Guatemala). 2002. Tablas de datos (en línea, sitio web). Consultado 11 ene. 2021. Disponible en <https://ideg.segeplan.gob.gt/tablas/tablas.php>
49. Schlötterer, Cristian. 2004. The evolution of molecular markers -just a matter of fashion? (en línea). *Nature Reviews Genetics* 5:63-69. Consultado 10 sep. 2021. Disponible en <https://doi.org/10.1038/nrg1249>



50. Schnell, R. J.; Kuhn, D. N.; Brown, J. S.; Olano, C. T.; Phillips-Mora, W.; Amores, F. M.; Motamayor, J. C. 2007. Development of a Marker Assisted Selection Program for Cacao (en línea). *Phytopathology* 97(12):1664-1669. Consultado 10 oct. 2020. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-97-12-1664>

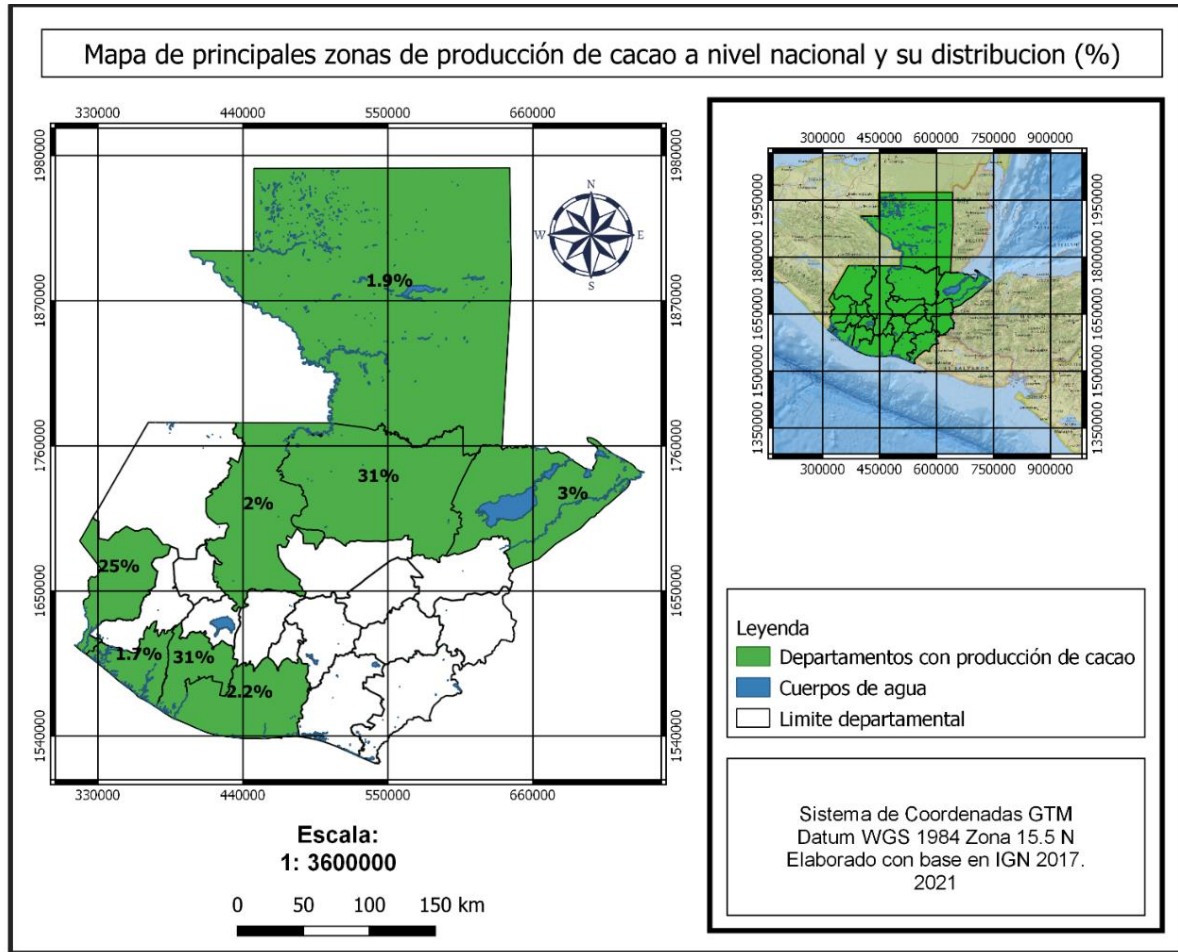
51. Suarez, Liliana. 2017. Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia (en línea). *Acta Agronomica* 65:51-57. Consultado 12 sep. 2020. Disponible en https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/47994

52. Tirado, Paola; Lopera, Andrea; Ríos, Leonardo. 2016. Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática (en línea). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 17:417-430. Consultado 10 oct. 2020. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449946663008.pdf>

53. Vekemans, X.; Beauwens, T.; Lemaire, M.; Roldán-Ruiz, 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 (en línea). *Mol Ecol* 11(1):139-51. Consultado 2 feb. 2021. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.0962-1083.2001.01415.x>

54. WFO (World Flora Online, Estados Unidos de América). 2020. *Theobroma cacao* L. (en línea, sitio web). Consultado 9 sep. 2020. Disponible en <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000458440>





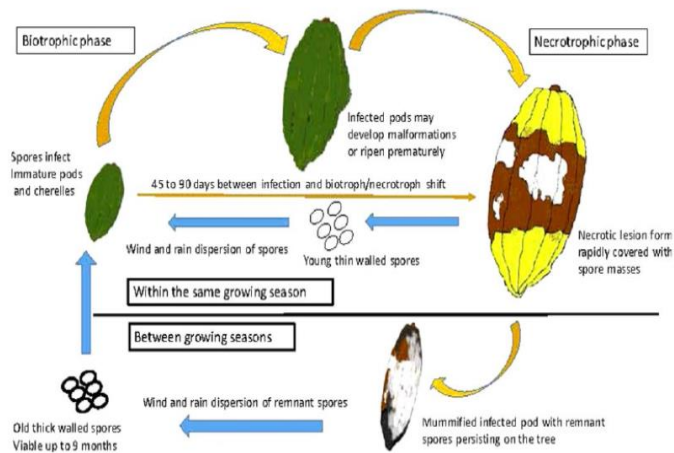
Fuente: elaborado con base en MAGA 2017 e IGN 2017.

Figura 5A. Mapa de departamentos productores de cacao.



Fuente: elaborado con base en FAO 2018.

Figura 6A. Producción promedio de cacao por país para el periodo 2008 a 2018.



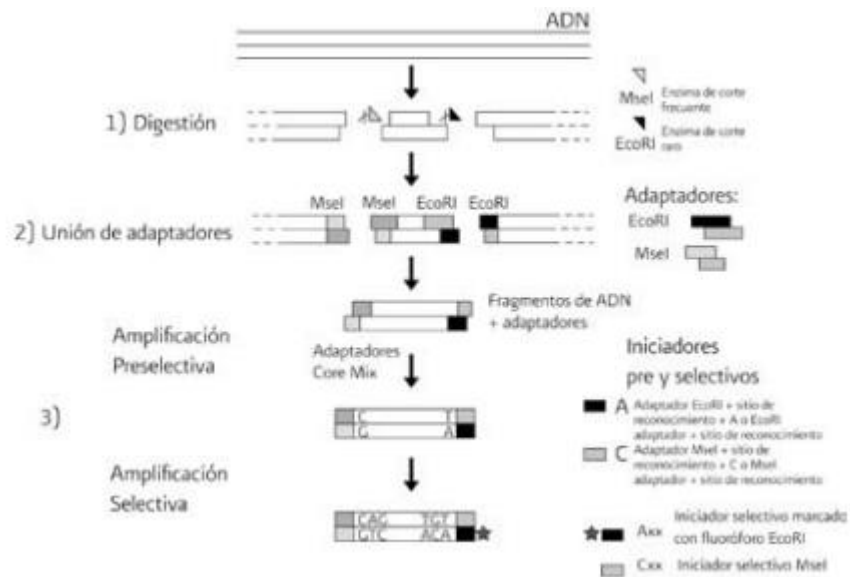
Fuente: tomado de Bailey et al. 2018:1585.

Figura 7A. Ciclo de la enfermedad causada por *M. royeri* (Cif.) H.C. Evans et al.



Fuente: tomado de Phillips y Cerda 2013:6.

Figura 8A. Síntomas de la enfermedad moniliasis.



Fuente: tomado de Cornejo et al. 2014:129.

Figura 9A. Proceso de los marcadores tipo AFLP.

Cuadro 11A. Características físicas para las diferentes series de suelos.

Serie de suelos	Textura	pH	Profundidad (cm)
Cutzan	Franco-arenoso	6.30	40
Mazatenango	Franco-limoso	6.50	150
Chocolá	Franco limosa o arcillosa	6.25	150
Chuva	Franco arenosa, franco arcillosa, franco arcillo	5.78	400
Ostuncalco	Franca o arenosa	6.10	10
Retalhuleu	Franco arenosa a franco arcillosa o franco arcillo limosa	5.78	400
Suchitepéquez	Franco a limoso	6.10	150 - 200
Tamahú	Franca o franca arcillosa	7.83	50
Guapaca	Arcillosa	4.86	45
Cobán	Franco limosa	6.20	300
Sebach	Arcillosa	6.30	40
Chacalte	Arcillosa	7.10	50
Toltec	Arcillosa	6.10	30 - 40

Fuente: elaborado con base en MAGA 2017.



Fuente: elaboración propia, 2020.

Figura 10A. Planta de cacao con frutos presentando moniliasis.

Cuadro 12A. Distribución de muestras por localidad.

Muestra	Población	Municipio	Departamento	Código
1	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	1_LQ
2	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	2_LQ
3	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	3_LQ
4	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	4_LQ
5	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	5_LQ
6	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	6_LQ
7	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	7_LQ
8	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	8_LQ
9	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	9_LQ
10	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	10_LQ
11	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	11_LQ
12	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	12_LQ
13	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	13_LQ
14	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	14_LQ
15	LQ	Lanquín	Alta Verapaz	15_LQ
16	CH	Cahabón	Alta Verapaz	16_CH
17	CH	Cahabón	Alta Verapaz	17_CH
18	CH	Cahabón	Alta Verapaz	18_CH
19	CH	Cahabón	Alta Verapaz	19_CH
20	CH	Cahabón	Alta Verapaz	20_CH
21	CH	Cahabón	Alta Verapaz	21_CH
22	CH	Cahabón	Alta Verapaz	22_CH
23	CH	Cahabón	Alta Verapaz	23_CH
24	CH	Cahabón	Alta Verapaz	24_CH
25	CH	Cahabón	Alta Verapaz	25_CH
26	CH	Cahabón	Alta Verapaz	26_CH
27	CH	Cahabón	Alta Verapaz	27_CH
28	CH	Cahabón	Alta Verapaz	28_CH
29	IZ	Puerto Barrios	Izabal	29_IZ
30	IZ	Puerto Barrios	Izabal	30_IZ

Continuación cuadro 12A.

Muestra	Población	Municipio	Departamento	Código
30	IZ	Puerto Barrios	Izabal	30_IZ
31	IZ	Puerto Barrios	Izabal	31_IZ
32	IZ	Puerto Barrios	Izabal	32_IZ
33	IZ	Puerto Barrios	Izabal	33_IZ
34	IZ	Puerto Barrios	Izabal	34_IZ
35	IZ	Puerto Barrios	Izabal	35_IZ
36	IZ	Puerto Barrios	Izabal	36_IZ
37	IZ	Puerto Barrios	Izabal	37_IZ
38	IZ	Puerto Barrios	Izabal	38_IZ
39	IZ	Puerto Barrios	Izabal	39_IZ
40	IZ	Puerto Barrios	Izabal	40_IZ
40	IZ	Puerto Barrios	Izabal	40_IZ
41	IZ	Puerto Barrios	Izabal	41_IZ
42	IZ	Puerto Barrios	Izabal	42_IZ
43	IZ	Puerto Barrios	Izabal	43_IZ
44	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	44_MZ
45	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	45_MZ
46	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	46_MZ
47	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	47_MZ
48	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	48_MZ
49	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	49_MZ
50	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	50_MZ
40	IZ	Puerto Barrios	Izabal	40_IZ
41	IZ	Puerto Barrios	Izabal	41_IZ
42	IZ	Puerto Barrios	Izabal	42_IZ
43	IZ	Puerto Barrios	Izabal	43_IZ
44	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	44_MZ
45	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	45_MZ

Continuación cuadro 12A.

Muestra	Población	Municipio	Departamento	Código
46	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	46_MZ
47	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	47_MZ
48	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	48_MZ
49	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	49_MZ
50	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	50_MZ
51	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	51_MZ
52	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	52_MZ
53	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	53_MZ
54	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	54_MZ
55	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	55_MZ
56	SMC	El Tumbador	San Marcos	56_SMC
57	SMC	El Tumbador	San Marcos	57_SMC
58	SMC	El Tumbador	San Marcos	58_SMC
59	SMC	El Tumbador	San Marcos	59_SMC
60	SMC	El Tumbador	San Marcos	60_SMC
51	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	51_MZ
52	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	52_MZ
53	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	53_MZ
54	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	54_MZ
55	MZ	San Miguel Panán	Suchitepéquez	55_MZ
56	SMC	El Tumbador	San Marcos	56_SMC
57	SMC	El Tumbador	San Marcos	57_SMC
58	SMC	El Tumbador	San Marcos	58_SMC
59	SMC	El Tumbador	San Marcos	59_SMC
60	SMC	El Tumbador	San Marcos	60_SMC
61	SMC	El Tumbador	San Marcos	61_SMC
62	SMC	El Tumbador	San Marcos	62_SMC

Continuación cuadro 12A.

Muestra	Población	Municipio	Departamento	Código
63	SMC	El Tumbador	San Marcos	63_SMC
64	SMC	El Tumbador	San Marcos	64_SMC
65	SMC	El Tumbador	San Marcos	65_SMC
66	SMC	El Tumbador	San Marcos	66_SMC
67	SMC	El Tumbador	San Marcos	67_SMC
68	SMC	El Tumbador	San Marcos	68_SMC
69	SMC	El Tumbador	San Marcos	69_SMC



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 11A. Colecta de material utilizado (frutos de cacao).



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA -FAUSAC-
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS
Y AMBIENTALES -IIA-



REF. Sem. 17/2021

LA TESIS TITULADA:

"DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE
Moniliophthora roreri (Cif.) H. C. Evans,
Stalpers, Samson & Benny, COLECTADOS EN
ZONAS PRODUCTORAS DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.) DEL NORTE Y SUR DE
GUATEMALA, C. A."

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE:

DANILO FERNANDO VILLANUEVA OSORIO

CARNE:

201703352

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Edin Alejandro Gil Esturban
Dr. Gregorio Amilcar Sánchez Pérez

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Dr. Luis Rodolfo Montes Osorio
ASESOR

Ing. Agr. Carlos Fernando López Bucaro
DIRECTOR DEL IIA

IMPRIMASE

Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
DECANO



CFLB/nm
c.c. Archivo