

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE ESCOBA DE BRUJA
(*Moniliophthora perniciosa*) EN EL AGROECOSISTEMA
CACAO DE LA PROVINCIA DE BAGUA, REGIÓN
AMAZONAS.**

Autor: Bach. Tito Ademir Ramos Carrasco

Asesor: M. Sc. Santos Triunfo Leiva Espinoza

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS - PERÚ

2022

DATOS DEL ASESOR:

M. Sc. Santos Triunfo Leiva Espinoza

DNI N° 41265287

Registro ORCID N° 0000-0003-1710-1994

<https://orcid.org/0000-0003-1710-1994>

Campo de la Investigación y Desarrollo, según la Organización para la

Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE):

4.00.00-Ciencias Agrícolas

4.01.00-Agricultura, Silvicultura, Pesquería

4.01.06- Agronomía

Dedicatoria

A Dios, por haberme dado la vida, la salud, y la oportunidad de disfrutar del maravilloso mundo de la ciencia, mediante esta investigación.

A mis padres, mis hermanos y todo mi círculo familiar cercano, quienes han impulsado mi formación profesional, y han estado conmigo en todo momento.

Al Ph.D. Jorge Ronny Díaz Valderrama por su asesoría y acompañamiento incondicional en todos los procesos técnicos y científicos que hicieron parte de esta investigación.

A mi asesor de tesis, el Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza, por su asesoría y confianza en mi persona para desarrollar esta investigación.

Al personal del Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal del INDES-CES, quienes de una u otra manera aportaron a lograr esta meta.

A mis profesores, compañeros y amigos de la universidad, con quienes compartí momentos de aprendizaje y compañerismo durante mi formación profesional.

Tito A. Ramos Carrasco

Agradecimiento

A Dios que me ha dado la vida, la pasión por el estudio, y la oportunidad de conocer a las personas correctas, para mi desarrollo como profesional.

A mi alma mater la “Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas”, que ha guiado todo el proceso de mi formación profesional.

A los docentes de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, por la pasión de enseñanza, y su aporte a mi desarrollo de capacidades.

A mis compañeros de estudio; quienes, con su compañerismo y competencia académica, motivaron mi superación constante como estudiante en formación.

A mis padres, Selmira e Hipólito que siempre han sido un ejemplo de esfuerzo, trabajo y constancia para salir adelante.

A mis hermanos Fani, Gilmer, Merli y Mileydi, que siempre estuvieron ahí para brindarme su apoyo incondicional en momentos difíciles.

Al Ph.D. Jorge Ronny Díaz Valderrama por su asesoría y acompañamiento en todos los procesos técnicos y científicos, sin los cuales esta investigación no sería una realidad.

A mi asesor de Tesis, el Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza por su asesoría y confianza en mi persona para desarrollar un tema tan impactante como este.

Al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, por haberme permitido utilizar sus ambientes, equipos, materiales y reactivos, para sacar adelante mi investigación.

Al personal del área de biología molecular del Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal, por su apoyo incondicional, quienes, con sus conocimientos y experiencia, aportaron al desarrollo de las diferentes actividades programadas.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), por el soporte financiero a través del proyecto **“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL AGROECOSISTEMA DEL CACAO NATIVO FINO DE AROMA, CON FINES DE PROTECCIÓN DEL GERMOPLASMA Y CENTRO DE ORIGEN, EN LA ZONA NOR ORIENTAL DEL PERÚ” – GEN CACAO, con CONTRATO N° 30-2019-FONDECYT-BM-INC.INV.**

**Autoridades de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de
Amazonas**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

Rector

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

Vicerrector Académico

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

Vicerrectora de Investigación

Ing. *Ms. Sc.* ARMSTRONG BARNARD FERNÁNDEZ JERI

Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Visto Bueno del Asesor de la Tesis



ANEXO 3-K

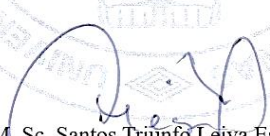
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Diversidad genética de escoba de bruja (*Monilophthora perniciosa*) en el agroecosistema cacao de la provincia de Bagua, región Amazonas. ; del egresado Tito Ademir Ramos Carrasco de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

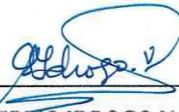
Chachapoyas, 21 de Abril del 2022


M. Sc. Santos Triunfo Leiva Espinoza
Firma y nombre completo del Asesor

Jurado Evaluador de la Tesis



Dr. SEGUNDO MANUEL OLIVA CRUZ
PRESIDENTE



Ing. GUILLERMO IDROGO VÁSQUEZ
SECRETARIO



Ms. C. CÉSAR GUEVARA HOYOS
VOCAL

Constancia de Originalidad de la Tesis



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-O

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Diversidad genética de escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en el agroecosistema cacao de la provincia de Bagua, región Amazonas.

presentada por el estudiante () /egresado (x) Tito Ademir Ramos Carrasco de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma

con correo electrónico institucional 4771648741@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 11.1 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.

Chachapoyas, 11 de mayo del 2022




SECRETARIO


PRESIDENTE


VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

Acta de Sustentación de la Tesis



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-Q

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 30 de JUNIO del año 2022, siendo las 10:00 horas, el aspirante: TITO ADEMIR RAMOS CARRASCO, defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: "DIVERSIDAD GENÉTICA DE ESCOBA DE BRUJA (Moniliophthora perniciosa) EN EL SISTEMA DE CACAO DE LA PROVINCIA DE BAGUA, REGIÓN AMAZONAS", teniendo como asesor a SANTOS TRIUNFO LEIVA ESPINOZA, para obtener el Título Profesional de INGENIERO AGRÓNOMO, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: DR. SEGUNDO MANUEL OLIVA CRUZ

Secretario: ING. GUILLERMO EDGAR NÚÑEZ

Vocal: M. CS. CÉSAR GUEVARA HOYOS



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 11:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

[Firma]
SECRETARIO

[Firma]
PRESIDENTE

[Firma]
VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

Índice o Contenido General

Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Autoridades de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.....	v
Visto Bueno del Asesor de la Tesis	vi
Jurado Evaluador de la Tesis	vii
Constancia de Originalidad de la Tesis.....	vii
Acta de Sustentación de la Tesis.....	ix
Índice o Contenido General	x
Índice de Tablas	xi
Índice de Figuras.....	xii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
I. INTRODUCCIÓN	16
II. MATERIAL Y MÉTODOS	19
2.1. Área de estudio	19
2.2. Población, muestra y muestreo	21
2.3. Metodología	22
III. RESULTADOS	38
3.1. Zonas cacaoteras con síntomas de presencia de <i>Moniliophthora perniciosa</i> . 38	
3.2. Caracterización macro y micro morfológica de aislados de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	40
3.3. Caracterización molecular de aislados de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	61
3.4. Evaluación de diversidad genética en aislados de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	65
IV. DISCUSIÓN.....	72
V. CONCLUSIONES.....	85
VI. RECOMENDACIONES	86
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXOS.....	95

Índice de Tablas

Tabla 1. Detalle del número de muestras por distrito.	22
Tabla 2. Datos de la evaluación de incidencia, recolección de tejidos infectados y codificación de aislados.	28
Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de 11 marcadores moleculares microsatélites.	36
Tabla 4. Incidencia de <i>M. pernicioso</i> a nivel de distritos y provincia de Bagua.	38
Tabla 5. Análisis de varianza para 44 aislados de <i>M. pernicioso</i> , a 15 días de crecimiento.	40
Tabla 6: Análisis de varianza para aislados agrupados por distritos a los 7 días de crecimiento.	42
Tabla 7. Análisis de varianza para aislados agrupados por distritos, a los 9 días de crecimiento.	43
Tabla 8. Análisis de varianza para aislados, agrupados por distritos, a los 11 días de crecimiento.	44
Tabla 9: Análisis de varianza para aislados agrupados por distritos, a los 13 días de crecimiento.	45
Tabla 10. Análisis de varianza para aislados agrupados por distritos, a los 15 días de crecimiento.	46
Tabla 11. Análisis de varianza para el efecto ITTASPE (crecimiento radial a 15 días).	48
Tabla 12. Análisis de Varianza para aislados agrupados según el tipo de tejido infectado del que fueron obtenidos (Crecimiento radial a 15 días).	49
Tabla 13. Aislados agrupados por similitud en características de color, borde de colonia y aspecto micelial.	51
Tabla 14. Características microscópicas observadas en los 44 aislados.	60
Tabla 15. Tabla de diversidad por población.	66
Tabla 16. Condiciones climáticas relacionado al porcentaje de incidencia de cada distrito.	73

Índice de Figuras

Figura 1. Localización geográfica del área de estudio.	20
Figura 2. Síntomas y signos de <i>Moniliophthora perniciosa</i> en <i>Theobroma cacao</i> , tomados en cuenta en el proceso de evaluación de incidencia.	24
Figura 3. Aislamiento de <i>Moniliophthora perniciosa</i> a partir de tejidos infectados de <i>Theobroma cacao</i>	26
Figura 4. Proceso de registro del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora perniciosa</i> en medio de cultivo.....	30
Figura 5. Proceso de microcultivo a. Microcultivo de 0 días. b. Microcultivo de 10 días.	31
Figura 6. Distribución geográfica de la incidencia de <i>Moniliophthora perniciosa</i> basado en las unidades productivas cacaoteras evaluadas.	39
Figura 7. Grafica del test de Tukey (Alfa = 0,05) para 44 aislados de <i>M. perniciosa</i> . Comparación de medias de crecimiento radial a 15 días.....	41
Figura 8. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 7 días, en aislados agrupados por distritos.....	42
Figura 9. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 9 días, en aislados agrupados por distritos.....	43
Figura 10. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 11 días, en aislados agrupados por distritos.....	44
Figura 11. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 13 días, en aislados agrupados por distritos.....	45
Figura 12. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 15 días, para aislados agrupados por distritos.....	46
Figura 13. Gráfica de puntos de total de días evaluados, respecto a las medias de crecimiento radial de aislados agrupados por distritos.	47
Figura 14. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el efecto de (ITTASPE) en el crecimiento radial (mm) a 15 días. Letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.	48
Figura 15. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el efecto de tejido infectado en el crecimiento radial (mm) a 15 días. Letras iguales no difieren estadísticamente entre sí.	49
Figura 16. Aislados ejemplares de <i>Moniliophthora perniciosa</i> (25 días de edad) de los grupos 1, 2, y 3.....	54

Figura 17. Aislados ejemplares de <i>Moniliophthora perniciosa</i> (25 días de edad), de los grupos 4, 5 y 6.....	55
Figura 18. Aislados ejemplares de <i>Moniliophthora perniciosa</i> (25 días de edad), de los grupos 7, 8 y 9.....	56
Figura 19. Repeticiones de un mismo aislado de <i>M. perniciosa</i> (MEB7) de 25 días de edad, con 2 aspectos de micelio.....	57
Figura 20. Aislados de <i>Moniliophthora perniciosa</i> de 25 días de edad, creciendo con 2 aspectos miceliales en una misma placa Petri..	58
Figura 21. Características microscópicas (círculos rojos) observadas en <i>M. perniciosa</i> a los diez días en microcultivo..	59
Figura 22. Árbol filogenético construido a partir de secuencias ITS de <i>M. perniciosa</i> usando el método de máxima verosimilitud.	62
Figura 23. Árbol filogenético construido a partir de secuencias LSU de <i>M. perniciosa</i> usando el método de máxima verosimilitud.	63
Figura 24. Árbol filogenético construido a partir de secuencias SSU de <i>M. perniciosa</i> usando el método de máxima verosimilitud..	64
Figura 25. Genotipos multilocus (MLG) por poblaciones. Cada población está representada por un color.....	67
Figura 26. Curva de genotipos multilocus respecto al número de loci más informativos.	67
Figura 27. Red mínima de expansión, basado en el porcentaje de distancia de disimilitud alélica.....	69
Figura 28. Gráfica de índice de asociación sin corrección de clones.	70
Figura 29. Gráfica de índice de asociación con corrección de clones..	71

Resumen

Moniliophthora perniciosa es el agente causal de la escoba de bruja del cacao, una de las enfermedades más importantes del cultivo en el Perú. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética de *Moniliophthora perniciosa* en el agroecosistema cacao de la provincia de Bagua, Amazonas. Esto incluyó la evaluación de incidencia, la caracterización macro y micro morfológica de 44 aislados *in vitro*, la caracterización molecular basado en las regiones de ADN ribosomal (ADNr) ITS, LSU, SSU, y el análisis con once marcadores microsátélites. Los resultados, mostraron la incidencia de *M. perniciosa* en el 100% de unidades productivas evaluadas. La morfología macro y microscópica fue variable. Se encontró diferencias significativas en el crecimiento radial, y se registró nueve patrones de crecimiento micelial en medio de cultivo PDA. En microcultivo, todos los aislados presentaron fíbulas, micelios de 1-3,8µm de diámetro, y en 13 aislados se observaron hifas hinchadas tipo clamidosporas. El análisis filogenético de las tres regiones de ADNr no evidenció polimorfismos. Sin embargo, el polimorfismo alélico en seis de los once marcadores SSR, evidenció la existencia de diversidad genética. Los distritos de Imaza y Aramango exhibieron los mayores índices de diversidad, y Copallín fue el distrito con los índices más bajos. La distribución de genotipos multilocus evidenció la dominancia de haplotipos en Imaza. Asimismo, exhibió la relación genética en aislados de Bagua, Utcubamba y Condorcanqui. Finalmente, los análisis del índice de asociación, corroboraron la estrategia de reproducción homotálica, y sugieren la existencia de recombinación genética mediante reproducción sexual cruzada.

Palabras clave: Incidencia, escoba de bruja, diversidad genética, ITS, LSU, SSU, Microsátélites SSR, polimorfismo alélico.

Abstract

Moniliophthora perniciosa is the causal agent of cocoa witches' broom, one of the most important diseases of the crop in Peru. The objective of this study was to determine the genetic diversity of *Moniliophthora perniciosa* in the cacao agroecosystem of the province of Bagua, Amazonas. This included incidence assessment, *in vitro* macro and micro morphological characterization of 44 isolates, molecular characterization based on ITS, LSU, SSU ribosomal DNA (rDNA) regions, and analysis with eleven microsatellite markers. The results showed the incidence of *M. perniciosa* in 100% of productive units evaluated. The macro and microscopic morphology was variable. Significant differences were found in radial growth, and nine mycelial growth patterns were recorded in PDA culture medium. In microculture, all the isolates presented clamp connections, mycelia of 1-3,8 μ m in diameter, and in 13 isolates swollen chlamydospore-type hyphae were observed. Phylogenetic analysis of the three rDNA regions did not show polymorphisms. However, the allelic polymorphism in six of the eleven SSR markers evidenced the existence of genetic diversity. The districts of Imaza and Aramango exhibited the highest rates of diversity, and Copallín was the district with the lowest rates. The distribution of multilocus genotypes evidenced the dominance of haplotypes in Imaza. Likewise, it exhibited the genetic relationship of isolates from Bagua, Utcubamba and Condorcanqui. Finally, the index of association analysis corroborated the homothallic reproduction strategy and suggested the existence of genetic recombination through outcrossing.

Keywords: Incidence, witches' broom, genetic diversity, ITS, LSU, SSU, Microsatellites SSR – simple sequence repeats, allelic polymorphism.

I. INTRODUCCIÓN

Moniliophthora perniciosa es el agente causal de la escoba de bruja en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*) (Aime & Phillips-Mora, 2005). Junto a *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* spp., *M. perniciosa* es considerado uno de los fitopatógenos más amenazantes para la industria chocolatera a nivel mundial (Bowers et al., 2001; Ploetz, 2016). Ha sido reportado en países cacaoteros de América del Sur, parte de centro América y algunas islas del Caribe (Bowers et al., 2001), estando aun ausente en países cacaoteros del África occidental y el sudeste asiático, donde se produce más del 80 % del cacao a nivel mundial (Díaz-Valderrama et al., 2020; Meinhardt et al., 2008).

Las primeras observaciones de *M. perniciosa* fueron realizadas por Alexandre Rodrigues Ferreira, entre los años 1785 a 1787, quien lo describió como “lagartão” (Meinhardt et al., 2008). Estas observaciones se llevaron a cabo en áreas de la Amazonía brasilera, en márgenes de los afluentes del Río Branco, Río Negro y Río Solimoes (Silva, 1987). Sin embargo, no fue hasta 1915 cuando se describió al hongo formalmente como *Marasmius pernicius* (Stahel). Posteriormente fue transferido al género *Crinipellis*, como *Crinipellis perniciosa* (Singer, 1942), nombre con el que se conoció hasta el 2005, cuando nuevamente fue reclasificado, y transferido al género *Moniliophthora*, como *Moniliophthora perniciosa* (Aime & Phillips-Mora, 2005).

Tras los primeros reportes, *M. perniciosa* permaneció desapercibido por varios años. Sin embargo, a medida que se expandieron las áreas de cacao, se propagó vertiginosamente a diversos países de América, provocando la pérdida de miles de toneladas de cacao en grano (Bowers et al., 2001). Se estima que, a nivel mundial, *M. perniciosa* provocó pérdidas de 150 000 t en el 2001 y 380 000 t en el 2012 (Ploetz, 2016). Ecuador hasta la primera década del siglo XX, era considerado el principal productor de cacao a nivel mundial. Sin embargo, tras la llegada de *M. roreri*, otro patógeno del cacao de suma importancia en 1916, y *M. perniciosa* en 1917, Ecuador perdió el puesto que había mantenido por casi 50 años (Bartley, 2005). En Brasil, tras la rápida propagación de *M. perniciosa* en el estado de Bahía a fines de los años 80, la producción brasileña se redujo catastróficamente en un 70 %, pasando de 378 000 t en 1990, a menos de 120 000 t en 1999 (Gray, 2001). Pérdidas similares se han reportado en Colombia, Perú, Venezuela, Bolivia, Panamá, Guyana, Surinam, Trinidad y Tobago, entre otros (Bowers et al., 2001; Pérez-Vicente, 2018; Ploetz, 2016).

Theobroma cacao (Malvaceae) no es el único hospedero de *M. pernicioso*. También se ha reportado infectando otras especies de la misma y diferentes familias, lo que ha conducido a su clasificación en biotipos (Griffith & Hedger, 1994b; Lisboa et al., 2020). A la actualidad se han descrito cinco biotipos: El biotipo C que parasita especies de los géneros *Theobroma* y *Herrania* en la familia Malvaceae (Evans, 1977; Meinhardt et al., 2008); el biotipo L que parasita lianas silvestres, especialmente *Arrabidaea verrucosa* (Bignoniaceae) y otras no identificadas (Evans, 1977; Lisboa et al., 2020); el biotipo S que parasita un amplio número de especies de la familia Solanaceae (Bastos & Evans, 1985; Lisboa et al., 2020); el biotipo B reportado en una sola oportunidad parasitando *Bixa Orellana* (Bastos & Anderbrhan, 1986); y el biotipo H que parasita a *Heteropterys acutifolia* y otras especies más de la familia Malpighiaceae (Lisboa et al., 2020; Resende et al., 2000).

Moniliophthora pernicioso es un patógeno hemibiotrófico, su ciclo de vida se divide en dos fases: la fase biotrófica o parasitaria monocariótica, y la fase necrótica o saprófita dicariótica (Evans, 1980). El proceso de infección solo puede iniciarse en tejidos jóvenes de crecimiento activo, principalmente meristemos apicales, meristemos laterales, cojines florales, y frutos recién formados, donde provoca hipertrofia e hiperplasia como síntomas principales (Tovar, 1991). La infección únicamente puede ser causada por las basidiosporas, que son producidas en grandes cantidades en los basidiocarpos (Gramacho et al., 2007; Merchán-Vargas, 1980). Los primeros síntomas visibles se manifiestan de 5 a 6 semanas después de la infección, y de 4 a 6 semanas más tarde entran en un proceso de necrosis (Tovar, 1991). Desde la infección hasta la necrosis, la parte interna de los tejidos es invadida por micelio monocariótico que crece de manera intercelular (Griffith & Hedger, 1994b; Meinhardt et al., 2008). Luego, el micelio monocariótico se convierte en micelio dicariótico fibulado que crece de manera intercelular e intracelular. Posteriormente, se forman clamidosporas binucleadas, que dependiendo de la disponibilidad de humedad y periodos cortos de sequía, germinan para nuevamente producir micelio dicariótico y dar paso a la fusión de núcleos y emergencia de cuerpos fructíferos del hongo (Evans, 1980; Tovar, 1991).

En condiciones de laboratorio, *M. pernicioso* ha sido estudiado en diferentes medios de cultivo como el agar papa dextrosa (PDA). Gracias a estos estudios se ha documentado características homogéneas y heterogéneas respecto al crecimiento y morfología de

aislados de uno y varios biotipos (Maridueña-Zavala et al., 2019; Meinhardt et al., 2006). Asimismo, en medios de cultivo especiales se ha logrado producir y mantener por varias semanas, micelios representativos de la fase biotrófica monocariótica sin la presencia de fíbulas (Meinhardt et al., 2006). Otra de las características encontradas en medios de cultivo *in vitro*, es la formación de hifas hinchadas, tipo clamidosporas (Evans, 1980; Griffith & Hedger, 1994a).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado la existencia de diversidad genética de *M. pernicioso*, basado en el análisis de marcadores moleculares. Un estudio reciente reportó la existencia de un alto grado de diversidad genética en 63 aislados del biotipo C, en base a la amplificación de marcadores de los tipos, Polimorfismo Amplificado entre Retrotransposones (IRAP, por sus siglas en inglés) y Polimorfismo Amplificado por Microsatélite Retrotransposón (REMAP) (Maridueña-Zavala et al., 2019). Otro estudio similar realizado en Brasil, informó la presencia de diversidad genética entre biotipos y a nivel de un mismo biotipo en 131 aislados, basado en el análisis de 14 marcadores microsatélites o de Secuencia Simple Repetida (SSR) (Artero et al., 2017). Similares resultados se han reportado en otros estudios, que independientemente de las metodologías utilizadas, refieren la existencia de diversidad genética en aislados de *M. pernicioso* (De Arruda et al., 2003; Gramacho et al., 2007; Rincones et al., 2006; J. Silva et al., 2008).

Aunque *M. pernicioso* es un fitopatógeno ampliamente estudiado, aún existe mucho por hacer en países como Perú, donde la investigación al respecto es limitada. El Perú es el octavo productor de cacao a nivel mundial, el segundo productor de cacao orgánico y uno de los principales productores de cacao fino y de aroma (MIDAGRI, 2020). Al mismo tiempo, es uno de los países más afectados por fitopatógenos como *M. pernicioso*. A nivel de país, hasta el momento no existen estudios contundentes de caracterización morfológica ni molecular, mucho menos estudio alguno sobre la diversidad genética de *M. pernicioso*. En este contexto, se hace oportuno la presente investigación, que tuvo como principal objetivo determinar la diversidad genética de *M. pernicioso* en el agroecosistema *cacao* de la provincia de Bagua, región Amazonas. Los objetivos específicos comprendieron, la identificación de zonas cacaoteras con síntomas de infección, la caracterización macro y micro morfológica, la caracterización molecular, y el análisis de diversidad genética en aislados de *M. pernicioso*.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

La investigación se realizó en los seis distritos de la provincia de Bagua, región Amazonas, Perú: Copallín, La Peca, El Parco, Bagua, Aramango e Imaza (Fig. 1). La agricultura es una de las principales actividades económicas de Bagua, siendo el cultivo de cacao uno de sus cultivos más importantes con 5 288 ha cultivadas (DRAA, 2018), y una producción de 2 975,5 toneladas /año (Mori, 2018).

Las plantaciones de cacao se encuentran principalmente entre los 200 y 1300 m.s.n.m, en condiciones topográficas variadas que van desde extensos valles hasta empinados y pendientes montañosas a lo largo de toda la provincia. Las plantaciones son parte de la pequeña agricultura, con unidades productivas que van en su mayoría desde $\frac{1}{4}$ de ha a 4 ha. Las variedades sembradas son cultivares nativos, forasteros y en menor cantidad clones de alta producción como el CCN51, ICS95, IMC67 (MINAGRI, 2009).

Las condiciones climáticas son altamente variables. Según Vargas (2010), el clima es seco y cálido en el distrito de Bagua, ligeramente húmedo y cálido en el distrito de Aramango, y super húmedo y cálido en el distrito de Imaza. La precipitación y temperatura promedio anual varía según distritos: estos son de 673,5 mm/año y 26,3 °C en el distrito Bagua; de 1748,7 mm/año y 24,3 °C en Aramango; y 3013,3 mm/año y 24,7 °C en Imacita (Imaza). No existe registros oficiales para los distritos de El Parco, La Peca y Copallín. La temperatura es mayor en las zonas más bajas (26,3 °C en Bagua, a 434 m.s.n.m), a excepción de Imaza y partes bajas de Aramango que presentan un clima propio de ceja de selva y selva baja, donde las constantes lluvias y la abundante vegetación ayudan a mantener la temperatura entre 24 °C y 25 °C en altitudes promedio de 350 m.s.n.m (Vargas, 2010).

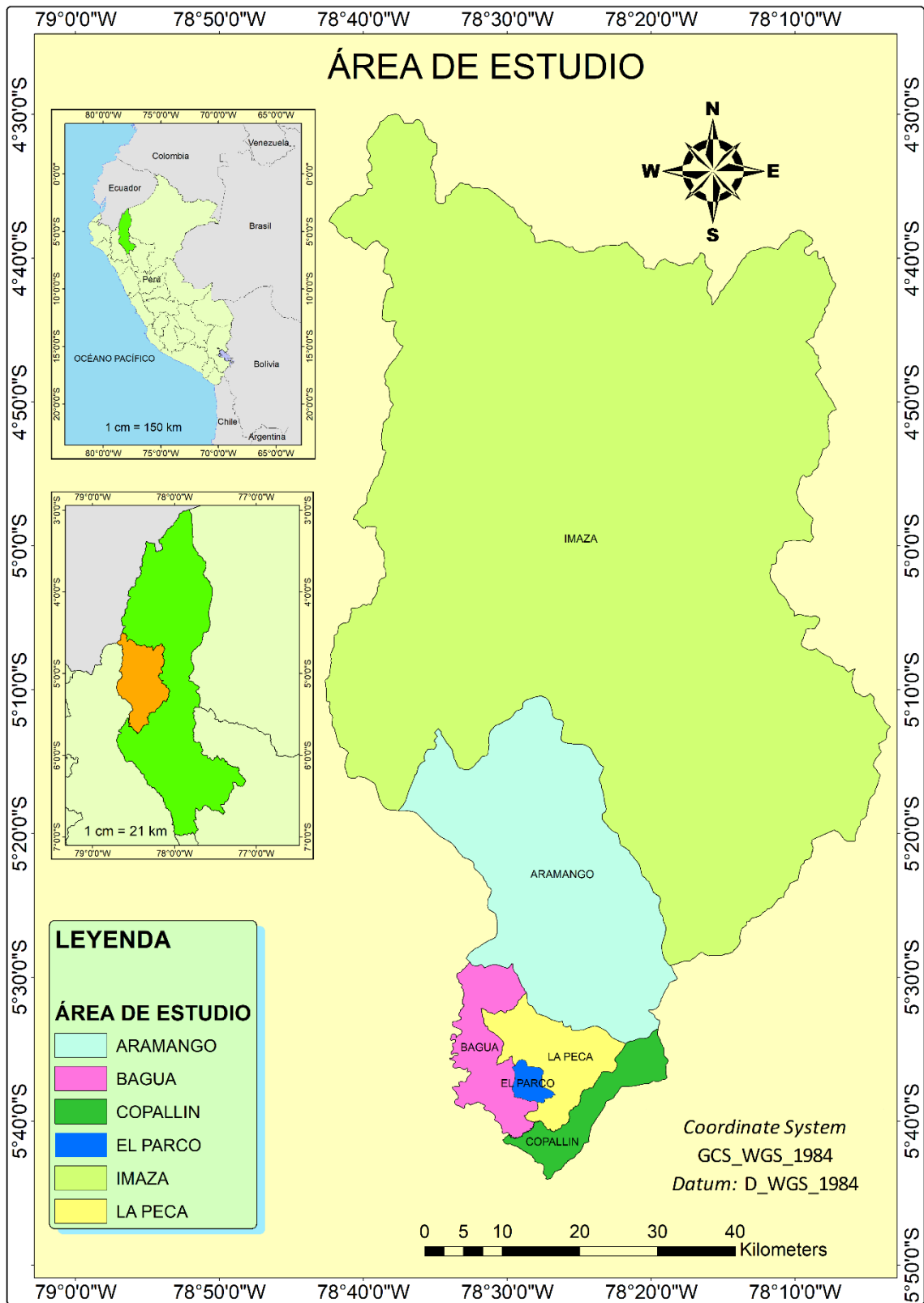


Figura 1. Localización geográfica del área de estudio.

2.2. Población, muestra y muestreo

2.2.1. Población

La población se determinó en base al último Censo Nacional Agropecuario 2012 (INEI, 2012), donde se reporta la existencia de 6505 unidades productivas (UP) de cacao en la provincia de Bagua (Tabla 1).

2.2.2. Muestra

Se define como muestra, las unidades productivas (UP) con las que se trabajó para el levantamiento de información y recolección de tejidos de cacao con síntomas de infección por *M. perniciosa*. El número de muestras estuvo conformado por 44 unidades productivas de cacao, distribuidas geográfica y proporcionalmente en todos los distritos de la provincia (Tabla 1). La muestra fue probabilística (Beyer et al., 2017), y se determinó aplicando la siguiente fórmula de muestreo.

$$n = \frac{\frac{4PQ}{d^2}}{\frac{\frac{4PQ}{d^2} - 1}{N} + 1}$$

Donde:

n = Muestra total

N = Población total (Universo = 6505)

P = Probabilidad de acierto (Se asume 0,5)

Q = Probabilidad de fracaso (Se asume 0,5)

d = Error máximo en términos de proporción (Se asume 0,15)

Calculado la muestra total, se procedió a calcular el número de muestras por distrito, en función a la representatividad porcentual de unidades productivas de cacao de cada distrito respecto a la muestra total (n). Se utilizó la siguiente fórmula:

$$nd = \frac{\%d \times n}{100}$$

Donde:

nd = Muestra distrital

%d = Representación porcentual distrital respecto al total en la provincia

n = Muestra total

Tabla 1

Detalle del número de muestras por distrito.

Distrito	Unidades Productivas (UP) *	Representación porcentual (%) por distritos	Número muestra por distrito
Aramango	601	9,2	4
La Peca	615	9,5	4
El Parco	60	0,9	1
Copallín	540	8,3	4
Imaza	4651	71,5	30
Bagua	38	0,6	1
TOTAL	6505	100	44

* **Fuente:** (Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), 2012)

2.2.3. Muestreo

En las visitas realizadas a cada uno de los distritos, las 44 unidades productivas de cacao (muestra) fueron elegidas a criterio del investigador. El criterio fue que éstas cuenten con aproximadamente un área igual o mayor a 2500 m² y guarden distancias geográficas entre sí, de mínimo 1 km.

2.3. Metodología

El estudio comprendió actividades de campo y laboratorio, con visitas a las unidades productivas de cacao, y actividades desarrolladas en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal (LABISANV) del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM). Se describe la metodología utilizada, de acuerdo a los objetivos específicos del estudio.

2.3.1. Identificación de las zonas cacaoteras con síntomas de presencia de *Moniliophthora perniciosa*

La identificación de zonas cacaoteras con síntomas de presencia de *M. perniciosa* se realizó mediante la evaluación de incidencia de *M. perniciosa* en las 44 unidades

productivas, ubicadas en diferentes sectores cacaoteros de los distritos, Imaza, Aramango, Bagua, El Parco, Copallín y La Peca (Tabla 2).

2.3.1.2. Evaluación de incidencia

Para la evaluación de incidencia se utilizó el método zigzag (Murrieta & Palma, 2018), en el que se evaluaron 20 plantas de cacao elegidas al azar, en cada unidad productiva. En cada árbol se evaluó minuciosamente la presencia o ausencia de la enfermedad en base a los síntomas característicos producidos por la infección de *M. pernicioso* (Evans, 1980; Tovar, 1991). Los síntomas tomados en cuenta fueron: tallos jóvenes con hipertrofia e hiperplasia creciendo en las partes terminales de ramas y puntos de crecimiento axilar; frutos con hipertrofia e hiperplasia conocidos comúnmente como frutos zanahoria o frutos chirimoya; cojines florales con pedúnculos y flores engrosadas; escobas de bruja necrosadas y cuerpos fructíferos del hongo (basidiocarpos) (Fig. 2).

El porcentaje de incidencia se determinó, utilizando la siguiente fórmula:

$$I = \frac{\text{PSIMP} \times 100\%}{\text{PE}}$$

Donde:

I = Incidencia

PSIMP = Plantas con Síntomas de Infección de *M. pernicioso*

PE = Plantas Evaluadas

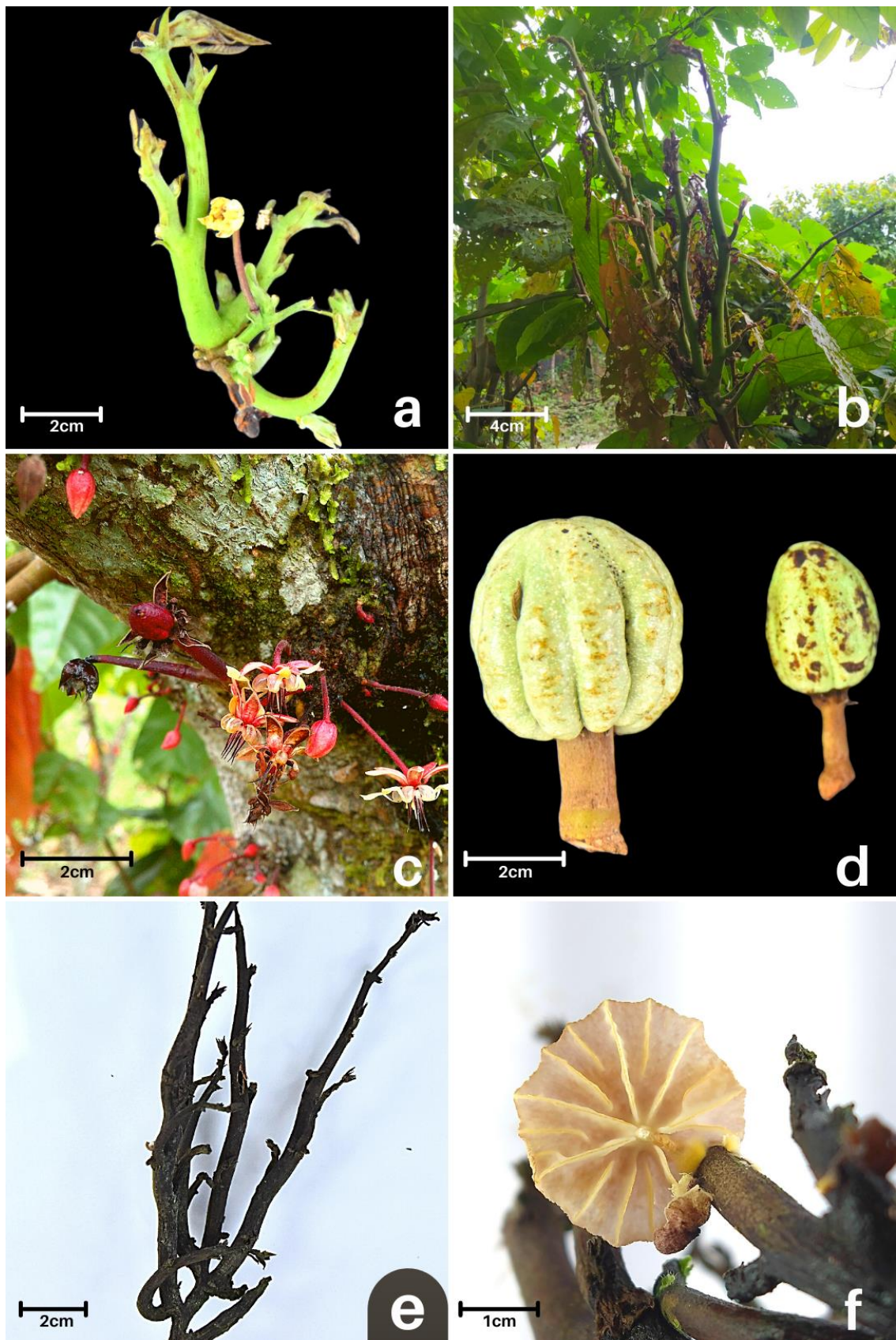


Figura 2. Síntomas y signos de *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao*, tomados en cuenta en el proceso de evaluación de incidencia. **a.** Tallo joven con hiperplasia e hipertrofia (Escoba de bruja en estado verde). **b.** Escoba de bruja en estado

verde, creciendo en una yema terminal. **c.** Cojín floral, con flores de pedúnculo engrosado. **d.** Hipertrofia e hiperplasia en frutos provocado por la infección de *M. pernicioso*. **e.** Escoba de bruja necrosada por *M. pernicioso*. **f.** Cuerpo fructífero (Basidiocarpio) de *M. pernicioso* creciendo sobre una escoba de bruja necrosada.

2.3.2. Caracterización macro y micro morfológica de aislados de *Moniliophthora pernicioso*

Moniliophthora pernicioso es un hongo Basidiomycota que no fructifica en cultivos de agar. Sólo presenta hifas con pinzas de conexión (fíbulas) e hifas hinchadas tipo clamidosporas (Griffith & Hedger, 1994a). La caracterización macro y micro morfológica se realizó en función al crecimiento radial, color, forma, aspecto de la colonia y la presencia de estructuras microscópicas como fíbulas e hifas tipo clamidosporas. Esto comprendió una serie de actividades, que incluyó la recolección de tejidos infectados por *M. pernicioso*, aislamiento del fitopatógeno, cultivo *in vitro* y evaluaciones macro y micro morfológicas en condiciones de laboratorio.

2.3.2.1. Recolección de tejidos de cacao infectados por *Moniliophthora pernicioso*

Se recolectó ejemplares de tejidos de cacao con síntomas de infección de *M. pernicioso* (escobas de bruja) en cada unidad productiva donde se realizó la evaluación de incidencia (Fig. 2). Se recolectó principalmente escobas de bruja en estado verde de la parte terminal de ramas y puntos de crecimiento axilar (Fig. 2a-b). Asimismo, se recolectaron frutos con síntomas de infección conocidos como frutos chirimoyos o frutos zanahoria (Fig. 2c-d). Finalmente, se colectaron escobas necrosadas y en algunas instancias cuerpos fructíferos del hongo (Fig. 2e-f). Todo el material colectado fue separado de los árboles de cacao utilizando una tijera de poda desinfectada con alcohol de 96°. Las colectas fueron colocadas en sobres de papel, codificados y puestos en un contenedor de enfriamiento, donde permanecieron hasta ser transportados al laboratorio.

2.3.2.2. Aislamiento e identificación preliminar de *Moniliophthora pernicioso*

Una vez transportados los tejidos de cacao a instalaciones del LABISANV, se realizaron los aislamientos de *M. pernicioso* usando el siguiente protocolo: segmentos de 3 – 5 cm de tejido infectado fueron desinfectados sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 5 minutos, seguido de tres enjuagues de 3 min cada uno en agua

destilada estéril contenidas en vasos Beaker (Suarez, 2016). Finalmente, el material desinfectado y enjuagado se sumergió en alcohol puro de 96° por 1 segundo y con mucho cuidado flameados por unos 3 segundos con la finalidad de incrementar la eliminación de agentes contaminantes y acelerar el secado superficial del tejido tratado. Los segmentos desinfectados fueron seccionados en fragmentos pequeños de 0,4 a 0,6 centímetros de longitud, y sembrados en placas Petri (Fig. 3a-b) que contenían medio de cultivo PDA con cloranfenicol. El antibiótico fue colocado en el medio a razón de 0,02 g disuelto en 0,4 ml de alcohol de 96° para 15,6 g de PDA disuelto y autoclavado en 400 ml de Agua. Todas las placas fueron selladas con cinta de embalaje plástica y encubadas (INCUCCELL, LSIS-B2V/IC55) a 27 °C en oscuridad. Después de 6 días en incubación, discos de los bordes de las colonias con micelio blanco emergido a partir de los tejidos sembrados fueron transferidos a nuevas placas Petri que contenían PDA (Fig. 3c-d) (Maridueña-Zavala et al., 2019).

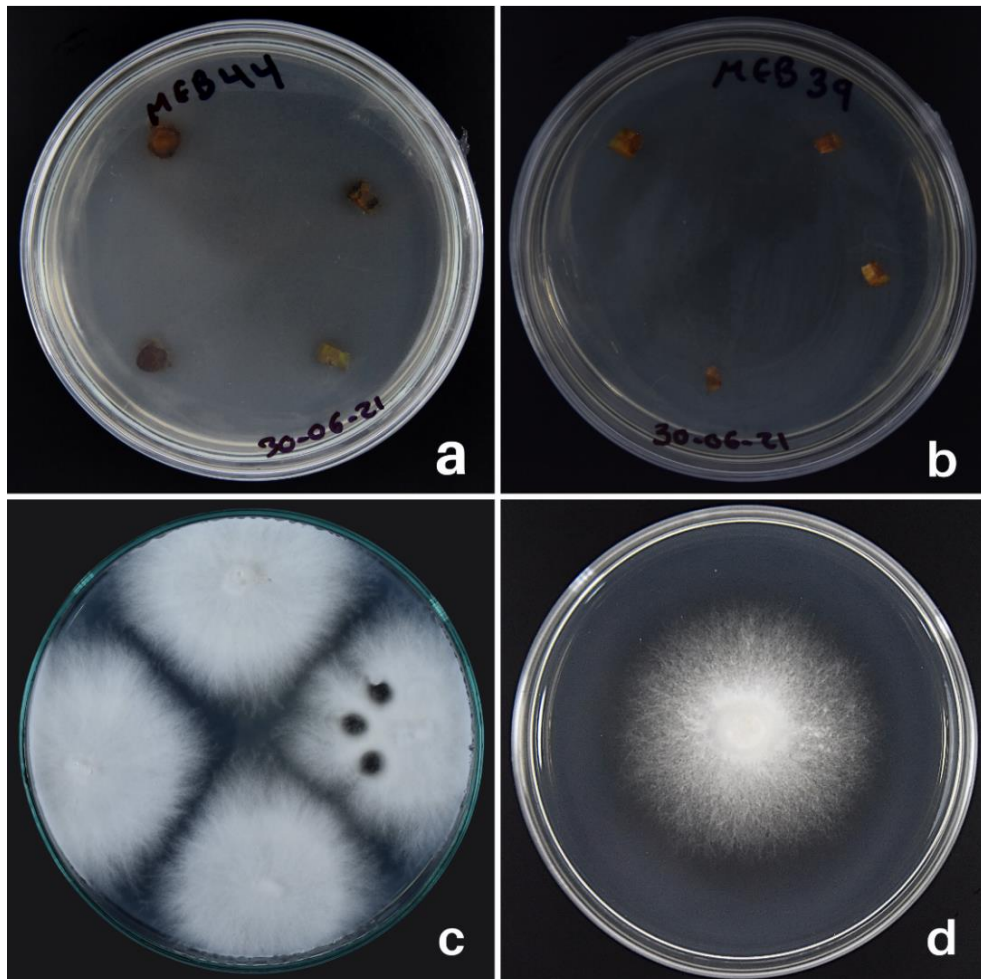


Figura 3. Aislamiento de *Moniliophthora perniciosa* a partir de tejidos infectados de *Theobroma cacao*. **a.** Segmentos de tallo con síntomas de infección por *M. perniciosa*,

sembrados en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). **b.** Segmentos de la parte interna de un fruto infectado, sembrados en PDA. **c.** Micelio blanco algodonoso creciendo a partir de los tejidos de cacao, de donde se sacó discos con micelio hacia nuevas placas con PDA. **d.** Aislado puro de *M. pernicioso* creciendo en PDA.

Se obtuvo 44 aislados (Tabla 2), uno por cada unidad productiva evaluada, a excepción del aislado MEB52 que fue recolectado en una parcela del sector La Lluhuana (distrito de Copallín), y se incluyó en el estudio debido a que no se logró aislar *M. pernicioso* de los tejidos infectados recolectados en la unidad productiva del sector Palo Grande en el mismo distrito. Todos los aislados fueron codificados de acuerdo a la codificación asignada al momento de la recolección de muestras (Tabla 2).

La identificación preliminar se realizó basado en la presencia de fíbulas (pinzas de conexión), estructura microscópica típica de algunos hongos Basidiomycota como *M. pernicioso* (Griffith & Hedger, 1994b; Watanabe, 2002). En todos los casos se utilizó un microscopio AXIO (ZEISS Lab.A1). La micro evaluación de aislados obtenidos a partir de tejidos necrosados se realizó mediante la técnica de la cinta pegante (Cañedo & Ames, 2004). Se colocó la cara de la cinta con pegamento sobre el micelio de aislados de 15 días de edad, que luego fue puesto sobre una lámina porta objeto con una pequeña gota de lactofenol y observado en el microscopio. En la gran mayoría de aislados obtenidos a partir de segmentos de escobas en estado verde, no se observó la presencia de fíbulas a los 15 días. Para estos casos se realizó la técnica de microcultivo (Hernandez & Monter, 2013), con la finalidad de forzar el crecimiento micelial con características de la fase saprófita dicariótica; y a los 10 días de incubación en microcultivo, se pudieron observar la presencia de fíbulas. La técnica de microcultivo se detalla más adelante, en la sección “Descripción de características microscópicas”.

Tabla 2

Datos de la evaluación de incidencia, recolección de tejidos infectados y codificación de aislados.

Distrito	Sector	Latitud (°)	Longitud (°)	U.P evaluadas	Nro de Plantas evaluadas	Tejido vegetal utilizado en el aislamiento	Código de aislado	
Aramango	Vista Alegre	-5.35513	-78.43084	1	20	Escoba verde vegetativa	MEB1	
	Miraná	-5.33230	-78.42488	1	20	Escoba verde vegetativa	MEB2	
	C. N. Tutumberos	-5.33471	-78.45115	1	20	Escoba verde vegetativa	MEB3	
	La Libertad	-5.44330	-78.48550	1	20	Escoba verde vegetativa	MEB34	
Imaza	C. N. Chipe	-4.78594	-78.28101	1	20	Escoba verde vegetativa	MEB4	
	C. N. Tupac Amaru II	-4.86877	-78.19133	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB5	
	C. N. Zuwa	-4.88533	-78.30388	1	20	Escoba necrosada	MEB6	
	C. N. Shushuí	-4.91507	-78.32422	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB7	
	C. N. Pumpú	-4.93498	-78.33769	1	20	Escoba necrosada	MEB8	
	C. N. Sasa	-5.00696	-78.33068	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB9	
	C. N. Yamayakat	-5.05229	-78.33709	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB10	
	C. N. Yupicusa	-5.18998	-78.38204	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB11	
	C. N. Tsamarem	-5.18225	-78.37910	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB12	
	C. N. San Ramón	-5.16732	-78.36656	1	20	Escoba necrosada	MEB13	
	C. N. San Rafael	-5.15436	-78.34487	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB14	
	C. N. Puerto Samaren	-5.10515	-78.36445	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB15	
	Estación Seis	-5.03578	-78.25872	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB16	
	Nuevo Chota	-5.07129	-78.30230	1	20	Escoba verde de fruto	MEB17	
	Nuevo Huancabamba	-4.88708	-78.20707	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB18	
	Nueva Alianza	-4.91465	-78.20224	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB19	
	Aguas Turbias	-4.96990	-78.22210	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB20	
	Mesones Muro	-5.06884	-78.32129	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB21	
	C. N. Teesh	-5.23415	-78.24836	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB22	
	C. N. Nayumpin	-5.22251	-78.25305	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB23	
	C. N. Pacui	-5.20412	-78.27995	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB24	
	Durand	-5.23841	-78.36301	1	20	Escoba necrosada	MEB25	
	Shushunga	-5.20901	-78.32861	1	20	Escoba verde de fruto	MEB26	
	C. N. Nasareth	-5.13858	-78.31696	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB27	
	Chiriaco	-5.15554	-78.29013	1	20	Escoba necrosada	MEB28	
	Inayo	-5.19024	-78.28996	1	20	Escoba verde de fruto	MEB29	
	Nuevo Horizonte	-5.08823	-78.34078	1	20	Escoba verde de fruto	MEB30	
	C. N. Wawin	-5.14341	-78.23509	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB31	
	C. N. Wan Entsa	-5.14894	-78.25527	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB32	
	C. N. Wachapea	-5.14626	-78.27432	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB33	
	Copallín	Lluhuana	-5.68025	-78.40404	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB35
		Pan de Azucar	-5.66687	-78.40061	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB36
		La Palma	-5.65287	-78.38903	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB37
Palo Grande		-5.67009	-78.39742	1	20	Escoba necrosada		
	Lluhuana	-5.67009	-78.39742			Escoba necrosada	MEB52*	
Bagua	Alenya	-5.67240	-78.47741	1	20	Escoba verde de fruto	MEB39	
La Peca	Chonza Alta	-5.62281	-78.40519	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB40	
	Humbate	-5.62088	-78.41588	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB41	
	Nueva Florida	-5.60303	-78.44024	1	20	Escoba verde de fruto	MEB42	
	San Francisco	-5.62045	-78.44945	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB43	
El Parco	El Parco	-5.62464	-78.47955	1	20	Escoba verde Vegetativa	MEB44	

(U.P) Unidad Productiva

(C.N) Comunidad Nativa

(*) Aislado, incluido en el estudio, debido a que no se logró aislar a *M. pernicioso* de los tejidos recolectados en la UP del sector Palo Grande, en Copallín.

2.3.2.3. Evaluación de crecimiento radial

Se evaluó el crecimiento radial de los 44 aislados de *M. pernicioso* obtenidos a partir de escobas de *T. cacao* en estado vegetativo verde, escobas necrosadas y frutos (Tabla 2). Discos de PDA con micelio de *M. pernicioso* obtenidos de los bordes de cultivos de 10 días de edad, fueron sembrados de manera invertida en el centro de placas Petri que contenían medio PDA. Se realizó tres repeticiones por cada aislado. Las placas fueron selladas con cinta plastificada de embalaje y encubadas a 27 °C en oscuridad por un periodo de 16 días (Maridueña-Zavala et al., 2019).

El crecimiento radial se midió en cuatro direcciones. Para ello en el anverso de la placa Petri se trazó una línea horizontal y otra vertical, que se interceptaban de forma perpendicular en la parte céntrica del disco sembrado. La medición se realizó cada 2 días en 5 momentos diferentes, de acuerdo a la metodología descrita por (Maridueña-Zavala et al., 2019) con algunas modificaciones, teniendo en cuenta que en el estudio citado realizaron la medición cada 3 días, en 4 momentos.

Las medidas se realizaron a los días 7, 9, 11, 13 y 15, trazando una pequeña línea perpendicular a las líneas verticales y horizontales de acuerdo al crecimiento del micelio observado a simple vista. Posterior a la quinta medida, se fotografió la base de las placas donde se trazó las líneas pequeñas en función a los momentos evaluados. En todas las placas fotografiadas se colocó un instrumento de medida (Fig. 4) que fue usado en la calibración del software ImageJ versión 1.8.0 (Schneider et al., 2012). Las fotografías se procesaron de manera manual con la finalidad de materializar las medidas registradas a lo largo del periodo de crecimiento de los aislados.

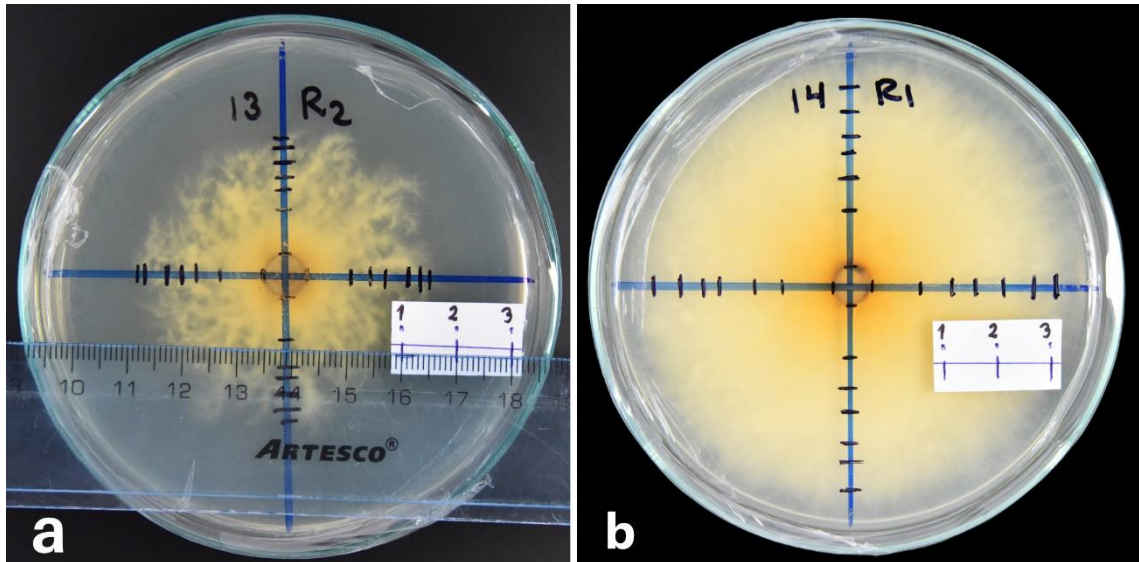


Figura 4. Proceso de registro del crecimiento radial de *Moniliophthora perniciosa* en medio de cultivo PDA. **a.** Regla graduada como instrumento de medida utilizado para la calibración del software ImageJ al momento de procesar las fotografías. **b.** Placa Petri donde se utilizó una franja de papel con una línea graduada de medidas conocidas para la calibración del software ImageJ al momento de procesar las imágenes de registro.

Los resultados obtenidos, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba Tukey ($p \leq 0,05$; $\alpha = 0,05$), utilizando el Software InfoStat. Este análisis se realizó para el crecimiento radial (CR) de los 44 aislados a 15 días de edad, como también para el crecimiento radial a los 7, 9, 11, 13 y 15 días de edad para los 44 aislados agrupados por distritos. Adicionalmente, se realizó el ANOVA y prueba Tukey para el CR a 15 días de los 44 aislados agrupados según el tejido del que fueron obtenidos, como también en grupos de acuerdo al Intervalo de Tiempo Transcurrido desde el Aislamiento en laboratorio hasta la Siembra Para la Evaluación (ITTASPE), que fue de 16, 84, 88 y 123 días debido a que la recolección de tejidos infectados se realizó en cuatro momentos diferentes.

2.3.2.4. Descripción de características macroscópicas

La siembra e incubación para la descripción de características macroscópicas de los 44 aislados de *M. perniciosa* se realizó bajo las mismas condiciones descritas para la evaluación de crecimiento radial, a diferencia que en este caso los aislados fueron encubados por 25 días, momento en que se registró mediante fotografías el anverso y reverso de las placas Petri que contenían el hongo en crecimiento. Teniendo como base

el registro fotográfico, se describió el color, forma, borde y aspecto micelial de la colonia de la parte anversa, y el color de la parte céntrica, mitad de radio y borde de la parte inversa (Pacasa-Quisbert et al., 2017; Watanabe, 2002).

2.3.2.5. Descripción de características microscópicas

La caracterización micro morfológica se realizó utilizando la técnica de microcultivo (Hernandez & Monter, 2013). Esta consistió en colocar discos de medio de cultivo PDA de 0,7 cm de diámetro en los extremos de la cara superior de láminas porta objeto dispuestas sobre dos varillas de vidrio colocadas horizontalmente en forma de “V” en el interior de placas Petri que contenían papel toalla humedecida en la base. Posteriormente, los discos de medio de cultivo fueron inoculados en la parte superior con pequeños fragmentos de micelio de cada aislado y sobre este se colocó una lámina cubre objeto (Fig. 5a). Todas las placas fueron tapadas, selladas con cinta de embalaje y encubadas a 27 °C, con un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Transcurridos 10 días después de la siembra, tiempo en el que el micelio había colonizado el disco PDA y crecía adherido a la cara superior e inferior de las láminas porta y cubre objeto (Fig. 5b), se abrió las placas Petri, se desmontó las láminas cubre objeto, se eliminó el disco PDA, y con las láminas cubre y porta objeto se realizaron los montajes que luego fueron observados al microscopio (OLYMPUS, modelo BX53) y documentados a 40X mediante una cámara incorporada modelo DP74.

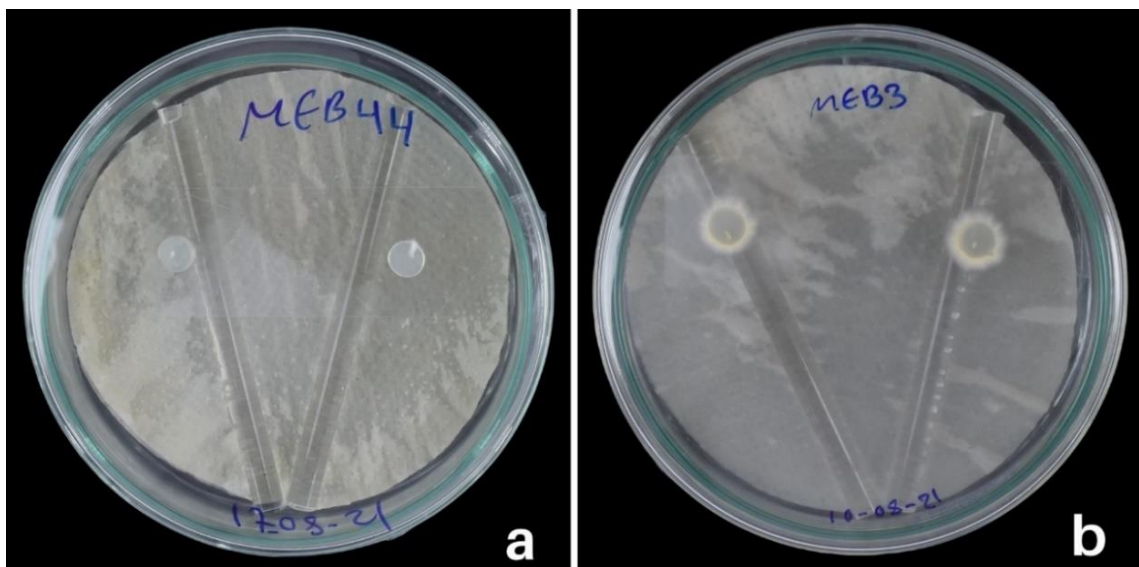


Figura 5. Proceso de microcultivo **a.** Microcultivo de 0 días. **b.** Microcultivo de 10 días.

2.3.3. Caracterización molecular de aislados de *Moniliophthora perniciosa*

La caracterización molecular comprendió actividades de extracción de ADN, cuantificación, amplificación de regiones genéticas, electroforesis, purificación de productos amplificados, secuenciación, edición de secuencias, identificación y análisis filogenético.

2.3.3.1. Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN para la caracterización molecular de los 44 aislados de *M. perniciosa* se realizó a partir de micelios de 15 - 20 días de edad, cultivados en PDA a 27 °C en condiciones de oscuridad (Maridueña-Zavala et al., 2019). En una cámara de flujo laminar esterilizada con radiación UV, utilizando un bisturí de hoja ancha estéril, el micelio fue raspado y colocado en tubos de extracción de ADN tipo B y C que contenían perlas MN (Macherey-nagel). El ADN fue extraído utilizando el kit de extracción de ácidos nucleicos de Promega (Wizard® Genomic DNA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó en ng/μl mediante espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro (Basic eppendorf) de cubeta de 1 mm.

2.3.3.2. Amplificación de regiones del ADN para delimitación de especie

Para la delimitación de especie se trabajó con tres regiones genéticas: el espaciador transcrito interno ribosómico (ITS, por sus siglas en inglés); aproximadamente las primeras 1250 pares de base de la subunidad ribosómica grande (LSU, por sus siglas en Inglés); y la subunidad ribosomal pequeña (SSU, por sus siglas en Inglés) compuesta por aproximadamente 1800 pares de base (Aime & Phillips-Mora, 2005).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la región ITS se realizó con los cebadores ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes & Bruns, 1993) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Para la región LSU se utilizaron los cebadores LSU4B (5'-CTGGACCGTGTACAAGTCTCCTG-3') y LR6 (5'-CGCCAGTTCTGCTTACC-3') (Aime & Phillips-Mora, 2005). La región SSU se amplificó en dos reacciones de PCR por separado, la primera con los cebadores NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') y NS4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'), y la segunda con los cebadores NS3 (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'), y NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') (White et al., 1990). Las secuencias obtenidas en ambos PCRs de la región SSU, fueron unificadas en el proceso de edición de secuencias.

Todas las PCR se realizaron en un termociclador BIO RAD T100, con un volumen de 25 μ l, que consistió en una mezcla de 12,5 μ l de PCR Master Mix de Promega (PCR Master Mix 2X), 1,25 μ l a 10 μ M del cebador en sentido *forward*, 1,25 μ l a 10 μ M del cebador en sentido *reverse*, y 10 μ l de ADN diluido al 0,5 ng/ μ l. Los programas de la PCR fueron diferentes para cada región, excepto para ITS y LSU, donde se utilizó el mismo programa de amplificación. Las regiones LSU y SSU fueron amplificadas utilizando los programas descritos por (Aime & Phillips-Mora, 2005). La amplificación de ITS y LSU consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 50 °C por 45 s, elongación a 72 °C por 1 minuto, y una elongación final a 72 °C por 7 minutos. Para la región SSU la amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 55 °C por 45 s, elongación a 72 °C por 1 minuto, y una elongación final a 72 °C por 10 minutos.

2.3.3.3. Electroforesis y purificación de productos PCR

Los productos de la PCR fueron verificados mediante el proceso de electroforesis: 1,2 μ l de los productos PCR mezclados con 1 μ l de Dye 6X (Blue/Orange, Promega) se cargaron en geles agarosa sumergidos en solución Tris Acetate EDTA (TAE) 1X. Los geles fueron preparados a razón de 1,44 g de agarosa, 150 ml de solución TAE 1X y 4 μ l de SYBR Safe. La electroforesis comprendió una corrida de 20 minutos a 100 voltios, donde las moléculas de ADN amplificadas se desplazaron hacia el polo positivo de la cámara de electroforesis. Cabe precisar que paralelo a las muestras corridas, se corrió una escalera molecular de 1 Kb (Promega) como indicador de tamaño de los productos de PCR amplificados. Las bandas formadas fueron reveladas por la interacción de SYBER Safe (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) con el ADN y la iluminación con luz azul, y documentadas utilizando un Transiluminador y fotodocumentador de geles (Clever Scientific). Los productos PCR que dieron positivo en la electroforesis fueron purificados utilizando el kit de purificación de Promega (ReliaPrepTM DNA Clean-up and Concentration System), siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante. Realizada la purificación, todos los productos fueron nuevamente sometidos al proceso de electroforesis, para comprobar que su purificación ocurrió de manera correcta.

2.3.3.4. Secuenciamiento, edición y alineamiento de secuencias

Tras el proceso de purificación, los productos de la PCR fueron secuenciados utilizando la metodología Sanger, usando un servicio de contratación externa a la universidad (Macrogen, laboratorio de biotecnología de Corea del Sur). Las secuencias, resultado de la secuenciación Sanger, fueron ensambladas y editadas utilizando el software Sequencher v.5.4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan). Las secuencias editadas fueron analizadas a través, del portal web del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), donde por similitud de secuencias, se confirmó la identificación de los 44 aislados, como *M. pernicioso*.

2.3.3.5. Análisis filogenético

Se realizó el análisis filogenético para las 44 secuencias de cada una de las regiones genéticas ITS, LSU y SSU. Adicionalmente, se utilizó secuencias de *M. pernicioso*, *M. roreri* y otras especies del género *Moniliophthora* generadas en otras investigaciones, y disponibles en la base de datos del NCBI. Por separado, las secuencias de cada una de las regiones se alinearon utilizando el software MEGA-X, mediante el algoritmo de MUSCLE. Posteriormente se realizó el análisis filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud (RAxML-HPCBlackBox), implementado en CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/>), de donde se obtuvo 3 árboles filogenéticos, uno por cada región amplificada.

2.3.4. Evaluación de diversidad genética en aislados de *Moniliophthora pernicioso*

Se evaluó la diversidad genética, mediante el análisis de marcadores moleculares microsatélite de secuencia simple repetida, que comprendió actividades de amplificación de 11 marcadores moleculares, electroforesis, análisis de fragmentos, análisis de diversidad y análisis del índice de asociación.

2.3.4.1. Amplificación de marcadores moleculares

Se analizó once marcadores moleculares microsatélite de secuencia de repetición simple (SSR, por sus singlas en inglés). Adicional a las 44 muestras con las que se trabajó para el análisis de las regiones ITS, LSU, y SSU, para este análisis se añadió 6 aislados más de *M. pernicioso*, provenientes del distrito de La Peca (MEB51); y las provincias de Condorcanqui (MEB45, MEB55 y MEB57) y Utcubamba (MEB50 y MEB53), dos

provincias limítrofes de la provincia de Bagua. Se utilizó los cebadores MsCepec_14, MsCepec_15, MsCepec_16, MsCepec_19 y MsCepec_45 (Tabla. 3), diseñados por (Gramacho et al., 2007), y los cebadores mMpCena4, mMpCena8, mMpCena11, mMpCena12, mMpCena19 y mMpCena26, deñados por (Silva et al., 2008). Los cebadores *forward*, fueron modificados al momento del diseño, colocando una secuencia del marcador universal M13 en el extremo 5' (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') (Tabla 3), con la finalidad de marcar con fluorescencia los productos de la PCR para un etiquetado económico y necesario para el análisis de fragmentos de ADN (Schuelke, 2000). En la PCR, cada marcador molecular, fue marcado con uno de los cuatro colores estándar (FAM, azul; NED, amarillo; PET, rojo; y VIC, verde) de Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific.

Todas las PCR para el análisis con marcadores SSR se realizaron con un volumen total de 12,5 µl, que consistió en una mezcla de 6,25 µl de PCR Master Mix (PCR Master Mix 2X - Promega), 0,156 µl del cebador *forward* con la secuencia del marcador M13 en el extremo 5', 0,625 µl del cebador *reverse*, 0,469 µl de uno de los cuatro colores_tag-M13 (FAM, NED, PET o VIC), y 5 µl de ADN a concentración de 0,5 ng/µl. Todos los cebadores estuvieron a una concentración de 10 µM. El programa de la PCR consistió en dos etapas, con una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, y 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 56 °C por 45 s, y elongación a 72 °C por 45 s; seguido de una segunda etapa de 10 ciclos, con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 53 °C por 45 s, elongación a 72 °C por 45 s, y una elongación final de 72 °C por 10 minutos.

Tabla 3

Cebadores utilizados para la amplificación de 11 marcadores moleculares microsatélite.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Size range (bp)*	Repeat type*
MsCepec_14_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT CAGCTCGTACGGATCAACAA - 3'	235-239	(AGAT)5
MsCepec_Cp14	R: 5'-TACCGATGGTGTGAGGTCAA - 3'		
MsCepec_15_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT AAAGGGAGGAAGCGAAGTCT - 3'	177-200	(GAT)7(GAA)6
MsCepec_Cp15	R: 5'-TGTCGAGCACTAGCATGTGA - 3'		
MsCepec_16_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT CGCACTTTGGCTGATGTAAA - 3'	212-221	(ATG)10
MsCepec_Cp16	R: 5'-GTCCCAGAGGGAAAGAGGAT - 3'		
MsCepec_45_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT ATGACCAGACAAATGAAAC - 3'	234-266	(AGAT)5
MsCepec_Cp45	R: 5'-CAAAGAGAAATCACAGAGC - 3'		
MsCepec_19_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT TCCCACAACCCAAAGATAG - 3'	197-200	(GAT)8
MsCepec_Cp19	R: 5'-CCCCTTCAAGGTCGTATCCT - 3'		
mMpCena4_F_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT ATTTGGCTTCGTTGCTGGT - 3'	293-299	(CCA)11
mMpCena4_R	R: 5'-AATCAGAGGCGGGATAGGG - 3'		
mMpCena26_F_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GGCAACTTCAGAGGCAAC - 3'	232-238	(GGT)9
mMpCena26_R	R: 5'-CACCAAATCCGCCATAC - 3'		
mMpCena8_F_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT TCGGAAACCAACCAAGAAG - 3'	269-275	(TCA)7
mMpCena8_R	R: 5'-AGGAAGGAGTCAGAGAGCA - 3'		
mMpCena11_F_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT ATGCTGATGAAGAGGAAGAG - 3'	250-259	(ACC)8
mMpCena11_R	R: 5'-TGGAAGAGAAGAGATGATGG - 3'		
mMpCena12_F_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GGGACCACCACCATAGAGA - 3'	278-284	(ACC)8
mMpCena12_R	R: 5'-AACAAACAGCCCTAACAAACC - 3'		
mMpCena19_F_M13	F: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT AACAAAGGACAGGCACAAC - 3'	244-250	(AAC)18
mMpCena19_R	R: 5'-GGTATCAATGTAGGGGAGGA - 3'		

***Fuente:** Información extraída de Gramacho et al., (2007) y J. Silva et al., (2008)

2.3.4.2. Electroforesis de marcadores moleculares amplificados

La correcta amplificación en los PCR fue verificada mediante el proceso de electroforesis descrito anteriormente, excepto que en este caso no se utilizó SYBR Safe contenido en el gel de agarosa; en su lugar se usó 30 µl de Diamond™ Nucleid Acid Dye (Promega), diluido en 300 ml de TAE 1X, en el que se sumergió el gel durante 30 minutos, posterior a la electroforesis. Las bandas amplificadas fueron reveladas por la interacción de la luz azul (*blue light*) con el Diamond™ Nucleid Acid Dye, alojado en las secuencias de ADN amplificadas, y documentadas utilizando un Transiluminador y fotodocumentador de geles (Clever Scientific).

2.3.4.3. Análisis de fragmentos y determinación de longitud de alelos

Los productos de la PCR correctamente amplificados, fueron sometidos al análisis de fragmentos, utilizando un servicio de contratación externa a la Universidad (1st BASE Apical Scientific - Malasia). Obtenido los resultados del análisis de fragmentos, la longitud de alelos se obtuvo en función al número de nucleótidos utilizando GeneScan

500 LIZ como patrón de medida, y el software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems) en la materialización de la data.

2.3.4.4. Análisis de diversidad genética

El análisis de diversidad genética se realizó utilizando el paquete estadístico “*poppr*” versión 2.9.3, (Kamvar et al., 2014, 2015) disponible para el software R 4.1.2. (R Core Team, 2022). Se realizó la asignación de Genotipos Multilocus (MLG) y determinó la curva informativa del número de genotipos multilocus respecto al número de marcadores moleculares utilizados. Se evaluó la diversidad alélica mediante el índice de heterocigosidad de Nei (H_{exp}) (Nei, 1978). Asimismo, se calculó los índices de diversidad genotípica, mediante el índice de Shannon - Wiener (H) (Shannon, 1948), índice de Simpson (lambda) (Simpson, 1949) y el índice de Stoddard y Taylor (G) (Stoddard & Taylor, 1988). Los análisis se realizaron inicialmente con todos los aislados y posteriormente aplicando el método de corrección clonal (Smith et al., 1993). En este método se ignoran datos de clones de un haplotipo por población en un genotipo multilocus, conservando un solo representante por población para evitar sesgos por poblaciones clonales.

2.3.4.5. Análisis de agrupamientos de Genotipos Multilocus

El análisis de agrupamiento de genotipos multilocus, se realizó utilizando la función “*poppr.msn*” del paquete “*poppr*” que permitió visualizar la distribución y relación de genotipos multilocus basado en la disimilitud alélica, mediante la representación gráfica de una red de expansión mínima (Csardi & Nepusz, 2006).

2.3.4.6. Índice de Asociación

El índice de asociación es un indicador de desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*) que indica la existencia o no de recombinación genética mediante reproducción sexual cruzada. Este se calcula mediante el Índice de asociación (I_A) que depende del número de muestras (Brown et al., 1998) y el Índice de asociación estandarizado (\bar{r}_d) donde se elimina esta dependencia (Agapow & Burt, 2001). El análisis se realizó, utilizando la función “*ia*” implementada en el paquete “*poppr*”. Al igual que en el análisis de diversidad genética, este análisis se realizó antes y después de la corrección de clones, con 1000 permutaciones de muestreo en cada análisis.

III. RESULTADOS

3.1. Zonas cacaoteras con síntomas de presencia de *Moniliophthora perniciosa*

La evaluación de incidencia en las 44 unidades productivas ubicadas en los diferentes distritos de la provincia de Bagua evidenció la presencia de *M. perniciosa* en el 100 % de unidades productivas evaluadas (Fig. 6). El porcentaje de incidencia fue variable a nivel de distritos. El distrito de Aramango presentó el porcentaje de incidencia más alto con 97,5 %, seguido de Copallín (80,0 %), Imaza (74,3 %), La Peca (72,5 %), Bagua (30,0 %), y el Parco (10,0 %), siendo de 74,32 % el porcentaje de incidencia a nivel de la provincia (Tabla 4).

Tabla 4

Incidencia de M. perniciosa a nivel de distritos y provincia de Bagua.

Área de Estudio	Distritos	UP evaluadas	Plantas Evaluadas por UP	% de incidencia por distritos	% de incidencia a nivel de provincia
Provincia Bagua	Aramango	4	20	97,5	74,32
	Imaza	30	20	74,3	
	Copallín	4	20	80,0	
	Bagua	1	20	30,0	
	La Peca	4	20	72,0	
	El Parco	1	20	10,0	

(UP) = Unidad Productiva.

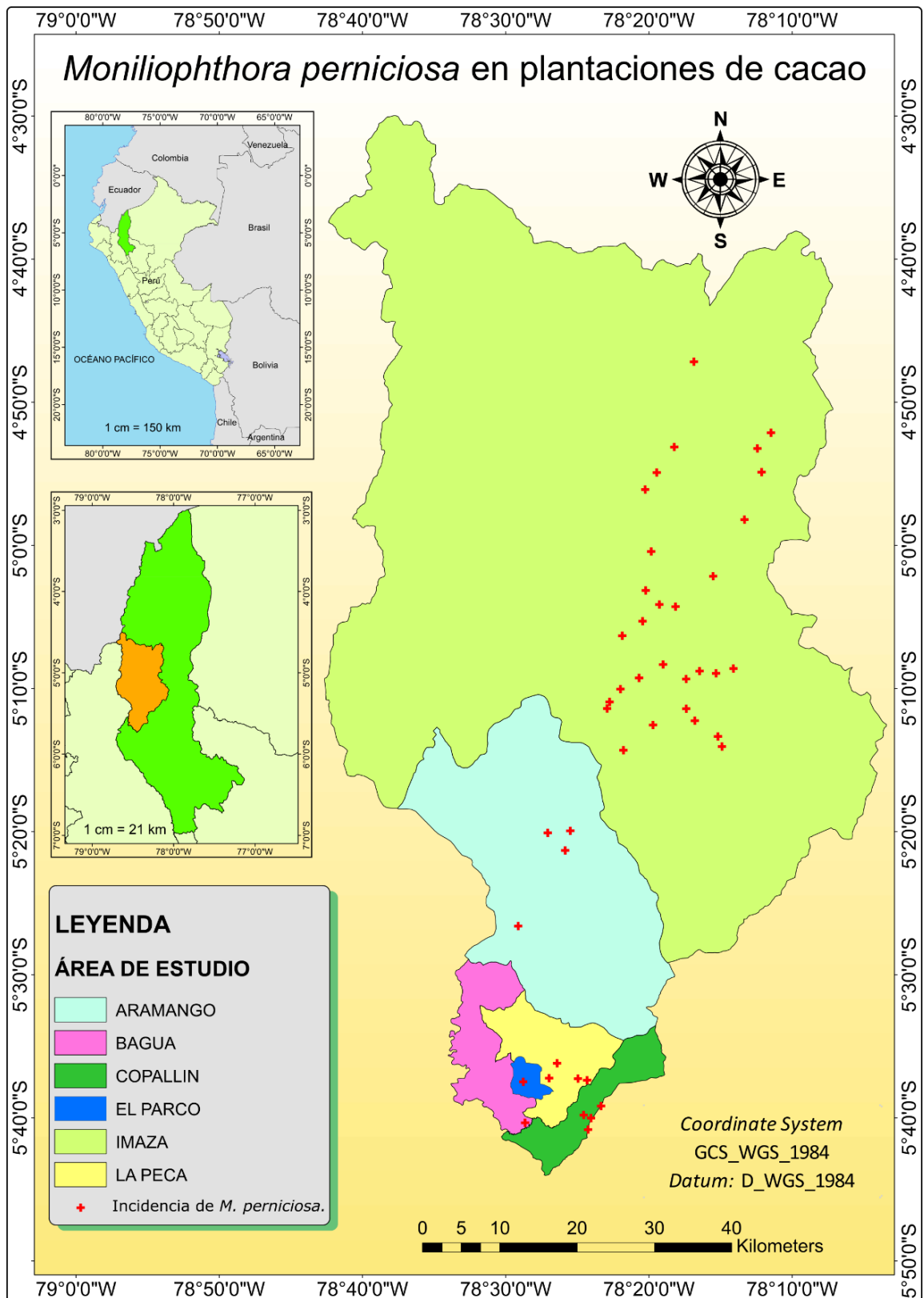


Figura 6. Distribución geográfica de la incidencia de *Moniliophthora perniciosa* basado en las unidades productivas cacaoteras evaluadas.

3.2. Caracterización macro y micro morfológica de aislados de *Moniliophthora perniciosa*

3.2.1. Evaluación de crecimiento radial

Crecimiento radial de 44 aislados

El análisis de varianza (ANOVA) para los 44 aislados, mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) en el crecimiento radial a los 15 días (Tabla 5). Esto revela un alto grado de heterogeneidad en el crecimiento radial de aislados, lo cual indica que al menos uno de los aislados presentó media de crecimiento radial con diferencia significativa respecto a los demás aislados.

Tabla 5

Análisis de varianza para 44 aislados de M. perniciosa, a 15 días de crecimiento.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Valor de P
Aislado	43	6458,51	150,20	41,76	< 0,0001
Error	88	316,52	3,60		
Total	131	6775,03			
R² = 0,95 CV = 8,59 %					
R²: R cuadrado CV: Coeficiente de Variación					

El análisis de comparación de medias por Tukey ($\alpha = 0,05$) para los 44 aislados de *M. perniciosa* al día 15 de crecimiento mostró más de un grupo estadístico, donde el aislado MEB39 (grupo A) con 36,34 mm presentó el mayor crecimiento radial promedio, seguido de los aislados, MEB36 con 36,03 mm, MEB35 con 34,52 mm, MEB41 con 34,38 mm, MEB40 con 34,29 mm, MEB43 con 33,94 mm, MEB42 con 31,08 mm y MEB34 con 30,35 mm; los mismos que no difirieron significativamente del aislado MEB39. El aislado MEB4 (grupo P) presentó el crecimiento radial más bajo, con 9,98 mm (Fig. 7).

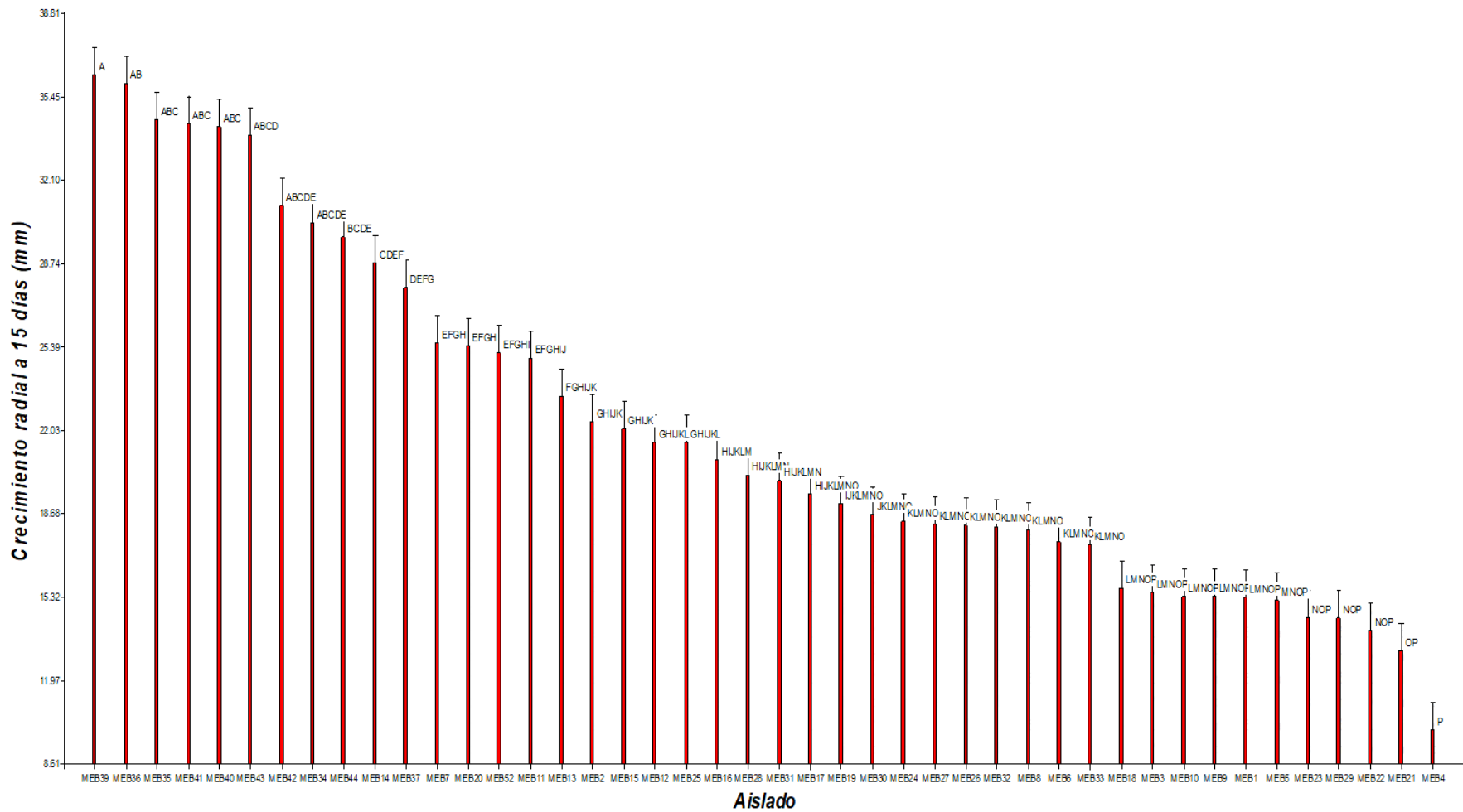


Figura 7. Grafica del test de Tukey (Alfa = 0,05) para 44 aislados de *M. perniciosa*. Comparación de medias de crecimiento radial a 15 días. Letras en común no difieren estadísticamente entre sí

Crecimiento radial de aislados agrupados por distritos

Crecimiento radial a los 07 días (mm)

El análisis de varianza, a un nivel de significancia de ($\alpha = 0,05$), mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para aislados agrupados por distritos respecto al crecimiento radial a los 7 días (Tabla 6). Esto indica que al menos uno de los distritos presentó diferencia significativa respecto a los demás distritos.

Tabla 6

Análisis de varianza para aislados agrupados por distritos a los 7 días de crecimiento.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Valor de P
Distrito	5	852,83	170,57	43,03	< 0,0001
Error	126	499,44	3,96		
Total	131	1352,27			

R² = 0,63 CV = 22,20 %

R²: R cuadrado CV: Coeficiente de Variación

El análisis de comparación de medias por Tukey mostró 4 grupos estadísticos (A, AB, BC, C), donde los distritos de Bagua (15,75 mm) y La Peca (14,44 mm) obtuvieron la mayor media de crecimiento radial (Grupo A), seguido de Copallín con 12,68 mm (grupo AB) y El Parco con 10,36 mm (grupo BC). Aramango e Imaza (grupo C) presentaron el crecimiento radial más bajo, con 8,30 mm y 7,56 mm respectivamente (Fig. 8).

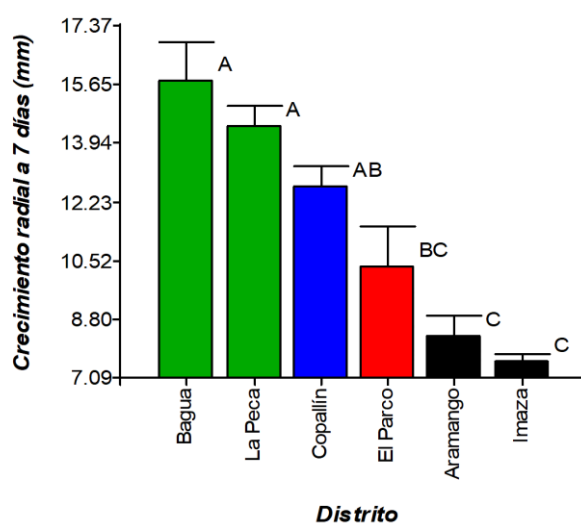


Figura 8. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 7 días, en aislados agrupados por distritos. Letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

Crecimiento radial a los 09 días (mm)

El análisis de varianza a un nivel de significancia de ($\alpha = 0,05$), mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para aislados agrupados por distritos respecto al crecimiento radial a los 9 días (Tabla 7). Esto indica que al menos uno de los distritos presentó diferencia estadística significativa respecto a los demás distritos.

Tabla 7

Análisis de varianza para aislados agrupados por distritos, a los 9 días de crecimiento.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Valor de P
Distrito	5	1381,26	276,25	37,79	< 0,0001
Error	126	921,18	7,31		
Total	131	2302,44			

R² = 0,60 CV = 21,61 %

R²: R cuadrado CV: Coeficiente de Variación

El análisis de comparación de medias por Tukey mostró 4 grupos estadísticos (A, AB, BC, C), donde los distritos de Bagua (21,16 mm) y La Peca (19,44 mm) obtuvieron el mayor crecimiento radial (grupo A), seguido de Copallín con 17,20 (grupo AB) y El Parco con 14,83 (grupo BC). Aramango e Imaza (grupo C) presentaron el crecimiento radial más bajo, con 11,74 mm y 10,70 mm, respectivamente (Fig. 9).

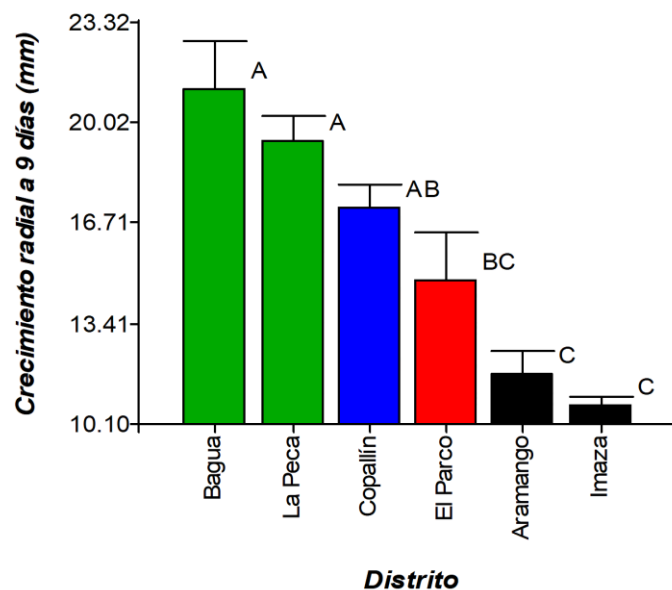


Figura 9. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 9 días, en aislados agrupados por distritos. Letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

Crecimiento radial a los 11 días (mm)

El análisis de varianza a un nivel de significancia de ($\alpha = 0,05$), mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para aislados agrupados por distritos respecto al crecimiento radial a los 11 días (Tabla 8). Esto indica, que al menos uno de los distritos presentó diferencia estadística significativa respecto a los demás distritos.

Tabla 8

Análisis de varianza para aislados, agrupados por distritos, a los 11 días de crecimiento.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Valor de P
Distrito	5	2469,99	494,00	43,45	<0,0001
Error	126	1432,65	11,37		
Total	131	3902,64			

R² = 0,63 CV = 21,54 %

R²: R cuadrado CV: Coeficiente de Variación

El análisis de comparación de medias por Tukey mostró 5 grupos estadísticos (A, AB, BC, CD, D), donde el distrito de Bagua con 26,83 mm (grupo A), y los distritos de la Peca con 24,72 mm y Copallín con 22,08 mm (grupo AB), obtuvieron el mayor crecimiento radial; seguido de El Parco con 19,92 mm (grupo BC). Aramango con 14,92 mm (grupo CD) e Imaza con 13,18 mm (grupo D), presentaron el crecimiento radial más bajo (Fig. 10).

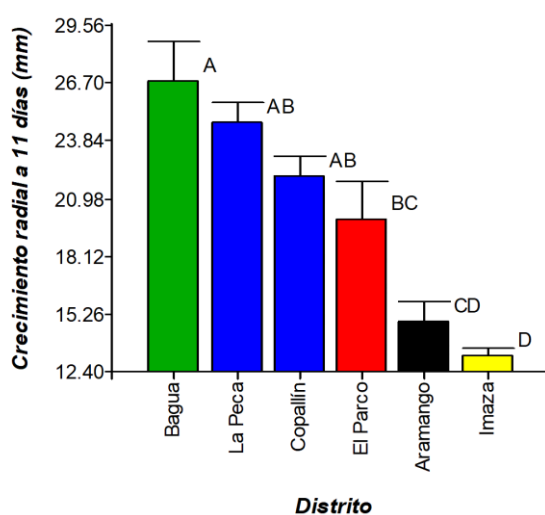


Figura 10. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 11 días, en aislados agrupados por distritos. Letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

Crecimiento radial a 13 días (mm)

El análisis de varianza a un nivel de significancia de ($\alpha = 0,05$), mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para aislados agrupados por distritos respecto al crecimiento radial a los 13 días (Tabla 9). Esto indica que al menos uno de los distritos presentó diferencia estadística significativa respecto a los demás distritos.

Tabla 9

Análisis de varianza para aislados agrupados por distritos, a los 13 días de crecimiento.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Valor de P
Distrito	5	3434,45	686,89	43,63	<0,0001
Error	126	1983,61	15,74		
Total	131	5418,06			

R² = 0,63 CV = 21,04 %

R²: R cuadrado CV: Coeficiente de Variación

El análisis de comparación de medias por Tukey mostró 4 grupos estadísticos (A, AB, B, C), donde el distrito de Bagua con 32,04 mm (grupo A) y los distritos de La Peca con 29,24 mm, y Copallín con 26,66 mm (grupo AB) obtuvieron el mayor crecimiento radial; seguido de El Parco con 24,74 mm (grupo B). Aramango e Imaza (grupo C) presentaron el crecimiento radial más bajo, con medias de 17,91 mm y 15,93 mm, respectivamente (Fig. 11).

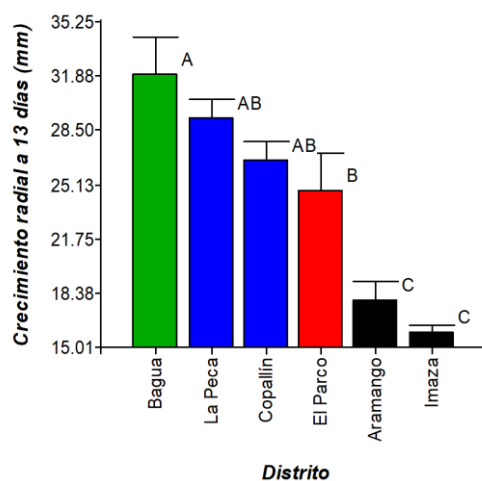


Figura 11. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 13 días, en aislados agrupados por distritos. Letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

Crecimiento radial a 15 días (mm)

El análisis de varianza a un nivel de significancia de ($\alpha = 0,05$), mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para aislados agrupados por distritos respecto al crecimiento radial a 15 días (Tabla 10). Esto indica que al menos uno de los distritos presentó diferencia estadística significativa respecto a los demás distritos.

Tabla 10

Análisis de varianza para aislados agrupados por distritos, a los 15 días de crecimiento.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Valor de P
Distrito	5	4222,62	844,52	41,69	<0,0001
Error	126	2552,41	20,26		
Total	131	6775,03			

R² = 0,62 CV = 20,37 %

R²: R cuadrado CV: Coeficiente de Variación

El análisis de comparación de medias por Tukey mostró 2 grupos estadísticos (A, y B), donde los distritos de Bagua con 36,34 mm, La Peca con 33,42 mm, Copallín con 30,87 mm, y El Parco con 29,80 mm obtuvieron el mayor crecimiento radial (grupo A). Los distritos Aramango e Imaza (grupo B) presentaron el crecimiento radial más bajo, con medias de 20,88 mm y 18,84 mm, respectivamente (Fig. 12).

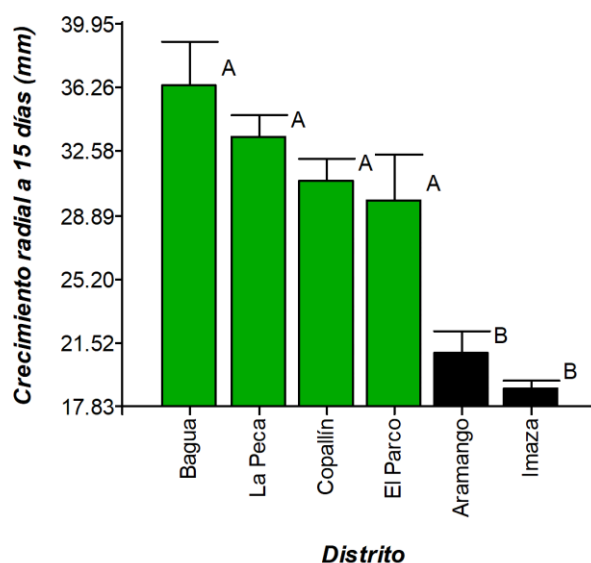


Figura 12. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para medias de crecimiento radial a 15 días, para aislados agrupados por distritos. Letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

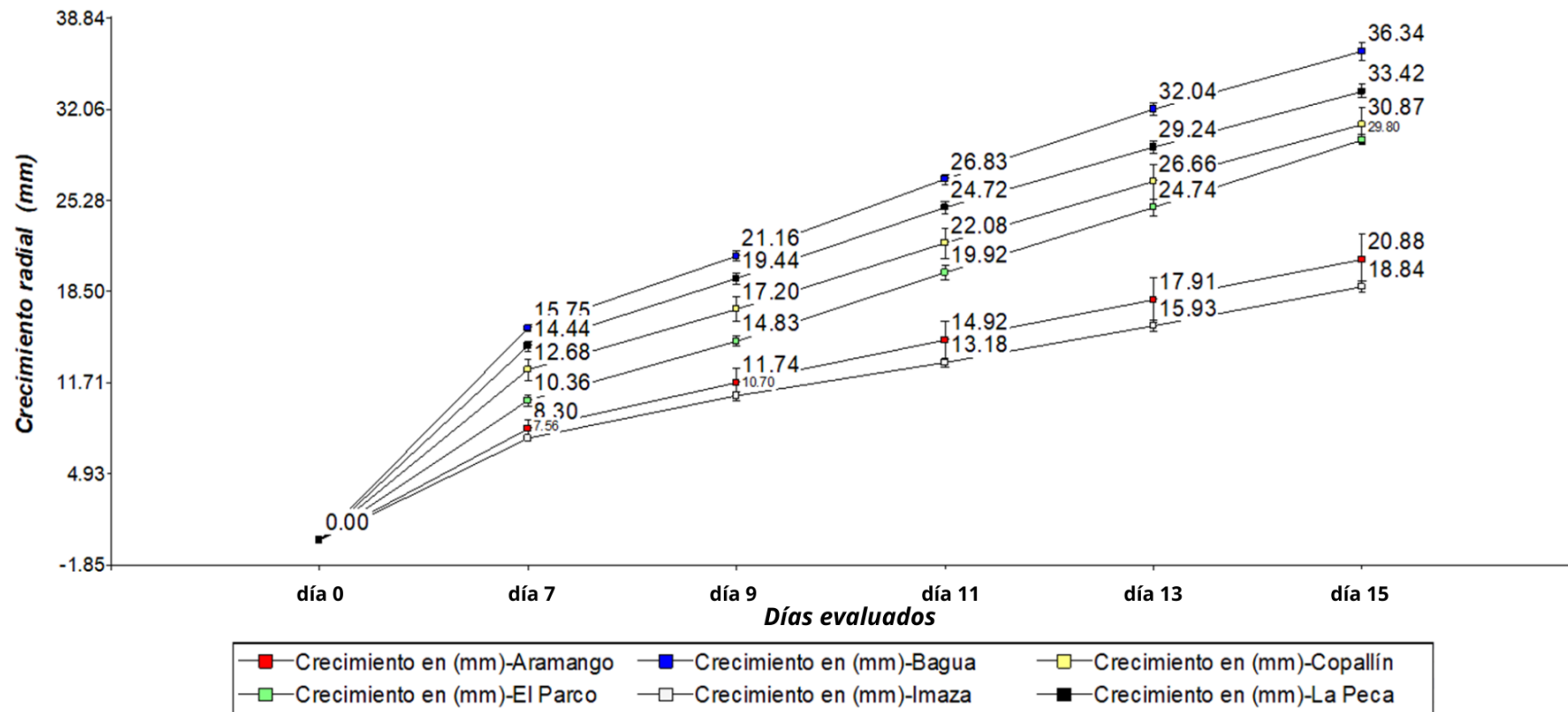


Figura 13: Gráfica de puntos de total de días evaluados, respecto a las medias de crecimiento radial de aislados agrupados por distritos.

Crecimiento radial a 15 días para los aislados agrupados por el Intervalo de tiempo transcurrido desde el aislamiento hasta la siembra para la evaluación (ITTASPE)

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para aislados agrupados por intervalo de tiempo transcurrido desde el aislamiento hasta la siembra para la evaluación (ITTASPE) (Tabla 11). Esto indica que al menos uno de los grupos presentó media de crecimiento con diferencia estadística significativa respecto a los demás grupos.

Tabla 11

Análisis de varianza para el efecto ITTASPE (crecimiento radial a 15 días).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Valor de P
ITTASPE	3	4632,69	1544,23	92,26	<0,0001
Error	128	2142,34	16,74		
Total	131	6775,03			

R² = 0,68 CV = 18,52 %

R²: R cuadrado CV: Coeficiente de Variación

El análisis de comparación de medias por Tukey mostró 2 grupos estadísticos (A y B) que difieren estadísticamente entre sí, donde el grupo de aislados agrupados para 16 días (grupo A), presentaron el crecimiento radial más alto con una media de 32,85 mm a los 15 días. Asimismo, los aislados agrupados para 88, 123 y 84 días (grupo B), presentaron la media de crecimiento radial más baja con 20,22 mm, 19,58 mm y 17,78 mm, respectivamente (Fig. 14).

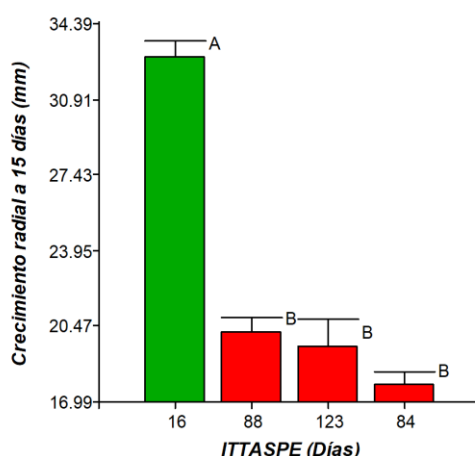


Figura 14. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el efecto de (ITTASPE) en el crecimiento radial (mm) a 15 días. Letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

Crecimiento radial a 15 días de aislados agrupados según el tejido infectado del que fueron aislados

El análisis de varianza mostró diferencias no significativas ($p = 0,6936$) para aislados agrupados según el tipo de tejido infectado del que fueron obtenidos (Tabla 12). Esto indica que el tipo de tejido del que fueron aislados no influyó estadísticamente en el crecimiento radial.

Tabla 12

Análisis de Varianza para aislados agrupados según el tipo de tejido infectado del que fueron obtenidos (Crecimiento radial a 15 días).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Valor de P
Tejido infectado	2	38,32	19,16	0,37	0,6936
Error	129	6736,72	52,22		
Total	131	6775,04			

R² = 0,01 CV = 32,71 %

El análisis de comparación de medias por Tukey ($\alpha = 0,05$) presentó un solo grupo estadístico (A) para la categoría tejido infectado, lo que indica que las medias de crecimiento radial a 15 días, no difieren estadísticamente a nivel de aislados agrupados según el tejido infectado del que fueron obtenidos (Fig. 15).

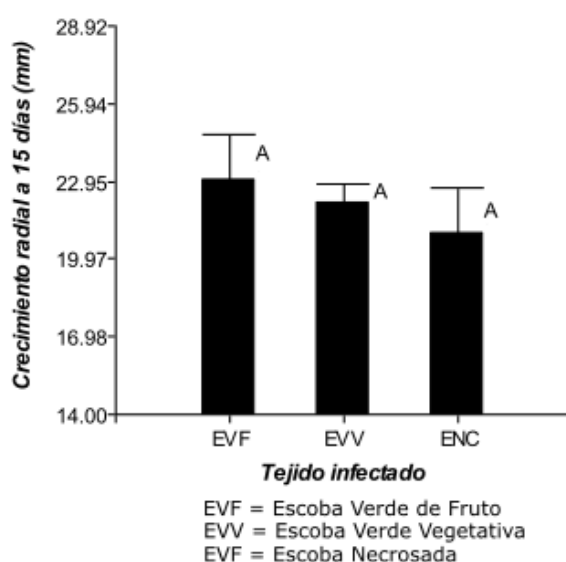


Figura 15. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el efecto de tejido infectado en el crecimiento radial (mm) a 15 días. Letras iguales no difieren estadísticamente entre sí.

3.2.2. Descripción de características macroscópicas

Se encontraron características macroscópicas propias de *M. pernicioso* en los 44 aislados obtenidos (Figs. 16-20). A los 25 días de crecimiento se registró elevada similitud en una gran mayoría de aislados, como también una gran variabilidad inclusive en réplicas de un mismo aislado (Figs. 19-20). Las características más frecuentes que marcaron la diferencias y similitudes entre aislados fueron el aspecto, color, borde y textura de la colonia en la parte anversa; y el color de la parte céntrica, mitad del radio y borde, en el reverso.

Las diferencias y similitudes observadas han permitido establecer nueve grupos de características morfológicas para los 44 aislados evaluados (Tabla 13; Figs. 16-18). Varios de los aislados comparten características macro morfológicas de más de un grupo debido a la heterogeneidad morfológica presentada en repeticiones de un mismo aislado (Figs. 19-20).

Adicionalmente, se realizó observaciones microscópicas de aislados representativos de cada grupo. La presencia de fíbulas en los grupos 1, 2, y 3 fue extremadamente escasa, mientras que en los grupos 4, 5, 6, 7, 8, y 9 fue mucho más abundante. La presencia de fíbulas se relacionó estrechamente a las características macro morfológicas principalmente con el aspecto micelial. En el caso de los tres primeros grupos, el micelio fue uniforme, abundante, y de crecimiento mucho más rápido, mientras que, en los demás grupos, el micelio fue de crecimiento disperso y mucho más lento.

Para ninguno de los grupos se realizó observaciones microscópicas respecto al número de núcleos por hifa. Sin embargo, por la presencia de fíbulas, se deduce que en todos los grupos el micelio fue de tipo dicariótico. El porqué de la abundancia y escasas de fíbulas son características fisiológicas de *M. pernicioso* que se discuten más adelante. Sin embargo, por la relación observada con el aspecto micelial, vale mencionar que algunos aislados presentaron los dos aspectos de micelio antes descrito, en repeticiones de un mismo aislado (Fig. 19), e inclusive en una misma placa Petri (Fig. 20).

Tabla 13

Aislados agrupados por similitud en características de color, borde de colonia y aspecto micelial.

Grupo	Aislados	Características macroscópicas
Grupo 1	MEB22, MEB25, MEB28, MEB40	<p><i>Anverso:</i> Color: Blanco intenso en toda la colonia. Forma y borde: Circular con borde definido. Textura de la colonia: Micelio algodonoso de crecimiento alto y uniforme, a excepción de los bordes donde el micelio fue de crecimiento más bajo. Reverso: Color amarillo - naranja hasta la parte media del radio, seguido de blanco amarilloso hacia los bordes.</p>
Grupo 2	MEB7, MEB14, MEB18, MEB20, MEB21, MEB30, MEB31, MEB35, MEB36, MEB37, MEB39, MEB40, MEB41, MEB42, MEB43	<p><i>Anverso:</i> Color: Blanco intenso en toda la colonia. Forma y borde: Circular con borde definido. Textura de la colonia: Micelio algodonoso de crecimiento alto, uniforme y aterciado, a excepción de los bordes donde el micelio fue menos saturado y de crecimiento bajo. Reverso: Color naranja alrededor del disco de siembra, seguido de amarillo - naranja hacia la mitad del radio, y blanco amarilloso a los bordes.</p>
Grupo 3	MEB31, MEB34, MEB44, MEB52	<p><i>Anverso:</i> Color: Blanco claro y blanco intenso, dispuestos en delgadas franjas circulares. Forma y borde: Circular con borde definido. Textura de la colonia: Micelio algodonoso de crecimiento alto y bajo, dispuestos en franjas circulares bien definidas, con micelio menos saturado y bajo hacia los bordes. Reverso: Color naranja alrededor del disco de siembra, seguido de un color blanco pálido hacia los bordes de la colonia. Es notable los anillos concéntricos formados por la disposición de franjas delgadas de zonas de crecimiento micelial alto y bajo.</p>

Tabla 13

(Continuación)

Grupo	Aislados	Características macroscópicas
Grupo 4	MEB12	<p>Anverso: Color: Purpura-granate en la parte céntrica, blanco intenso de la mitad del radio hacia los bordes. Forma y borde: Circular con borde irregular. Textura de la colonia: Micelio aterciopelado rizomórfico de crecimiento superficial medio, dispuestos del centro hacia los bordes, gruesos en la base, afinados y rizados en sentido antihorario hacia las puntas; con pequeñas y finas ramificaciones hacia los costados. Reverso: Color lila intenso en la parte céntrica hasta la mitad del radio, seguido de amarillo - naranja, y amarillo débil hacia los bordes.</p>
Grupo 5	MEB5, MEB11	<p>Anverso: Color: Blanco intenso en toda la colonia. Forma y borde: Circular con borde irregular. Textura de la colonia: Micelio aterciopelado y rizomórfico de crecimiento superficial medio, dispuestos del centro hacia los bordes, gruesos en la base, afinados y rizados en sentido antihorario hacia las puntas; con pequeñas y finas ramificaciones hacia los costados. Reverso: Color lila débil alrededor del disco de siembra, seguido de amarillo- naranja hasta la mitad del radio, y blanco amarilloso hacia los bordes.</p>
Grupo 6	<p>MEB2, MEB6, MEB7, MEB8, MEB9, MEB13, MEB15, MEB16, MEB17, MEB18, MEB23, MEB24, MEB25, MEB26, MEB27, MEB28, MEB30, MEB32, MEB33</p>	<p>Anverso: Color: Blanco claro y puntos resaltantes de blanco intenso. Forma y borde: Circular con borde irregular. Textura de la colonia: Micelio aterciopelado de crecimiento superficial medio, dispuestos del centro hacia los bordes, gruesos en la base, y afinados hacia las puntas, con pequeñas y finas ramificaciones hacia los costados. A diferencia de los grupos 4 y 5, estos fueron rizados con mayor inclinación en sentido antihorario, además presentaron pequeños puntos y manchas de micelio blanquecino que resaltaban a lo largo de los tercios miceliales y toda la colonia. Reverso: Color naranja débil alrededor del disco de siembra, amarillo- naranja hasta la mitad del radio, y blanco amarilloso hacia los bordes.</p>

Tabla 13

(Continuación)

Grupo	Aislados	Características macroscópicas
Grupo 7	MEB3, MEB4, MEB8, MEB9, MEB10, MEB18, MEB21	<p><i>Anverso:</i> Color: Blanco transparente en toda la colonia. Forma y borde: Circular con borde irregular. Textura de la colonia: Micelio disperso con finas ramificaciones, de crecimiento lento a ras de superficie del medio. Reverso: Color naranja débil alrededor del disco de siembra, seguido de blanco amarilloso hacia los bordes.</p>
Grupo 8	MEB19	<p><i>Anverso:</i> Color: Crema en toda la colonia. Forma y borde: Circular con borde irregular. Textura de la colonia: Micelios delgados, abundantes, dispersos y aterciopelado, dispuestos desde el disco de siembra hacia los bordes. Crecimiento a ras de superficie del medio Reverso: Color naranja débil alrededor del disco de siembra, seguido de amarillo - naranja hacia los bordes.</p>
Grupo 9	MEB1, MEB2, MEB6, MEB8, MEB13, MEB23 MEB52	<p><i>Anverso:</i> Color: Blanco algodonoso, con puntos de blanco intenso a lo largo de la colonia Forma y borde: Circular, cerebriforme con borde irregular. Textura de la colonia: Micelio algodonoso de crecimiento lento, altura media y saturado en algunas zonas. Reverso: Color naranja alrededor del disco de siembra, seguido de blanco amarillos hacia los bordes.</p>

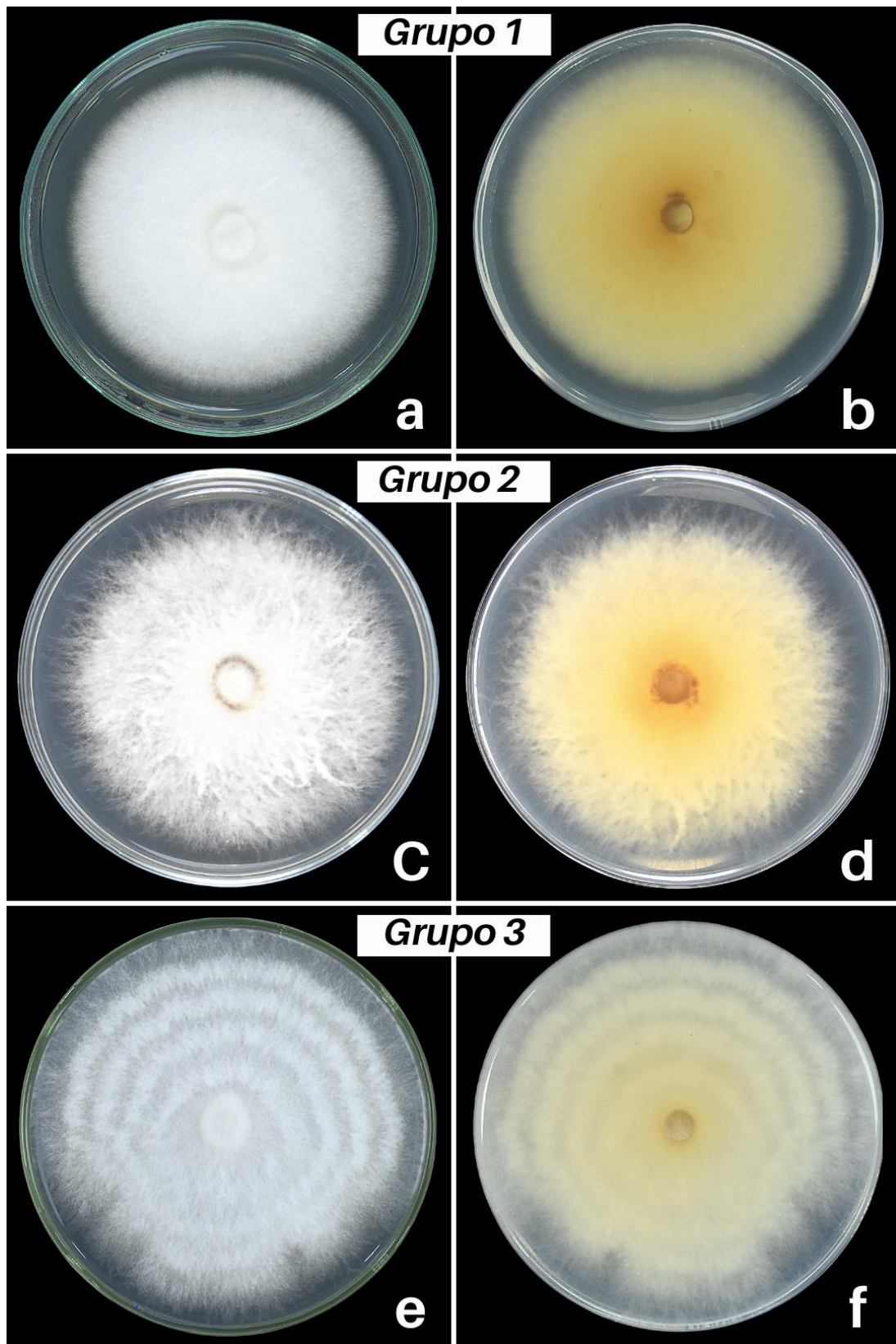


Figura 16. Aislados ejemplares de *Moniliophthora perniciosa* (25 días de edad) de los grupos 1, 2, y 3. **a** y **b**. Anverso y reverso del aislado MEB25. **c**. y **d**. Anverso y reverso del aislado MEB14. **e**. y **f**. Anverso y reverso del aislado MEB31. En los tres grupos, microscópicamente, la presencia de fíbulas fue escasa.

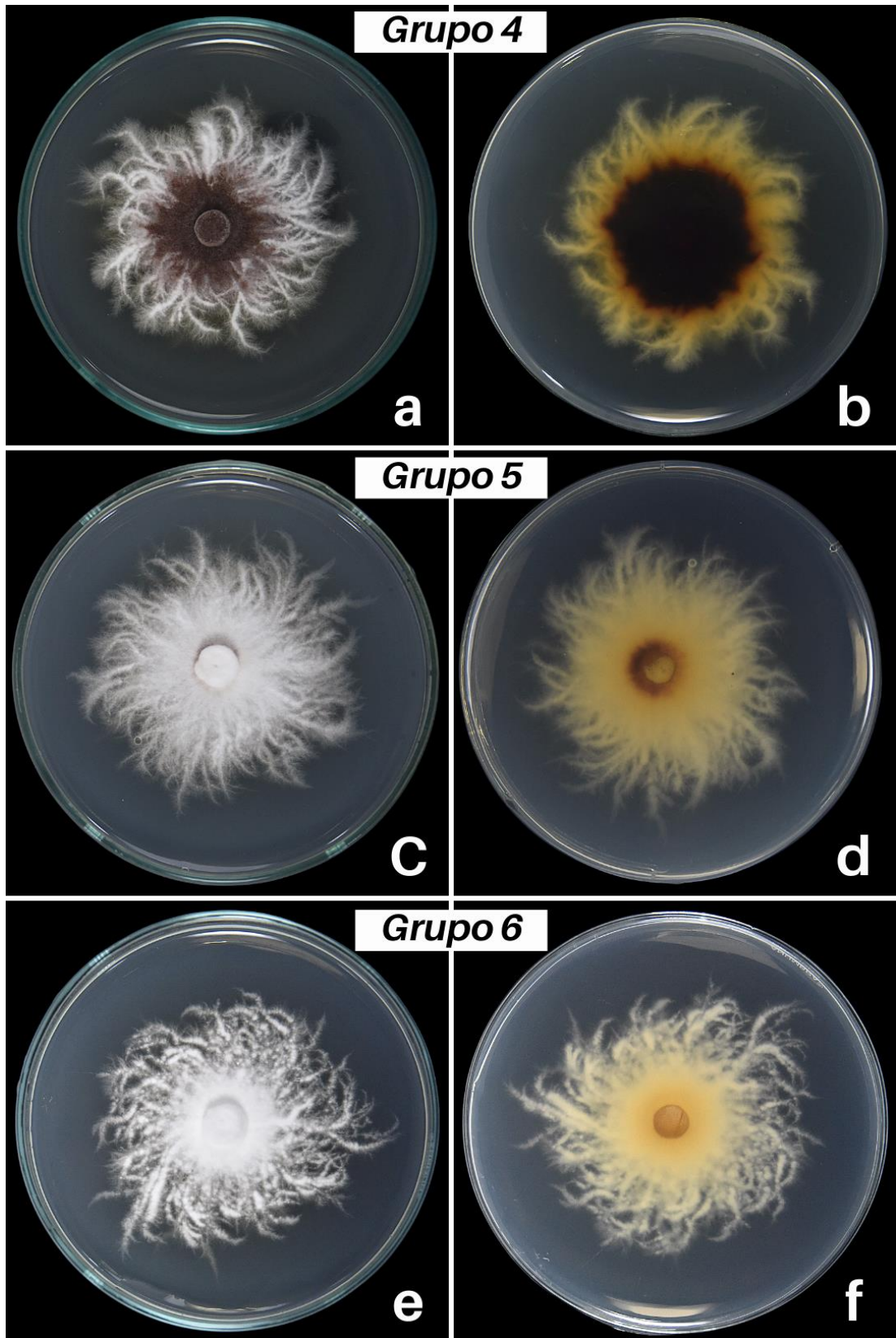


Figura 17. Aislados ejemplares de *Moniliophthora perniciosa* (25 días de edad), de los grupos 4, 5 y 6. **a** y **b**. Anverso y reverso del aislado MEB12. **c**. y **d**. Anverso y reverso del aislado MEB11. **e**. y **f**. Anverso y reverso del aislado MEB15. En los tres grupos, microscópicamente la presencia de fíbulas fue más abundante que en los grupos 1, 2, 3.

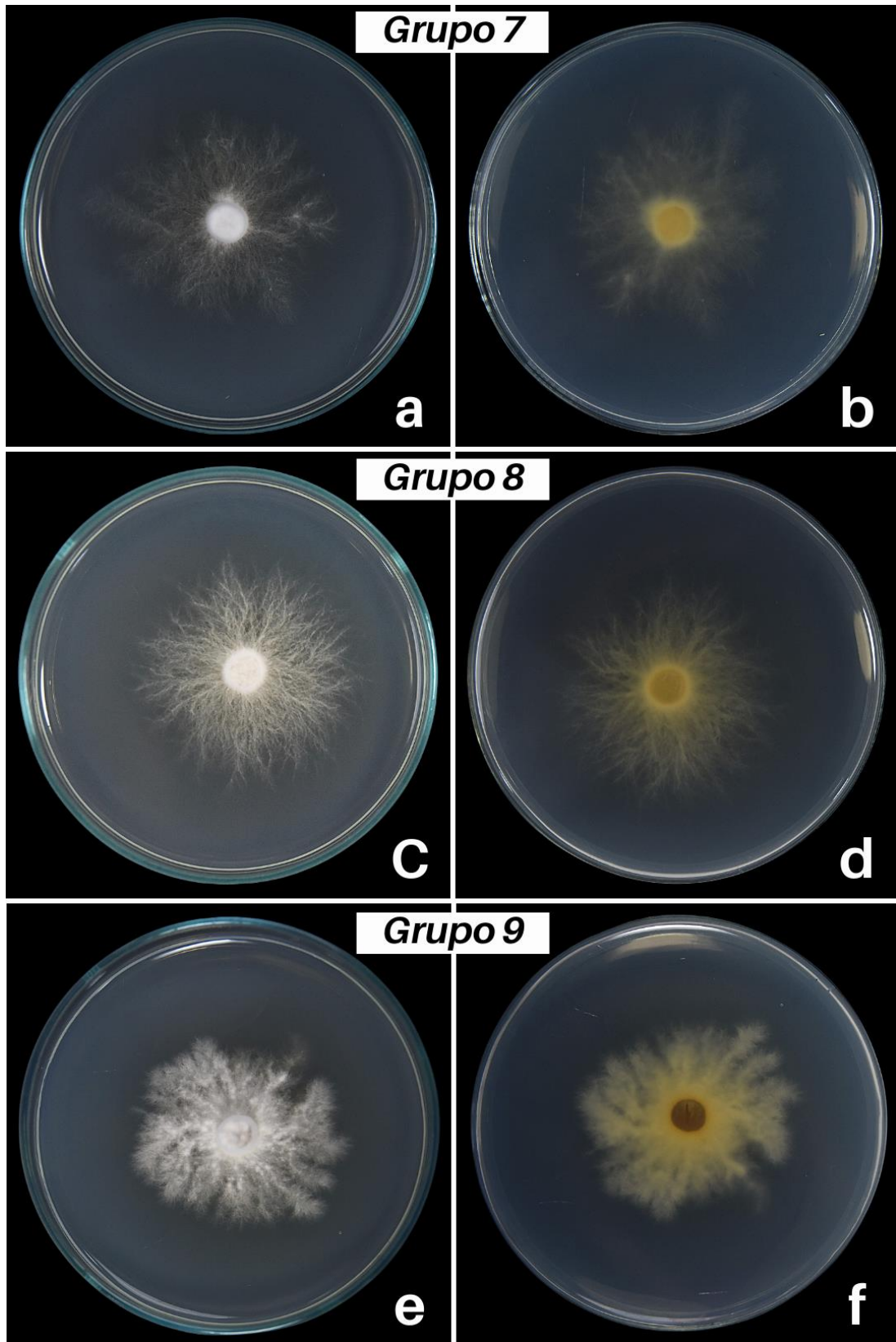


Figura 18. Aislados ejemplares de *Moniliophthora perniciosa* (25 días de edad), de los grupos 7, 8 y 9. **a** y **b**. Anverso y reverso del aislado MEB10. **c.** y **d.** Anverso y reverso del aislado MEB19. **e.** y **f.** Anverso y reverso del aislado MEB8. En los tres grupos, microscópicamente, la presencia de fíbulas fue similar que en los grupos 4, 5 y 6.

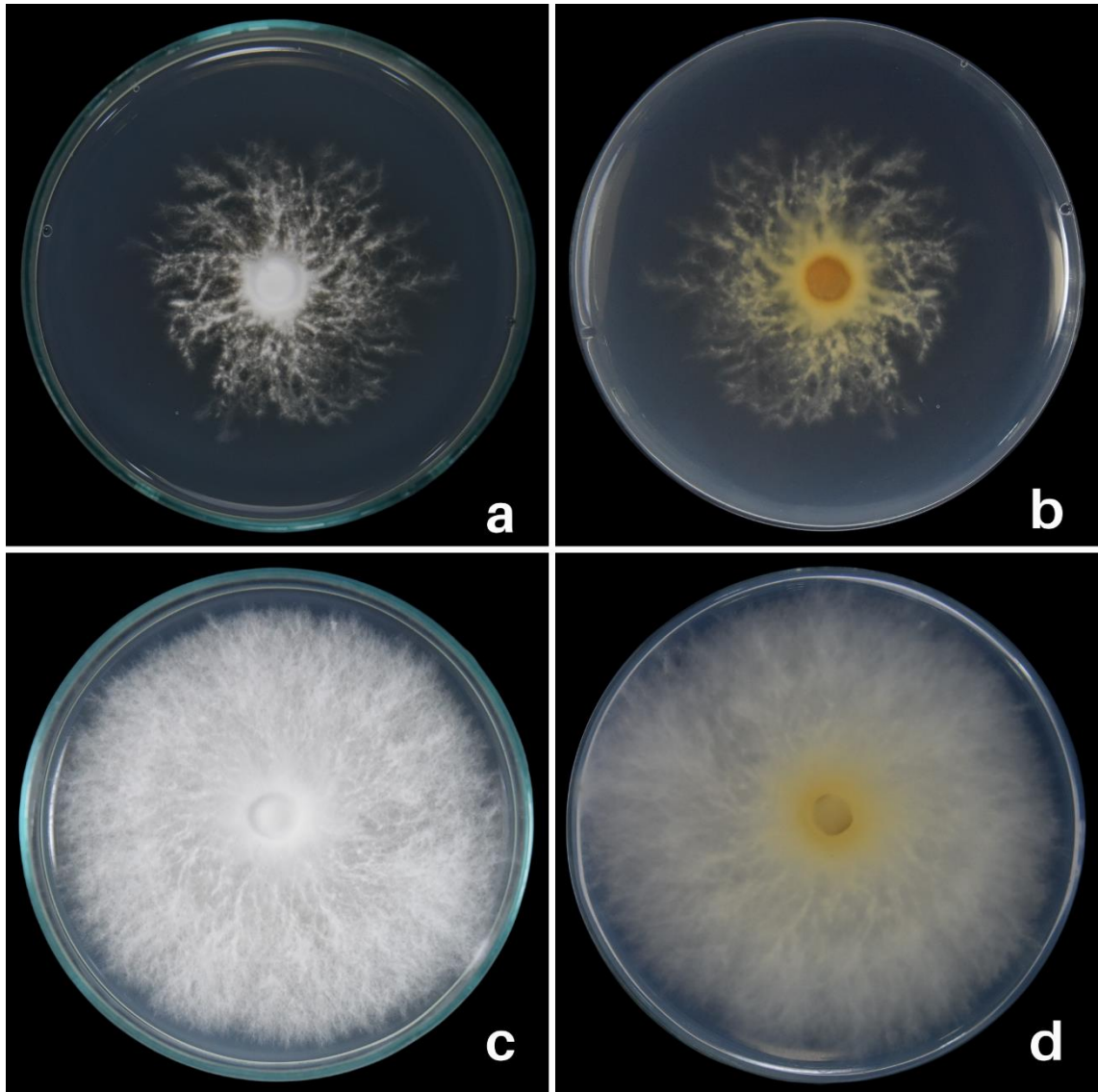


Figura 19. Repeticiones de un mismo aislado de *M. perniciosus* (MEB7) de 25 días de edad, con 2 aspectos de micelio. **a.** y **b.** Anverso y reverso del aislado MEB7 con aspecto de micelio de crecimiento disperso y lento; microscópicamente se observó mayor abundancia de fíbulas. **c.** y **d.** Anverso y reverso del aislado MEB7 con aspecto de micelio de crecimiento uniforme, abundante y mucho más rápido; microscópicamente, la presencia de fíbulas fue escasa.

Algunos aislados presentaron zonas de crecimiento con 2 aspectos de micelio en una misma placa (Fig. 20). Estos fueron el MEB5, MEB18, MEB23, MEB24, MEB25, MEB26, MEB29, MEB30 y MEB32. El aislado MEB29, fue el único aislado que sólo mostró este tipo de crecimiento en todas las repeticiones.

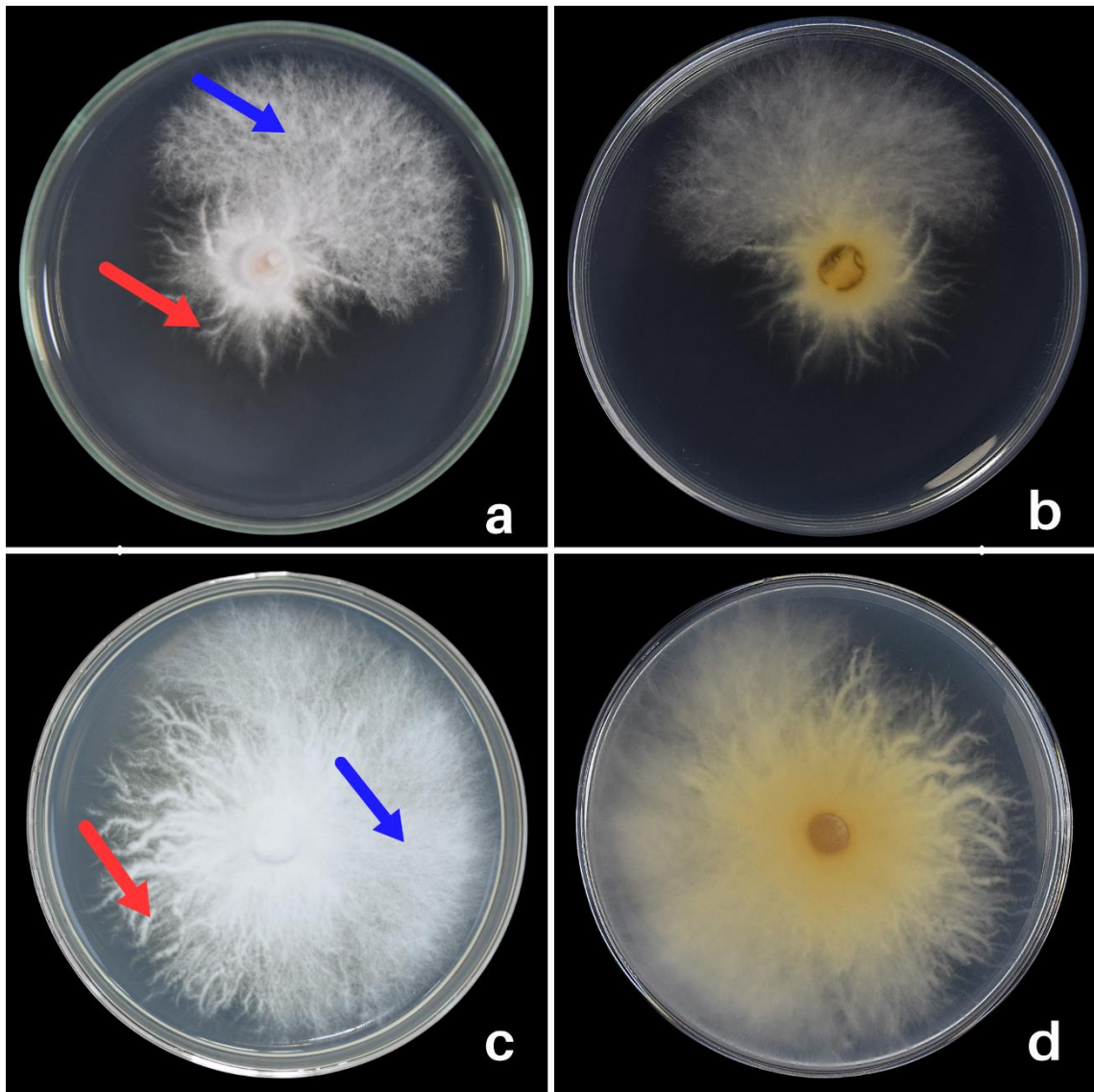


Figura 20. Aislados de *Moniliophthora perniciosa* de 25 días de edad, creciendo con 2 aspectos miceliales en una misma placa Petri. Las flechas rojas indican zonas de un aspecto de micelio de crecimiento disperso y lento, que presentaron abundancia de fíbulas. Las flechas de color azul indican zonas con un aspecto de micelio de crecimiento uniforme, abundante y mucho más rápido; donde se observó escasa presencia de fíbulas. **a.** y **b.** Anverso y reverso del aislado MEB5. **c.** y **d.** Anverso y reverso del aislado MEB29.

3.2.3. Descripción de características microscópicas

A los 10 días de incubación en cámara de micro cultivo todos los aislados presentaron micelio hialino y ramificado que varió entre 1 y 3,8 μm de grosor. Se observó presencia de fíbulas en los 44 aislados (Fig. 21a-b) y formación de hifas hinchadas tipo clamidosporas de 5-7 μm de diámetro (Fig. 21c-d) en 13 de los 44 aislados evaluados (Tabla 14). El tamaño de las fíbulas fue variable y estuvo relacionado directamente al grosor del micelio donde se formaron.

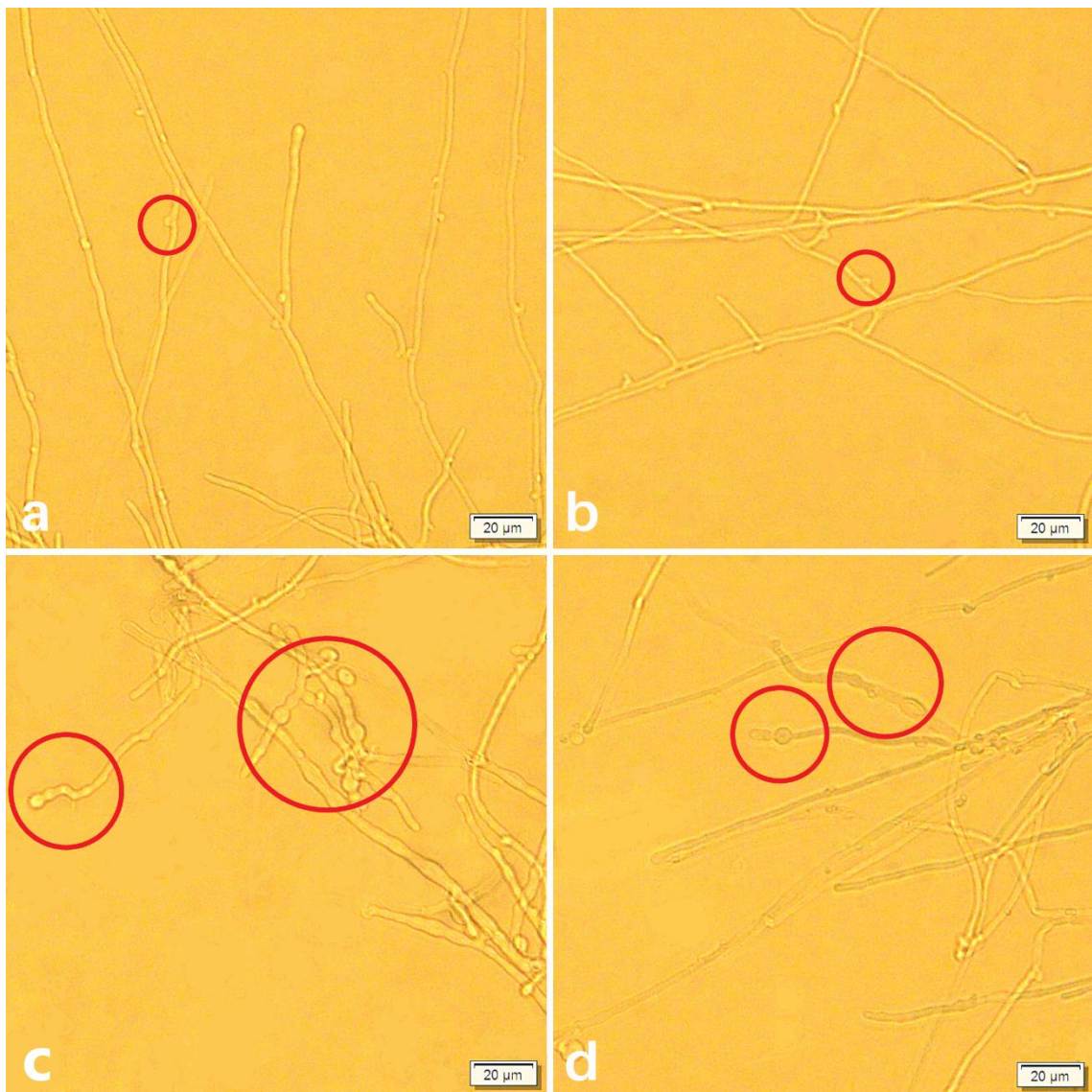


Figura 21. Características microscópicas (círculos rojos) observadas en *M. perniciosus* a los diez días en microcultivo. **a. y b.** Fíbulas, observadas en los 44 aislados evaluados. **c. y d.** Hifas hinchadas tipo clamidosporas, observadas en 13 aislados, en condiciones de microcultivo.

Tabla 14*Características microscópicas observadas en los 44 aislados de M. pernicioso.*

Distrito	Código de aislado	Presencia de fíbulas	Hifas hinchadas tipo clamidosporas	Diametro de micelio en μm	
Aramango	MEB1	sí	-----	1,71 - 2,83	
	MEB2	sí	-----	1,75 - 3,05	
	MEB3	sí	-----	2,50 - 3,34	
	MEB34	sí	-----	1,27 - 2,68	
Imaza	MEB4	sí	sí	2,24 - 3,49	
	MEB5	sí	sí	1,68 - 2,96	
	MEB6	sí	-----	1,57 - 2,74	
	MEB7	sí	sí	1,94 - 2,55	
	MEB8	sí	-----	1,66 - 2,63	
	MEB9	sí	sí	1,71 - 2,84	
	MEB10	sí	-----	1,36 - 2,71	
	MEB11	sí	si	1,83 - 2,85	
	MEB12	sí	-----	1,65 - 2,87	
	MEB13	sí	sí	2,13 - 3,00	
	MEB14	sí	-----	1,83 - 3,39	
	MEB15	sí	sí	1,83 - 2,83	
	MEB16	sí	sí	1,71 - 2,86	
	MEB17	sí	sí	1,37 - 2,32	
	MEB18	sí	sí	1,88 - 2,66	
	MEB19	sí	-----	1,65 - 3,06	
	MEB20	sí	-----	1,84 - 2,68	
	MEB21	sí	sí	1,17 - 3,26	
	MEB22	sí	sí	1,83 - 3,15	
	MEB23	sí	-----	1,79 - 2,75	
	MEB24	sí	-----	1,20 - 3,06	
	MEB25	sí	-----	1,51 - 2,95	
	MEB26	sí	-----	1,33 - 2,83	
	MEB27	sí	-----	1,70 - 2,83	
	MEB28	sí	sí	1,17 - 3,27	
	MEB29	sí	-----	1,37 - 2,53	
	MEB30	sí	-----	1,90 - 2,75	
	MEB31	sí	-----	1,17 - 3,13	
	MEB32	sí	-----	1,50 - 2,50	
	MEB33	sí	-----	1,51 - 2,63	
	Copallín	MEB35	sí	-----	1,49 - 3,20
		MEB36	sí	-----	1,37 - 3,00
		MEB37	sí	-----	1,51 - 2,82
MEB52		sí	-----	1,69 - 2,63	
Bagua	MEB39	sí	-----	1,05 - 3,06	
La Peca	MEB40	sí	-----	1,33 - 3,07	
	MEB41	sí	-----	2,13 - 3,80	
	MEB42	sí	-----	1,27 - 3,16	
	MEB43	sí	-----	1,27 - 3,37	
El parco	MEB44	sí	-----	1,37 - 2,68	

3.3. Caracterización molecular de aislados de *Moniliophthora perniciosa*

3.3.1. Identificación y análisis filogenético

Se obtuvieron secuencias de las regiones ITS, LSU y SSU, de 44 aislados de *Moniliophthora perniciosa*. Todas correspondientes a aislados provenientes de los 6 distritos de la Provincia de Bagua: 30 de Imaza, 4 de Aramango, 4 de La Peca, 4 de Copallín, 1 de Bagua, y 1 del Parco (Tabla 2). Las 44 secuencias ITS compartieron similitud de secuencias en un 100 %, (cobertura de consulta al 99 y 100 %) con secuencias de la base de datos del NCBI. Los códigos de acceso de secuencias con las que se compartió identidad fueron, AF335590, MH861049, AY176316, MF495374. El árbol filogenético mostró todas las secuencias agrupadas en un solo clado con soporte de 99 % en el análisis bootstrap, con un mínimo grado de polimorfismo (Fig. 22). Los 44 haplotipos se agruparon junto a las secuencias de *M. perniciosa* AF335590, MH861049, AY176316 y KX913250, MF495374, disponibles en la base de datos del NCBI, incluidas para el análisis filogenético.

Cuarenta y dos (42) secuencias de LSU, compartieron similitud en un 100 % con la secuencia AY916742, y 2 secuencias (MEB40 y MEB42) en un 99,89 % (cobertura de búsqueda del 100 %). Estas dos últimas se diferenciaron de las demás por la presencia de una adenina adicional en su secuencia. El árbol filogenético no mostró diferencias para ningunos de los haplotipos (Fig. 23). Los 44 formaron un clado bien soportado (100 % en el análisis bootstrap), junto a las secuencias AY916742, MK785250, AY916768 y AY916737 que fueron incluidas en el análisis filogenético (Fig. 23).

Resultados similares se obtuvieron con las 44 secuencias SSU, que compartieron similitud de secuencias en un 100 % con la secuencia AY916739 del NCBI (Cobertura de búsqueda al 99 y 100 %). Asimismo, el árbol filogenético no mostro diferencias entre haplotipos. Todos formaron un sólo clado (100 % en el análisis bootstrap) junto las secuencias AY916739, MG717342, incluidas para el análisis filogenético (Fig. 24).

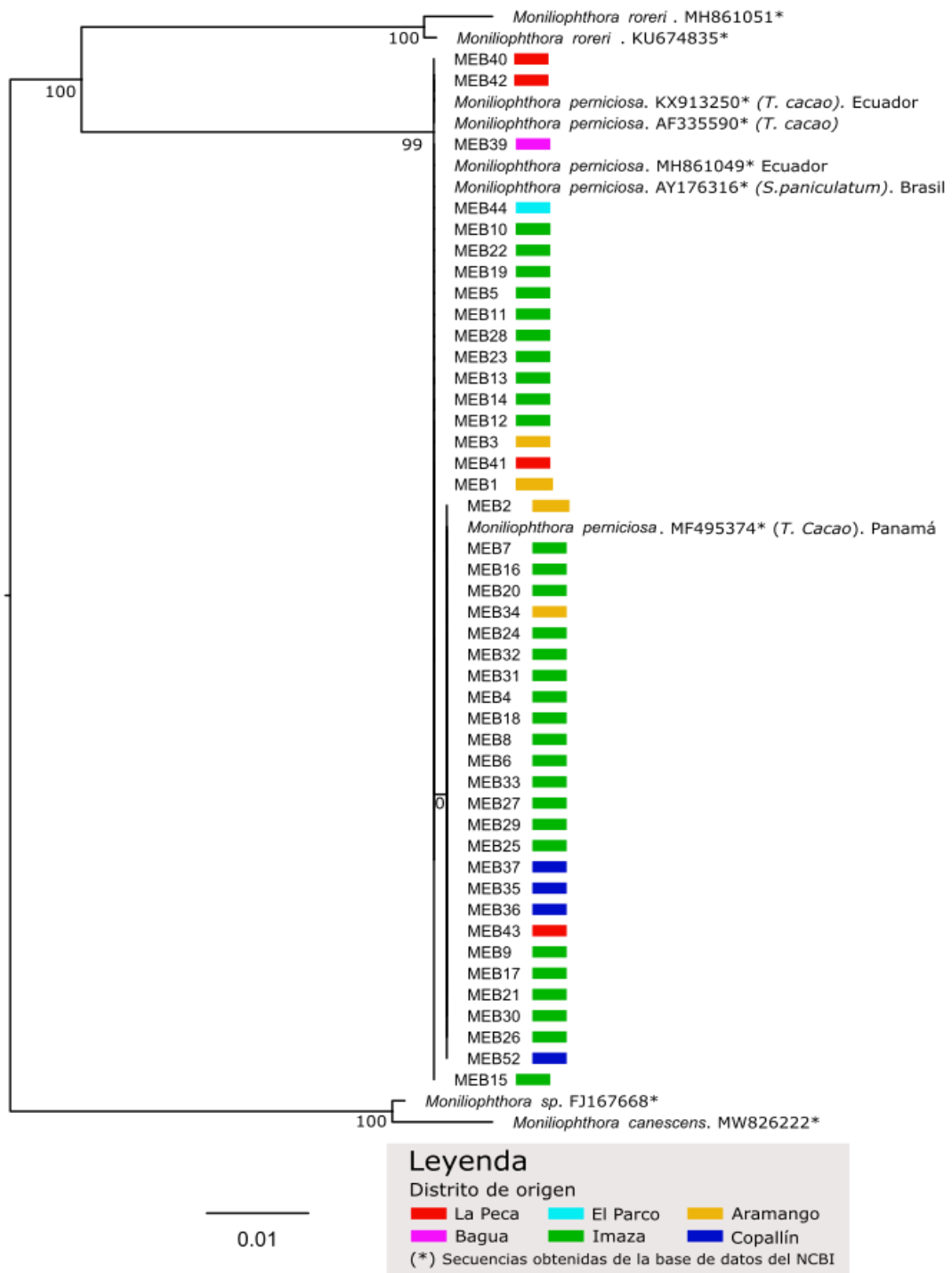
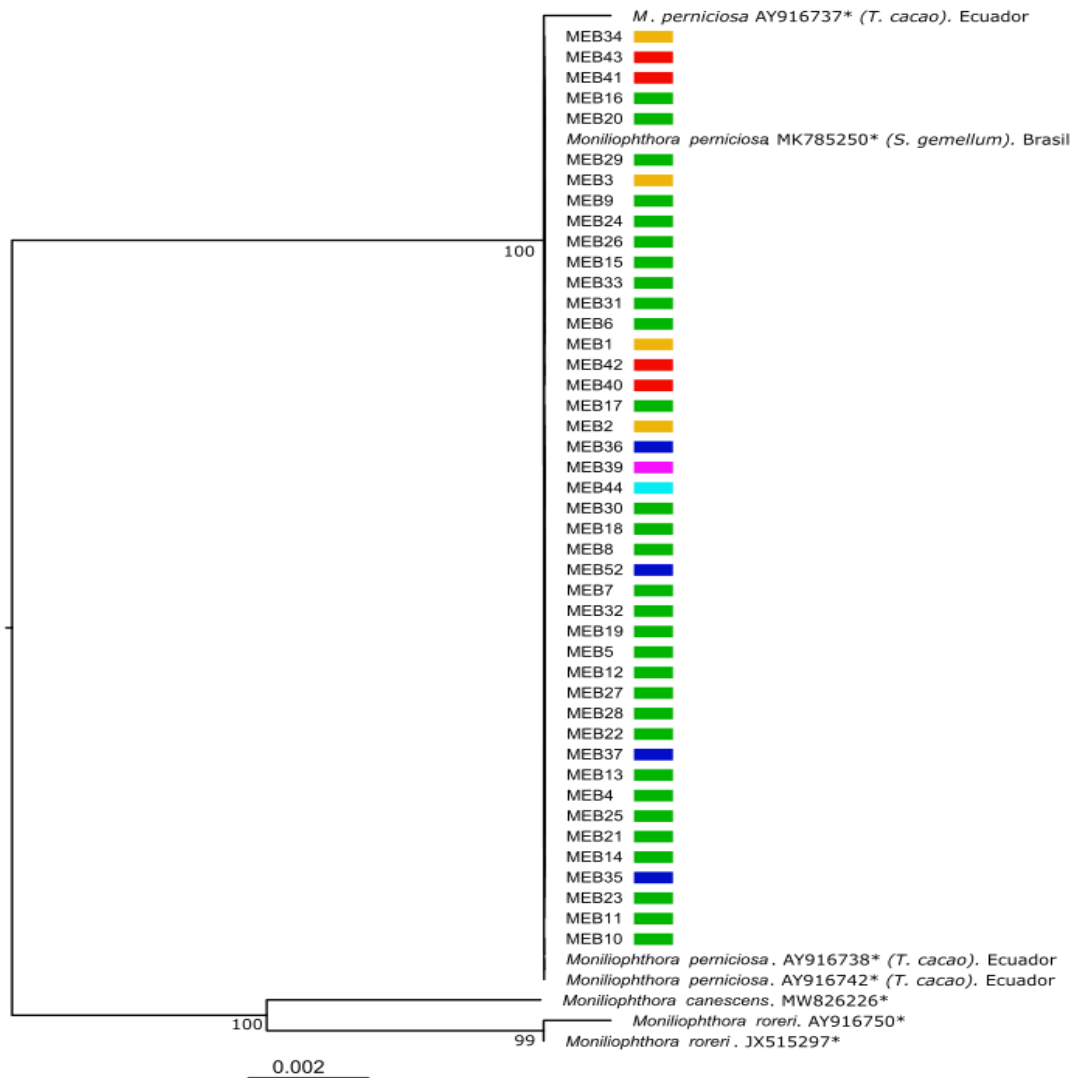


Figura 22. Árbol filogenético construido a partir de secuencias ITS de *M. pernicioso* usando el método de máxima verosimilitud. Los rectángulos de colores al lado de los códigos de cada aislado indican la procedencia geográfica de los haplotipos de este estudio. Todas las secuencias que tienen un asterisco (*) corresponden a secuencias disponibles en base de datos del NCBI, y el código que lo acompaña es el número de acceso. Los números debajo de los nodos del que parten los clados corresponden al valor obtenido del análisis Bootstrap.



Leyenda
 Distrito de origen
 La Peca El Parco Aramango
 Bagua Imaza Copallín
 (*) Secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI

Figura 23. Árbol filogenético construido a partir de secuencias LSU de *M. perniciosa* usando el método de máxima verosimilitud. Los rectángulos de colores al lado de los códigos de cada aislado indican la procedencia geográfica de los haplotipos de este estudio. Todas las secuencias que tienen un asterisco (*) corresponden a secuencias disponibles en base de datos del NCBI, y el código que lo acompaña es el número de acceso. Los números debajo de los nodos del que parten los clados corresponden al valor obtenido del análisis Bootstrap.

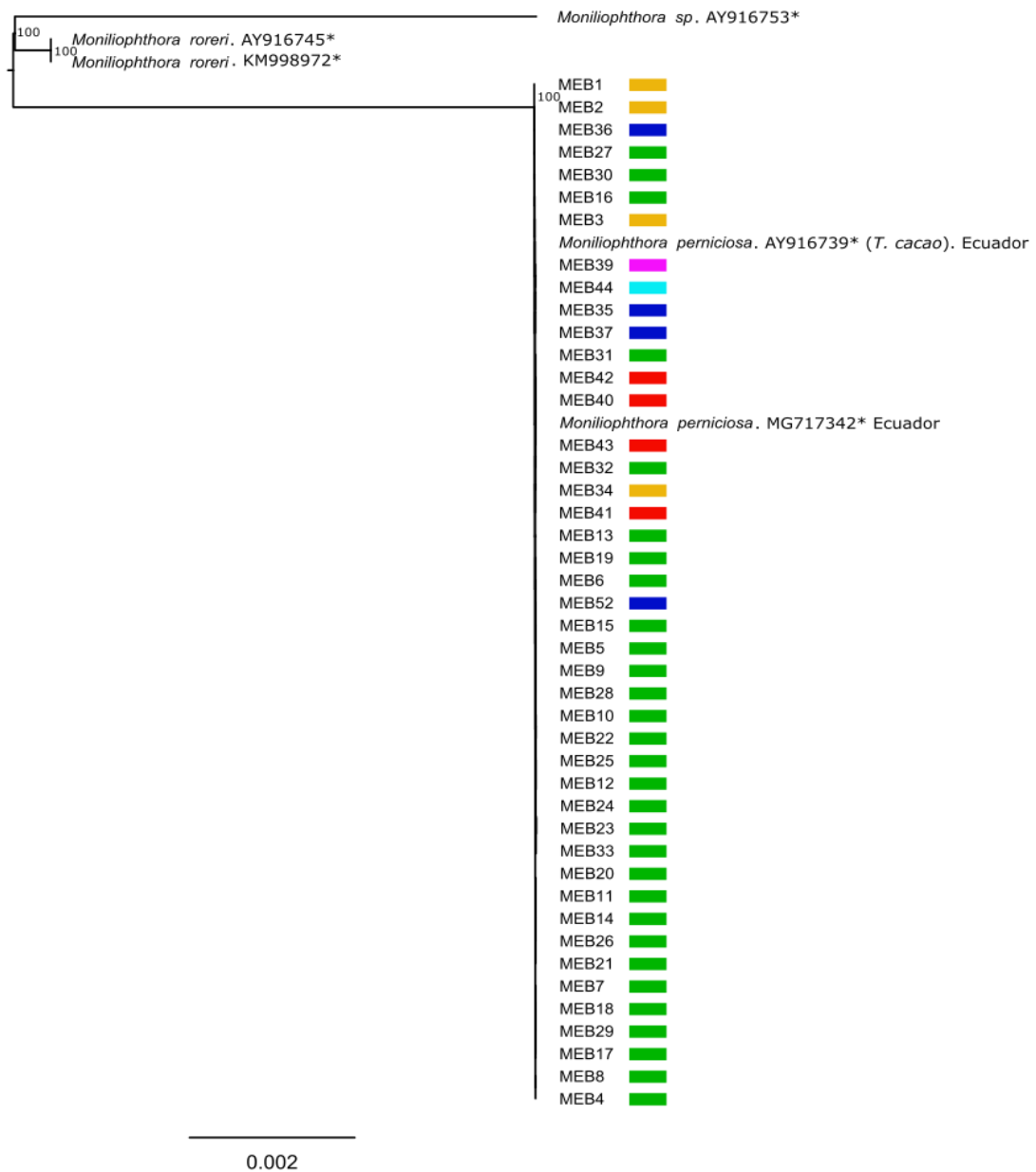


Figura 24. Árbol filogenético construido a partir de secuencias SSU de *M. perniciososa* usando el método de máxima verosimilitud. Los rectángulos de colores al lado de los códigos de cada aislado indican la procedencia geográfica de los haplotipos de este estudio. Todas las secuencias que tienen un asterisco (*) corresponden a secuencias disponibles en base de datos del NCBI, y el código que lo acompaña es el número de acceso. Los números debajo de los nodos del que parten los clados corresponden al valor obtenido del análisis Bootstrap.

3.4. Evaluación de diversidad genética en aislados de *Moniliophthora perniciosa*

3.4.1. Polimorfismo alélico en marcadores microsatélite SSR

El análisis de los 11 marcadores moleculares microsatélites mostró la existencia de polimorfismo alélico de tamaño, en la población de *M. perniciosa* evaluada. Seis loci (*MsCepec_15*, *MsCepec_19*, *MsCepec_45*, *mMpCena4*, *mMpCena8*, *mMpCena19*) fueron polimórficos sin ambigüedades, cuatro loci (*MsCepec_16*, *mMpCena11*, *mMpCena12*, *mMpCena26*) fueron monomórficos no informativos y el *MsCepec_14* se consideró polimórfico con ambigüedad debido a la falta de datos para dos aislados (MEB27, MEB31), situación que lo colocó frente a dos posibilidades, tener el alelo o no tenerlo (i.e. alelo nulo). Asimismo, se observó la ocurrencia de loci homocigotos y heterocigotos. La gran mayoría de aislados fueron homocigotos para casi todos los loci, a excepción de algunos donde se observó heterocigosidad para los loci *mMpCena8* y *MsCepec_45*. Los aislados MEB12, MEB18, MEB20, MEB26 colectados en el distrito de Imaza, fueron heterocigotos para *mMpCena8*; y los aislados MEB11, MEB19 (distrito de Imaza), y MEB55 (Condorcanqui) lo fueron para *MsCepec_45*.

3.4.2. Diversidad genética

En total se identificaron 19 genotipos multilocus (MLG) que agruparon a los 50 aislados analizados. A nivel poblacional, los aislados de Aramango presentaron 4 genotipos multilocus, los de Imaza 10, los de Copallín 2, los de La Peca 3, los de Condorcanqui 3, y los aislados agrupados de los distritos de Bagua, el Parco y la provincia de Utcubamba 3 (Fig. 25).

Los indicadores de diversidad demostraron la existencia de diversidad genética en las 6 poblaciones evaluadas. Los resultados del análisis de diversidad alélica sin la corrección de clones (Tabla 15) mostraron valores de heterocigosidad esperada o índice de Nei (H_{exp}) total de 0,16. A nivel de poblaciones el valor más alto lo obtuvo Condorcanqui (0,25), seguido de Aramango (0,18), mientras que Copallín obtuvo el valor más bajo (0,04). La diversidad genotípica según la índice diversidad de Shannon-Weiner (H), mostró un valor total de 2,36, y a nivel de poblaciones los valores más altos lo obtuvieron Imaza (1,65), Aramango (1,39) y Condorcanqui (1,10). El índice total de diversidad de Simpson (λ) fue de 0,83, y a nivel de poblaciones los valores más altos lo obtuvieron Aramango (0,75), Imaza (0,68) y Condorcanqui (0,67). El índice de diversidad de Stoddard y Taylor (G), mostró un valor total de 6,04, y a nivel de poblaciones los valores

más altos correspondieron a Aramango (4,0), Imaza (3,15) y Condorcanqui (3,0). En los tres índices de diversidad evaluados, la población de La Peca, la Población de Bagua, El Parco y Utcubamba agrupados, y la población de Copallín, presentaron los índices de diversidad más bajos, siendo Copallín la población que obtuvo los valores más bajos en los tres índices evaluados (Tabla 15).

Los resultados para el análisis de datos con corrección de clones (Tabla 15) mostraron un valor total de H_{exp} igual a 0,22, y a nivel a de poblaciones el valor más alto lo obtuvo Condorcanqui (0,25), seguido de Imaza (0,23); Copallín obtuvo el valor más bajo (0,06). El índice de Shannon-Weiner (H) fue de 2,84 para el total de aislados, y a nivel de poblaciones Imaza (2,30) y Aramango (1,39) obtuvieron los valores más altos. El índice total de diversidad de Simpson (λ) fue de 0,93, y a nivel de poblaciones Imaza (0,90) y Aramango (0,75) obtuvieron los valores más altos. Al igual que en los índices (H) y (λ), el índice de diversidad de Stoddard y Taylor (G), también se incrementó alcanzando un valor total de 15,20, y las poblaciones de Imaza (10) y Aramango (4), obtuvieron los valores más altos. La Peca, Condorcanqui, y los aislados agrupados en la población de Bagua, El Parco y Utcubamba obtuvieron los mismos valores (1,10; 0,67; 3,00) para los índices de diversidad (H), (λ) y (G) respectivamente, sin embargo, por la diversidad alélica observada mediante en el índice de Nei, fue Condorcanqui la población con mayor diversidad, seguido de La Peca y los distritos agrupados en la población de Bagua, El Parco y Utcubamba. Copallín obtuvo el índice de diversidad más bajo en los tres índices de diversidad evaluados.

Tabla 15

Tabla de diversidad por población.

Población	Sin corrección de clones						Con corrección de clones					
	N	MLG	Hexp	H	lambda	G	N	MLG	Hexp	H	lambda	G
Aramango	4	4	0.18	1.39	0.75	4.00	4	4	0.18	1.39	0.75	4.00
Imaza	30	10	0.12	1.65	0.68	3.15	10	10	0.23	2.30	0.90	10.00
Copallín	4	2	0.04	0.56	0.38	1.60	2	2	0.06	0.69	0.50	2.00
Bagua, El Parco y Utcubamba	4	3	0.14	1.04	0.63	2.67	3	3	0.17	1.10	0.67	3.00
La Peca	5	3	0.15	0.95	0.56	2.27	3	3	0.19	1.10	0.67	3.00
Condorcanqui	3	3	0.25	1.10	0.67	3.00	3	3	0.25	1.10	0.67	3.00
Total	50	19	0.16	2.36	0.83	6.04	25	19	0.22	2.84	0.93	15.20

Nota: N = Número de aislados; MLG = Genotipos multilocus; H_{exp} = Diversidad de Nei (Heterocigosidad esperada); H = Diversidad de Shannon-Weiner; lambda = Diversidad de Simpson; G = Diversidad de Stoddard y Taylor.

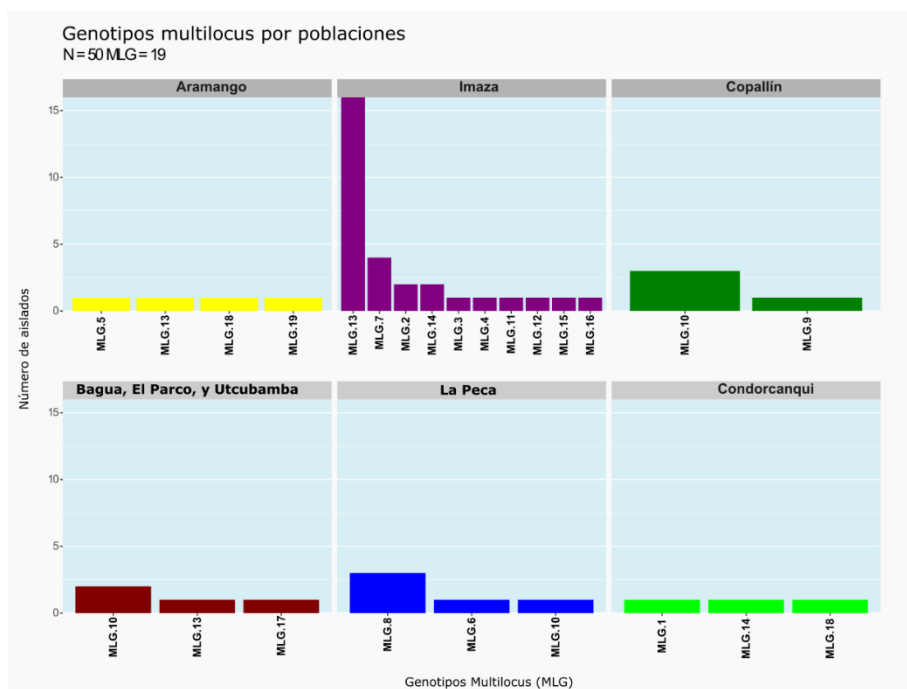


Figura 25. Genotipos multilocus (MLG) por poblaciones. Cada población está representada por un color. La altura de barras indica la cantidad de haplotipos por genotipo multilocus.

La curva de genotipos multilocus respecto al número de marcadores moleculares o loci utilizados indicó que el número de genotipos multilocus aumentaría si se trabajara con un mayor número de marcadores (Fig. 26). De los 11 marcadores moleculares utilizados, 6 fueron los más informativos, que llevaron a la asignación de 19 genotipos multilocus para los 50 aislados evaluados.

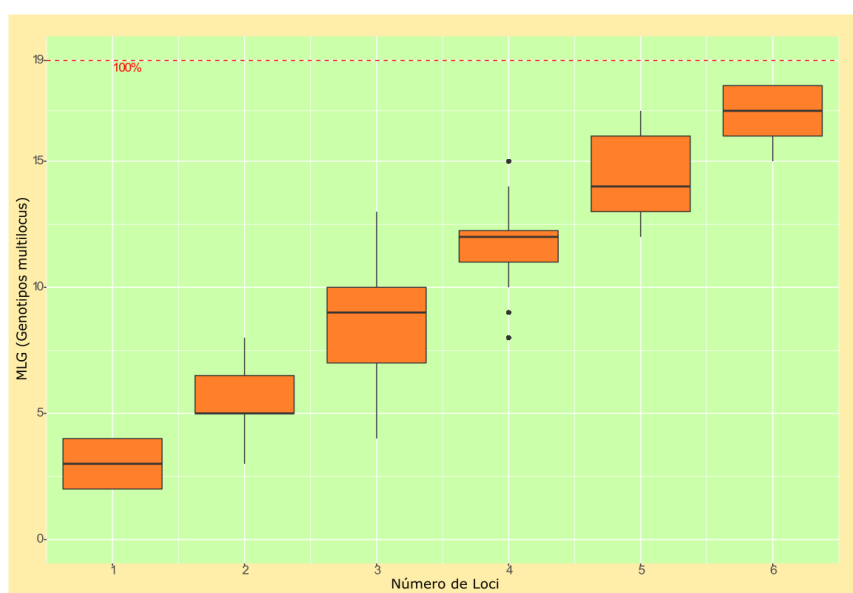


Figura 26. Curva de genotipos multilocus respecto al número de loci más informativos.

3.4.3. Red mínima de expansión

La red mínima de expansión de genotipos multilocus sin corrección de clones mostró que 12 aislados correspondieron a genotipos multilocus únicos, y los 38 restantes compartieron genotipos con uno a más aislamientos, y formaron parte de los 7 genotipos multilocus compartidos (Fig. 27). La gran mayoría de genotipos multilocus fueron únicos para cada población, a excepción de 4 que fueron compartidos por más de una población: el MLG.10 fue compartido por 6 aislados (3 de Copallín, 1 de la Peca, 1 del distrito Bagua y 1 de Utcubamba); el MLG.13 por 18 aislados (16 de Imaza, 1 de Aramango, y 1 de Utcubamba); el MLG.14, por 3 aislados (2 de Imaza, y 1 de Condorcanqui); y el MLG.18, por 2 aislados (1 de Aramango y 1 de Condorcanqui).

Los aislados de Imaza se extendieron por toda la red mínima de expansión, encontrándose genotipos de esta población en los tres extremos de la red. Sin embargo, más del 50 % coincidieron en la parte céntrica de la Red (MLG.13) (Fig. 27). Los aislados de Aramango y Condorcanqui presentaron buena distribución en la red, y presentaron genotipos multilocus únicos, es decir, no se encontraron clones en estos lugares. Los aislados de Copallín, La Peca, y los aislados agrupados en la población de Bagua, el Parco y Utcubamba presentaron la distribución más baja, formando parte de solo 6 genotipos multilocus entre todos ellos (Fig. 27).

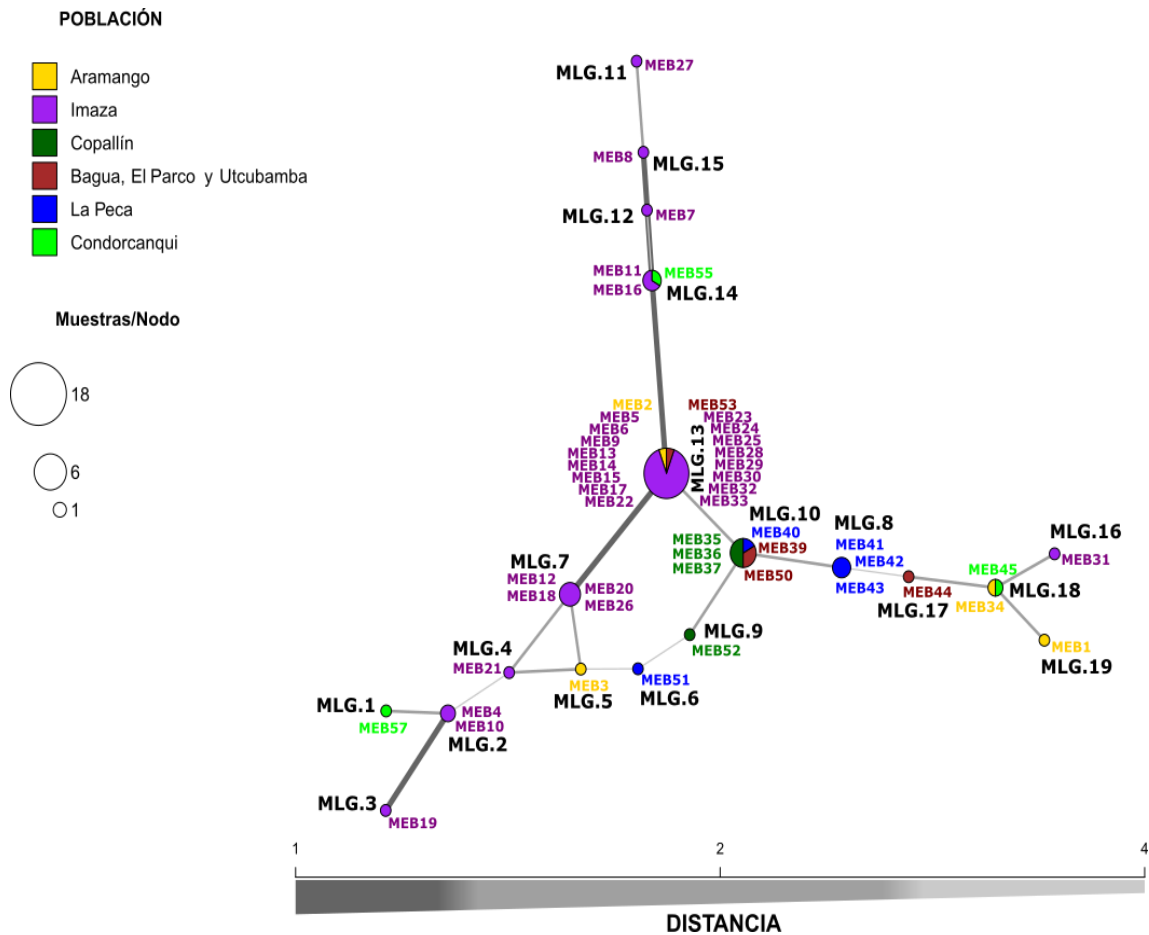


Figura 27. Red mínima de expansión, basado en el porcentaje de distancia de disimilitud alélica. Cada nodo representa un genotipo multilocus (MLG), que van desde MLG.1 hasta MLG.19. Los genotipos multilocus de nodos sin divisiones corresponden a un solo aislado, y los que presentan nodos con divisiones corresponden a haplotipos (aislados) de más de una población. El tamaño del nodo, responde al número de haplotipos por genotipo multilocus. Los códigos MEB cercanos a cada nodo indican el código de cada aislado que presenta dicho MLG. Cada población está indicada por colores.

3.4.4. Índice de asociación

El análisis de datos sin corrección de clones, mostró valores de índice de asociación (I_A) e índice de asociación estandarizado (\bar{r}_d) ($I_A = 0,4887$, $\bar{r}_d = 0,0863$) altamente significativos ($p = 0,000999$) (Fig.28), indicando un desequilibrio de ligamiento.

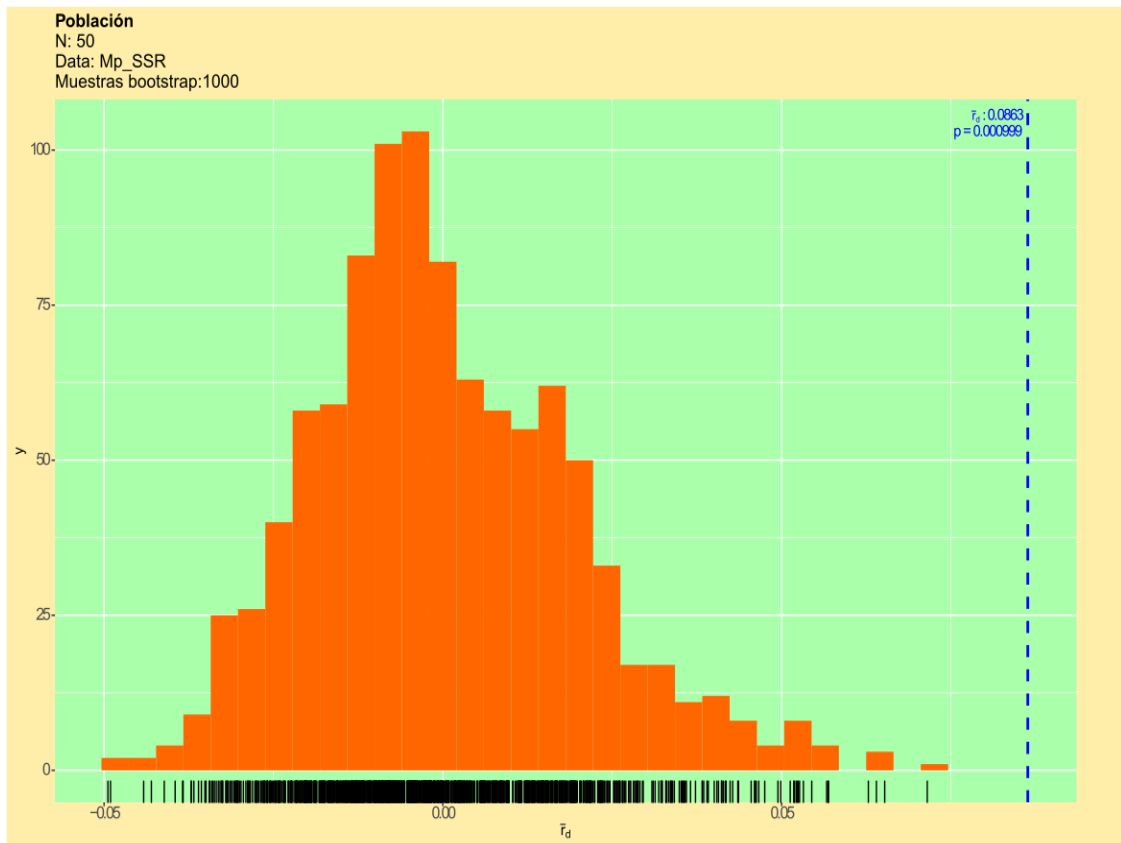


Figura 28. Gráfica de índice de asociación sin corrección de clones. Se compara el valor del Índice de asociación estandarizado \bar{r}_d (línea punteada azul) con histogramas que muestran los resultados de 1000 permutaciones aleatorias.

Los resultados para el análisis con corrección clonal (Fig. 29) mostraron un índice de asociación ($I_A = 0,0727$) e índice de asociación estandarizado ($\bar{r}_d = 0,0124$) no significativos ($p = 0,27$), indicando la existencia de equilibrio de ligamiento (apareamiento aleatorio), demostrando así la ocurrencia de recombinación genética mediante reproducción sexual cruzada.

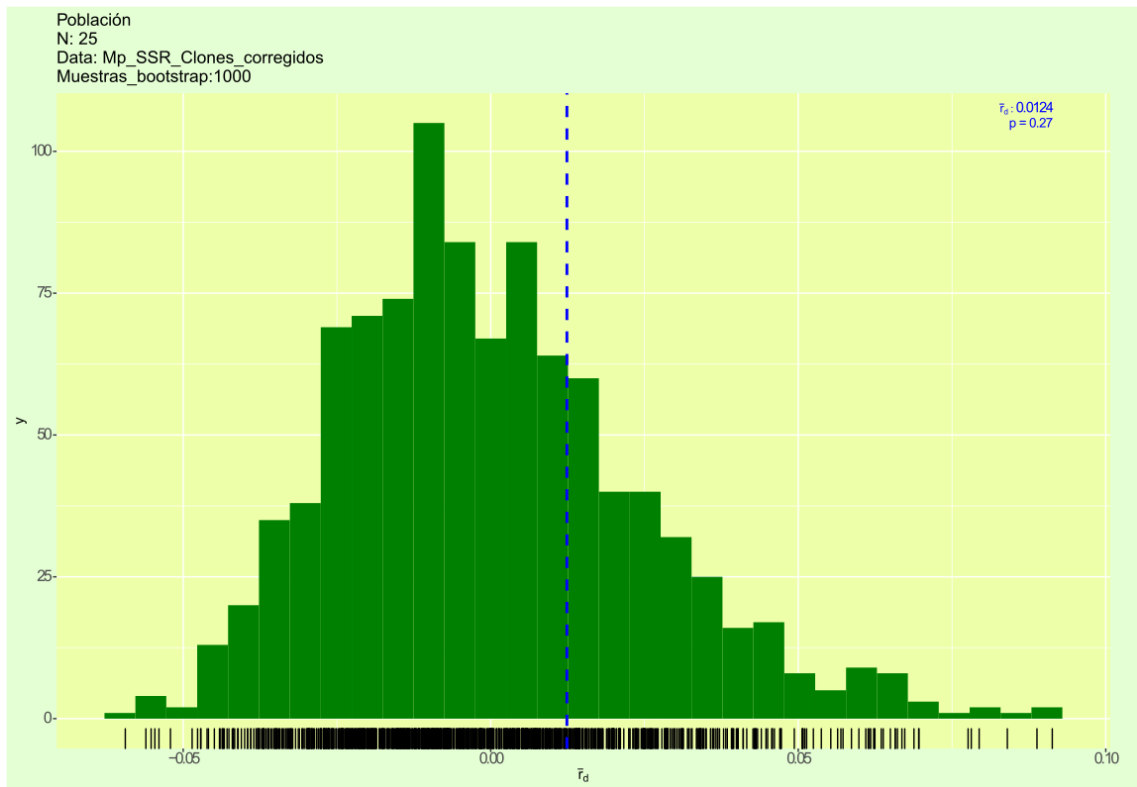


Figura 29. Gráfica de índice de asociación con corrección de clones. Se compara el valor del Índice de asociación estandarizado \bar{r}_d (línea punteada azul) con histogramas que muestran los resultados de 1000 permutaciones aleatorias.

IV. DISCUSIÓN

Zonas cacaoteras con síntomas de presencia de *Moniliophthora perniciosa*

Se encontró la presencia de *M. perniciosa* en el 100 % de unidades productivas evaluadas. Sin embargo, el porcentaje de incidencia a nivel de distritos fue altamente variable. Tovar (1991) refiere que el nivel de incidencia de *M. perniciosa* en cacao está sujeto a un conjunto de factores que influyen en el desarrollo de la infección tales como: la presión de inóculo, la genética de las plantaciones, fenología del cultivo, manejo agronómico y condiciones ambientales. Por su parte, Maddison et al. (1995) menciona que la agresividad de *M. perniciosa* está estrechamente relacionada con las condiciones climáticas que favorecen el desarrollo de infección, principalmente la duración e intensidad del periodo húmedo a lo largo del año.

Las condiciones climáticas juegan un papel importante en el comportamiento de *M. perniciosa*, y determinan los picos de producción de escobas a lo largo del año. La infección de *M. perniciosa* principalmente inicia con la estación lluviosa y alcanza los picos de producción de escobas más altos en la estación seca (Tovar et al., 1991). Se sabe que *M. perniciosa* necesita periodos alternos de sequía y humedad, para fructificar y producir sus basidiosporas. Sin embargo, es la humedad el factor indispensable que desencadena el proceso de fructificación, además, facilita la liberación y dispersión de esporas para dar inicio a la infección (Tovar , 1991). Por lo tanto, resulta fundamental conocer las condiciones climáticas de un área de estudio para comprender los niveles de incidencia de *M. perniciosa* en un cacaotal.

La provincia de Bagua se encuentra ubicada en zona de ceja de selva y presenta condiciones climáticas variables a lo largo de todo su territorio. Aunque en la actualidad no se cuenta con Estaciones Meteorológicas (EMs) activas en todos los distritos, existen registros de precipitación, temperatura y otros elementos meteorológicos para los periodos de 1999-2003 de EMs en Bagua y Aramango, y para el periodo de 1967-1971 de la Estación Meteorológica (EM) de Imacita (Imaza). Gracias a esta información, Vargas (2010) clasificó como un clima seco y cálido el entorno de la EM Bagua; ligeramente húmedo y cálido el entorno de la EM Aramango; y super húmedo y cálido el entorno de la EM de Imacita (Imaza) (Tabla 16).

Tabla 16

Condiciones climáticas relacionado al porcentaje de incidencia de cada distrito.

Distrito	Clima*	Precipitación (mm/año) *	Temperatura (Promedio/año) *	Incidencia de <i>M. perniciosa</i> (%)
Imaza	Super húmedo y cálido	3013,3	24,7 °C	74,3
Aramango	Muy húmedo y cálido	1748,7	24,3 °C	97,5
Copallín	_____	_____	_____	80,0
La Peca	_____	_____	_____	72,5
Bagua	Seco y cálido	673,5	26,3 °C	30,0
El Parco	_____	_____	_____	10,0

(*)Información extraída de Vargas (2010).

No se cuenta con registros de precipitación, temperatura y clasificación climática documentada para los distritos de La Peca, Copallín, y El Parco. No obstante, en base a los registros y clasificación climática antes mencionada, más las observaciones realizadas en campo, se asume que zonas por encima de los 1000 m.s.n.m en Copallín, y sobre los 800 m.s.n.m en la Peca, comparten condiciones climáticas similares al registrado para el entorno de la EM de Aramango. Zonas por debajo de estas altitudes, muy probablemente presenten un clima semihúmedo y cálido, con un pequeño déficit de agua, en los meses de agosto, setiembre y octubre. El distrito de El Parco comparte condiciones climáticas muy parecidas con el distrito de Bagua, por lo que se adopta la clasificación climática del distrito de Bagua Vargas (2010), para describir el clima de El Parco.

Es notable la estrecha relación de los índices de precipitación con los porcentajes de incidencia de *M. perniciosa* encontrados, teniendo en cuenta que los distritos que presentaron mayor incidencia (Aramango, Copallín, Imaza y La Peca), corresponden a zonas de climas húmedos con un total de precipitación por encima de los 1700 mm/año; y los distritos con un porcentaje de incidencia más bajo (El Parco y Bagua) responden a climas secos, con niveles de precipitación inferiores a los 700 mm/año. Similares resultados se encontraron en un estudio realizado en Brasil entre el 2002 y el 2005, en el cual se reportan diferencias significativas en el nivel de incidencia de escobas de bruja en

frutos y cojines florales, principalmente en el año 2003, causadas por el elevado índice de precipitaciones registradas (1382 mm) en solo seis meses, lo que habría provocado mayor formación de basidiocarpos, y por ende una mayor cantidad de inóculo que ejerció una gran presión del patógeno en las plantaciones de cacao (De Almeida et al., 2009).

En Quevedo, Ecuador se evaluó la importancia de la producción de cacao en la estación seca para evadir la infección de *M. pernicioso* y *M. royeri* (Maddison et al., 1995). Se encontró una reducción drástica de mazorcas de cacao afectadas por *M. pernicioso* en periodos de estación seca comparado a las pérdidas encontradas en estaciones lluviosas (Maddison et al., 1995). Resultados que ampliamente coinciden con los resultados encontrados para los distritos de clima seco y cálido (Bagua y La Peca; precipitación menor a 700 mm/año y una temperatura promedio anual de alrededor de 26,3 °C) que presentaron los porcentajes de incidencia más bajos. Esto probablemente debido a que las condiciones ambientales de un clima seco y cálido no estarían favoreciendo la producción óptima de basidiocarpos, y por ende la carga de inóculo inicial.

Es evidente, que la producción de basidiocarpos es una de las etapas más importantes del ciclo de la enfermedad, ya que es donde se produce las basidiosporas, el único tipo de esporas capaces de producir infección en los tejidos meristemáticos del cacao (Rocha & Wheeler, 1985). La temperatura no es un factor limitante para la producción de basidiocarpos en toda la provincia de Bagua, ya que esta ocurre en un amplio rango de temperaturas (Tovar, 1991). Sin embargo, la producción de basidiocarpos será óptima siempre y cuando exista periodos alternos de humedad (Pires et al., 2009), pues estos periodos favorecen la germinación de estructuras de resistencia similares a clamidosporas presente en las escobas necrosadas (Tovar et al., 1991). Este escenario no estaría ocurriendo de manera óptima en los distritos de Bagua y El Parco, únicos distritos donde no se logró encontrar cuerpos fructíferos del hongo al momento de la evaluación.

El material genético de las plantaciones también influye en la incidencia de *M. pernicioso* (Meinhardt et al., 2008; Sena et al., 2014; Tovar, 1991). La resistencia y tolerancia a *M. pernicioso* son características genéticas reportadas en diferentes genotipos de cacao (Castro et al., 2015; De Almeida et al., 2009; Sena et al., 2014; Shaw & Vandenberg, 2007). En la provincia de Bagua existe una gran diversidad genética de cacao, y prevalecen variedades de cacaos criollos, forasteros y trinitarios (MINAGRI, 2009),

donde probablemente existan clones nativos con niveles promisorios de resistencia, que de alguna manera pueden haber influido en los porcentajes de incidencia encontrados. Si bien es cierto no se tomó registro de los clones de cacao presentes en las unidades productivas evaluadas, el 95,4 % de estas fueron policlonales, a excepción del 4,6 % donde se evaluó unidades productivas con el 100 % de clones CCN-51, ubicadas en los distritos de Imaza y Aramango. El Perú es uno de los países donde se han reportado varios genotipos con tolerancia y resistencia a *M. pernicioso* (García, 2010). Tal es el caso de las accesiones SCA6 y SCA12, de las más utilizadas en los programas de mejoramiento genético “SCAVINO”, y según la base de datos internacional de germoplasma de cacao, más de 300 clones mejorados, tienen contribución parental directa de estos dos clones (Meinhardt et al., 2008). Asimismo un estudio reciente realizado en la región San Martín, evaluó la incidencia de escoba de bruja en 20 accesiones silvestres provenientes de las cuencas de los Ríos Santiago y Morona, encontrándose diferencias significativas en los porcentajes de incidencia y niveles sobresalientes de resistencia en cuatro genotipos (Fernández, 2018). Probablemente, estos genotipos no se encuentren como clones en las zonas evaluadas. Sin embargo, teniendo en cuenta la relativa cercanía con estas cuencas, y el constante intercambio de semillas botánicas entre comunidades indígenas, es posible la existencia de genotipos con ascendencia genética de genotipos resistentes.

El manejo agronómico es otro de los factores influyentes en el nivel de incidencia, principalmente a través de podas de mantenimiento y podas fitosanitarias (Jaimes & Aranzzu, 2010). Cuando la infección existe en el cultivo, el nivel de incidencia aumenta de un año a otro si los tejidos infectados no son removidos. Una escoba permanente en la planta significa el incremento de inóculo, ya que posteriormente fructificará y provocará la infección de nuevos tejidos. Cada escoba puede llegar a producir hasta 2,5 escobas nuevas cada año (Tovar et al., 1991). Por lo tanto, la remoción de escobas en campo es clave para su control y su baja incidencia en las siguientes campañas.

En toda la provincia existe una gran diferencia respecto al manejo agronómico del cultivo. Las plantaciones pertenecientes a comunidades nativas de Aramango e Imaza presentan un deficiente manejo agronómico, comparado a plantaciones conducidas por gran parte de agricultores de zonas mestizas. Imaza es un claro ejemplo, donde se encontró un alto grado de incidencia en UP administradas por comunidades nativas, y un bajo nivel de incidencia en sectores mestizos. Esto se debe probablemente a que en los sectores

mestizos la gran mayoría de unidades productivas son de interés comercial y están compuestas por clones mejorados como el CCN51, y los agricultores refieren que estas son podadas como mínimo 2 veces al año. Además, el uso de fertilizantes y plaguicidas en el cultivo es frecuente. Las UP administradas por pobladores nativos generalmente son pequeñas, y con frecuencia presentan un deficiente manejo agronómico, posiblemente debido a que el poblador indígena tiene por cultura, como fuente principal de sustento la caza, y no la agricultura. Asimismo, vale mencionar hallazgos atípicos encontrados en UPs de todo Imaza, principalmente en árboles de cacao CCN-51, donde el nivel de incidencia de *M. pernicioso* fue notablemente bajo, comparado a la incidencia encontrada en la misma variedad en el resto de distritos.

Caracterización macro y micro morfológica

Uno de los factores que afecta el potencial de crecimiento de algunos hongos sub cultivados en condiciones de laboratorio es la senescencia, debido a la presencia de plásmidos en las mitocondrias (Griffiths, 1992). El genoma mitocondrial de *M. pernicioso* no es ajeno a la presencia de plásmidos. Se ha reportado la inserción de un plásmido lineal en el ADN mitocondrial de *M. pernicioso* (Formighieri et al., 2008), pero esta fue localizada en una sola posición de la secuencia, por lo que los autores no encontraron suficientes pruebas para atribuir a este como el causal del envejecimiento de aislados de *M. pernicioso*. Sin embargo, a pesar de haber observado varios síntomas característicos de envejecimiento en aislados que en un inicio mostraron un aspecto de micelio liso y blanco de crecimiento continuo, luego de haber sido sub cultivados unas 10 veces, observaron disminución de la tasa de crecimiento y la formación de hifas aéreas, crecimiento de micelio ondulado y aumento de pigmentación, sin mostrar regresión fenotípica, es decir, regresar a presentar el crecimiento inicial (Formighieri et al., 2008).

En el presente estudio, la siembra para medir CR se realizó a partir de discos de PDA con micelios de aislados de 10 días de edad. Sin embargo, no todos tenían el mismo tiempo de conservación en el laboratorio. Estos se mantuvieron activos con una variación de tiempo desde 16 días hasta por 4 meses mediante repicado consecutivo de una placa a otra (entre 2 a 8 repiques). Se encontró que los aislados obtenidos de aislados más jóvenes (16 días = 2 a 3 repiques) tuvieron un mayor CR, y los aislados de provenientes de aislados de mayor antigüedad (84, 88, y 123 días = 6 a 8 repiques) presentaron un menor CR, resultados que coinciden ampliamente con lo observado por (Formighieri et al.,

2008). Sin embargo, es contradictorio respecto la regresión fenotípica no registrada en el mencionado estudio, ya que en muchos de los aislados aquí evaluados se ha observado la regresión fenotípica luego de que estos habían expresado características fenotípicas de envejecimiento. Por otra parte, las diferencias en CR entre repeticiones de un mismo aislado fueron muy pequeñas. Estos resultados son similares a los reportados por McGeary & Wheeler (1988), quienes encontraron diferencias no significativas en repeticiones de un mismo aislado.

El tipo de tejido del cual provinieron los aislados no tuvo influencia en el crecimiento radial. Maridueña-Zavala et al. (2019) tampoco encontraron diferencias significativas en CR en 85 aislados cultivados en PDA que fueron obtenidos a partir de tres tipos de tejidos: ramas y brotes con hipertrofia, tejidos necrosados y frutos hipertróficos. Asimismo, mencionan que todos los aislados cubrieron la placa de 9 cm de diámetro a los 35 días, de donde se puede deducir que el tejido del que fueron obtenidos no influyó en el crecimiento radial (Maridueña-Zavala et al. 2019).

Las evaluaciones de morfología en aislados de 25 días de edad mostraron aspectos de colonia altamente variables, inclusive en repeticiones de un mismo aislado. En el anverso, el micelio fue de color blanco en la gran mayoría de aislados, a excepción de algunos pocos que presentaron un color con tendencia a crema, y el aislado MEB12 que presentó un color entre púrpura y granate en el centro, hasta la mitad del radio. Según Purdy & Schmidt (1996), estos son colores frecuentes de colonias de *M. pernicioso*, en cultivos *in vitro*, y menciona que el micelio es generalmente de color blanco, con algunas excepciones donde pueden ser de color crema o rojizo púrpura. Resultados similares también fueron reportados por Maridueña-Zavala et al. (2019), quien evaluó el crecimiento micelial de *M. pernicioso* en cultivo PDA, y reportó aislados con micelios de color blanco, y algunos con tonalidades entre rojizo y púrpura. Por su parte, Evans (1980), refiere observaciones de micelio de color blanco y aspecto algodonoso en aislados de crecimiento rápido, y colores de blanco opaco a gris en aislados con hifas de crecimiento rizoidal, que posteriormente se tornaban de color amarillo y marrón.

El color del reverso de las colonias no ha sido documentado con frecuencia, a excepción de Evans (1980), quien refirió un color de marrón gris en el reverso de algunos aislados. Esta coloración difiere al color observado en el reverso de la gran mayoría de aislados aquí

evaluados, ya que estos presentaron un color entre amarillo y anaranjado, seguido de blanco amarilloso de la mitad del radio hacia los bordes. El aislado MEB12 en el reverso presentó coloración lila intenso en el centro, seguido de anaranjado y blanco amarilloso.

Por otro lado, se observó una amplia relación del aspecto micelial con el ritmo de crecimiento. Los dos tipos de aspecto micelial que se observaron fueron: i) los aislados de aspecto micelial saturado, liso y/o algodonoso, de crecimiento elevado y rápido, con bordes de colonia definidos (Grupo 1, 2 y 3); y ii) los aislados de aspecto micelial disperso, aterciado, rizoidal, de crecimiento bajo y lento, con bordes de colonia irregulares (grupo 4, 5, 6, 7, 8 y 9). Características similares, fueron descritas en otros estudios. Maridueña-Zavala et al., (2019) refirió un aspecto micelial aterciopelado con bordes de colonias regulares para 85 aislados de *M. pernicioso*. Asimismo, Meinhardt et al., (2006) menciona que el micelio de *M. pernicioso* cultivado en un medio de cultivo especial denominado LMCpS+ es blanco y esponjoso de crecimiento lento, y que después de 4 a 6 semanas cesan su crecimiento. Por su parte, Formighieri et al., (2008), refiere un micelio blanco y liso de crecimiento continuo para aislados de *M. pernicioso* cultivados en medios de cultivo enriquecido con nutrientes.

En condiciones de microcultivo, en todos los aislados se encontró la presencia de fíbulas, con micelios finos y hialinos con diámetros desde 1 – 3,8 μm . Resultados similares fueron reportados por Evans (1980) quien refirió un micelio fino, hialino y binucleado de 1,5 - 3 μm de diámetro con presencia de fíbulas, en colonias obtenidas de basidiosporas, cultivados en agar estándar. De igual manera, estos resultados coinciden con las observaciones de (Griffith & Hedger, 1994b), quienes informaron la presencia de micelios estrechos, con diámetros de 1-3 μm , en aislados mayores a 2 días de edad.

A pesar de haber observado la presencia de fíbulas en todos los aislados, su persistencia en los aislados fue variable. La presencia de fíbulas es una característica típica de micelios dicarióticos (McGeary & Wheeler, 1988). *Moniliophthora pernicioso* en medios de cultivo *in vitro*, no necesariamente forma fíbulas en cada septo, a pesar de tratarse de micelios dicarióticos (Delgado & Cook, 1976). A esto se suma, la relación de la incidencia de fíbulas, con la disponibilidad de nutrientes y condiciones ambientales reportadas en algunas especies del orden Agaricales, como el caso de *Coprinus disseminatus* (Butler,

1968). En este estudio no se evaluó el tipo de micelio, respecto al número de núcleos. Sin embargo, por la presencia de fíbulas se asume que se trató de micelios secundarios binucleados (dicarióticos). Evans (1980) refiere que el micelio primario de aislados obtenidos de basidiosporas, es de corta duración, y la dicarionización se produce entre 24 y 48 horas luego de producida la germinación. Por su parte, (Griffith & Hedger, 1994b) describieron hallazgos de condición binuclear en todos los aislados del *M. pernicioso* que presentaron hifas con presencia de fíbulas. Asimismo un estudio más reciente, reportó que colonias con micelio de tipo monocariótico, germinadas en un medio de cultivo especial para mantener la condición monocariótica, migran al estado dicariótico en un periodo de 7 a 10 días como máximo al ser traspasados a medio de cultivo PDA (Meinhardt et al., 2006).

La presencia de micelios con hifas hinchadas de aspecto similar a clamidosporas fue otra de las características observadas en 13 de los aislados evaluados. La formación de estas estructuras en medios de cultivos *in vitro* también ha sido reportada en otros estudios. Evans (1980) reportó estructuras similares en micelios creciendo sobre agar alrededor de un callo de cacao, al cual denominó como un tipo de clamidospora. Por su parte (Griffith & Hedger, 1994a) refieren la presencia de micelios con hifas severamente hinchadas (5 - 20 μm) sin la presencia de fíbulas en aislados de *M. pernicioso* de 4 a 8 semanas, cultivados en medio de cultivo a base de papa. Estos hallazgos coinciden con los resultados aquí encontrados. Sin embargo, vale mencionar que el diámetro de las hifas hinchadas, similares a clamidosporas fue mucho menor, (6 - 7 μm) a las descritas por (Griffith & Hedger, 1994a). Esto se puede deber a que el medio de cultivo y condiciones de crecimiento fueron diferentes. Cabe resaltar que las observaciones aquí hechas, corresponden a micelios de hifas de 10 días de edad, producidas en condiciones de microcultivo, en discos de 7 mm de diámetro de PDA.

Caracterización molecular

La caracterización molecular, principalmente la amplificación de las regiones ITS, LSU y SSU, permitieron confirmar la identidad de los 44 aislados evaluados. En la identificación de especies de hongos filamentosos en general, las regiones ITS y LSU, son consideradas altamente efectivas, existiendo una probabilidad de identificación efectiva del 82 % con ITS (más efectiva), y 77,6 % con LSU (Vu et al., 2019). El 100 %

de los aislados identificados en el presente estudio, fueron confirmados como *M. pernicioso*, valiéndose de estas 2 regiones genéticas y de la región SSU utilizada con menor frecuencia. Sin embargo, esta última, también resultó ser altamente efectiva para la discriminación de especie (*M. pernicioso*) en el presente estudio.

El análisis filogenético de la región ITS, agrupó en un solo clado a las secuencias de los 44 aislados junto a otros aislados de los biotipos C y S incluidos para el análisis. Similares resultados fueron reportados por Artero et al. (2017), quienes encontraron que aislados de los biotipos C y S formaron un clado filogenético bien soportado, con muy poco polimorfismo en la región ITS. De Arruda et al. (2003) también reportó resultados similares para la región ITS, y tras analizar 120 aislados menciona que la región ITS no es suficientemente polimórfica para determinar diversidad genética intraespecífica, quedando limitada a la utilidad para la discriminación a nivel de especies. Asimismo Maridueña-Zavala et al. (2019), quien realizó uno de los estudios más recientes, reportó homogeneidad en la región ITS de 65 secuencias de aislados de *M. pernicioso*, tras encontrar que estos formaron un solo clado filogenético junto a otras secuencias de *M. pernicioso* de la base de datos del NCBI.

No se encontró polimorfismos genéticos significativos, en las regiones LSU y SSU. En ambos casos, el análisis filogenético, agrupó en un sólo clado a los 44 aislados de *M. pernicioso* en los árboles filogenéticos. En el caso de LSU, estas se agruparon junto 3 secuencias del *T. cacao* y 1 secuencia de *Solanum gemellum*, todas incluidas para el análisis filogenético y disponibles en la base de datos del NCBI. Resultados similares, fueron reportados por Lisboa et al. (2020), donde aislados del biotipo C y S, se agruparon en un clado filogenético con valor bootstrap de 99 % en un dendograma construido a base de secuencias concatenadas de ITS, LSU, y RPB1 (RNA polymerase II large subunit).

Para la región SSU no existen reportes basado en una amplia base de secuencias, que sustenten al grado de polimorfismo genético en aislados de *M. pernicioso*. Esta región evoluciona relativamente lento comparada a otras regiones como ITS que evoluciona mucho más rápido, por lo que la variación genética a nivel poblacional de una especie es poco probable para SSU, sucediendo todo lo contrario para ITS donde si puede existir variación en poblaciones de una misma especie (White et al., 1990). Aquí, el análisis filogenético se realizó incluyendo las 2 únicas secuencias de *M. pernicioso* disponibles

en la base de datos del NCBI, y como era de esperarse, estas formaron un solo clado filogenético. Asimismo, vale mencionar que esta fue una de las 5 regiones genéticas analizadas por Aime & Phillips-Mora, (2005), estudio que llevo a la reclasificación taxonómica, y por ende al cambio de nombre de *Crinipellis pernicioso* a *Moniliophthora pernicioso*, tal como se conoce a este hongo en la actualidad.

Diversidad genética

El análisis de 11 marcadores moleculares microsatélite SSR mostró la existencia de diversidad genética en la población de *M. pernicioso* evaluada. No existen estudios previos de diversidad genética de *M. pernicioso* para las zonas muestreadas. Sin embargo, estudios realizados en países como Brasil (Artero et al., 2017; De Arruda et al., 2003; Gramacho et al., 2007; J. Silva et al., 2008), Ecuador (Maridueña-Zavala et al., 2019) y Colombia (Osorio-Solano et al., 2012), han evidenciado la ocurrencia de diversidad genética en poblaciones de *M. pernicioso* del biotipo C.

Los resultados exhibieron la presencia de polimorfismo alélico en 6 de los marcadores microsatélite evaluados (MsCepec_15, MsCepec_19, MsCepec_45, mMpCena4, mMpCena8 y mMpCena19). Esta ocurrencia de polimorfismo en los mismos marcadores fue reportado previamente por Gramacho et al. (2007) y J. Silva et al.(2008), quienes diseñaron los *primers* para la amplificación de estos marcadores y encontraron la presencia de 2 a 6 alelos en cada uno de los marcadores mencionados. Asimismo, Osorio-Solano et al. (2012), quién evaluó la diversidad genética de una pequeña población de *M. pernicioso* en Colombia, describió al marcador MsCepec_15, como el más polimórfico en su estudio. Por su parte Artero et al (2017) quien evaluó la diversidad genética de 131 aislados de *M. pernicioso* de los biotipos C, S y L, refirió la presencia de polimorfismo alélico en 11 de 15 marcadores moleculares utilizados. El polimorfismo alélico para cada marcador puede variar, y dependerá estrictamente de la existencia de diversidad genética en la población. Por citar algunos ejemplos, Osorio-Solano et al. (2012) reportó como monomórfico al marcador mMpCena19, y Maridueña-Zavala et al., (2019) refiere lo mismo para el marcador MsCepec_45; sin embargo en el presente estudio el mMpCena19 y MsCepec_45 fueron polimórficos.

También se reporta la presencia de alelos homocigotos y heterocigotos. El mMpCena8 y MsCepec_45 fueron los únicos marcadores moleculares donde se observó

heterocigosidad en algunos aislados. La presencia de aislados con alelos homocigotos y heterocigotos en poblaciones de *M. pernicioso*, también fue reportada por Artero et al. (2017), quién describió la existencia de heterocigosidad en aislados del biotipo C para el marcador mMpCena8 y otros dos marcadores no analizados en el presente estudio. Asimismo, sugirió que la heterocigosidad podría haber surgido luego de múltiples infecciones de un mismo meristema por esporas genéticamente diferentes. Esto mediante un proceso de heterocariosis (dicarionización) entre micelios fenotípicamente primarios, que conlleva a la formación de micelios dicarióticos estables al entrar en la fase saprofita del hongo (Griffith & Hedger, 1994b).

Por otra parte, se observó 19 genotipos multilocus en 50 muestras, la gran mayoría conformados por 1, 2 y hasta 3 aislados que pertenecían a una o más de una población. En algunos casos los genotipos multilocus, estuvieron constituidos por aislados que coincidieron en su procedencia geográfica, tal como se observó en parte de las poblaciones de Imaza y Copallín, donde más del 50 % de la población de cada distrito, formaron parte de los MLG.13 y MLG.10 respectivamente. Similar ocurrencia de haplotipos relacionado al origen geográfico ya se habían observado previamente en aislados del biotipo C y otros biotipos de *M. pernicioso* (Artero et al., 2017). De igual manera, la gran mayoría de los genotipos multilocus presentaron frecuencias de ocurrencia bajas, a excepción del MLG.13 que presentó una alta frecuencia de ocurrencia con 18 aislados; frecuencias variables ya reportadas en *M. pernicioso* (Artero et al., 2017), y otros fitopatógenos fúngicos (Abán, 2019).

El biotipo L ha sido descrito como el de mayor diversidad genética respecto a los biotipos C y S (De Arruda et al., 2003), siendo el biotipo C el de menor diversidad (Artero et al., 2017; Rincones et al., 2006). Al comparar los índices de diversidad genotípica a nivel de poblaciones antes de la corrección clonal, se exhibió los mayores valores de índices de diversidad para las poblaciones de Aramango, Imaza y Condorcanqui. Sin embargo, luego de la corrección clonal, fue Imaza la población con mayor índice de diversidad genotípica, seguido de la población de Aramango. Las poblaciones restantes, mostraron los índices de diversidad genotípica más bajos, antes y después de la corrección de clones, siendo Copallín la población con el menor índice de diversidad genotípica. Una de las características más resaltantes del biotipo C, relacionado a su baja diversidad, es su estrategia de reproducción homotálica, condición fisiológica y genética que le permite

reproducirse sexualmente y producir basidiocarpos a partir de una sola espora, sin la necesidad de apareamiento cruzado (Griffith & Hedger, 1994b). Entonces no resulta sorprendente la baja diversidad genética en poblaciones del biotipo C, tal como lo muestran los resultados de este estudio, y los hallazgos de uno de los estudios más recientes donde también se utilizó marcadores moleculares SSR (Artero et al., 2017).

La red de mínima de expansión corroboró los resultados mostrados en los valores de diversidad. Aramango y Condorcanqui fueron las únicas poblaciones cuyos aislados se distribuyeron en diferentes genotipos multilocus y junto a Imaza fueron las tres poblaciones que mostraron una mayor distribución en la red mínima de expansión. Se ha evidenciado que zonas cacaoteras donde existen grandes áreas de unidades productivas dedicadas a la explotación comercial, presentan una baja variabilidad genotípica en *M. pernicioso* (Artero et al., 2017; De Arruda et al., 2003). De hecho, esto coincide con lo mostrado en la red de expansión mínima y los índices de diversidad genotípica más bajos observados en aislados de las poblaciones de Bagua, La Peca, Copallín, El Parco, y Utcubamba, zonas poco distantes entre sí, y con grandes áreas destinadas a la producción cacaotera. Asimismo, esto se ve reflejado en la población de Imaza, donde 16 aislados coincidieron en el MLG.13. Sin duda alguna la estrategia de reproducción del patógeno juega un papel importante en los niveles de diversidad genética de las poblaciones en *M. pernicioso*. Como ya se mencionó anteriormente, *M. pernicioso* es un hongo con estrategia de reproducción homotálica primaria que le permite reproducirse sin la necesidad de apareamiento sexual cruzado (Griffith & Hedger, 1994b), lo que estaría facilitando la propagación de individuos genéticamente idénticos o clonales en Imaza, como también en las zonas cacaoteras de Bagua, La Peca, Copallín, El Parco, y Utcubamba, provocando bajos niveles de diversidad.

A la estrategia de reproducción se suman los factores que ayudan en la dispersión del patógeno. Se ha descrito a la acción antropogénica como uno de los factores más eficaces en la dispersión de patógenos a largas distancias (Stukenbrock & Bataillon, 2012). La llegada de *M. pernicioso* a la región de mayor producción de cacao en Brasil, (Bahía), a finales de la década de los 80's, ha sido documentada como una introducción del patógeno desde dos orígenes geográficos diferentes (Andebrhan et al., 1999; M. De Arruda et al., 2003), atribuida a un acto antropogénico de agro-terrorismo (Caldas & Perz, 2013). Por otro lado, se ha informado de la relación genética en aislados de distintos orígenes

geográficos, como el reporte de ascendencia compartida en aislados de la amazonia Brasileira, en distancias de hasta 137 km (Artero et al., 2017).

Probablemente la intervención humana, sea uno de los actores principales en la dispersión del patógeno en las zonas aquí analizadas, lo que explicaría la presencia de un mismo haplotipo en varias poblaciones. Los aislados de Bagua, La Peca, Copallín, El Parco, y Utcubamba, se agruparon en 6 genotipos multilocus distribuidos cercanamente entre sí, de los cuales uno (MLG.13) fue compartido por aislados de Imaza, Aramango y Utcubamba. Asimismo, ayudaría a entender la presencia de 4 genotipos multilocus en la población de Aramango, de los cuales 2 fueron únicos, 1 compartido con un aislado de Condorcanqui y 1 compartido con aislados de Imaza y Utcubamba.

Moniliophthora perniciosa del biotipo C tiene una estrategia de reproducción sexual homotálica (Gramacho et al., 2007; Griffith & Hedger, 1994b), por lo que en campo se puede encontrar aislados con el mismo genotipo, como en (Artero et al., 2017) donde los autores encontraron varios clones por población de *M. perniciosa*. Sin embargo, indicios de reproducción sexual cruzada (o heterotalismo) en *M. perniciosa* se había encontrado en análisis bioinformáticos del genoma (Kües & Navarro-González, 2010). En este estudio, se reporta por primera vez la ocurrencia de este tipo de recombinación genética a nivel de campo, evidenciada mediante el análisis del índice de asociación realizado luego de la corrección de clones. Este modo de reproducción ya se había descrito anteriormente para *M. perniciosa* del biotipo L, que presenta heterotalismo bifactorial y un grado limitado de homotalismo (Griffith & Hedger, 1994b).

Conocer la estrategia de reproducción de un patógeno, es de vital importancia al momento de planificar estrategias y métodos de mitigación a largo plazo. Una población de patógenos donde existe reproducción mixta, tiene una mayor probabilidad de descomponer los genes de resistencia genética de la planta, debido al alto potencial en el flujo de genes (McDonald & Linde, 2002). Esto sugiere que los planes de mejoramiento genético del cacao, dirigidos a la busca de resistencia a *M. perniciosa* deben de tener claro los índices de diversidad genética y el modo de reproducción del patógeno.

V. CONCLUSIONES

- Se encontró la incidencia de *M. pernicioso* en los seis distritos de Bagua. Aramango presentó el porcentaje de incidencia más alto con 97,5 %, seguido de Copallín (80,0 %), Imaza (74,3 %), La Peca (72,5 %), Bagua (30,0 %), y el Parco (10,0 %). Los distritos con mayor incidencia correspondieron a zonas con índices de precipitación por encima de los 1700 mm/año, y los distritos con el porcentaje de incidencia más bajo (El Parco y Bagua) correspondieron a zonas con índices de precipitación inferiores a 700 mm/año.
- Se encontró diferencias macromorfológicas en el crecimiento radial y aspecto de colonias, donde prevaleció: i) aislados de aspecto micelial saturado, liso y/o algodonoso, de crecimiento rápido y elevado, con bordes de colonia definidos; y ii) aislados de aspecto micelial disperso, aterciado, rizoidal, de crecimiento bajo y lento, con bordes de colonia irregulares. Respecto al color, prevalecieron colonias de color blanco, blanco amarilloso, y un aislado con colonias de color púrpura intenso en la parte céntrica de la colonia.
- Microscópicamente, no se observó diferencias marcadas entre aislados. En todos los aislados se encontró la presencia de fíbulas, y el diámetro de micelio osciló entre 1 y 3,8 μm . Sin embargo, en 13 de los 44 aislados se observó la presencia de estructuras similares a clamidosporas que presentaron un diámetro de 5-7 μm .
- El análisis filogenético, de las regiones genéticas del ADN ribosomal ITS, LSU y SSU de los 44 aislados de la provincia de Bagua, permitieron la identificación de todos los aislados, sin embargo, no mostraron polimorfismo genético, lo que corrobora que el análisis de estas regiones queda limitado a la identificación de *M. pernicioso* a nivel de especies.
- El análisis de los 11 marcadores moleculares microsatélites SSR evidenció la existencia de diversidad genética en la población de *M. pernicioso* de la provincia de Bagua. Asimismo, exhibió la relación genética existente en aislados de las provincias de Bagua, Utcubamba y Condorcanqui. Finalmente, se corroboró la estrategia de reproducción homotálica y se sugiere la ocurrencia de recombinación genética mediante reproducción sexual cruzada.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar *M. perniciosa* en unidades productivas que tengan las mismas condiciones de manejo agronómico. Las evaluaciones deben ser repetidas a lo largo de un periodo de tiempo establecido, de como mínimo un año, teniendo en cuenta el ciclo de la enfermedad y las condiciones climáticas variables en toda provincia.
- Respecto a la evaluación de crecimiento radial de colonias, se recomienda hacerlo inmediatamente después de aislar el patógeno si se trabaja a partir de tejidos infectados. De lo contrario, *M. perniciosa* puede experimentar un proceso de senescencia después de sucesivas siembras en medios de cultivo.
- Respecto a la recolección de muestras, de preferencia el número de muestras debe ser proporcionalmente igual a nivel de subpoblaciones, para evitar sesgos por sobrepoblación en los análisis de diversidad genética.
- En la extracción de ADN de *M. perniciosa*, se recomienda utilizar micelio de aislados que tengan de 15 a 20 días de edad como máximo (depende del índice de crecimiento radial). Esto asegura una adecuada cantidad y calidad de ADN.
- Para futuras investigaciones, se recomienda hacer un muestreo más representativo con aislados de las regiones cacaoteras más importantes del país. Esto daría luces de la diversidad genética de *M. perniciosa* en el Perú, y la dinámica de dispersión del patógeno a nivel de zonas cacaoteras más importantes.
- Para futuras investigaciones, utilizar un mayor número de marcadores moleculares microsatélites SSR, ya que probablemente aumentaría la información de polimorfismo alélico, tal como lo sugiere la curva de genotipos multilocus del presente estudio. Esto es fundamental, teniendo en cuenta que *M. perniciosa* es un patógeno de reproducción homotálica, que indica baja diversidad genética, por lo tanto, se requerirá un mayor número de marcadores para detectar la baja variabilidad alélica.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abán, C. (2019). *Variabilidad fenotípica y genotípica de aislamientos de S clerotinia sclerotiorum (Lib .) de Bary , agente causal de la esclerotinia del poroto en el NOA.* <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/80192?show=full>
- Agapow, P., & Burt, A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1, 101–102. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x>
- Aime, M., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, Theobroma cacao) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97(5), 1012–1022. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832751>
- Andebrhan, T., Figueira, A., Yamada, M., Cascardo, J., & Furtek, D. (1999). Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches ' broom disease (Crinipellis perniciosa) of Theobroma cacao in Bahia , Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 167–175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1008716000479>
- Artero, A., Silva, J., Albuquerque, P., Bressan, E., Leal, G., Sebbenn, A., Griffith, G., & Figueira, A. (2017). Spatial genetic structure and dispersal of the cacao pathogen Moniliophthora perniciosa in the Brazilian Amazon. *Plant Pathology*, 66(6), 912–923. <https://doi.org/10.1111/ppa.12644>
- Bartley, B. (2005). *Genetic diversity of cacao and its utilization.*
- Bastos, C., & Anderbrhan, T. (1986). Urucu (Bixa Orellana): a new host of witches' broom disease (Crinipellis perniciosa) of cocoa. *Fitopatologia Brasileira*, 11, 963–965.
- Bastos, C., & Evans, H. (1985). A new pathotype of Crinipellis perniciosa (witches' broom disease) on solanaceous hosts. *Plant Pathology*, 34, 306–312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1985.tb01366.x>
- Beyer, A., Rodríguez, P., Collantes, D., & Joyo, G. (2017). Factores socioeconómicos, productivos y fuentes de información sobre plaguicidas para productores de Fragaria x ananassa en Cañete, Lima, Perú. *Idesia*, 35(1), 31–37. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292017005000008>
- Bowers, J., Bailey, B., Hebbar, P., Sanogo, S., & Lumsden, R. (2001). The Impact of Plant Diseases on World Chocolate Production. *Plant Health Progress*, 2(1), 12. <https://doi.org/10.1094/PHP-2001-0709-01-RV>
- Brown, A., Feldman, M., & Nevo, E. (1998). Cumulative effects of founding events during colonisation on genetic diversity and differentiation in an island and stepping-stone model.

- Journal of Evolutionary Biology*, 96(10), 523–536. <https://doi.org/10.1007/s000360050102>
- Butler, G. (1968). Environmentally Induced Changes in Clamp Connection Incidence in Hyphal Branching Systems of *Coprinus*. *Annals of Botany*, 32(128), 847–862. <http://www.jstor.org/stable/42908094>
- Caldas, M., & Perz, S. (2013). “Agro-terrorism? The causes and consequences of the appearance of witch’s broom disease in cocoa plantations of southern Bahia, Brazil.” *Geoforum*, 47, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2013.01.006>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. (Primera ed). Centro Internacional de la Papa.
- Castro, A., de Almeida, A., Pirovani, C., Reis, G., Almeida, N., & Mangabeira, P. (2015). Ecotoxicology and Environmental Safety Morphological , biochemical , molecular and ultrastructural changes induced by Cd toxicity in seedlings of *Theobroma cacao* L . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 174–186. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.003>
- Csardi, G., & Nepusz, T. (2006). The igraph software package for complex network research. *InterJournal, Complex Systems*, 5, 1–9.
- De Almeida, C., dos Santos, L., & de Paula, A. (2009). Caracterização agrônômica de acessos de cacau. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 44(4), 368–373. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000400006>
- De Arruda, M., Miller, R., Ferreira, M., & Felipe, M. (2003). Comparison of *Crinipellis perniciosus* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. *Plant Pathology*, 52(2), 236–244. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00819.x>
- De Arruda, M., Ferreira, M., Miller, R., Resende, M., & Felipe, M. (2003). Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosus* from different geographic origins and hosts. *Mycological Research*, 107(1), 25–37. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006895>
- Delgado, J., & Cook, A. (1976). Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius perniciosus*. *Canadian Journal of Botany*, 54(1–2), 66–72. <https://doi.org/10.1139/b76-009>
- Díaz-Valderrama, J., Leiva-Espinoza, S., & Catherine Aime, M. (2020). The history of cacao and its diseases in the Americas. *Phytopathology*, 110(10), 1604–1619. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>

- Dirección Regional de Agricultura de Amazonas (DRAA). (2018). *Ejecución y perspectivas de la información agrícola*.
- Evans, H. (1977). The occurrence of pathotypes of *Crinipellis pernicioso* (STAHLE) singer in the tropical forest ecosystem. *Proceeding of the 6th International Cocoa Research Conference*, 166–170.
- Evans, H. (1980). Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(3), 515–523. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(80\)80051-9](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(80)80051-9)
- Fernández, L. (2018). *Epidemiología de escoba de bruja (Moniliophthora pernicioso) en accesiones de cacao (Theobroma cacao L.) silvestre colectadas en la cuenca del alto Amazonas* [Universidad Nacional de San Martín]. <http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/2873>
- Formighieri, E., Tiburcio, R., Armas, E., Medrano, F., Shimo, H., Carels, N., Góes-Neto, A., Cotomacci, C., Carazzolle, M., Sardinha-Pinto, N., Thomazella, D., Rincones, J., Digiampietri, L., Carraro, D., Azeredo-Espin, A., Reis, S., Deckmann, A., Gramacho, K., Gonçalves, M., ... Pereira, G. (2008). The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete *Moniliophthora pernicioso* is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid. *Mycological Research*, 112(10), 1136–1152. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.04.014>
- García, L. (2010). Cultivares de cacao del Perú Ministerio de agricultura - devida. In *Ministerio de Agricultura*. https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/cultivares_cacao.pdf
- Gardes, M., & Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Gramacho, K., Risterucci, A., Lanaud, C., Lima, L., & Lopes, U. (2007). Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Molecular Ecology*, 7, 153–155. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01563.x>
- Gray, A. (2001). The world cocoa market outlook. *LMC International, Ltd.*
- Griffith, G., & Hedger, J. (1994a). Dual culture of *Crinipellis pernicioso* and potato callus. *European Journal of Plant Pathology*, 100(6), 371–379. <https://doi.org/10.1007/BF01874805>
- Griffith, G., & Hedger, J. (1994b). The breeding biology of biotypes of the witches' broom

- pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. *Heredity*, 72(3), 278–289.
<https://doi.org/10.1038/hdy.1994.38>
- Griffiths, A. (1992). Fungal senescence. *Annual Review of Genetics*, 26(63), 351–372.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.002031>
- Hernandez, M., & Monter, A. (2013). Implantación a Microescala para Determinar las Características Fisiológicas de Hongos Miceliales y Levaduras en el Laboratorio de Microbiología General II de la Carrera de QFB de la FES Zaragoza. In *Unam*.
https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_hernandez_garay.pdf
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). (2012). *IV Censo Nacional Agropecuario 2012*. <http://censos.inei.gob.pe/Cenagro/redatam/>
- Jaimes, Y., & Aranzzu, F. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia, con énfasis en Monilia (*Moniliophthora roreri*). In *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica E.E. La Suiza*.
https://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_04A.pdf
- Kamvar, Z., Brooks, J., & Grünwald, N. (2015). Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics*, 6(JUN), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00208>
- Kamvar, Z., Tabima, J., & Grünwald, N. (2014). Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2014(1), 1–14.
<https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Kües, U., & Navarro-González, M. (2010). Mating-type orthologous genes in the primarily homothallic *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom Disease in cacao. *Journal of Basic Microbiology*, 50(5), 442–451.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201000013>
- Lisboa, D., Evans, H., Araújo, J., Elias, S., & Barreto, R. (2020). *Moniliophthora perniciosa*, the mushroom causing witches' broom disease of cacao: Insights into its taxonomy, ecology and host range in Brazil. *Fungal Biology*, 124(12), 983–1003.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.09.001>
- Maddison, A. C., Macias, G., Moreira, C., Arias, R., & Neira, R. (1995). Cocoa production in Ecuador in relation to dry-season escape from pod rot caused by *Crinipellis perniciosa* and *Moniliophthora roreri*. *Plant Pathology*, 44(6), 982–998. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

3059.1995.tb02657.x

- Maridueña-Zavala, M., Freire-Peñaherrera, A., Espinoza-Lozano, R., Villavicencio-Vasquez, M., Jimenez-Feijoo, M., & Cevallos-Cevallos, J. (2019). Genetic characterization of *Moniliophthora perniciosa* from Ecuador and in vitro sensitivity to compost tea. *Plant Pathol*, 154, 943–959. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01714-1>
- Mcdonald, B., & Linde, C. (2002). *Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance*. 40(1), 349–379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- McGeary, F., & Wheeler, B. (1988). Growth rates of, and mycelial interactions between, isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa. *Plant Pathology*, 37(4), 489–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02106.x>
- Meinhardt, L., de Bellato, C., Rincones, J., Azevedo, R., Cascardo, J., & Pereira, G. (2006). In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology*, 52(3), 191–196. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0182-z>
- Meinhardt, L., Rincones, J., Bailey, B., Aime, M., Griffith, G., Zhang, D., & Pereira, G. (2008). *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology*, 9(5), 577–588. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00496.x>
- Merchán-Vargas, V. (1980). Información técnica: formación en medios de cultivo de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. *Federación Nacional de Cacaoteros*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/21919>
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2009). *Región de Amazonas*. https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/organizaciones/dgpa/documentos/estudio_cacao/4_3_1amazonas_informefinal.pdf
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). (2020). *Observatorio de Commodities 2020 - Boletín Trimestral (Octubre - Diciembre)*. https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1026014/Commodities_arroz_abr-jun_2020.pdf
- Mori, R. (2018). Modelo de gestión estratégica para el posicionamiento comercial en el mercado internacional del cacao Amazonas, Perú. In *Repositorio UNTRM*. <http://repositorio.untrm.edu.pe/handle/UNTRM/1664>
- Murrieta, E., & Palma, H. (2018). *Manejo integrado de plagas (MIP) en el cultivo de cacao* (pp.

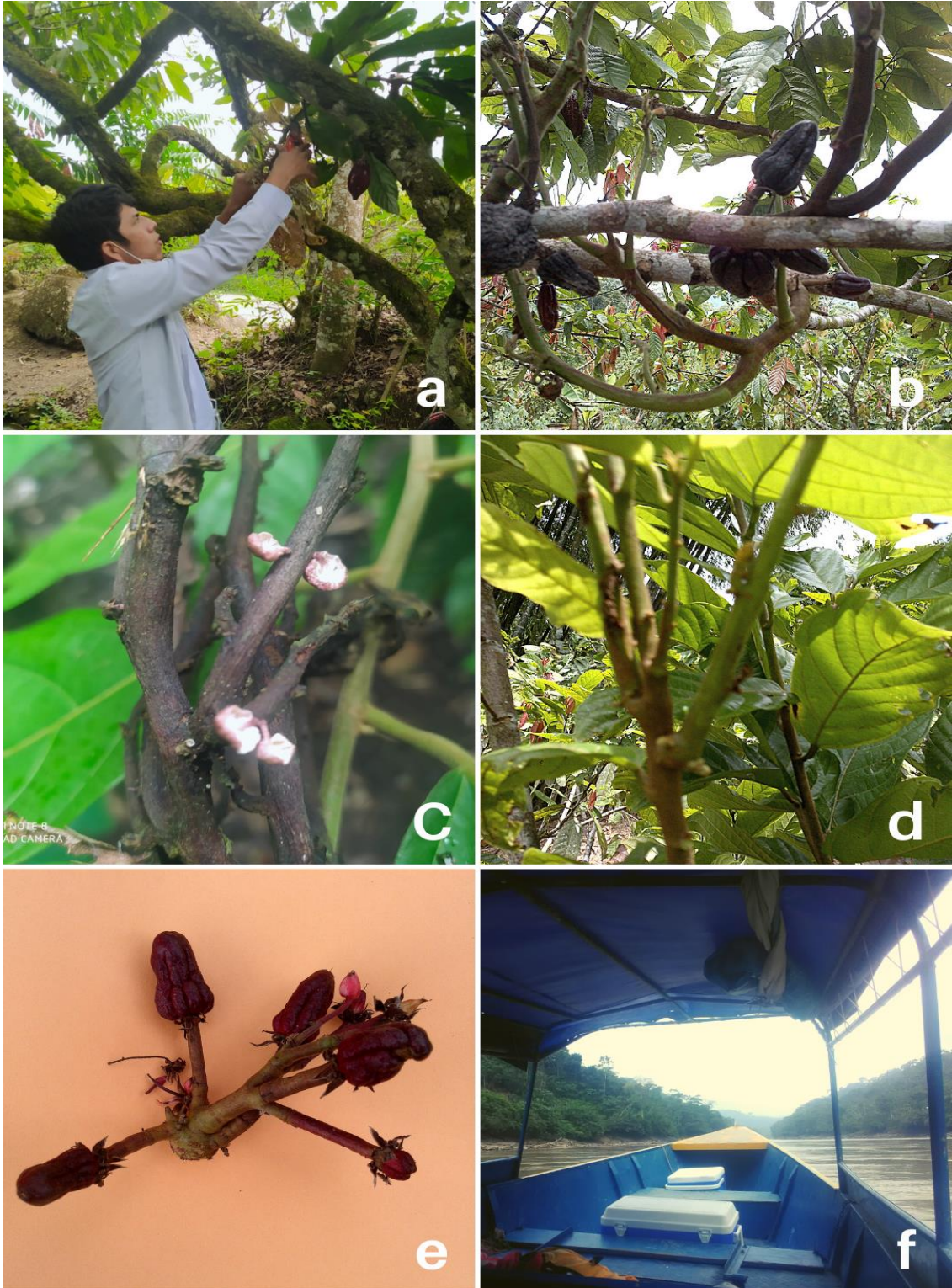
- 1–40). https://issuu.com/comunicacionesalianzacacaoperu/docs/manual_mip
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583–590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583>
- Osorio-Solano, C., Orozco-Castaño, C., López-Gartner, G., & Rivera-Páez, F. (2012). Acta agronomica (Palmira, Colombia). *Acta Agronómica*, 61(2), 93–101.
- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L., & Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 2–25. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2017.080100002>
- Pérez-Vicente, L. (2018). Moniliophthora rozeri H.C. Evans et al. y Moniliophthora perniciosa (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(1), 01–13.
- Pires, A., Gramacho, K., Silva, D., Góes-Neto, A., Silva, M., Muniz-Sobrinho, J., Porto, R., Villela-Dias, C., Brendel, M., Cascardo, J., & Pereira, G. (2009). Early development of Moniliophthora perniciosa basidiomata and developmentally regulated genes. *BMC Microbiology*, 9, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-158>
- Ploetz, R. (2016). The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview. Cacao Diseases. *Springer International Publishing Switzerland*, 33–59. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>
- Purdy, L., & Schmidt, R. (1996). Status of cacao witches' broom: Biology, Epidemiology, and Management. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 573–594. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.573>
- R Core Team. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org/>
- Resende, M., Gutemberg, B., Silva, L., Niella, G., Carvalho, G., Santiago, D., & Bezerra, J. (2000). Crinipellis perniciosa proveniente de um novo hospedeiro , Heteropterys acutifolia , é patogênico a T . cacao. *Fitopatologia Brasileira*, 25, 88–91.
- Rincones, J., Mazotti, G., Griffith, G., Pomela, A., Figueira, A., Leal, G., Queiroz, M., Pereira, J., Azevedo, R., Pereira, G., & Meinhardt, L. (2006). Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen Crinipellis perniciosa from various plant hosts in South America. *Mycological Research*, 110(7), 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.05.002>

- Rocha, H., & Wheeler, B. (1985). Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology*, 34(3), 319–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1985.tb01368.x>
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/doi:10.1038/nmeth.2089>
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology*, 18(February), 1–2.
- Sena, K., Alemanno, L., & Gramacho, K. (2014). The infection process of *Moniliophthora pernicioso* in cacao. *Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/ppa.12224>
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Shaw, M., & Vandenbon, A. (2007). A qualitative host-pathogen interaction in the *Theobroma cacao*-*Moniliophthora pernicioso* pathosystem. *Plant Pathology*, 56(2), 277–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01549.x>
- Silva, J., Figueira, A., Pereira, G., & Albuquerque, P. (2008). Development of novel microsatellites from *Moniliophthora pernicioso*, causal agent of the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Molecular Ecology Resources*, 8(4), 783–785. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02063.x>
- Silva, P. (1987). Cacau e lagartao ou vassoura-de-bruxa: registros efetuados por Alexandre Rodrigues Ferreira nos anos de 1785 a 1787 na Amazonia. *Boletim Técnico - Comissao Executiva Do Plano Da Lavoura Cacaueira (Brasil)*. (No.146) 21 P.
- Simpson, E. (1949). Measurement of diversity. In *Nature* (Vol. 163, Issue 4, p. 688). <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Singer, R. (1942). A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. *Lilloa*, 8, 441–534.
- Smith, J., Smith, N., O'Rourke, M., & Spratt, B. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(10), 4384–4388. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.10.4384>
- Stoddart, J., & Taylor, J. (1988). Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples.

- Genetics*, 118(4), 705–711. <https://doi.org/10.1093/genetics/118.4.705>
- Stukenbrock, E., & Bataillon, T. (2012). A Population Genomics Perspective on the Emergence and Adaptation of New Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *PLoS Pathogens*, 8(9), 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002893>
- Suarez, L. (2016). Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta Agronomica*, 65(1), 51–57. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n1.47994>
- Tovar, G. (1991). Capítulo XIV. La escoba de bruja del cacao [*Crinipellis perniciosa* (Stahel Singer)] en la región del piedemonte llanero de Colombia: Interpretación del estudio epidemiológico para el manejo de la enfermedad. *Agronomía Colombiana*, 8(1), 209–226. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/25434>
- Tovar, G., Mayorga, M., Rondón, G., Cifuentes, C., Prieto, J., & Ortíz, M. (1991). Capítulo VIII. La escoba de bruja del cacao [*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer] en la región del piedemonte llanero de Colombia: La dinámica de la producción de escobas y el periodo de latencia. *Agronomía Colombiana*, 8(1), 123–138. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/download/25406/25912/0>
- Vargas, J. (2010). *Clima, informe temático. Proyecto Zonificación Ecológica y Económica del departamento de Amazonas, convenio entre IIAP y el Gobierno Regional de Amazonas. Iquitos - Perú*. <http://www.iiap.org.pe/upload/publicacion/PUBL510.pdf>
- Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J., Cardinali, G., Houbraken, J., Boekhout, T., Crous, P., Robert, V., & Verkley, G. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 92, 135–154. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
- Watanabe, T. (2002). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. In *CRC Press* (Second Ed.). CRC PRESS.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>

ANEXOS

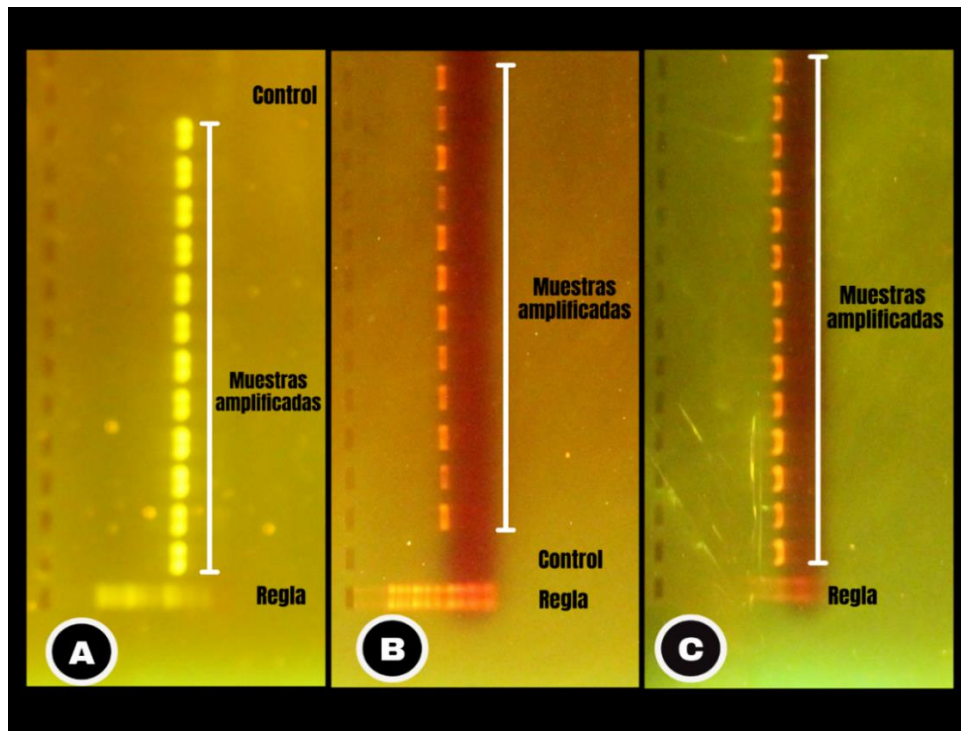
Anexo 1. Fotografías de actividades en campo. **a.** Recolección de tejidos infectados. (**b**, **c**, **d** y **e**) Tejidos con síntomas y signos de infección de *M. pernicioso* tomados en cuenta la evaluación de incidencia y recolección de muestras infectadas. **f.** Cajas termoestables utilizadas en la recolección de tejidos infectados.



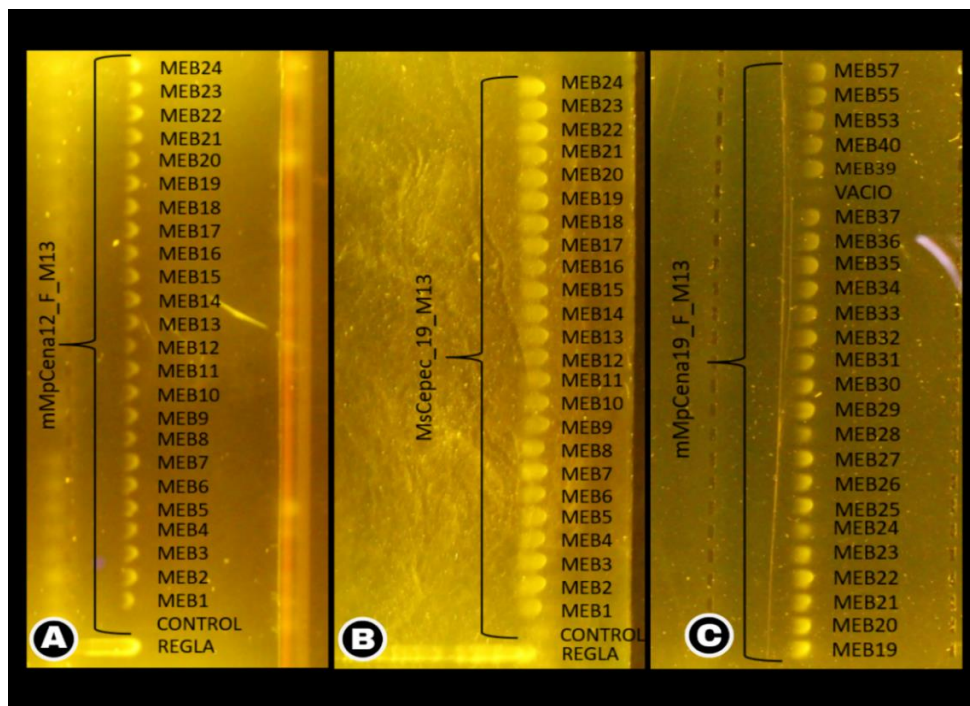
Anexo 2. Fotografías de actividades en laboratorio. **a.** Tratamiento de tejidos infectados por *M. perniciosa*. **b.** Tejidos de cacao sembrados en medio PDA. **c.** Observación de estructuras microscópicas. **d.** Preparación de gel de Agarosa para el proceso de electroforesis. **e.** Colocación de muestras en el termociclador para el proceso de PCR. **f.** Llenado de placas, con muestras amplificadas para el envío a secuenciamiento.



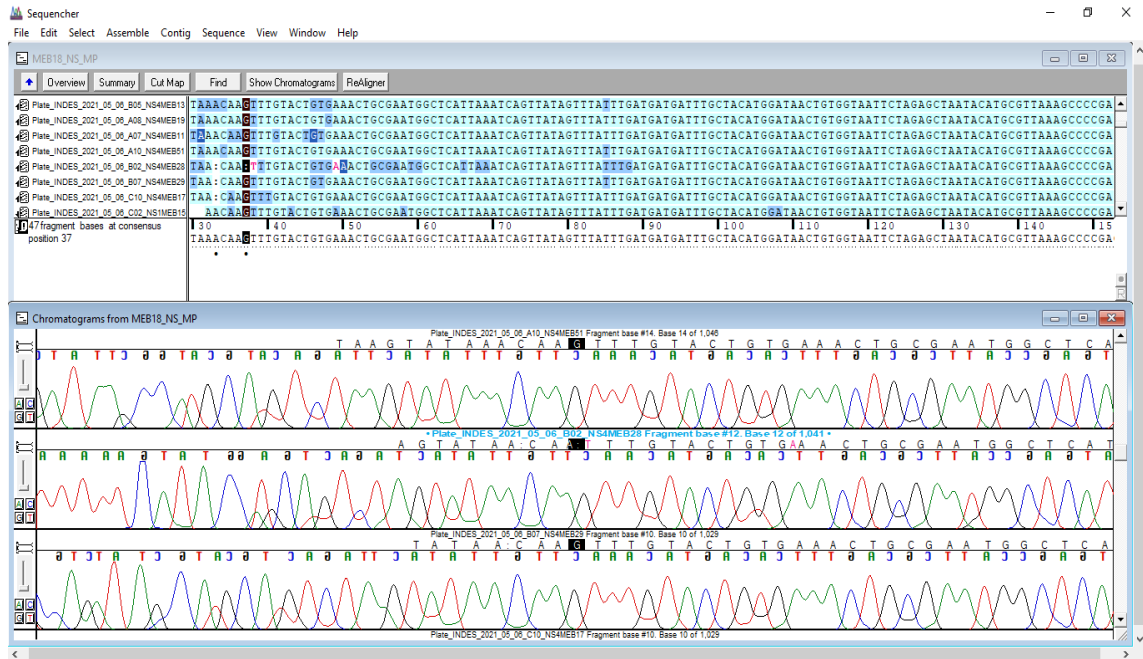
Anexo 3. Fotografías de electroforesis de productos de PCR en geles de agarosa. **A.** Productos de PCR de la region ITS. **B.** Productos de PCR de la region SSU. **C.** Productos de PCR de la region LSU (Purificación).



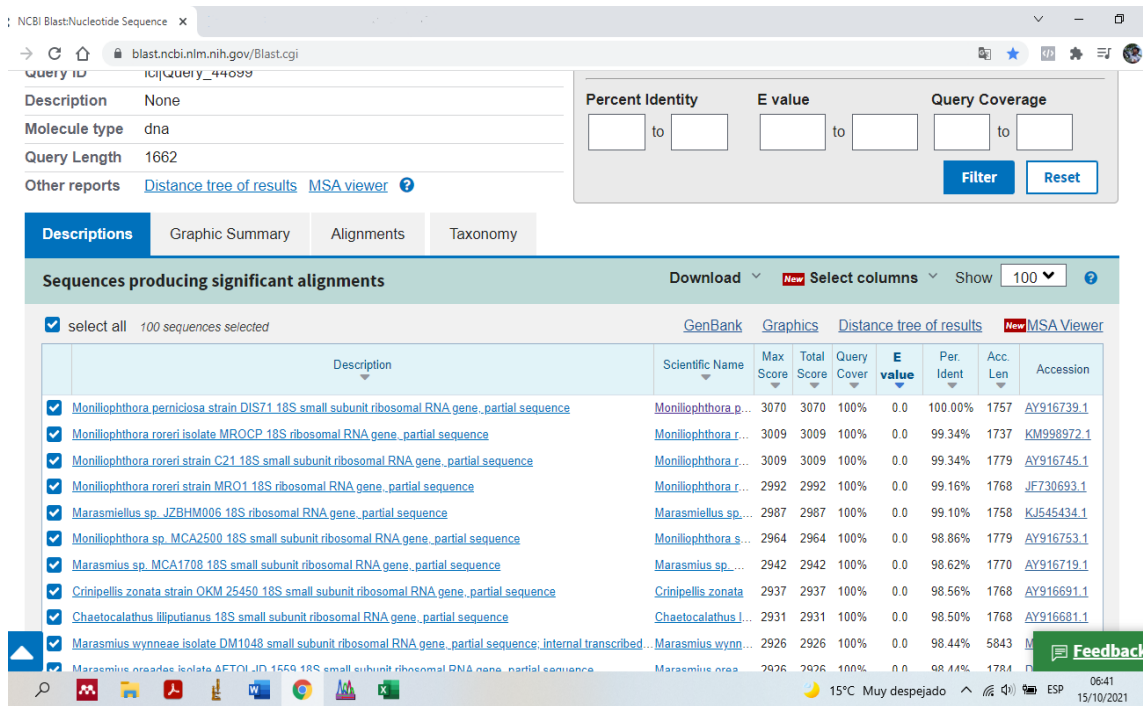
Anexo 4. Electroforesis de productos de PCR de marcadores moleculares microsatélites SSR, corridos en geles de agarosa. **A.** Marcador mMpCena12. **B.** Marcador MsCepec_19. **C.** Marcador mMpCena19



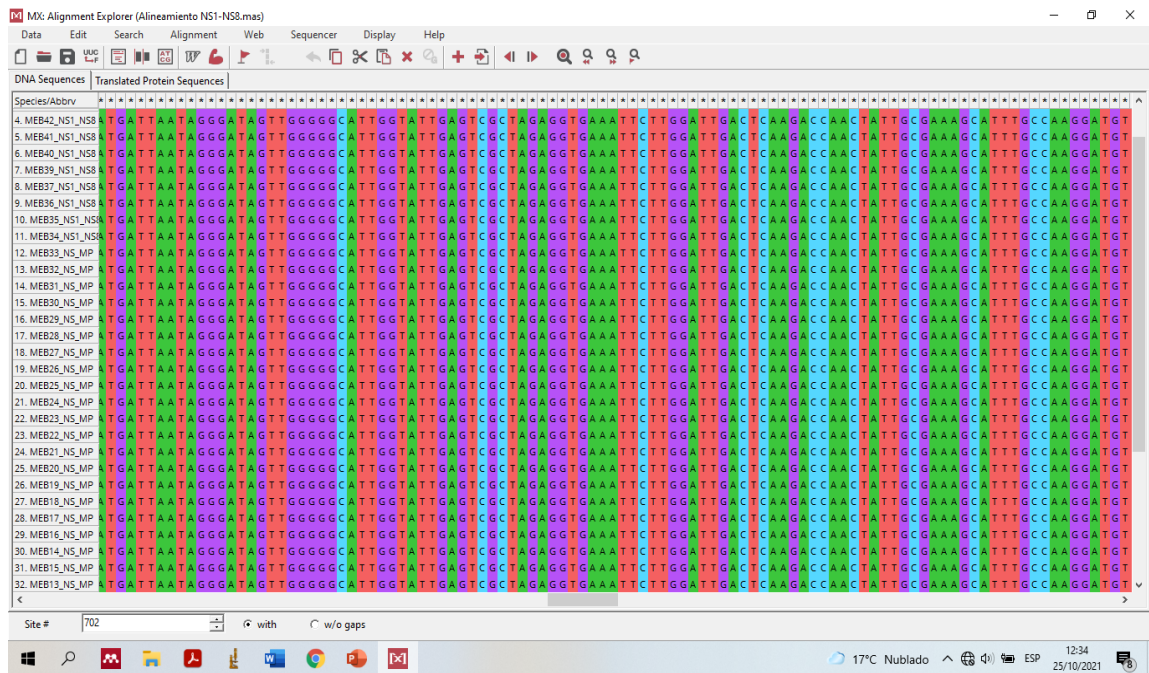
Anexo 5. Edición de secuencias de ADN, utilizando el Software Sequencher.



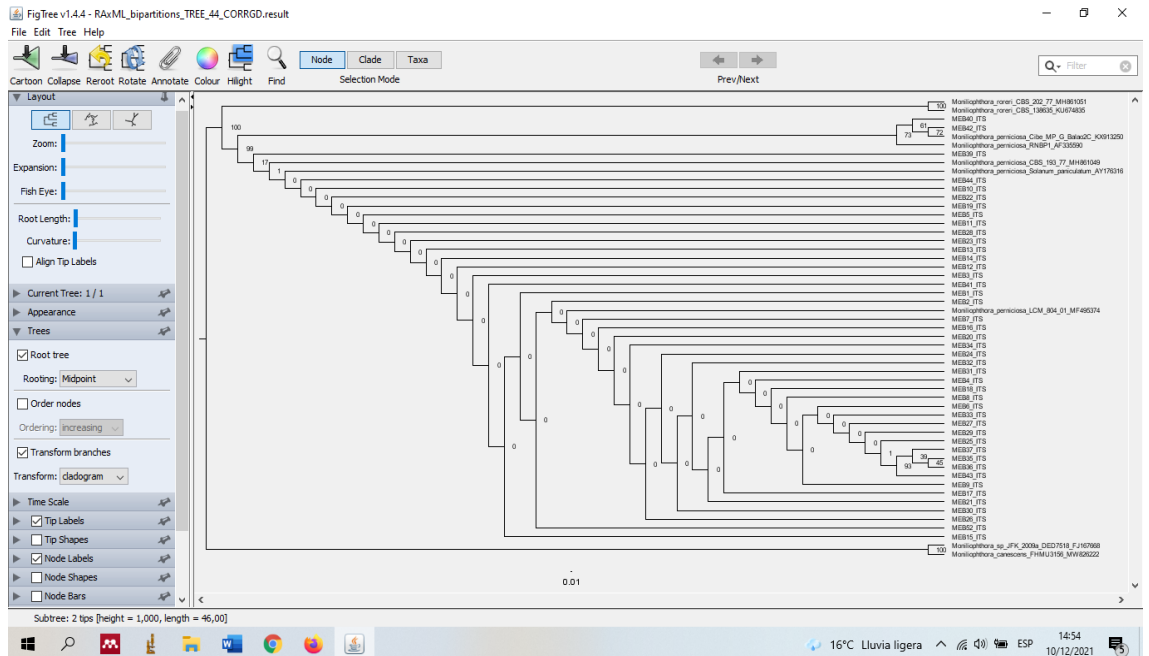
Anexo 6. Identificación del patógeno mediante el análisis de secuencias de las regiones ITS, LSU y SSU utilizando el programa BLAST, del portal web del NCBI (National Center for Biotechnology Information).



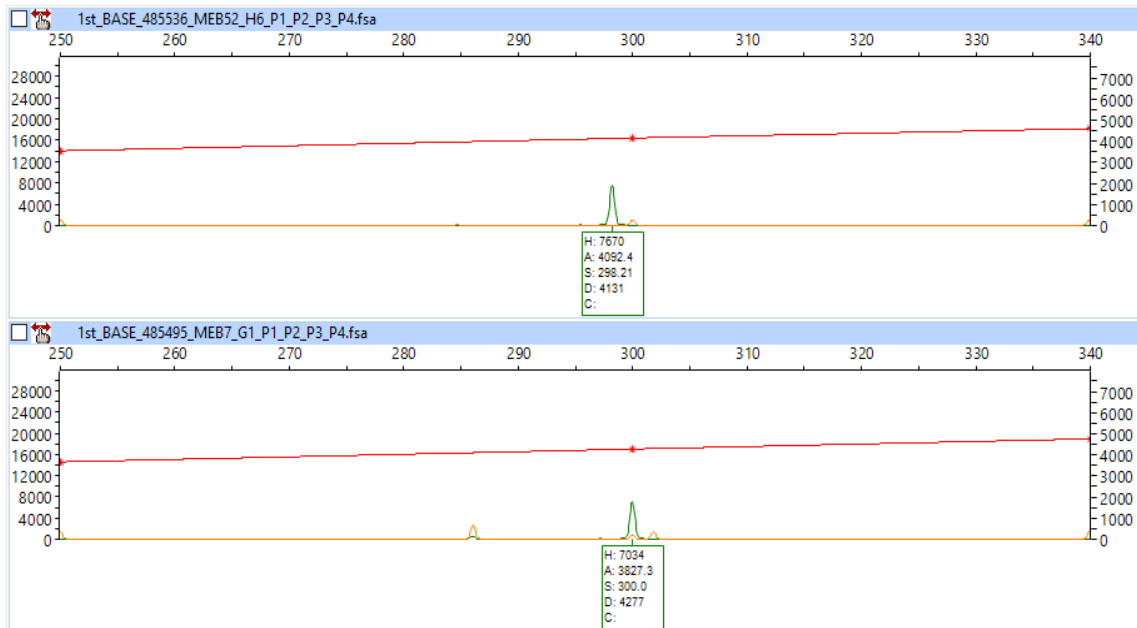
Anexo 7. Alineamiento de secuencias usando el software MEGA-X.



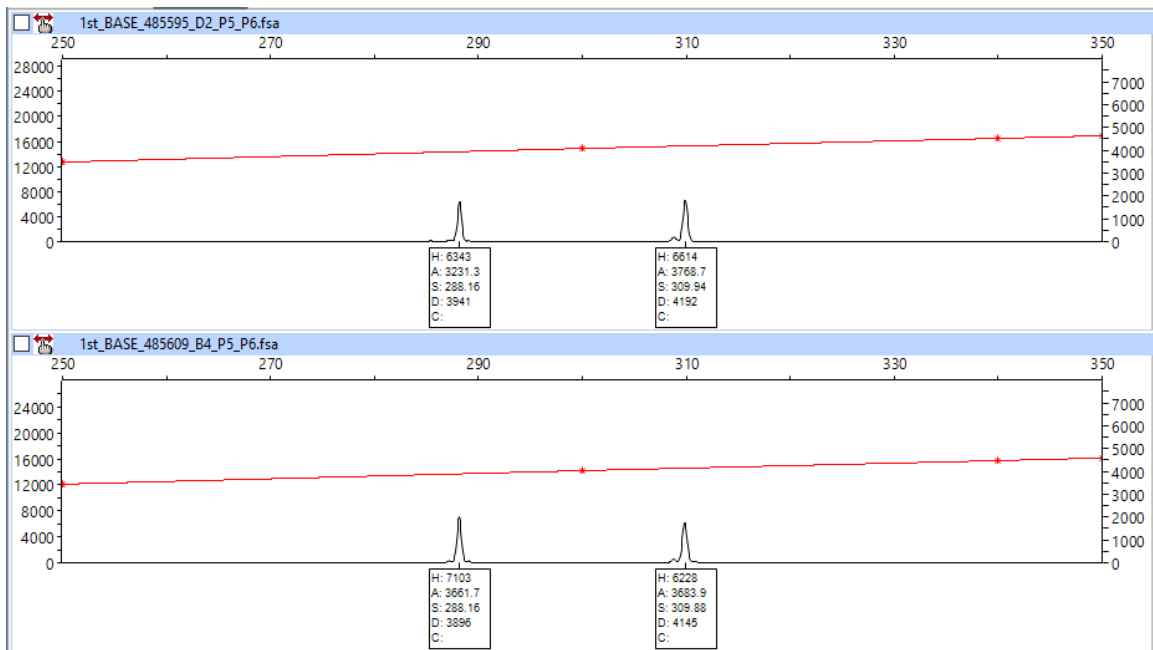
Anexo 8. Enraizamiento de un árbol filogenético utilizando el Software Fig Tree.



Anexo 9. Lectura de resultados del análisis de fragmentos de la amplificación de marcadores SSR, utilizando el Software Peak Scanner v1.0. Se muestra polimorfismo alélico de tamaño en aislados para el marcador *mMpCena4*.



Anexo 10. Lectura de resultados del análisis de fragmentos de la amplificación de marcadores SSR, utilizando el Software Peak Scanner v1.0. Se muestra alelos heterocigotos en 2 aislados para el marcador *mMpCena8*.



Anexo 11. Lectura de resultados del análisis de fragmentos de la amplificación de marcadores SSR, utilizando el Software Peak Scanner v1.0. Se muestra alelos homocigotos (picos de color azul) en aislados para el marcador *mMpCena12*.

