



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ciencias de la Vida**

“Análisis de la estructura poblacional de *Moniliophthora roreri* mediante marcadores genéticos SSR y fenotípicos de sensibilidad a fungicidas y agresividad en *Theobroma cacao L.*”.

**TESIS DE GRADO**

Previa a la obtención del título de:

**MÁSTER EN BIOCENCIAS APLICADAS CON MENCIÓN EN  
BIODESCUBRIMIENTO**

Presentada por:

Ing. Darlyn José Amaya Márquez

GUAYAQUIL-ECUADOR

Año: 2020

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco primeramente al Señor Jesucristo por darme la vida y la oportunidad de culminar el trabajo de tesis. A mis padres Haydée Márquez, Ángel Amaya, por el constante apoyo incondicional. En la ejecución de la Maestría me fueron de gran ayuda la directora del CIBE Daynet Sosa Ph.D, el director de tesis Dr. Simón Pérez, el comité revisor del proyecto y tesis final conformado por Freddy Magdama ph.D, Luis Galarza ph.D, Gabriela Nicoleta ph.D, A VLIR NETWORK ECUADOR liderado por el Dr. Juan Manuel Cevallos, por su gran apoyo en el transcurso de postgrado. Al Ing. Fernando Espinoza y a Miriam Villavicencio MSc por la asistencia en el aprendizaje de técnicas laboratorio. A Christian Romero ph.D, por su aporte en el análisis de datos. A James Quiroz (MSc.) y Saul Mestanza (MSc.) por las facilidades para realizar el experimento en el INIAP-Litoral sur.

Este proyecto de tesis fue financiado por el Proyecto 2016-CONV-P-01-04 de la UNEMI y el proyecto CIBE-02-2016 de la ESPOL.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de investigación a todos quienes aportaron con su ayuda por más pequeña que haya sido. A mis compañeros de la segunda corte 2017 por ser muy unidos y responsables. También es dedicado a los agricultores que desean mantener una producción rentable de cacao, para el bienestar social y económico de sus familias, ya que son los beneficiarios directos por recibir un aporte positivo en el manejo de la enfermedad en cacao.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



---

Ing. Simón Pérez Martínez Ph.D  
**Tutor de tesis**



---

Gabriela Nicoleta Tenea Ph.D  
**Vocal principal**



---

Ing. Luis Galarza Romero Ph.D  
**Vocal Principal**



---

Ing. Freddy Magdama Tobar Ph.D  
**Vocal Principal**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO y la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de graduación de la ESPOL)

-----  
Ing. Agr. Darlyn José Amaya Márquez

## RESUMEN

La Pudrición Helada del Fruto (PHF) del cacao, es una enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, y provoca grandes pérdidas en los cultivares cacaoteros, perjudicando la económica de cientos de familias productoras y exportadores del cacao. Se ha estudiado la genética del patógeno, para encontrar medidas de control o manejo de la enfermedad. El estudio fenotípico como la sensibilidad a fungicidas y la virulencia en campo de este hongo, no ha sido estudiado. El objetivo de esta investigación fue determinar la estructura poblacional de *M. roreri*, en zonas cacaoteras de la región Amazónica, mediante marcadores fenotípicos y genotípicos. Se evaluó la sensibilidad de 76 aislados de *M. roreri* a los fungicidas flutolanil y azoxystrobin, en medio de cultivo suplementado el fungicida, se estimó la Concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) y el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC). También se evaluó la agresividad de tres aislados en dos clones de cacao mediante la obtención de frutos con 15 y 29 días de edad por medio de la polinización artificial. Se inoculó los frutos mediante la técnica de aspersión y se evaluó la severidad externa e interna. Para el análisis de diversidad genética de 76 aislados, la PCR se llevó a cabo con nueve marcadores moleculares *Simple Sequence Repeat (SSR)*, se generó una matriz con los pesos moleculares (pb) de los aislados. Luego se calculó la heterocigosidad esperada, índice de diferenciación por poblaciones, y análisis de la varianza molecular para conocer la variación dentro y entre poblaciones. Para determinar la relación existente entre variables ambientales y la diversidad genética, se descargó capas *shapefile* de mapas del Ecuador. Los resultados indican que todos los aislados fueron altamente sensible a los fungicidas, y que 53 cepas fueron estimuladas a bajas concentraciones con flutolanil y un aislado con azoxystrobin. La severidad interna y externa del patógeno no fue significativamente diferente en los clones, pero la intensidad de daño fue significativa en frutos de 29 días de edad. MR59 fue más agresivo externamente en EET96, pero se clasificó el clon como resistente; y moderadamente resistente; y el clon EET103 como moderadamente resistente según el daño interno. *M. roreri* mostró alta diversidad genética, y la mayor diferenciación genética se encontró dentro de poblaciones, y entre poblaciones fue diferenciada por el origen geográfico (provincias). Se concluye que *M. roreri* es susceptible a los fungicidas y que los brotes de resistencia pueden surgir de las Provincias de El oro y Orellana. Los aislados fueron más agresivos en frutos de mayor edad (29 días). Se sugiere que el origen geográfico provincia puede explicar la estructura poblacional de *M. roreri* en el Ecuador.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vi
ÍNDICE GENERAL .....	vii
ABREVIATURAS .....	ix
SIMBOLOGÍA.....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
CAPÍTULO 1 .....	10
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
Podrición Helada del Fruto de cacao en el Ecuador.....	13
BIOLOGÍA DEL PATÓGENO Y SUS CONSECUENCIAS EN EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD (HEMIBIOTRÓFICOS).....	15
UTILIDAD DE HERRAMIENTAS DE LA GENÉTICA POBLACIONAL.....	17
IMPLICACIONES DEL ESTUDIO POBLACIONAL EN EL MANEJO DEL CULTIVO.....	21
CAPITULO 2 .....	26
METODOLOGÍA.....	26
2.1 Obtención de material biológico y aislados de <i>M. royeri</i> .....	26
2.2 Estimación de la sensibilidad de <i>M. royeri</i> al fungicida flutolanil y Azoxystrobin. .....	28
2.3 Estimación de la agresividad de <i>M. royeri</i> .....	29

2.4 Cuantificación de la diversidad genética y su distribución intra e interpoblacional de <i>M. royeri</i> mediante marcadores (SSR).....	32
CAPÍTULO 3 .....	37
RESULTADOS .....	37
3.2. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PIC) del flutolanil y Azoxystrobin contra <i>M. royeri</i> . .....	38
3.4 Sensibilidad de <i>M. royeri</i> a los fungicidas flutolanil y azoxystrobin .....	41
3.5 Determinación de la agresividad de aislados de <i>M. royeri</i> mediante ensayos <i>in vivo</i> en frutos de <i>T. cacao</i> . .....	44
3.6. Cuantificación de la diversidad genética.....	49
3.7 Correlación fenotípica con la diversidad genética de <i>M. royeri</i> .....	56
CAPÍTULO 4 .....	59
DISCUSIÓN.....	59
4.1 Sensibilidad de <i>M. royeri</i> a fungicidas .....	59
4.2 Efecto de <i>M. royeri</i> en frutos de cacao mediante la agresividad de los aislados a nivel <i>in vivo</i> . .....	62
4.3 Cuantificación de la diversidad genética .....	64
Correlación fenotípica con la diversidad genética de <i>M. royeri</i> .....	70
Conclusiones .....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

## ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
AMOVA	Analysis of molecular variance
Ap	Alelos privados
cm	Centímetros
Cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
F <sub>ST</sub>	Índice de diferenciación
g	Gramos
GenAlEx	Genetic Analysis in Excel.
H <sub>s</sub>	Heterocigosidad esperada
I	Índice de Shannon
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria media máxima
ICP	Índice de Contenido Polimórfico
m	Metro
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
ml	Mililitro
N	Número de muestras
Na	Número de alelos
Ne	Número de alelos efectivos
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Potato dextrose agar
PIC	Porcentaje de Inhibición de Crecimiento
r.p.m	revoluciones por minuto
SSR	Simple Sequence Repeats
v/v	volumen/volumen

## SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
μl	Microlitro
μg	Microgramo
mM	Mili molar
bp	Pares de bases

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de cebadores ISSR con tamaños esperados para <i>M. royeri</i> .....	33
Tabla 2. Frecuencia por PIC de flutolanil para los aislados de <i>M. royeri</i> .....	38
Tabla 3. Porcentaje del PIC a diferentes concentraciones .....	40
Tabla 4. Clasificación de la respuesta de los genotipos de cacao frente a <i>M. royeri</i> .....	48
Tabla 5. Características de 10 marcadores ISSR según información esperada y observada, (ICP) de <i>M. royeri</i> del Ecuador .....	49
Tabla 6. Riqueza alélica, diversidad genética e índices de diferenciación genética según la subdivisión de la población por *origen geográfico y variables ambientales**.	51
Tabla 7. Diversidad genética según la sensibilidad al flutolanil y azoxystrobin (IC <sub>50</sub> )....	57
Tabla 8. Aislados evaluados en campo experimental .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. polinización de clones EET96 y EET103 con padre CCN-51, e inoculación de <i>M. royeri</i> .....	30
Figura 2. Distribución geográfica de PHF, puntos de color verde muestra mayor número de aislados. ....	37
Figura 3. Dinámica de inhibición del crecimiento de <i>M. royeri</i> . Ciertos aislados mostraron un PIC positivo, indicando que estimulan su crecimiento. Agrupamientos por análisis de clúster usando como variables las concentraciones. ....	39
Figura 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento de azoxystrobin contra <i>M. royeri</i> . Todos los grupos indican un PIC positivo, menos el grupo 3 (1 aislado) que fue estimulado en su crecimiento. ....	40
Figura 5. Agrupamiento de los aislados de <i>M. royeri</i> en función de los IC <sub>50</sub> . Las medias de cada grupo fueron: grupo 1 (74 aislados) obtuvo una IC <sub>50</sub> entre 0.003 y 0.08 µg/ml, el grupo 2 (2 aislados) entre 0.13 a 0.15 µg/ml (A). Muestra la frecuencia relativa en µg/ml de los aislados en función de las concentraciones IC <sub>50</sub> (B).....	42
Figura 6. Distribución espacial de los aislados en función de la sensibilidad al flutolanil. Con azul indica sensibilidad homogénea que fue entre 0.02 µg/ml y 0.04 µg/ml. El color rojo muestra los dos aislados que fueron menos sensible pertenecientes a El oro y Orellana con dosis de 0.13 µg/ml y 0.15 µg/ml.....	43
Figura 7. Agrupamiento de los aislados de <i>M. royeri</i> en función de los IC <sub>50</sub> . Las medias de cada grupo fueron: grupo 1 (71 aislados) obtuvo una IC <sub>50</sub> entre 0.00002 a 0.01462µg/ml, el grupo 2 (3 aislados) entre 0.0220 a 0.0364µg/ml (A). Frecuencia relativa de los aislados en función de las concentraciones IC <sub>50</sub> (B).....	44

Figura 8. Efecto de <i>M. royeri</i> sobre frutos de cacao durante ocho semanas de evaluación. Primera imagen a izquierda corresponde al momento de la inoculación. Seguido de los daños adquiridos a partir de la tercera a la octava semana.....	45
Figura 9. Promedio de los niveles de daño externo e interno por pudrición helada del fruto en clones de cacao inoculados con varios aislados de <i>M. royeri</i> . En línea se representa la severidad externa de (Cardenas y Giraldo,1986) y en barra la severidad interna (Phillips-Mora, 2005). Sin diferencias significativas entre clones en ninguno de los momentos ( $p < 0.05$ , datos no mostrados). .....	45
Figura 10. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para tres aislados de <i>M. royeri</i> y el control. Asterisco indica diferencia significativa en el clon EET96 según Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ). .....	46
Figura 11. Promedio de la severidad externa de 24 frutos inoculados con <i>M. royeri</i> a 15 y 29 días de edad, y evaluados hasta ocho semanas post inoculación.....	47
Figura 12. Severidad de la PHF en dos clones de cacao inoculados con tres aislados de <i>M. royeri</i> . Asteriscos indican diferencia estadística significativa según Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ). .....	48
Figura 13. Visualización resumida del análisis de varianza molecular (AMOVA) para <i>M. royeri</i> mediante el porcentaje de la varianza molecular (AMOVA) explicado por las poblaciones. ....	53
Figura 14. Mapa ( <i>heatmap</i> ) generado con marcadores moleculares y características fenotípicas de sensibilidad a fungicidas flutolanil y azoxystrobin, realizado con datos transformados a binarios (ausencia y presencia). .....	54
Figura 15. distribución espacial de los cuatro grupos genéticos determinados para <i>M. royeri</i> en el Ecuador (I-IV) según las precipitaciones anuales. Mapa generado con capas shapefile de isoyetas (SIPA-MAGAP,2019).....	55

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La Pudrición Helada del Fruto (PHF) del cacao (*Theobroma cacao*), causada por el hongo basidiomicete *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, provoca pérdidas del 40% en varios países de América tropical (Phillips-Mora, Aime, & Wilkinson, 2007). Actuando en conjunto con la escoba de bruja pueden ocasionar pérdidas del 80% de la producción (Ali et al., 2015b). La PHF es la enfermedad más destructiva del cultivo en el Ecuador (H. C. Evans, Holmes, & Reid, 2003). El agente causal es un hongo hemibiotrófo que ataca primero con una fase biotrófica y luego necrotrófica, en la fase biotrófica el patógeno coloniza los frutos causando malformaciones, para después adsorber los nutrientes liberados en una fase necrótica (Bailey, Evans, Phillips-Mora, Ali, & Meinhardt, 2018; Mendgen K, 2002).

La enfermedad continua siendo un problema fitosanitario y el mayor desafío de los productores desde décadas (Suárez-Capello, 1983). La capacidad de sobrevivencia a variantes ambientales, rápida dispersión natural, agresividad, dispersión antropogénica y la alta susceptibilidad de genotipos de cacao representa una importante amenaza (Phillips-Mora et al., 2007). Actualmente, los manejos tradicionales, han provocado el fortalecimiento de la resistencia de la enfermedad; esta problemática se debe al manejo inadecuado de las plantaciones, y por el impacto ambiental generado por acciones antropogénicas (Álvarez, Martínez, & Coy, 2014).

En este hongo las fuentes de variación de población más estudiadas han sido generalmente el origen geográfico y un reporte del papel de la recombinación genética (H. C. Evans et al., 2003). El muestreo de varios países subtropicales identificó cinco grupos genéticos de

*M. royeri*: dos de Colombia; Grupo Co-oriente y Grupo Co-central, Grupo Gireli endémico de Ecuador, Grupo Bolívar (oriente de Colombia-Santander), Grupo Co-occidente en el oriente de Colombia, centro de Ecuador, y Panamá. En el Ecuador existen tres grupos genéticos de *M. royeri*, denominados como I (originario de *Theobroma gileri* en Imbabura), IV=CoWest (del oeste colombiano) y el V denominado Bolívar (Phillips-Mora et al., 2007). Dicho estudio incluyó 36 aislados del Ecuador; y se cree que estos aislados de *M. royeri* tienen poca diferenciación entre las poblaciones, según Phillip-Mora (2007), debido a la reducida variabilidad geográfica que se muestreo en el país (Ali et al., 2015b; Maridueña Zavala, 2015). Pero este estudio podrá aportar información, realizando muestreos en la parte amazónica del Ecuador para complementar los estudios anteriores.

Es poco el reporte de características fenotípicas de aislados de *M. royeri* (Ali et al., 2015b; Magdiel Torres de la Cruz, 2011a). Curiosamente, la información fenotípica asociada a los grupos genéticos reportados en Colombia, fueron diferenciados por variables ambientales y genotipos de cacao, lo cual permitiría encontrar el éxito de los programas de mejoramiento, y la selección de materiales resistentes (Jaimes et al., 2016a).

Es factible el uso de modelos con tratamientos de fungicida para estimar las estrategias claves de la resistencia, y canalizar el manejo adecuado de los fungicidas, salvaguardando el uso futuro en los cultivos (Lucas, Hawkins, & Fraaije, 2015). En contexto, la sensibilidad de *M. royeri* al fungicida flutolanil *in vitro*, no se ha reportado para *M. royeri*, pero se han hecho estudios de sensibilidad a azoxystrobin, lo cual muestra aislados resistentes que necesitan hasta 500µg/ml de ingrediente activo para la inhibición de crecimiento del patógeno (Torres-de-la-Cruz et al., 2019).

Si bien *M. royeri* es un hongo de reproducción clonal (Ali et al., 2015b). Las poblaciones de hongos que no poseen ciclo sexual aún son capaces de tener una rápida evolución, estos rápidos cambios pueden reflejarse en la virulencia, por eso es necesario realizar estudios

de agresividad *in vivo*; para estimar la elevada incidencia de *M. royeri*, baja resistencia o el nivel de tolerancia de alguno de los genotipos de cacao (Jaimes et al., 2016b; Michelmore & Hulbert, 1987). En este sentido, la reacción de *M. royeri* en campo ha mostrado genotipos de cacao menos afectados que *T. cacao*, pero la severidad y la incidencia se diferenciaron por el patógeno (Cuéllar et al., 2015).

El estudio de la agresividad ha sido dirigido a la inoculación de varios genotipos de cacao, pero sin considerar la utilización de varias cepas del patógeno, para conocer su virulencia según su origen y condiciones viables (Gardini Enrique Arévalo,, Sánchez-Torres Gina Paola, Eibis, Flores, Kadir, Markes, Betsabe, Leon-Ttacca, Dapeng, Zhang, Lyndel, Meinhardt, Virupax, 2017).

La estructura genética del patógeno permite entender la capacidad y adaptabilidad de una población a cambios climáticos y respuestas a prácticas agronómicas y predecir nuevos genotipos tolerantes que son liberados por los programas de mejoramiento genético del hospedante (J. W. Meng et al., 2015). Los ensayos que realizan los fitomejoradores con respecto de la resistencia a la PHF serían más efectivos si se conoce la biología poblacional del hongo *M. royeri*, de esta forma no se escogerían de forma empírica las poblaciones del hongo o los aislados para los enfrentamientos planta-patógeno, sino en base a las características genéticas y fenotípicas del hongo, y según su origen geográfico (Ali et al., 2015b; Phillips-Mora et al., 2007).

Los marcadores microsatélites *Simple Sequence Repeat* (ISSR), se consideran robustos para una evaluación genotípica detallada en poblaciones de hongos, siendo empleados en el análisis de la diversidad genética (Dutech et al., 2007; Frenkel et al., 2012). Conocer la estructura genética de uno de los patógeno más nocivos del cacao en el Ecuador, es una actividad pendiente en el manejo integrado de enfermedades.

Por lo cual este estudio pretende determinar la estructura poblacional de *M. royeri*, en zonas cacaoteras de la región Amazónica mediante marcadores fenotípicos y genotípicos. Los objetivos específicos fueron: 1) Estimar la sensibilidad de *M. royeri* a fungicidas flutolanil y azoxystrobin mediante ensayos *in vitro*. 2) Determinar la agresividad de aislados de *M. royeri* mediante ensayos *in vivo* en frutos de *T. cacao*. 3) Cuantificar la diversidad genética y su distribución intra e interpoblacional de *M. royeri* mediante marcadores *simple-sequence repeats* (SSR). La comprensión y conocimiento de los mecanismos de patogenicidad y las fuentes de variación genética es probable que sea fundamental para el control futuro de la enfermedad fúngica.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### **Pudrición Helada del Fruto de cacao en el Ecuador**

El primer reporte de la enfermedad en nuestro país fue en el siglo 20, invadiendo diversas áreas de producción de cacao de gran importancia, provocando problemas de rendimiento (Rorer, 1918). La enfermedad tuvo aparición en la provincia de Los Ríos, propagándose al resto de plantaciones de cacao. En Ecuador desde 1909 *M. royeri* ha provocado grandes pérdidas económicas, durante el viaje de Van Hall (1914); época de buenas bonanzas en Suramérica, se encontró frutos con síntomas de *M. royeri* (Rorer, 1918).

El Ecuador por 35 años fue el mayor exportador de cacao a nivel mundial, pero a fines del año 1915 se vio altamente afectado por la incidencia de la enfermedad PHF, causada por *M. royeri*. Posteriormente la escoba de bruja inducida por *M. pernicioso*, también se destaca como problema fitosanitario en el Guayas, causando pérdidas de hasta el 63% de la producción. Las enfermedades de monilia (1916) y escoba de bruja (1918) golpearon

muy fuertes las plantaciones cacaoteras del Ecuador, las grandes haciendas fueron abandonadas por deudas de hipoteca.

Para los años 40 por causa de la Segunda Guerra Mundial la producción se estancó debido a las limitaciones, se exportó solo el 6% de la producción. Por ello la enfermedad continuó expandiéndose y se envejecieron las plantaciones por la falta de manejo (Goldstein et al., 1996). Para los años 49s las pérdidas por la enfermedad ascendieron a un 40%, reportando mayores afecciones en las zonas más húmedas y regiones bajas de Los Ríos-Pueblo Viejo, Caracol y provincia de Orellana (Fowler, R.L. y López R., 1949). Los andes significaba una barrera para la dispersión de la enfermedad a la parte amazónica, pero debido a la colonización y explotación de Napo, creció el riesgo de recibir el patógeno por medio de material infectado (Henderson, 1997). Por ello para los años 1982 *M. royeri* invadió todas las regiones de nuestro país tanto costa como Amazonía (Ricardo Antonio Delgado; Zoila Karina Solís; Carmita Suárez-Capello, Karina Peres Gramacho, 2003).

### **Problemática: pérdidas por PHF en Costa y Amazonía**

La producción de cacao involucra a 100.000 familias de productores en el Ecuador, las altas temperaturas han provocado pérdidas del 70% de la producción. En la región amazónica del norte de nuestro país se presentan pérdidas de un 40% lo que significa 20 millones de dólares por año (Croplife, 2019). La producción bajó de 46000 toneladas en 1917 a 37.700 en 1918 debido a la PHF (Erneholm, 1948). Para el año 1922 bajó a 30.000 toneladas menguando aún más en 1925 con 20.000 toneladas (Thorold, 1975).

La enfermedad en la Amazonia no se detectó sino en la década de 1980 debido a la introducción de nuevos híbridos mejorados de cacao. Ocurrido esto se detectó la llegada de *M. royeri* (H. C. Evans et al., 2003). Las pérdidas se dan cuando los frutos son tiernos;

es decir menor a 3 meses de edad, pueden ocurrir malformaciones de frutos, aumento de peso del fruto, ocasionando bajas en la producción del 40% (Alcides Calva, 2016). El rango de pérdidas según el tipo de manejo que se realice, fluctúa entre el 16 y 80% de la producción (H. C. Evans et al., 2003). Pero se está introduciendo la variedad de cacao nacional súper árbol “ESS”, la cual posee alta resistencia a PHF, a diferencia de la variedad CCN-51 que presenta pérdidas significativas (Alcides Calva, 2016).

### **BIOLOGÍA DEL PATÓGENO Y SUS CONSECUENCIAS EN EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD (HEMIBIOTRÓFICOS)**

Se conocía que las esporas de *M. royeri* eran conidios asexuales, después se probó que existe una meiosis modificada (Harry C Evans, Stalpers, Samson, & Benny, 1978). También se encontró que la producción de esporas ha sido de origen mitótico, y se considera que las células presentes en micelio de fase necrótica poseen un único núcleo, por ello son considerados como haploides (Díaz-Valderrama & Aime, 2016).

La dispersión de clones de *M. royeri* y la deriva genética localizada asociada a ciertos aislados se cree que son únicos eventos. Sin embargo se estima que la alta diversidad de haplotipos sugiere que aparte de las tasas de mutación en marcadores genéticos SSR y el posible flujo de genes; *M. royeri* podría ser una especie de reproducción asexual, sometida a recombinación esporádica del ciclo parasexual, que implica cambios en el número de cromosomas de hongos con reproducción sexual (Jaimes et al., 2016b). Debido a que la ausencia de heterocigosidad para un número de 88 marcadores SNP, derivada de secuenciación de ARN Seq manifiesta una reproducción clonal u homotálica en *M. royeri*; y una nueva generación de recombinantes por medio de la propagación sexual es raro, pero si ocurre, tiene una gran vinculación en la estrategia de reproducción y manejo de la PHF (Ali et al., 2015a).

Un estudio en secuenciación de genoma RNA-Seq para estimar y validar el secretoma y genoma de *M. roreri*, indicó una alta identidad entre la secuencia de los genes de *M. roreri* y *M. pernicioso*, respaldando la relación existente en taxonomía con *M. pernicioso* y la estrecha relación de este patógeno con otros basidiomicetos (Bailey et al., 2014). El análisis de datos RNA-Seq realizado de tejidos vegetales infectados con *M. roreri* mostró genes expresados de forma distinta en fases biotrófica y necrotrófica; lo cual se relaciona con la matriz intercelular y la modificación del micelio, probablemente para camuflaje del hongo de las defensas de la planta (Bailey et al., 2014).

Los frutos de cacao pueden ser colonizados por esporas que penetran la cutícula, invadiendo así los tejidos intercelulares (Bailey et al., 2018). Los síntomas que ocasiona como biotrófico (micelio grueso) es una enrevesada hinchada, produciendo frutos con malformaciones, los frutos menores a un mes presentan una mayor susceptibilidad (Bailey et al., 2018). Esta fase biotrófica puede extenderse entre 45 y 90 días, después de esto el patógeno realiza un cambio a fase necrótica, introduciéndose hacia el interior del fruto, a través de micelios delgados que producen la muerte celular y tejidos del fruto en términos de días (Bailey et al., 2018). Por tal motivo *M. roreri* es un hongo hemibiotrófico, que actúa como biotrófico durante las primeras fases de infección, luego producen la muerte de tejido y continúan su ciclo como necrotrófico.

Los hongos biotróficos radican una relación a fin al huésped por medio del desarrollo de hifas de infección en el interior de tejidos vegetales para la toma de nutrientes; ya que los hongos fitopatógenos deben crear estrategias de infección, penetrando la pared celular y resistir a las defensas de la planta, liberando nutrientes para su uso. (Mendgen & Hahn, 2002). Por otro lado, los hongos necróticos pueden secretar enzimas y toxinas que producen la muerte del huésped, para luego adsorben los nutrientes del tejido muerto. Ya

que suprimen la actividad inmunológica del huésped, y es así que los hongos hemibiotróficos han combinado estas dos estrategias para su beneficio (Horbach, Navarro-Quesada, Knogge, & Deising, 2011).

Un estudio de transcriptoma supone que las proteínas secretadas en fase necrótica atacan las paredes celulares de las plantas, resultando en necrosis. Estos genes se utilizan para una comprensión de la interacción de la enfermedad e identificar objetivos claves para restar el impacto de la enfermedad (Meinhardt et al., 2014).

## **UTILIDAD DE HERRAMIENTAS DE LA GENÉTICA POBLACIONAL**

Los alelos medios por población, heterocigosidad esperada y observada ( $H_e$  y  $H_o$ ) son herramientas muy usadas en evaluación de diversidad. Dentro de ello los parámetros más sencillos para evaluar diversidad son los índices de fijación o diferenciación genética; como el  $F_{ST}$  y  $G_{ST}$ , pero el más usado es  $F_{ST}$  (Weir & Basten, 1990). Debido a que pueden medir el grado de diferenciación a nivel genético de las subpoblaciones, calculando de esta forma la varianza de frecuencias alélicas y la significancia estadística de los valores  $F_{ST}$  entre los pares de genotipos o poblaciones (Weir & Cockerham, 1984). Para corroborar la hipótesis nula de alguna falta de diferenciación genética entre poblaciones existente, se puede emplear el análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier L, Smouse PE, 1992); así evaluar cómo se distribuye la diversidad dentro y entre grupo de poblaciones.

La metodología más usada para medir la distancia genética es la distancia genética estándar de Nei (Nei, 1972). Y para la observación de relación genética entre razas existentes se usa el método de adyacencia (N-J) mediante la reconstrucción de una filogenia (Saitou & Nei, 1987). El método de grupo de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA)

permite construir un árbol filogenético partiendo de una matriz de distancia. UPGMA considera una tasa de sustitución constante a lo largo del tiempo y linajes filogenéticos (Michael WeißMarkus Göker, 2011). El dendrograma UPGMA puede realizar acciones como cálculo de una matriz de similitud, y crear agrupamiento que utiliza el método de par ponderado con media aritmética (WPGMA) o el grupo de par ponderado con algoritmo de aritmética media (UPGMA) (Huw A. Ogilvie, 2018).

El coeficiente de Jaccard usado en dendrograma UPGMA es una medida del porcentaje de superposición entre individuos definidos; el valor de Jaccard puede estar entre 0 y 1, en lo cual el cero indica que no existe superposición y uno significa superposición completa entre los conjuntos de individuos (Valerio Arnaboldi, 2015).

### **Marcadores genéticos en estudio de agentes fitopatógenos (hongos)**

Con el Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), las endonucleasas de restricción de bacterias son ampliamente reportadas en investigaciones mostrando la variación de la secuencia de ADN en diverso número de organismos, entre ellos, los hongos. Esta técnica explota las variaciones del ADN por la abolición o creación de sitios para el corte de las endonucleasas, provistas por la adición o delección de fragmentos de ADN entre sus sitios. Por tanto un sitio de restricción polimórfico del ADN es detectado como RFLP a nivel fenotípico (Tanksley, 1989). El RFLP puede ser muy útil para aislar genes asociados a la patogenicidad y la virulencia, por otra parte el polimorfismo en el ADNr puede ser informativo hasta un nivel de especies de varios hongos (Anderson, Bailey, & Pukkila, 1989).

El Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) ha permitido hacer la discriminar la variación genética intraespecífica e interespecífica de *Cyphomyrmex minutus*, *mycorhizas* y *Fusarium spp* (Donaldson, Chopin, & Saunders, 1998). También

ha sido empleado en estudio de *Candida spp* y *Asperjillus fumigatus*, los cuales son hongos de gran valor para la salud humana (Van der, 1997). El AFLP tiene aplicación universal con gran potencial de reproducibilidad y discriminación, permitiendo la compilación de una gran base de datos de genotipos (Savelkoul et al., 1999).

Se ha estudiado la diversidad genética de *M. rozeri* con marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphism of DNA) en 12 municipios de Antioquia, mostrando seis grupos, en los cuales uno de los aislamientos obtuvo un 95% de similitud, con un coeficiente de similaridad de 0.7, concluyendo que la variación más grande se encontró dentro de los municipios (75.68%) y 5.94% entre subregiones (Grisales, 2007).

Los microsatélites (SSR) son unidades conformadas de 2 a 6 pb de longitud, con cinco a ciento de réplicas por *locus*. Son muy polimórficos y dispersos de forma aleatoria por todo el ADN cada 30 Kb (promedio), son de gran utilidad para genética poblacional, identificación personal, mapeo genético y evolución. Tienen aplicación en estudio de eventos pasados, temporales y presentes que perjudican la diferenciación de poblaciones, por lo cual se puede realizar estudio de la asociación entre estructura geográfica y estructura genética, e inferencias filogenéticas (21,50).

La determinación de microsatélites polimórficos con alto número de loci, podrían ser perfectos candidatos en estudio poblacional, debido a que son específicos para muchas especies de hongos. Muchos loci con cinco y siete repeticiones han sido polimórfico dentro de poblaciones de hongos, siendo actos para evaluación de especies (Dutech, 2007). Para el uso de microsatélites es necesario el conocimiento de la secuencia de la región para adquirir primers específicos (Goldstein et al., 1996). Los microsatélites poseen ventajas sobre marcadores AFLPs, RAPDs, RFLPs por poseer mayor grado de polimorfismo, son codominantes, presencia de un locus por microsatélite (Goldstein & Pollock, 1994).

La variación que puede existir en el ADN se deben a mutaciones, SNP, inserción o delección de fragmentos existentes en el ADN de diversos tamaños, que van de uno a miles de nucleótidos, lo cual hace que sean mejor que los microsatélites (Hood, Heath, Phelps, & Lin, 2004). Los marcadores genéticos (SNP) creados para *M. roseri* se pueden usar de forma amplia para la genética de poblaciones y análisis evolutivos del patógeno, lo cual podría ser un gran activo para la obtención de cacao tolerante a PHF (Ali et al., 2015a).

Los análisis con ITS son considerados muy útiles en evaluaciones moleculares. En Ecuador se estudió la región ITS de aislados de *M. roseri* pertenecientes a la Costa y Amazonía mostrando altos niveles de diversidad genética entre aislados (Maridueña-Zavala, Villavicencio-Vásquez, Cevallos-Cevallos, & Peralta, 2016).

#### **Asociación de marcadores fenotípicos y genotípicos (vinculación)**

A través de un estudio de diversidad genética de 56 muestras de *M. roseri* con marcadores (AFLPs) se encontró una alta diversidad genética que podría estar relacionada con la variabilidad morfológica, suponiendo así que la variabilidad genética se relaciona con la diversidad fenotípica (Suárez-Contreras, 2017). Así también un estudio con plantas de Henequen se pudo observar un agrupamiento de plantas madre de Henequén e hijas obtenidas por embriogénesis somáticas; se conservó intacta los patrones de marcadores moleculares en las hijas micropropagadas, mostrando que la diversidad genética está vinculada a la diversidad en los caracteres morfológicos (González, Alemán, & Infante, 2003).

Marcadores SNP en levaduras, han mostrado relación con la variación fenotípica (Dalman et al., 2013). Así también el rendimiento en cacao, y distancia geográfica se relacionaron positivamente con 96 tipos de marcadores SNP (Mustiga et al., 2018). De igual forma la

asociación de genoma completo (GMAS) obtuvo varios SNP vinculados con la resistencia a enfermedades, indicando ser muy útil para acelerar la resistencia a enfermedades del cacao (McElroy et al., 2018).

También se estudiaron las características morfológicas y moleculares, de un grupo de aislados de *M. royeri* de Ecuador, y se determinó que *M. royeri* tiene una alta diversidad molecular y morfológica, y que las características como el color de micelio del hongo patógeno puede estar asociada con la tasa de crecimiento o ITS – marcador RFLP (Maridueña-Zavala et al., 2016).

No obstante, un estudio de diversidad genética de loci de microsatélites con grupos de compatibilidad micelial de patógeno del suelo (*Sclerotinia sclerotiorum*), y diversidad fenotípica (sensibilidad a fungicidas, tasa de crecimiento, color de colonia, producción de ácido oxálico y virulencia); los resultados mostraron que no se detectó ninguna relación de forma aparente entre los rasgos fenotípicos y marcadores genéticos, efectuando una falta de correspondencia entre ambos marcadores a pesar de existir una alta diversidad genética (Attanayake, Porter, Johnson, & Chen, 2012).

## **IMPLICACIONES DEL ESTUDIO POBLACIONAL EN EL MANEJO DEL CULTIVO**

### **Fitomejoramiento del cacao**

Debido a la extensión de plantaciones de cacao las enfermedades se dispersaron en todos los países productores de cacao, lo cual requirió el establecimiento de programas para mejorar la resistencia, especialmente para escoba de bruja en nuestro país. Para lo cual se obtuvo clones para las zonas más afectadas. Se ha reportado problemas en la siembra de

un solo tipo de material o cultivar por razón de ser más susceptibles a plagas. Para elegir materiales resistentes se han realizado infecciones de diversas enfermedades en cómo (*Phytophthora palmivora*) escoba de bruja (*Crinipellis pernisioides*) y pudrición helada del fruto (*M. royeri*), cuyas características se usaban en programas de mejoramiento.

Al obtener materiales deseables se elaboró bancos de germoplasmas y se distribuyó haciendo intercambios en países productores. Las mayores dificultades presentes han sido la validación de materiales resistentes en programas de investigación en mejoramiento de cacao. Actualmente aún se manifiesta que existe poco interés en introducir características deseadas como alto rendimiento, vigor, precocidad, madurez temprana, resistencia enfermedades. Las dificultades en árboles perennes en busca de la resistencia genética son problemas fitosanitarios como factor depresivo de la producción, en lo cual el mejoramiento genético ha sido muy lento a pesar de tener más de 60 años, debido a factores financieros decrecientes en esta temática, descuidando así materiales diversos como fuente de germoplasma, lo cual es una base genética fundamental para el mejoramiento (José Guillermo Rondón C., 2020).

Para la prevención de la enfermedad se utiliza materiales resistentes, pero el principal problema es la variabilidad del hongo fitopatógeno como lo es *M. royeri*, que adquiere una adaptación rápida a las condiciones ambientales, haciendo posible su dispersión y colonización de materiales que presentan características de resistencia (Gardini Enrique Arévalo,, Sánchez-Torres Gina Paola, Eibis, Flores, Kadir, Markes, Betsabe, Leon-Ttacca, Dapeng, Zhang, Lyndel, Meinhardt, Virupax, 2017).

Las respuestas de resistencia de ciertos clones de cacao pueden aumentar o disminuir la incidencia de *M. royeri* según las condiciones ambientales. La diferencia de resistencia entre los clones se debe a los genes de resistencia acumulados, y podría alterarse debido a

variantes climáticas. El éxito de la resistencia en el cacao contra la germinación y penetración de hongos se da por activación de la inmunidad activada PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*), denominada *PAMP-triggered immunity* (PIT), que se encuentra en la superficie de células vegetales como sistema de resistencia; y por la inmunidad activada del efecto ETI (*effector-triggered immunity*); el efecto favorable de estos dos eventos es dependiente de la humedad y la temperatura, el mecanismo de resistencia del hospedante, fruto de la ETI internamente, se activa contra la colonización, donde la temperatura es vital en el éxito de dichas estrategias (B.A. & Ogundeji, 2017).

Generar variedades mejoradas genéticamente ha sido el medio apropiado para controlar enfermedades, ya que es rentable y no genera costo a los agricultores (63,64). La herencia resistente de cacao a las distintas enfermedades es variable; y *M. royeri* es poligénica, aunque existen diferentes niveles de resistencia basados en sistemas poligénicos. (Phillips Mora, 1986). Se ha informado cinco loci de rasgos cuantitativos (QTL) de resistencia del cacao contra PHF, y 873 genes de *M. royeri* diferentes que son expresados con la diferencia de que; si la planta de cacao es susceptible o tolerante, identificados mediante el análisis de RNA.seq (Bailey et al., 2014).

En el fitomejoramiento de cacao se ha estudiado mayormente la incompatibilidad de materiales. Y dentro de las prioridades está el mejoramiento de la resistencia a patógenos, pero el progreso ha sido limitado por la pérdida de germoplasma de cacao; pruebas deficientes de selección, ausencias efectivas de mejoramiento. Las enfermedades importantes no pueden ser ignoradas, por ello la resistencia debería recibir prioridad en los programas de mejoramiento con el motivo de mejorar ingresos económicos de pequeños y grandes productores. Pero en principio, en todo el mundo la prioridad era aumentar la producción, pero es necesario adoptar nuevas tecnologías si se quiere optimizar y acelerar la ganancia genética en el mejoramiento por resistencia.

El mejoramiento de la resistencia necesita una amplia base de recursos genéticos de cacao y datos de campo que son vitales para empezar un programa de evaluación de genotipos resistentes; en el cual los ensayos de inoculación artificial son muy esenciales para conocimiento de progresos satisfactorio en mejoramientos enfocados a la resistencia. También se debe mejorar la formación y arquitectura de la planta como un mecanismo de resistencia, tales como copas abiertas, lo cual ayuda a prevenir mayores impactos de infección (José Guillermo Rondón C., 2020).

### **Manejo de enfermedades**

El manejo del cacao se desarrolla con firmes medidas de cuarentena, destrucción de partes infectadas de la planta, saneamiento, clones resistentes, uso de fungicidas, antagonistas. En Cuba el manejo y contención de las enfermedades causadas por *M. royeri* y *M. pernicioso* se realiza con medidas estrictas cuarentena (H C Evans, Evans, & Stahel, 2018). Las tácticas estratégicas para el control de enfermedades como *M. royeri* deben ser diseñadas a escala regional para prevenir la diseminación de este hongo de una localidad geográfica a otra (Jaimes et al., 2016b).

### **Uso de fungicidas**

Para manejo de enfermedades en cacao se usa fungicidas a base de cobre, pero esto podría traer implicaciones de impacto negativo al acumular residuos de cobre en el suelo y en las plantas de cacao, análisis han demostrado que los suelos de plantaciones de cacao, eran más altos en cobre de manera significativa, que los suelos forestales adyacentes (P. Addo-Fordjour, H. Gyimah Gyamfi & Akrofi, 2013).

El uso de fungicida cúprico ha disminuido la incidencia de *M. royeri* hasta un 10%, tradicionalmente se utilizaba fungicidas a base de Clorotalonil y oxido cuproso en temporadas lluviosas, pero luego fueron reemplazadas por moléculas con menor toxicidad como el azoxystrobin, hidróxido de cobre, y fluotalonil; el Iniap reporta que en la provincia de Manabí los agricultores no acostumbran a utilizar fungicidas para el manejo de la enfermedad, reportándose pérdidas de un 60% en la producción (INIAP-DICYT, 1BC).

El cobre puede reaccionar en la superficie celular, y podría interrumpir la función de la membrana, inhibiendo la obtención y producción de enzimas fúngicas extracelulares, pero no se ha detectado que los hongos hayan desarrollado resistencia ante el cobre (Circabc, 2011).

## CAPITULO 2

### METODOLOGÍA

#### 2.1 Obtención de material biológico y aislados de *M. royeri*

Los aislados de *M. royeri* se aislaron de plantas de cacao correspondiente a productores de la Amazonía y Costa. Los clones adquiridos para las pruebas *in vivo* fueron EET96 y EET103 ubicados en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Para la obtención de cepas del patógeno se muestreo las provincias de Zamora Chinchipe, Orellana, Sucumbíos, Morona Santiago, Napo, Pastaza, El oro, Los Ríos, y Guayas. Cada coordenada geográfica fue asociada con atributos de vegetación, clima, precipitación y tipo de suelo usando las capas de información *shapefile* del Sistema de Información de SIGTIERRRAS, INAMHI y SIPA-MAGAP, para poder asociarlos con las condiciones ambientales del sitio de colecta (Anexo 1-3). Para definir los atributos de cada punto geográfico se procedió de la siguiente manera:

En cada finca se tomaron entre una y dos mazorcas de cacao con signos de la enfermedad y con menos del 25% de afectación, separadas por un mínimo 10 km una de otra. En cada sitio se registraron los siguientes datos: coordenadas geográficas, toponimia, ubicación político-administrativo, y genotipo de cacao reportado por el productor. Se determinó *in situ* el porcentaje de incidencia de enfermedad, en base al número de frutos totales, y enfermos en la planta de la que se tomó la muestra, y de las 3 a 4 que la rodeaban.

Los frutos fueron envueltos en papel Kraft y conservados a temperatura ambiente en lugar fresco por un máximo de 3 días hasta su procesamiento en el laboratorio. Cada día se cambió el papel para evitar la rápida afectación del fruto. Las muestras, y toda la parte

experimental *in vitro* se realizó en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

**Aislamiento y purificación.** Se aisló el patógeno de frutos que mostraron síntomas tales como necrosis o esporulación de la enfermedad. Se cortaron fragmentos de las mazorcas, tomando una parte sana y otra parte enferma en segmentos de 0.5 cm<sup>2</sup> de cada fruto. Los fragmentos fueron desinfectados en tres tratamientos de solución: alcohol 70%, cloro al 2%, y agua destilada estéril por 2 min. Después se dejaron secar en papel toalla estéril; luego se sembró cuatro trozos en una caja Petri en medio de papa dextrosa agar (PDA, BD Difco™), y fueron incubadas a 27°C por 2-4 días o hasta verificar el crecimiento del patógeno, para ser aislado en una nueva caja Petri (Carrera-sánchez, Paredes, & Autora, 2014; Wilbert Phillips-Mora, 2003).

**Cultivo monospórico.** Al obtener el aislamiento de colonias fueron sembradas en caja Petri y se incubaron por 11 días, después en una cámara de flujo, se agregó 1 mL de agua estéril sobre la colonia y fue frotada cuidadosamente para obtener el desprendimiento de los conidios, esta solución se pasó a un tubo de 15 mL que contenían 8 mL de agua estéril. Se realizó diluciones de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup> según lo necesario para alcanzar una concentración de conidios entre 50 y 100 conidios. Después se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer. De la solución escogida se tomaron 100 µl y se sembró en una nueva caja Petri, esparciéndolo de manera uniforme sobre la caja con un asa estéril. Se dejó incubar a 25°C por 3 – 5 días hasta visualizar en el estereoscopio el desarrollo de una espora. Después del aislamiento se realizó cultivo monospórico, sembrando un conidio en una caja Petri, después se dejó incubar a 25°C por 11 días según el tamaño de la colonia para realizar la respectiva conservación de los aislados en tubos de 1,5 mL con agua destilada estéril. Se realizó este proceso según el cultivo monospórico de Garzon del año 2013 (Garzon, 2013).

El total de aislados monospóricos se conservan en el CCM-CIBE (Cultivo de colecciones de microorganismos del CIBE).

## **2.2 Estimación de la sensibilidad de *M. royeri* al fungicida flutolanil y Azoxystrobin.**

Se empleó la técnica de medición del crecimiento micelial en medio de cultivo suplementado con el fungicida. Se utilizó el producto comercial Moncut 20 SC (*Arysta LifeScience*) como fuente del principio activo (flutolanil) y el medio papa dextrosa agar (PDA, BD Difco™) como sustrato, respectivamente. Se preparó una solución madre 1:10 (v/v), a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones de los experimentos.

Se realizó diluciones seriadas preparando 1:10 para adquirir las concentraciones para el experimento. El medio de cultivo fue (PDA), las soluciones se agregaron cuando el medio obtuvo una temperatura aproximada de 50°C para evitar que el fungicida pierda su efectividad, el volumen que se agregó en cada caja Petri fue de 10 ml, la cual tenía un tamaño de 90 x 15 mm (Magdiel Torres de la Cruz, 2011a). Las concentraciones preliminares fueron desde 1, 0.1, 0.01, 0.001, y 0.0001 µg/ml y se realizaron evaluaciones a los 3, 6, y 9 días. Las cepas para este ensayo fueron dos MR63 y MR85 (Anexo 1).

El tiempo de incubación de los aislados para el desarrollo de los experimentos fue de 11-15 días. De cada aislado se tomó un disco de 0.5cm de diámetro con un sacabocado y se sembró en el centro de la caja Petri con el medio envenenado, empleando cinco réplicas por cada tratamiento. Pero el experimento final se consideró utilizar solo las primeras cuatro concentraciones, con su respectivo control, el cual no tenía fungicida.

Para el fungicida azoxystrobin se realizó un ensayo preliminar con 10 aislados (MR32, MR39, MR50, MR53, MR54, MR63, MR73, MR76, MR77, MR85) (Anexo 1). Se utilizó grado reactivo disuelto con Dimetilsulfóxido (DMSO). Las concentraciones fueron a 10,

1, 0.1, 0.01, y 0.001  $\mu\text{g/ml}$ , con cuatro replicas por tratamiento, las concentraciones finales del experimento fueron a 1, 0.1, 0.01, 0.001, y 0.0001  $\mu\text{g/ml}$ .

Las cajas fueron incubadas a  $27^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 6 días, después se midió el área de crecimiento radial ( $\text{cm}^2$ ), y se estimó el Porcentaje de Inhibición de Crecimiento micelial (PIC) para observar la evolución del crecimiento del patógeno en cuanto a su uniformidad (Mohammed Ezziyyani, Consuelo Pérez Sánchez, 2004). El PIC en términos de porcentaje por cada concentración, nos permitió generar curvas de crecimiento, para observar la uniformidad de efecto fúngico sobre el crecimiento micelial. También se utilizó para realizar agrupamientos en base a aislados que indicaron menor susceptibilidad.

#### **Determinación de la sensibilidad mediante $\text{IC}_{50}$ .**

A partir del promedio de los cuatro puntos leídos en la caja Petri y mediante la fórmula  $A = \pi r^2$  se estimó el área de la colonia ( $\text{cm}^2$ ) (Magdiel Torres de la Cruz, 2011a). Estos valores se generaron columnas horizontales para todas las cepas evaluadas y se transformó las concentraciones fúngicas a ( $\text{Log}_{10}$ ). Estos datos fueron cargados en el software Graph Pad Prism v.6 para el cálculo de la concentración inhibitoria media.

#### **2.3 Estimación de la agresividad de *M. roreri***

Se realizó el experimento en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Boliche, a partir del mes de octubre, presentándose condiciones en el campo de bajas temperaturas, y el comienzo de las condiciones ambientales adecuadas para desarrollo de *M. roreri* en la zona.

#### **Polinización e inoculación de frutos**

Se eligió un genotipo de cacao susceptible a la pudrición helada del fruto: EET-96, y el EET103 (Clones del INIAP) que presentan una resistencia moderada. Los árboles fueron sometidos al riego para provocar la floración, se eliminaron los brotes y chupones de la planta, limpiando alrededor de la misma. La polinización dirigida se realizó mediante la protección de los botones con tubos (Eppendorf de 1.5 mL) para que no ocurra la fecundación natural. Al día siguiente se realizó la polinización artificial de forma manual para la obtención de frutos con una edad conocida. La edad de los frutos que se obtuvo para la inoculación de *M. royeri* fue de 15 y 29 días (Fig. 1).



Figura 1. polinización de clones EET96 y EET103 con padre CCN-51, e inoculación de *M. royeri*.

Los frutos fueron protegidos con una funda, evitando así la contaminación exterior hasta el momento de la inoculación. El número de aislados de *M. royeri* para la inoculación fueron tres, los cuales se escogieron de acuerdo con resultados obtenidos de marcadores fenotípicos (sensibilidad a fungicida), se utilizaron entre 6-8 frutos por árbol. Se empleó concentraciones de  $1 \times 10^6$  esporas/ml en un volumen de 0.5-2ml por fruto mediante un atomizador y fue protegido con una funda plástica de polietileno transparente (Phillips

Mora, 1986). Se realizaron 4 réplicas por tratamiento más el control, siendo un total de 8 frutos por aislado.

### **Caracterización patogénica de los aislados**

Se determinó la severidad externa a partir de la aparición de los primeros síntomas (3 semanas), y hasta la formación de esporas (8 semanas), basado en signos del patógeno; grado 1 = fruto sano, grado 2= 1-25% con síntomas de protuberancia o Giba; grado 3= 26-50 inicio de mancha; grado 4= 51-75% mancha; grado 5= 76-100% esporulación (Cárdenas, 1986). Para comparar la agresividad externa causada por las cepas se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), por medio de la fórmula propuesta por Shaner y Finney 1977 (Shaner et al., 1977):

$$ABCPE = \sum_i^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Donde  $y_i$  representa el índice de infección (severidad), en diferentes momentos de evaluación ( $t_i$ ).

Para la base de datos a analizar se tuvo en cuenta el grado de daño externo con valores según la escala de 1-5, y el tiempo a evaluarse que fue desde de 1 a 8 semanas. Al transcurrir las ocho semanas los frutos se cortaron longitudinalmente para estimar la severidad interna, la que fue expresada según valores de la escala que parten de 0-5 donde: grado 0= 0% área necrosada, grado 1= 1-20% necrosada, grado 2= 21-40% necrosada, grado 3= 41 – 60% necrosada, grado 4= 61-80% necrosada, grado 5= >80% necrosada (Phillips-Mora, Castillo, Krauss, Rodríguez, & Wilkinson, 2005). Se clasificarán los nivel de daños según escala de *Phillips-Mora et al 2005*, categorizados como resistente (0-1,25), los que son moderadamente resistente (1,26 - 2,50), los moderadamente susceptible (2,51 – 3,75) y de (3,76 – 5,0) los susceptible (Phillips Mora, 1986; Sterling Cuéllar et al., 2015).

## 2.4 Cuantificación de la diversidad genética y su distribución intra e interpoblacional de *M. royeri* mediante marcadores (ISSR).

### 2.4.1 Amplificación de microsatélites mediante PCR

**Extracción de ADN.** A partir de micelio obtenido de colonias de 11 días, las mismas se rasparon en flujo laminar, se trituró el micelio en eppendorf de 1,5 mL con un pistilo y 350  $\mu$ L de buffer de extracción (Tris-HCl). Posteriormente, se agregaron 150  $\mu$ L de acetato de sodio, se agitó en vortex (1 min), incubación (-20 °C/ 20 min) y centrifugación (10 min). En tubos nuevos se mezclaron 500  $\mu$ L del sobrenadante y 500  $\mu$ L de isopropanol, centrifugación (3 min), se lavó el *pellet* dos veces (40  $\mu$ L de etanol al 70%) y centrifugación. El *pellet* se secó al vacío en *Eppendorf Vacufuge plus* (20 min); el ADN fue hidratado en 40  $\mu$ L de agua destilada estéril, y cuantificado el ADN (Nanodrop 2000), la concentración de ADN se ajustó a 60 ng/  $\mu$ L, la calidad de ADN en geles de agarosa al 2% y se almacenó a (-20 °C) (Weiland John J., n.d.).

**Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).** Se utilizaron 12 cebadores utilizados para *M. royeri* (Tabla 1). El volumen de la reacción final fue de 25  $\mu$ l, conteniendo la siguiente mezcla: 12.5  $\mu$ l de Go Taq® Green Master mix combinado con 0.5  $\mu$ l de cada cebador, 2  $\mu$ l de ADN (30 ng/ $\mu$ l) y 9.5  $\mu$ l de agua bi-destilada. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 94°C a 4 min, seguidos por 12 ciclos touchdown de 40 s a 94°C; 40 s a 60°C; y 1 min a 72°C, disminuyendo 1°C por ciclo hasta 48°C; terminando con 10 ciclos de 4 min a 94°C; 1 min a 48 °C; y 1 min a 72°C y una extensión final de 4 min a 72°C, terminando con 20 ciclos de 4 min a 94°C; 1 min a 48°C; 1 min a 72°C y una extensión final de 4 min a 72°C. Este procedimiento se llevó a cabo con todos los cebadores, excepto para los cebadores MR10 y MR15 (Tabla 1) que utilizaron una temperatura de anillamiento de 56°C.

Las mezclas de reacción de los cebadores #816 y #890 fueron 12.5  $\mu$ l de Go Taq® Green Master mix combinado con 0.75  $\mu$ l de cada cebador, 2  $\mu$ l de ADN (30 ng/ $\mu$ l) y 9.75  $\mu$ l de agua bi-destilada. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 94°C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C para el cebador #816 y 1 min a 56°C para #890, una extensión de 72°C por 1 min, y una extensión final de 10 min a 72°C (Melo et al., 2014a; Wang, 2011).

Tabla 1. Características de cebadores ISSR con tamaños esperados para *M. roreri*

Nombre (locus)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Tipo de repetición (bp)	Rango esperado (pb)	# Alelos esperados
MR*6	TD 60–48	[AGA]6	127–130	2
MR10	56	[AAC]6	121–133	4
MR11	TD 60–48	[GAGAA]12	139–149	3
MR12	TD 60–48	[TCT]5	132–138	2
MR13	TD 60–48	[GAA]5	124–139	4
MR15	56	[GTG]6	154–160	3
MR22	TD 60–48	[CAA]3CAG[CAA]3[CAG]3	141–150	3
MR30	TD 60–48	CAA[CAG]6CAA[CAG]3	134–149	5
MR31	TD 60–48	[AGA]5	146–149	2
MR33	TD 60–48	[GAAGGA]4	101–125	4
#816**	52	(CA)8T	200-1700	9
#890**	56	VHV***(GT)7	310-1575	12

\*(Melo, 2014)

\*\* (Phillips Mora, 2007)

\*\*\* B = (C, G o T), H = (A, C o T) y V = (A, C o G)

Para todas las muestras las electroforesis se realizaron en geles de agarosa (Agarose, LE, Analytical Grade) al 2% preparados con Tris-acetate-EDTA (TAE) en concentración 1x, teñidos con 1  $\mu$ L de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) por cada mL de TAE. Se cargó un volumen de 5  $\mu$ L de producto PCR, y se utilizó 25/100pb Mixed DNA Ladder (Bioneer) como marcador de peso molecular. Los geles se corrieron a 140 voltios durante 90 minutos. Para una mejor visualización de las bandas de ciertos geles que no podían ser

identificadas, se realizó electroforesis con agarosa de alta resolución (Agarose SFR™) al 3%, pero para una adecuada manipulación del gel se agregó 25% de agarosa y 75% de agarosa de alta resolución a 140 voltios durante 100 minutos. El programa de análisis molecular incorporado en el fotodocumentador imager Doc XR (Bio.Rad, California, USA) se usó para el cálculo de tamaños de alelos.

#### 2.4.2 Análisis de la diversidad genética

Se determinaron los perfiles de microsatélites de 76 aislados, mediante 12 marcadores ISSR. Pero según el polimorfismo que mostraron los marcadores, se realizó el análisis con 9 marcadores. La base de datos de microsatélites se elaboró con el número de alelos por marcador y por muestra, y también con los tamaños en pares de base (pb), se encontraron entre cero y un máximo de siete alelos en la colección analizada. En base a los pesos moleculares por cada locus (marcador ISSR) se determinó el N° de alelos por marcador y por muestra (matriz de 0 a 7). Con estos datos se calcularon: la frecuencia alélica  $f(A)$ , el Índice de Contenido Polimórfico (ICP), el índice de fijación ( $F_{ST}$ ), la heterocigosidad esperada de Nei ( $H_S$ ) (Goudet, 2003). Se hicieron corridas en dos softwares para contrastar los resultados en dichos programas. En el software GenAlex (ver. 6.51) se calculó como organismo haploide y como diploide en el Fstat (ver. 2.9.4). Aunque Fstat es por defecto para organismos diploides, se puede usar para haploides siempre que se codifiquen los genotipos haploides como diploides (detallando dos veces el identificador del alelo). Se calculó la varianza molecular (AMOVA con 9999 permutaciones) para conocer variación genética dentro y entre las poblaciones predefinidas.

$f(A)$  : se estimó por cada muestra y de manera general en la población, obteniéndose el número de individuos tipeados, siguiendo la ecuación:  $f(A) = \frac{\# \text{ alelos observados}}{\# \text{ total de alelos}}$

**Índice de contenido Polimórfico (ICP):** se evaluó la información de cada marcador o *locus* en la población según la frecuencia de alelos. Se obtiene de multiplicar la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la probabilidad de que sean informativos, es decir, que se pueda identificar al progenitor del que procede el alelo (Botstein, et al., 1980). La fórmula seguida por estos autores fue la siguiente:

$$ICP = 1 - (\sum_{i=1}^n p_i^2) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

dónde:  $p_i$  es la frecuencia del alelo I,  $p_j$  es la frecuencia del alelo J y n es el número en un *locus*.

**Diversidad genética dentro de la población ( $H_s$ ):** nos permite conocer que tan diferente puede ser dos alelos elegidos al azar así como el nivel de heterocigosidad esperada para nuestras poblaciones (Nei, 1987). La ecuación es la siguiente:

$$H_s = \frac{n}{(n-1)} \left[ 1 - \sum_i p_i^2 - \frac{H_o}{2n} \right]$$

$$\text{Dónde: } n = \frac{np}{\sum_k 1/n_k} \text{ y } p_i^2 = \sum_k p_{ki}^2 / np$$

### **Índice de fijación o diferenciación ( $F_{ST}$ )**

Expresa la proporción de la variación genética total que se mantiene o existe entre las poblaciones. En las frecuencias alélicas para genotipos que más se separan deberían ser mayormente homogéneos que los individuos que se mantienen en su origen territorial. Por lo cual se espera que  $F_{ST}$  sea más alto para el sexo o genotipo menos dispersos, que los genotipos dispersos. De los estimadores existentes se escogió Weir y Cockerham, 1987, ya que es imparcial y el más usado (Weir & Cockerham, 1984). La ecuación es la siguiente:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

$H_T$ : diversidad total

H<sub>s</sub>: diversidad genética dentro de la población

Puede existir baja diferencia genética ( $F_{ST} < 0.05$ ), moderada (0.05-0.15), grande (0.15-0.25), y muy grande diferenciación genética ( $> 0.25$ ), según Hartl y Clark 1997 (Charlesworth, 1999).

**Determinación de la relación entre los aislados.** Se realizó sobre la matriz de presencia y ausencia (matriz binaria) obtenida a partir de la matriz descrita anteriormente. Se realizó un análisis de conglomerados por el método promedio no ponderado por grupo (UPGMA), y la métrica Jaccard. El resultado se visualizó mediante un dendograma obtenido con el software XLSTAT.

#### **Análisis de datos**

Para el cálculo de la IC<sub>50</sub> se utilizó el software Prism 6 (GraphPad), el cual requirió que las concentraciones del fungicida sean transformadas a logaritmo base diez ( $\text{Log}_{10}$ ). Los grupos sensibilidad de *M. royeri* fueron agrupados tomando la IC<sub>50</sub> de cada aislado, e ingresados al software infoStat para ser analizados. Para realizar gráficos de severidad y cálculo de diferencias significativas entre variables se utilizó el software SigmaPlot 12.0. Para obtener la cantidad de alelos por locus, se usó el software FSTAT versión 2.9.3.2 y se confirmó los resultados con el software GenAlEx 6.5. Para maximizar la homogeneidad dentro de grupo, se generó un dendograma *heatmap*, según el método de *Ward* en el software R. v. 3.6.2. Para relacionar el muestreo de *M. royeri* según el clima, precipitación y tipo de suelo geográfico, se cargaron mapas del Ecuador con imágenes *shapefile*, en el software MapWindow 5.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Aislamiento, purificación y conservación de aislados

De 76 aislados que se muestrearon, en la provincia de la Costa se aislaron 5 de Los ríos, 5 de Guayas, y 14 de El Oro. De la Amazonía se obtuvieron 13 aislados de Sucumbios, 5 de Napo, 9 de Orellana, 4 de Pastaza, 7 de Morona Santiago, y 16 de Zamora Chinchipe (Anexo 4). La distribución geográfica de los puntos se muestra en la (Fig. 2).

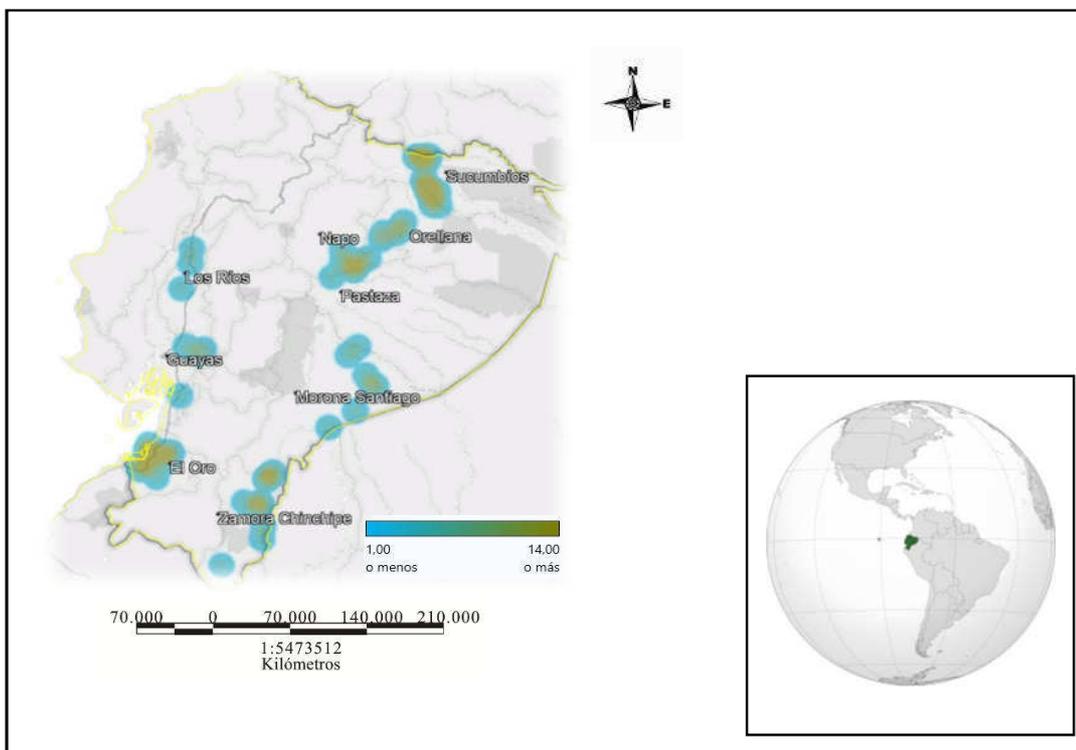


Figura 2. Distribución geográfica de PHF, puntos de color verde muestra mayor número de aislados.

### 3.2. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PIC) del flutolanil y Azoxystrobin contra *M. roseri*.

#### 3.2.1. Evaluación del efecto de flutolanil contra *M. roseri*

Los aislados obtenidos fueron inhibidos en más del 91% a la máxima concentración probada (Tabla. 2), en particular, 76 aislados fueron inhibidos al 100% a concentraciones de 1 µg/ml. La concentración 0.01 fue la que mejor discriminó la muestra de aislados por su afectación en el crecimiento micelial, según la frecuencia de aislados por las clases de PIC (Tabla. 2). Al bajar la concentración la discriminación entre los aislados disminuyó al mostrarse solo tres clases de PIC en la Tabla 1. Notoriamente, a 0.01 µg/ml y 0.001 µg/ml aparecen aislados que son estimulados en su crecimiento.

Tabla 2. Frecuencia por PIC de flutolanil para los aislados de *M. roseri*

PIC %	1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.01 µg/ml	0.001 µg/ml
<b>91-100</b>	76	38		
<b>81-90</b>		20		
<b>71-80</b>		12	2	
<b>&lt;70</b>		8	57	40
<b>Estimula</b>			17	36

Al agrupar los aislados por su homología de crecimiento en respuesta al flutolanil, observamos que a esas concentraciones hay tres grupos que estimulan (Fig. 3, zona sombreada). es decir que los PIC con valor inferior a cero indican que los tratamientos con fungicidas crecen más que los controles en medio PDA. Vale destacar que la mayoría de los aislados (Fig. 3, grupo amarillo) nunca estimuló el crecimiento a ninguna de las concentraciones.

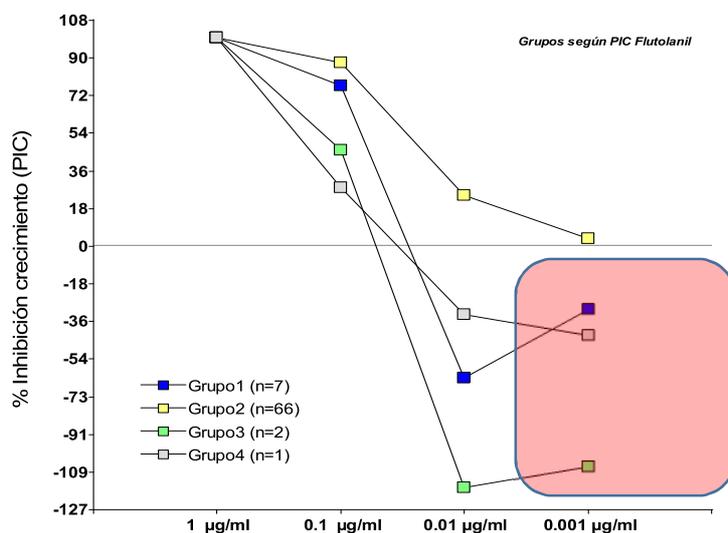


Figura 3. Dinámica de inhibición del crecimiento de *M. roreri*. Ciertos aislados mostraron un PIC positivo, indicando que estimulan su crecimiento. Agrupamientos por análisis de clúster usando como variables las concentraciones.

### 3.2.2. Evaluación del efecto de azoxystrobin contra *M. roreri*

Todos los aislados fueron inhibidos en más del 91% a concentraciones de 1 µg/ml. La concentración de 0.1 y 0.01 fueron las que mejor discriminaron la muestra de aislados por su efecto en el crecimiento micelial, según la frecuencia de aislados por las clases de PIC (Tabla.3). Al bajar la concentración la discriminación entre los aislados disminuyó al mostrarse tres clases de PIC positivo y un PIC negativo, que corresponde a un solo aislado (MR41) que fue estimulado en su crecimiento a la concentración de 0.0001 µg/ml (Fig. 4).

Tabla 3. Porcentaje del PIC a diferentes concentraciones

PIC %	1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.01 µg/ml	0.001µg/ml	0.0001µg/ml
91-100	66	63	21	2	
81-90		3	25	11	2
71-80			16	12	8
<70			4	41	55
Estimula					1

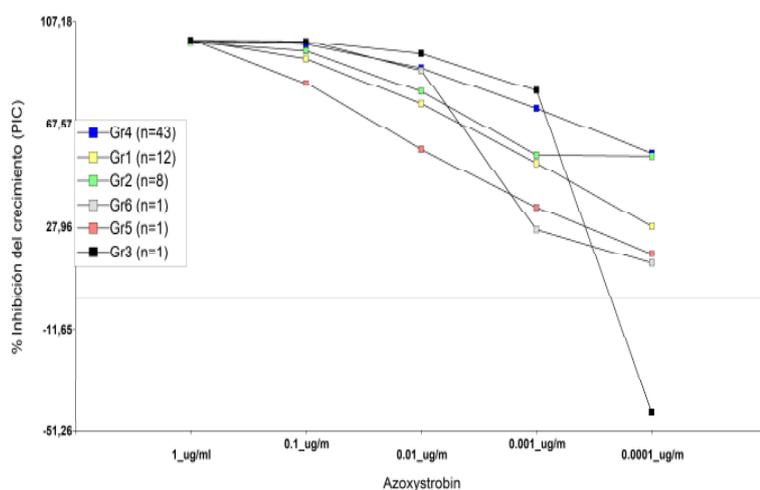


Figura 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento de azoxystrobin contra *M. royeri*. Todos los grupos indican un PIC positivo, menos el grupo 3 (1 aislado) que fue estimulado en su crecimiento.

### **3.4 Sensibilidad de *M. royeri* a los fungicidas flutolanil y azoxystrobin**

#### **3.4.1. Estimación de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de *M. royeri* al flutolanil**

La sensibilidad de los aislados al flutolanil se expresó mediante la IC<sub>50</sub>, la sensibilidad fue alta, observándose valores extremos de 0.003 a un máximo de 0.15 µg/ml (ver anexo 4 para detalles de cada aislados). Usando las IC<sub>50</sub> de cada aislados como variable se formaron dos grupos de homología en el análisis de agrupamiento (Fig. 5A) de ligamiento promedio (distancia euclídea). El grupo 1 contenía el 97.36%, el grupo 2 estuvo formado por los aislados menos sensibles (2.63%) con una IC<sub>50</sub> promedio de 0.13 µg/ml. Independientemente de la topología del dendrograma, se definieron solamente dos grupos por las siguientes razones prácticas: un corte aproximado del dendrograma a la mitad de la similitud del mismo, por el histograma (Fig. 5B) que muestra una discontinuidad en la distribución dentro de la población y por la poca diferenciación en los valores de IC<sub>50</sub> de la mayoría de los aislados.

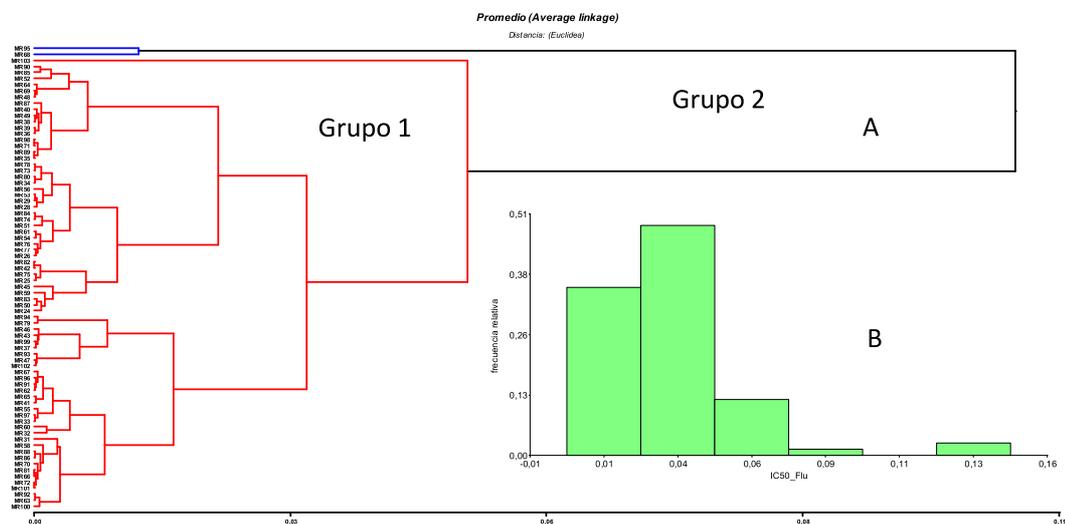


Figura 5. Agrupamiento de los aislados de *M. royeri* en función de los IC<sub>50</sub>. Las medias de cada grupo fueron: grupo 1 (74 aislados) obtuvo una IC<sub>50</sub> entre 0.003 y 0.08 μg/ml, el grupo 2 (2 aislados) entre 0.13 a 0.15 μg/ml (A). Muestra la frecuencia relativa en μg/ml de los aislados en función de las concentraciones IC<sub>50</sub> (B).

Todos los aislados presentaron una alta sensibilidad al fungicida. Se destaca entre ellos un aislado de la provincia del Oro y uno correspondiente a la provincia de Orellana que obtuvieron menor sensibilidad (Fig. 6).

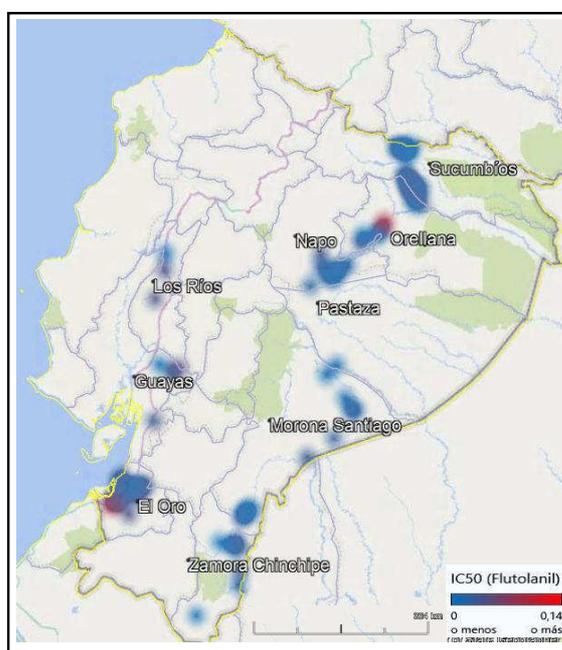


Figura 6. Distribución espacial de los aislados en función de la sensibilidad al flutolanil. Con azul indica sensibilidad homogénea que fue entre 0.02  $\mu\text{g/ml}$  y 0.04  $\mu\text{g/ml}$ . El color rojo muestra los dos aislados que fueron menos sensible pertenecientes a El oro y Orellana con dosis de 0.13  $\mu\text{g/ml}$  y 0.15  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.4.2 Estimación de la concentración inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ ) de *M. royeri* al fungicida azoxystrobin

La  $\text{IC}_{50}$  para cada aislado están detallados en el Anexo 4. Se muestra dos grupos bien definidos realizados según la  $\text{IC}_{50}$  de *M. royeri* al fungicida. También se describe la

frecuencia de aislados que obtuvieron una alta sensibilidad, y otros que mostraron una menor sensibilidad (Fig. 7). Pero en general los aislados fueron altamente sensible a azoxystrobin.

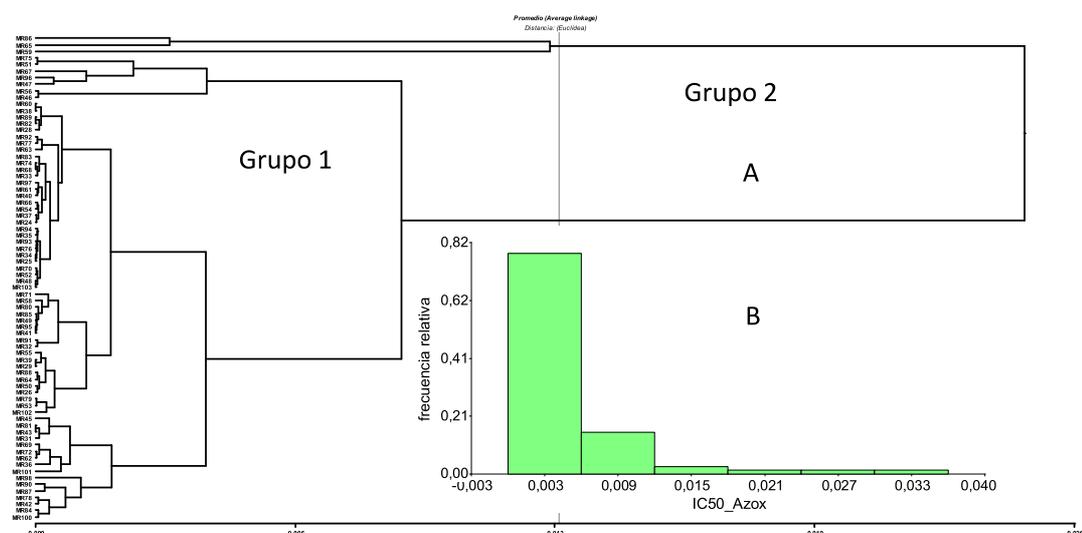


Figura 7. Agrupamiento de los aislados de *M. royeri* en función de los IC<sub>50</sub>. Las medias de cada grupo fueron: grupo 1 (71 aislados) obtuvo una IC<sub>50</sub> entre 0.00002 a 0.01462 μg/ml, el grupo 2 (3 aislados) entre 0.0220 a 0.0364 μg/ml (A). Frecuencia relativa de los aislados en función de las concentraciones IC<sub>50</sub> (B).

### 3.5 Determinación de la agresividad de aislados de *M. royeri* mediante ensayos *in vivo* en frutos de *T. cacao*.

#### 3.5.1 Evaluación de los clones de cacao EET96 y EET103 frente a *M. royeri* mediante la severidad interna y externa.

La figura 8 describe los efectos de *M. royeri*, que se originan desde la tercera a octava semana post inoculación de frutos. Los daños causados por *M. royeri* según la severidad externa, no son significativos ( $P=0.448$ ) entre clones; debido a que el daño (necrosis), no

supera el grado dos de la escala (25%). Igualmente, los daños de severidad interna provocados por *M. royeri* en los frutos, tampoco fueron significativos ( $P=0.082$ ) entre los dos clones de cacao, ya que el grado de afectación estuvo entre cero y dos (0-20%) (Fig. 9).



Figura 8. Efecto de *M. royeri* sobre frutos de cacao durante ocho semanas de evaluación. Primera imagen a izquierda corresponde al momento de la inoculación. Seguido de los daños adquiridos a partir de la tercera a la octava semana.

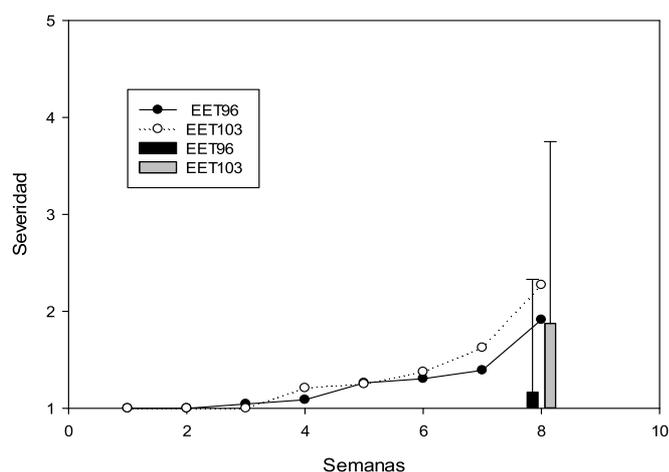


Figura 9. Promedio de los niveles de daño externo e interno por pudrición helada del fruto en clones de cacao inoculados con varios aislados de *M. royeri*. En línea se representa la

severidad externa de (Cardenas y Giraldo,1986) y en barra la severidad interna (Phillips-Mora, 2005). Sin diferencias significativas entre clones en ninguno de los momentos ( $p < 0.05$ , datos no mostrados).

### Agresividad de tres aislados de *M. royeri* en dos clones de cacao

Según el ABCPE, los valores más altos indican el mayor daño causado por el patógeno. En este sentido, únicamente en el clon EET96, el aislado MR59 mostró diferencia significativa ( $P=0.003$ ) respecto al control; el aislado MR87 y MR75 fueron menos agresivo que MR59 (Fig. 10). Esta tendencia se mantiene en EET103, sin embargo, no se encontró diferencia estadística ( $P=0.066$ ) respecto al control (Fig. 10).

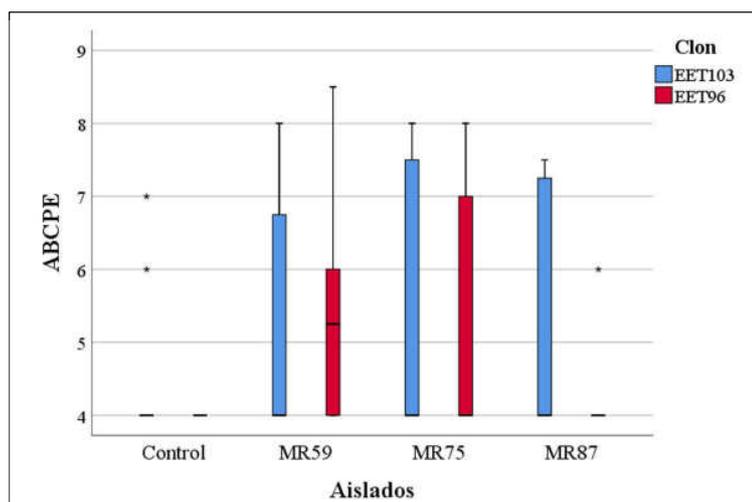


Figura 10. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para tres aislados de *M. royeri* y el control. Doble asterisco indica diferencia significativa en el clon EET96 según Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ).

### Efecto de *M. royeri* en diferentes edades de frutos en clones de cacao

En el clon EET96, a partir de la séptima a octava semana post inoculación los daños son más expresivos; los frutos (29 días) muestran daños significativos ( $P=0.001$ ) frente a los frutos inoculados con 15 días de edad, según la severidad externa causada por *M. royeri*. Igualmente, en EET103 los frutos (29 días) muestran daños externos significativos ( $P=0.0001$ ), en relación de los frutos inoculados con 15 días de edad (Fig.11).

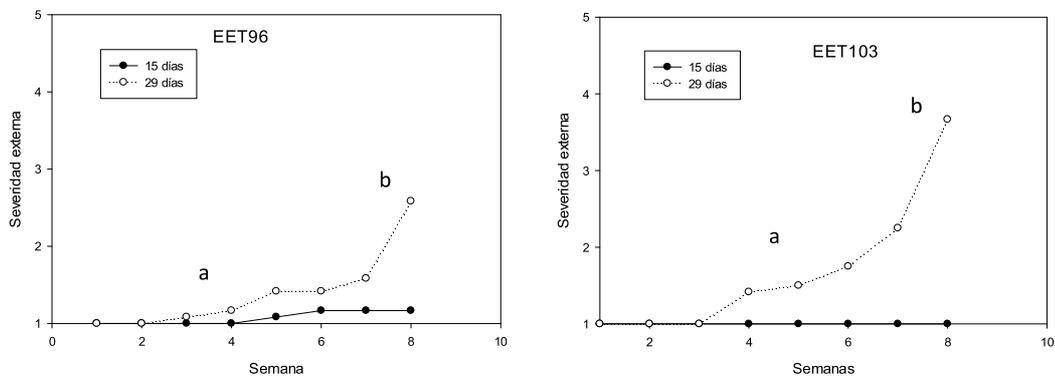


Figura 11. Promedio de la severidad externa de 24 frutos inoculados con *M. royeri* a 15 y 29 días de edad, evaluados hasta ocho semanas post inoculación.

### Severidad interna de *M. royeri* y respuesta de resistencia de dos clones de cacao.

En el clon EET96 se observa, que los daños (patógeno) de severidad interna en los frutos (29 días) fueron significativos ( $P=0.0001$ ) frente a los frutos inoculados con 15 días de edad y control. Este mismo efecto se mostró en EET103, ya que los daños de severidad interna en frutos (29 días) fueron significativos ( $P=0.001$ ) frente al control y contra los frutos que fueron inoculados con 15 días de edad (Fig. 12). Esto señala que *M. royeri* no afecta los frutos en temprana edad (15 días), sino después transcurrir otros 15 días.

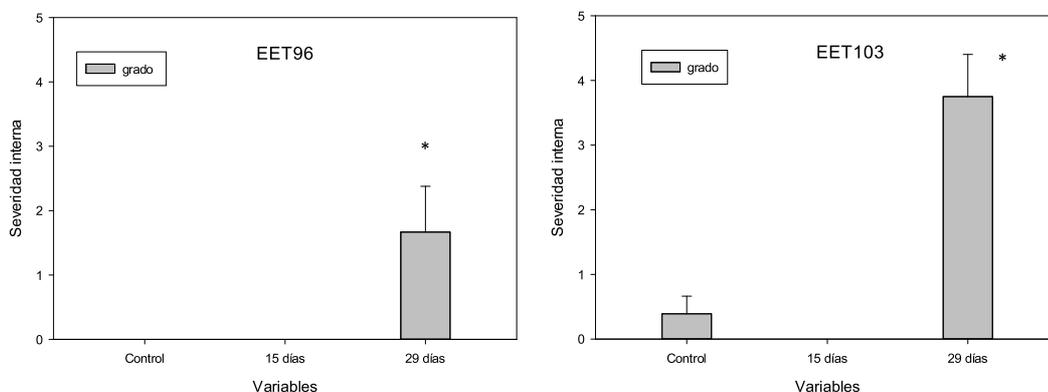


Figura 12. Severidad de la PHF en dos clones de cacao inoculados con tres aislados de *M. royeri*. Asteriscos indican diferencia estadística significativa según Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ).

Según la severidad interna causada por aislados de *M. royeri*, el clon EET96 fue resistente y moderadamente resistente, pero de manera general omitiendo el aislado se clasifica al EET96 como resistente. Mientras que el clon EET103 se mostró moderadamente resistente independientemente del tipo de aislado (Tabla. 4).

Tabla 4. Clasificación de la respuesta de los genotipos de cacao frente a *M. royeri*

Clon	aislados	Media	Mín.	Máx.	Clasificación
EET96	MR59	0.63±1.77	0	5	Resistente
	MR75	1.88±2.59	0	5	Moderadamente resistente
	MR87	0±0.00	0	0	Resistente
EET103	MR59	1.88±2.59	0	5	Moderadamente resistente
	MR75	1.88±2.59	0	5	Moderadamente resistente
	MR87	1.88±2.59	0	5	Moderadamente resistente

Clasificación según Sánchez et al., (1987).

### 3.6. Cuantificación de la diversidad genética

#### 3.6.1 Perfiles ISSR

De 10 microsatélites seleccionados, nueve de ellos fueron polimórficos y únicamente el marcador mr-12 fue monomórfico. Los marcadores más informativos según el ICP fueron mr-10, mr-11, mr-22, mr-30 (Tabla 5). Con los marcadores mr-6, mr-10, mr-11, mr-12 y mr-31, no se obtuvieron los alelos y los pesos moleculares esperados. Se observaron 39 alelos en toda la población, con rango de 105 a 183 pb, y frecuencia alélica de 3-7 alelos por *locus* (Tabla 5) ver en el Anexo 5 y 6.

Tabla 5. Características de 10 marcadores ISSR según información esperada y observada, (ICP) de *M. royeri* del Ecuador

Nº	Marcadores	Tamaño		Alelos esperados	Alelos observados	índice de contenido polimórfico
		esperado (pb)	observado (pb)			
1	mr-10	121–133	108-180	4	7	0.97
2	mr-11	139–149	116-163	3	6	0.97
3	mr-13	124–139	105-123	4	4	0.97
4	mr-30	134–149	121-176	5	5	0.96
5	mr-22	141–150	116-158	3	5	0.95
6	mr-15	154–160	162-183	3	3	0.92
7	mr-33	101–125	100-142	4	4	0.92
8	mr-6	127–130	122-124	2	3	0.89
9	mr-31	146–149	149-176	2	3	0.87
10	mr-12	132–138	0	2	0	0

Melo et al.,2014

### 3.6.2 Análisis de la varianza molecular

La información sobre la divergencia a nivel molecular de los haplotipos (aislados) se procesó mediante una partición de varianzas, cuyo cálculo se obtiene a partir de distancias genéticas. Se realizaron particiones de la muestra de los aislados analizados a fin de encontrar alguna estructuración dentro de la población causada por algunos factores. Estos factores fueron: origen geográfico (región y provincias), vegetación, clima, precipitaciones, y tipo de suelos. El análisis de la variabilidad molecular dentro y entre aislados de distintos grupos-particiones permite inferir la magnitud de la estructuración poblacional que pudiera ser causada por los distintos factores.

La tabla 6 resume parámetros de interés de las diferentes poblaciones en que fueron subdivididas. Las poblaciones en base a regiones y la vegetación mostraron mayor número de alelos ( $N_a$ ) y alelos efectivos ( $N_e$ ), la provincia de Los Ríos presentó la menor cantidad de alelos entre las poblaciones. Las poblaciones según la región, tipo de suelo, clima, y vegetación mostraron mayor diversidad de acuerdo con el índice de diversidad de Shannon ( $I$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_s$ ), mientras que la población Costa mostró menor diversidad. En cuanto a la diferenciación genética dentro y entre poblaciones, las poblaciones de la Costa, Amazonas y Provincias mostraron gran diferenciación ( $<0.25$ ). Las poblaciones según clima y la vegetación mostraron grande diferenciación ( $0.15-0.25$ ). Finalmente, la población según el tipo de suelo, región, y precipitación mostraron baja diferenciación ( $<0.15$ ).

En la Amazonía se encontró un total de 43 aislados con alelos privados, mientras que la Costa obtuvo 13 aislados con alelos privados, en su mayoría el *locus* más frecuente con alelos privados fue el mr-33 seguido de mr-13 y mr-10 (Anexo 7).

Tabla 6. Riqueza alélica, diversidad genética e índices de diferenciación genética según la subdivisión de la población por \*origen geográfico y variables ambientales\*\*.

<b>Poblaciones</b>	<b>N</b>	<b>Número de alelos (Na)</b>	<b>Alelos efectivos (Ne)</b>	<b>Índice de Shannon (I)</b>	<b>Heterocigosidad esperada (Hs)</b>	<b>Índice de diferenciación (F<sub>ST</sub>)</b>
<b>(N° aislados)</b>						
<b>REGIÓN (77)</b>						
Costa	22	3.56	2.32	0.96	0.54	
Amazonía	55	4.22	3.18	1.21	0.66	
<b>Subtotal</b>	<b>77</b>	<b>3.89</b>	<b>2.75</b>	<b>1.08</b>	<b>0.60</b>	<b>0.11</b>
<b>AMAZONAS (55)</b>						
Morona Santiago	7	2.11	1.81	0.57	0.35	
Napo	5	1.78	1.56	0.44	0.30	
Orellana	9	2.44	1.85	0.65	0.39	
Pastaza	4	1.44	1.40	0.29	0.21	
Sucumbíos	13	2.22	1.57	0.50	0.29	
Zamora	17	2.78	2.21	0.78	0.46	
<b>Subtotal</b>	<b>77</b>	<b>2.13</b>	<b>1.73</b>	<b>0.54</b>	<b>0.33</b>	<b>0.37</b>
<b>COSTA</b>						
El oro	14	2.33	1.73	0.58	0.35	
Guayas	5	2.56	2.23	0.84	0.53	
Los ríos	3	1.11	1.09	0.07	0.05	
<b>Subtotal</b>	<b>22</b>	<b>2.00</b>	<b>1.68</b>	<b>0.50</b>	<b>0.31</b>	<b>0.35</b>
<b>PROVINCIAS</b>						
El Oro	14	2.33	1.73	0.58	0.35	
Guayas	5	2.56	2.23	0.84	0.53	
Los ríos	3	1.11	1.09	0.07	0.05	
Morona Santiago	7	2.11	1.81	0.57	0.35	
Napo	5	1.78	1.56	0.44	0.30	
Orellana	9	2.44	1.85	0.65	0.39	
Pastaza	4	1.44	1.40	0.29	0.21	
Sucumbíos	13	2.22	1.57	0.50	0.29	
Zamora	17	2.78	2.21	0.78	0.46	
<b>Subtotal</b>	<b>77</b>	<b>2.09</b>	<b>1.72</b>	<b>0.53</b>	<b>0.33</b>	<b>0.41</b>
<b>Vegetación</b>						
BOSQUE deciduo Costa	14	2.33	1.73	0.58	0.35	
BOSQUE húmedo tropical Amazónico	46	4.33	3.32	1.26	0.68	
BOSQUE Montano oriental	16	2.78	2.19	0.78	0.46	

<b>Subtotal</b>	<b>76</b>	<b>3.15</b>	<b>2.41</b>	<b>0.87</b>	<b>0.50</b>	<b>0.24</b>
<b>Clima</b>						
húmedo con pequeño déficit agua mesotérmico	11	2.67	2.28	0.79	0.47	
húmedo sin déficit agua megatérmico	5	2.44	2.07	0.75	0.47	
subhúmedo gran déficit agua en época seca megatérmico	4	1.89	1.58	0.51	0.35	
subhúmedo moderado deficiencia agua época seca megatérmico	5	1.78	1.56	0.44	0.29	
superhúmedo sin déficit de agua megatérmico o cálido	44	4.22	3.09	1.22	0.67	
<b>Subtotal</b>	<b>69</b>	<b>2.60</b>	<b>2.12</b>	<b>0.74</b>	<b>0.45</b>	<b>0.20</b>
<b>Precipitación (mm)</b>						
250-500	3	2.11	2.02	0.65	0.42	
500-750	8	2.22	1.85	0.54	0.32	
750-1000	3	2.33	2.27	0.78	0.50	
1500-1750	7	2.56	2.07	0.79	0.49	
1750-2000	4	1.78	1.60	0.45	0.30	
2000-2500	8	2.67	2.27	0.82	0.50	
2500-3000	5	2.67	2.38	0.86	0.53	
3000-3500	14	2.33	1.62	0.53	0.31	
3500-4000	15	3.56	2.72	1.09	0.62	
4000-4500	2	1.11	1.11	0.08	0.06	
<b>Subtotal</b>	<b>69</b>	<b>2.33</b>	<b>1.99</b>	<b>0.66</b>	<b>0.40</b>	<b>0.15</b>
<b>Suelos</b>						
Entisol	19	3.78	2.72	1.11	0.62	
Inceptisol	50	4.33	3.45	1.29	0.70	
<b>Subtotal</b>	<b>69</b>	<b>4.06</b>	<b>3.08</b>	<b>1.20</b>	<b>0.66</b>	<b>0.03</b>

\*Origen geográfico según el anexo 4\*\*Vegetación según anexo 1. Clima anexo 2. Precipitación fig.15, y tipos de suelos anexo 3.

La figura 13 resume el análisis molecular de la varianza (AMOVA); para los haplotipos, en todos los casos, la varianza fue mayor intrapoblacionalmente con valores entre 7 y 95%. Las poblaciones según el tipo de suelo y sensibilidad a flutolanil mostraron baja diferenciación con valores 5-7%. La sensibilidad a azoxystrobin, región, precipitación y clima mostraron una moderada a alta diferenciación (17-19%). Mientras que las

poblaciones según la región Costa, Amazonía, y provincias explicaron la estructura poblacional del patógeno entre 35-39%. (Fig. 13, línea color café). Los valores P ( $\leq 0.05$ ) indican que las diferencias son significativas, excepto la sensibilidad a flutolanil (Anexo 11).

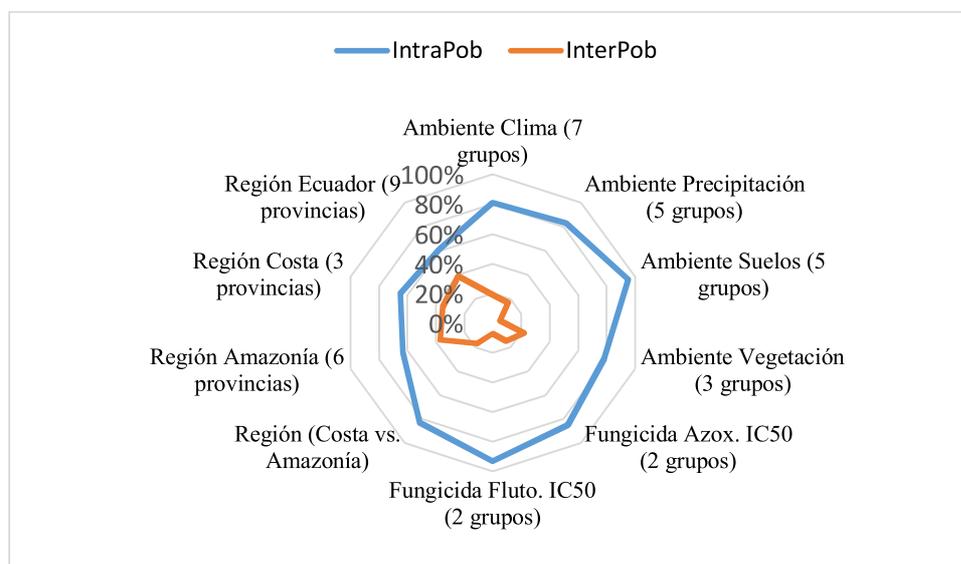


Figura 13. Visualización resumida del análisis de varianza molecular (AMOVA) para *M. royeri* mediante el porcentaje de la varianza molecular (AMOVA) explicado por las poblaciones.

### Determinación de la relación entre los aislados

La figura 14 muestra la relación entre 76 aislados, ocho marcadores ISSR, y la sensibilidad a fungicidas. Los marcadores mr-6, 30, y 33 muestran ser bastante homogéneos entre ellos, mr-11 y mr-15 poseen una discriminación distinta a los demás marcadores. Los fungicidas indican una similitud muy homogénea entre la mayor parte de la población. Curiosamente en la parte inferior izquierda se observa, que el 40.79% (31 aislados) mostraron

características similares en todos los marcadores. Se confirma la presencia de cuatro grupos que se generó con el dendograma de similitud (Anexo 8).

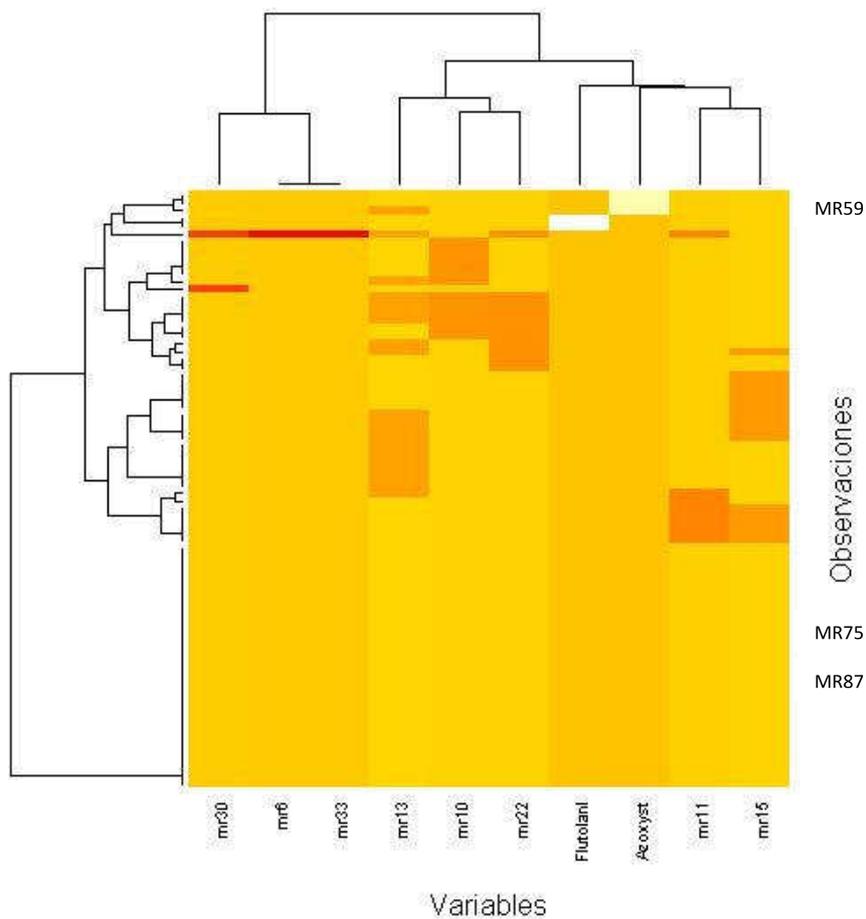


Figura 14. Mapa (*heatmap*) generado con marcadores moleculares y características fenotípicas de sensibilidad a fungicidas flutolanil y azoxystrobin, realizado con datos transformados a binarios (ausencia y presencia).

La figura 15 muestra la distribución de los grupos genéticos. El grupo II se encontró en la mayor parte de muestreo, tanto Costa como Amazonía. El grupo I se ubicó en las

Provincias de Zamora Chinchipe y Morona Santiago. El grupo III en Napo y El oro. Y el grupo IV (un aislado) perteneciente a Guayas.

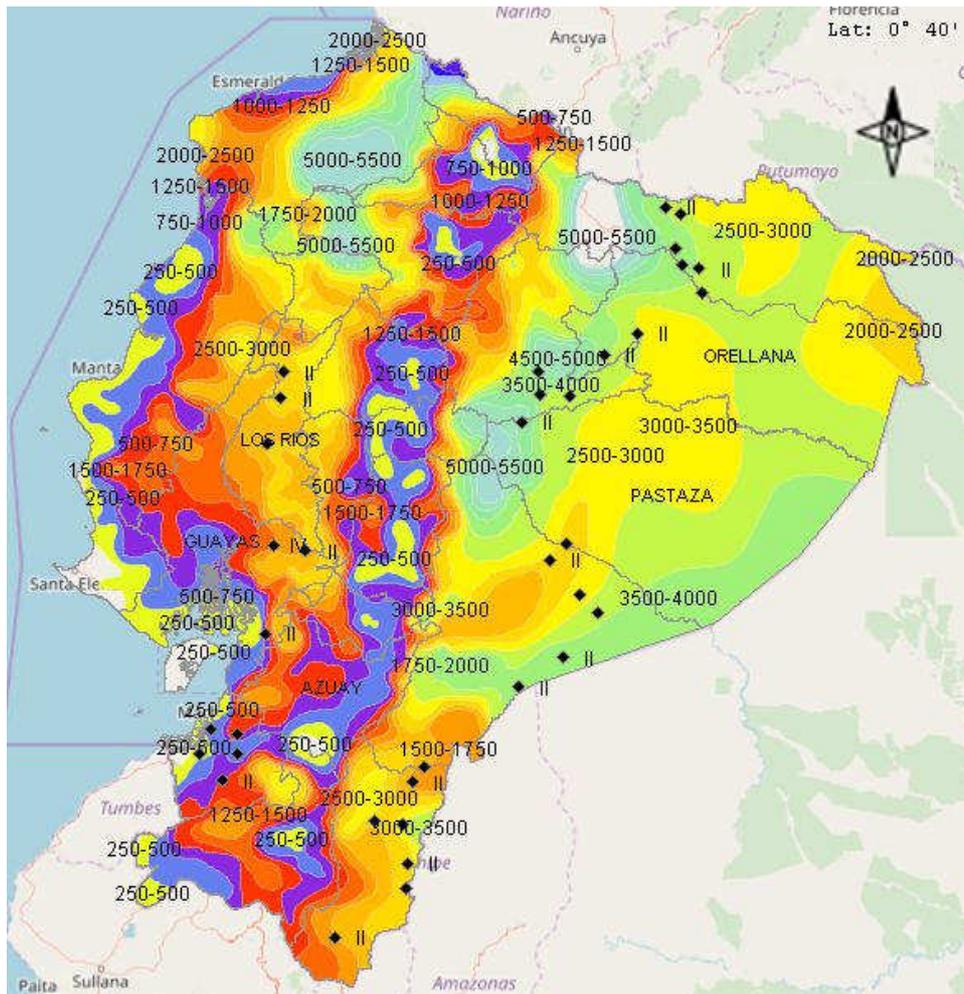


Figura 15. distribución espacial de los cuatro grupos genéticos determinados para *M. royeri* en el Ecuador (I-IV) según las precipitaciones anuales. Mapa generado con capas *shapefile* de isoyetas (SIPA-MAGAP,2019).

### **3.7 Correlación fenotípica con la diversidad genética de *M. royeri***

#### **3.7.1 Variabilidad genética de los aislados según la IC<sub>50</sub> de Flutolanil y azoxystrobin contra *M. royeri*.**

El número de alelos ( $N_a$ ) y alelos efectivos ( $N_e$ ) fueron similares según la población de los fungicidas. Igualmente, el índice de diversidad de Shannon (I) y La heterocigosidad esperada ( $H_s$ ) señalan una diversidad del 50% para los fungicidas; en ambos fungicidas la diversidad fue alta (70%) para los grupos de aislados más sensible; mientras que la diversidad fue menor (30%) para los aislados menos sensibles. La subpoblación de alta sensibilidad no puede relacionarse con la alta diversidad, debido a que agrupó más del 90% de los aislados. El índice de diferenciación ( $F_{ST}$ ) nos dice que no son significativamente diferente (3%) (Tabla 7).

Respecto a los aislados que presentaron una menor sensibilidad (MR68 y MR95) según el flutolanil pertenecientes a las provincias de Orellana y El Oro, se observa similitud clonal entre MR95 y MR96 (L). Mientras que MR68 no presenta característica clonal con ningún aislado. Los grupos clonales de los 76 aislados pueden ser observados en (Anexo 9).

Tabla 7. Diversidad genética según la sensibilidad al flutolanil y azoxystrobin (IC<sub>50</sub>)

<b>Poblaciones (N° aislados)</b>	<b>N</b>	<b>Número de alelos (Na)</b>	<b>Alelos efectivos (Ne)</b>	<b>Índice de Shannon (I)</b>	<b>Heterocigosidad esperada (H<sub>s</sub>)</b>	<b>Índice de diferenciación (F<sub>ST</sub>)</b>
<b>IC<sub>50</sub></b>						
<b>AZOXYSTROBIN</b>						
<b>(74)</b>						
Alta sensibilidad (0.00002 a 0.01462)	71	4.33	3.50	1.30	0.70	
baja sensibilidad (0.0220 a 0.0364)	3	1.67	1.58	0.40	0.27	
<b>Subtotal</b>	<b>74</b>	<b>3.00</b>	<b>2.54</b>	<b>0.85</b>	<b>0.49</b>	<b>-0.02</b>
<b>IC<sub>50</sub></b>						
<b>FLUTOLANIL</b>						
<b>(76)</b>						
Alta sensibilidad (0.003 a 0.08)	74	4.33	3.48	1.30	0.70	
baja sensibilidad (0.13 a 0.15)	2	1.56	1.56	0.39	0.28	
<b>Subtotal</b>	<b>76</b>	<b>2.94</b>	<b>2.52</b>	<b>0.84</b>	<b>0.49</b>	<b>0.03</b>

Fig. 3. para flutolanil y fig. 6. para azoxystrobin

### 3.7. 2 relación de las características fenotípicas (agresividad) con la diversidad genética.

Los tres aislados (*M. royeri*) que fueron evaluados mediante la inoculación artificial en clones de cacao, los resultados muestran que MR59 se agrupó en clúster distante (disimilitud) en relación MR75 y MR87. Según las cualidades fenotípicas de severidad externa; MR59 causó mayor daño que MR87, pero la intensidad de daño interno de MR59 fue menor que MR75. La relación entre los aislados MR75 y MR87 fue similar, tanto en la sensibilidad a fungicidas y marcadores genéticos ISSR, pero hubo diferencia entre estos según la severidad interna (Fig. 8). Según el dendograma de Jaccard al 78% de similitud, los tres aislados evaluados en campo se agruparon en clúster distintos ver Anexo 8.

Tabla 8. Comportamiento patogénico de los aislados evaluados en campo experimental

<b>Agrupamiento en dendograma</b>		<b>Promedios</b>	
<b>Aislados inoculados</b>	<b>Grupos (Similitud)</b>	<b>Severidad externa</b>	<b>severidad interna</b>
MR59	2	1,46	1,44
MR75	3	1,44	1,94
MR87	4	1,26	1,19

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

#### 4.1 Sensibilidad de *M. royeri* a fungicidas

La gran importancia de las moléculas químicas para el control de hongos fitopatógenos, implica el modo de acción, la frecuencia y el tiempo de aplicación (Reuveni & Sheglov, 2002). El flutolanil inhibe el suministro de ATP y es empleado en el control de basidiomicetes (Universidad Nacional de Costa Rica (UNA), 2019). En estudios anteriores se ha evaluado sensibilidad de *R. solani*, patógeno del cultivo de papa al fungicida flutolanil, con concentraciones entre 0.01 hasta 1 µg/ml, mostrando que todos los aislados fueron altamente sensibles IC<sub>50</sub> 0.05 y 0.50 µg/ml (Campion, Chatot, Perraton, & Andrivon, 2003). Así también, la sensibilidad a flutolanil de 119 aislados de *Rhizoctonia*, patógeno de plantas de papa a nivel *in vitro*, mostraron una alta sensibilidad IC<sub>50</sub> 0.14 a 0.75 µg/ml (Lehtonen, Ahvenniemi, Wilson, German-Kinnari, & Valkonen, 2008). En este estudio la evaluación de la sensibilidad de *M. royeri* al fungicida flutolanil, obtuvo una IC<sub>50</sub> entre 0.001 a 0.15 µg/ml para el 100% de los aislados; en los cuales MR39 y MR71 mostraron mayor sensibilidad (susceptibles), y MR68 y MR95 menor sensibilidad, pero señalando a los aislados como altamente sensibles < 1 µg/ml (L. V. Edginton, 1971), lo cual coincide con lo reportado para *Rhizoctonia* sp.

Sin embargo, en Georgia se ha evaluado también la sensibilidad de 450 aislados *Sclerotium rolfsii* al fungicida flutolanil (grado reactivo) sobre la inhibición de crecimiento micelial, estimando que los aislados pertenecientes a diferentes localidades variaron en su nivel de sensibilidad (ED<sub>50</sub>=0.41 y 17.70 µg/ml), como sensibles y moderadamente resistentes (Franke, Brenneman, Stevenson, & Padgett, 1998). Estos cambios de sensibilidad pueden

deberse a la resistencia generada por el patógeno, cuando se utiliza fungicidas de forma descuidada al momento de aplicación, o también respuesta biológica del hongo frente a condiciones desfavorables. Además, la alta sensibilidad podría justificarse por la escasa utilización de fungicidas en el manejo y control de la enfermedad (Lucas et al., 2015). Es importante tomar en cuenta las dosis de fungicidas a utilizar, ya que aislados de El oro (7 aislados), Zamora (4 aislados), Morona Santiago, Orellana (2 aislados), Sucumbíos y Guayas (un aislado), fueron estimulados a concentraciones de 0.01 µg/ml. Mientras que de El oro (10 aislados), Los ríos (2 aislados), Morona Santiago (3 aislados), Napo (2 aislados), Pastaza (3 aislados), Sucumbíos (6 aislados), Zamora (8 aislados), Guayas y Orellana (un aislados) fueron estimulados positivamente a bajas concentraciones de 0.001 µg/ml, probablemente debido a excipientes del fungicida comercial *moncut* (Lin & Garry, 2000). En este sentido, el manejo fúngico con flutolanil debe ser aplicado cuidadosamente para mantener su eficacia. Aunque existe alta sensibilidad de *M. royeri*, se sugiere realizar trabajos en campo para conocer si existe una reducción de la alta sensibilidad determinada a nivel *in vitro*.

El fungicida azoxystrobin pertenece al grupo químico estrobirulinas. El cual inhibe la respiración mitocondrial impidiendo la obtención de ATP, y tiene efectividad sobre patógenos basidiomicetes (Bartlett et al., 2002). En Nueva York se estudió la sensibilidad de 47 aislados de *Alternaria brassicola* a azoxystrobin, donde el rango de la EC50 fue entre 0.22 y 14.12 µg/ml, con una media de 2.49 µg/ml; de los cuales, 19 de los aislados fueron altamente sensible (<1.0 µg/ml), y 20 aislados fueron moderadamente sensible (<5.0 µg/ml), los aislados restantes se mantuvieron en el rango mencionado (Kreis, Dillard, & Smart, 2016). Igualmente el fungicida azoxystrobin, usando concentraciones entre 1 y 10.000 µg/ml sobre los conidios de *A. alternata*, inhibió el 98.94% de crecimiento con la dosis más alta; a pesar que la concentración de la etiqueta del producto fue menor (250-

300µg/ml), asumen que la presión de selección sea el factor que cause la resistencia hacia azoxystrobin (Utrilla, 2012).

En Cuba un estudio de sensibilidad en aislados de *M. fijiensis* a azoxystrobin; utilizando concentraciones entre 0.01 y 10 µg/ml, se determinó que el 100% de la inhibición de crecimiento fue a 1 µg/ml, considerando estos aislados como altamente sensibles (Pérez, Luis; Batlle, Alicia; Hernández, Alexis; Pérez, Michel; Trujillo, Roberto; Álvarez & Méndez, 2003). Igualmente en Brasil se estudió la sensibilidad de 143 aislados de *Monilinia fructicola*, usando concentraciones entre 0.05 y 7.4µg/ml de azoxystrobin; la CE<sub>50</sub> promedio para el grupo menos sensible fue 0.35 µg/ml, calificados como aislados de alta sensibilidad, mientras el grupo con mayor sensibilidad fue 0.17µg/ml, determinando que la población perteneciente a Sao Paulo fue menos sensible al fungicida, que la población perteneciente a Paraná y Santa Catarina (Pereira et al., 2017).

Lo cual coincide con el presente estudio, donde *M. rozeri* mostró alta sensibilidad a azoxystrobin, con dosis menor a 1µg/ml al igual que el flutolanil. Pero, estos resultados no concuerdan con lo reportado en México 2011 y 2016, donde el 100% de la germinación y crecimiento micelial se inhibió a 450 µg/ml y 500 µg/ml respectivamente (Magdiel Torres de la Cruz, 2011b; Torres-de-la-Cruz et al., 2019). Aunque el control químico en México ha sido muy poco usado por la escases de productos compuestos para *M. rozeri*, se utiliza fungicidas protectantes (cúpricos), aplicados en épocas tempranas de desarrollo de la enfermedad, lo cual podría provocar el aumento de la resistencia (Bateman et al., 2005).

La resistencia no es una problemática exclusiva del control químico, ya que los hongos pueden tornarse resistentes a fungicidas por la adaptación a condiciones adversas; los fungicidas estrobirulinas poseen alto riesgo de resistencia cruzada, por ello no se debe enfrentar al fungicida con altas poblaciones del patógeno (Luis F. Gaspar, 2013). Si bien

*M. royeri* mostró alta sensibilidad, se debería disminuir el uso de fungicidas de alto riesgo de resistencia, e integrar al control químico otras alternativas que mantengan baja la población. En nuestro país no se registra el uso de azoxystrobin para el control de la enfermedad, esto podría explicar la alta sensibilidad de los aislados fungicidas.

#### **4.2 Efecto de *M. royeri* en frutos de cacao mediante la agresividad de los aislados a nivel *in vivo*.**

De manera general, los tres aislados inoculados en dos clones de cacao, no muestran diferencias según la severidad interna y externa; esto mantiene relación con Phillips Mora, ya que reportó que la severidad interna de siete aislados en cinco clones comerciales, no mostraron diferencias entre ellos (Phillips-Mora et al., 2005). No obstante Brenes y Cuéllar et al, encontraron diferencias significativas entre los materiales de cacao evaluados (Brenes, 1983; Sterling Cuéllar et al., 2015).

La reacción del cacao a *M. royeri* está relacionada por el genotipo y la virulencia del aislado (Phillips-Mora et al., 2005). Si bien la severidad externa no permite estimar precisamente el daño interno del fruto, pero contribuye a conocer la tolerancia de los frutos a *M. royeri* (Carmen Suárez-Capello, Freddy Amores, 2006; Phillips-Mora et al., 2005). En este estudio según el ABCPE de la severidad externa, MR59 fue más agresivo en el clon EET96, mientras que en EET103 mantuvo tendencias de infección pero no hubo diferencia significativa entre aislados, observándose interacción entre patógeno y material genético (Phillips-Mora et al., 2005; Sterling Cuéllar et al., 2015).

Nuestros resultados coincide que el valor medio de severidad externa entre clones de cacao estuvo en el rango entre 0,73-2,46 y que la terminación de la enfermedad es la formación de mancha necrótica y esporulación (Sterling Cuéllar et al., 2015). Además en este estudio los síntomas de *M. royeri* fueron débiles en frutos con 15 días de edad, lo cual es posible,

ya que se ha evaluado clones comerciales y se encontraron pocos síntomas como la protuberancia en frutos (Cuéllar et al., 2015; Porras Umana, 1985).

Los frutos con 29 días de edad fueron más afectados en ambos clones, señalando que la edad del fruto influye en la intensidad de afectación, similar a lo reportado por Phillips-Mora (1986) (Phillips Mora, 1986). Pero opuestamente, Sánchez y Aránzazu encontraron que los primeros síntomas de *M. royeri* se observan a partir de 35, 54, y 78 días post inoculación (Aranzazu H, 1977; Sánchez López, 1982). Consecuentemente la severidad interna fue mayor en frutos con 29 días de edad ambos clones; esto es posible ya que los frutos son susceptibles en edad de dos y tres meses de edad (Amores Puyutaxi, Agama Parreño, Suárez Capello, Quiroz Vera, & Motato, 2009; Porras, 1988).

En este trabajo la media de la severidad interna fue de 1.17 y 1.88, y la máxima cinco, para EET96 y EET103 según el grado de daño (0 a 5), donde cero es fruto sano y cinco es la necrosis y esporulación total del fruto, lo cual concuerda que la severidad interna fue  $>4$  con rangos de severidad entre 2.3 y 5.0, causando un necrosamiento de 60 al 100% (Phillips-mora, Arciniegas-leal, Mata-quirós, Motamayor-arias, & Motamayor-arias, 2012; Phillips-Mora et al., 2005). Así también Cuellar et al., (2015) determinaron, que la media fue de 1.96 oscilando entre grado cero para el 26% de los materiales de cacao, y grado cinco para selecciones de *T. cacao* (Sterling Cuéllar et al., 2015). Mientras que la menor severidad interna hallada en este estudio osciló entre 0.5 y 1.17, lo cual coincide que el rango de daño ha sido de 0.90 a 1.63, lo que representa un 16% de daño de almendras (Jesús Sánchez y Aroldo Dubón, 2012; Yeirme Jaimes, 2011).

En este estudio los aislados mantuvieron similar agresividad interna en EET103, excepto EET96; ya que, de 47 frutos evaluados por clon, el 8.51% indicó severidad grado cinco, y el 21.28% de frutos mostraron síntomas grado cinco en ETT103. Así también en Colombia

se reportó dos aislados más agresivos que causaron necrosis interna en el 66% de los materiales, y el 16% de los materiales mostraron afectación con medias superior  $> 4$ , necrosis (60-100%) de las almendras en frutos (Sterling Cuéllar et al., 2015).

Se ha reportado que el clon EET103 posee baja resistencia a *M. royeri*, pero también se ha encontrado que resistencia natural con buena producción (Freile-Almeida, Morgado-Martínez, Jorge Pérez-García, Armando, Demesio, & Reinaldo., 2018; Rafael Alberto Osorio Sánchez, 2010). Contrariamente, Sánchez y Morgado reportan que *M. royeri* causó la mayor incidencia en EET103 y menor incidencia en CCN-51 (Freile-Almeida et al., 2018; Sánchez-Mora et al., 2015). Esto mantiene cierta similitud con este estudio, ya que EET103 mostró mayor porcentaje de frutos afectados con moderada resistencia, pero las diferencias estadísticas no son significativas entre clones.

De 50 materiales genéticos de cacao, el 44% mostró resistencia completa o moderada a *M. royeri* y el 21% no mostró síntomas de la enfermedad (tres de *T. cacao*, seis de *T. grandiflorum* y cuatro de *T. bicolor*) (Sterling Cuéllar et al., 2015). En este estudio EET96 mostró resistencia y moderada resistencia según los aislados de *M. royeri*, lo cual debería ser evaluado nuevamente para afirmar estos resultados y difundir la información a los productores.

#### **4.3 Cuantificación de la diversidad genética**

Se reportaron cebadores polimórficos para *M. royeri* (1,2). De los 10 microsatélites seleccionados, 9 de ellos fueron polimórficos y únicamente el marcador mr-12 fue monomórfico. Se conoce que un microsatélite está compuesto por un motivo repetitivo (Chistiakov, Hellemans, & Volckaert, 2006). El marcador mr-12 no presentó valores

polimórficos, es posible que se deba a regiones flaqueantes incompletas (Melo et al., 2014b), las cuales deben estar presentes a lado del motivo repetitivo en ambos lados de la secuencia, ya que un marcador microsatélite debe contener toda la variación de la secuencia dentro del motivo repetitivo (Chistiakov et al., 2006).

Con un promedio PIC de 84%, los SSR mostraron alto grado de polimorfismo y son muy informativos, ya que un PIC mayor a 50% es aceptable, y los más deseables son los cercanos a 100% de polimorfismo (Botstein et al., 1980). Estos resultados corroboran que los SSR son adecuados para analizar el grado existente de variabilidad en poblaciones, según la determinación de microsatélites (Melo et al., 2014b).

Un nivel admisible de polimorfismo con microsatélites polimórficos en hongos es complicado, pero oscilan entre 0.4 y 5.4 alelos por *locus* (Dutech et al., 2007). En la determinación y obtención de 10 de microsatélites para *M. roreri* se reportó un promedio de 3.2 y un máximo 5 alelos por *locus* (Melo et al., 2014b). En este estudio los aislados presentaron promedio de 3.28 alelos por *locus* y un máximo de 7 alelos.

La variación presente en los *locus* microsatélites podría deberse al tipo de análisis de producto PCR, siendo lo ideal utilizar geles de poliacrilamida para una mejor discriminación de las bandas; pero no se ha realizado un protocolo para el análisis de *M. roreri* en geles de poliacrilamida. Aunque al correr muestras en geles de alta resolución al 3% (Anexo 6), el cual posee una mejor sensibilidad que agarosa normal al 3%; se observó características similares a la agarosa convencional, pero no se descarta que el tipo de gel refleje resultados diferentes.

### **Análisis de la varianza molecular**

Los alelos privados se encuentran en una sola población o en una sola muestra, y son muy informativos en estudios genéticos (Zachary A. Szpiecha & Noah A. Rosenberg, 2011). A su vez, permiten determinar el flujo de alelos entre poblaciones (Calafell, Shuster, Speed, Kidd, & Kidd, 1998). La Amazonía obtuvo 43 aislados con alelos privados, y 13 para la región Costa. Estos alelos aumentan en función de la diferenciación genética entre poblaciones (Humedades Temporales Fabiola Magallán Hernández, Martínez, Hernández Sandoval, & Ken Oyama, 2009). La población Amazónica que mostró la mayor cantidad de alelos privados, es probable que haya evolucionado con anterioridad que la región Costa (Slatkin & Barton, 1989). Y puede deberse a que se encuentran en una región genómica altamente mutagénica, o que son originados de sitios heterocigotos, tendiendo a mutar mayormente que los sitios homocigotos (Li, Korol, Fahima, Beiles, & Nevo, 2002).

La región Costa que obtuvo menos alelos privados, es probable que haya ocurrido una evolución reciente, eso quiere decir que presentó un flujo genético hace corto tiempo (Slatkin & Barton, 1989). Ya que a principio de la aparición de la enfermedad en la Costa (Quevedo) en 1918, antes de eso en 1895 ya había sido reportado de los daños de “la mancha” en la parte Norte de Magdalena en Colombia pudiendo existir anteriormente también en la Amazonía (Rorer, 1918). Aunque en Amazonía ecuatoriana aparece la PHF por el año de 1972, por causa de las civilizaciones y explotación en Napo, y ya para los años 1982 *M. royeri* invadió toda la región Amazónica y Costera del país (Ricardo Antonio Delgado; Zoila Karina Solís; Carmita Suárez-Capello, Karina Peres Gramacho, 2003).

Otro punto es que el centro de origen del cacao es en el Amazona, sur de Ecuador y norte de Perú. Puede que el hongo haya estado presente junto con el hospedante, y viviendo sin ser visto en cacao silvestre, pero eso es bastante improbable ya que solo recientemente (1988) se reporta en Perú (Croplife, 2019). En este contexto, es que la población

Amazónica sería más Antigua que en la Costa. Además, sabemos que la separación espacial de dos poblaciones de una misma especie durante años da lugar a novedades evolutivas por causas ambientales y zona geográfica, lo cual es probable ya que las poblaciones Costa y Amazonía, están separadas por la región Sierra. Los alelos promedio (1.11-4.33) fueron mayores que los alelos efectivos (1.09-3.5), confirmando la existencia de alelos raros en la población de *M. roreri* (Humedades Temporales Fabiola Magallán Hernández et al., 2009).

En este estudio las poblaciones correspondientes a Costa y Amazonía obtuvo valores de heterocigosidad esperada ( $H_s$ ) 0.60. Las variables ambientales como la vegetación, clima, precipitación y suelo dieron valores de 0.50, 0.45, 0.40, y 0.66, expresando una alta variabilidad genética. Pero para las subpoblaciones definidas como Amazonas (seis provincias), Costa (tres provincias) y provincias (nueve provincias) mostraron  $H_s$  0.33, 0.31, 0.33 moderadamente alta, lo cual presume que exista mayor homogeneidad entre estos subgrupos de aislados, y es cercano a lo reportado por Melo et al. (2014), donde heterocigosis fue 0.43 entre aislados de *M. roreri*.

También en Colombia se reportó una alta diversidad (SSR) según el índice de diversidad de Shannon (0.488), indicando que las altas mutaciones presentes en dichos aislados de *M. roreri* se deban al intercambio genético entre y dentro de los diferentes lugares (Jaimes et al., 2016a). Aunque según Ali et al. (2015) reportaron ausencia de heterocigosis para cinco grupos genéticos de *M. roreri*, utilizando marcadores SNP (Ali et al., 2015a)

La diversidad encontrada es consistente con los microsatélites, ya que cierto SSR pueden estar presentes en el ADN regulador y provocar cambios fenotípicos (Gymrek et al., 2015). También podría relacionarse con mutaciones en el gen, pérdida nucleótidos en un gen (delección), incorporación de algún nucleótido (inserción), SNP<sub>s</sub> en regiones codificantes del gen, causando la existencia de alelos distintos en el gen del patógeno (Gupta, Roy, Sci, & 2001, 2001). Aunque los SNP<sub>s</sub> no alteran los aminoácidos de forma total, pero pueden

afectar ciertos rasgos en la síntesis de proteína, provocando alguna variación en el gen (Ramírez-Bello & Jiménez, 2017).

Los hongos que adquieren resistencia a fungicida son más agresivos contra el hospedante, pero un hongo inofensivo puede mutar y transformarse en dañino, superando las barreras de resistencia de hospederos, volviéndolos susceptible (Manzo Sánchez & Canto Canché Andrew James Kay, 2005). La intervención antropogénica como el uso de fungicidas, intercambio de material genético dentro y fuera de localidades puede alterar la diversidad del patógeno (Jaimes et al., 2016a). Igualmente las propiedades abióticas, ya que la según reporte, la humedad y alta temperatura se han correlacionado positivamente con la virulencia *in vivo*, y las bajas temperaturas se relacionaron de forma negativa con la formación de esporas de *M. royeri* en cacao (Leandro-Muñoz et al., 2017). Al existir variantes con éxito reproductivo, es un indicativo de presión de selección (Haldane J. B. S., 1957). El hongo *M. royeri* puede estar interactuando con una presión de selección significativa, haciendo que la población sea poca homogénea, por ello podría tener cualidades reproductivas de gran éxito en la infección de los diferentes materiales de cacao.

El índice de diferenciación ( $F_{ST}$ ) permite conocer la historia de las poblaciones, evolución del flujo génico y también la deriva génica (Aguirre-Planter, 2007). La alta diferenciación es el resultado de poco flujo genético, y por el contrario una baja diferenciación significa un alto flujo de genes. En este estudio la variación genética dentro y entre los niveles jerárquicos establecidos de la población, examinando regiones (Costa-Amazonía) como población y los estratos como subpoblaciones (región, Provincias, variables ambientales), mostraron diferencias significativas en las subpoblaciones estimadas ( $P=0.001$ ). La mayor diversidad de haplotipos (85-97%) se encontró dentro de las subpoblaciones (región, tipos de suelo, precipitación), y una porción apreciable (35-41%) separa las poblaciones (regiones). Cuando se consideró la región Amazonas, Costa y provincias como subpoblaciones, se obtuvo valores de  $\Phi_{PT}$  de 0.368, 0.348, y 0.386 entre las poblaciones

respectivamente, esto señala una gran diferenciación ( $>0.25$ ) entre las poblaciones de las regiones, sugiriendo que existe bajo flujo genético. Ali et al. (2015) manifiestan que la diferenciación de las poblaciones se da por la dispersión de esporas de un lugar a otro en el tiempo, sin embargo la alta diversidad que encontraron sugieren que, además de mutaciones y alto flujo genético puede darse posiblemente una recombinación esporádica por parasexualidad (Ali et al., 2015a). El desplazamiento de genes de una población a otra, puede provocar una metapoblación de *M. royeri*, haciendo que se comporte distinta entre especie, y puede adaptarse debido a su variación genética, y una poca fragmentación de la población (Jing Wen Meng et al., 2018).

Jaime et al., (2016) encontraron que según el AMOVA de *M. royeri*, el 68.02% de la variabilidad genética se produce entre individuos de tres provincias muestreadas de Colombia, y es atribuido al flujo genético entre los diferentes aislados (Jaimes et al., 2016a). En este estudio los valores de AMOVA fueron similares a  $F_{ST}$ , lo cual sugiere que, aunque existe bajo y moderado flujo de genes en este patógeno, puede aportar a la alta diversidad encontrada; ya que el flujo genético de *M. royeri* puede generarse por medio de la dispersión de agentes reproductores como esporas, actividad humana, viento y el comercio agrícola, provocando poca variación genotípica (Wilbert Phillips-Mora, 2003). Si bien cuando se consideró el origen geográfico (regiones) como población, la estructura genética no fue diferenciada. Pero cuando se consideró la población como Amazonas, Costas, y Provincias (Orellana, Napo, Zamora Chinchipe, Morona Santiago, Pastaza, Sucumbíos, El oro, Guayas, Los ríos) las poblaciones fueron diferenciadas hasta un 40%. Cabe mencionar que los aislados del muestreo no fueron homogéneos por origen geográfico. Pero se sugiere que los controles sean implementados según el origen geográfico (provincias) para disminuir el riesgo de factores antropogénicos, que alteren la

diversidad del patógeno. Este estudio coincide que las diferencias ambientales y geográficas justifican la diferenciación genética (Jaimes et al., 2016b).

### **Relación de distancias entre aislados**

El dendograma realizado con 76 aislados confirma la presencia de cuatro grupos bien definidos para toda la población. Lo cual podría contradecir los cinco grupos genéticos realizados con un gran número de aislados ecuatorianos (36 aislados), donde se concluyó que el centro de origen de la enfermedad es Colombia y que en el Ecuador existen tres de dichos grupos (Phillips-Mora et al., 2007).

En este estudio el dendograma de similitud destacó mayor diversidad de un aislado correspondiente al Guayas (MR87), el cual no se agrupó a la mayoría de aislados, igualmente se observó que un aislado perteneciente a la provincia de El Oro, se agrupó en uno de los grupos de manera individual. La temperatura y humedad influyen en la agresividad patogénica del hongo (Leandro-Muñoz et al., 2017). Un clima cálido lluvioso con temperaturas de 22 a 32°C presenta una mayor incidencia de *M. royeri* en cacao (Croplife, 2019). En este sentido, el aislado de la provincia de El Oro (arenillas), posee un clima semiárido caliente con precipitación media de 773.6 mm y temperatura media de 26.6°C; el aislado correspondiente a Milagro provincia del Guayas posee un clima con temperatura media de 26.8°C y precipitación de 1252.5 mm (Inamhi, 2019). Para acertar las causas puntuales de variación genética que puedan existir entre aislados, se sugiere secuenciar el ADN del hongo patógeno (Forin et al., 2018).

### **Correlación entre variables fenotípicas y la diversidad genética de *M. royeri***

En EE.UU se estudió la estructura ISSR y fenotipado de *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol seco, observando que las poblaciones se estructuraron libremente en el espacio y el

tiempo con base en el análisis de la varianza molecular y el análisis discriminante de los componentes principales, pero no por cultivar, agresividad o fuente de campo (Kamvar et al., 2017).

En Brasil no se encontró mutaciones del gen relacionadas con la resistencia de *M. fructicola* a azoxystrobin a pesar de que ciertos aislados presentaron menos sensibilidad al fungicida (Pereira et al., 2017). Un estudio en EE.UU afirma que mutaciones F129L, G137R y G143, no fueron detectados en los aislados de *Alternaria brassicola*; aunque su diversidad fue alta (ISSR), no se relacionó con la sensibilidad (Kreis et al., 2016). También los rasgos fenotípicos de *Sclerotinia sclerotiorum* (sensibilidad a fungicidas, tasa de crecimiento, color de colonia, producción de ácido oxálico, virulencia) y marcadores genéticos (ISSR), han mostrado falta de correspondencia entre ambos marcadores a pesar de existir una alta diversidad genética (Attanayake et al., 2012).

En este estudio tanto el PIC, IC<sub>50</sub> de *M. royeri* a flutolanil y azoxystrobin; y las variables de agresividad de tres aislados, no se correlacionaron de manera positiva con la alta diversidad. Es probable que un estudio que incluya más aislados pueda describir dicha relación, la cual sería vital en el manejo de la enfermedad.

## Conclusiones

1. La estimación de la sensibilidad de *M. royeri* a fungicidas define que el patógeno es estimulado en su crecimiento *in vitro* a dosis bajas del flutolanil, probablemente debido a excipientes; a diferencia del azoxystrobin en grado reactivo que no provocó la estimulación de crecimiento.
2. La población de *M. royeri* en Ecuador es altamente sensible al principio activo contenido en el fungicida flutolanil, y a la molécula azoxystrobin.
3. La agresividad de los aislados de *M. royeri* no se expresa diferencialmente en los clones de cacao en condiciones de campo, pero si expresa en la edad del fruto (29 días). Solo MR59 fue más agresivo externamente en EET96. Según el daño interno, los clones EET96 y EET103 se clasifican como resistente y moderadamente resistente respectivamente.
4. La diferenciación genética de las poblaciones fue mayor en función de la provincia (39%) de origen. El clima, vegetación, precipitación y el tipo suelo no diferenciaron a las poblaciones.

## RECOMENDACIONES

1. Las dosis mínimas en campo nunca deben estar por debajo de 0.000127 kg i.a/Ha ya que las dosis bajas estimulan el crecimiento del hongo.
2. Evaluar la agresividad de *M. royeri* en épocas diferentes de noviembre-enero, para conocer si existe variación en ambientes distintos.
3. Considerar el manejo de *M. royeri* por origen geográfico (provincias), para evitar que la diversidad del patógeno se incremente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre-Planter, E. (2007). Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. *Ecología Molecular*, 49–62. Retrieved from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap2.pdf>
- Alcides Calva, P. R. (2016). Guía técnica para el establecimiento del cacao súper árbol, 96. Retrieved from [http://www.eco-consult.com/fileadmin/user\\_upload/pdf/downloads/Guia\\_tecnica\\_Cacao\\_10\\_2016.pdf](http://www.eco-consult.com/fileadmin/user_upload/pdf/downloads/Guia_tecnica_Cacao_10_2016.pdf)
- Ali, S. S., Shao, J., Strem, M. D., Phillips-Mora, W., Zhang, D., Meinhardt, L. W., & Bailey, B. A. (2015a). Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Frontiers in Microbiology*, 6, 850. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00850>
- Ali, S. S., Shao, J., Strem, M. D., Phillips-Mora, W., Zhang, D., Meinhardt, L. W., & Bailey, B. A. (2015b). Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00850>
- Álvarez, J. C., Martínez, S. C., & Coy, J. (2014). Biology stage of *Moniliophthora roreri* in Colombia. <https://doi.org/10.15446/acag>
- Amores Puyutaxi, F. M., Agama Parreño, J. E., Suárez Capello, C., Quiroz Vera, J. G., & Motato, N. (2009). EET 575 y EET 576: Nuevos clones de cacao nacional para la zona central de Manabí. Retrieved February 20, 2020, from <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1517>
- Anderson, J. B., Bailey, S. S., & Pukkila, P. J. (1989). Variation in ribosomal dna among biological species of *armillaria*, a genus of root-infecting fungi. *Evolution*, 43(8). <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02615.x>
- Aranzazu H, F. | C. Z. G. (1977). Observaciones sobre control y sintomatología de *Monilia roreri* Cif. & Par., en la zona de Urabá, Colombia. Retrieved February 20, 2020, from <http://opac.biblioteca.iica.int/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=67292>
- Attanayake, R. N., Porter, L., Johnson, D. A., & Chen, W. (2012). Genetic and phenotypic diversity and random association of DNA markers of isolates of the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* from soil on a fine geographic scale.

- Soil Biology and Biochemistry*, 55, 28–36.  
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2012.06.002>
- B.A., A. S. O. A. D. O., & Ogundeji. (2017). Impact of climate change on timing and frequency of fungicide application for the control of Phytophthora pod rot of cacao in Nigeria, (November), 13–17.
- Bailey, B. A., Evans, H. C., Phillips-Mora, W., Ali, S. S., & Meinhardt, L. W. (2018). Moniliophthora roreri, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580–1594. <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- Bailey, B. A., Melnick, R. L., Strem, M. D., Crozier, J., Shao, J., Sicher, R., ... Meinhardt, L. (2014). Differential gene expression by Moniliophthora roreri while overcoming cacao tolerance in the field. *Molecular Plant Pathology*, 15(7), 711–729. <https://doi.org/10.1111/mpp.12134>
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7). <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Bateman, R. P., Hidalgo, E., Garcia, J., Arroyo, C., ten Hoopen, G. M., Adonijah, V., & Krauss, U. (2005). Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (Moniliophthora roreri) in Costa Rican cocoa (Theobroma cacao). *Annals of Applied Biology*, 147(2), 129–138. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.00012.x>
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>
- Brenes, O. (1983). Evaluación de la resistencia a Monilia roreri y su relación con algunas características morfológicas del fruto de cultivares de cacao (Theobroma cacao L.).
- Calafell, F., Shuster, A., Speed, W., Kidd, J., & Kidd, K. (1998). Short tandem repeat polymorphism evolution in humans. *European Journal of Human Genetics*, 6(1), 38–49. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200151>
- Campion, C., Chatot, C., Perraton, B., & Andrivon, D. (2003). Anastomosis groups, pathogenicity and sensitivity to fungicides of Rhizoctonia solani isolates collected on potato crops in France. *European Journal of Plant Pathology*, 109(9), 983–992. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000003829.83671.8f>
- Cárdenas, C. y J. G. (1986). Evaluación de la respuesta de algunos cultivares del cacao (Theobroma cacao L.) a Moniliophthora roreri mediante dos métodos de

inoculación en frutos y en semilla en estado radicular. *Universidad de Agronomía*.  
<https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47830>

- Carmen Suárez-Capello, Freddy Amores, O. L. (2006). “*Developing Effective Sustainable Crop Protection Systems for Increased Cocoa Production*” “*NEW SOURCES TO RESISTANCE TO Moniliophthora roreri*.” Retrieved from [http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3519/1/Developing\\_Effective\\_Sustainable\\_Crop\\_Protection\\_Systems\\_Increased\\_Cocoa\\_Production\\_copia.pdf](http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3519/1/Developing_Effective_Sustainable_Crop_Protection_Systems_Increased_Cocoa_Production_copia.pdf)
- Carrera-sánchez, K., Paredes, L. M., & Autora, M. L. (2014). Protocolo para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* ( Cif y Par ) Evans et al . en frutos de cacao cv . ‘ Nacional ’ de la Amazonía ecuatoriana al . from cacao fruits cv . ‘ National ’ in the Ecuadorian Amazonia, *14*(3), 147–150.
- Charlesworth, B. (1999). *Principles of Population Genetics*. 3rd edition (1993-re-issued 1997). By Daniel L. Hartl and Andrew G. Clark. Sunderland, MA: Sinauer 519 pp. *BioEssays*, *20*(12), 1055–1055. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-1878\(199812\)20:12<1055::aid-bies14>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-1878(199812)20:12<1055::aid-bies14>3.0.co;2-x)
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., & Volckaert, F. A. M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution , evolution , function and applications : A review with special reference to fish genetics, *255*, 1–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.031>
- Circabc. (2011). *Copper (II) Hydroxide*. Retrieved from [https://circabc.europa.eu/sd/a/e469a0ef-40df-4aa0-a813-1fff7e4726e9/Copper II hydroxide \(assessment report as finalised on 22.09.11\).pdf](https://circabc.europa.eu/sd/a/e469a0ef-40df-4aa0-a813-1fff7e4726e9/Copper%20II%20hydroxide%20(assessment%20report%20as%20finalised%20on%2022.09.11).pdf)
- Croplife. (2019). Moniliasis del cacao. Retrieved from <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/moniliasis-del-cacao>
- Cuéllar, A. S., Daza, M. A. H., León, C. H. R., Tobón, Y. M. S., Guzmán, M. N. N., & Rodríguez, D. F. C. (2015). Reacción a *Moniliophthora roreri* en *Theobroma* spp. en Caquetá, Colombia. *Summa Phytopathologica*, *41*(3), 183–190.  
<https://doi.org/10.1590/0100-5405/2026>
- Cyril Dutech, Jerome Enjalbert, Elisabeth Fournier, F. D., & Benoit Barre`s e, Jean Carlier, Didier Tharreau, T. G. (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi, *44*, 933–949. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.05.003>
- Dalman, K., Himmelstrand, K., Olson, Å., Lind, M., Brandström-Durling, M., & Stenlid, J. (2013). A Genome-Wide Association Study Identifies Genomic Regions for Virulence in the Non-Model Organism *Heterobasidion annosum* s.s. *PLoS ONE*, *8*(1), e53525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053525>

- Díaz-Valderrama, J. R., & Aime, M. C. (2016). The cacao pathogen *Moniliophthora roreri* (Marasmiaceae) possesses biallelic A and B mating loci but reproduces clonally. *Heredity*, *116*(6), 491–501. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.5>
- Donaldson, S. L., Chopin, T., & Saunders, G. W. (1998). Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) as a source of genetic markers for red algae. *Journal of Applied Phycology*, *10*(4), 365–370. <https://doi.org/10.1023/A:1008063105741>
- Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès, B., Carlier, J., ... Giraud, T. (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, *44*(10), 933–949. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.05.003>
- Erneholm, I. (1948). Cacao production of South America. *Cacao Production of South America*.
- Evans, H. C., Evans, H. C., & Stahel, M. (2018). *Moniliophthora roreri* H. C. Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* manejo, (June).
- Evans, H. C., Holmes, K. A., & Reid, A. P. (2003). Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology*, *52*(4), 476–485. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00867.x>
- Evans, H. C., Stalpers, J. A., Samson, R. A., & Benny, G. L. (1978). On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*, *56*(20), 2528–2532. <https://doi.org/10.1139/b78-305>
- Excoffier L, Smouse PE, Q. J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. - PubMed - NCBI. *NCBI*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644282>
- Forin, N., Nigris, S., Voyron, S., Girlanda, M., Vizzini, A., Casadoro, G., & Baldan, B. (2018). Next Generation Sequencing of Ancient Fungal Specimens: The Case of the Saccardo Mycological Herbarium. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *6*(AUG), 129. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00129>
- Fowler, R.L. y López R., G. H. (1949, December 15). The cacao industry of Ecuador. *Foreign Agriculture Report*. Retrieved from <https://ia700403.us.archive.org/29/items/cacaoindustryofe34fowl/cacaoindustryofe34fowl.pdf>.
- Franke, M. D., Brenneman, T. B., Stevenson, K. L., & Padgett, G. B. (1998). Sensitivity of isolates of *Sclerotium rolfsii* from peanut in Georgia to selected fungicides. *Plant Disease*, *82*(5), 578–583. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.5.578>

- Freile-Almeida, A., Morgado-Martínez, Jorge Pérez-García, M., Armando, A.-P. G., Demesio, & Reinaldo., D.-B. (2018). Soil microorganisms and plant diseases associated to cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes in the Ecuadorian Amazon. *Acta Agron*, 67(1), 23–29. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n1.60828>
- Frenkel, O., Portillo, I., Brewer, M. T., Péros, J. P., Cadle-Davidson, L., & Milgroom, M. G. (2012). Development of microsatellite markers from the transcriptome of *Erysiphe necator* for analysing population structure in North America and Europe. *Plant Pathology*, 61(1), 106–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02502.x>
- Gardini Enrique Arévalo,, Sánchez-Torres Gina Paola, Eibis, Flores, Kadir, Markes, Betsabe, Leon-Ttacca, Dapeng, Zhang, Lyndel, Meinhardt, Virupax, B. (2017). *Comportamiento de los clones de cacao de la colección del ICT frente a Moniliophthora roreri en Tarapoto, Peru*. Lima. Retrieved from [https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/68-icco-workshops-and-seminars/352-international-cocoa-research-symposium-lima-peru-2017/438-proceedings-of-the-international-symposium-on-cocoa-research-2017/441-thematic-3.html](https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/68-icco-workshops-and-seminars/352-international-cocoa-research-symposium-lima-peru-2017/438-proceedings-of-the-international-symposium-on-cocoa-research-2017/441-thematic-3.html)
- Garzon, N. G. (2013). CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS DE SUELO AISLADOS DE LOS PÁRAMOS DE GUASCA Y CRUZ VERDE, CUNDINAMARCA - COLOMBIA, 49.
- Goldstein, D. B., & Pollock, D. D. (1994). Least Squares Estimation of Molecular Distance - Noise Abatement in Phylogenetic Reconstruction. *Theoretical Population Biology*, 45(3), 219–226. <https://doi.org/10.1006/tpbi.1994.1012>
- Goldstein, D. B., Zhivotovsky, L. A., Nayar, K., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L., & Feldman, M. W. (1996). Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y chromosomes [published erratum appears in *Mol Biol Evol* 1997 Mar;14(3):354]. *Molecular Biology and Evolution*, 13(9), 1213–1218. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025686>
- González, G., Alemán, S., & Infante, D. (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Science*, 165(3), 595–601. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00227-9)
- Goudet, J. (2003). FSTAT (version 2.9.4), a program (for Windows 95 and above) to estimate and test population genetics parameters, 53. Retrieved from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Grisales Ortega, S., & Afanador Kafuri, L. (2007). Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia. *Revista*

*Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 15–32.

- Gupta, P., Roy, J., Sci, M. P.-C., & 2001, undefined. (2001). Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Repository.Ias.Ac.In.* Retrieved from <http://repository.ias.ac.in/74817/1/74817.pdf>
- Gymrek, M., Willems, T., Guilmatre, A., Zeng, H., Markus, B., Georgiev, S., ... Erlich, Y. (2015). Abundant contribution of short tandem repeats to gene expression variation in humans. *Nature Genetics*, 48(1), 22–29. <https://doi.org/10.1038/ng.3461>
- Haldane J. B. S. (1957). The cost of natural selection. Retrieved December 2, 2019, from <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02984069>
- Henderson, P. (1997). Cocoa, Finance and the State in Ecuador, 1895-1925. <https://doi.org/10.2307/3339105>
- Hood, L., Heath, J. R., Phelps, M. E., & Lin, B. (2004). Systems Biology and New Technologies Enable Predictive and Preventative Medicine. *Science*, 306(5696), 640–643. <https://doi.org/10.1126/science.1104635>
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., & Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*, 168(1), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>
- Humedades Temporales Fabiola Magallán Hernández, D., Martínez, M., Hernández Sandoval, L., & Ken Oyama, Y. (2009). Estructura Genética De Poblaciones De *Eriocaulon Bilobatum* (Eriocaulaceae): Una Especie Amenazada. *GENÉTICA Bol.Soc.Bot.Méx*, 85, 81–88.
- Huw A. Ogilvie. (2018). UPGMA and WPGMA trees | Species and Gene Evolution. Retrieved from <https://www.cs.rice.edu/%7B~%7Dogilvie/comp571/2018/10/25/upgma-and-wpgma.html>
- Inamhi. (2019). *Boletín Climático*. Retrieved from [www.inamhi.gob.ec](http://www.inamhi.gob.ec)
- INIAP-DICYT. (IBC). La moniliasis, una plaga del cacao con graves efectos. Retrieved December 25, 2019, from <http://www.dicyt.com/noticias/la-moniliasis-una-plaga-del-cacao-con-graves-efectos>
- Jaimes, Y. Y., Gonzalez, C., Rojas, J., Cornejo, O. E., Mideros, M. F., Restrepo, S., ... Furtado, E. L. (2016a). Geographic Differentiation and Population Genetic Structure of *Moniliophthora roreri* in the Principal Cocoa Production Areas in Colombia. *Plant Disease*, 100(8), 1548–1558. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1498-RE>

- Jaimes, Y. Y., Gonzalez, C., Rojas, J., Cornejo, O. E., Mideros, M. F., Restrepo, S., ... Furtado, E. L. (2016b). Geographic Differentiation and Population Genetic Structure of *Moniliophthora roreri* in the Principal Cocoa Production Areas in Colombia. *Plant Disease*, *100*(8), 1548–1558. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1498-RE>
- Jarne, P., & Lagoda, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, *11*(10), 424–429. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)
- Jesús Sánchez y Aroldo Dubón. (2012). *Fundación Hondureña de investigación agrícola programa de cacao y agroforestería* .
- José Guillermo Rondón C. (2020). El mejoramiento genético de cacao un reto no cumplido. Retrieved February 21, 2020, from <https://censalud.ues.edu.sv/cacao/CEDOC/ficha.php?id=1529>
- Kamvar, Z. N., Amaradasa, B. S., Jhala, R., McCoy, S., Steadman, J. R., & Everhart, S. E. (2017). Population structure and phenotypic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* from dry bean (*Phaseolus vulgaris*) in the United States. *PeerJ*, *2017*(12). <https://doi.org/10.7717/peerj.4152>
- Kreis, R. A., Dillard, H. R., & Smart, C. D. (2016). Population diversity and sensitivity to azoxystrobin of *alternaria brassicicola* in New York State. *Plant Disease*, *100*(12), 2422–2426. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0414-RE>
- L. V. Edginton, K. L. an. G. L. B. (1971). *Fungitoxic Spectrum of Benzimidazole Compounds*. Retrieved from [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1971Articles/Phyto61n01\\_42.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1971Articles/Phyto61n01_42.PDF)
- Leandro-Muñoz, M. E., Tixier, P., Germon, A., Rakotobe, V., Phillips-Mora, W., Maximova, S., & Avelino, J. (2017). Effects of microclimatic variables on the symptoms and signs onset of *Moniliophthora roreri*, causal agent of *Moniliophthora* pod rot in cacao. *PLoS ONE*, *12*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184638>
- Lehtonen, M. J., Ahvenniemi, P., Wilson, P. S., German-Kinnari, M., & Valkonen, J. P. T. (2008). Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. *Plant Pathology*, *57*(1), 141–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01694.x>
- Li, Y.-C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, *11*(12), 2453–2465. <https://doi.org/10.1046/j.1365->

294X.2002.01643.x

- Lin, N., & Garry, V. F. (2000). In vitro studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in red river valley, minnesota. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 60(6), 423–439. <https://doi.org/10.1080/00984100050033494>
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 90, 29–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aamb.2014.09.001>
- Luis F. Gaspar. (2013). Estrategias para el Manejo de la Resistencia a Fungicidas de Alto Riesgo: Estrobirulinas, Benzimidazoles, Tiofanatos y Triazoles - Engormix. Retrieved December 21, 2019, from <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/estrategias-manejo-resistencia-fungicidas-t30601.htm>
- Magdiel Torres de la Cruz, C. F. O. G. D. T. O. A. M. A. y C. N. D. (2011a). Efecto del Azoxystrobin Sobre *Moniliophthora roreri*, Agente Causal de la Moniliasis del Cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología*. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092013000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000100007)
- Magdiel Torres de la Cruz, C. F. O. G. D. T. O. A. M. A. y C. N. D. (2011b). Effect of the Azoxystrobin on *Moniliophthora roreri*, Causal Agent of Frosty Pod Rot of Cocoa (*Theobroma cacao*). Retrieved December 18, 2019, from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092013000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000100007)
- Manzo Sánchez, G., & Canto Canché Andrew James Kay, B. (2005). Hongos patógenos: enemigos versátiles. Retrieved November 23, 2019, from <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-academia-mexicana-de-ciencias/articulo/hongos-patogenos-enemigos-versatiles>
- Maridueña-Zavala, M. G., Villavicencio-Vásquez, M. E., Cevallos-Cevallos, J. M., & Peralta, E. L. (2016). Molecular and morphological characterization of *Moniliophthora roreri* isolates from cacao in Ecuador. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(4), 460–469. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1261372>
- Maridueña Zavala, M. G. (2015). *Estudio de la microbiota patogenica de cacao criollo (theobroma cacao) en cinco provincias de la costa ecuatoriana y evaluacion de la efectividad in vitro de los bioles locales para su control*. Espol, Guayaquil. Retrieved from <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/30224>

- McElroy, M. S., Navarro, A. J. R., Mustiga, G., Stack, C., Gezan, S., Peña, G., ... Motamayor, J. C. (2018). Prediction of Cacao (*Theobroma cacao*) Resistance to *Moniliophthora* spp. Diseases via Genome-Wide Association Analysis and Genomic Selection. *Frontiers in Plant Science*, 9, 343. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00343>
- Meinhardt, L. W., Costa, G. G., Thomazella, D. P. T., Teixeira, P. J. P. L., Carazzolle, M., Schuster, S. C., ... Bailey, B. A. (2014). Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics*, 15(1), 164. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-164>
- Melo, B. L. B., de Souza, J. T., Santos, R. M. F., Rehner, S. A., Solis, K. H., Suarez, C., ... Gramacho, K. P. (2014a). Development of microsatellites for the cacao frosty pod rot pathogen, *Moniliophthora roreri*. *Forest Pathology*, 44(4), 320–324. <https://doi.org/10.1111/efp.12103>
- Melo, B. L. B., de Souza, J. T., Santos, R. M. F., Rehner, S. A., Solis, K. H., Suarez, C., ... Gramacho, K. P. (2014b). Development of microsatellites for the cacao frosty pod rot pathogen, *Moniliophthora roreri*. *Forest Pathology*, 44(4), 320–324. <https://doi.org/10.1111/efp.12103>
- Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167330>
- Mendgen K, H. M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. - PubMed - NCBI. Retrieved February 29, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167330>
- Meng, J. W., He, D. C., Zhu, W., Yang, L. N., Wu, E. J., Xie, J. H., ... Zhan, J. (2018). Human-mediated gene flow contributes to metapopulation genetic structure of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* from potato. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00198>
- Meng, J. W., Zhu, W., He, M. H., Wu, E. J., Yang, L. N., Shang, L. P., & Zhan, J. (2015). High genotype diversity and lack of isolation by distance in the *Alternaria solani* populations from China. *Plant Pathology*, 64(2), 434–441. <https://doi.org/10.1111/ppa.12275>
- Michael WeißMarkus Göker. (2011). UPGMA - an overview | ScienceDirect Topics. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/upgma>
- Michelmore, R. W., & Hulbert, S. H. (1987). Molecular Markers for Genetic Analysis of

- Phytopathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 25(1), 383–404.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.002123>
- Mohammed Ezziyani, Consuelo Pérez Sánchez, A. S. A. (2004). Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol de Phytophthora capsici en plantas de pimiento (Capsicum annuum L.), 12. Retrieved from  
<https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30441/29631>
- Mustiga, G. M., Gezan, S. A., Phillips-Mora, W., Arciniegas-Leal, A., Mata-Quirós, A., & Motamayor, J. C. (2018). Phenotypic Description of Theobroma cacao L. for Yield and Vigor Traits From 34 Hybrid Families in Costa Rica Based on the Genetic Basis of the Parental Population. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00808>
- Nei, M. (1972). Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist*. The University of Chicago Press/The American Society of Naturalists.  
<https://doi.org/10.2307/2459777>
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press.
- Niks, R. E., & Rubiales, D. (2002). Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica*, 124(2), 201–216.  
<https://doi.org/10.1023/A:1015634617334>
- P. Addo-Fordjour, H. Gyimah Gyamfi, B. F.-B., & Akrofi, A. Y. (2013). (PDF) Impact of copper-based fungicide application on copper contamination of cocoa plants and soils in the Ahafo Ano North District, Ashanti region, Ghana. Retrieved from  
[https://www.researchgate.net/publication/286846638\\_Impact\\_of\\_copper-based\\_fungicide\\_application\\_on\\_copper\\_contamination\\_of\\_cocoa\\_plants\\_and\\_soils\\_in\\_the\\_Ahafo\\_Ano\\_North\\_District\\_Ashanti\\_region\\_Ghana](https://www.researchgate.net/publication/286846638_Impact_of_copper-based_fungicide_application_on_copper_contamination_of_cocoa_plants_and_soils_in_the_Ahafo_Ano_North_District_Ashanti_region_Ghana)
- Pereira, W. V., Primiano, I. V., Morales, R. G. F., Peres, N. A., Amorim, L., & May De Mio, L. L. (2017). Reduced Sensitivity to Azoxystrobin of Monilinia fructicola Isolates From Brazilian Stone Fruits is Not Associated With Previously Described Mutations in the Cytochrome b Gene. *Plant Disease*, 101(5), 766–773.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1247-RE>
- Pérez, Luis; Batlle, Alicia; Hernández, Alexis; Pérez, Michel; Trujillo, Roberto; Álvarez, C., & Méndez, A. (2003). Evolución de la sensibilidad a fungicidas de las poblaciones de mycosphaerella fijiensis morelet en banano en cuba.
- Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (Theobroma cacao) pathogen Moniliophthora roreri in tropical America. *Plant Pathology*, 56(6), 911–922. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x>

- Phillips-mora, W., Arciniegas-leal, A., Mata-quirós, A., Motamayor-arias, J. C., & Motamayor-arias, J. C. (2012). *Catálogo Catálogo seleccionados por el catie para siembras comerciales*.
- Phillips-Mora, W., Castillo, J., Krauss, U., Rodríguez, E., & Wilkinson, M. J. (2005). Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology*, 54(4), 483–490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01210.x>
- Phillips Mora, W. (1986). Evaluación de la resistencia de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) a *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al. Retrieved from <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/1954>
- Porras Umana, V. H. (1985). *Determinación de la estabilidad de la resistencia a Monilia roreri en cultivares de cacao en dos zonas de Costa Rica*.
- Porras, V. . G. M. L. . E. G. . G. J. J. (1988). Determinación de la estabilidad de la tolerancia a *Moniliophthora roreri* en cultivares de cacao en dos zonas de Costa Rica. Retrieved February 20, 2020, from <http://opac.biblioteca.iica.int/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=67891#>
- Rafael Alberto Osorio Sánchez. (2010). Estudio del efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* en la provincia de Esmeraldas. Retrieved February 20, 2020, from <https://biblioteca.epn.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=10193>
- Ramírez-Bello, J., & Jiménez, M. (2017). *Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales*.
- Reuveni, M., & Sheglov, D. (2002). Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. *Crop Protection*, 21(10). [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00073-X)
- Ricardo Antonio Delgado; Zoila Karina Solís; Carmita Suárez-Capello, Karina Peres Gramacho, F. G. F. and U. V. L. (2003). Genetic diversity among some cocoa (*Theobroma cacao* L.) elite clones in Ecuador. Retrieved December 25, 2019, from [https://www.researchgate.net/publication/232723867\\_Genetic\\_diversity\\_among\\_some\\_cocoa\\_Theobroma\\_cacao\\_L\\_elite\\_clones\\_in\\_Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/232723867_Genetic_diversity_among_some_cocoa_Theobroma_cacao_L_elite_clones_in_Ecuador)
- Rorer, J. (1918). Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y metodos modernos apropiados al cultivo del cacao, informe presentado al presidente y miembros de la Asociación de agricultores del Ecuador. Retrieved February 29, 2020, from

- <https://www.worldcat.org/title/enfermedades-y-plagas-del-cacao-en-el-ecuador-y-metodos-modernos-apropiados-al-cultivo-del-cacao-informe-presentado-al-presidente-y-miembros-de-la-asociacion-de-agricultores-del-ecuador/oclc/28318044>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sánchez-Mora, F. D., Mariela Medina-Jara, S., Díaz-Coronel, G. T., Ramos-Remache, R. A., Vera-Chang, J. F., Vásquez-Morán, V. F., ... Onofre-Nodari, R. (2015). Potencial sanitario y productivo de 12 clones de cacao en Ecuador. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(3), 265–274.
- Sánchez López, J. A. (1982). *Reaccion de cultivares de cacao a la inoculacion artificial Monilia royeri*.
- Savelkoul, P. H., Aarts, H. J., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., ... Lenstra, J. A. (1999). Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3083–3091. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488158>
- Shaner, G., Finney, R. E., I, W. K. C., Vermillion, C., Farm, A., Lafayette, W., & Potassium, I. (1977). The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat Unfortunately, is only a partial September on a fine sandy loam soil on the Purdue genetically as a quantitative trait ( 12 ). Moreover, Knox ' s slow-mild, 1051–1056.
- Slatkin, M., & Barton, N. H. (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43(7), 1349–1368. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02587.x>
- Sterling Cuéllar, A., Hermida Daza, M. A., Rodríguez León, C. H., Salas Tobón, Y. M., Nieto Guzmán, M. N., & Caicedo Rodríguez, D. F. (2015). Reacción a *Moniliophthora royeri* en *Theobroma* spp. en Caquetá, Colombia. *Summa Phytopathologica*, 41(3), 183–190. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2026>
- Suárez-Capello, C. (1983). Problemática del cultivo del cacao en el Ecuador. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2003.09.001>
- Suárez-Contreras Liliana Yanet. (2017). Diversidad genética de *Moniliophthora royeri* mediante Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v11n2/2011-2173-rcch-11-02-00425.pdf>
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H., & Bonierbale, M. W. (1989). RFLP

- Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. *Nature Biotechnology*, 7(3), 257–264. <https://doi.org/10.1038/nbt0389-257>
- Thorold, C. A. (1975). Diseases of cocoa. *Diseases of Cocoa*.
- Torres-de-la-Cruz, M., Quevedo-Damián, I., Ortiz-García, C. F., Lagúnez-Espinoza, L. del C., Nieto-Angel, D., & Cruz, M. P. la. (2019). Control químico de *Moniliophthora roreri* en México. *Biotecnia*, 21(2), 55–61. <https://doi.org/10.18633/BIOTECNIA.V21I2.906>
- Universidad Nacional de Costa Rica (UNA). (2019). Flutolanil. Retrieved December 21, 2019, from <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-datos-menu/283-flutolanil>
- Utrilla, L. del carmen echeverría. (2012). *Efectividad biológica del fungicida azoxystrobin sobre Alternaria alternata de tomate in vitro*.
- Valerio Arnaboldi, R. I. M. D. (2015). Jaccard Coefficient - an overview | ScienceDirect Topics. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/topics/computer-science/jaccard-coefficient>
- Van der Lee T, De Witte I, Drenth, Alfonso, & Govers. (1997). AFLP Linkage Map of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 21(3), 278–291. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9299198>
- W. Phillips-Mora, A. M.-Q. & A. A.-L. (2017). Generation of cacao clones with durable resistant against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans et al.). *Journal of Chemical Information and Modeling*, (9), 9. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wang, X. mei. (2011). Inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating the genuine species of rhubarb. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(5), 758–764.
- Weiland John J. (n.d.). DNA extraction from Fungi. Retrieved September 20, 2019, from <http://www.fgsc.net/fgn44/weiland.html>
- Weir, B. S., & Basten, C. J. (1990). Sampling strategies for distances between DNA sequences. *Biometrics*, 46(3), 551–582. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2242405>
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6), 1358. <https://doi.org/10.2307/2408641>
- Wilbert Phillips-Mora. (2003). *Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (Theobroma cacao L.) fungus Moniliophthora roreri (Cif.)*

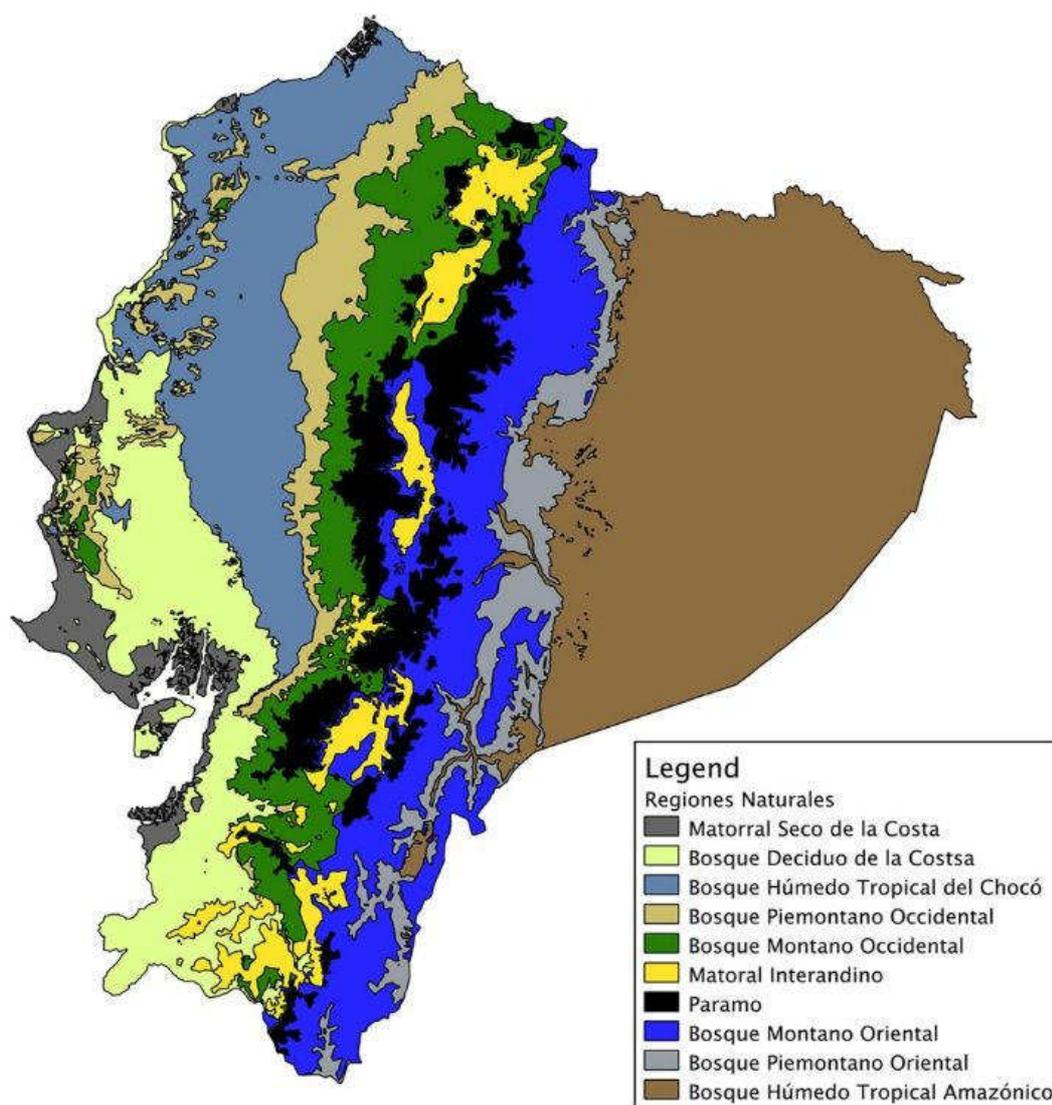
*Evans et al. as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence.* Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences, The University of Reading, RG6 6AS, UK. Retrieved from [https://censalud.ues.edu.sv/CDOC-Deployment/documentos/Origin,\\_biogeography,\\_genetic\\_diversity\\_and\\_taxonomic\\_affinities\\_of\\_the\\_cacao.pdf](https://censalud.ues.edu.sv/CDOC-Deployment/documentos/Origin,_biogeography,_genetic_diversity_and_taxonomic_affinities_of_the_cacao.pdf)

Yeirme Jaimes, F. A. (2011). Behavior of introduced regional clones of *Theobroma cacao* toward the infection *Moniliophthora roreri* in three different regions of Colombia | Jaimes | *Agronomía Colombiana*. Retrieved February 20, 2020, from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/15678>

Zachary A. Szpiecha, & Noah A. Rosenberg. (2011). On the size distribution of private microsatellite alleles. Retrieved from <https://rosenberglab.stanford.edu/papers/SzpiechRosenberg2011-TPB.pdf>

# ANEXOS

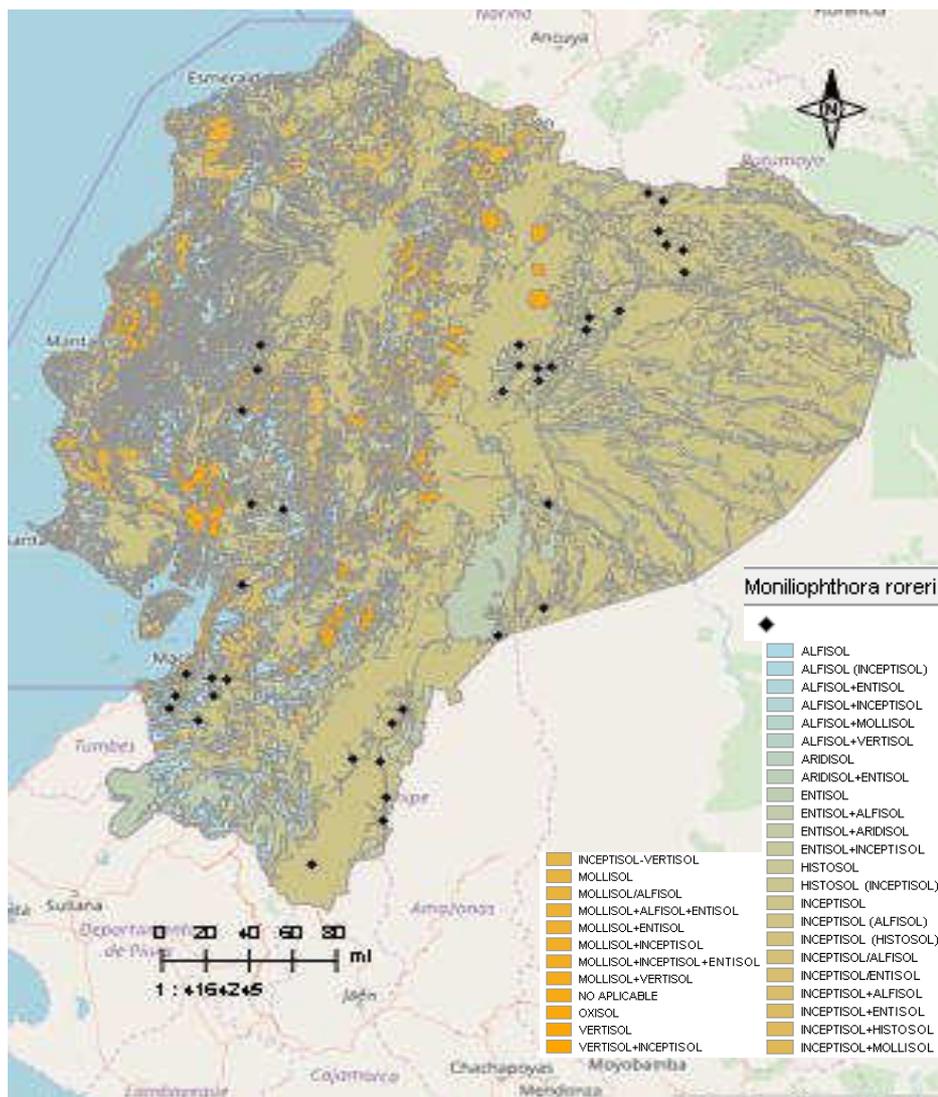
## ANEXO 1. Vegetación de las regiones naturales del Ecuador



**Fuente:** bioweb Ecuador (2019) disponible en:  
<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/RegionesNaturales>



## ANEXO 3. Mapa de tipos Suelos del Ecuador



Fuente: MAGAP-SIPA. Taxonomía de suelos versión 2002, generado a partir de datos Shapefile disponible en:

<http://geoportal.agricultura.gob.ec/geonetwork/srv/spa/catalog.search#/search?any=taxonomia%20de%20suelos>

ANEXO 4. Aislados de *M. royeri*. origen geográfico. coordenadas y la IC<sub>50</sub> a Flutolanil y azoxystrobin.

Aislados	Origen	Latitud	Longitud	IC <sub>50</sub>	
				Flutolanil	Azoxystrobin
MR24	Morona Santiago	-2.3836	-77.50055556	0.019	0.0006
MR25	Morona Santiago	-2.3836	-77.50055556	0.023	0.0009
MR26	Morona Santiago	-2.3836	-77.50055556	0.029	0.0019
MR28	Morona Santiago	-2.3836	-77.50055556	0.032	0.0000
MR29	Morona Santiago	-2.3836	-77.50055556	0.032	0.0016
MR31	Zamora Chinchipe	-3.5433	-78.53725	0.045	0.0053
MR32	Zamora Chinchipe	-3.6445	-78.61041667	0.036	0.0027
MR33	Zamora Chinchipe	-3.927	-78.68394444	0.039	0.0004
MR34	Zamora Chinchipe	-3.6132	-78.61291667	0.030	0.0009
MR35	Zamora Chinchipe	-4.6794	-79.12841667	0.005	0.0010
MR36	Zamora Chinchipe	-3.9449	-78.71427778	0.003	0.0043
MR37	Zamora Chinchipe	-3.911	-78.678	0.060	0.0006
MR38	Zamora Chinchipe	-3.5693	-78.54386111	0.003	0.0002
MR39	Zamora Chinchipe	-3.927	-78.68394444	0.003	0.0016
MR40	Zamora Chinchipe	-3.9038	-78.86461111	0.003	0.0008
MR41	Zamora Chinchipe	-4.1868	-78.64708333	0.041	0.0033
MR42	Zamora Chinchipe	-4.3534	-78.66222222	0.024	0.0069
MR43	Zamora Chinchipe	-3.5693	-78.54386111	0.060	0.0054
MR45	Zamora Chinchipe	-2.1529	-77.702925	0.016	0.0050
MR46	Los Ríos	-1.0743	-79.48916667	0.059	0.0146
MR47	Los Ríos	-1.3739	-79.58666667	0.055	0.0111
MR48	Los Ríos	-0.8968	-79.47433333	0.008	0.0008
MR49	Sucumbíos	0.15611	-76.83327778	0.003	0.0033
MR50	Sucumbíos	0.23414	-76.8095	0.018	0.0020
MR51	Sucumbíos	0.22483	-76.91155556	0.026	0.0089
MR52	Sucumbíos	0.20897	-76.93530556	0.010	0.0009
MR53	Sucumbíos	0.21111	-76.96094444	0.032	0.0022
MR54	Sucumbíos	0.18358	-76.87647222	0.028	0.0005
MR55	Sucumbíos	-0.0656	-76.87211111	0.039	0.0018
MR56	Sucumbíos	-0.0691	-76.85786111	0.033	0.0146
MR58	Sucumbíos	-0.1491	-76.83530556	0.048	0.0032
MR59	Sucumbíos	-0.1624	-76.81908333	0.017	0.0365
MR60	Sucumbíos	-0.2062	-76.70947222	0.037	0.0002
MR61	Sucumbíos	-0.2032	-76.74425	0.028	0.0007
MR62	Sucumbíos	-0.1751	-76.82188889	0.042	0.0047

MR63	Orellana	-0.3695	-76.69436111	0.050	0.0014
MR64	Orellana	-0.3649	-76.77508333	0.008	0.0018
MR65	Orellana	-0.2822	-76.77683333	0.041	0.0220
MR66	Orellana	-0.2402	-76.80075	0.047	0.0005
MR67	Orellana	-0.6402	-77.12330556	0.041	0.0122
MR68	Orellana	-0.5687	-77.09136111	0.146	0.0004
MR69	Orellana	-0.7049	-77.16291667	0.008	0.0046
MR70	Orellana	-0.782	-77.33930556	0.047	0.0009
MR71	Orellana	-0.698	-77.31911111	0.005	0.0036
MR72	Napo	-0.8978	-77.77586111	0.047	0.0047
MR73	Napo	-1.0451	-77.77286111	0.031	0.0000
MR74	Napo	-1.0598	-77.66075	0.027	0.0004
MR75	Napo	-1.0546	-77.57094444	0.023	0.0089
MR76	Napo	-1.0041	-77.48597222	0.028	0.0009
MR77	Zamora Chinchipe	-2.5106	-77.38951667	0.029	0.0013
MR78	Zamora Chinchipe	-2.5147	-77.43025278	0.031	0.0070
MR79	Guayas	-2.0918	-79.324025	0.065	0.0022
MR80	Morona Santiago	-2.8056	-77.6165	0.030	0.0034
MR81	Morona Santiago	-3.0042	-77.90930556	0.047	0.0054
MR82	Pastaza	-1.1341	-77.64380556	0.024	0.0001
MR83	Pastaza	-1.1489	-77.64638889	0.018	0.0003
MR84	Pastaza	-1.229	-77.88586111	0.026	0.0066
MR85	Pastaza	-2.0505	-77.59227778	0.012	0.0033
MR86	Guayas	-2.1439	-79.39341667	0.047	0.0253
MR87	Guayas	-2.0568	-79.53411111	0.004	0.0062
MR88	Guayas	-2.6463	-79.59286111	0.047	0.0019
MR89	El Oro	-0.7049	-77.16291667	0.005	0.0001
MR90	El Oro	-3.315	-79.99388889	0.013	0.0060
MR91	El Oro	-3.3539	-79.91916667	0.042	0.0028
MR92	El Oro	-3.2272	-79.95555556	0.050	0.0012
MR93	El Oro	-3.4536	-80.02888889	0.054	0.0009
MR94	El Oro	-3.4903	-80.04388889	0.066	0.0010
MR95	El Oro	-3.5386	-80.06722222	0.134	0.0033
MR96	El Oro	-3.3219	-79.78361111	0.041	0.0107
MR97	El Oro	-3.3225	-79.73388889	0.039	0.0007
MR98	El Oro	-3.3794	-79.83861111	0.005	0.0077
MR99	El Oro	-3.4494	-79.77472222	0.059	0.0000
MR100	El Oro	-3.6297	-79.87416667	0.050	0.0067
MR101	El Oro	-3.4925	-79.95861111	0.047	0.0039

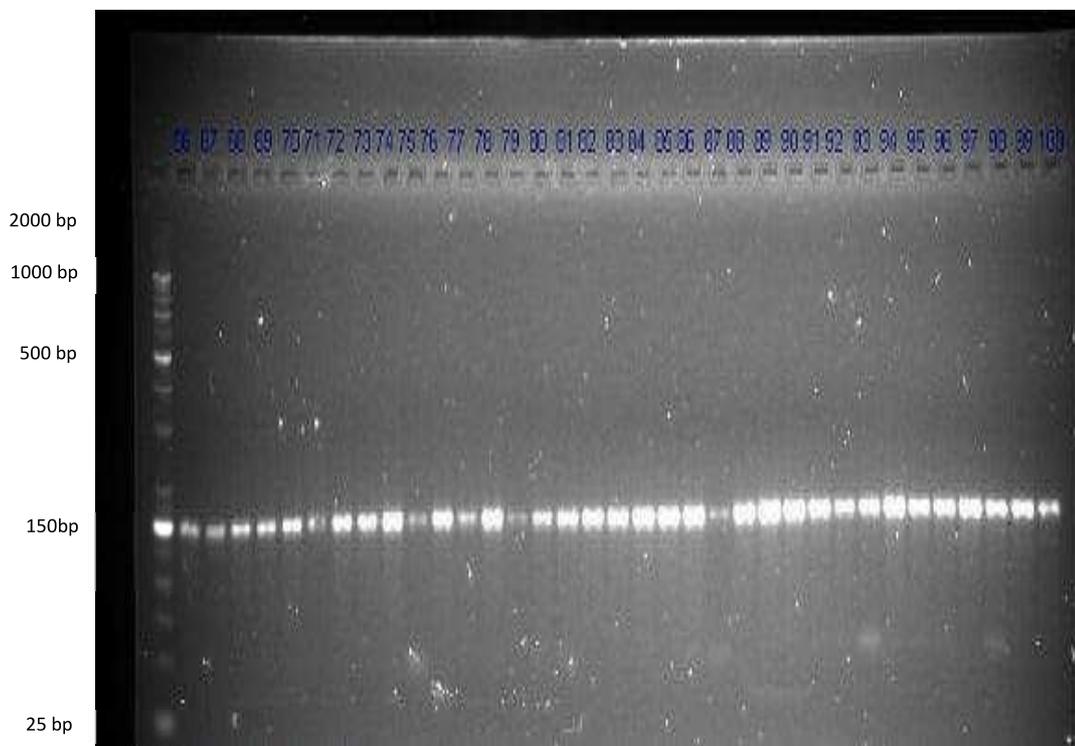
MR102	El Oro	-3.3319	-79.68888889	0.055	0.0025
MR103	Guayas	-3.3319	-79.68888889	0.079	0.0008

---

ANEXO 5. Lista de alelos para datos haploides de *M. royeri* por marcador microsatélite en el Ecuador

Alelos (pb)	mr-6	mr-10	mr-11	mr-13	mr-15	mr-22	mr-30	mr-31	mr-33
100	0	0	1	0	0	0	0	0	1
103	0	0	0	1	0	0	0	0	0
107	0	0	1	0	0	0	0	0	0
108	0	1	0	0	0	0	0	0	0
111	0	0	0	1	0	0	0	0	1
112	1	0	0	0	0	0	0	0	0
116	0	0	0	0	0	1	0	0	0
120	0	1	1	0	0	0	0	0	0
121	0	0	0	0	0	0	1	0	0
124	1	0	0	0	0	0	0	0	1
130	0	0	1	1	0	0	0	0	0
131	0	0	0	0	0	1	0	0	0
132	0	1	0	0	0	0	0	0	0
133	1	0	0	0	0	0	0	0	0
138	0	0	1	0	0	0	0	0	0
140	0	0	0	1	0	0	0	0	0
141	0	0	0	0	0	1	0	0	0
142	0	1	0	0	0	0	1	0	1
149	0	0	0	0	0	0	0	1	0
150	0	0	0	0	0	1	1	0	0
152	0	1	0	0	0	0	0	0	0
157	0	0	0	0	0	0	1	0	0
159	0	0	1	0	0	0	0	0	0
161	0	0	0	0	0	0	0	1	0
162	0	0	0	0	1	0	0	0	0
171	0	1	0	0	0	0	0	0	0
173	0	0	0	0	1	0	0	0	0
176	0	0	0	0	0	0	1	1	0
180	0	1	0	0	0	0	0	0	0
183	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Total No. Alelos	3	7	6	4	3	4	5	3	4

## ANEXO 6. Gel de agarosa de Alta resolución



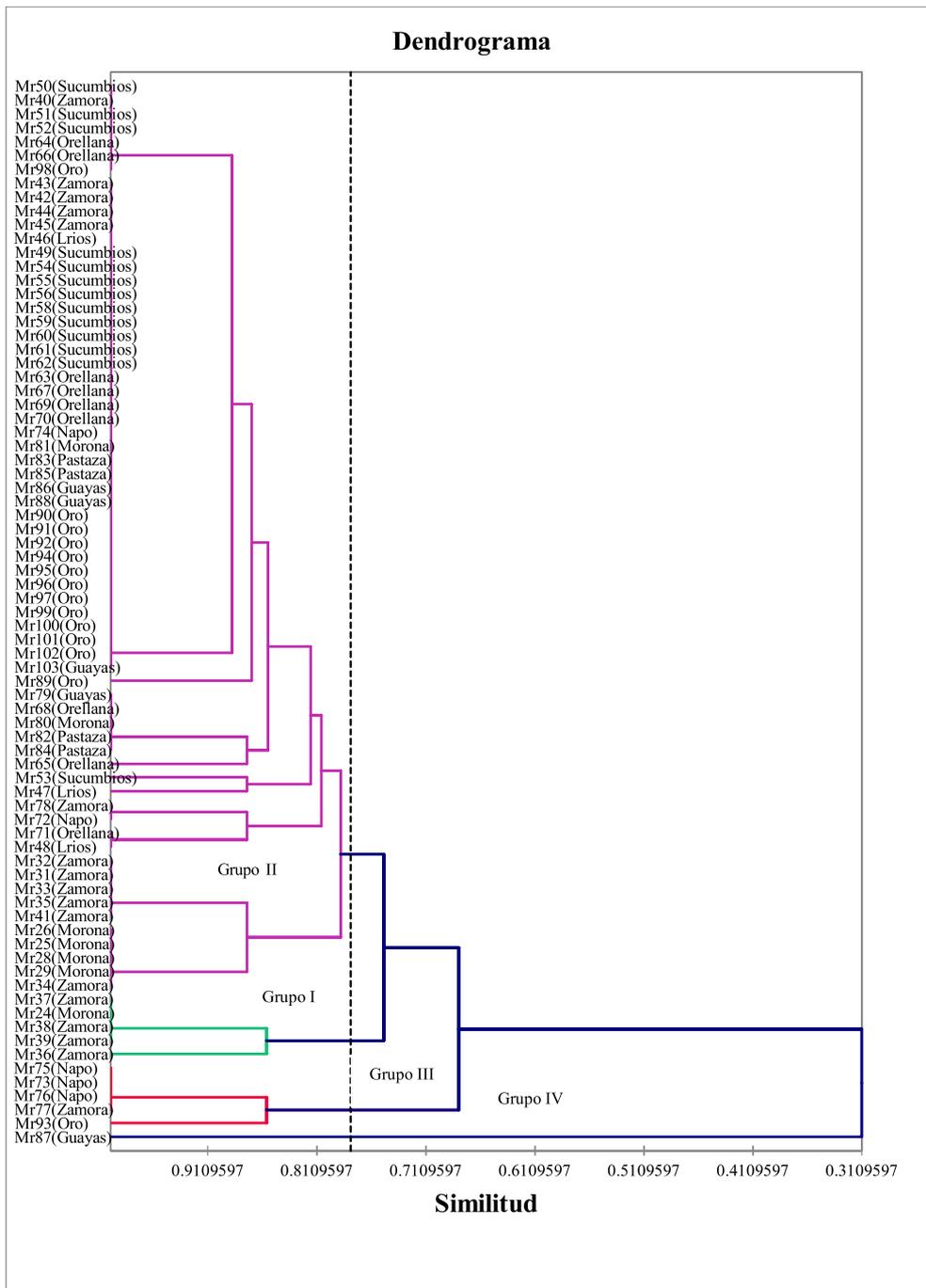
## ANEXO. 7 alelos privados por poblaciones y por marcador molecular

# de muestras	Asilados	Región	No. Loci alelos privados	Loci con alelos privados
1	MR24	Amazonía	1	mr-11
2	MR29	Amazonía	1	mr-33
3	MR80	Amazonía	2	mr-11 mr-33
4	MR81	Amazonía	3	mr-10 mr-11 mr-33
5	MR73	Amazonía	1	mr-33
6	MR74	Amazonía	1	mr-11
7	MR75	Amazonía	1	mr-33
8	MR76	Amazonía	1	mr-33
9	MR63	Amazonía	1	mr-33
10	MR64	Amazonía	1	mr-33
11	MR65	Amazonía	1	mr-11
12	MR66	Amazonía	1	mr-33
13	MR69	Amazonía	2	mr-10 mr-11
14	MR70	Amazonía	1	mr-10
15	MR71	Amazonía	1	mr-10
16	MR82	Amazonía	1	mr-33
17	MR83	Amazonía	2	mr-10 mr-33
18	MR84	Amazonía	1	mr-33
19	MR85	Amazonía	2	mr-10 mr-33
20	MR49	Amazonía	2	mr-30 mr-33
21	MR50	Amazonía	3	mr-11 mr-30 mr-33
22	MR51	Amazonía	2	mr-30 mr-33
23	MR52	Amazonía	3	mr-11 mr-30 mr-33
24	MR53	Amazonía	2	mr-30 mr-33
25	MR54	Amazonía	2	mr-30 mr-33
26	MR55	Amazonía	2	mr-30 mr-33
27	MR56	Amazonía	1	mr-33
28	MR58	Amazonía	2	mr-30 mr-33
29	MR59	Amazonía	2	mr-30 mr-33
30	MR60	Amazonía	2	mr-30 mr-33
31	MR61	Amazonía	1	mr-33
32	MR31	Amazonía	1	mr-11

33	MR32	Amazonía	1	mr-11
34	MR33	Amazonía	1	mr-33
35	MR34	Amazonía	1	mr-33
36	MR36	Amazonía	1	mr-33
37	MR38	Amazonía	1	mr-33
38	MR39	Amazonía	1	mr-33
39	MR41	Amazonía	1	mr-33
40	MR42	Amazonía	1	mr-33
41	MR44	Amazonía	1	mr-33
42	MR45	Amazonía	2	mr-11 mr-33
43	MR77	Amazonía	1	mr-33
44	MR89	Costa	1	mr-13
45	MR90	Costa	1	mr-13
46	MR91	Costa	1	mr-13
47	MR92	Costa	1	mr-13
48	MR95	Costa	1	mr-13
49	MR96	Costa	1	mr-13
50	MR97	Costa	1	mr-13
51	MR99	Costa	1	mr-13
52	MR100	Costa	1	mr-13
53	MR101	Costa	1	mr-13
54	MR102	Costa	1	mr-13
55	MR86	Costa	1	mr-13
56	MR88	Costa	1	mr-13

---

ANEXO 8. Dendrograma de similitud entre aislados realizado con números binarios



ANEXO 9. Clones de *M. royeri* pertenecientes a la Costa y Amazonía del Ecuador

Aislados	Origen	mr6	mr10	mr 11	mr 13	mr 15	MR22	mr 30	mr 31	mr 33	Label
<b>MR24</b>	<b>Morona Santiago</b>	<b>112</b>	<b>142</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>141</b>	<b>142</b>	<b>161</b>	<b>111</b>	<b>A</b>
<b>MR31</b>	<b>Zamora</b>	<b>112</b>	<b>142</b>	<b>100</b>	<b>130</b>	<b>0</b>	<b>141</b>	<b>142</b>	<b>161</b>	<b>111</b>	<b>A</b>
MR32	Zamora	112	132	100	130	0	141	142	161	111	A
MR38	Zamora	133	108	107	0	0	116	121	161	100	B
MR39	Zamora	133	108	107	0	0	116	121	161	100	B
MR46	Los ríos	112	108	130	140	173	116	121	161	111	C
<b>MR48</b>	<b>Los ríos</b>	<b>112</b>	<b>108</b>	<b>130</b>	<b>140</b>	<b>173</b>	<b>0</b>	<b>121</b>	<b>161</b>	<b>111</b>	<b>C</b>
<b>MR49</b>	<b>Sucumbíos</b>	<b>112</b>	<b>120</b>	<b>107</b>	<b>140</b>	<b>162</b>	<b>116</b>	<b>176</b>	<b>149</b>	<b>100</b>	<b>C</b>
MR50	Sucumbíos	112	108	100	0	162	116	176	149	100	C
MR51	Sucumbíos	112	120	107	0	162	116	176	149	100	D
MR52	Sucumbíos	112	120	100	0	162	116	176	149	100	D
MR54	Sucumbíos	112	120	107	111	162	116	176	149	100	E
MR55	Sucumbíos	112	120	107	111	162	131	176	149	100	E
MR59	Sucumbíos	112	132	107	111	173	141	176	149	100	F
MR60	Sucumbíos	112	152	107	111	173	141	176	149	100	F
MR63	Orellana	112	132	107	111	183	131	157	149	100	G
MR64	Orellana	112	132	107	0	183	141	157	149	100	G
MR72	Napo	124	0	120	111	173	0	150	161	111	H
<b>MR76</b>	<b>Napo</b>	<b>133</b>	<b>0</b>	<b>120</b>	<b>0</b>	<b>183</b>	<b>0</b>	<b>142</b>	<b>161</b>	<b>100</b>	<b>H</b>
<b>MR77</b>	<b>Zamora</b>	<b>133</b>	<b>0</b>	<b>120</b>	<b>0</b>	<b>183</b>	<b>0</b>	<b>142</b>	<b>161</b>	<b>100</b>	<b>H</b>
MR82	Pastaza	133	0	107	140	173	141	142	161	100	I
MR83	Pastaza	133	180	107	140	173	141	142	161	100	I
MR84	Pastaza	133	0	107	140	162	150	142	161	100	J
MR85	Pastaza	133	171	107	140	162	150	142	176	100	J
MR91	El Oro	133	120	120	103	173	150	150	176	124	K
MR92	El Oro	133	120	120	103	173	141	150	176	124	K
MR95	El Oro	133	120	120	103	173	150	150	176	124	L
MR96	El Oro	124	120	138	103	173	150	150	176	124	L
MR99	El Oro	124	120	120	103	173	141	150	176	111	M
MR100	El Oro	124	120	130	103	173	141	150	176	124	M
<b>MR101</b>	<b>El Oro</b>	<b>124</b>	<b>120</b>	<b>130</b>	<b>103</b>	<b>173</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>149</b>	<b>124</b>	<b>M</b>
MR102	<b>El Oro</b>	<b>124</b>	<b>120</b>	<b>138</b>	<b>103</b>	<b>173</b>	<b>141</b>	<b>150</b>	<b>149</b>	<b>124</b>	<b>N</b>
MR103	<b>Guayas</b>	<b>124</b>	<b>142</b>	<b>130</b>	<b>111</b>	<b>173</b>	<b>131</b>	<b>150</b>	<b>161</b>	<b>124</b>	<b>N</b>

ANEXO 10. Medias de IC<sub>50</sub> de *M. royeri* a flutolanil según el origen geográfico (provincias)

Categoría	Medias LS(IC50)	Grupos
T1:Oro	0.047	A
T2:Guayas	0.048	A
T3:Lrios	0.040	A
T4:Morona	0.030	A
T5:Napo	0.031	A
T6:Orellana	0.044	A
T7:Pastaza	0.020	A
T8:Sucumbios	0.028	A
T9:Zamora	0.027	A

## ANEXO 11. Análisis de varianza molecular

<b>Fuente</b>	<b>df</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>Est. Var.</b>	<b>%</b>	<b>PhiPT</b>	<b>P</b>
<b>Fungicida IC50 azoxystrobin</b>							
Entre poblaciones	1	6,74	6,74	0,59	15%	0,151	0,009
Dentro de poblaciones	72	239,36	3,32	3,32	85%		
Total	73	246,09		3,92	100%		
<b>IC50 flutolanil</b>							
Entre poblaciones	1	4,34	4,34	0,25	7%	0,071	0,125
Dentro de poblaciones	74	247,96	3,35	3,35	93%		
Total	75	252,30		3,61	100%		
<b>Región (Costa vs Amazonía)</b>							
Entre poblaciones	1	23,48	23,48	0,65	17%	0,174	0,001
Dentro de poblaciones	75	231,64	3,09	3,09	83%		
Total	76	255,12		3,74	100%		
<b>Amazonas</b>							
Entre poblaciones	5	66,28	13,26	1,27	37%	0,368	0,001
Dentro de poblaciones	49	107,00	2,18	2,18	63%		
Total	54	173,27		3,45	100%		
<b>Costa</b>							
Entre poblaciones	2	17,52	8,76	1,15	35%	0,348	0,001
Dentro de poblaciones	19	40,84	2,15	2,15	65%		
Total	21	58,36		3,29	100%		
<b>Provincias</b>							
Entre poblaciones	8	107,28	13,41	1,37	39%	0,386	0,001
Dentro de poblaciones	68	147,84	2,17	2,17	61%		
Total	76	255,12		3,54	100%		
<b>Clima</b>							
Entre poblaciones	4	38,4	9,6	0,7	19%	0,190	0,001
Dentro de poblaciones	64	190,1	3,0	3,0	81%		
Total	68	228,5		3,7	100%		
<b>Vegetacion</b>							

Entre poblaciones	2	40,88	20,44	0,83	22%	0,223	0,001
Dentro de poblaciones	73	211,42	2,90	2,90	78%		
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>252,30</b>		<b>3,73</b>	<b>100%</b>		
<b>Precipitación</b>							
Entre poblaciones	9	60,86	6,762	0,594	17%	0,173	0,001
Dentro de poblaciones	59	167,66	2,842	2,842	83%		
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>228,52</b>		<b>3,436</b>	<b>100%</b>		
<b>Suelos</b>							
Entre poblaciones	1	8,119	8,119	0,175	5%	0,051	0,003
Dentro de poblaciones	67	220,40	3,290	3,290	95%		
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>228,52</b>		<b>3,465</b>	<b>100%</b>		

df: grados de libertad, SS: fuente de variación, MS: cuadrado medio, Est. Var: variación estándar, Phi PT: valor análogo al FST), P: probabilidad.