



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**“Contribución al estudio de hongos y
cromistas asociados al sistema agroforestal
del cacao en Venezuela”**

MSc. Sandy Lorena Molina Moret

Maracay, Octubre de 2017



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**“Contribución al estudio de hongos y
cromistas asociados al sistema agroforestal
del cacao en Venezuela”**

Autora: MSc. Sandy Lorena Molina Moret

Tutora: Dra. Daynet Sosa

Maracay, Octubre de 2017

**TESIS DE DOCTORADO PRESENTADA COMO REQUISITO FINAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

Comité Consejero



Dra. Daynet Sosa
Tutora

Dra. Catalina Ramis

+
Dr. Jhonny Demey

A LA MEMORIA DE MIS AMIGOS
JHONNY DEMEY Y ELIZABETH GÁMEZ
... ENAMORADOS DEL CACAO

AGRADECIMIENTO

A DIOS Todopoderoso mi guía y mi fuerza para seguir adelante

A Daynet Sosa, Tutora, amiga y pieza clave en el desarrollo de este trabajo. Gracias por tus enseñanzas y tu apoyo

A Diego Rojas, por sus valiosas orientaciones y su invaluable apoyo en el procesamiento y análisis de los datos

A Dercy Parra (INIA-Miranda), Raiza Rumbos (INIA-Zulia) y Bárbara Gutiérrez (INIA-Sucre) por el valioso apoyo en el inicio de este trabajo

A María Alejandra Isturiz, Diamarys Domínguez, Darío Torrealba y José Vezga, por el gran apoyo en el procesamiento de las muestras

A Darío Torrealba, Alan Miyadi y María Alejandra Isturiz, por su compañía, apoyo y colaboración en las salidas de campo

A Gustavo Romay, José David Rosales y Leandro Balzano, por sus orientaciones bioinformáticas y estadísticas

A Simón Pérez y Carlos Noceda por sus aportes y revisión del manuscrito

Al IDEA, mi institución de trabajo, donde conté con el apoyo para llevar a cabo esta investigación

Al programa de estímulo a la investigación e innovación PEII, por financiar parte de este trabajo.

A Darío, mi apoyo incondicional, gracias por tanto. TE AMO

A mi HERMOSA FAMILIA ... GRACIAS

RESUMEN

El cacao es un cultivo estrechamente ligado a la cultura venezolana, tanto por su origen como por su importancia en el desarrollo económico y social del país. Los principales problemas de producción han estado asociados a las enfermedades que lo afectan las cuales varían en magnitud e importancia, según las particularidades de cada zona del país. Esta investigación haciendo uso del espaciador interno transcrito (ITS) determinó la base genética de las especies de patógenos asociadas a las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva, en las tres zonas productoras de cacao de Venezuela, así como de *Trichoderma* como controlador biológico. Se identificaron los *hotspots* de esas enfermedades y mediante distintas herramientas estadísticas, como análisis de correspondencias, análisis de correspondencias canónico y análisis de correlaciones canónicas se estudiaron las relaciones funcionales entre los patógenos, controladores y el ambiente. La diversidad de los patógenos fue de moderada a baja y generalmente nula la diferenciación genética entre las tres zonas. En *Trichoderma*, se evidenció alta diversidad genética en el género. Se observó una tendencia zonal, analizando las especies encontradas en las tres zonas cacaoteras del país, se evidenció que los controladores ejercen un efecto en las abundancias de los patógenos, así como las variables ambientales influyen de forma importante en la dispersión de las especies estudiadas. Con estos hallazgos se pretende generar estrategias de mejoramiento genético para el cacao y manejo integrado de sus enfermedades en las diferentes zonas cacaoteras del país.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, enfermedades, diversidad genética, *hotspots*, *Trichoderma*, relaciones funcionales.

ABSTRAC

Cacao is a crop closely related to Venezuelan culture due to its origins as well as its importance in the economic and social development of the country. The main problems in its production have been associated to diseases that affect it, which may vary in magnitude and importance, according to particularities of each geographic location. This research, through the use of the internal transcribed spacer (ITS), determined the genetic base of pathogenic species associates to diseases such as anthracnosis, trunk cancer, frosty pod, moniliasis and regressive death, in three different cacao productive regions in Venezuela, as well as that of *Trichoderma* as a biological control agent. The hotspots of these diseases were identified and, through different statistical tools such as correspondence analysis, canonical correspondences analysis and canonical correlation analyzes, the functional relationships between pathogens, controllers and the environment were studied. Pathogen diversity was from moderated to low, and genetic differentiation among the regions was generally null. In *Trichoderma*, a high genetic diversity was evidenced. A zonal tendency was observed, analyzing the found species in the three cacao regions of the country. It was evidenced that controllers exert an affect in pathogen abundance, and that environmental variables significantly influence dispersion of the studied species. With these findings, it is expected to generate strategies for genetic improvement of cacao, and integrated disease management in the different cacao producing zones in Venezuela.

Keywords: *Theobroma cacao*, diseases, genetic diversity, Hotspots, *Trichoderma*, functional relations

Índice

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	5
Objetivo General	5
Objetivos Específicos:	5
ANTECEDENTES.....	6
1.- Enfermedades del cacao.....	6
2.- Variabilidad genética en hongos.....	9
3.- El espaciador interno transcrito (ITS).....	10
4.- <i>Hotspots</i> como zonas de diversidad de especies	11
5.- Géneros de hongos y cromistas a estudiar	13
5.1.- <i>Colletotrichum</i> Corda	13
5.2.- <i>Lasiodiplodia</i> Ellis & Everli 1896.....	14
5.3.- <i>Phytophthora</i> de Bary 1876	16
5.4.- <i>Moniliophthora</i> H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny 1978	17
5.5.- <i>Trichoderma</i> Pers. 1794	19
METODOLOGÍA	22
1.- Muestreo de plantas sintomáticas:	22
2.- Aislamiento y purificación de colonias de hongos y cromistas:.....	22
2.1.- Aislamiento de hongos y cromistas patógenos de cacao.....	22
2.2.- Aislamiento de hongos a partir de suelo	23
2.3.- Purificación de colonias	23
3.- Identificación preliminar de especies basada en la morfología	25
4.1.- Extracción de ADN	26
4.2.- PCR-ITS.....	26
5.- Análisis de las secuencias:.....	26
5.1.- Identificación de especies	26

5.2.- Estimación de la diversidad genética	27
6.- Determinación del <i>Hotspots</i> de las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva en las tres regiones productoras de cacao de Venezuela.	29
6.1.- Determinación de <i>Hotspots</i> geográficos:	29
6.2.- Determinación de <i>Hotspots</i> genéticos:.....	29
7.- Evaluación de las relaciones funcionales patógeno-controlador-ambiente	30
7.1.- Organización y Procesamiento de datos	30
7.2.- Análisis de Componentes Principales (PCA)	32
7.3.- Análisis de Coordenadas Principales (PCO):.....	32
7.4.- Análisis de Correspondencias (CA) y Análisis de Correspondencias Canónico (CCA).....	33
7.5.- Análisis de Correlación de Pearson y Análisis de Correlaciones Canónicas (CCorA)	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1.- Riqueza y abundancia de especies:.....	41
2.- Diversidad Genética.....	44
2.1.- Diversidad Genética en <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	45
2.2.- Diversidad Genética en <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	49
2.3.- Diversidad Genética en <i>Phytophthora palmivora</i>	54
2.4.- Diversidad Genética en <i>Moniliophthora roreri</i>	59
2.5.- Diversidad Genética en <i>Trichoderma</i>	62
3.- <i>Hotspots</i> de las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva o repentina en las tres zonas productoras de cacao de Venezuela	68
3.1.- <i>Hotspots</i> geográficos	68
3.2.- <i>Hotspots</i> genéticos	69
4.- Relaciones funcionales patógeno-controlador-ambiente	72
4.1.- Análisis de Correlación Canónica (CCorA).....	72
4.1.1.- CCorA de Patógenos-Controladores.....	74
4.1.2.- CCorA de “Patógenos-Controladores” y Variables Ambientales.	80
4.1.3.- CCorA de Patógenos-Variables Ambientales	87
4.1.4.- CCorA de Controladores-Variables Ambientales	92
4.2.- Análisis de Componentes Principales (PCA)	96

4.3.- Análisis de Coordenadas Principales (PCO).....	107
4.4.- Análisis de Correspondencias (CA)	110
4.5.- Análisis de Correspondencias Canónico (CCA)	119
CONCLUSIONES	146
RECOMENDACIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA	150
ANEXOS	161

Índice de Tablas

Tabla 1. Localidades de muestreo en las tres zonas cacaoteras del país y sus coordenadas geográficas -----	24
Tabla 2. Parámetros de calidad utilizados en la escogencia de la matriz. -----	31
Tabla 3. Patógenos y especies de <i>Trichoderma</i> aislados de plantas enfermas y suelos de cacao, identificados a nivel de especie. Abundancia y riqueza de especies en cada una de las zonas cacaoteras muestreadas -----	43
Tabla 4. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de las especies estudiadas.-----	44
Tabla 5. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de <i>C. gloeosporioides</i> de las tres zonas cacaoteras estudiadas. -----	45
Tabla 6. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de <i>L. theobromae</i> , en las tres zonas estudiadas: Centro, Occidente y Oriente. -----	49
Tabla 7. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de <i>P. palmivora</i> , en las tres zonas cacaoteras estudiadas.-----	54
Tabla 8. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de <i>Trichoderma</i> spp. en las tres zonas estudiadas: Centro, Occidente y Oriente.-----	62
Tabla 9. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de las nueve especies de <i>Trichoderma</i> aisladas e identificadas en las tres zonas cacaoteras del país.-----	64
Tabla 10. Estimados de diversidad genética en los agentes causales de las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva en las tres zonas productoras de cacao de Venezuela. -----	70
Tabla 11. Variables utilizadas en el análisis CCorA de Patógenos-Controladores. -----	74
Tabla 12. Correlaciones Canónicas Patógenos-Controladores.-----	75
Tabla 13. Coeficientes de Redundancia para los Conjuntos de Variables Canónicas. -----	76
Tabla 14. Variables utilizadas en el análisis de CCorA de “Patógenos-Controladores” y Variables Ambientales. -----	81
Tabla 15. Correlaciones Canónicas de “Patógenos-Controladores” y las Variables Ambientales.-----	81
Tabla 16. Coeficientes de Redundancia para los Conjuntos de Variables Canónicas. -----	83
Tabla 17. Variables utilizadas en el análisis de CCorA de Patógenos-Variables Ambientales -----	87
Tabla 18. Correlaciones Canónicas de Patógenos-Variables Ambientales.-----	88
Tabla 19. Coeficientes de Redundancia para los Conjuntos de Variables Canónicas. -----	89
Tabla 20. Variables utilizadas en el análisis CCorA de Controladores-Variables Ambientales.-----	92
Tabla 21. Correlaciones Canónicas de Controladores-Variables Ambientales -----	93
Tabla 22. Coeficientes de Redundancia para los Conjuntos de Variables Canónicas. -----	94

Tabla 23. Resultados de la prueba de permutación de Monte Carlo (22 Variables Bioclimáticas).-----	120
Tabla 24. Valores propios e Inercia del CCA (22 Variables bioclimáticas).-----	125
Tabla 25. Resumen de Inercia del CCA (22 Variables Bioclimáticas).-----	125
Tabla 26. Resultados de la prueba de permutación de Monte Carlo (15 Variables bioclimáticas).-----	131
Tabla 27. Valores propios e Inercia del CCA (15 Variables bioclimáticas).-----	133
Tabla 28. Resumen de Inercia del CCA (15 Variables bioclimáticas).-----	133
Tabla 29. Resultados de la prueba de permutación de Monte Carlo (5 Variables bioclimáticas).-----	139
Tabla 30. Valores propios e Inercia del CCA (5 Variables bioclimáticas).-----	141
Tabla 31. Resumen de Inercia del CCA (5 Variables Bioclimáticas).-----	141

Índice de Figuras

Figura 1 Localidades del país muestreadas en cada zona cacaotera	25
Figura 2. Abundancia (A) y Riqueza (R) de especies en cada zona cacaotera del país	43
Figura 3. Relaciones filogenéticas entre aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 51) y de referencia del Genbank (total 10). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones superiores al 50%. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank.....	48
Figura 4. Relaciones filogenéticas entre aislados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 86) y de referencia del Genbank (total 13). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones superiores al 43%. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank.....	53
Figura 5. Relaciones filogenéticas entre aislados de <i>Phytophthora</i> spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 55) y de referencia del Genbank (total 14). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones superiores al 43%. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank.....	58
Figura 6. Relaciones filogenéticas entre aislados de <i>Moniliophthora</i> spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 30) y de referencia del Genbank (total 11). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones superiores al 43%. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank.....	61
Figura 7. Relaciones filogenéticas entre aislados de <i>Trichoderma</i> spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 59) y de referencia del Genbank (total 33). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones superiores al 24%. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank.....	66
Figura 8. Regiones en las que se agrupan los estados pertenecientes a las diferentes zonas cacaoteras del país, a partir del análisis de correlación de Pearson considerando las especies encontradas.....	68
Figura 9. Gráfico de araña. Se evidencia la incidencia relativa de las especies encontradas por región.....	69
Figura 10. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos "Patógenos" y "Controladores". Donde se observan las muestras de las tres zonas cacaoteras del país (ORI= Oriente; OCC=Occidente y C= Centro).....	77
Figura 11. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos "Patógenos" y "Controladores". Donde se observan las muestras de las tres zonas cacaoteras del país (ORI= Oriente; OCC=Occidente y C= Centro). (Acercamiento excluyendo la muestra OCC13).....	78
Figura 12. Variables de entrada obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos "Patógenos" (Y1) y "Controladores" (Y2).....	79
Figura 13. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos "Patógenos-Controladores" y las Variables Ambientales. Donde se observan las muestras de las tres zonas cacaoteras del país (ORI= Oriente; OCC=Occidente y C= Centro).....	84

Figura 14. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos-Controladores” y las Variables Ambientales. Donde se observan las muestras del Occidente del país (OCC=Occidente).....	85
Figura 15. Variables de entrada obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos-Controladores” (Y1) y “Variables ambientales” (Y2).	86
Figura 16. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos” y las Variables Ambientales. Donde se observan las muestras de las tres zonas cacaoteras del país (ORI= Oriente; OCC=Occidente y C= Centro).....	90
Figura 17. Variables de entrada obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos” y “Variables ambientales”.....	91
Figura 18. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Controladores” y las Variables Ambientales. Donde se observan las muestras de las tres zonas cacaoteras del país (ORI= Oriente; OCC=Occidente y C= Centro).....	94
Figura 19. Variables de entrada obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Controladores” y “Variables ambientales”.	95
Figura 20. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del PCA basado en la matriz de varianza-covarianza. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.	97
Figura 21. Ubicación relativa de las especies obtenida a partir del PCA basado en la matriz de varianza-covarianza.	98
Figura 22. Biplot obtenido a partir del PCA basado en la matriz de varianza-covarianza de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las especies encontradas. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.	99
Figura 23. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del PCA basado en la matriz de correlación. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.....	103
Figura 24. Ubicación relativa de las especies obtenida a partir del PCA basado en la matriz de correlación.....	104
Figura 25. Biplot obtenido a partir del PCA basado en la matriz de correlación de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las especies encontradas. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.	105
Figura 26. Biplot obtenido a partir del PCA basado en la matriz de correlación de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las especies encontradas. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país. Acercamiento al grupo central ignorando la muestra 13.	106
Figura 27. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del PCO utilizando el coeficiente de similitud de Gower. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.	108
Figura 28. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo), obtenida a partir del PCO, incorporando el tercer eje. Se aprecia la nube de datos presentando un patrón consistente. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.....	109
Figura 29. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las variables (especies) obtenida a partir del CA. Dominancia de la muestra 28 en el primer eje (dicha dominancia es debida a <i>B.parva</i>), por esta razón el resto de las muestras aparecen apiñadas en el origen de coordenadas.....	114

Figura 30. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del CA. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país. El gráfico se ha centrado en el origen de coordenadas para eliminar la dominancia de la muestra 28.	115
Figura 31. Biplot de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las variables (especies) obtenida a partir del CA. El gráfico se ha centrado en la parte apiñada del gráfico anterior, de forma de ignorar la dominancia de las muestras atípicas.	116
Figura 32. Biplot de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las variables (especies) obtenida a partir del CA. Se grafican los ejes 2 y 3 eliminando la dominancia de muestras atípicas y alinea el gradiente principal con el eje (2).	117
Figura 33. Biplot de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las variables (especies) obtenida a partir del CA. Se ha retirado a <i>B. parva</i> del análisis y, se aprecia que ahora, el gradiente principal se alinea con el primer eje, comparar con la Figura 32.	118
Figura 34. Histograma de la prueba de permutación de Monte Carlo para el CCA (22 Variables Bioclimáticas).	121
Figura 35. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del CCA (22 variables bioclimáticas). Muestras distribuidas a lo largo del primer eje. En este caso se observa nuevamente a la muestra 28 separada del grupo correspondiente.	126
Figura 36. Ubicación relativa de las variables (especies) obtenida a partir del CCA. Se aprecian a <i>M. pernicioso</i> ; <i>G. magna</i> ; <i>P. palmivora</i> y a <i>M. roreri</i> y <i>C. capsici</i> en extremos opuestos.	127
Figura 37. Triplot obtenido a partir del CCA. Se aprecian tanto las muestras (localidades o sitios de muestreo) como las variables (especies) y además las variables bioclimáticas incorporadas al análisis (vectores).	128
Figura 38. Triplot obtenido a partir del CCA. Se aprecian tanto las muestras (localidades o sitios de muestreo) como las variables (especies) y además las variables bioclimáticas incorporadas al análisis (vectores). (Acercamiento).	129
Figura 39. Arreglo tridimensional de muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenido a partir del CCA. Se aprecia que la tendencia es consistente aun cuando se incorpora el tercer eje, obsérvese la separación de las diferentes muestras por zonas.	130
Figura 40. Histograma de la prueba de permutación de Monte Carlo para el CCA (15 Variables bioclimáticas).	132
Figura 41. Biplot obtenido a partir del CCA de muestras (localidades o sitios de muestreo) y 15 variables bioclimáticas (vectores). Se aprecian las muestras alineadas con el primer eje. La muestra 28 presenta la misma tendencia descrita en el CA y CCA anterior.	134
Figura 42. Biplot obtenido a partir del CCA de muestras (localidades o sitios de muestreo) y 15 variables bioclimáticas (vectores). Eliminación de la muestra 28 (Acercamiento).	135
Figura 43. Biplot obtenido a partir del CCA de variables (especies en azul) y 15 variables bioclimáticas incorporadas al análisis (vectores).	136
Figura 44. Biplot obtenido a partir del CCA de variables (especies en azul) y 15 variables bioclimáticas (vectores). Eliminación de <i>B. parva</i> . (Acercamiento)	137

Figura 45. Triplot obtenido a partir del CCA de muestras (localidades o sitios de muestreo) como las variables (especies en rojo) y además las 15 variables bioclimáticas incorporadas al análisis (vectores).....	138
Figura 46. Histograma de la prueba de permutación de Monte Carlo para el CCA (5 Variables bioclimáticas).	140
Figura 47. Medias e intervalos de confianza para las Variables Bioclimáticas. Se presentan sólo las variables en las que se obtuvo diferencias significativas para las distintas zonas cacaoteras (Occidente, Centro y Oriente).	143
Figura 48. Biplot obtenido a partir del CCA de muestras (localidades o sitios de muestreo) y 5 variables bioclimáticas. El patrón de las muestras permanece prácticamente idéntico.	144
Figura 49. Triplot obtenido a partir del CCA de las muestras (localidades o sitios de muestreo), las variables (especies en rojo) y las 5 variables bioclimáticas (vectores) incorporadas al análisis.....	145

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo estrechamente ligado a la cultura venezolana, tanto por su origen como por su gran importancia en el desarrollo económico y social del país desde que se estableció su comercialización hace más de 350 años. Venezuela llegó a ser el primer productor mundial de cacao y éste constituyó la fuente principal de ingresos durante un largo período de la época colonial y se ha convertido en un “patrimonio irremplazable” tanto económica como culturalmente (Cartay 1997; Reyes y Capriles, 2000). Tradicionalmente, ha sido considerado como un país productor de cacao finos y de aroma de alta calidad, debido a que posee excelentes condiciones para su siembra y una gran calidad genética de los materiales. Durante varios años la Organización Internacional del Cacao (ICCO, por sus siglas en inglés) ha reportado que Venezuela exporta un alto porcentaje de cacao clasificado como fino de aroma, siendo en 2016 un 100% (Icco.org, 2016). Los principales problemas de producción del rubro, aún en sus inicios como cultivo comercial en el siglo XVII, han estado siempre asociados a las enfermedades, las cuales constituyen una de las principales limitantes del cultivo en todo el mundo (Barreto *et al.*, 2015; Parra *et al.*, 2009; Ploetz, 2016; Reyes y Capriles, 2000). Es así como en las plantaciones de cacao se han reconocido y estudiado las infecciones por numerosos patógenos fúngicos entre los que se encuentran: *Ceratocystis fimbriata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium spp.*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri*. Otro grupo importante de patógenos es el perteneciente al Reino Chromista en el que se incluyen las especies del género *Phytophthora* (Parra *et al.*, 2009). A escala mundial, el impacto relativo de las diversas enfermedades en cacao, varían considerablemente entre y dentro de las diferentes regiones de producción (Ploetz, 2016); y en este sentido, en Venezuela, la incidencia de

las mismas, los patógenos causantes, así como las pérdidas económicas que provocan, varían en magnitud e importancia, según las particularidades de cada zona o región productora.

En Venezuela, existen definidas tres regiones productoras de cacao (Leal *et al.*, 1999), a saber: la zona nororiental, conformada en orden de importancia por los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro; la zona centro norte costera, formada por los estados Miranda, Aragua y Carabobo; y la zona sur-occidental, conformada principalmente por la cuenca Sur del Lago Maracaibo, que abarca los estados Zulia y Mérida, incluyéndose en esta zona también a los estados Apure, Barinas y Táchira. Cada región tiene características propias, definidas por sus condiciones geo-ambientales, genotipos sembrados, prácticas de manejo de las plantaciones y condiciones socioeconómicas de los productores, variables que, a su vez, determinan y condicionan los problemas ocasionados por los patógenos (Capriles, 1975). Los primeros estudios sobre la problemática fitosanitaria del cultivo en cada región de Venezuela, así como el estudio de sus agentes patógenos, datan de la década de los setenta (Capriles, 1975; 1977; Parra *et al.*, 2009). En un estudio de la situación fitosanitaria del cacao a nivel nacional, entre 2006 y 2009, se señaló la dispersión de enfermedades a regiones donde antiguamente permanecían ausentes (Parra *et al.*, 2009). Estudios recientes han evaluado esta diversidad genética en algunos patógenos asociados a estas enfermedades en Venezuela, así como de *Trichoderma*, género que ha demostrado su acción potencial para proteger al cacao contra enfermedades (Molina *et al.*, 2016; Rivas & Pavone, 2010; Sosa *et al.*, 2014). Sin embargo, es necesario profundizar estos estudios ampliando el número de aislados, de patógenos, de posibles controladores biológicos y de zonas estudiadas con vistas a implementar programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), tomando en cuenta que la eficiencia en el control de los patógenos de cacao está estrechamente relacionada con las condiciones locales y propias de cada región productora.

En la actualidad, el empleo de técnicas basadas en el estudio del ADN han incrementado la capacidad y las facilidades para la correcta identificación, ubicación filogenética y caracterización de la diversidad, el estudio de los mecanismos de variación, así como la determinación de la estructura genética de poblaciones de aislados de hongos y cromistas, convirtiendo las bases de datos de secuencias de nucleótidos en un instrumento importante para el fortalecimiento de la taxonomía, especialmente para aquellas especies que tienen características morfológicas muy similares. Las tecnologías moleculares disponibles presentan una sensibilidad lo suficientemente alta como para permitir la detección de la variación entre los organismos a nivel de un solo cambio de base nucleotídica. Además, a diferencia de la taxonomía tradicional, las técnicas basadas en el estudio del ADN permiten procesar un gran número de muestras en un corto período de tiempo (Schlick *et al.*, 1994; Crawford *et al.*, 1996; Cooke *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000).

La producción futura de cacao dependerá de las regulaciones de cuarentena relativas al movimiento seguro del germoplasma la mejora continua del cultivo para la resistencia a las enfermedades y la distribución de genotipos mejorados a los productores locales (Ploetz, 2016) y de la inclusión del control biológico como pilar central y de refuerzo en estrategias integradas de manejo de plagas (MIP), en conjunto con el manejo cultural (Ten y Krauss, 2016). Por lo tanto, la identificación de la ubicación geográfica de los principales patógenos, de su prevalencia así como de la variación genética contenida dentro y entre sus poblaciones en cada región productora, tiene una importancia crucial en cualquiera de las tendencias de control de enfermedades. Por ejemplo, la determinación de *hotspots* o puntos calientes para las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva; así como el estudio de las relaciones funcionales de los agentes causales de esas enfermedades, sus posibles controladores biológicos y el ambiente, pueden permitirnos hacer

predicciones sobre la dinámica de la enfermedad en el futuro e identificar lugares donde nuevos patógenos pueden surgir; lo cual se traduce en información valiosa para el manejo y vigilancia de las enfermedades. También se constituye en información valiosa a la hora de desarrollar nuevos cultivares resistentes, considerando que el genoma fúngico es capaz de cambiar, de modo que nuevos mutantes o recombinantes pueden aumentar rápidamente la frecuencia en la población y superar los genes de resistencia presentes en los cultivares.

Esta investigación se basó en principio, en información recabada a través del sub-proyecto 6 “*Caracterización morfológica, molecular y de virulencia de patógenos asociados al cultivo del cacao*”, como parte del proyecto de Investigación en Red “Ruta del Chocolate” que comenzó en 2006, el cual buscaba hacer un estudio extenso en todas las zonas cacaoteras del país y para lo cual se realizó una alianza estratégica con las estaciones experimentales del Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA) de cada zona estudiada.

Bajo estas premisas, la propuesta de investigación que se presenta pretende contribuir al conocimiento de la base genética de las especies de patógenos asociados a las principales enfermedades del cacao en Venezuela, así como de controladores biológicos del género *Trichoderma* asociados al cultivo. Aunado a esto, se identifican los *Hotspots* de esas mismas enfermedades y las relaciones funcionales entre estos patógenos, los posibles controladores biológicos y el ambiente. Esto permitirá seleccionar aislados para ser utilizados en la identificación de genes de resistencia en programas de mejoramiento genético del cacao, seleccionar zonas idóneas para realizar mejoramiento genético en distintas enfermedades, identificar especies de *Trichoderma*, que pueden ser utilizadas como controladores biológicos y generar estrategias de manejo integrado de las enfermedades en las diferentes zonas cacaoteras del país, entre otros.

OBJETIVOS

Objetivo General: Contribuir al conocimiento de la diversidad genética de hongos y cromistas asociados al sistema agroforestal del cacao en Venezuela.

Objetivos Específicos:

1. Estudiar la diversidad genética de las especies patógenas asociadas a antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva o repentina en las tres regiones productoras de cacao de Venezuela.
2. Determinar el *hotspots* para las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva o repentina en las tres regiones productoras de cacao de Venezuela.
3. Estudiar la diversidad genética de las especies del género *Trichoderma* asociadas al cultivo de cacao en las tres regiones productoras de Venezuela.
4. Determinar las relaciones funcionales patógeno-controlador biológico-ambiente para los diferentes agentes causales de las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva o repentina y las especies de *Trichoderma*, asociadas a las tres regiones productoras de Venezuela.

ANTECEDENTES

1.- Enfermedades del cacao

En el ámbito mundial, las enfermedades que afectan al cultivo del cacao son diversas y su importancia varía entre regiones, países y continentes según la intensidad con que ellas se presentan. Muchos autores consideran que las tres enfermedades más severas del cacao son causadas por hongos y cromistas, especialmente el complejo de especies de *Phytophthora* y por los basidiomicetos *Moniliophthora roreri* y *M. perniciosa* (Correa *et al.*, 2014; Suárez, 2010; Phyllips-Mora y Cerda 2009; Ploetz, 2007). En Brasil, la producción de cacao se redujo en un 75% en 10 años debido a la escoba de bruja causada por *M. perniciosa* (Pereira, 1985). En Venezuela, las pérdidas ocasionadas por las enfermedades varían en magnitud e importancia, según las particularidades de cada zona productora, tal es el caso de la moniliasis del cacao (*M. roreri*) en el estado Barinas, la cual ocasionó el abandono de muchas fincas y actualmente causa hasta un 60% de pérdidas en las cosechas (Capriles, 1977; Parra *et al.*, 2009).

Las enfermedades del cacao a escala global han sido clasificadas considerando el origen geográfico y el grado de especialización patógeno-hospedante (Pereira, 2000). Según esta clasificación las enfermedades pueden ser: *i*) enfermedades genuinas que serían las que han coevolucionado con el cultivo y tienen un alto nivel de especialización, como la escoba de bruja y la moniliasis; *ii*) enfermedades comunes a todas las áreas de producción (como las ocasionadas por *P. palmivora*, patógeno que no se asocia con un origen definido hasta el momento), y que no están relacionadas con el cultivo, sino que se presentan a escala global y causan pérdidas significativas en la producción; *iii*) enfermedades regionales específicas, las cuales predominan en sitios distantes del origen del cacao,

causadas por patógenos de otros hospedantes que han logrado una excepcional adaptación al cacao, como *Oncobasidium theobromae* y *iv*) enfermedades que no están necesariamente asociadas con el sitio de origen, sin patrón definido de diseminación, con daños epifíticos esporádicos y que en algunos casos, se ignora si son agentes etiológicos primarios, categoría que agrupa una miscelánea de patógenos de frutos, tallos y raíces.

En Venezuela, Parra *et al.*, (2009) han clasificado a las enfermedades del cacao según su distribución de la siguiente manera: *i*) enfermedades generales de importancia, las que se presentan todo el año, en todas las regiones y que excepcionalmente llegan a provocar daños mayores a los históricos, (pudrición/ mancha parda o negra de la mazorca (complejo de *Phytophthora*)), cáncer/necrosis del tronco y de los cojines florales (*P. palmivora*), mazorca negra/ pudrición negra del fruto/ pudrición carbonosa de la mazorca/ muerte repentina o regresiva (*Lasiodiplodia theobromae*) y antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*); *ii*) enfermedades generales de menor importancia, de las cuales no se tienen observaciones documentadas sobre epifitias o pérdidas alarmantes (Complejo de agallas en el cojín floral (5 tipos), antracnosis (*C. gloeosporioides*), mancha de agua (*P. megasperma*), muerte regresiva (*L. theobromae*, *Phytophthora* spp., *Albonectria rigidiuscula* (anamorfo: *F. decemcellulare*), cáncer del tronco y de las ramas (*L. theobromae*), mazorca harinosa (*Trachysphaera fructigena*), arañera (*Pellicularia koleroga*), enfermedad rosada/ mal rosado (*Erythricium salmonicolor* y *Corticium salmonicolor*), llaga negra (*Rosellinia bunodes*) y *iii*) enfermedades regionales, las cuales se encuentran localizadas en una región de acuerdo a su importancia económica, pero que de extenderse podrían provocar pérdidas considerables y serían difíciles de controlar (Escoba de bruja (*M. pernicioso*), moniliasis/ mancha ceniza (*M. roreri*), mal de Choroní/ mal de machete/ necrosis del tronco (complejo *Xileborus*–*C. cacaofunesta*)).

El auge que ha obtenido el cultivo del cacao en los últimos 20 años ha ocasionado la dispersión de muchas plagas. Además, el interés en el cultivo ha propiciado la ampliación de las áreas sembradas y la movilización de plantas y frutos de cacao entre regiones. Probablemente, la movilización de material vegetal fue la causa de la primera aparición de la moniliasis del cacao en el estado Barinas en 1997; hasta ese año, la enfermedad estuvo restringida a la zona Sur del Lago de Maracaibo, donde ha causado severas pérdidas de cosecha y el abandono de muchas fincas. Actualmente, se encuentra en el estado Barinas (municipios Obispo, Barinas, Bolívar, Sucre, Andrés Eloy Blanco y Zamora) y en los estados Apure (municipio Páez), Táchira (municipios Ayacucho, Fernández Feo, García de Hevia y Libertador), Mérida (municipios Salas, Tulio Febres Cordero y Zea) y Zulia (municipios Colón y Francisco Javier Pulgar), en la región sur del lago de Maracaibo y afectando a cacao y copoazú en el municipio Autana del estado Amazonas (Rumbos *et al.*, 2005; Chacón *et al.*, 2009; Parra *et al.*, 2009).

Diagnósticos realizados en 2004, en la localidad de Canoabito, estado Carabobo, evidenciaron por primera vez en esa zona la presencia de escoba de bruja, cuyo agente etiológico es *M. perniciosa*. En 2007, se hizo el primer señalamiento de la mancha de agua, causada por *Phytophthora megasperma* Dreschler en Río Caribe, estado Sucre, especie que sólo había sido descrita en el sur del lago de Maracaibo, donde se cultivan los genotipos criollos Porcelana y Guasare, exclusivos de la región (Rumbos *et al.*, 2007). Estos hechos indican que en las últimas décadas ha ocurrido la dispersión de enfermedades a regiones donde anteriormente no existían. De ahí la importancia de conocer la diversidad genética asociada a estos patógenos, lo cual permitirá el diagnóstico rápido de los mismos con vistas a la toma de medidas de control adecuadas.

2.- Variabilidad genética en hongos

En los patógenos ocurre de forma natural, variación intraespecífica, siendo los principales mecanismos por los cuales se genera la variabilidad genética en las poblaciones de microorganismos fitopatógenos: i) las mutaciones (cromosómicas, por inserción y/o eliminación de fragmentos de ADN, incluyendo actividad de transposones), ii) el flujo de genes en las poblaciones (local o a largas distancias) y iii) la recombinación sexual o asexual (Burdon y Silk, 1997). Por lo general, esta variación está asociada a la patogenicidad o la virulencia del patógeno y puede ser continua o discontinua, dependiendo de la magnitud del cambio sufrido. Así la variación continua se presenta cuando se observa diferencia entre dos extremos de una población de patógenos, pero la diferencia entre los individuos es muy sutil. Por el contrario, la mutación discontinua ocurre cuando la expresión del cambio tiene efectos determinantes; por ejemplo, por mutación, un microorganismo puede perder la capacidad de producir una enzima relacionada con la patogenicidad, por lo que el mutante es incapaz de infectar al hospedante (Carlile y Watkinson, 1996). La diversidad genética de los patógenos puede afectar todos los aspectos de su biología, incluyendo las relaciones entre ellos y sus hospedantes. Esta variación genética es la que les permite adaptarse fácilmente a las cambiantes condiciones del ambiente y de esta manera, evolucionar a nuevos tipos patogénicos en función de las resistencias desarrolladas por sus hospedantes (coevolución planta-patógeno) (Carlile y Watkinson, 1996; Wang y Szmidt, 1998).

En Venezuela, son muy pocos los estudios acerca de la variabilidad genética de los patógenos asociados a las principales enfermedades del cacao y en general al agroecosistema del cacao, el conocimiento actual de la variabilidad de los mismos se limita principalmente a los caracteres morfo-fisiológicos de un pequeño número de aislados. Recién, ha sido publicado un

estudio donde se evaluó la diversidad genética de *Phytophthoraspp.* en plantaciones venezolanas de cacao mediante marcadores de tipo intermicrosatélites (ISSR) (Molina *et al.*, 2016).

3.- El espaciador interno transcrito (ITS)

El ITS es una región del ADN ribosomal (ADNr) que se encuentra entre la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU) del ADNr; se divide en ITS1 e ITS2, los cuales están separados por el gen 5,8S (Froeschke y Von der Heyden, 2014). La función de esta región no está claramente definida, sin embargo se ha reportado que puede desempeñar algún papel en la biogénesis ribosómica y en la maduración pre ADNr (Lalev y Nazar 1998; Peculis y Greer, 1998). El ADNr 5,8S es altamente conservado, mientras que los ITSs son más variables, siendo el ITS1 más variable que ITS2, debido a la presencia de unidades repetitivas que generalmente no se encuentran en este último (Tkach *et al.*, 2000, Vilas *et al.*, 2005 Nolan y Cribb, 2005). Las distintas regiones conservadas de la SSU, LSU y 5,8S han permitido el desarrollo de cebadores como los descritos por White *et al.*, (1990), los cuales han sido ampliamente utilizados en diversos estudios.

El ITS es el marcador oficial designado como el código de barras para los hongos, esta región puede ser amplificada en muchos géneros, permitiendo en la mayoría de los casos, su identificación a nivel de especie. Uno de los primeros géneros donde se asumió este marcador como código de barras para su identificación fue *Trichoderma* (Druzhinina *et al.*, 2005; Schoch *et al.*, 2012). Muchos son los trabajos que han utilizado este marcador para identificación de especies de hongos, así como para evaluar diversidad entre y dentro de especies, algunos autores lo describen como una poderosa herramienta para el estudio taxonómico de hongos (Kolawale *et al.*, 2015). Sin embargo, este marcador puede presentar algunos problemas en la

separación de especies genéticamente muy cercanas, por lo que han recomendado el uso del ITS acompañado con otros genes como los que codifican el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la glutamina sintetasa, actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintetasa I (CHS-1), ADN liasa (APN2), manganeso superóxido dismutasa (SOD2), la subunidad grande de la ARN polimerasa II (RPB1) y el factor de elongación 1- α (EF1 α), entre otros. (Weir *et al.*, 2012; Cannon *et al.*, 2012; Doyle *et al.*, 2013; Gañan *et al.*, 2015).

4.- *Hotspots* como zonas de diversidad de especies

Puntos calientes o "*hotspots*" es un término utilizado ampliamente en estudios de biodiversidad y definido por Myers (1988) como zonas que se caracterizan por poseer una gran cantidad de especies endémicas y que además se encuentran amenazadas. Este mismo autor, quien utilizó y definió el término por primera vez, identificó diez *hotspots*, centrados en bosques tropicales los cuales sirvieron de punto de partida para numerosos estudios enfocados a la conservación de esas áreas amenazadas. En el año 2000, Myers junto con otros investigadores identificaron 25 *hotspots* considerados como áreas prioritarias de conservación y señalaron que el número de especies en extinción, para ese momento, superaba ampliamente la cantidad de recursos destinados a su conservación; también definieron otro tipo de *hotspots*, como áreas con riqueza de especies raras o taxonómicamente inusuales (Myers *et al.*, 2000). Esta última definición es la base para lo que luego se identificaría como los *hotspots* genéticos, los cuales se definen como áreas en las que se superponen elevada diversidad genética y/o presencia de variantes genéticas particulares para especies filogenéticamente independientes. Esta diversidad representa el potencial evolutivo y novedades evolutivas de las distintas especies, que pueden

considerarse clave para la preservación en el largo plazo de las poblaciones (Souto *et al.*, 2015).

Estas áreas definidas como *hotspots* de diversidad, han sido objeto de numerosos estudios tanto para diseñar planes de conservación como para evaluar distintos aspectos relacionados con esas áreas y las especies allí presentes; tal es el caso del estudio realizado por Migheliet *al.*, 2009, donde evaluaron en un *hotspots* de biodiversidad en el Mediterráneo, los mecanismos de biodiversidad, geografía, y especiación de *Hypocrea* / *Trichoderma*, encontrando una fuerte reducción de especies nativas, las cuales han sido reemplazadas por la invasión de especies provenientes de Eurasia, África y la Cuenca del Pacífico.

En el caso de este estudio la determinación de los *hotspots* o puntos calientes para las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva en las tres zonas productoras de cacao de Venezuela, será con dos finalidades: i) Mejoramiento del rubro, identificando los sitios donde se pueden seleccionar nuevos cultivares resistentes, considerando que el genoma fúngico es capaz de cambiar, de modo que nuevos mutantes o recombinantes pueden aumentar rápidamente la frecuencia en la población y superar los genes de resistencia presentes en los cultivares; ii) Predecir la dinámica de dichas enfermedades e identificar los lugares donde pueden surgir nuevos patógenos; lo cual se traduce en información valiosa para el manejo y vigilancia de las enfermedades. Hasta ahora, los *hotspots* para las enfermedades del cacao, no se han determinado en el país, sin embargo, en otros rubros y otras latitudes, si han sido utilizados y recomendados, como por ejemplo en arroz y trigo y más recientemente en virus (Correa *et al.*, 1997; Beuningen y Kohli 1987; Savory *et al.*, 2014).

5.- Géneros de hongos y cromistas a estudiar

5.1.- *Colletotrichum Corda* 1831: Es un género perteneciente al Phylum Ascomycota, Orden Glomerellales, Familia Glomerellaceae (Cabi Bioscience, 2017). Las especies de *Colletotrichum* interactúan con numerosas especies de plantas, bien sea como patógenos sintomáticos o como endófitos asintomáticos. Son la causa de los tizones, de la antracnosis y de numerosas podredumbres pre y postcosecha (Bailey y Jeger 1992; Rojas *et al.*, 2010). *Colletotrichum* spp. Infecta diversas especies de plantas de manera individual o en asociación. Se han identificado infecciones mezcladas de diferentes especies de *Colletotrichum* en cacao, fresa, banano, olivo, aguacate, mango, tomate de árbol, ñame, entre otros (Xiao *et al.*, 2004; Talhinhos *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2010; Salazar, *et al.*, 2013; Pinzón *et al.*, 2013, Gañán *et al.*, 2015).

***Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.** como agente fitopatogénico: Anamorfo de *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk; es el agente causal de la antracnosis en cacao, es de distribución cosmopolita y con predominancia en los trópicos y subtrópicos (Freeman *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2004). Este hongo afecta las hojas, ramas y frutos y se da con mayor frecuencia en época seca. En el follaje se presentan las infecciones, mayormente en las hojas tiernas, que son las más susceptibles. En frutos jóvenes, la enfermedad se hace más severa, pues causa la muerte total por la momificación del fruto; también pueden apreciarse manchas circulares hundidas, de coloración marrón oscura y manchas secas antracnósicas bordeadas de un halo amarillo a lo largo del fruto; en ambos síntomas, cuando las manchas se unen pudren completamente la cáscara del fruto. En condiciones de alta humedad ambiental, se pueden observar crecimientos de puntos rosado salmón sobre las manchas, que son las esporas del hongo, estos son pegajosos al tacto y pueden transmitirse de

frutos enfermos a frutos sanos por insectos y también por la mano del hombre (Parra *et al.*, 2009).

Algunos autores han demostrado que determinados hongos referidos a *Colletotrichum* son endófitos foliares y pueden conferir beneficios a plantas hospedantes de cacao, en términos de reducir la incidencia de enfermedades y daños causados por otros patógenos. Por ello, se ha sugerido que estos endófitos asintomáticos foliares podrían desempeñar un papel en el control biológico de enfermedades del cacao (Herre *et al.*, 2007; Mejía *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2010; Mejia *et al.*, 2014).

Diversas técnicas moleculares, han sido ampliamente utilizadas para el estudio del género *Colletotrichum*, permitiendo una delimitación de las fronteras entre especies y la asignación de *C. gloeosporioides sensu lato* y *C. acutatum*, como complejos de especies de patógenos de plantas y hongos endófitos (Weir *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012). El futuro de la biología de *Colletotrichum* dependerá de la clasificación por consenso y de herramientas de identificación sólidas, para ello se ha creado una subcomisión sobre *Colletotrichum* bajo los auspicios de la Comisión Internacional de Taxonomía de Hongos, la cual administrará una base de datos de códigos de barras cuidadosamente curada para la identificación secuencial de especies dentro del entorno web de BioloMICS (Doyle *et al.*, 2013).

5.2.- *Lasiodiplodia* Ellis & Everli 1896: Es un género perteneciente al Phylum Ascomycota, Orden Botryosphaerales, Familia Botryosphaeriaceae (Cabi Bioscience, 2017); que agrupa diversas especies que pueden ser tanto endófitos como patógenos de un amplio rango de hospedantes, principalmente de árboles del trópico y subtrópico, entre los que se encuentra el cacao.

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl. como agente fitopatogénico: Anamorfo de *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & Curt.) v. Arx, es el agente etiológico de la enfermedad conocida como muerte súbita, repentina o regresiva del cacao. En Venezuela esta enfermedad fue reportada por primera vez en 1941 y está clasificada como de importancia general. Puede presentarse en todas las zonas productoras de cacao y durante todo el año, sin embargo, no existe cuantificación de pérdidas a causa de la misma (Parra *et al.*, 2009). En otros países productores de cacao, como Camerún, donde la enfermedad fue reportada por primera vez en 1895, ha causado la muerte hasta del 100% de los árboles en algunas granjas convirtiéndose en un obstáculo importante para la producción de cacao (Mbenoun *et al.*, 2008).

Esta enfermedad afecta tallos, raíces, frutos y ramas, limitando la capacidad fotosintética y por tanto productiva de la planta. La sintomatología característica es el amarillamiento de las hojas jóvenes y luego el necrosado de los bordes, hasta que invade toda la hoja, causando finalmente la muerte de ramas o de la planta completa. *Lasiodiplodia* también afecta a frutos, produciendo la enfermedad conocida como “pudrición carbonosa de las mazorcas” y está asociada a insectos coleópteros conocidos como “coquitos escopeteros”; cuando el número de estos insectos es elevado, realizan numerosas perforaciones en el tallo que semejan el tiro de una escopeta de perdigones, estos coquitos trasladan al hongo de planta en planta y generalmente se ubican en las horquetas o en las ramas jóvenes (Rumbos *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2009).

Estudios moleculares basados en el ITS y el factor de elongación 1 α (EF1 α) han permitido la identificación de nuevas especies y potenciales especies crípticas en *Lasiodiplodia*, así como la evaluación de sus relaciones filogenéticas con su teleomorfo *Botryosphaeria* (Burgess *et al.*, 2006; Alves *et*

al., 2008). Marcadores dominantes como los ISSR y RAPD y codominantes como los SSR han sido utilizados en el estudio de estas mismas relaciones y en la evaluación de la diversidad del género (Zhou *et al.*, 2001; Mohali *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2008; Cardona *et al.*, 2012; Picos-Muñose *et al.*, 2014).

5.3.- *Phytophthora* de Bary 1876: Este género pertenece al Reino *Chromista*, Phylum Oomycota, Orden Peronosporales, Familia Peronosporaceae (Cabi Bioscience, 2017). *Phytophthora* significa “destructor de plantas” y sus especies son responsables de las enfermedades más devastadoras en plantas dicotiledóneas como el cacao (Irwin, 1997). Esta especie, es el agente causal del cáncer del tronco y pudrición o mancha parda o negra de la mazorca. Según Evans, (2007) las pérdidas mundiales debidas a este patógeno se calculan en alrededor de 450.000 toneladas métricas, lo que representaría alrededor del 20 al 25% de la cosecha esperada.

***Phytophthora* spp. como agente fitopatogénico:** La pudrición parda de las mazorcas de cacao fue señalada por primera vez en 1727, en Trinidad (Tollenar, 1958) y es la enfermedad más antigua conocida en el cultivo. *P. palmivora* (E.J. Butler), fue inicialmente considerada como la única especie causante de dicha enfermedad (Butler, 1919). En Venezuela, esta enfermedad ha sido la más importante del cultivo del cacao debido a la magnitud de sus daños. Plantaciones enteras se han abandonado por la muerte total de las plantas debido al carácter vascular de algunos daños causados por cáncer del tronco (Capriles, 1978). Se han señalado como agentes causales de esta enfermedad, además de *P. palmivora* a otras cuatro especies de *Phytophthora*: *P. capsici* Leonian, *P. citrophthora* (R.E.Sm. & E.H. Sm) Leonian, *P. megasperma* Drechsler y *P. parasítica* Dastur. De las cinco especies, *P. palmivora* es la única que se encuentra presente en todas las zonas productoras del país. Las otras especies

presentan una distribución geográfica diferencial; es así como, en la región centro norte costera, se han identificado a *P. capsici* y *P. citrophthora* y en la zona sur del Lago de Maracaibo -zona sur-occidental- y en la zona nororiental, específicamente en la cuenca de Río Caribe, se ha identificado a *P. megasperma* (Reyes, 1972; Parra y Subero, 2000; Rumbos *et al.*, 2007). Un estudio realizado con marcadores ISSR sugiere la presencia en Venezuela de tres especies de *Phytophthora*, que afectan a las plantaciones de cacao; sin embargo, se recomienda la identificación molecular, mediante secuenciación, para verificar esta presunción (Molina *et al.*, 2016).

5.4.- *Moniliophthora* H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny 1978:

Género perteneciente al Phylum Basidiomycota, Orden Agaricales, Familia Marasmiaceae (Cabi Bioscience, 2017), que alberga especies ampliamente diseminadas en el trópico. La moniliasis causada por *Moniliophthoralaroreri*, es la enfermedad más destructiva del cacao en América Latina, en donde es endémica. Estudios moleculares sugieren que Colombia y Ecuador pudiesen ser el centro de origen de la enfermedad, debido a que en dichos países se ha encontrado una alta diversidad genética del hongo; de allí, éste se ha dispersado por toda Mesoamérica hasta llegar a México (Phillips *et al.*, 2005, Phillips *et al.*, 2007, Correa *et al.*, 2014). Otros investigadores también apoyan la hipótesis que la enfermedad se originó en Suramérica debido a que aquí encontraron las dos formas de reproducción del hongo (sexual y clonal) y que posteriormente se introdujo en Centroamérica donde solo se evidenció reproducción clonal, sin embargo a través de este tipo de reproducción se ha propagado rápidamente; este estudio también muestra que lo que algunos investigadores creían eran diferentes variedades del hongo son en realidad las variaciones genéticas en los dos tipos de apareamiento. Estos hallazgos abren la puerta a programas de mejoramiento para investigar qué tipo de

apareamiento es más virulento y posiblemente desarrollar cultivares de cacao resistentes(Díaz-Valderrama y Aime 2016).

En Venezuela, desde su primer reporte en 1941 hasta 1994, esta enfermedad estuvo confinada a la zona sur del Lago de Maracaibo, posteriormente se ha encontrado en los estados Zulia, Táchira, Mérida, Barinas, Apure, Trujillo y Amazonas. (Parra *et al.*, 2009).

***Moniliophthora spp.* como agente fitopatogénico:** Dos especies del género causan dos de las principales enfermedades del cacao. *M. roreri* (Cif. H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny) agente causal de la moniliasis del cacao y *M. perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, agente causal de la escoba de bruja. (Aime y Phillips 2005).

M. roreri afecta los frutos del cacao, comenzando por la aparición de una mancha húmeda con presencia de micelio blanco, el cual va cambiando de color hasta tornarse grisáceo. En el interior del fruto se va produciendo una desecación del mucílago y de las almendras hasta su total momificación (Parra *et al.*, 2009). Las esporas de este hongo se perpetúan en el follaje, tronco, cojines florales y musgos, por lo que el traslado de plantas o semillas de cacao criollo merideño o porcelana es sumamente arriesgado. Debido al carácter destructivo de la moniliasis, las autoridades venezolanas han dictado medidas cuarentenarias con el fin de prevenir su dispersión. El Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras prohíbe el traslado de material de cacao (excepto almendras beneficiadas) desde los estados Mérida, Zulia, Táchira, Apure y Barinas hacia los estados libres de la enfermedad (Gaceta Oficial N° 37.901, ordinales 193 y 145 de fecha 18 de marzo del 2004).

Se han realizado estudios moleculares en *M. roreri*, con la finalidad de identificación así como para evaluar su diversidad y sus relaciones genéticas con *M. pernicioso*. En dichos estudios se han utilizado diferentes marcadores moleculares como los ITS, RAPD, AFLP, ISSR y SSR. Esto ha permitido determinar en la especie una alta diversidad genética, alta variabilidad y adaptación a diferentes condiciones ambientales, así como su estrecha relación genética con *M. pernicioso* (Phillips *et al.*, 2003; Cunha, 2006; García *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2007, Gutarra *et al.*, 2013; Suarez 2016).

5.5.- Trichoderma Pers.1794: Género perteneciente al Phylum Ascomycota, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae (Cabi Bioscience, 2017). Bissett (1991) estableció la subdivisión del género en cinco Secciones: *Hypocreanum*, *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Saturnisporum* y *Trichoderma*; pero el uso combinado de marcadores moleculares (análisis de las secuencias de los espaciadores ribosomales ITS1 e ITS2, RAPD), marcadores fisiológicos, análisis de isoenzimas, caracteres morfológicos y análisis de los teleomorfos potenciales de *Trichoderma* spp. de la sección *Longibrachiatum*, permitió la fusión de esta sección con la sección *Saturnisporum*. Esto sugirió un grado de correlación entre los criterios morfológicos y los moleculares para la correcta clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp. (Druzhinina y Kubicek, 2005). En Venezuela se han descrito las especies: *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. brevicompactum*, *T. theobromicola*, *T. koningiopsis*, *T. ovalisporum*, *T. asperellum*, *T. pleurotum*, *Hypocrea lixii* (anamorfo: *T. harzianum*), *Hypocrea virens* (anamorfo: *T. virens*), *T. ghanense*; *T. erinaceum*; *T. atroviride*; *T. reesei* *T. spirale* (Bautista y Acevedo, 1993; Pérez y Escalona, 1995; Rivas y Pavone 2010; Sosa *et al.*, 2014; Pavone & Dorta 2015).

Trichoderma es un género muy diverso, y en los últimos 15 años la taxonomía y la filogenia del mismo han experimentado un tremendo refinamiento a nivel de especie. Este refinamiento se debe al desarrollo de los marcadores filogenéticos utilizados para *Trichoderma* como los de la región ITS, los exones *rpb2* y *tef1*, o el intrón 5 de *tef1* y el intrón 4 de *tef1* en combinación con el intrón 5. Además, otros genes, menos variables han sido utilizados (como *cal1* o *chi18-5*), para cumplir con el concepto de la concordancia genealógica de reconocimiento de especies filogenéticas (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition(GCPSR)) (Jaklitsch y Voglmayr 2015).

Trichoderma spp. como agente de control biológico (ACB):Weindling (1932) fue el primero en demostrar la naturaleza micoparasítica de los hongos del género *Trichoderma* sobre especies de *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, sugiriendo su uso potencial como ACB de hongos fitopatógenos. Sin embargo, el primer experimento de control biológico utilizando *Trichoderma* en condiciones de campo fue realizado por Well *et al.*, (1972) utilizando *T. harzianum* para controlar *Sclerotium rolfsii* Sacc. Aunque el nombre *T. harzianum* es casi un sinónimo de agente de control biológico debido a su amplio uso, son varias las especies que se utilizan con el mismo fin (Hermosa *et al.*, 2000; Kullnig *et al.*, 2000, Galarza *et al.*, 2015). Las más utilizadas contra hongos patógenos son *Trichoderma virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) (Miller *et al.*, 1957), *T. harzianum* Rifai, *H. lixii* y *T. viride* Pers.:Fr. (Samuels, 1996). Las distintas especies de *Trichoderma* poseen diferentes mecanismos de biocontrol, como parasitismo, antibiosis, competencia por espacio y nutrientes; *Trichoderma* también es capaz de promover el crecimiento y desarrollo de las plantas e inducir la respuesta de defensa frente a patógenos; sin embargo, dentro de estas mismas especies existen cepas que exhiben distintos potenciales como ACB, llegando en algunos casos a ser casi nulo su efecto (Jiménez *et al.*, 2011;Galarza *et al.*, 2015).

En cacao se ha evaluado el potencial de distintas especies de *Trichoderma* en el control de diversos patógenos. Principalmente se ha estudiado el efecto antagonista de este género en los hongos *Moniliophthora rorei* y *Moniliophthora perniciosa*, encontrándose dentro de las especies *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. virens* y *T. theobromicola* cepas candidatas para el control de los patógenos mencionados (Rivas y Pavone 2010; Galarza *et al.*, 2015; Reyes-Figueroa *et al.*, 2016). Una revisión sistemática de las estrategias de control de estos dos patógenos, arrojó que se ha venido estableciendo como una de las principales prácticas, la utilización de agentes biológicos, como hongos y bacterias, dentro de los cuales las especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. stromaticum*, *T. hamatum*, *T. asperellum* y *T. ovalisporum*) han jugado un rol importante en el control de estos dos patógenos (Tirado-Gallego *et al.*, 2016). En algunas especies de *Phytophthora* que causan enfermedades en cacao, como *P. palmivora* y *P. megakarya*, también se ha evaluado el efecto antagónico de *Trichoderma*, encontrándose cepas de las especies *T. asperellum* y *T. martiale*, como controladoras de esas enfermedades (Tondje *et al.*, 2007; Hanada *et al.*, 2009; Deberdt *et al.*, 2008).

Dado el auge de las enfermedades en cacao a causa de baja variabilidad genética en los materiales que se siembran, poca resistencia a enfermedades, mal manejo de las plantaciones, condiciones ambientales propicias, intercambio de material genético entre otros factores y considerando las grandes pérdidas que éstas provocan, hay quienes concluyen que se necesitan acciones holísticas en múltiples frentes para abordar este problema (Drenth y Guest, 2016).

METODOLOGÍA

1.- Muestreo de plantas sintomáticas: Se realizaron muestreos durante los años 2008-2013 en las tres principales zonas cacaoteras de Venezuela. En la zona nororiental, se muestreó en los estados Sucre y Monagas; en la zona centro norte costera, se muestreó en los estados Miranda, Aragua y Carabobo; y en la zona sur-occidental se muestreó en los estados Zulia, Mérida, Apure, Barinas, Táchira y Lara (Tabla 1). Con el registro de parcelas productivas de cada zona se seleccionaron, utilizando un muestreo no probabilístico –a conveniencia-, aquellas parcelas que previa observación presentaron síntomas de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva. Para cada parcela se registraron los datos básicos referidos a su ubicación, coordenadas geográficas, altitud, hectáreas sembradas de cacao, nombre del propietario y de la finca. Se tomaron muestras de tallos, frutos, ramas, hojas y cojines florales. Las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas e identificadas con el número de la planta y de la muestra y se colocaron en una cava para su traslado al laboratorio y posterior aislamiento y caracterización. Para los aislados pertenecientes al género *Trichoderma*, se tomaron muestras de suelo.

2.- Aislamiento y purificación de colonias de hongos y cromistas: Estos aislamientos se realizaron en los laboratorios de fitopatología de INIA-Miranda, INIA-Zulia y Área de Agricultura y Soberanía alimentaria (ASA) del IDEA.

2.1.- Aislamiento de hongos y cromistas patógenos de cacao: Las muestras se procesaron mediante el método del plato de agar para tejidos vegetales. El tejido afectado se lavó con abundante agua corriente y luego con agua destilada, se tomaron cinco trozos de la zona de avance de la infección de 2 mm aproximadamente, los cuales se desinfectaron en

hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min y luego se sometieron a doble lavado con agua destilada estéril, los fragmentos se sembraron en una placa de Petri con el medio agar papa dextrosa (PDA), se colocaron los cinco puntos equidistantes, finalmente se selló la placa con papel parafilm®. Tanto la desinfección como la siembra se realizaron en campana de flujo laminar. Posteriormente, los fragmentos se incubaron a 26°C en condiciones de oscuridad durante 4-5 días, tras los cuales se realizó una primera observación para verificar el desarrollo de los hongos.

2.2.- Aislamiento de hongos a partir de suelo: Las muestras de suelo se secaron en estufa a 50°C durante 48 h, luego se disolvieron 10gr de cada muestra en 90 ml de agua destilada estéril con 0,01% de Tween 20, se agitó fuertemente y después se dejó en reposo durante 40 min. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} en H₂O dd con 0,01% de Tween 80. Con 0,1 ml de cada una de estas diluciones se sembraron placas con medio agar-agua y otras con agar malta 2% (p/v). Estas placas se dejaron en incubación durante 24, 48 y 72 h a temperatura ambiente. Al comenzar el crecimiento micelial, las colonias se repicaron a nuevas placas, las cuales se incubaron a temperatura entre 25 y 28°C. A los cuatro o cinco días se realizó una primera observación para verificar el desarrollo del hongo.

2.3.- Purificación de colonias: Crecidas las colonias de interés, se realizaron las purificaciones, para lo cual se extrajo un disco de la colonia deseada con ayuda de un sacabocado y con una aguja de disección se sembró en una placa de Petri con medio PDA; el disco se colocó en el centro de la placa y luego se procedió a flamear y sellar los bordes de la cápsula, la cual se colocó en una incubadora a 25°C. A los cuatro o cinco días se realizaron observaciones para verificar el desarrollo del hongo. Las cepas se encuentran conservadas en la micoteca del laboratorio de Microbiología del ASA - IDEA.

Tabla 1. Localidades de muestreo en las tres zonas cacaoteras del país y sus coordenadas geográficas

Zona	Estado	Municipio	Localidad	Longitud	Latitud
Centro	Miranda	Andrés Bello	Manatí	-66,0348	10,3414
	Miranda	Andrés Bello	El Tesoro	-66,0507	10,2683
	Miranda	Acevedo	Araguita - La Pastora	-66,9006	10,1286
	Miranda	Acevedo	El Jobito	-66,2816	10,1046
	Miranda	Acevedo	Tapipa - Padrón	-66,3425	10,2222
	Miranda	Brión	Panaquire	-66,2393	10,2161
	Miranda	Brión	Birongo	-66,2394	10,4811
	Miranda	Brión	Curiepe	-66,0925	10,4623
	Aragua	Girardot	Choroní	-67,6103	10,4936
	Aragua	Ocumare de la Costa de Oro	Ocumare	-67,7681	10,4533
	Carabobo	Naguanagua	Las Trincheras-Las M.	-68,0873	10,3052
	Carabobo	Bejuma	Canoabo-Canoabito	-68,2786	10,3091
Occidente	Zulia	Colón	Moralito-Los Morales	-71,7695	8,8019
	Zulia	Colón	Moralito-Abanico	-71,803	8,8939
	Zulia	Colón	Moralito-Km41	-71,7425	8,7242
	Zulia	Colón	Mosíoco	-71,6987	8,8478
	Zulia	Jesús María Semprun	Casigua el Cubo	-72,5153	8,7486
	Zulia	Rosario de Perijá	El Rosario-Los Tangues	-72,3163	10,3258
	Zulia	Francisco Javier Pulgar	Simón Rodríguez-Crucero	-71,6089	8,9645
	Zulia	Francisco Javier Pulgar	Burra Mocha	-71,6519	8,9577
	Táchira	Fernández Feo	El Piñal	-71,9592	7,5299
	Mérida	Alberto Adriani	Héctor Amable-Mucujepe	-71,5925	8,6677
	Mérida	Alberto Adriani	Héctor Amable-Las Adjuntas	-71,5861	8,6661
	Mérida	Caracciolo Parra Olmedo	Tucaní-Monte Bello	-71,1648	8,9688
	Mérida	Caracciolo Parra Olmedo	Río frío	-71,3479	8,8914
	Mérida	Zea	Chuco	-71,7802	8,4205
	Barinas	Pedraza	Chuponal	-70,589	8,4185
Lara	Andrés Eloy Blanco	Escalera	-69,5154	9,7297	
Oriente	Sucre	Arismendi	Chacaracual	-63,1087	10,687
	Sucre	Arismendi	El Bordial	-63,1087	10,7018
	Sucre	Arismendi	La Concepción	-63,0141	10,632
	Sucre	Cajigal	Yaguaraparo-Ag.sant.	-62,8253	10,5663
	Sucre	Andrés Eloy Blanco	Rómulo Galle.-La Pal.	-63,1852	10,3525
	Sucre	Mariño	Irapa Marabal	-62,5695	10,6157
	Sucre	Mariño	Irapa-Campo Claro	-62,5494	10,5943
	Monagas	Bolívar	Sector El amparo	-63,5469	9,8789
	Monagas	Bolívar	Caripito-Las Parcelas	-63,1573	10,1206



Figura1.- Localidades del país muestreadas en cada zona cacaotera

3.- Identificación preliminar de especies basada en la morfología: Se realizaron observaciones macroscópicas de las colonias, para la evaluación de las características de colores de la parte frontal y del envés, borde, textura y zonificación. Estas observaciones permitieron una identificación preliminar y una agrupación de los hongos según la morfología de la colonia (Barnett y Hunter (1972 y 1998); Evans (1981); Samuels *et al.*, 2011). Esta identificación se realizó en los laboratorios de fitopatología de INIA-Miranda, INIA-Zulia y ASA - IDEA.

4.- Identificación de especies basada en la secuenciación de la región

ITS: Esta identificación se realizó en el laboratorio de Biología molecular del ASA-IDEA.

4.1.- Extracción de ADN: De cada aislado se extrajo el ADN genómico utilizando la metodología reportada por Naranjo *et al.*, (2007) con algunas modificaciones. La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y la cuantificación se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop.

4.2.- PCR-ITS: Para la amplificación por PCR de la región ITS del ADNr a partir de ADN genómico, se utilizaron los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') descritos por White *et al.* (1990), que amplifican el fragmento ITS1-5.8S-ITS2. La reacción se realizó en un volumen total de 25µl, el cual contenía: buffer PCR 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, cebadores 0,25 uM, 40ng de ADN y 1U de GoTaq® Flexi Polimerasa (Promega). El programa de PCR utilizado comenzó con un ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 40 segundos, 55°C por 40 segundos y 72°C por 40 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos resultantes de la amplificación fueron purificados y secuenciados para su posterior análisis. La secuenciación se realizó en el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CESAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

5.- Análisis de las secuencias:

5.1.- Identificación de especies: Se procesaron bioinformáticamente, todas las secuencias nucleotídicas obtenidas, con los programas Chromas Lite, versión 2.1.1 y BIOEdit 7.2.5, con el fin de generar las secuencias consenso. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en el registro

nucleotídico del Genbank (base de datos del National Center for BIOTEchnology Information) (NCBI) utilizando la aplicación Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990). De esta misma base de datos se tomaron secuencias depositadas de los géneros en estudio, como secuencias de referencia, las cuales se incluyeron en las matrices de secuencias para los correspondientes análisis. Las secuencias obtenidas para el género *Trichoderma*, también fueron comparadas con las disponibles en la base de datos específica para este género, TrichOKey (Druzhinina *et al.*, 2005). Los alineamientos y cortes de todas las secuencias se realizaron con el programa DAMBE versión 2013.

5.2.- Estimación de la diversidad genética: Con las secuencias alineadas se procedió a evaluar la diversidad genética para cada uno de los géneros estudiados. Se evaluó la diversidad genética entre y dentro de cada zona cacaotera y se estimó a partir del número de haplotipos (H), diversidad de haplotipos (H_d) y la diversidad nucleotídica (π). Además se estimó la diferenciación entre poblaciones, mediante el cálculo del índice F_{st} y el flujo de genes (N_m según Nei 1982). Para estos cálculos se utilizó el programa DnaSP 5.10.01. Los niveles de diferenciación genética fueron categorizados como alta diferenciación ($F_{st} > 0,25$); moderada diferenciación (F_{st} de 0,15 a 0,25) y baja diferenciación ($F_{st} < 0,15$) (Wright, 1978). Los niveles de flujo genético fueron categorizados como: alto flujo de genes ($N_m \geq 1$), moderado flujo de genes (N_m de 0,25 a 0,99) y bajo flujo de genes ($N_m \leq 0,25$) (Govindajuru, 1989). Se construyó un árbol filogenético para cada uno de los géneros estudiados, a partir de las secuencias obtenidas y de las secuencias de referencia, para ello se utilizó el programa MEGA 5 y como método estadístico Neighbor-joining, aplicando un remuestreo de 1000 repeticiones (Bootstrap). Para determinar el modelo de sustitución de bases nucleotídicas más adecuado para el grupo de secuencias analizadas, se utilizó el programa ModelTest (Posada y Crandall, 1998), implementado “*on-line*” como

FindModel

(<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>). Este programa arrojó que General Time Reversible plus Gamma (modelo 55) (AIC 1783.84) era el modelo que mejor se adaptaba al set de secuencias estudiadas, pero este modelo no lo incluye el MEGA 5 por lo tanto, se utilizó: Tamura-Nei Model (AIC 1784.34).

6.- Determinación del *Hotspots* de las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva en las tres regiones productoras de cacao de Venezuela.

La determinación de los *Hotspots* para las enfermedades mencionadas, se realizó de dos maneras: i) Determinación de *Hotspots* geográficos, considerando la abundancia de especies y ii) Determinación de *Hotspots* genéticos, donde se considera la diversidad genética de las especies y la presencia de variantes genéticas particulares o haplotipos.

6.1.- Determinación de *Hotspots* geográficos: Se construyeron matrices de presencia-ausencia por estado para los patógenos, (Anexo 1a, 1b, 1c). A partir de estas matrices se estimó el coeficiente de correlación de Pearson por estados, esto permitió separar claramente dos grupos geográficos de patógenos y las especies que hacen la diferencia principal para la separación de los mismos. A las tendencias encontradas por esta vía se les practicó luego “Análisis de Correlación Canónica”, los detalles de este análisis se describen en el aparte 7.5; los cálculos y las figuras fueron realizados en el programa R empleando específicamente los paquetes *fsmb* (Coale A. y McNeil D. 1972) y *qgraph* (Epskamp *et al.*, 2012).

6.2.- Determinación de *Hotspots* genéticos: Se utilizaron los valores de número de haplotipos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica, calculados en el aparte 5.2, para cada especie agente causal de las enfermedades estudiadas.

7.- Evaluación de las relaciones funcionales patógeno-controlador-ambiente:

7.1.- Organización y Procesamiento de datos. Para estudiar las relaciones funcionales patógeno-controlador-ambiente, se construyeron tres matrices binarias de presencia-ausencia de las especies de patógenos y de *Trichoderma* en cada zona, donde cero (0) representa ausencia y uno (1) presencia. Estas tres matrices son producto de la combinación de datos de distinta fuente y calidad, y por tanto, de niveles de confiabilidad diferentes. El procedimiento de construcción y selección de diferentes matrices de datos se realizó con la finalidad de incorporar la mayor cantidad de información y, al mismo tiempo, cuidar la calidad de la misma, es decir, obtener la mejor combinación de cantidad y calidad, con los datos disponibles. En la primera matriz se incluyeron sólo las especies encontradas que se identificaron molecularmente; la segunda matriz incluyó a las anteriores especies más las identificadas morfológicamente, que no pudieron ser identificadas a nivel molecular, pero sobre las cuales se tiene un alto nivel de certeza acerca de su identidad; y una tercera matriz donde se incluyeron todas las anteriores especies, más las que se presumen estaban presentes, por haber observado síntomas de las enfermedades que ellas causan, pero que no pudieron ser aisladas. Vistas las tres matrices y ponderando las ventajas y desventajas de las diferentes combinaciones de cantidad y calidad del dato (Tabla N° 2), se decidió utilizar la matriz N° 2, en el resto de análisis de este trabajo (Anexo2). Esta matriz conjuga un porcentaje importante de especies identificadas por vía molecular (84,2%), con especies caracterizadas morfológicamente (15,8%), pero de las cuales se tiene gran certeza acerca de su identidad.

Tabla 2. Parámetros de calidad utilizados en la escogencia de la matriz.

Matriz	Presencias	Identificación Molecular (%)	Identificación Morfológica (%)	Observación de síntomas	Calidad	Cantidad
1	128	100	0	0	Alta	Baja
2	152	84,2	15,8	0	Media	Media
3	191	67,02	12,57	20,42	Baja	Alta

En cada sitio de muestreo se registraron las coordenadas geográficas, información ésta que integrada en la matriz de presencia-ausencia, permitió que, utilizando el programa DIVA-GIS (DIVA-GIS 7.5.0.0 desarrollado por Robert J. Hijmans, 2005), se extrajeran valores de 19 variables bioclimáticas procedentes de la base de datos BIOCLIM (Anexo 3), así como otras variables como “tipo y uso del suelo” y “altitud”. Esta nueva matriz de variables bioclimáticas (MatrizBioclimática o MB, ver Anexo 2) se corresponde de forma unívoca con la de presencia-ausencia seleccionada (Matriz 2). Con las matrices antes mencionadas y con los programas MVSP (MultiVariate Statistical Package) versión 3.1, XLSTAT Versión 18.07.39045 y STATGRAPHICS Centurion XVI, versión 16.1.03., se hicieron los análisis siguientes: Componentes Principales (PCA) sobre la matriz de varianza-covarianza y la matriz de correlación; Análisis de Coordenadas Principales (PCO), Análisis de Correspondencia (CA), Análisis de Correspondencias destendenciado y un Análisis de Correspondencias Canónico (CCA) donde se incluyó una restricción adicional que es la matriz de variables bioclimáticas (MB). Estos análisis permiten explorar los datos de forma secuencial desde diferentes perspectivas, avanzando por varios niveles de explicación para los patrones observados. Cada uno de los análisis anteriormente nombrados tiene ventajas y desventajas, esto en función de la naturaleza de los datos que se dispone. Los análisis de correlación de Pearson, para estudiar la relación de presencia de patógenos por Estado, fueron realizados en el programa R, empleando específicamente los paquetes fsmb y qqgraph. A continuación se describirá brevemente cada uno de los métodos utilizados,

se mencionan algunas generalidades, en qué variaciones se han utilizado y la razón por la cual se utilizó (para una revisión profunda de los métodos aquí empleados se puede consultar en Legendre & Legendre, 2012).

7.2- Análisis de Componentes Principales (PCA): es uno de los métodos de ordenación más antiguos y conocidos, fue descrito por Karl Pearson (1901). Matemáticamente consiste en un eigenanálisis, bien sea de la matriz de varianza-covarianza o de la matriz de correlación, que se calcula sobre los datos medidos originalmente. Gráficamente pudiese ser descrito como la rotación de una nube de puntos en un espacio multidimensional, de tal manera que su eje más largo (que es el de mayor varianza), coincida con el primer “componente principal”, el segundo eje de mayor variación se hará entonces coincidir con el segundo componente principal y así sucesivamente. Este segundo eje tiene la restricción adicional de ser ortogonal al primero. Es así que con unos pocos ejes se puede representar un conjunto multidimensional, sin perder en el proceso mucha de la variación original. Este análisis, a pesar de ser uno de los más versátiles no siempre arroja buenos resultados. Por ejemplo, el PCA no se recomienda cuando los datos son de tipo presencia-ausencia, sino más bien para variables continuas, sin embargo, la sola inspección por este análisis suele dar una idea aproximada del conjunto de los datos. Con este sentido se ha realizado este análisis en este trabajo, más como una herramienta exploratoria que como una confirmatoria.

7.3- Análisis de Coordenadas Principales (PCO): es un método de ordenación (también llamado “Escalamiento Multidimensional”) parecido al PCA, pero que trabaja sobre una matriz de similaridad, la cual, para ser generada requiere que las variables sean una “métrica”. Para que una medida sea considerada una “métrica” debe seguir una serie de reglas matemáticas que no se detallaran aquí, pero que básicamente exigen que las

distancias deben poder ser vistas de una cierta forma, por ejemplo, entre un conjunto de tres puntos debe poder dibujarse un triángulo, cosa esta que no siempre es posible. En este estudio, para la aplicación del PCO se ha escogido la distancia Gower, que ha demostrado ser especialmente valiosa cuando se tienen matrices con muchos ceros (las matrices de presencia-ausencia suelen tener este inconveniente). La posibilidad de poder escoger entre una gran variedad de distancias hace al PCO una herramienta mucho más general que el PCA, pues puede trabajar con variables de muchos tipos. Una de sus principales ventajas es que es un método que permite analizar cualquier tipo de variable. Una desventaja podría ser que la ordenación que arroja se usa básicamente para comparar muestras (sitios o localidades de muestreo), y no dice nada acerca de las variables que generan el arreglo (en este caso las especies). Sin embargo, suele interpretarse como una muy buena aproximación a la similitud de las muestras. Las muestras más cercanas son más parecidas entre sí.

7.4- Análisis de Correspondencias (CA) y Análisis de Correspondencias

Canónico (CCA): El CA es considerado como un método de gradiente “indirecto”, mientras que el segundo CCA se le clasifica como un método de gradiente “directo”. El CA es un análisis desarrollado para trabajar específicamente con datos de la forma de “tablas de contingencia”, en las cuales una cantidad de objetos distintos se enumeran. Este método es conocido bajo diferentes nombres como: ponderación recíproca, escalamiento dual, análisis factorial de las correspondencias. Se calcula de forma similar al PCA, mediante un eigenanálisis. Sin embargo, difiere en que en lugar de usar la matriz de varianza-covarianza o de correlación, se genera una nueva matriz de similaridad, la cual se obtiene transformando la matriz original por los totales de sus filas y columnas. Lo que se produce como consecuencia es una matriz basada en distancia Chi-cuadrada en lugar de una matriz de distancia Euclídea (como en PCA). El CA también se puede

llevar a cabo mediante una técnica que se denomina ponderación recíproca (reciprocal averaging), en la cual puntajes (scores) de los casos son estimados de los puntajes de las variables, a través de un proceso de ponderación, luego un nuevo puntaje de las variables es calculado a partir de los puntajes de los casos así obtenidos y el proceso se repite de forma cíclica hasta lograr convergencia. Con este proceso se obtienen los puntajes de los casos y las variables para el primer eje. El proceso se repite tomando en cuenta el primer resultado y se obtiene el segundo eje y así sucesivamente. Los dos métodos descritos llevan a resultados idénticos, aunque podrían estar en escalas diferentes. El producto final son dos conjuntos de puntajes, uno para los casos y otro para las variables. Estos pueden ser graficados juntos o separados. En muchos estudios en ecología se ha demostrado que el CA se comporta mejor que el PCA particularmente cuando la rotación de especies es alta y algunos casos en los que en un extremo del gradiente tienen muy poca similitud con los del otro extremo. Sin embargo, CA es especialmente susceptible a la dominancia de casos o especies inusuales o periféricas. Esto se manifiesta cuando se tiene un caso (en este estudio los “casos” no son más que las muestras) muy diferente al resto, entonces este suele aparecer en el extremo del primer eje y el resto de los mismos empaquetados en otro extremo. En estos casos algunos autores recomiendan el remover estos casos, mientras otros recomiendan no remover estas muestras por ningún motivo. En este trabajo se ha optado por no remover casos y cuando se hace, siempre es luego de haber analizado primero la configuración original. También se ha utilizado otra alternativa que consiste en ignorar el primer eje (el cual está dominado por el dato anómalo) y centrarse en los posteriores.

El CA también es susceptible a dos fallas que son comunes a muchos métodos de ordenación. La primera y más prominente es lo que se llama el “efecto arco” o, alternativamente, el “efecto herradura” (horseshoe effect).

Con este efecto, los puntos están dispuestos en un patrón arqueado a lo largo de los dos primeros ejes, en lugar de un patrón lineal como cabría esperar. Este arco es un resultado del proceso de reducción de datos y representa una relación matemática entre los dos primeros ejes, que se supone que son independientes. El efecto es particularmente pronunciado cuando ha sido muestreado un gradiente ambiental largo, de modo que los casos de un extremo son mayormente o completamente diferentes de los del otro extremo. El segundo fallo, que es el resultado del primero, es la compresión de puntos de datos en los extremos de los ejes. Pares de casos que son igualmente disímiles aparecerán más juntos en los extremos de los ejes que en el medio, por tanto, distorsionando la distancia entre estos pares. Ambas de estas fallas se pueden corregir aplicando un Análisis de correspondencia “destendenciado” (DCA).

DCA corrige el efecto de arco de la siguiente manera: Después de extraer los dos primeros ejes con la técnica de promediado recíproco, el primer eje se divide en varios segmentos. Los puntajes en el segundo eje para cada punto se ajustan entonces para que la puntuación media de los puntos dentro de cada segmento sea la misma que en otros segmentos. Esto es como cortar el diagrama de dispersión en una serie de tiras verticales y mover cada uno hacia arriba y hacia abajo hasta que los puntos están en una línea recta. Las puntuaciones se ajustan a lo largo del primer eje para que estén más uniformemente espaciados. Esta técnica ha sido criticada por varias razones, pero para los efectos de este trabajo la más importante es que en el proceso de eliminación de un posible efecto arco, pudiese arrastrar también un patrón intrínseco a los datos originales (Palmer, 1993). Es decir, en el intento de eliminar un efecto pernicioso para la tendencia, se pudiese eliminar también uno que se está tratando de describir. Es por ello que se ha evitado utilizar el proceso de destendenciado en este trabajo cuando se ha realizado CA.

Todos los métodos de ordenación hasta ahora descritos son métodos de análisis de gradiente indirecto. En estos, los datos son sometidos a algún tipo de manipulación matemática para revelar las tendencias más importantes en los datos. Estas tendencias se comparan a menudo con otros datos relativos a las mismas muestras para determinar la relación entre los dos conjuntos. Para dar un ejemplo ecológico, los datos ambientales como la precipitación o el pH en un lago serían comparados con las tendencias observadas en los datos de especies. Estas comparaciones a menudo se realizan ya sea a simple vista o realizando un procedimiento estadístico, como la regresión, sobre las especies y los datos ambientales. Por otra parte, los métodos de análisis de gradiente directo, abarcan técnicas para relacionar los datos de las especies directamente con los datos ambientales, en lugar de tener que pasar por dos pasos. Hasta hace poco esto significaría graficar las especies individualmente contra unos pocos parámetros ambientales para ver los patrones. Sin embargo, cualquier análisis que tuviera más de tres especies o variables ambientales requeriría varios diagramas para mostrar todos los datos. Lo que se necesita entonces es un método que incorpore los datos ambientales directamente en el análisis, que es precisamente lo que hace el método que describimos a continuación.

El Análisis de Correspondencias Canónico (CCA) es un método de análisis de gradiente directo multivariado (Ter Braak, 1986). Método este que se ha convertido en uno de los más ampliamente utilizados en Ecología. Como su nombre indica, este método se deriva del CA, pero se ha modificado para permitir incorporar los datos de variables ambientales. Se calcula utilizando el método de la correspondencia recíproca. Sin embargo, en cada ciclo del proceso de promediado, se realiza una regresión múltiple de las puntuaciones de la muestra sobre las variables ambientales. Los nuevos puntajes de los sitios (en nuestro caso las muestras) se calculan sobre la base de esta regresión, y luego el proceso se repite, continuando hasta que

las puntuaciones se estabilicen. El resultado es que los ejes de la ordenación final, en lugar de simplemente reflejar las dimensiones de mayor variabilidad en los datos de las especies, están constreñidos también a ser combinaciones lineales de las variables ambientales. De esta manera, estos dos conjuntos de datos están entonces directamente relacionados. Los resultados del CCA se pueden presentar en un diagrama que contiene las variables ambientales trazadas como flechas que emanan del centro del gráfico, junto con puntos para las muestras y especies (a este gráfico suele llamársele triplot). Las relaciones entre las muestras y las especies son como en el CA; cada punto de muestreo se encuentra en el centroide de los puntos para las especies que se producen en esas muestras. Las flechas que representan las variables ambientales indican la dirección de cambio máximo de esa variable a través del diagrama. Si una flecha para pH apunta a la derecha del diagrama, esto indica que el pH está aumentando a lo largo de un gradiente de izquierda a derecha. La longitud de la flecha es proporcional a la velocidad de cambio, por lo que una flecha de pH larga, indica un cambio grande e indica que el cambio en el pH está fuertemente correlacionado con los ejes de ordenación y, por lo tanto, con la variación de la comunidad mostrada por el diagrama. La posición relativa de las especies en el diagrama con respecto a las flechas de las variables ambientales (la cual se determina trazando líneas perpendiculares desde el punto a la flecha) indica la preferencia ambiental de esa especie. Uno de los inconvenientes que presenta el CCA es que este ignora cualquier estructura de los datos de composición que no esté relacionada con las variables ambientales. Es por esto que se debe acompañar con otros análisis que arrojen luces en donde este falla (en nuestro caso hemos usado CCorA).

En este caso, en el CCA, se incluyen las variables bioclimáticas, definidas como variables biológicamente más significativas, utilizadas en estudios de distribución de especies y en técnicas de modelado ecológico. Estas

variables se derivan de los valores mensuales de precipitación y temperatura, pero representan las tendencias anuales, como por ejemplo la temperatura media anual, la precipitación media anual, y los factores ambientales extremos o limitantes, por ejemplo, la temperatura del mes más frío y cálido y la precipitación de los trimestres más secos y húmedos (Hijmans *et al.*, 2005). Los promedios se han tomado por 50 años.

Cuando se realiza un CCA se pueden usar las pruebas de permutación usando el método de Monte Carlo, esto para determinar la importancia de las relaciones entre la composición de las especies y las variables ambientales (Ter Braak, 1986). Es decir, con este método se puede hacer prueba de hipótesis. Estas pruebas se realizaron en este trabajo al realizar un CCA. Por otra parte, el ruido en el conjunto de datos de abundancia de especies no es un problema importante para el CCA (Palmer, 1993). Sin embargo, se ha argumentado que el ruido en los datos ambientales sí puede ser un problema (McCune, 1997). No es de extrañar que el ruido en las variables predictoras cause ruido en los puntajes muestrales, pues estos últimos son combinaciones lineales de las primeras. Con la intención de minimizar cualquier efecto de este tipo, se ha escogido como opción de escalamiento en CA y CCA, la denominada “por muestras” (by Samples en inglés), de forma de eliminar los problemas referidos por McCune (1997), pues cuando se usa este tipo de escalamiento se ha demostrado que es inmune al ruido ambiental. Cuando se realiza este tipo de escalamiento, las muestras se presentan en el centroide de las especies que estas contienen y las distancias entre muestras representan una aproximación a la distancia chi-cuadrado.

El CCA ha demostrado ser robusto y no necesitar el procedimiento de destendenciado, así como también ha probado ser robusto ante problemas habituales de la regresión múltiple como la multicolinealidad (Palmer,

1993). En particular, el CCA es inapropiado para respuestas de gradiente corto, tal que cada especie se eleva o cae en una función lineal o monótona con respecto al gradiente (Palmer, 1993). El gradiente que se ha evaluado en este estudio tiene una longitud de unos 1000 km, con lo cual no se tiene este problema.

7.5- Análisis de Correlación de Pearson y Análisis de Correlaciones Canónicas (CCorA). Como se comentó en el aparte anterior, a las tendencias encontradas en el Análisis de Correlaciones de Pearson se les exploró mediante “Análisis de Correlación Canónica” (CCorA por sus siglas en inglés) de forma de explorarlas más a fondo y establecer los niveles de significación de las tendencias observadas. El CCorA puede ser un instrumento adecuado para tratar los supuestos en los que se dispone de información de un conjunto numeroso de variables que pueden agruparse en dos grupos, el primero formado por las variables explicativas y el segundo por las explicadas y, además, dentro de cada grupo se observa un elevado grado de correlación entre las variables. En el análisis de correlación canónica se examina la relación lineal entre un grupo de variables, X, y un grupo, o más de un grupo, de variables Y. La técnica consiste en encontrar una combinación lineal de las variables $X = (V1 = b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_pX_p)$ y otra combinación lineal de las variables $Y = (U1 = a_1Y_1 + a_2Y_2 + \dots + a_qY_q)$ de tal manera que la correlación entre U y V sea máxima. A estas combinaciones lineales se denominan variables canónicas, y las correlaciones entre los correspondientes pares de variables canónicas se denominan correlaciones canónicas y se interpretan como variable respuesta o variables dependiente, mientras que las variables X representan variables predictivas o variables independientes. El análisis de correlación canónica se aplica a situaciones en las que es adecuada la técnica de la regresión pero existe más de una variable dependiente. Otra aplicación útil es para probar la independencia entre los dos grupos de

variables, Y y X. En el caso que nos compete hemos visualizado que pudiesen existir redes complejas de dependencia (como suele suceder en las relaciones ecológicas), entre las presencias de los patógenos y uno o varios posibles controladores, así como relaciones de dependencia con una o varias variables bioclimáticas, es por ello que no limitamos el análisis a una sola variable.

En este caso las relaciones exploradas son las siguientes:

1. Patógenos-Controladores
2. Conjunto “Patógenos-Controladores” y las Variables Ambientales.
3. Patógenos-Variables Ambientales
4. Controladores-Variables Ambientales

Como variables ambientales se utilizaron las más importantes obtenidas del CCA (bio1, bio3, bio4, bio14 y bio15). Las matrices analizadas fueron obtenidas dividiendo la Matriz 2 en dos partes, la correspondiente a los patógenos (P) y la correspondiente a los posibles controladores (C).

Las variables siempre fueron estandarizadas restándoles primero sus medias y dividiéndolas entre sus desviaciones estándar. Se estableció un nivel de confianza del 95,0%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Riqueza y abundancia de especies:

En las tres principales zonas cacaoteras del país, se muestrearon órganos de plantas sintomáticas y suelos en 37 localidades. Se obtuvo un número importante de aislados, los cuales se agruparon según su morfología para seleccionar los géneros objeto de este estudio. De los cinco géneros estudiados se obtuvieron 340 aislados, y se logró la identificación a nivel de especie de 281 de ellos. La causa por la cual el resto de los aislados no fueron identificados molecularmente, fue fundamentalmente la baja calidad del ADN obtenido, lo que impidió la amplificación de la región ITS, en otros casos, aunque se logró la amplificación del ITS, no se obtuvo una buena calidad de la secuencia.

Mediante la utilización de la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se logró la identificación molecular de varias especies dentro de los grupos morfológicos: En el grupo morfológico identificado como *Colletotrichum* (51 aislados), se identificaron tres especies (*C. gloeosporioides*, *C. capsici* y *Glomerella magna*) y el teleomorfo de *C. gloeosporioides* (*G. cingulata*); en el grupo morfológico identificado como *Lasiodiplodia* se identificaron cuatro especies en los 86 aislados (*L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *Botriosphaeria mamane* y *Botriosphaeria parva*); en el grupo morfológico identificado como *Phytophthora* se identificaron dos especies en los 55 aislados (*P. palmivora* y *P. bisheria*); en el grupo morfológico identificado como *Moniliophthora* se identificaron dos especies en los 30 aislados (*M. roreri* y *M. perniciosa*) y en *Trichoderma* se identificaron en los 59 aislados, 9 especies (*T. harzianum*, *T. reesei*, *T. virens*, *T. ghanense*, *T. brevicompactum*, *T. koningiopsis*, *T. spirale*, *T. assperellum*, *T. erinaceum*) y el teleomorfo de *T. harzianum* (*Hypocrea lixii*).

Las especies encontradas por zona, en las 37 localidades muestreadas, se detallan en la tabla N°3, donde se aprecia una abundancia de 281 aislados y una riqueza de 20 especies. Dentro de los patógenos, las especies más abundantes son: *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora palmivora* y *Moniliophthora roreri*, las cuatro primeras especies presentes en las tres zonas cacaoteras del país y agentes causales de cuatro enfermedades importantes, a saber: muerte regresiva, antracnosis, mancha parda y cáncer de tronco; la última especie presente solo en la zona Occidental del país y causante de la enfermedad conocida como moniliasis. Estas cuatro especies de patógenos abarcaron el 73,31% de los aislamientos totales. Del género *Trichoderma*, las especies más abundantes fueron *T.harzianum*, *T. virens*, y *T.koningiopsis*; las dos primeras presentes en las tres zonas cacaoteras del país, mientras que la última se encontró en las zonas de occidente y oriente. Estas tres especies de *Trichoderma* abarcaron el 13,17% del total de los aislados.

La zona occidental, presentó la mayor abundancia y riqueza de especies, tanto de patógenos (10 de 11 especies) como de *Trichoderma* (8 de 9 especies); La Figura 2, muestra la riqueza y abundancia para cada zona, donde se evidencia que la zona del occidente del país, es la zona con mayor diversidad de especies; esto podría atribuirse a que ésta fue la zona con más sitios muestreados. En el país no existen reportes hasta el momento de la riqueza y abundancia de especies en el sistema agroforestal del cacao, ésta sería una primera aproximación de manera general que incluye tanto patógenos como especies de *Trichoderma*. Uno de los estudios realizados en el país sobre diversidad en el agroecosistema del cacao, es el reportado por Rivas y Pavone (2010), donde evaluaron la diversidad de especies de *Trichoderma* en la rizósfera de plantas de cacao en el estado Carabobo, encontrando a *T. harzianum* como la especie más abundante, resultado que

concuera con los reportados en este trabajo donde la misma especie es una de las más abundantes a nivel nacional y en la zona central del país.

Tabla 3. Patógenos y especies de *Trichoderma* aislados de plantas enfermas y suelos de cacao, identificados a nivel de especie. Abundancia y riqueza de especies en cada una de las zonas cacaoteras muestreadas

N°	Especies aisladas	Número de aislados	N° de aislados en Centro	N° de aislados en Occidente	N° de aislados en Oriente
1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	49	6	23	20
2	<i>Glomerella magna</i>	1	1	0	0
3	<i>Colletotrichum capsici</i>	1	0	1	0
4	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	77	29	29	19
5	<i>Botryosphaeria mamane</i>	5	4	1	0
6	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	3	0	1	2
7	<i>Botryosphaeria parva</i>	1	0	1	0
8	<i>Moniliophthora roreri</i>	27	0	27	0
9	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3	1	2	0
10	<i>Phytophthora palmivora</i>	54	26	4	24
11	<i>Phytophthora bisheria</i>	1	0	1	0
12	<i>Trichoderma reesei</i>	4	2	0	2
13	<i>Trichoderma harzianum</i>	17	6	4	7
14	<i>Trichoderma virens</i>	7	1	3	3
15	<i>Trichoderma asperellum</i>	3	0	2	1
16	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	4	0	4	0
17	<i>Trichoderma ghanense</i>	2	0	2	0
18	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	17	0	13	4
19	<i>Trichoderma spirale</i>	2	0	2	0
20	<i>Trichoderma erinaceum</i>	3	0	3	0
	Total	281	76	123	82

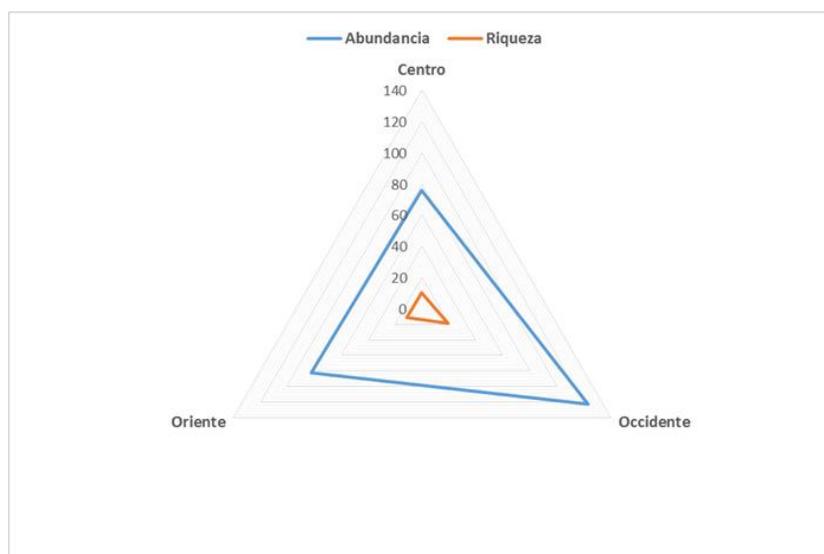


Figura 2. Abundancia (A) y Riqueza (R) de especies en cada zona cacaotera del país

2.- Diversidad Genética:

Las secuencias de la región ITS, se lograron para 281 aislados. Se amplificaron fragmentos entre 462 y 667 pares de bases (pb) dependiendo del género. Para el género *Colletotrichum* se amplificaron secuencias de 462pb, para *Lasiodiplodia* secuencias de 467pb, para *Phytophthora* de 667pb, para *Moniliophthora* de 594pb y para *Trichoderma* de 493pb.

Una vez alineadas las secuencias para cada una de las especies estudiadas y haciendo uso del programa DnaSP, se obtuvieron los estimados de polimorfismo, los cuales se presentan en la Tabla N° 4. Todos los parámetros se estimaron para evaluar la diversidad genética de las especies estudiadas, a partir de las secuencias de la región genómica ITS.

Tabla 4. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de las especies estudiadas.

Espece	N	pb	h	Hd±sd	Pi (π) ± SD
<i>C. gloeosporioides</i>	49	462	8	0,45±0,09	0,009±0,004
<i>L. theobromae</i>	77	467	10	0,52±0,06	0,005±0,001
<i>M. roreri</i>	27	594	3	0,53±0,06	0,001±0,000
<i>P. palmivora</i>	54	667	11	0,34±0,08	0,002±0,001
<i>Trichoderma sp.</i>	59	493	13	0,86±0,02	0,027±0,001

N=N° total de secuencias; pb = tamaño de la secuencia en pares de bases; h= N° de haplotipos; Hd= diversidad de haplotipos; Pi (π)= diversidad de nucleótidos.

Estos resultados muestran similares niveles de diversidad en las especies de patógenos estudiadas a pesar de tratarse de especies muy distintas, se puede apreciar en todas ellas una media a baja diversidad genética, tanto a nivel de nucleótidos como de haplotipos. En *Trichoderma*, se puede observar mayor diversidad genética a nivel de nucleótidos y de haplotipos, lo que es de esperarse, pues es una diversidad interespecífica donde se están considerando las 9 especies encontradas en este estudio. A continuación se

detalla la diversidad genética encontrada para cada especie de patógeno estudiada y para *Trichoderma* como controlador biológico.

2.1.- Diversidad Genética en *Colletotrichum gloeosporioides*

El total de 49 aislados identificados como *C. gloeosporioides* (tamaño en sus secuencias de 462 pb.), generó 8 haplotipos y demostró tener media a baja diversidad genética, tanto a nivel de nucleótidos ($\pi= 0,009$) como de haplotipos ($Hd= 0,45$) (Tabla N° 4 pag. 44).

Tabla 5. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de *C. gloeosporioides* de las tres zonas cacaoteras estudiadas.

Zona	N	h	Hd	Pi (π)	Fst	Nm (Nei 1982)
Centro	6	1	0	0,000	0,005	12,9
Occidente	23	5	0,32	0,008		
Centro	6	1	0	0,000	0,087	
Oriente	20	6	0,66	0,014		
Oriente	20	6	0,66	0,014	0,010	
Occidente	23	5	0,32	0,007		

N=N° total de secuencias; H= N° de haplotipos; Hd= diversidad de haplotipos; Pi (π)= diversidad de nucleótidos y Nm= Flujo Genético.

En las tres zonas estudiadas se observaron distintos índices de diversidad genética (Tabla N°5), siendo la zona oriental la que mostró mayor diversidad ($\pi=0,014$ y $Hd= 0,66$) y la de menor diversidad la zona central ($\pi=0,000$ y $Hd= 0,00$). Se encontraron muy bajos niveles de diferenciación genética entre las tres zonas ($Fst < 0,15$) y un alto grado de flujo génico ($Nm=12,9$); sugiriendo que el agente causal de la enfermedad de antracnosis en cacao (*C. gloeosporioides*) es poco variable a nivel nacional y podría definirse como una misma población genética afectando las tres zonas cacaoteras del país.

En Venezuela no se han realizado estudios de diversidad genética de *C. gloeosporioides* en cacao que permitan comparar nuestros resultados, sin embargo (Domínguez-Guerrero *et al.*, 2012), evaluaron la variabilidad genética de *C. gloeosporioides* en plantaciones de palma aceitera en Venezuela, encontrando alta uniformidad en sus aislados con la región ITS e idénticos patrones de bandas en fragmentos de restricción de estas mismas secuencias, lo que los hizo concluir que la población estudiada tenía una estructura fundamentalmente clonal, no obstante realizaron una evaluación con marcadores RAPDs y determinaron la presencia de diferentes subgrupos, esto les hizo presumir que se pudiera estar en presencia de otras especies dentro del complejo *C. gloeosporioides* no detectadas en su trabajo, dadas las limitaciones que para este género presentan las filogenias basadas exclusivamente en regiones ITS. Estos resultados en conjunto con los encontrados en este estudio, hacen suponer que la diversidad genética del género en Venezuela es baja, sin embargo sería recomendable evaluar otros genes o regiones del genoma en aislados de *C. gloeosporioides*, en distintos rubros y distintas zonas del país.

Diversos autores (Rojas, *et al.*, 2010, Weir *et al.*, 2012), han reportado a *C. gloeosporioides* como un complejo de especies con alta diversidad interespecífica y han estudiado su diversidad y relaciones filogenéticas con ITS y otros genes o regiones, tales como el factor de elongación 1 α (5' *tef1*), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, alegando que el uso de la región ITS ha mostrado limitaciones en la detección de variabilidad y baja resolución filogenética en especies estrechamente relacionadas. (Rojas *et al.*, 2010), también evaluaron la diversidad entre cepas endófitas y patogénicas de *Colletotrichum* encontrando que ambas cepas con esos distintos modos ecológicos se ubicaron en grupos o clados distintos.

Son muchos los rubros de importancia agrícola que se ven afectados por este patógeno a escala mundial, es por ello que su identificación a nivel de especie, así como el estudio de su diversidad, filogenia, patogenicidad, producción de metabolitos secundarios, entre otras características, siguen siendo objeto de estudio (Cai *et al.*, 2009; Pinzón Gutiérrez *et al.*, 2013; Gañán *et al.*, 2015).

La figura N° 3 muestra las relaciones filogenéticas entre los aislados de las diferentes especies de *Colletotrichum* encontradas en las zonas muestreadas y las 10 secuencias de referencia. Se pueden apreciar dos grupos; el primer grupo (GI) lo integran todos los aislados identificados en este estudio como *C. gloeosporioides*, dos de las secuencias de referencia de *C. gloeosporioides*; *Glomerella cingulata* (teleomorfo de *C. gloeosporioides*); *C. capsici* y las secuencias de referencia identificadas como *C. capsici* y el GII lo integran el aislado identificado en este estudio como *G. magna*, las secuencias de referenciade *G. magna* y tres secuencias de referencia de *G. gloeosporioides*. Este agrupamiento expone la baja variabilidad encontrada dentro de la especie *C. gloeosporioides* y su cercana relación con *C. capsici*, la cual pudiese estar incluida dentro del complejo de especies de *C. gloeosporioides*. Para visualizar mejor el árbol filogenético, se eliminó la rama más larga o con mayor número de aislados y se sustituyó por tres asteriscos (***) los códigos o nombres de estos aislados se detallan en la leyenda colocada al pie de la figura N°3.

Las especies encontradas en este estudio, además de *C. gloeosporioides* fueron: *Glomerella magna* (estado sexual o teleomorfo de *C. magna*) y *C. capsici*; las cuales son causantes de antracnosis en rubros como cucurbitáceas, leguminosas y frutales pero no han sido reportadas en el país y tampoco como patógenos de cacao (Rajamanickam & Sethuraman, 2014; Tapia-Tussell *et al.*, 2016). Cabe destacar que algunas de las secuencias de

referencia de *C. gloeosporioides* se ubicaron lejos de la mayoría de su especie, sin embargo, por tratarse de secuencias obtenidas del GeneBank, se presume que pudieran estar mal identificadas o con errores en la secuencia ingresada a esa base de datos como lo reporta (Cai *et al.*, 2009).

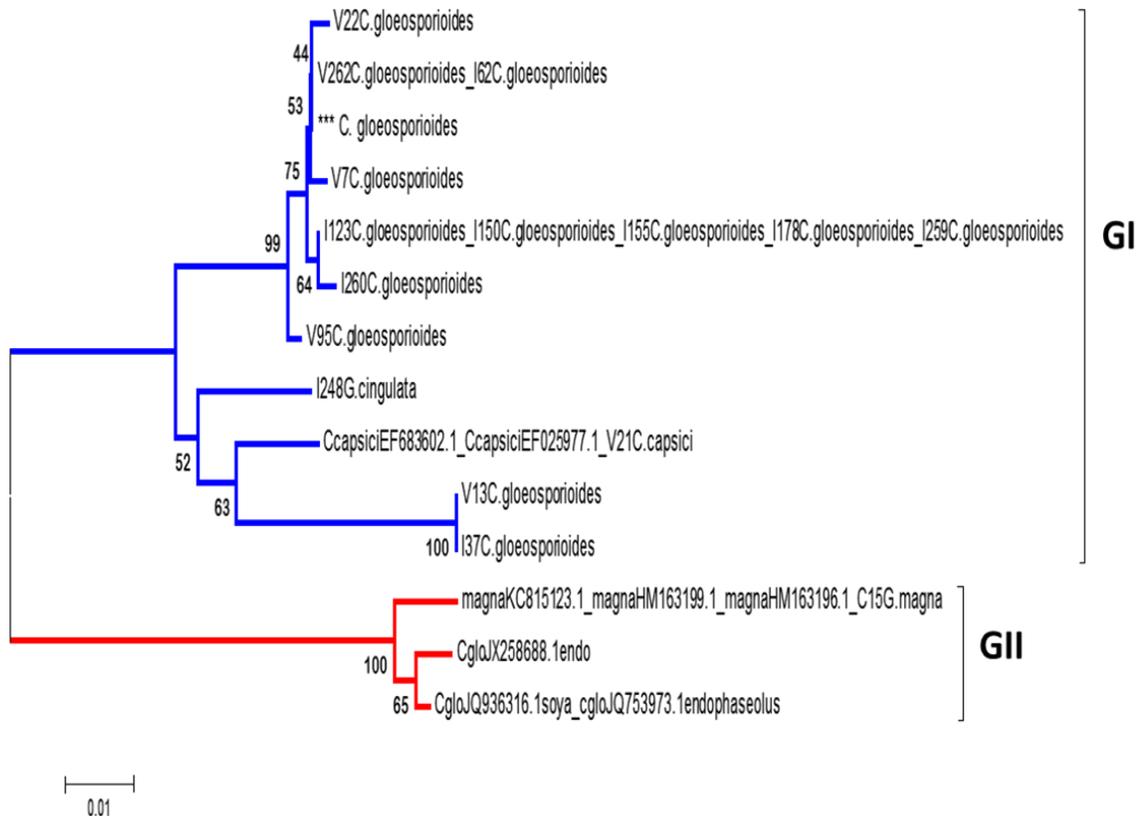


Figura 3. Relaciones filogenéticas entre aislados de *Colletotrichum* spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 51) y de referencia del Genbank (total 10). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank.

Leyenda Figura 3:

****C. gloeosporioides*

(KJ777825;KF923863;C98;C111;C116;C186;C220;C231;V3;V5;V6;

V45C;V64C;V147;V155;V170;V203;V260;V263;V273;V274;V333;V357;V444;V470;V4

71;I50;I73;I104;I114;I142;I151;I153;I209;I247;I233;I331).

2.2.- Diversidad Genética en *Lasiodiplodia theobromae*

El total de 77 aislados identificados como *L. theobromae* (tamaño en sus secuencias de 467 pb.), generó 10 haplotipos y demostró tener una diversidad genética de media a baja, por su moderada diversidad haplotípica ($Hd=0,52$) y su baja diversidad a nivel de nucleótidos ($\pi= 0,005$) (Tabla N° 4 pag.44).

Tabla 6. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de *L. theobromae*, en las tres zonas estudiadas: Centro, Occidente y Oriente.

Zona	N	h	Hd	Pi (π)	Fst	Nm (Nei 1982)
Centro	29	7	0,48	0,007	0,015	5,28
Occidente	29	4	0,41	0,003		
Centro	29	7	0,48	0,007	0,160	
Oriente	19	4	0,63	0,005		
Occidente	29	4	0,41	0,003	0,101	
Oriente	19	4	0,63	0,005		

N=N° total de secuencias; H= N° de haplotipos; Hd= diversidad de haplotipos; Pi (π)= diversidad de nucleótidos y Nm= Flujo Genético.

En las tres zonas estudiadas, se observan distintos índices de diversidad genética (Tabla N° 6), siendo la zona de menor diversidad la Occidental ($\pi= 0,003$ y $Hd=0,41$) mientras que en las otras dos zonas se observa, en la zona Central mayor diversidad nucleotídica (Centro $\pi= 0,007$ y $Hd=0,48$) y en la Oriental mayor diversidad haplotípica ($\pi= 0,005$ y $Hd=0,63$). En todo caso la diversidad observada es de moderada a baja. En cuanto a diferenciación genética, se pudo observar una moderada diferenciación entre las zonas de Centro y Oriente ($Fst > 0,15$) y una baja diferenciación entre Centro y Occidente y entre Occidente y Oriente ($Fst < 0,15$) observándose también un alto valor de flujo genético.

En Venezuela, la diversidad genética de *L. theobromae* como patógeno de cacao no ha sido estudiada, sin embargo, se evaluó en tres especies de árboles forestales (Pino, Acacia y Eucalipto) encontrándose baja diversidad, poca diferenciación genética entre las poblaciones de árboles estudiadas y alto flujo de genes (Mohali *et al.*, 2005), resultados que coinciden con los nuestros y podrían evidenciar tal como esos mismos autores sugieren, que *L. theobromae* en Venezuela es una especie introducida; esto aunado a que en ese estudio y en el nuestro no se encontró su fase sexual (*Botryosphaeria rhodina*), podría explicar la baja diversidad genética encontrada en el país. En general, nuestros resultados muestran una baja diferenciación genética de la especie en las zonas estudiadas, sin embargo se evidenció una moderada diferenciación genética entre las zonas de Oriente y Centro, diferenciación que pudiese ser explicada por barreras geográficas, si se realizara el análisis dentro de cada zona y se determinara cuales localidades específicamente hacen esta diferencia, pues como barrera geográfica encontramos la cordillera de la costa que pudiese estar influyendo en tal diferenciación, para esta especie; Mohali *et al.*, (2005) sí atribuyen la diferenciación genética encontrada en su estudio entre las poblaciones de Venezuela, México y Suráfrica a barreras geográficas, pues sus distancias geográficas son considerables.

Otros autores como Al-Sadi *et al.*, (2013), también han evaluado la diversidad de diferentes especies de *Lasiodiplodia* afectando frutales en los Emiratos Árabes Unidos y encontraron moderada a baja diversidad dentro de cada especie, incluyendo *L. theobromae*, igualmente Shah, *et al.* (2010), en India utilizando marcadores moleculares SSR y RAPD, encontraron altos coeficientes de similitud entre los aislados evaluados, resultados que evidencian poca variabilidad dentro de la especie.

En cacao, *L. theobromae* ha sido reportada como el agente causal de la enfermedad de muerte regresiva, sin embargo, Sosa *et al.*, (2016) la reportan como uno de los patógenos, que junto con *Fusarium decemcellulare*, fueron aislados e identificados en síntomas de la enfermedad de agallas de cojín del cacao. Estos mismos autores señalan su comportamiento endofítico, al igual que Mohali *et al.*, (2005) quienes agregan que este comportamiento, la amplia gama de hospederos, la falta de evidencia para la especialización del huésped y la aparición de síntomas en frutos después de su cosecha, dificultan las estrategias de manejo de la enfermedad.

Por otro lado, aprovechando el comportamiento endofítico de este hongoy que se encuentra en un amplio rango de hospedantes, recientemente se han logrado aislar nuevos compuestos naturales bioactivos denominados lasiodiplodinas, a los cuales se les está evaluando su efecto citotóxico en células cancerígenas (Li *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016). Esta viene a ser una ventaja de su comportamiento como endofito, sin embargo en cacao resulta preocupante la presencia de este hongo por las pérdidas que causa; tal es el caso de Camerún donde *L. theobromae* se ha convertido en una limitación importante para la producción del rubro, pues se ha registrado una disminución de la producción hasta del 100% en algunas explotaciones (Mbenoun *et al.*, 2008).

La figura N° 4 muestra las relaciones filogenéticas, entre los aislados de *Lasiodiplodia* de las diferentes especies encontradas en las zonas muestreadas y 13 secuencias de referencia. Se pueden apreciar tres grupos definidos; el primer grupo (GI) lo integran todos los aislados identificados en este estudio como *L. theobromae* y *L. pseudotheobromae* y sus respectivas secuencias de referencia; el GII lo integran el único aislado identificado en este estudio como *Botryosphaeria parva* y sus secuencias de referencia y el

GIII lo integran los 5 aislados identificados como *Botryosphaeria mamane* y sus secuencias de referencia. Este agrupamiento expone la moderada a baja variabilidad encontrada dentro de la especie *L. theobromae* y su cercana relación con *L. pseudotheobromae* las cuales, en este estudio no pudieron ser separadas, por el contrario en *B. parva* y *B. mamane*, si se evidencia su distancia genética con *L. theobromae*. Para visualizar mejor el árbol filogenético, se eliminaron las ramas más largas o con mayor número de aislados y se sustituyeron por uno (*) y dos asteriscos (**), los códigos o nombres de estas secuencias se detallan en la leyenda colocada al pie de la figura N°4.

Dentro de género *Lasiodiplodia* fueron reportadas como dos nuevas especies, *L. pseudotheobromae* y *B. parva*, ambas estrechamente relacionadas con *L. theobromae*, cuyos caracteres morfológicos son típicos del género los que las hace especies crípticas (Alves *et al.*, 2008). Esta separación de especies se basó en análisis filogenéticos, los cuales fueron avalados por caracteres morfológicos de los conidios y algunos caracteres fisiológicos, como temperatura de crecimiento y coloración en el medio de cultivo; siendo estos últimos cuestionados por otros autores como Abdollahzadeh *et al.*, (2010) quienes encontraron que las tres especies, producen la misma coloración y crecen a iguales temperaturas. Por lo tanto es a través del análisis de ADN en fragmentos de las regiones espaciadoras transcritas (ITS) y el factor de elongación de la traducción 1 alfa (EF-1 α), lo que ha permitido resultados más claros de su ubicación en relación a especies similares o cercanamente relacionadas (Alves *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

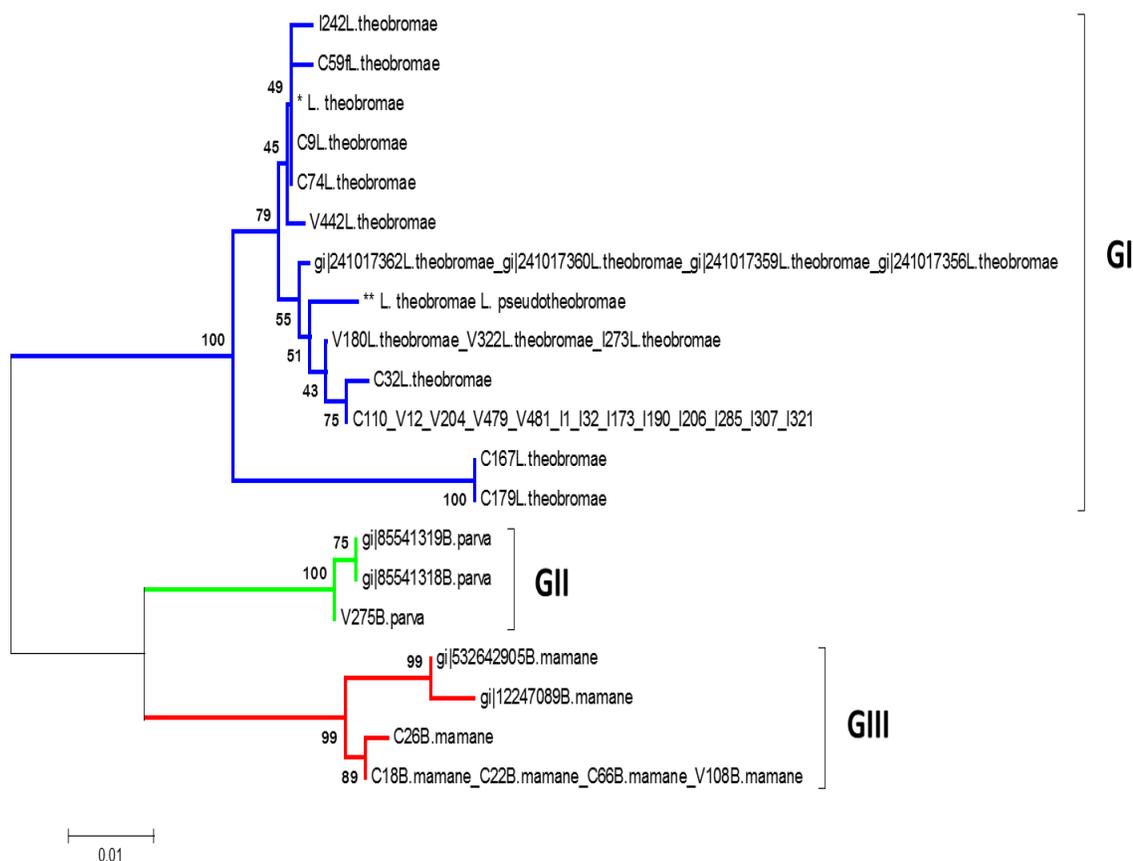


Figura 4. Relaciones filogenéticas entre aislados de *Lasiodiplodia* spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 86) y de referencia del Genbank (total 13). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank.

Leyenda Figura 4:

* *L. theobromae* (gj|731445852; C20; C27; C39; C41; C43; C49; C58; C67; C69; C70; C71; C76; C99; C133; C136; C143; C145; C183; C199; C202; C205; C278; V25; V138; V144; V145; V148; V181; V201; V213; V229; V231; V268; V269; V270; V271; V292; V362; V363; V365; V366; V386; V436; V519; I53; I103; I171; I172; I185; I219; I236; I245)

** *L. theobromae* (gj|24101736; gj|24101735; C13) *L. pseudotheobromae* (gj|241017498; gj|241017350; V24; I95; I120)

2.3.- Diversidad Genética en *Phytophthora palmivora*

El total de 54 aislados identificados como *P. palmivora* (tamaño en sus secuencias de 667 pb.), generaron 11 haplotipos, y demostró tener baja diversidad genética, tanto a nivel de nucleótidos ($\pi= 0,002$) como de haplotipos ($Hd= 0,34$) (Tabla N° 4 pag 44).

Tabla 7. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de *P. palmivora*, en las tres zonas cacaoteras estudiadas.

Género	Zona	N	h	Hd	Pi (π)	Fst	Nm (Nei 1982)
<i>Phytophthora</i>	Centro	26	8	0,47	0,003	-0,008	10,38
	Occidente	4	3	0,38	0,003		
	Centro	26	8	0,47	0,003	0,003	
	Oriente	24	2	0,08	0,000		
	Occidente	4	3	0,38	0,003	0,000	
	Oriente	24	2	0,08	0,000		

N=N° total de secuencias; h= N° de haplotipos; Hd= diversidad de haplotipos; Pi (π)= diversidad de nucleótidos; Fst= Diferenciación genética y Nm= Flujo Genético.

En las tres zonas estudiadas, se observan distintos índices de diversidad, siendo la zona central la que mostró mayor diversidad genética dada por su diversidad haplotípica ($\pi=0,003$ y $Hd= 0,47$) y la de menor diversidad genética la zona Oriental ($\pi=0,000$ y $Hd= 0,08$). Se encontraron muy bajos niveles de diferenciación genética entre las tres zonas ($Fst < 0,01$) y un alto valor para el flujo genético ($Nm=10,38$) (Tabla N° 7); demostrando entonces que el agente causal de las enfermedades de mancha parda y cáncer de tronco en cacao (*P. palmivora*) es poco variable a nivel nacional y podría definirse como una misma población genética afectando las tres zonas cacaoteras del país.

En Venezuela se realizó un estudio de diversidad genética de *Phytophthora spp.* en plantaciones de cacao mediante marcadores ISSR, donde los

aislados estudiados se ubicaron en tres grupos definidos, los cuales mostraron baja variabilidad genética, no se encontró un patrón asociado a la procedencia geográfica de los aislados y además se sugiere la presencia de tres posibles especies afectando las zonas cacaoteras del país (Molina *et al.*, 2016). Nuestros resultados concuerdan con los anteriormente reportados, en la baja variabilidad y en la poca diferenciación genética encontrada entre las zonas estudiadas, sin embargo con la región ITS se logró identificar a nivel de especie todos los aislados estudiados, donde 54 de 55 aislados fueron identificados como *P. palmivora*, el aislado faltante se identificó como *P. bisheria*, especie que no ha sido reportada en el país y tampoco como patógeno de cacao.

La región ITS al igual que otros genes tanto nucleares como mitocondriales, han sido utilizados en estudios de diversidad, identificación y filogenia de *Phytophthora*, estos estudios moleculares han permitido la separación y caracterización de un gran número de especies dentro del género (Blair *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2014). En plantaciones de cacao de diversas partes del mundo, se han estudiado las especies de *Phytophthora* causantes de enfermedades como tizón de la hoja, cáncer de tronco y pudrición de los frutos, encontrándose principalmente a *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. palmivora* y *P. megakarya* como las causantes de estas enfermedades y al evaluar su diversidad, encontraron alta similitud entre ellas señalando que son especies estrechamente relacionadas (Appiah *et al.*, 2004; Ducamp *et al.*, 2004).

En Venezuela, distintos investigadores han reportado varias especies de *Phytophthora* afectando las plantaciones de cacao, señalando que *P. palmivora* se encuentra presente en todas las zonas productoras del país, *P. capsici* y *P. citrophthora* se han encontrado en la zona central y *P. megasperma* en la zona occidental específicamente en el Sur del lago de

Maracaibo y en la zona Oriental en la cuenca de Río Caribe (Reyes, 1972; Parra y Subero, 2000; Rumbos *et al.*, 2007); sin embargo en este estudio solo logramos identificar a *P. palmivora* afectando las plantaciones de cacao en las tres zonas cacaoteras del país y *P. bisheria* en un solo aislado del occidente del país. *P. bisheriase* ha descrito afectando a plantas de frambuesa, fresa y rosa, todos miembros de la familia Rosácea, en tres continentes diferentes (Australia, Europa, Holanda y EEUU) (Abad *et al.* 2008); la aparición de una nueva especie, indica la necesidad de realizar ensayos de patogenicidad en cacao, tomando en cuenta que es un patógeno cuarentenado en California (Cline *et al.*, 2008), que de afectar al cacao puede producir daños significativos y pérdidas en la producción.

Cabe destacar que las otras especies de *Phytophthora* reportadas en el país por otros investigadores (Reyes, 1972; Parra y Subero, 2000; Rumbos *et al.*, 2007), han sido identificadas únicamente por caracteres morfológicos, por lo que sería recomendable un muestreo más intensivo de plantaciones enfermas y la identificación a nivel de especie mediante el uso de ITS y otros genes o regiones del genoma.

La figura N° 5 muestra las relaciones filogenéticas, entre los aislados de *Phytophthora* de las diferentes especies encontradas en las zonas muestreadas y las 14 secuencias de referencia. Se pueden apreciar dos grupos definidos los cuales coinciden con las dos especies encontradas. El GI lo integran todos los aislados identificados en este estudio como *P. palmivora* y todas las secuencias de referencia de la misma especie y el GII lo integran el aislado identificado como *P. bisheria* y las dos secuencias de referencia de la misma especie. Para visualizar mejor el árbol filogenético, se eliminó la rama más larga o con mayor número de aislados y se sustituyó por dos asteriscos (**). Los códigos o nombres de estos aislados se detallan en la leyenda colocada al pie de la figura N°5.

Este agrupamiento muestra la baja variabilidad encontrada dentro de *P. palmivora* pues, los aislados identificados en este estudio y las secuencias de referencia se ubicaron en el mismo grupo, a pesar que las secuencias de referencia aquí utilizadas corresponden a *P. palmivora* afectando cacao en otros países y otras que afectan otros rubros. Estos resultados coinciden con los reportados por Mohamed *et al.*,(2015), quienes no lograron separar genéticamente, aislados de *P. palmivora* de diferentes cultivos (incluyendo cacao) y de diferentes partes del mundo, de aislados de *P. palmivora* afectando la palma aceitera en Colombia, estudio que fue realizado evaluando secuencias de diferentes genes como ITS, factor de elongación de la traducción 1 α , beta-tubulina y citocromo c oxidasa sub unidad I y II (COX).

En otro estudio realizado en Papúa Nueva Guinea, también se encontró baja variabilidad genética y limitada diferenciación geográfica en aislados de *P. palmivora* de las cinco principales regiones productoras de cacao de ese país, demostrando que se trata de una población única y continuamente asexual; este estudio se realizó evaluando caracteres morfológicos, fisiológicos y marcadores moleculares del tipo microsatélites amplificados al azar (RAMS); estos autores al no encontrar diferenciación geográfica y baja variabilidad genética en *P. palmivora*, recomiendan que el programa de mejoramiento genético para resistencia o tolerancia a ese patógeno se haga en un solo lugar y que posteriormente sean distribuidos los materiales seleccionados a todo el país, implementando medidas estrictas de cuarentena interna sobre todo en los movimientos de suelo y plantas (Saul *et al.*, 2017).

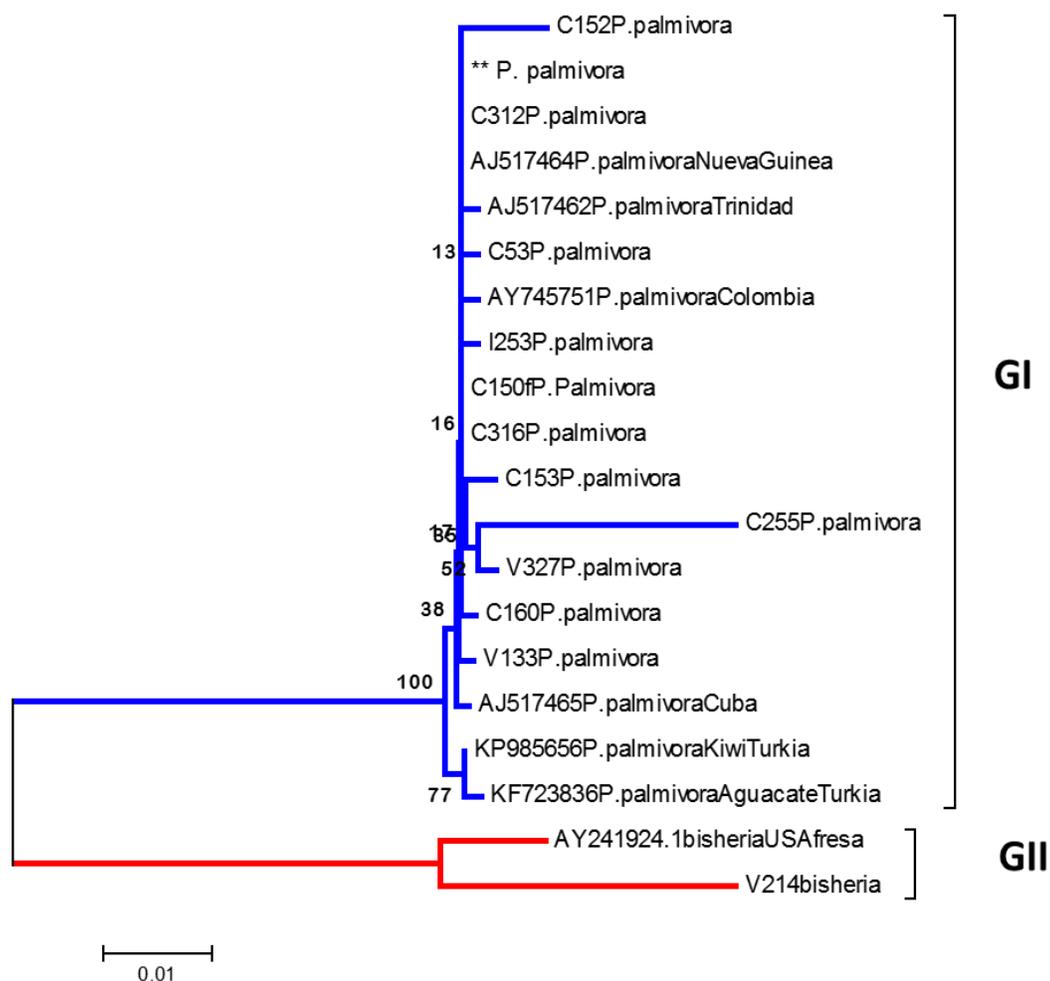


Figura 5. Relaciones filogenéticas entre aislados de *Phytophthora* spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 55) y de referencia del Genbank (total 14). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank.

Leyenda Figura 5:

** *P. palmivora* (JX315271 Costa de Marfil; JX315270 Costa de Marfil; JX315268 Costa de Marfil; AJ517463 Indonesia Coco; DQ987921 Puerto Rico; DQ987920 Puerto Rico; DQ987917 Puerto Rico; JX315271 Costa de Marfil; DQ987920 Puerto Rico; DQ987917 Puerto Rico; C28; C34; C40; C51; C54; C74; C78; C79; V78; V88; V226; V293; V315; I201; I217; I218; I229; I230; I237; I295; I309; I257; I258; I278; I315; I316; I317; I318; I319; I320.

2.4.- Diversidad Genética en *Moniliophthora roreri*

El total de 27 aislados identificados como *M. roreri* (tamaño en sus secuencias de 594 pb.), generó 3 haplotipos y demostró tener moderada a baja diversidad genética, pues a nivel de haplotipos se observó una diversidad media ($H_d = 0,53$), mientras que a nivel de nucleótidos se observó una diversidad baja ($\pi = 0,001$) (Tabla N° 4 pag 44).

Para esta especie, no se realizó análisis por zonas, pues *M. roreri* no fue encontrada en las zonas de oriente y centro, en estas dos zonas predomina la presencia de *M. pernicioso* agente causal de la enfermedad escoba de bruja, la cual no estudiamos en detalle en este trabajo.

Phillips-Mora *et al.*, 2007, evaluaron la diversidad genética de *M. roreri*, con ITS, AFLP e ISSR, encontrando alta diversidad genética en el análisis combinado AFLP/ISSR, lo que permitió la división de *M. roreri* en cinco grupos genéticos: El grupo Bolívar (Norte de Santander de Colombia, este de Venezuela, periferia de Ecuador y Perú); el grupo Co-Oeste (oeste de Colombia, centro de Ecuador y Centroamérica); el grupo Co-Este, el Co-Central (este y centro de Colombia respectivamente) y un quinto grupo llamado Grupo Gileri (Noreste de Ecuador). Con la región ITS obtuvieron dos grandes grupos congruentes con la agrupación anterior. La mayor diversidad genética la observaron en aislados provenientes de la zona este y central de Colombia, lo que les hizo presumir que allí podría estar el centro de origen; observaron también la disminución de la diversidad de manera progresiva entre Ecuador, Venezuela, Perú y América Central, asumiendo que en ese mismo orden se fueron dando las invasiones del patógeno. Nuestros resultados muestran una moderada diversidad genética la cual pudiese estar asociada a su cercanía al centro de origen del patógeno y a su introducción hace más de 70 años al país.

En nuestro estudio no fue posible evaluar diferenciación genética entre poblaciones de *M. roreri*, sin embargo, otros autores como Phillips-Mora *et al.*, 2007; si evidenciaron diferenciación en distintas poblaciones, de allí la descripción de los grupos geográficos mencionados anteriormente. Investigaciones en Colombia, han reportado diferenciación geográfica entre aislados de distintas zonas, evidenciando que las condiciones ambientales y los distintos genotipos de cacao sembrados, contribuyen a la diferenciación de grupos en *M. roreri*, por lo que se hace fundamental entender estos dos aspectos que favorecen al hongo y orientar las investigaciones al conocimiento del patógeno y sus hospederos en cada zona geográfica (Correa *et al.*, 2014; Jaimes *et al.*, 2016).

La figura N° 6 muestra las relaciones filogenéticas entre los aislados de las dos especies de *Moniliophthora* encontradas en las zonas muestreadas y las 11 secuencias de referencia. Se pueden apreciar dos grupos definidos los cuales coinciden con las dos especies encontradas. El GI lo integran todos los aislados identificados en este estudio como *M. roreri* y todas las secuencias de referencia de la misma especie y el GII lo integran tres aislados identificados como *M. perniciosa* y las secuencias de referencia de la misma especie. Este agrupamiento muestra baja diversidad genética en *M. roreri* y no evidencia diferenciación geográfica, pues todos los aislados identificados en este estudio no lograron separarse de las secuencias de referencia a pesar de haber sido seleccionadas por su procedencia de países como México, Ecuador, USA.

Por ser el agente causal de una de las enfermedades más importante del cacao en el Trópico, *M. roreri* ha sido ampliamente estudiada, su diversidad genética y filogenia, así como su diferenciación geográfica, han sido evaluadas con distintos marcadores moleculares y con la secuenciación de distintos genes y regiones del genoma, sin embargo, para abordar estos

temas de una manera más robusta y confiable, se han propuesto metodologías, como los polimorfismos en un simple nucleótido (SNP) en secuencias de ARN (Ali *et al.*, 2015).

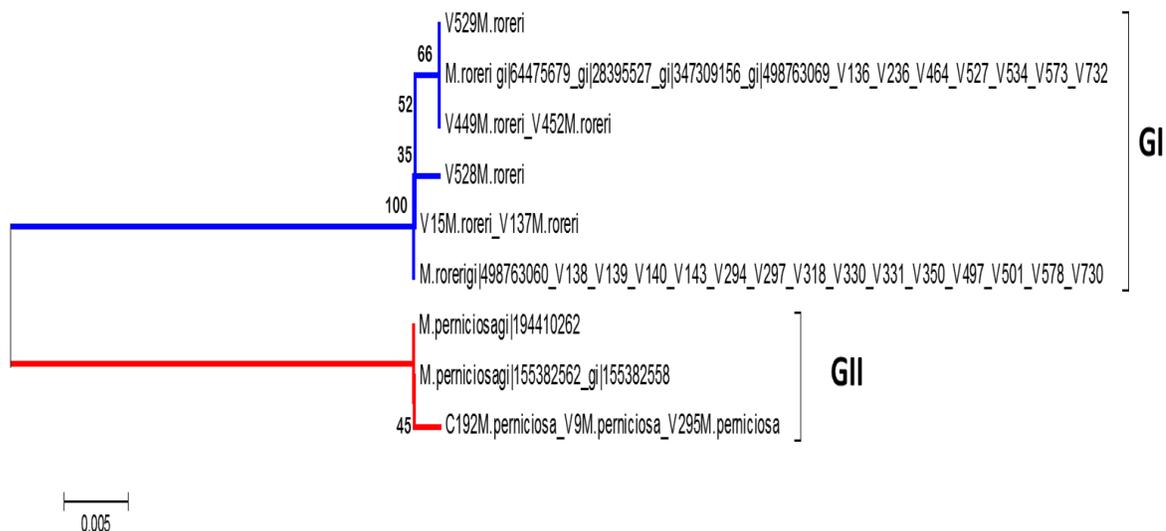


Figura 6. Relaciones filogenéticas entre aislados de *Moniliophthora* spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 30) y de referencia del Genbank (total 11). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank.

2.5.- Diversidad Genética en *Trichoderma*

El total de 59 aislados identificados como *Trichoderma* (tamaño en sus secuencias de 494 pb.), generó 13 haplotipos y demostró tener alta diversidad genética, tanto a nivel de nucleótidos ($\pi= 0,027$) como a nivel de haplotipos ($Hd= 0,86$) (Tabla N°4 pag 44). Cabe destacar que esta diversidad es a nivel de género y se debe a la diversidad genética entre las 9 especies identificadas en este estudio.

Tabla 8. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de *Trichoderma* spp. en las tres zonas estudiadas: Centro, Occidente y Oriente.

Zona	N	h	Hd	Pi (π)	Fst	Nm (Nei 1982)
Centro	9	3	0,56	0,013	0,390	2,81
Occidente	33	9	0,79	0,026		
Centro	9	3	0,56	0,016	0,098	
Oriente	17	6	0,80	0,028		
Occidente	33	9	0,79	0,026	0,112	
Oriente	17	6	0,80	0,025		

N=N° total de secuencias; h= número de haplotipos; Hd= diversidad haplotípica; Pi (π)= diversidad de nucleótidos; Fst= Diferenciación genética y Nm= Flujo Genético.

En las tres zonas estudiadas, se observan distintos índices de diversidad (Tabla N°8), siendo la zona Central la que muestra menor diversidad genética comparada con cualquiera de las otras dos zonas, mientras que la zona Oriental es la que muestra mayor diversidad genética dada por su diversidad haplotípica ($Hd= 0,80$). En cuanto a la diferenciación genética de las zonas estudiadas, se evidenció que entre Centro y Occidente existe alta diferenciación genética ($Fst >0,25$) la cual se justifica dada las diferentes especies encontradas en cada una de esas zonas; Occidente tiene 8

especies de las 9 identificadas, mientras que centro solo tiene 3 especies y una de ellas (*T. reseii*) no se encontró en occidente.

En Venezuela, se han realizado algunos estudios en el género *Trichoderma*, donde se han aislado e identificado diferentes especies en plantaciones de cacao, maíz y otros cultivos; todas las especies identificadas en nuestro estudio han sido reportadas en estos trabajos previos (Rivas y Pavone 2010; Sosa *et al.*, 2014; Pavone y Dorta 2015).

Pavone y Dorta (2015), encontraron entre sus aislados de plantaciones de maíz un bajo índice de diversidad biológica (ID=0,051), asumiendo que esta diversidad disminuye a medida que la zona estudiada está más perturbada; por otro lado, Rivas y Pavone (2010), en plantaciones de cacao encontraron un índice de diversidad biológica igual al encontrado en nuestro estudio (ID=0,15) lo cual puede atribuirse a que se trata de un agroecosistema poco perturbado por la utilización de fungicidas, agroquímicos en general y maquinaria. En cuanto a la diversidad genética del género en Venezuela, Sosa *et al.*, 2014 reportaron una diversidad de media a baja entre los aislados estudiados utilizando el marcador molecular AFLP, mientras que en nuestro estudio se evidencia una diversidad genética alta tanto a nivel de haplotipos como a nivel de nucleótidos.

La diversidad genética de cada una de las especies identificadas en este estudio, se evaluó mediante la diversidad haplotípica y la diversidad nucleotídica (Tabla N°9), encontrando cero diversidad en las especies *T. reseii*, *T. erinaceum*, *T. ghanense* y *T. spirale*; diversidad baja en *T. virens*; diversidad media en *T. asperellum*, *T. brevicompactum* y *T. koningiopsis* y una alta diversidad genética en *T. harzianum*.

En diversos estudios a nivel mundial, donde evalúan la diversidad genética de especies de *Trichoderma*, han reportado a *T. harzianum*, como una de las especies más abundantes y con mayor variabilidad (Kulnig *et al.*, 2000; Kubicek *et al.*, 2003; Druzhinina *et al.*, 2010; Ortiz-García *et al.*, 2015). Druzhinina *et al.*, (2010) atribuyen la variabilidad encontrada en *T. harzianum* a un proceso de especiación compleja dentro del grupo de especies *H. lixii* - *T. harzianum*, que se basa en la coexistencia y la interacción de organismos con diferentes historias evolutivas y en la ausencia de fronteras genéticas estrictas entre ellos, sugieren que *T. harzianum* y *H. lixii* son especies distintas.

Tabla 9. Estimados de polimorfismo en las secuencias de ADN de las nueve especies de *Trichoderma* aisladas e identificadas en las tres zonas cacaoteras del país.

Especie	N	h	Hd±sd	Pi (π) ± SD
<i>T. harzianum</i>	16	6	0,742	0,004
<i>T. resei</i>	4	1	0,000	0,000
<i>T. asperellum</i>	4	2	0,500	0,002
<i>T. brevicompactum</i>	4	2	0,500	0,001
<i>T. erinaceum</i>	3	1	0,000	0,000
<i>T. ghanense</i>	2	1	0,000	0,000
<i>T. koningiopsis</i>	17	4	0,550	0,003
<i>T. spirale</i>	2	1	0,000	0,000
<i>T. virens</i>	7	2	0,290	0,001

N=N° de secuencias; h=N° de haplotipos; Hd=diversidad haplotípica; Pi (π)=diversidad de nucleótidos.

La figura N° 7 muestra las relaciones filogenéticas, entre los aislados de *Trichoderma* de las diferentes especies encontradas en las zonas muestreadas y las 33 secuencias de referencia. Se pueden apreciar cuatro grupos. El GI corresponde a miembros de la sección *Pachybasium* y lo integran todos los aislados identificados en este estudio como *T. harzianum* y todas las secuencias de referencia de la misma especie, dos aislados

identificados como *H. lixii*, todos los aislados identificados como *T. spirale* y sus secuencias de referencia y todos los aislados identificados como *T. virens* y sus secuencias de referencia. El GII también corresponde a un miembro de la sección *Pachybasium* y lo integran los aislados identificados como *T. brevicompactum* y las secuencias de referencia de la misma especie. El GIII corresponde a miembros de la sección *Longibrachiatum* y lo integran todos los aislados identificados como *T. ghanense* y sus secuencias de referencia y *T. reseii* y sus secuencias de referencia. El GIV corresponde a miembros de la sección *Trichoderma* y lo integran los aislados identificados como *T. koningiopsis*, *T. erinaceum* y *T. asperellum* y sus respectivas secuencias de referencia. Para visualizar mejor el árbol filogenético, se eliminaron las ramas más largas o con mayor número de aislados y se sustituyó por asteriscos y el nombre de la especie correspondiente, los códigos o nombres de estas secuencias se detallan en la leyenda colocada al pie de la figura N°7. Este agrupamiento expone tres de las cuatro secciones del género propuestas por Bisset en el año 1991, estas mismas secciones fueron reportadas por Sosa *et al.*, 2014, lo que sugiere que las especies de *Trichoderma* en Venezuela, se ubican dentro de estas tres secciones.

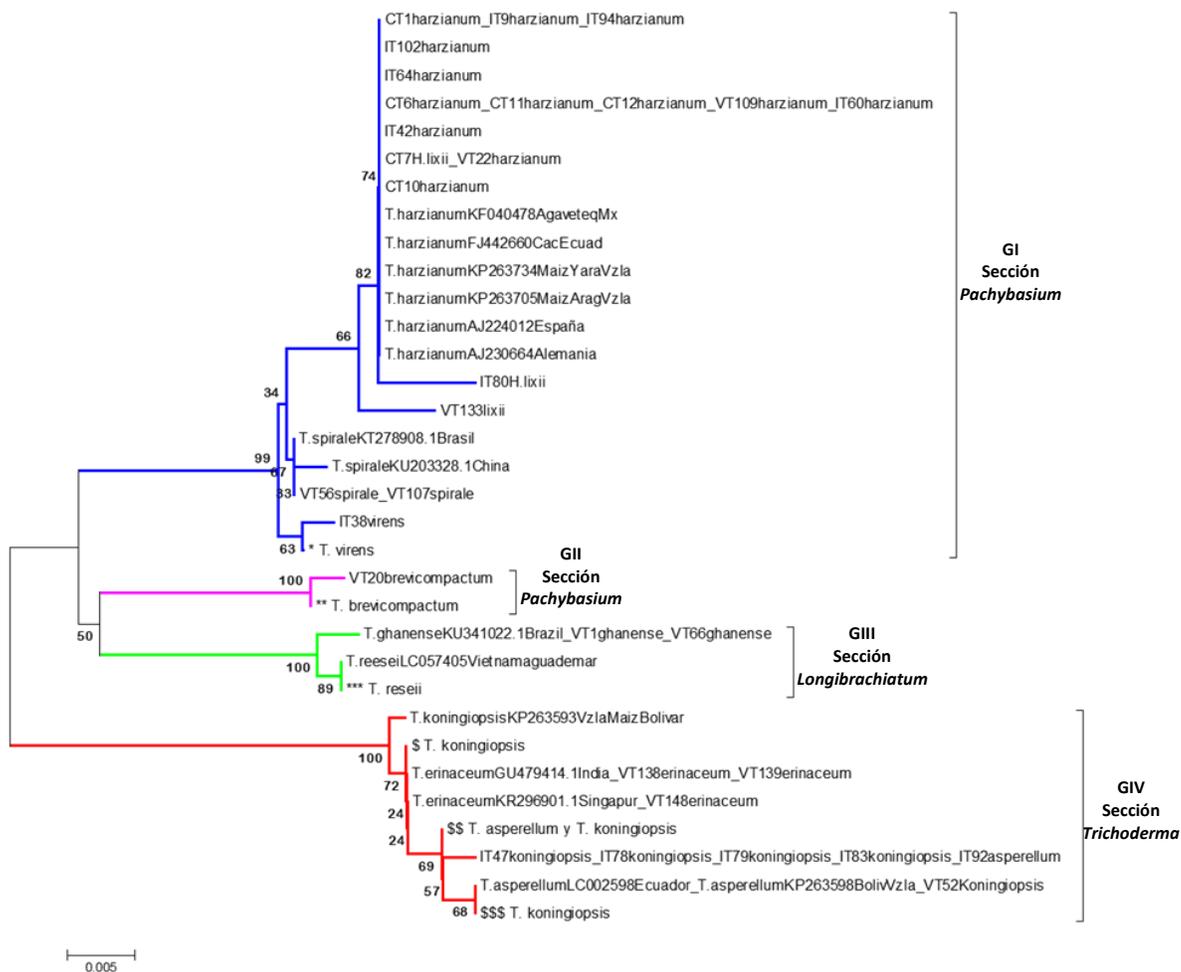


Figura 7. Relaciones filogenéticas entre aislados de *Trichoderma* spp. en agroecosistemas de cacao en Venezuela (total 59) y de referencia del Genbank (total 33). Método de agrupamiento Neighbor-joining y distancia Tamura-Nei model. Los números en cada rama indican el % en remuestreo de 1000 repeticiones. Los aislados de referencia se identifican con el código del Genbank

Legenda Figura 7:

*T.virensAF099007USA cacao_T.virensFJ442669USAleñosas_T.virensKP263703MaizAragu aVzla_T.virensKP263623MaizbarinasVzla_CT9virens_VT28virens_Vt42virens_VT43virens_I T61virens_IT93virens

**T.brevcompactumEU330943.1Guinea_T.brevcompactumEU330941.1USA_VT2brevicom pactum_VT21brevcompactum_VT25brevcompactum

***T.reeseiKP263684PortugVzlaMaiz_T.reeseiKP263683PortuMaizVzla_T.reeseiKJ767092M
alasiaSuelplaya_T.reeseiKC478546SueloTailandia_CT5resei_CT50resei_IT67reesei_IT100r
eesei 489 bases

\$T.koningiopsisKP263648VzlaGuarico_T.koningiopsisFJ442651cacaoPeru_T.koningiopsisFJ
442613CacaoEcuador_VT72koningiopsis

\$\$T.asperillumLC057426Japonplaya_T.asperillumAB935967Bangladeshsoya_T.asperellu
mKP263555AnzVzla_VT115koningiopsis

\$\$\$T.asperillumAF278789Austria_VT24koningiopsis_VT53koningiopsis_VT55koningiopsis_
VT60koningiopsis_VT61koningiopsis_VT62asperillum_VT63koningiopsis_VT64koningiopsis_
_VT67koningiopsis_VT71koningiopsis_VT74asperillum_VT75asperillum_VT108koningiopsi
s

3.- Hotspots de las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva o repentina en las tres zonas productoras de cacao de Venezuela

3.1.- Hotspots geográficos: A partir de las especies encontradas y el análisis de correlación de Pearson por estado, se generaron dos grupos o regiones, donde los estados pertenecientes a la zona Central y Oriental del país, más el estado Táchira, se agrupan en la Región 1 y el resto de los estados occidentales se agrupan en la Región 2 (Figura 8). A partir de la frecuencia de cada especie y su ubicación en cada región se construyó un gráfico radial (Figura 9) en el cual se puede apreciar que la Región 1 es un *hotspots* para las enfermedades de mancha parda, cáncer de tronco y muerte regresiva, mientras que la Región 2 es un *hotspots* para antracnosis, muerte regresiva y moniliasis.

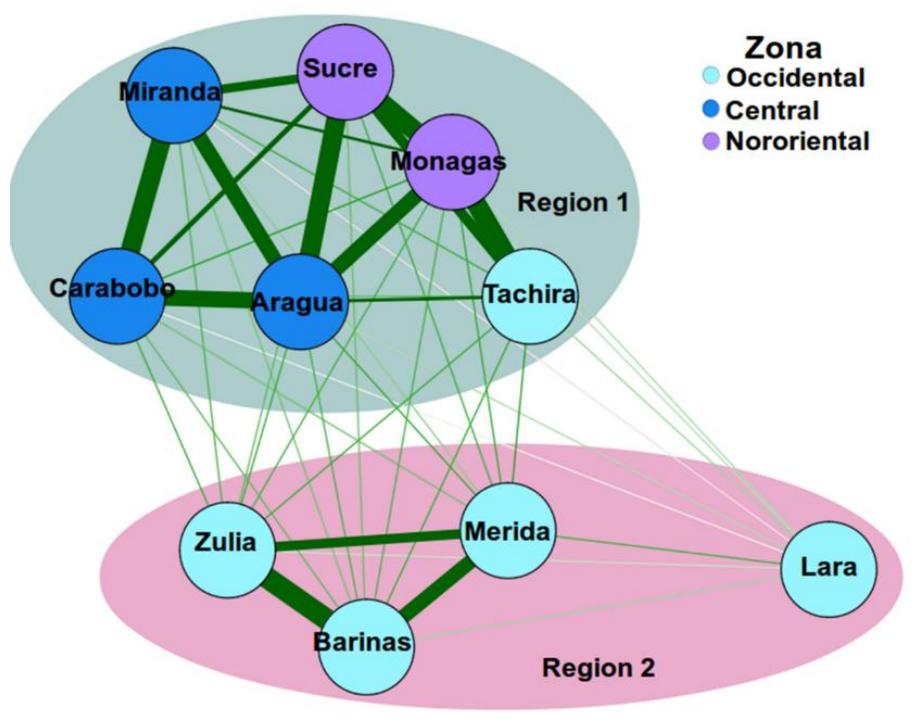


Figura 8. Regiones en las que se agrupan los estados pertenecientes a las diferentes zonas cacaoteras del país, a partir del análisis de correlación de Pearson considerando las especies encontradas.

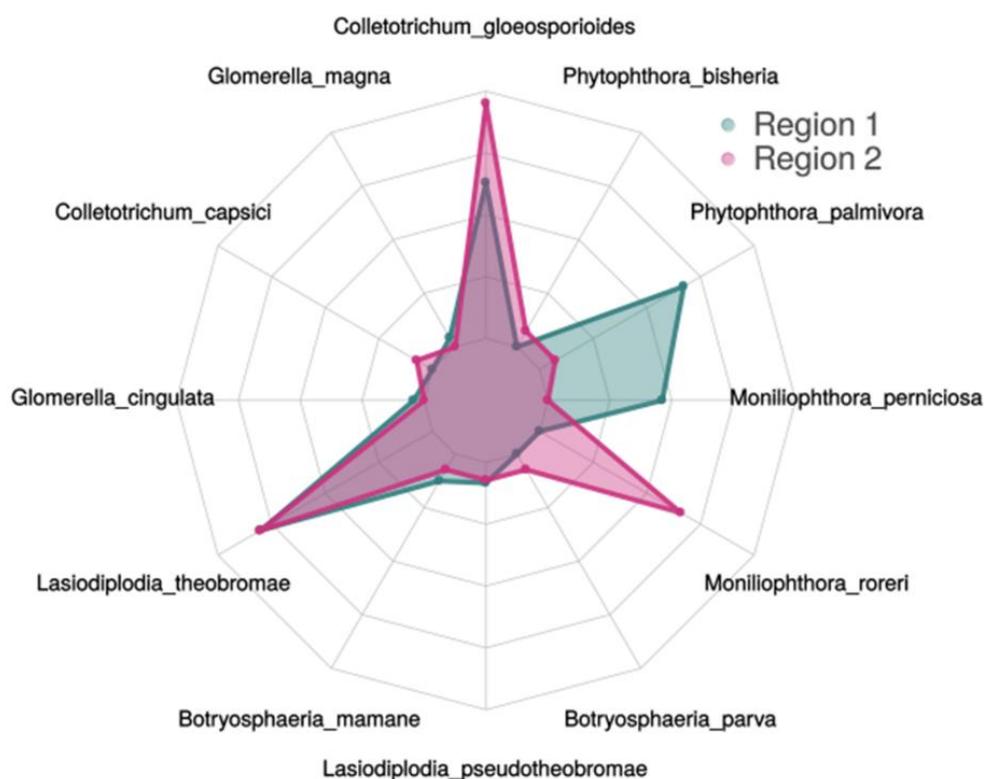


Figura 9. Gráfico de araña. Se evidencia la incidencia relativa de las especies encontradas por región.

3.2.-Hotspots genéticos: Se utilizaron los estimados de diversidad genética calculados anteriormente como son: número de haplotipos (H), diversidad de haplotipos (Hd) y diversidad nucleotídica (π) (Tabla N° 10); resultando que para la enfermedad de antracnosis el *Hotspots* la zona Oriental por poseer la mayor diversidad haplotípica (Hd=0,66) y nucleotídica ($\pi=0,014$) y el mayor número de secuencias únicas o haplotipos (6). Para las enfermedades de mancha parda y cáncer de tronco el *Hotspots* la zona Central por poseer la mayor diversidad haplotípica (Hd=0,47) y nucleotídica ($\pi=0,003$) y el mayor número de haplotipos (8). Para la enfermedad de Moniliasis el *hotspots* la zona Occidental, pues fue en la única donde se encontró su agente causal y además evidenció una moderada diversidad genética dada por su diversidad

haplotípica ($H_d=0,53$) y nucleotídica ($\pi=0,001$). Para la enfermedad de muerte regresiva el *hotspots* se ubicaría en la zona centro-oriente pues, la mayor diversidad nucleotídica ($\pi=0,007$) y el mayor número de haplotipos (7) se encontraron en la zona central, pero la zona Oriental presentó la mayor diversidad haplotípica ($H_d=0,63$).

Tabla 10. Estimados de diversidad genética en los agentes causales de las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva en las tres zonas productoras de cacao de Venezuela.

Especie	Enfermedad	Zona	H	Hd	Pi (π)
<i>C. gloeosporioides</i>	Antracnosis	Centro	1	0,00	0,000
		Occidente	5	0,32	0,008
		Oriente	6	0,66	0,014
<i>L. theobromae</i>	Muerte regresiva o repentina	Centro	7	0,48	0,007
		Occidente	4	0,41	0,003
		Oriente	4	0,63	0,005
<i>P. palmivora</i>	Mancha parda y cáncer de tronco	Centro	8	0,47	0,003
		Occidente	3	0,38	0,003
		Oriente	2	0,08	0,000
<i>M. rozeri</i>	Moniliasis	Occidente	3	0,53	0,001

H=N° de haplotipos; Hd= diversidad haplotípica; Pi (π)= diversidad de nucleótidos.

En muerte regresiva, mancha parda, cáncer de tronco y moniliasis, la zona identificada como *hotspots*, coincidió en las dos determinaciones, tanto geográfica como genéticamente, mientras que para la antracnosis la zona identificada fue distinta en las dos determinaciones, sin embargo, considerando que la zona con mayor variabilidad genética de la especie influye más en la presión de selección a la hora de realizar mejoramiento genético, se le dará mayor peso a la determinación genética; por lo tanto, el *hotspots* para la enfermedad de antracnosis es la zona Oriental. Para las enfermedades cáncer de tronco y mancha parda es la zona Central; para la enfermedad de moniliasis es la zona Occidental y para la muerte regresiva,

donde se encontró diversidad en Centro y Oriente pudiese considerarse esa región como su *hotspots*.

Los *hotspots* o puntos calientes para las enfermedades de antracnosis, cáncer de tronco, mancha parda, moniliasis y muerte regresiva del cacao, no han sido determinados con anterioridad en Venezuela, ni con la aproximación geográfica, ni con la genética. Por lo tanto este sería un primer reporte válido para los mejoradores del rubro, quienes al momento de seleccionar clones con resistencia o tolerancia a las enfermedades mencionadas, pudiesen tomar en cuenta la información aquí suministrada, pues estos puntos calientes ofrecen alta presión de la enfermedad debido a la variabilidad genética del patógeno y condiciones ambientales favorables para el desarrollo del mismo, lo que garantiza que dicha característica perdure en el tiempo. Por otro lado, estos puntos también deben ser monitoreados y vigilados, pues es allí donde podrían emerger nuevas cepas virulentas.

El uso de *hotspots* en programas de selección y mejoramiento, ha sido recomendado desde hace algún tiempo en otros rubros, como el programa de selección recurrente en arroz para resistencia a *Pyricularia grisea*, el programa de mejoramiento del trigo en el cono sur liderado por el CIMMYT y para la enfermedad de Antracnosis en olivo (Correa *et al.*, 1997; Kohli y Beuningen 1990; Talhinhos *et al.*, 2009). (Savory *et al.*, 2014) identificaron *hotspots* para virus multipartitos de plantas en la India, como una estrategia para dirigir hacia esos puntos los esfuerzos de gestión y vigilancia de las enfermedades causadas por dichos virus. En cacao, los intentos por determinar el centro de origen de las enfermedades, determinando la diversidad genética de los patógenos, como en el caso de la moniliasis, pudiesen estar encaminados a la determinación de esos puntos calientes que permitan hacer monitoreo del patógeno y mejoramiento para resistencia a esta enfermedad (Ali *et al.*, 2015, Jaimes *et al.*, 2016).

4.- Relaciones funcionales patógeno-controlador-ambiente

4.1.-Análisis de Correlación Canónica (CCorA): Como se comentó en el aparte de metodología, a las tendencias encontradas en el análisis de *hotspots* se les analizó mediante “Análisis de Correlación Canónica” (CCorA por sus siglas en inglés). Es de hacer notar, que en el análisis de *hotspots* se observaron tendencias, pero estas requieren ser sometidas a algún procedimiento que mida la fuerza de estas relaciones (su significancia). Por otra parte, en el análisis de *hotspots* el nivel de agrupación era el “estado”, con lo que se aprecian resultados que resuelven tendencias hasta un nivel equivalente y básicamente, hablan de un patrón geográfico, más que uno que pudiese estar relacionado con interacciones biológicas o bioclimáticas. En resumen, el análisis de *hotspots* permitió observar grandes tendencias de los patógenos a lo largo del país, pero no explican cómo los factores biológicos y ambientales afectan las distribuciones de los mismos. Por otro lado, se sabe por un gran cúmulo de teoría ecológica, que para una especie el “ambiente” está conformado por una serie de variables, que no solamente pudiesen ser de orden físico, sino también de orden biológico. Por tanto, un patógeno de cacao “siente” como “su ambiente” una serie de variables climáticas (lluvia, temperatura, variaciones estacionales de estas, etc.), pero también, las presiones a las que le somete una serie de competidores o depredadores. Todas estas variaciones y presiones directas o indirectas, son las que terminan moldeando la distribución de las especies.

Es por toda la reflexión anterior que se decidió explorar las siguientes relaciones:

1. Patógenos-Controladores
2. “Patógenos-Controladores” y las Variables Ambientales.
3. Patógenos-Variables Ambientales

4. Controladores-VARIABLES Ambientales

En cada uno de los casos se usa la matriz correspondiente. Como variables ambientales se utilizaron las más importantes obtenidas del CCA. Las matrices analizadas fueron obtenidas dividiendo la Matriz 2 en dos partes, la correspondiente a los patógenos y la correspondiente a los posibles controladores. El procedimiento CCorA encuentra las combinaciones lineales de dos conjuntos de variables que tienen la mayor correlación entre ellas y se forman conjuntos de combinaciones lineales. Las variables siempre fueron estandarizadas restándoles primero sus medias y dividiéndolas entre sus desviaciones estándar. Se estableció un nivel de confianza del 95,0%.

4.1.1.-CCorA de Patógenos-Controladores

Este procedimiento encuentra las combinaciones lineales de los dos conjuntos de variables (Patógenos y Controladores) que tienen la mayor correlación entre ellas. Los conjuntos de variables se resumen en la Tabla 11. En este caso, se formaron 10 conjuntos de combinaciones lineales. La Tabla N° 12 muestra las correlaciones estimadas entre cada conjunto de variables canónicas. Dado que uno de los valores-P es menor que 0,05; ese conjunto tienen una correlación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 11. Variables utilizadas en el análisis CCorA de Patógenos-Controladores.

Variables en el conjunto 1	Variables en el conjunto 2
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>T. reesei</i>
<i>G. magna</i>	<i>T. harzianum</i>
<i>C. capsici</i>	<i>H. lixii</i>
<i>G. cingulata</i>	<i>T. virens</i>
<i>L. theobromae</i>	<i>T. asperellum</i>
<i>B. mamane</i>	<i>T. brevicompactum</i>
<i>L. pseudot</i>	<i>T. ghanense</i>
<i>B. parva</i>	<i>T. koningiopsis</i>
<i>M. roleri</i>	<i>T. spirale</i>
<i>M. perniciosa</i>	<i>T. erinaceum</i>
<i>P. palmivora</i>	
<i>P. bisheria</i>	

Tabla 12. Correlaciones Canónicas Patógenos-Controladores.

Número	Eigenvalor	Correlación Canónica	Lambda de Wilks	Chi-Cuadrada	G.L.	Valor-P
1	0,937173	0,968077	0,00130276	162,76	120	0,0057
2	0,719676	0,848337	0,0207359	94,9593	99	0,5962
3	0,612019	0,782316	0,0739712	63,8	80	0,9075
4	0,496953	0,704949	0,190657	40,6034	63	0,9873
5	0,361524	0,601269	0,379004	23,7701	48	0,9987
6	0,198866	0,445944	0,593608	12,7777	35	0,9998
7	0,176054	0,419588	0,740959	7,34534	24	0,9996
8	0,0845739	0,290816	0,899281	2,60091	15	0,9998
9	0,0131899	0,114847	0,982363	0,435954	8	0,9999
10	0,00450615	0,0671279	0,995494	0,11065	3	0,9905

El primer conjunto de combinaciones lineales es:

-0,0862068*C. gloeos - 0,0932235*G. magna + 0,915696*C. capsici + 0,239518*G. cingulata - 0,0974435*L. theobromae + 0,229415*B. mamane + 0,0585031*L. pseudot - 0,052968*B. parva + 0,00356253*M. roreri + 0,154339*M. pernicioso - 0,177638*P. palmivora - 0,173814*P. bisheria

y

0,312416*T. reesei + 0,194143*T. harzianum - 0,471206*H. lixii + 0,269678*T. virens - 0,0232505*T. asperellum + 0,431644*T. brevic + 0,776376*T. ghanense - 0,476318*T. koningiopsis + 0,18766*T. spirale + 0,145671*T. erinaceum

Los coeficientes de redundancia de ambos grupos de variables canónicas (Tabla N°13), revelan el poder explicativo de las combinaciones linealmente independientes de cada variable canónica, observándose que: Las variables Y1 (patógenos), presentan un nivel de explicación ligeramente menor para las variables Y2 (controladores), en cambio al examinar los coeficiente de redundancia de la variable Y2, se observa que estos tienen un poder explicativo ligeramente mayor para las variables Y1. Como las matrices que se han analizado son de tipo presencia-ausencia, lo que revela esta relación entre los conjuntos de variables, es que las abundancias de los controladores parecen ejercer un efecto en las abundancias de los patógenos.

Tabla 13. Coeficientes de Redundancia para los Conjuntos de Variables Canónicas.

Coeficientes de redundancia (Y1):

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	Suma
0,104	0,079	0,047	0,041	0,024	0,019	0,014	0,006	0,001	0,000	0,335

Coeficientes de redundancia (Y2):

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	Suma
0,113	0,068	0,052	0,037	0,034	0,013	0,020	0,011	0,002	0,000	0,351

De los resultados del CCorA, aunado a lo anterior, se obtienen dos tipos de gráficos, unos en los que se pueden observar las puntuaciones canónicas (scores) de las muestras (localidades o sitios de muestreo) en el espacio de los conjuntos de variables canónicas (Figuras 10 y 11) y otros en los que se grafican las correlaciones de las variables originales y las variables canónicas (Figura 12). Los primeros suelen dar una idea de las relaciones que guardan las muestras con los conjuntos de variables consideradas. Es decir, arroja una ordenación de las muestras según las relaciones que guardan los dos conjuntos de variables canónicas. En el segundo las correlaciones se representan como vectores que parten del origen de coordenadas y están circunscritas en un círculo de radio 1. El grado de correlación entre la variable de entrada y los ejes canónicos depende de la longitud del vector y del ángulo entre este y los ejes. Se debe recordar que las correlaciones no implican causalidad, por tanto estos resultados solo orientan la experimentación que someterá a prueba este tipo de relaciones a posteriori, con investigaciones más específicas a futuro.

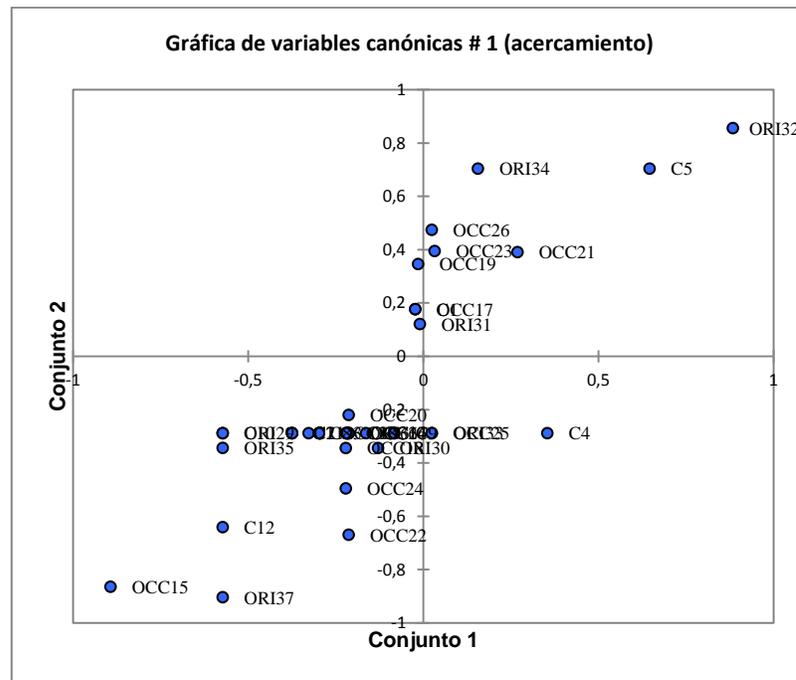


Figura 11. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos” y “Controladores”. Donde se observan las muestras de las tres zonas cacaoteras del país (ORI= Oriente; OCC=Occidente y C= Centro). (Acercamiento excluyendo la muestra OCC13)

La Figura 11 muestra un acercamiento del conjunto interno (excluyendo la muestra OCC13) para resolver el grupo interno. No se puede concluir que exista un patrón o gradiente producto únicamente de esta relación entre patógenos y controladores, que discrimine zonas o regiones geográficas, al menos con este análisis, no se aprecia a simple vista.

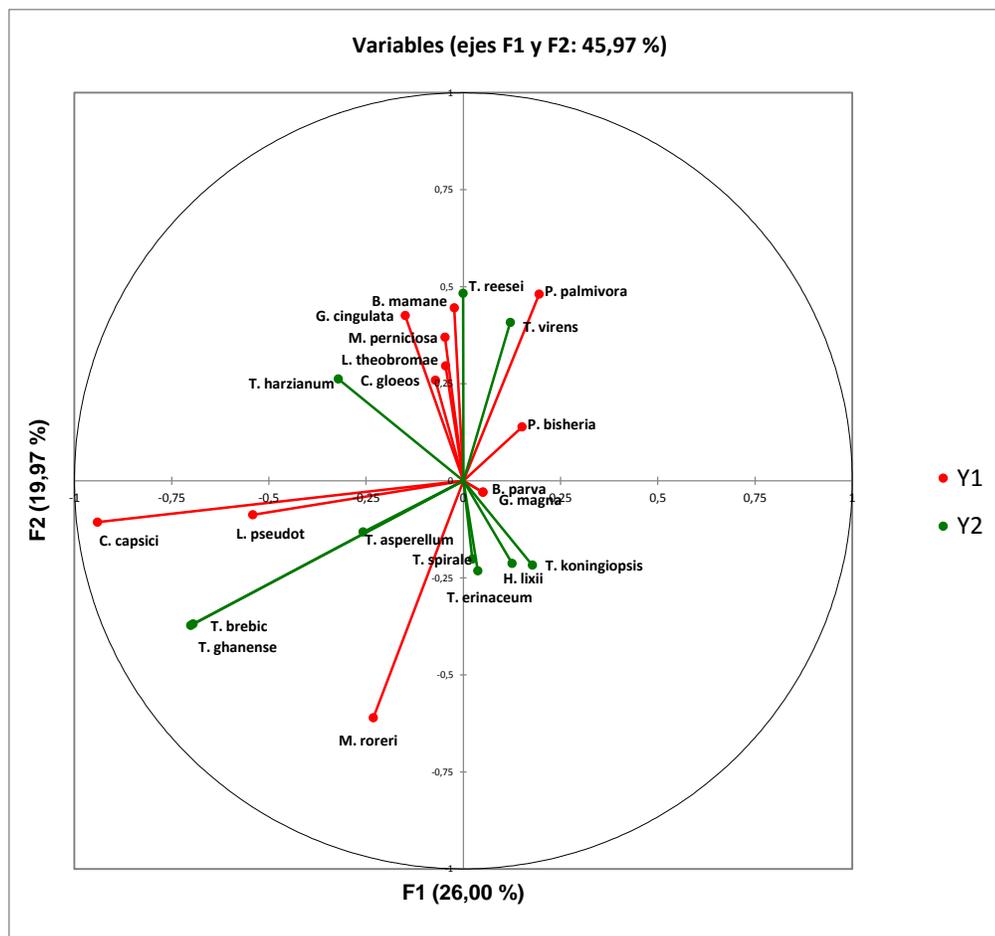


Figura 12. Variables de entrada obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos” (Y1) y “Controladores” (Y2).

En la Figura 12, se presentan las correlaciones de las distintas variables de entrada, pertenecientes a los dos conjuntos canónicos (Y1 y Y2). Se destacan las relaciones directas entre *T. brevicompactum* y *T. ghanenense* con *M. roreri*; *T. harzianum* con *C. gloeosporioides*, *L. theobromae* y *M. pernicioso*; así como la de *T. virens* y *T. reesei* con *P. palmivora*. Se pueden apreciar también correlaciones inversas como las de *M. roreri* con *T. virens* y *T. reesei*. Estas correlaciones no implican causalidad, por lo tanto, como se mencionó anteriormente, las relaciones aquí observadas solo orientan a

futuras investigaciones más específicas, donde puedan ser sometidas a prueba.

El efecto antagonista que ejercen algunas especies de *Trichoderma* sobre patógenos del cacao ha sido estudiada por diversos autores, los cuales han señalado a cepas de las especies *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. virens*, *T. theobromicola* y *T. martiale*, como controladoras de las enfermedades causadas por los patógenos *M. rorei*, *M. perniciososa*, *P. palmivora* y *P. megakarya* (Reyes-Figueroa *et al.*, 2016; Galarza *et al.*, 2015; Rivas y Pavone 2010; Tondje *et al.*, 2007; Hanada *et al.*, 2009; Deberdt *et al.*, 2008).

4.1.2.-CCorAde “Patógenos-Controladores” y Variables Ambientales.

Este procedimiento encuentra las combinaciones lineales de los dos conjuntos de variables (“Patógenos-Controladores” y Variable Ambientales) que tienen la mayor correlación entre ellas. Los conjuntos de variables se resumen en la Tabla 14. En este caso, se formaron 5 conjuntos de combinaciones lineales (nótese que el conjunto con menor número de variables impone la restricción). La Tabla N° 15 muestra las correlaciones estimadas entre cada conjunto de variables canónicas. Dado que uno de los valores-P es menor que 0,05; ese conjunto tienen una correlación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 14. Variables utilizadas en el análisis de CCorA de “Patógenos-Controladores” y Variables Ambientales.

Variables en el conjunto 1	Variables en el conjunto 2
<i>C. gloeosporioides</i>	bio1
<i>G. magna</i>	bio3
<i>C. capsici</i>	bio4
<i>G. cingulata</i>	bio14
<i>L. theobromae</i>	bio15
<i>B. mamane</i>	
<i>L. pseudot</i>	
<i>B. parva</i>	
<i>M. roreri</i>	
<i>M. perniciosa</i>	
<i>P. palmivora</i>	
<i>P. bisheria</i>	
<i>T. reesei</i>	
<i>T. harzianum</i>	
<i>H. lixii</i>	
<i>T. virens</i>	
<i>T. asperellum</i>	
<i>T. brevicompactum</i>	
<i>T. ghanense</i>	
<i>T. koningiopsis</i>	
<i>T. spirale</i>	
<i>T. erinaceum</i>	

Tabla 15. Correlaciones Canónicas de “Patógenos-Controladores” y las Variables Ambientales.

Número	Eigenvalor	Correlación Canónica	Lambda de Wilks	Chi-Cuadrada	G.L.	Valor-P
1	0,861689	0,928272	0,00138063	144,875	110	0,0145
2	0,852366	0,923237	0,00998207	101,353	84	0,0956
3	0,81092	0,900511	0,0676137	59,2668	60	0,5025
4	0,427782	0,65405	0,357592	22,624	38	0,9773
5	0,375077	0,612435	0,624923	10,3428	18	0,9201

El primer conjunto de combinaciones lineales para este caso es:

-0,115517*C. gloeos + 0,00149747*G. magna - 0,17999*C. capsici - 0,0349065*G. cingulata + 0,0688699*L. theobromae + 0,407523*B. mamane + 0,0870254*L. pseudot - 0,0893612*B. parva + 0,587231*M. roreri + 0,00945319*M. pernicioso + 0,661503*P. palmivora - 0,0875201*P. bisheria - 0,390203*T. reesei + 0,548669*T. harzianum - 0,0449985*H. lixii - 0,679219*T. virens - 0,142952*T. asperellum - 0,0390702*T. brebic - 0,0941989*T. ghanense - 0,0603061*T. koningiopsis - 0,138217*T. spirale + 0,172569*T. erinaceum

y

0,568225*bio1 - 1,61542*bio3 - 0,865439*bio4 + 0,512422*bio14 + 0,00431405*bio15

Por otro lado, los coeficientes de redundancia de ambos grupos de variables canónicas, presentados en la Tabla N° 16, revelan el poder explicativo de las combinaciones linealmente independientes de cada variable canónica, observándose lo siguiente: Las variables Y1 (conjunto patógenos-controladores), presentan un nivel de explicación sensiblemente menor para las variables Y2 (variables ambientales), en cambio al examinar los coeficiente de redundancia de las variables Y2, se observa que estas tienen un poder explicativo sensiblemente mayor para las variables Y1. Esta relación entre los conjuntos de variables, nos indica que las variables ambientales seleccionadas influyen de forma importante sobre la presencia del conjunto de los patógenos y los controladores.

Tabla 16. Coeficientes de Redundancia para los Conjuntos de Variables Canónicas.

Coeficientes de redundancia (Y1):

F1	F2	F3	F4	F5	Suma
0,045	0,065	0,045	0,016	0,019	0,190

Coeficientes de redundancia (Y2):

F1	F2	F3	F4	F5	Suma
0,170	0,276	0,209	0,044	0,044	0,743

Dentro de los resultados obtenidos del CCorA se encuentran dos tipos de gráficos, unos en los que se pueden observar las puntuaciones canónicas (scores) de las muestras en el espacio de los conjuntos de variables canónicas (Figuras 13 y 14) y otro en el que se grafican las correlaciones de las variables originales y las variables canónicas (Figura 15). Los primeros suelen dar una idea de las relaciones que guardan las muestras con los conjuntos de variables consideradas. En el segundo las correlaciones se representan como vectores que parten del origen de coordenadas y están circunscritas en un círculo de radio 1. El grado de correlación entre la variable de entrada y los ejes canónicos depende de la longitud del vector y del ángulo entre este y los ejes.

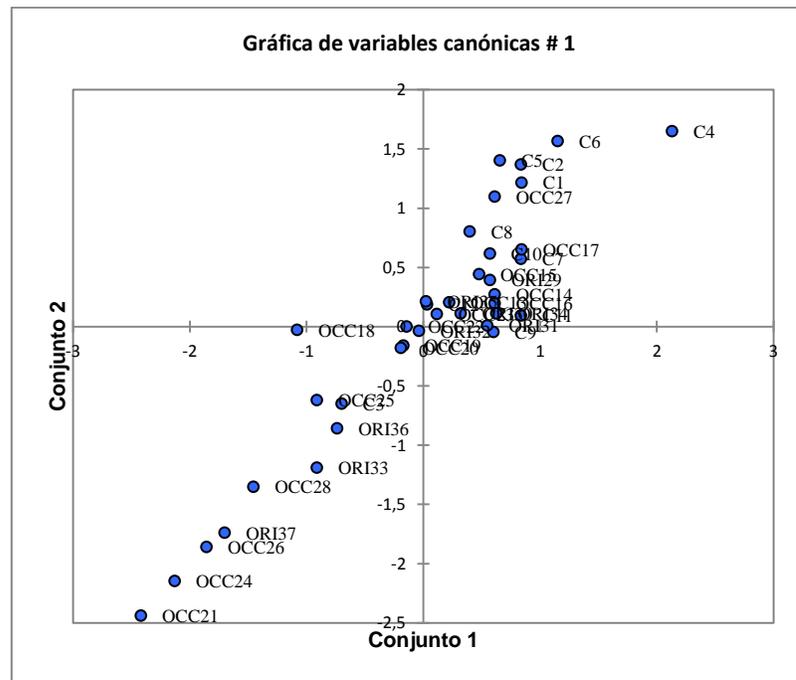


Figura 13. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos-Controladores” y las Variables Ambientales. Donde se observan las muestras de las tres zonas cacaoteras del país (ORI= Oriente; OCC=Occidente y C= Centro).

En este gráfico (Figura 13), se presenta la ordenación de las muestras en el espacio de los conjuntos “Patógenos-Controladores” y las Variables Ambientales, se puede observar una tendencia clara de las muestras de las zonas Oriente y Centro a agruparse en el cuadrante superior, mientras las de Occidente siguen un patrón lineal.

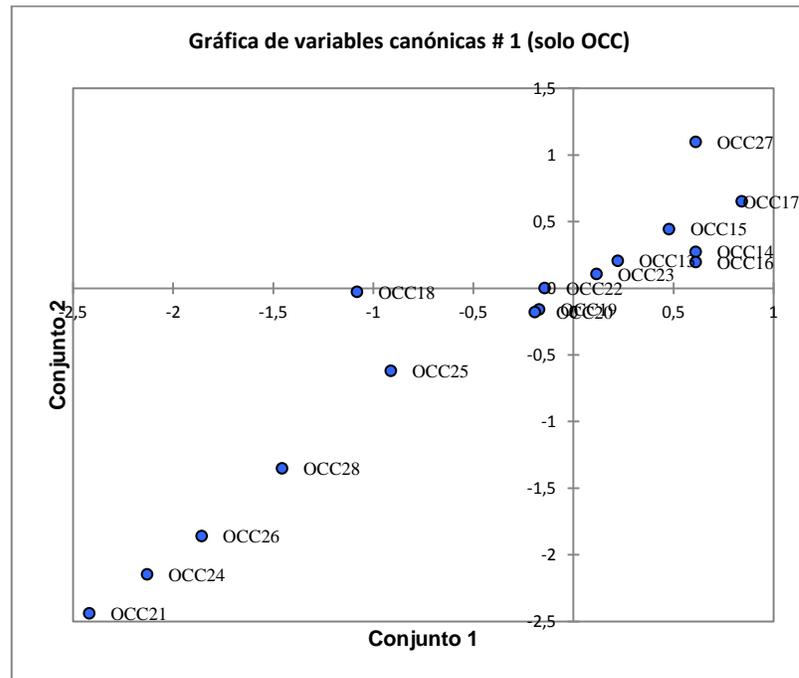


Figura 14. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos-Controladores” y las Variables Ambientales. Donde se observan las muestras del Occidente del país (OCC=Occidente).

En este gráfico (Figura 14) resalta el patrón lineal comentado en la figura 13 para las muestras de Occidente.

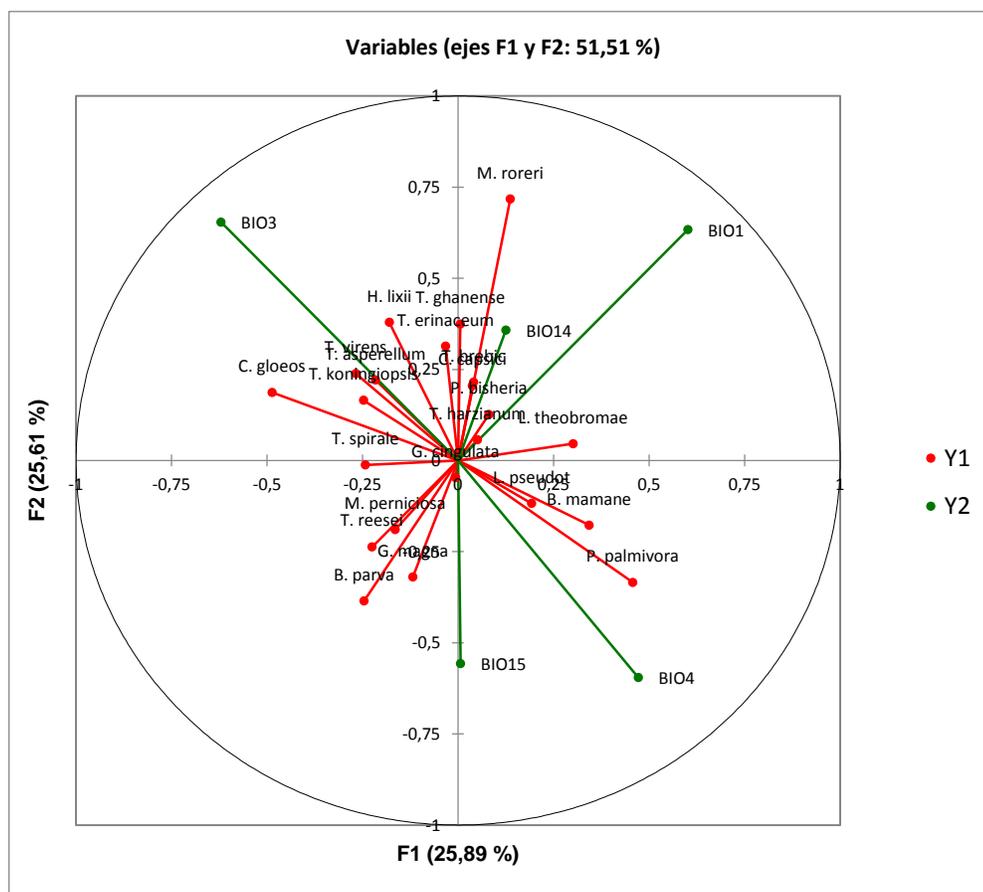


Figura 15. Variables de entrada obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos-Controladores” (Y1) y “Variables ambientales” (Y2).

En este gráfico (Figura 15), se presentan las correlaciones de las distintas variables de entrada, pertenecientes a los dos conjuntos canónicos (Y1 para patógenos y controladores; Y2 para variables ambientales). Se destacan las relaciones directas entre *P. palmivora* y bio4; así como la de *T. virens*, *T. reesei*, *T. asperellum*, *C. gloeosporioides* con bio3 y *M. roreri* con bio14. Se pueden también apreciar correlaciones inversas como las de *M. roreri* y bio15 y *B. parva* con bio1.

4.1.3.-CCorAde Patógenos-VARIABLES Ambientales

Este procedimiento encuentra las combinaciones lineales de los dos conjuntos de variables (Patógenos y Variables Ambientales) que tienen la mayor correlación entre ellas. Los conjuntos de variables se resumen en la Tabla 17. En este caso, se formaron 5 conjuntos de combinaciones lineales. La Tabla N° 18 muestra las correlaciones estimadas entre cada conjunto de variables canónicas. Dado que uno de los valores-P es menor que 0,05; ese conjunto tienen una correlación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 17. Variables utilizadas en el análisis de CCorA de Patógenos-VARIABLES Ambientales

Variables en el conjunto 1	Variables en el conjunto 2
<i>C. gloeosporioides</i>	bio1
<i>G. magna</i>	bio3
<i>C. capsici</i>	bio4
<i>G. cingulata</i>	bio14
<i>L. theobromae</i>	bio15
<i>B. mamane</i>	
<i>L. pseudotheobromae</i>	
<i>B. parva</i>	
<i>M. roreri</i>	
<i>M. perniciosa</i>	
<i>P. palmivora</i>	
<i>P. bisheria</i>	

Tabla 18. Correlaciones Canónicas de Patógenos-VARIABLES Ambientales.

Número	Eigenvalor	Correlación Canónica	Lambda de Wilks	Chi-Cuadrada	G.L.	Valor-P
1	0,797512	0,893036	0,0315421	93,3237	60	0,0038
2	0,625804	0,791078	0,155773	50,2026	44	0,2411
3	0,371457	0,609473	0,416287	23,6623	30	0,7871
4	0,291742	0,540132	0,662304	11,1248	18	0,889
5	0,0648828	0,254721	0,935117	1,81125	8	0,9863

Se formaron 5 conjuntos de combinaciones lineales, resultando estadísticamente significativo sólo el primer conjunto de combinaciones lineales, el cual es el siguiente:

0,122223*C. gloeos + 0,341371*G. magna - 0,0611511*C. capsici - 0,00203208*G. cingulata + 0,157172*L. theobromae - 0,0567322*B. mamane + 0,0750046*L. pseudot + 0,327271*B. parva - 0,787291*M. roreri - 0,112198*M. perniciosa + 0,188022*P. palmivora - 0,0644067*P. bisheria

y

-0,523165*bio1 + 0,153829*bio3 + 0,586008*bio4 - 0,186358*bio14 + 0,381716*bio15

En la Tabla N° 19 se presentan los coeficientes de redundancia de ambos grupos de variables canónicas, observándose lo siguiente: Las variables Y1 (patógenos), presenta un nivel de explicación sensiblemente menor para las variables Y2, (variables ambientales), en cambio al examinar los coeficiente de redundancia de la variable Y2, se observa que las variables ambientales tienen un poder explicativo sensiblemente mayor para las variables Y1. Esta relación entre los conjuntos de variables, indica que las variables ambientales seleccionadas influyen de forma importante sobre la presencia del conjunto de los patógenos.

En el análisis de correlación de Pearson que se hizo en la determinación de los *Hotspots* se habían podido segregar dos grandes regiones, dominadas por diferentes especies (en ese caso los datos estaban agrupados por estados). En este nuevo análisis vuelven a aparecer estas dos grandes

regiones (ver Figura 16). Sin embargo, es de hacer notar que en aquel caso, las regiones aparecen al analizar la estructura de correlación en la matriz de presencia-ausencia, mientras que en este caso, la estructura aparece como parte de las relaciones de las presencias-ausencias de los patógenos y el ambiente. Este resultado puede ser interpretado como la modelación de las abundancias de los patógenos (su distribución espacial) por las distintas variables ambientales a lo largo de un gradiente Occidente-Oriente.

Este resultado es digno de destacar puesto que, a pesar de existir una relación entre las abundancias de los patógenos y sus posibles controladores (como se desprende del primer CCorA presentado en esta sección), se observa que el moldeado que hacen las variables ambientales sobre las abundancias de los patógenos, es mucho más fuerte.

Tabla 19. Coeficientes de Redundancia para los Conjuntos de Variables Canónicas.

Coeficientes de redundancia (Y1):

F1	F2	F3	F4	F5	Suma
0,092	0,064	0,033	0,024	0,006	0,219

Coeficientes de redundancia (Y2):

F1	F2	F3	F4	F5	Suma
0,377	0,147	0,045	0,013	0,008	0,590

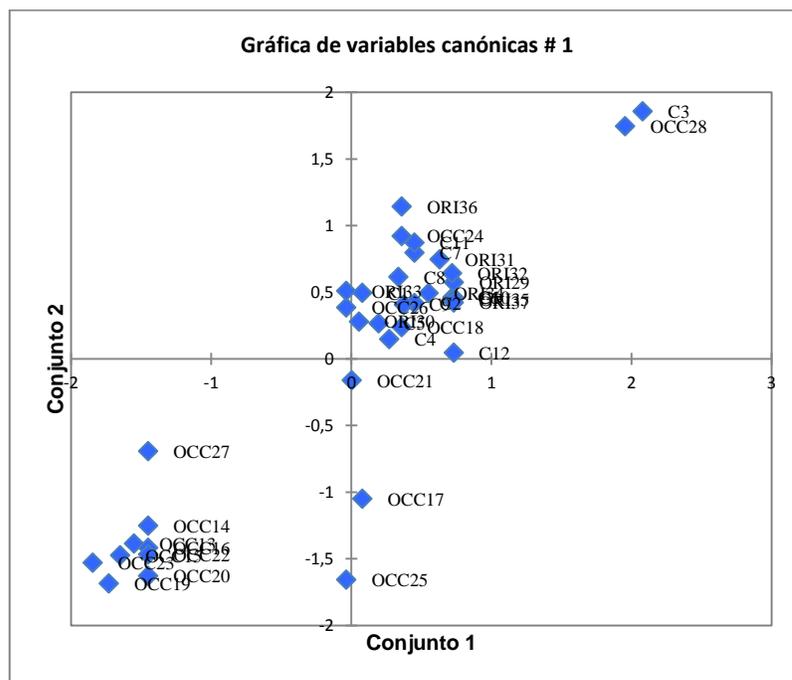


Figura 16. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos” y las Variables Ambientales. Donde se observan las muestras de las tres zonas cacaoteras del país (ORI= Oriente; OCC=Occidente y C= Centro).

En este gráfico (Figura 16) se presenta la ordenación de las muestras en el espacio de los conjuntos “Patógenos” y las Variables Ambientales, se puede observar una tendencia clara de las muestras de las zonas Oriente y Centro a agruparse en el cuadrante superior, mientras las de Occidente mayoritariamente en el cuadrante negativo. Se aprecia la similitud de esta segregación y la que resulta del análisis de correlación de Pearson realizado en el aparte de *hotspots*.

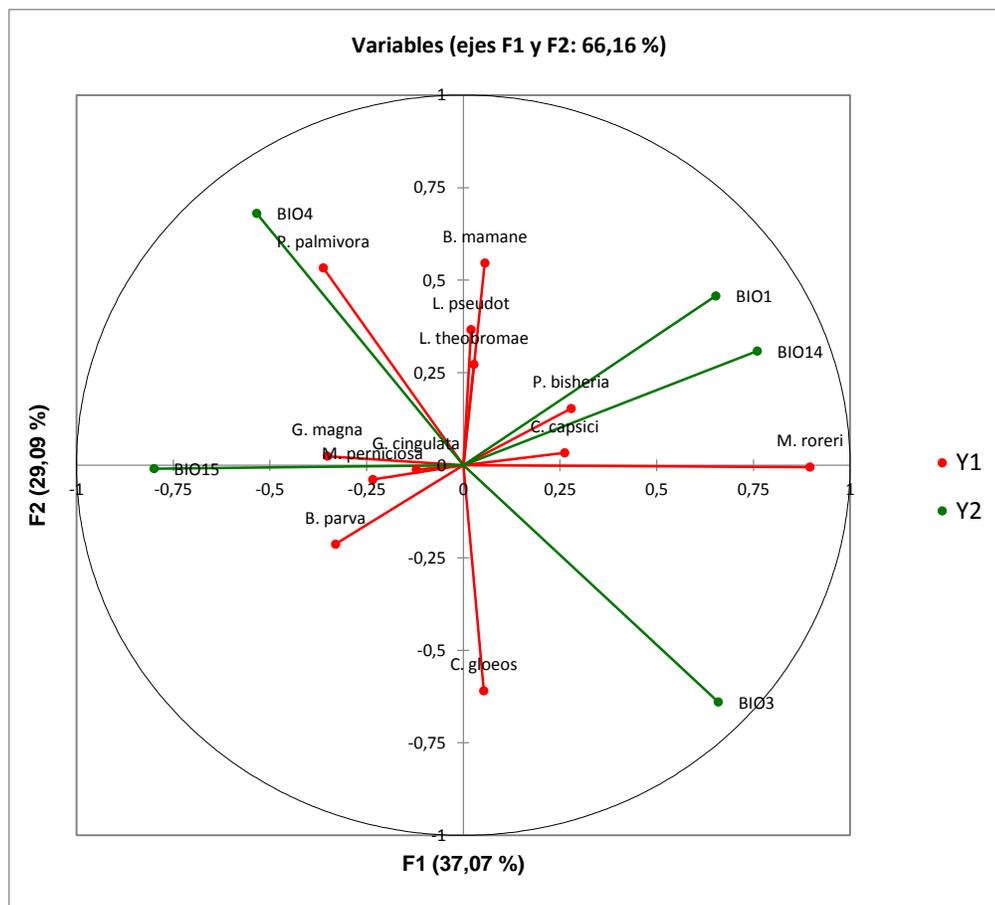


Figura 17. Variables de entrada obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Patógenos” y “Variables ambientales”.

En este gráfico (Figura 17), se presentan las correlaciones de las distintas variables de entrada, pertenecientes a los dos conjuntos canónicos (Y1 para patógenos; Y2 para variables ambientales). Se destacan las relaciones directas entre *P. palmivora* y bio4; *C. gloesporioides* con bio3 y *M. roreri* con bio3, bio14 y bio1; así como la de *M. pernicioso* y bio15. Se pueden apreciar correlaciones inversas como las de *M. roreri* y bio15; *P. palmivora* y bio3 y *B. parva* y bio1.

En este estudio, *M. roreri* se encontró solo en la zona Occidental y en investigaciones anteriores ha sido reportada únicamente en esa zona del país, por lo tanto se evidencia que las condiciones ambientales tienen una

considerable influencia en la presencia y distribución de ese patógeno. Esta influencia ambiental en *M. royeri*, ha sido reportada por distintos investigadores, quienes sostienen que se hace fundamental entender las condiciones ambientales y los distintos genotipos de cacao sembrados pues estos dos aspectos tienen importante influencia en este hongo (Correa *et al.*, 2014; Jaimes *et al.*, 2016).

4.1.4.-CCorA de Controladores-VARIABLES Ambientales

Por último se presentan las combinaciones lineales de los dos conjuntos de variables (Controladores y Variables Ambientales) que tienen la mayor correlación entre ellas. Los conjuntos de variables se resumen en la Tabla N° 20. En este caso, se formaron 5 conjuntos de combinaciones lineales. La Tabla N° 21 muestra las correlaciones estimadas entre cada conjunto de variables canónicas. A diferencia de los casos anteriores, ninguno de los valores-P es menor que 0,05; y por tanto ningún conjunto tienen una correlación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 20. Variables utilizadas en el análisis CCorA de Controladores-VARIABLES Ambientales.

Variables en el conjunto 1	Variables en el conjunto 2
<i>T. reesei</i>	bio1
<i>T. harzianum</i>	bio3
<i>H. lixii</i>	bio4
<i>T. virens</i>	bio14
<i>T. asperellum</i>	bio15
<i>T. brevicompactum</i>	
<i>T. ghanense</i>	
<i>T. koningiopsis</i>	
<i>T. spirale</i>	
<i>T. erinaceum</i>	

Tabla 21. Correlaciones Canónicas de Controladores-VARIABLES Ambientales

Número	Eigenvalor	Correlación Canónica	Lambda de Wilks	Chi-Cuadrada	G.L.	Valor-P
1	0,549928	0,741571	0,205458	44,3103	50	0,7001
2	0,261504	0,511375	0,456501	21,9566	36	0,9683
3	0,227941	0,477432	0,61815	13,4687	24	0,9578
4	0,162202	0,402743	0,800652	6,22521	14	0,9605
5	0,0443375	0,210565	0,955662	1,26981	6	0,9733

En este caso, se formaron 5 conjuntos de combinaciones lineales. El primer conjunto de combinaciones lineales es:

-0,093418*T. reesei + 0,288019*T. harzianum + 0,0583429*H. lixii - 0,154141*T. vires - 0,00371464*T. asperellum - 0,377215*T. brevic - 0,237725*T. ghanense - 0,483829*T. koningiopsis - 0,462841*T. spirale - 0,306261*T. erinaceum

y

0,299297*bio1 - 0,514374*bio3 - 0,131897*bio4 - 0,579183*bio14 + 0,215046*bio15

A pesar que en este caso ningún conjunto presentó una correlación estadísticamente significativa, como se ha visto anteriormente, es de hacer notar que en la Tabla N° 22, donde se presentan los coeficientes de redundancia de ambos grupos de variables canónicas, se puede apreciar que la tendencia es la misma del caso anterior (patógenos vs ambiente). Esta relación entre los conjuntos de variables, nos indica que las variables ambientales seleccionadas influyen (aunque no de forma significativa) en la presencia de los controladores. Es de hacer notar, que para el caso de los controladores, pareciese que la relación de estos con los patógenos es más fuerte que la de los mismos con las variables ambientales.

Tabla 22. Coeficientes de Redundancia para los Conjuntos de Variables Canónicas.

Coeficientes de redundancia (Y1):

F1	F2	F3	F4	F5	Suma
0,077	0,040	0,017	0,016	0,004	0,154

Coeficientes de redundancia (Y2):

F1	F2	F3	F4	F5	Suma
0,255	0,043	0,024	0,007	0,010	0,339

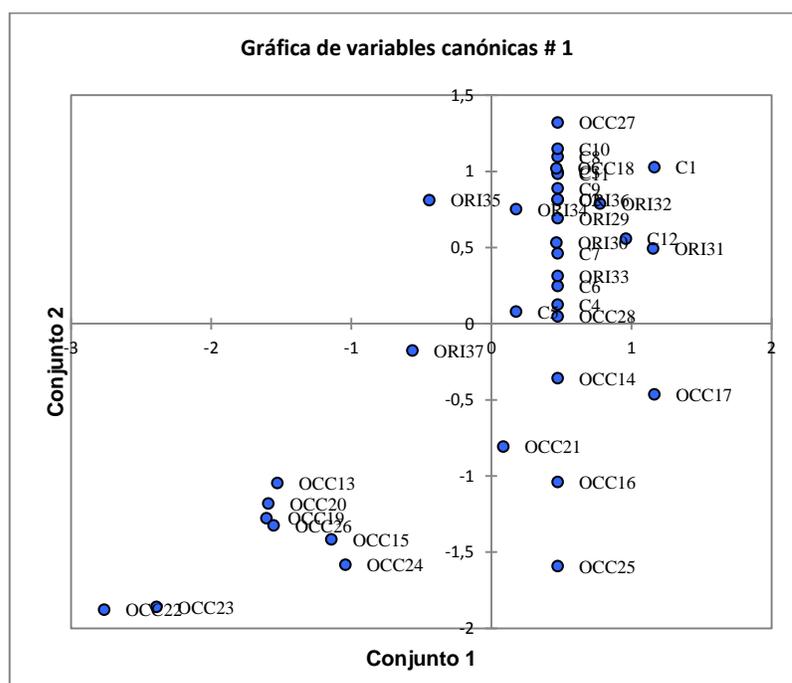


Figura 18. Variables canónicas obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Controladores” y las Variables Ambientales. Donde se observan las muestras de las tres zonas cacaoteras del país (ORI= Oriente; OCC=Occidente y C= Centro).

En este gráfico (Figura 18), se presenta la ordenación de las muestras en el espacio de los conjuntos mencionados, se puede observar una tendencia de

las muestras de las zonas Oriente y Centro a agruparse en el cuadrante superior, mientras las de Occidente mayoritariamente en los cuadrantes inferiores. Se aprecia la similitud de esta segregación y la que resulta del análisis de correlación de Pearson realizado en el aparte de *hotspots* y en este mismo aparte, al analizar Patógenos-VARIABLES ambientales. Sin embargo, la tendencia es mucho menos marcada, sobre todo en las muestras de Occidente, que presentan mayor dispersión.

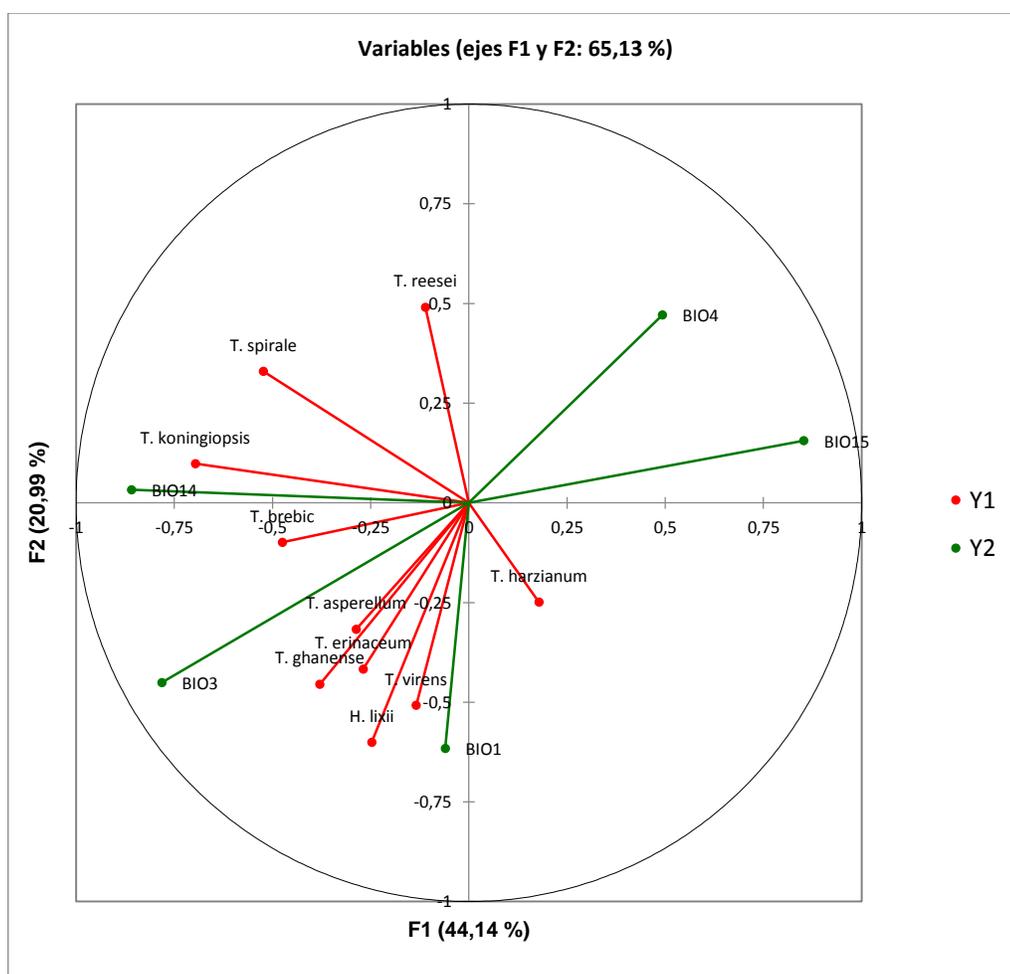


Figura 19. Variables de entrada obtenidas a partir del CCorA para los conjuntos “Controladores” y “Variables ambientales”.

En este gráfico (Figura19), se presentan las correlaciones de las distintas variables de entrada, pertenecientes a los dos conjuntos canónicos (Y1 para controladores; Y2 para variables ambientales). Como se ha dicho en el texto la correlación no ha resultado significativa en este caso para ninguno de los conjuntos formados. Sin embargo, se aprecian en el gráfico posibles tendencias. Lo más resaltante en este caso es la correlación negativa con bio4 y bio15; como la positiva con bio14, bio3 y bio1.

4.2.-Análisis de Componentes Principales (PCA):Contando con una matriz de presencia-ausencia de especies en cada sitio de muestreo, se calculó la matriz de varianza-covarianza y sobre ésta se realizó un Análisis de Componentes Principales sin transformaciones (PCA); este análisis acumuló en sus dos primeros ejes un 60% de la variabilidad original del sistema y permitió visualizar cierta segregación, donde se aprecian muestras provenientes de la tres zonas cacaoteras del país a lo largo del eje de mayor variación (Figura 20).

Se realizaron tres (3) gráficos para visualizar los resultados:

1. El primero para las muestras en el espacio de los componentes principales 1 y 2 (Figura 20).
2. El segundo para las variables, que en este caso son las especies que conforman cada una de las muestras (Figura 21).
3. El tercero en el cual se muestran los dos anteriores de forma resumida. En este gráfico (denominado Biplot o Jointplot) se representan las muestras y las variables en forma de flecha partiendo desde el origen, permitiendo así inferir la composición de las muestras allí representadas (Figura 22).

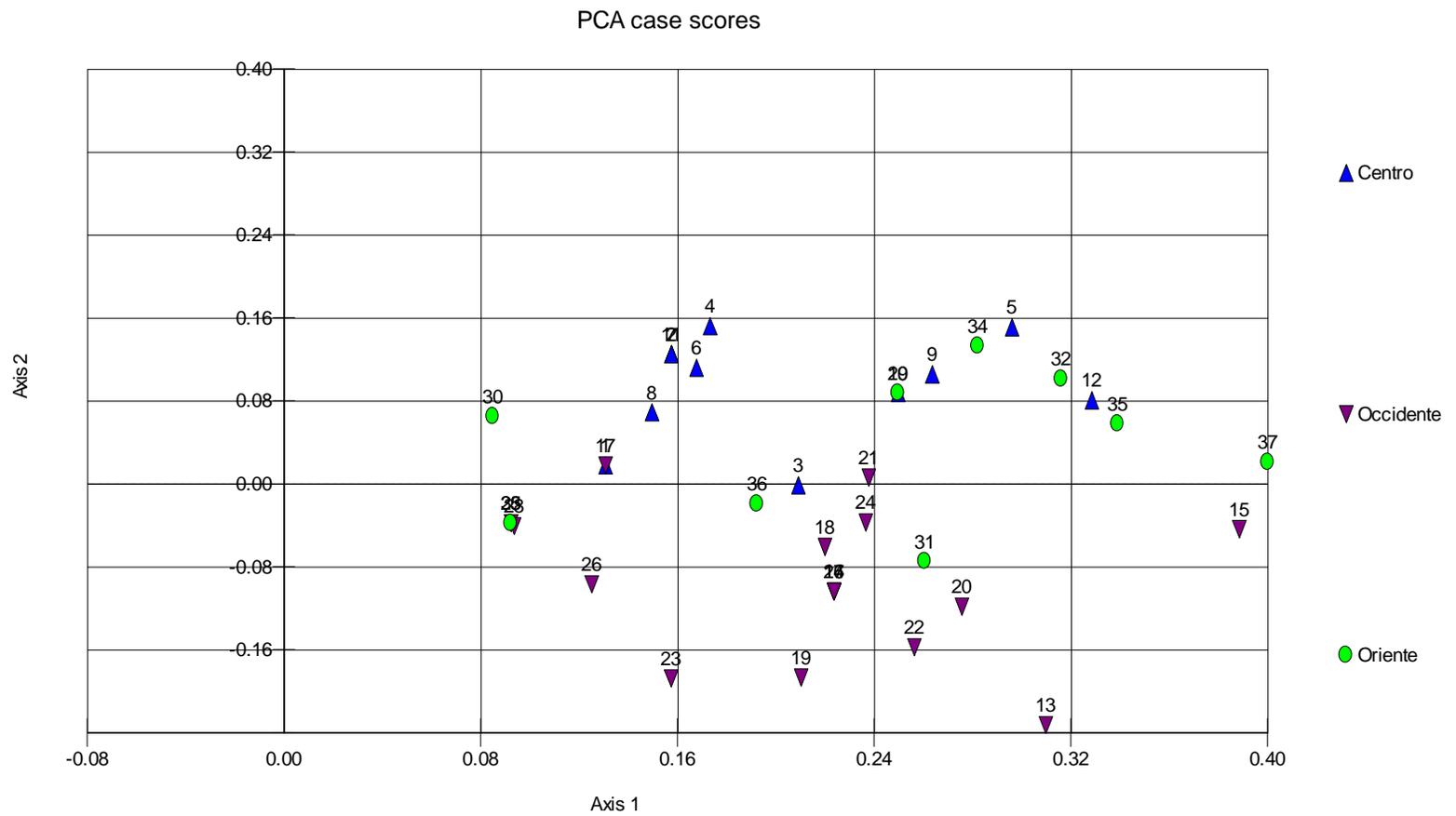


Figura 20. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del PCA basado en la matriz de varianza-covarianza. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.

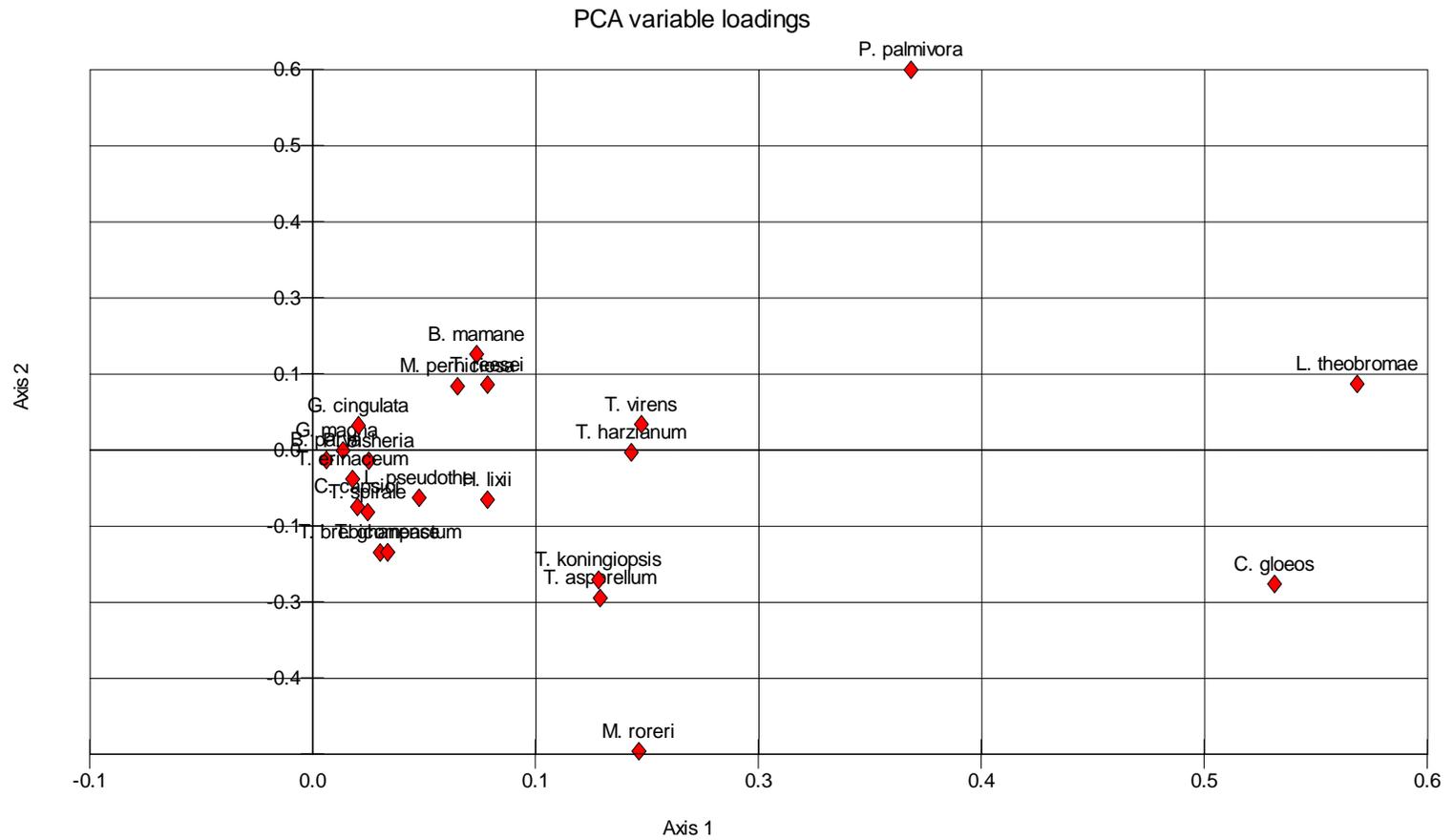
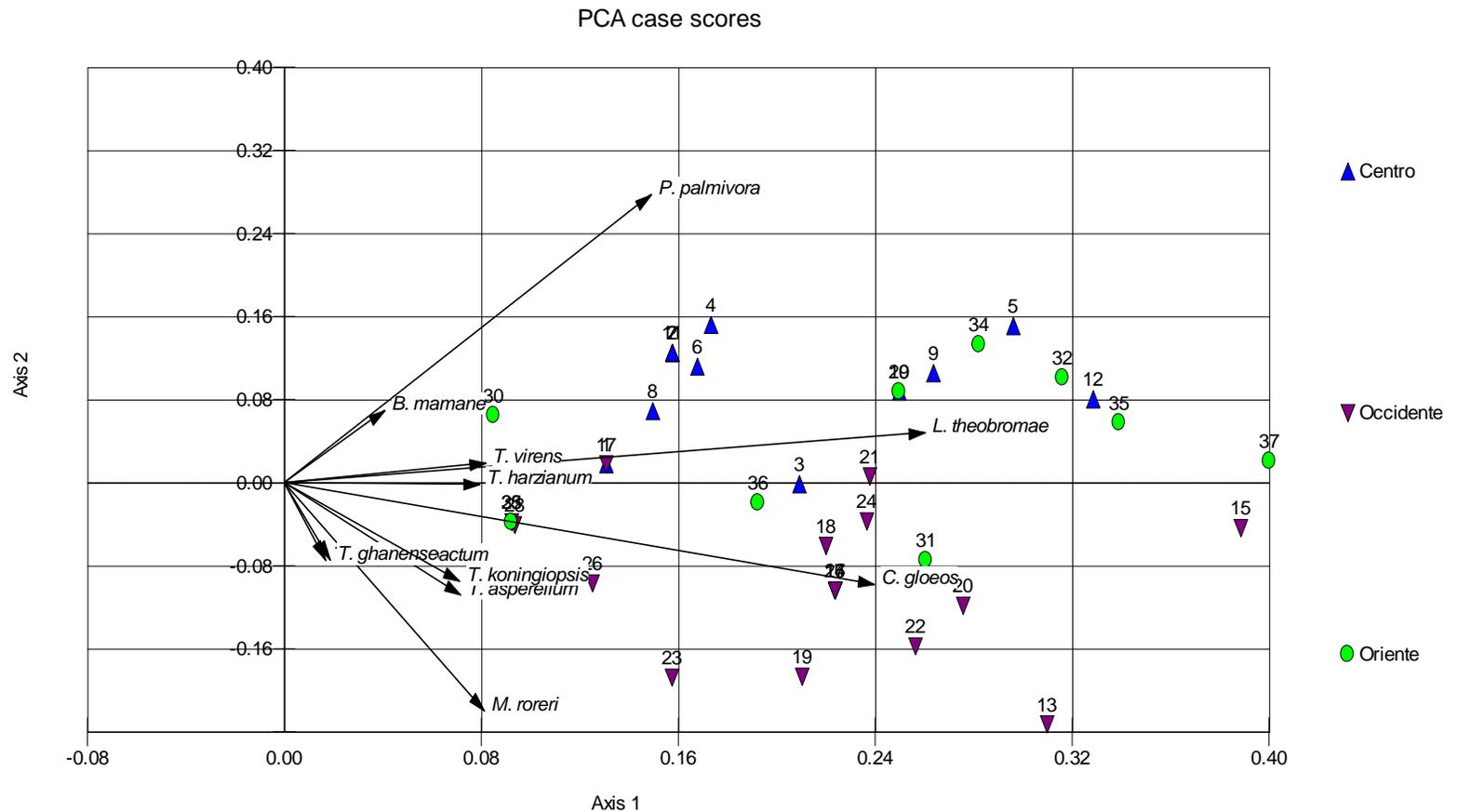


Figura 21. Ubicación relativa de las especies obtenida a partir del PCA basado en la matriz de varianza-covarianza.



Vector scaling: 0.43

Figura 22. Biplot obtenido a partir del PCA basado en la matriz de varianza-covarianza de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las especies encontradas. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.

La Figura 20, presenta una tendencia a ubicar las muestras de las distintas zonas cacaoteras en franjas horizontales. Es decir, podemos observar las muestras correspondientes al Centro, como una primera franja, seguida por las de Oriente y luego en la parte baja del gráfico las muestras provenientes de Occidente. Es posible inferir que esta disposición responde a un gradiente geográfico. Sin embargo, este no está claramente definido o esbozado en la ordenación lograda con el PCA. Pareciese que la variación dentro de cada una de estas áreas es muy grande, lo que hace más difícil resolver las diferencias entre zonas.

Por otro lado, la figura 22, muestra las especies más abundantes en las zonas cacaoteras del país, según el largo de los vectores, como son: *Phytophthora palmivora*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Moniliophthora roreri*. Observándose en el caso de *M. roreri* su predominio en el occidente; *P. palmivora* predominio hacia el Centro y Oriente; *C. gloeosporioides* predominio hacia el Oriente y Occidente del país y *L. theobromae* en las tres zonas cacaoteras del país. Del género *Trichoderma*, las especies más abundantes fueron *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* y *T. koningiopsis*; siendo que las dos primeras se observan en las tres zonas cacaoteras del país, mientras que *T. koningiopsis* y *T. asperellum* predominan hacia la zona de Occidente.

Posteriormente, se realizó un segundo análisis de componentes principales, esta vez sobre la matriz de correlación, este análisis explicó en sus dos ejes principales un 37% de la variabilidad y se resume en las cuatro figuras siguientes. Estas se han realizado siguiendo el mismo orden usado para el PCA sobre la matriz de varianza-covarianza.

En primer lugar podemos observar la dominancia en el análisis de muestras anómalas como la muestra 13 (Figura N° 23). Esta aparece en el extremo

positivo del primer componente principal. Es una muestra abundante, pero que además posee especies que no aparecen en otras muestras como *C. capsici*. Se puede observar que la caída de la cantidad de información “explicada” por los dos primeros componentes es sustancial, llegando a explicar en los tres primeros ejes un 37 % de la estructura. Sin embargo, ya el análisis no se ocupa simplemente de la variación, ahora aborda la estructura de correlación interna de los datos. Se observa, sin embargo, una ordenación que presenta las muestras del centro en el extremo izquierdo, luego las muestras de Oriente y en el extremo derecho las correspondientes al Occidente. Esto sugiere una primera aproximación interesante. Lo que el análisis plantea es que las muestras del Centro y de Oriente se parecen más entre sí, pero que las de Occidente se parecen más a las de Oriente que a las de Centro (lo esperado es que las muestras provenientes del Centro se parezcan más al Occidente y al Oriente de lo que se parecen estas últimas entre sí). Este resultado es muy importante, pues es contraintuitivo, desde el punto de vista de este trabajo, pues la estructura de correlación “habla” de algo más que de un mero gradiente geográfico. Claro está, que no es directa la respuesta de qué podría estarlo moldeando, pero más adelante, en este mismo aparte se pueden ver indicios de las fuerzas que juegan papeles importantes (ver CA y CCA).

En la Figura 25, se destaca la correlación negativa entre las dos especies de *Moniliophthora* encontradas, donde el vector de *M. roreri*, se ubica exclusivamente hacia la zona del gráfico donde predominan las muestras de Occidente, mientras que *M. perniciososa*, cuyo vector apunta en dirección totalmente opuesta, se ubica hacia las muestras representativas de las zonas de Oriente y Centro. En el caso de *Trichoderma*, se observa que los vectores de las especies *T. brevicompactum*, *T. spirale*, *T. ghanense*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. erinaceum* e *Hipocrea lixi*, apuntan hacia la zona del gráfico donde predominan las muestras de Occidente, mientras que los vectores de

las especies, *T. virens*, *T. harzianum* y *T. reesei*, hacia las zonas de Oriente y Centro. Se observa la consistencia de este resultado con los presentados tanto en el análisis de *Hotspots*, como con el de CCorA de Patógenos-Controladores.

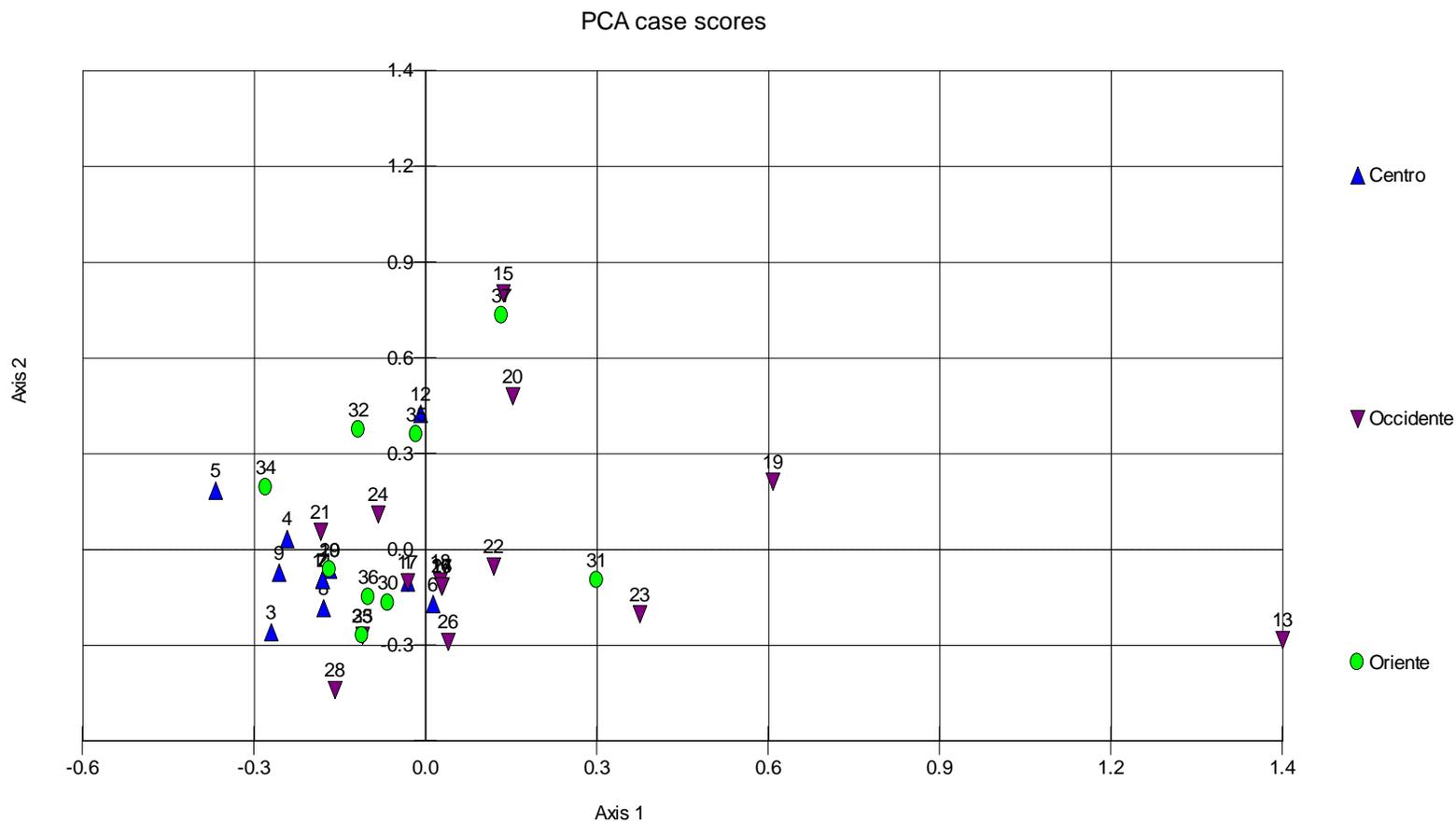


Figura 23. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del PCA basado en la matriz de correlación. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.

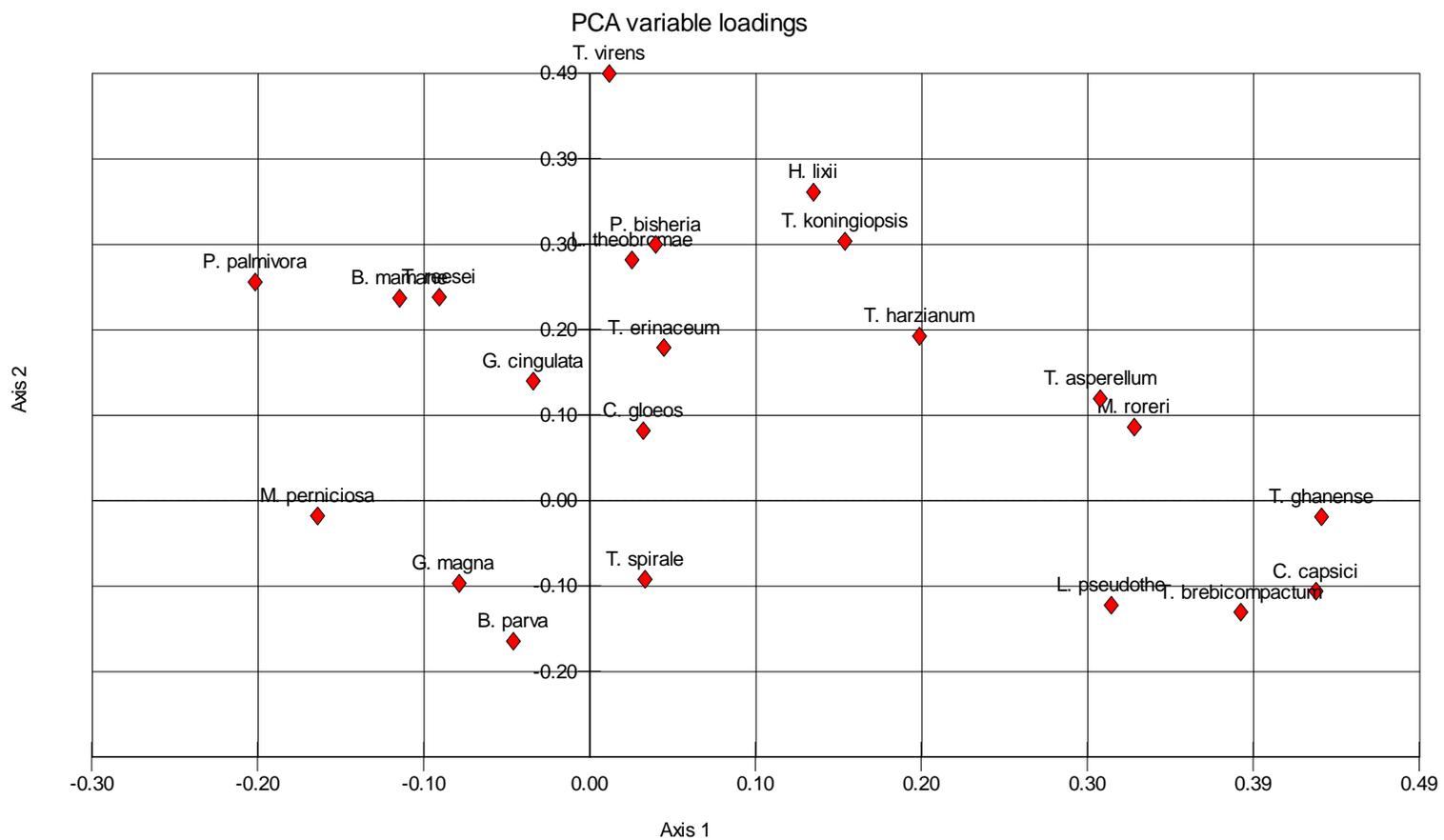
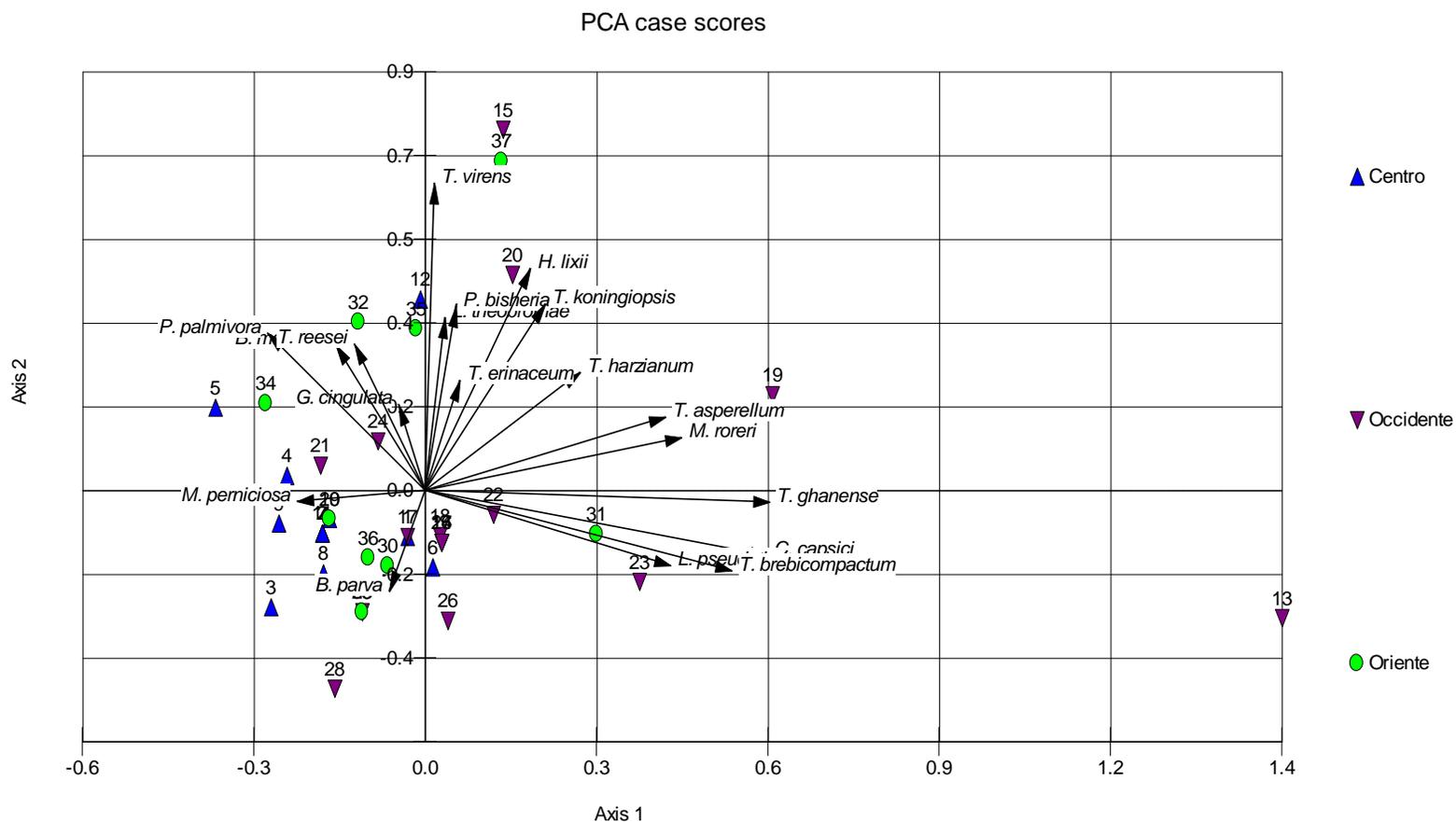
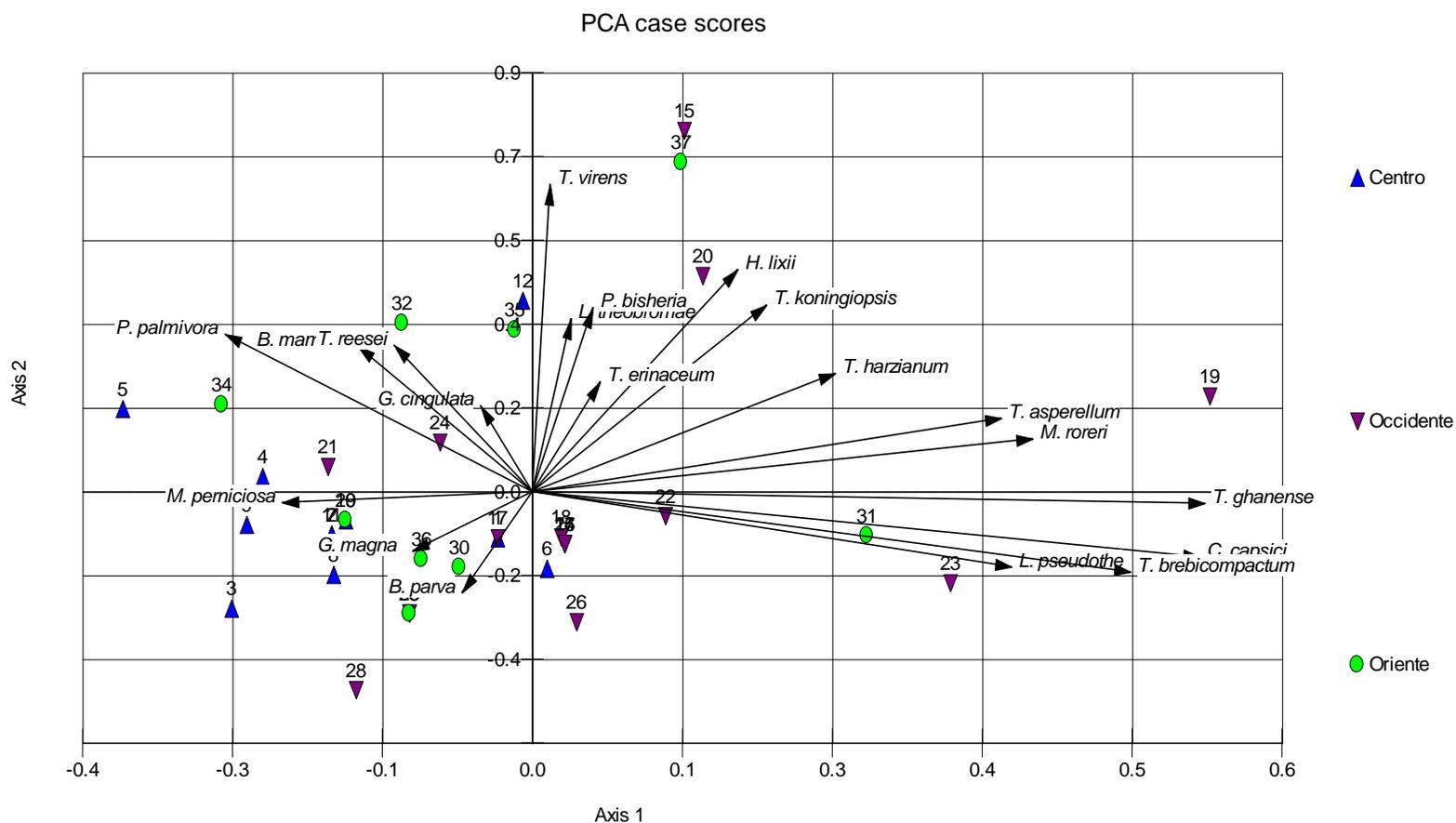


Figura 24. Ubicación relativa de las especies obtenida a partir del PCA basado en la matriz de correlación.



Vector scalina: 1,34

Figura 25. Biplot obtenido a partir del PCA basado en la matriz de correlación de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las especies encontradas. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.



Vector scaling: 1,34

Figura 26. Biplot obtenido a partir del PCA basado en la matriz de correlación de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las especies encontradas. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país. Acercamiento al grupo central ignorando la muestra 13.

Con estos dos análisis, se observa una tendencia zonal, es decir se aprecia, aunque con algunas superposiciones, como se separan las tres zonas cacaoteras del país, simplemente analizando los especímenes encontrados. Inclusive sugieren cómo podrían ser las relaciones de algunas zonas entre sí. Pero como se conoce, el PCA, además de ser sensible a los distintos valores de varianzas de las variables originales (lo cual se corrige al centrar y estandarizar), fue originalmente diseñado para tratar con variables continuas y no con valores presencia-ausencia o conteos, por lo tanto no genera suficiente información, sin embargo da una aproximación al comportamiento de los datos analizados.

4.3.-Análisis de Coordenadas Principales (PCO): Por las razones antes mencionadas, se realizó un análisis de Coordenadas Principales (PCO), el cual posee la ventaja descrita en el aparte de metodología de poder trabajar con distintas medidas y lidiar de buena forma con los ceros de la matriz de presencia-ausencia (sobre todo mediante la escogencia de la distancia Gower).

El PCO, explicó en sus tres ejes un 45% de la variabilidad, con este análisis se compararon las zonas de muestreo directamente por los especímenes allí encontrados, al igual que en el PCA, se observó una tendencia zonal aunque con superposiciones (Figura N°27). En dicha figura se aprecia nuevamente, aunque ahora de una manera más diáfana, la segregación de las muestras (observando de derecha a izquierda en el gráfico) correspondientes a la zona Centro, seguidas por las de Oriente y por último las de Occidente. La Figura N°28 incorpora un tercer eje, de forma de verificar que la tendencia mostrada se mantiene aun incorporándolo y que la misma es parte de la tendencia general de la nube de datos.

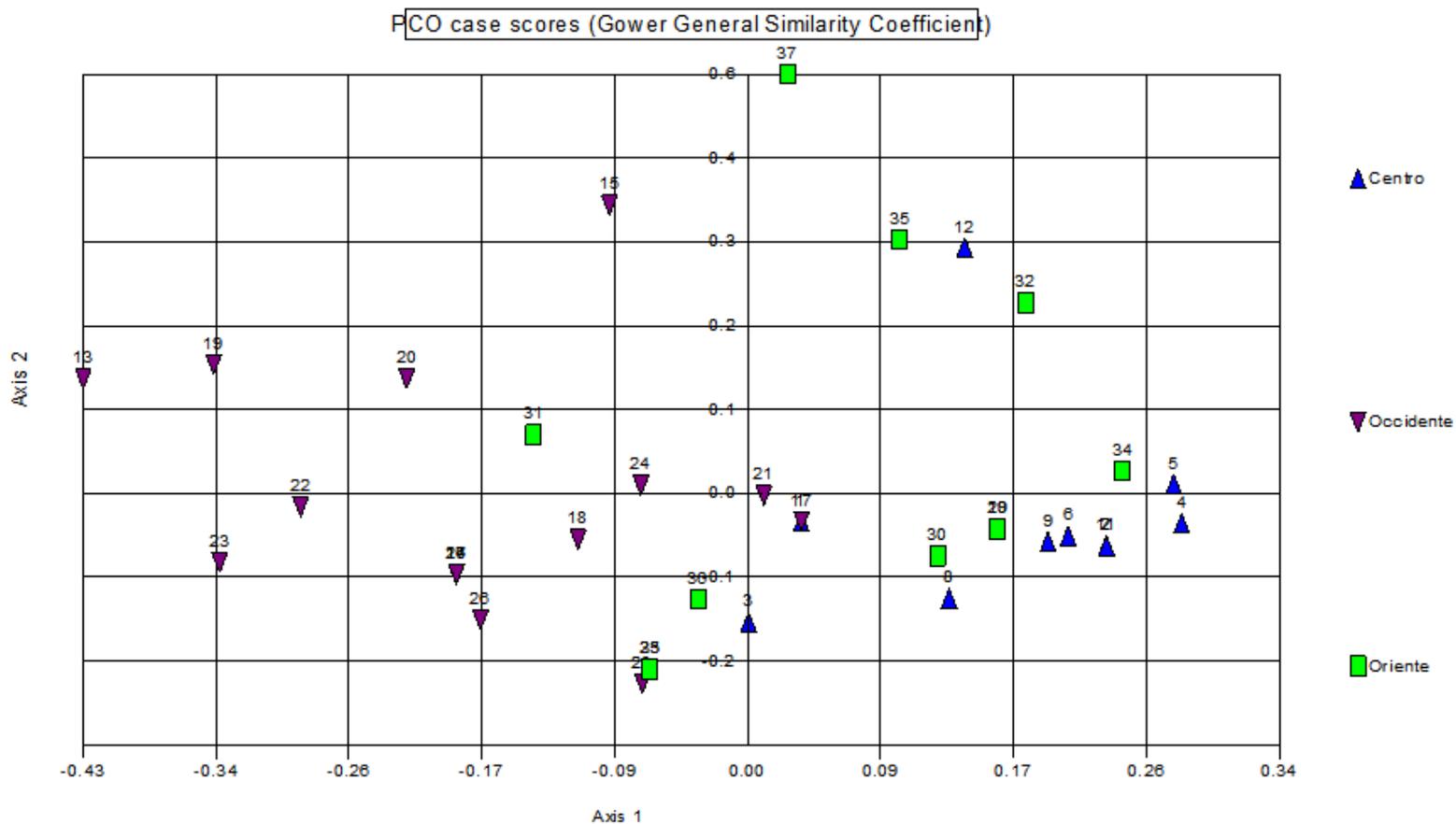


Figura 27. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del PCO utilizando el coeficiente de similaridad de Gower. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.

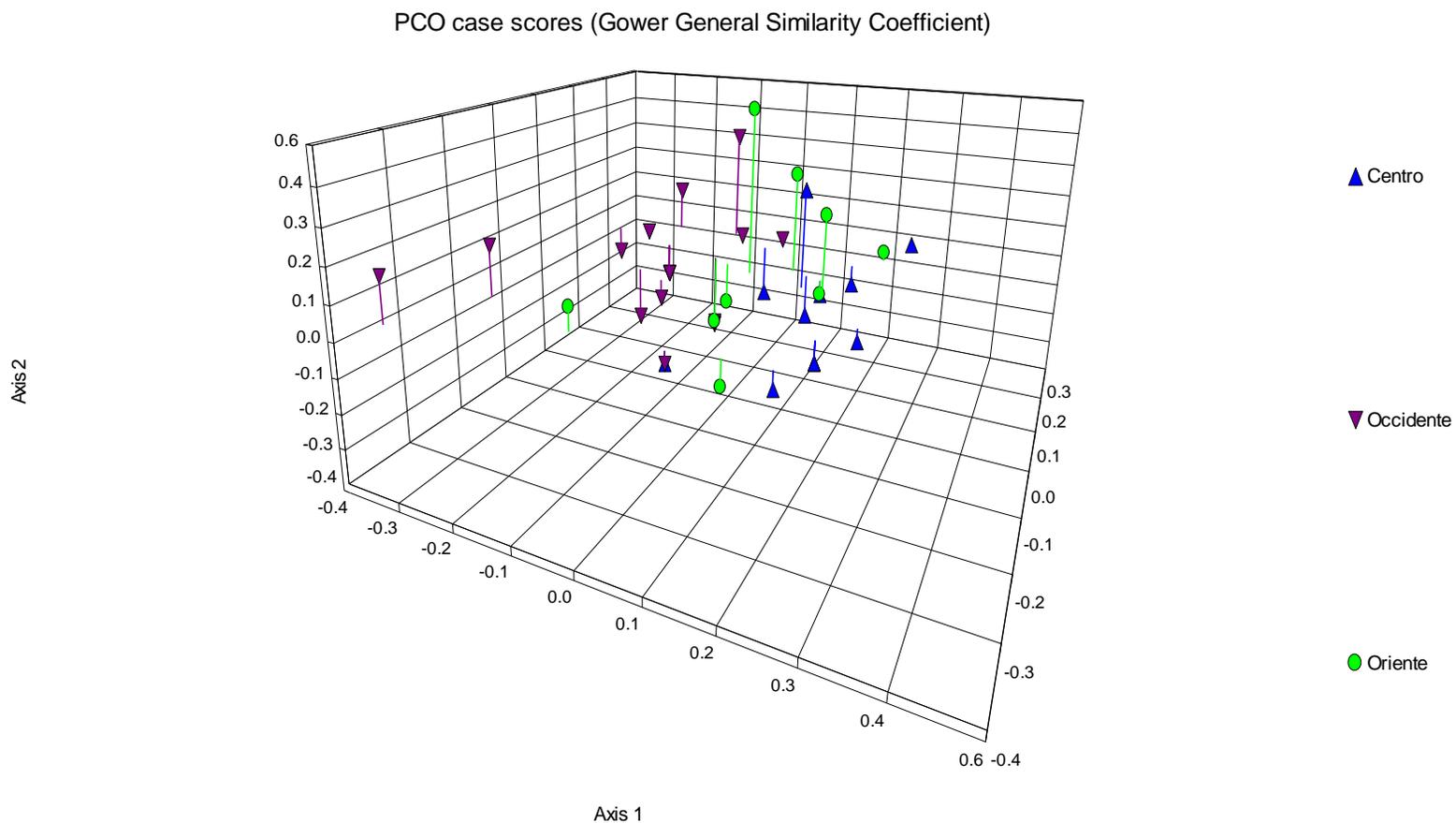


Figura 28. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo), obtenida a partir del PCO, incorporando el tercer eje. Se aprecia la nube de datos presentando un patrón consistente. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país.

4.4.-Análisis de Correspondencias (CA)

En el Análisis de Correspondencias (CA) realizado se utilizó el escalamiento por “muestras”, como se comentó en el aparte de metodología, cuando se realiza este tipo de escalamiento, las muestras se presentan en el centroide de las especies que estas contienen y las distancias entre muestras representan una aproximación a la distancia Chi-cuadrado, además no hace susceptible el análisis a posible ruido ambiental contenido en las variables (en este caso las variables son las especies, pero en el ACC se introducen directamente las variables ambientales como una restricción y, en ese caso, se torna sumamente importante eliminar el ruido). El análisis capturó en sus tres primeros ejes un 35 % de la Inercia.

Como se observa en la figura 29, el primer eje es dominado por la muestra 28, la cual es una muestra atípica, pues posee una especie común (*C. gloeosporioides*) y otra que sólo se registra en dicha muestra (*B. parva*). Se aprecia que la ubicación de las muestras en el diagrama es en el centroide de las especies que contienen. Tomando como ejemplo el caso de la muestra 28, se puede constatar que ésta se encuentra entre *C. gloeosporioides* y *B. parva*; esta muestra sólo tiene esas dos especies, por lo tanto el centroide se encuentra en el punto medio de la recta imaginaria que une a las dos especies y allí precisamente se ubica la muestra. Esta muestra al ser “portadora” de una especie muy común y una extremadamente rara, se torna muy poco común ella misma, y sus contribuciones en términos de valores Chi-cuadrado es muy grande (este método de ordenación trabaja con distancia Chi-cuadrado). El efecto neto de tener muestras muy raras (en su constitución de especies) es que esas muestras tienden a dominar el primer eje. Esto efectivamente se puede constatar en la figura 29, donde se aprecia la muestra 28 en la parte derecha del mismo y el resto de muestras ubicadas

en la parte central del gráfico y alineadas más bien con el segundo eje. En este gráfico se han colocado también las especies (que se denotan por rombos de color rojo).

Para poder observar entonces la tendencia del resto de muestras es necesario hacer un “acercamiento” de la nube. Claro está que se pudiera retirar a la muestra del análisis, pero como se ha explicado en el aparte de metodología se ha optado por dejarlas siempre en este trabajo. La razón que orienta en esta decisión tiene que ver con la posible deformación que introduciría en el resto de la nube el sacar la muestra, pues como se ha dicho su contribución Chi-cuadrada es grande. No se debe perder de vista que en la representación gráfica que se presenta a lo largo de este trabajo, las muestras u objetos que se colocan en los gráficos, guardan relaciones entre sí que han sido calculadas con las matrices originales. Extraer o quitar una muestra, cambia o modifica no sólo a ella misma, sino a todo el arreglo que se calcula a partir de la matriz. El acercamiento mencionado se puede observar en las figuras 30, 31 y 32.

Particularmente en la figura 30 se puede observar en la nube (muestras) una alineación en forma de franjas. Este efecto “zonal” se alinea con el segundo eje y deja a la franja azul (Centro) en la parte superior, la verde (Oriente) en la parte central y la morada (Occidente) en la parte inferior del gráfico. Esta alineación obviamente no es perfecta y se observa un grado de superposición entre dichas franjas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que esta ordenación es producto sólo de las relaciones obtenidas de una matriz de ausencia-presencia. Es decir, la estructura que refleja el método de ordenación, sólo se basa en la información que aporta dicha matriz. No deja de sorprender que una matriz de este tipo, pueda contener tanta información, al punto, que pueda reflejar un patrón incluso geográfico.

Como se ha mencionado la matriz de ausencia-presencia trabajada, es una matriz de “especies”, es decir, cada muestra que se ubica dentro del gráfico posee un patrón particular de ausencias y presencias de las especies encontradas. En términos del AC a este patrón se le suele denominar también “perfil”. En la figura 31 se ubican simultáneamente a las muestras y a las especies que dieron origen a la ordenación. La interpretación es en términos generales sencilla, y se corresponde con la noción que las muestras tienen contribuciones más importantes de las especies que aparecen “cerca” que de las especies que aparecen “lejos”.

Nuevamente no se debe perder de vista que la ordenación que se obtiene (por ejemplo, para una muestra) refleja un “perfil”, es decir es un patrón que depende no solamente de una especie en particular, sino de una combinación de especies. Esto puede ser explicado con la figura 31, observando las especies *M. roreri* y *M. perniciosa*, las cuales se pueden identificar con un patrón “zonal”. *M. roreri* suele presentarse en las muestras de Occidente únicamente y *M. perniciosa* en las muestras de Oriente y Centro. Es por esto, que el rombo que identifica a *M. perniciosa* se ubica en la parte superior del gráfico (coincidiendo con las muestras correspondientes de Oriente y Centro, mientras que el rombo que identifica a *M. roreri* se presenta en la parte inferior del gráfico (coincidiendo a su vez con las muestras provenientes de Occidente).

Por otro lado se observa la muestra 21 proveniente de Occidente muy arriba llegando a coincidir con las muestras de Oriente y Centro en su ubicación, la razón es que dicha muestra presenta en su perfil a *M. perniciosa*, que suele presentarse comúnmente en las muestras de Oriente y Centro, más no en las de Occidente (de hecho es la única muestra de Occidente que presenta esta especie). En este sentido, dicha muestra es atípica. Estos criterios de análisis se pueden ir aplicando a cada una de las muestras y descubriendo razones y patrones dentro de la ordenación así obtenida.

Cuando se presentan muestras atípicas (cuya contribución Chi-cuadrada es importante) estas suelen dominar el primer eje, como se ha llamado la atención anteriormente con respecto a la muestra 28 y *B. parva*, es por esto, que cuando se quiere observar la tendencia del resto de las muestras en conjunto, se suele obviar el primer eje y producir un nuevo gráfico con el segundo y tercer eje. Esto es precisamente lo que se puede apreciar en la figura 32, en la cual se observa el patrón geográfico alineado ahora con el Eje 2. El efecto logrado es casi equivalente a excluir del análisis a la especie relacionada con el valor atípico, comparar con Gráfico 33 (*B. parva*).

A manera de prueba o confirmación del efecto que se describe en el párrafo anterior se presentan los resultados de la figura 33, la cual es producto de repetir el AC sin incluir a la especie *B. parva* en el mismo. Se puede apreciar que la ordenación es casi idéntica a la mostrada en el Gráfico 32, sólo que ahora el resultado se puede apreciar en el primero y segundo eje.

Ahora bien, hasta este momento los distintos análisis han mostrado que las diferentes especies tienen patrones de distribución diferenciales, y estos patrones diferenciales, a su vez, hacen que se puedan distinguir zonas específicas de la geografía nacional. Es decir, si se tiene una muestra de la cual sólo se conocen las especies que aparecen en ella y cuáles no, se podría con una buena probabilidad decir, a que zona pertenece. Por otro lado, se ha podido constatar que existe una relación estadísticamente significativa entre ciertas variables climáticas y la presencia-ausencia de las especies de patógenos y posibles controladores (ver CCorA 2 y 3, en este aparte), pero debe haber criterios para decir cuáles son las variables que pesan más en la distribución de las mencionadas especies y en la conformación de las zonas que hemos podido observar. Es con la intención de dilucidar estas interrogantes que se ha realizado el Análisis de Correspondencia Canónico (CCA) que se presenta a continuación.

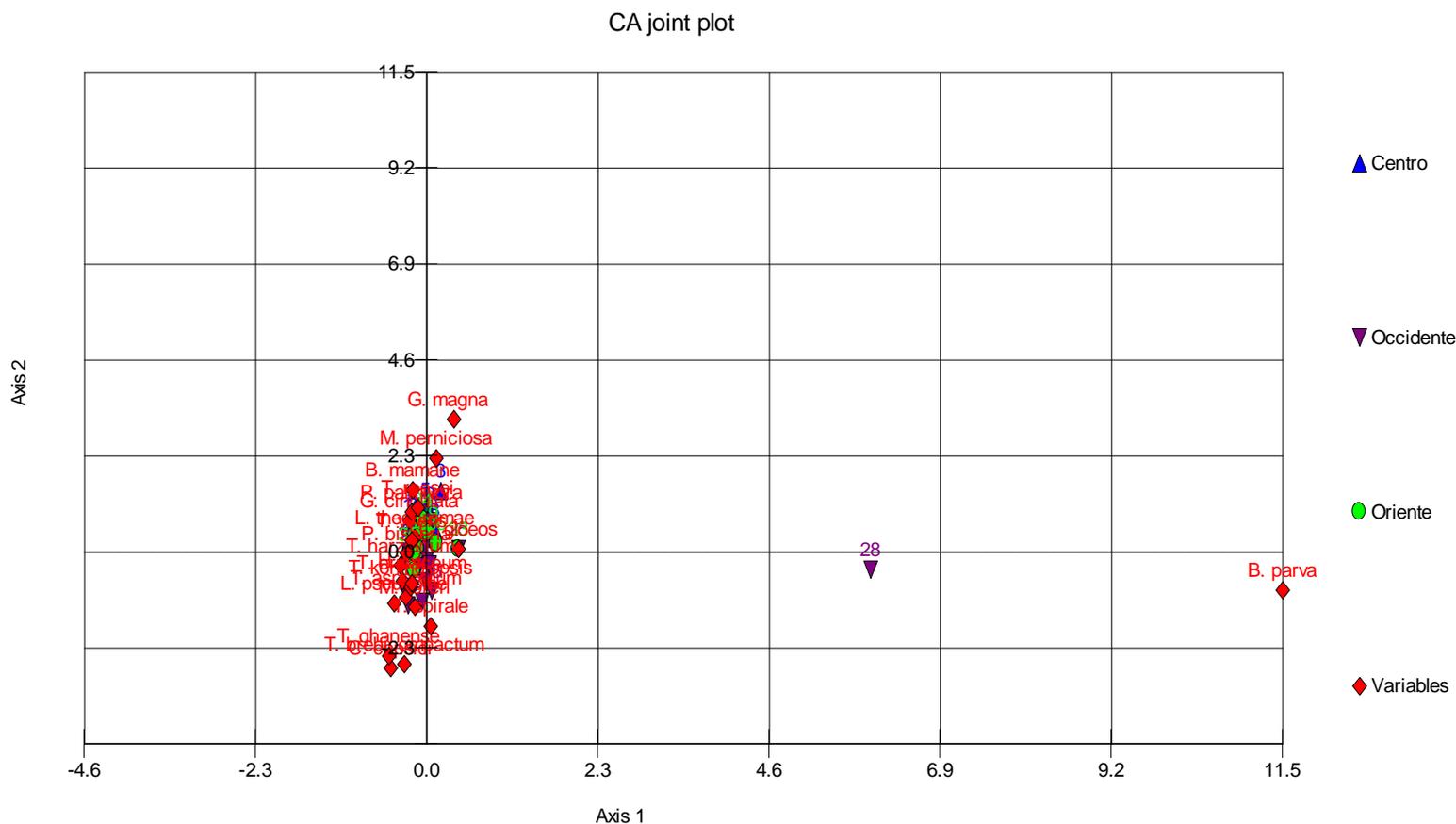


Figura 29. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las variables (especies) obtenida a partir del CA. Dominancia de la muestra 28 en el primer eje (dicha dominancia es debida a *B.parva*), por esta razón el resto de las muestras aparecen apiñadas en el origen de coordenadas.

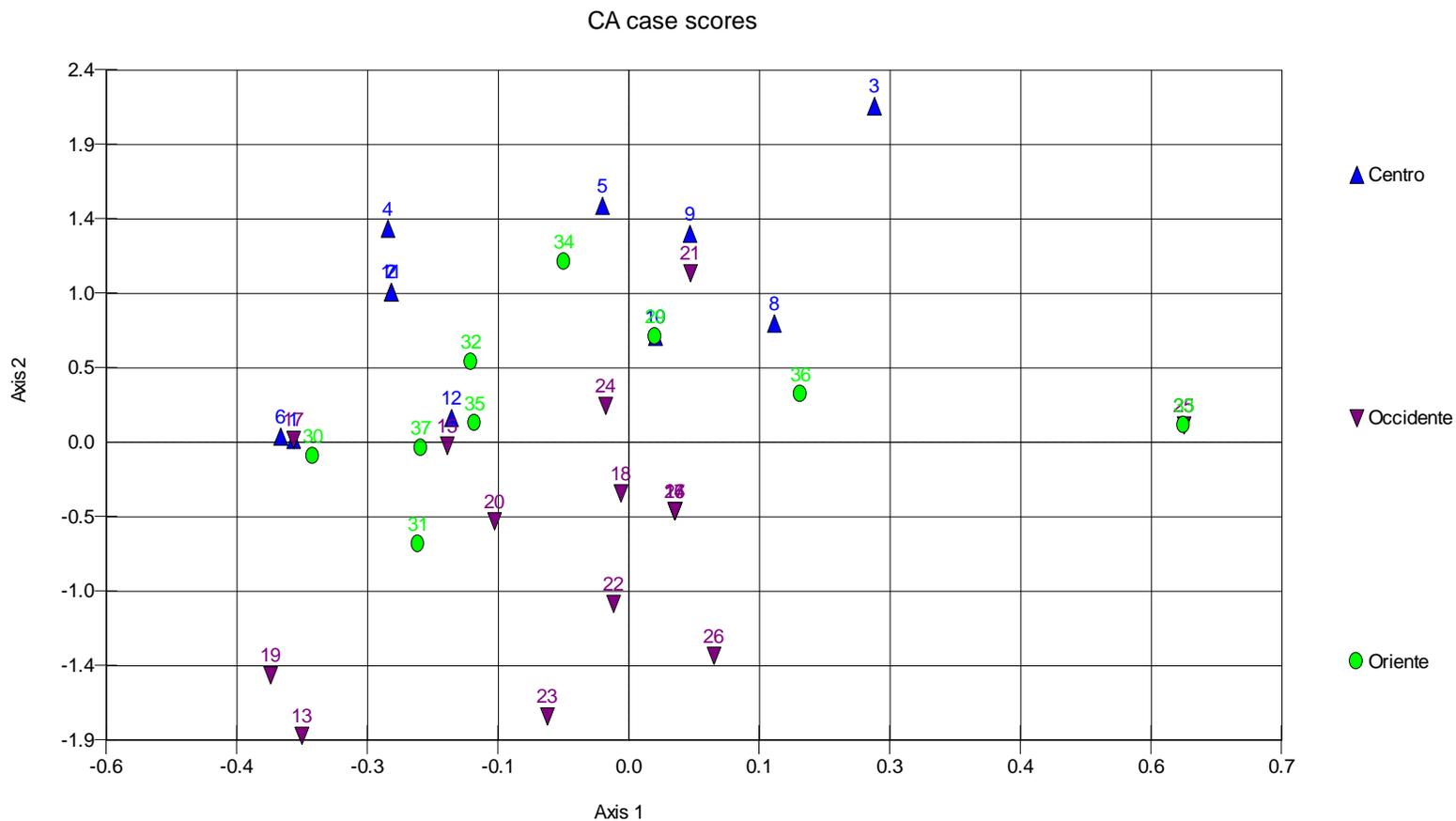


Figura 30. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del CA. Los colores diferencian las zonas cacaoteras del país. El gráfico se ha centrado en el origen de coordenadas para eliminar la dominancia de la muestra 28.

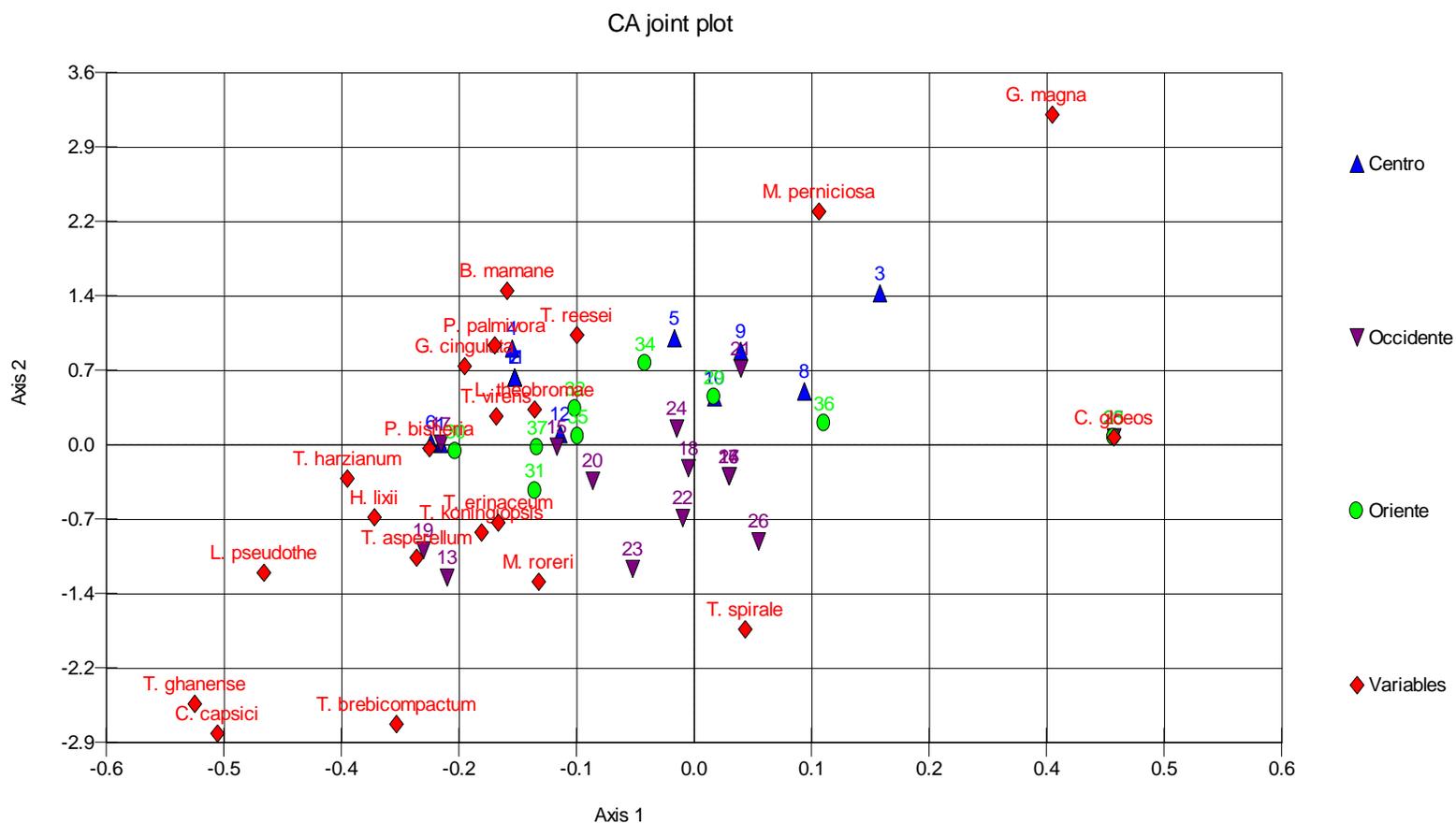


Figura 31. Biplot de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las variables (especies) obtenida a partir del CA. El gráfico se ha centrado en la parte apiñada del gráfico anterior, de forma de ignorar la dominancia de las muestras atípicas.

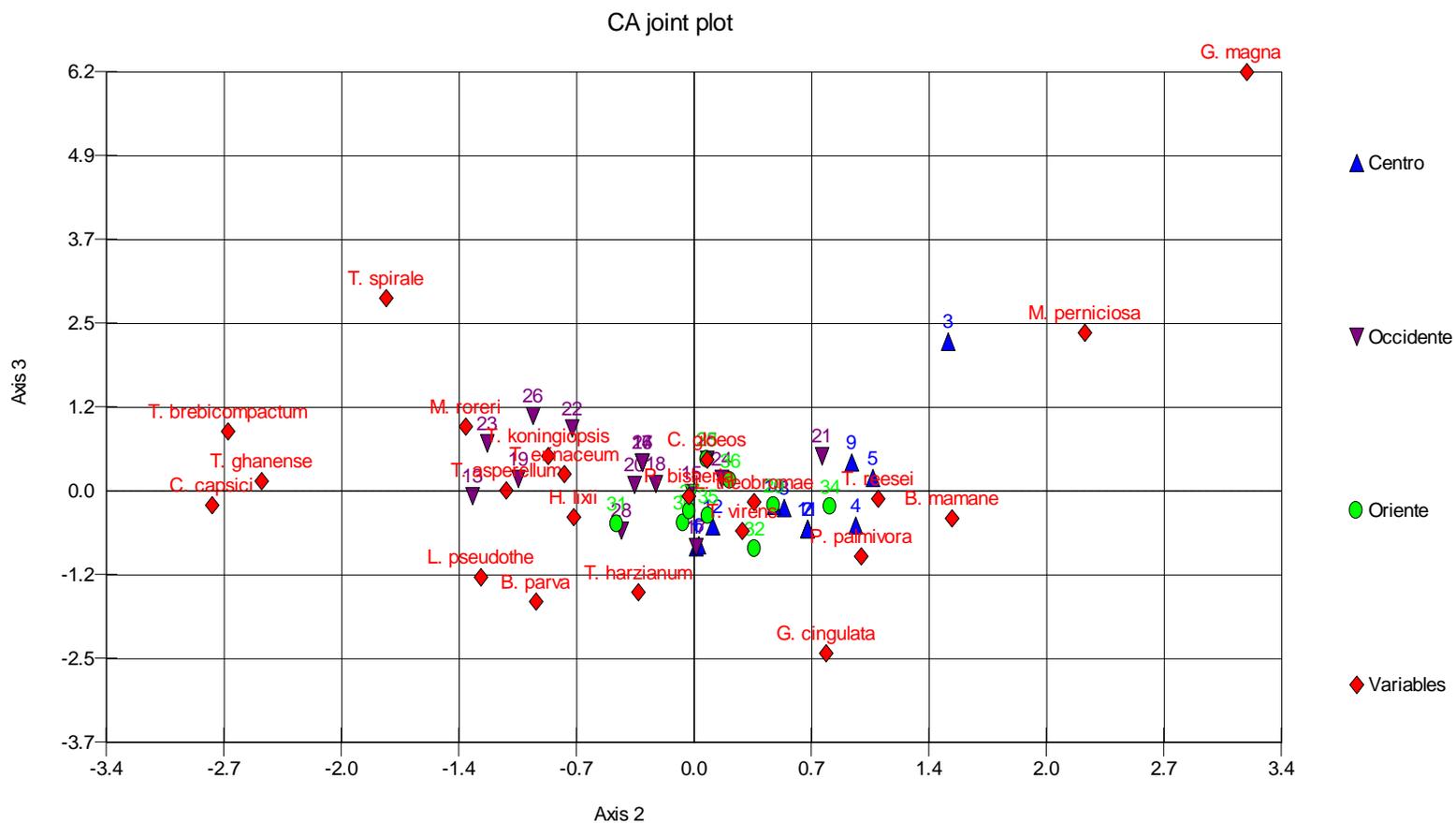


Figura 32. Biplot de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las variables (especies) obtenida a partir del CA. Se grafican los ejes 2 y 3 eliminando la dominancia de muestras atípicas y alinea el gradiente principal con el eje (2).

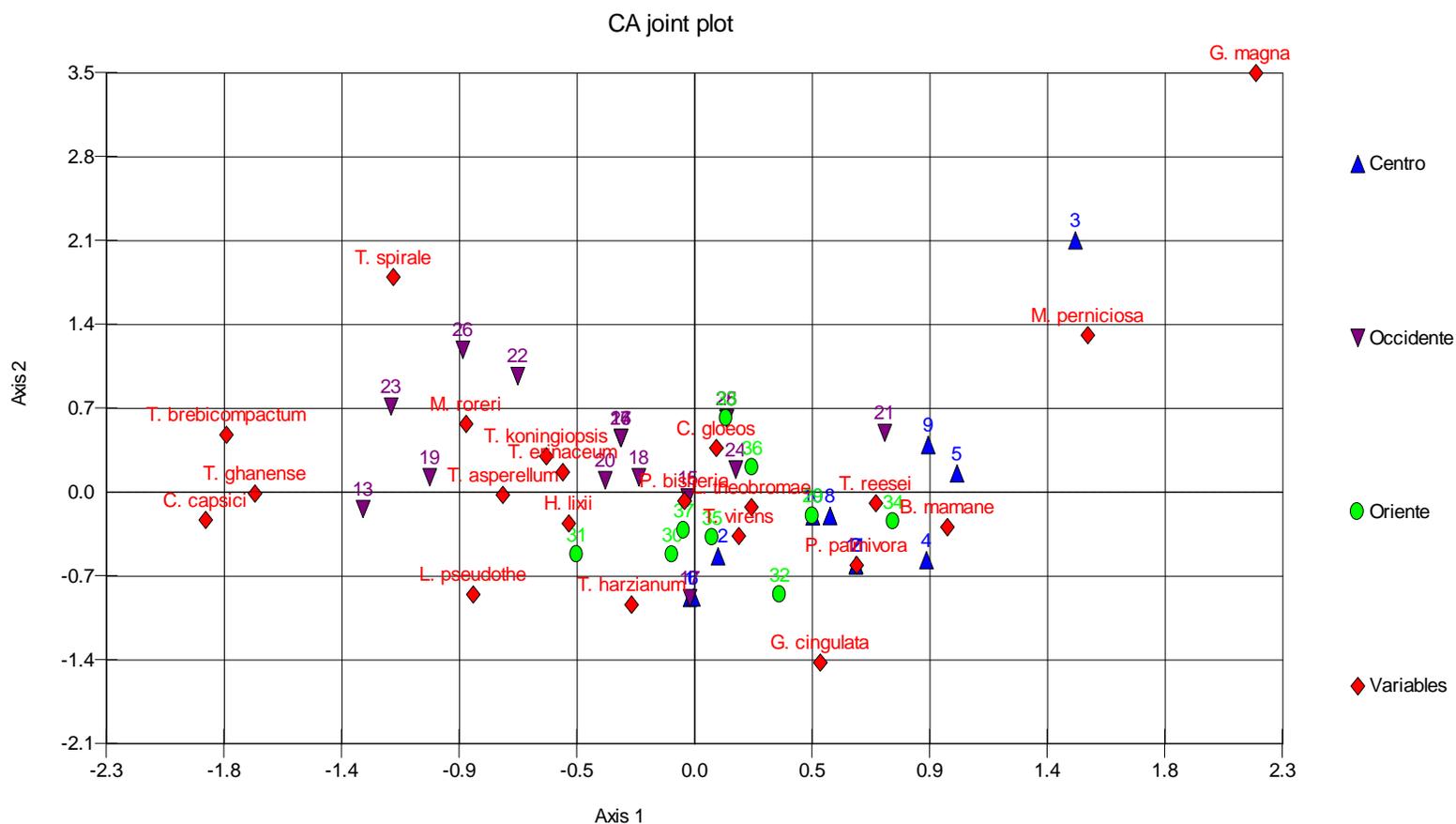


Figura 33. Biplot de las muestras (localidades o sitios de muestreo) y las variables (especies) obtenida a partir del CA. Se ha retirado a *B. parva* del análisis y, se aprecia que ahora, el gradiente principal se alinea con el primer eje, comparar con la Figura 32.

4.5.-Análisis de Correspondencias Canónico (CCA)

En el primer análisis realizado se utilizó la totalidad de variables ambientales disponibles (22 en total), a manera de exploración inicial. En el CCA las puntuaciones de las muestras (scores) son constreñidas a ser combinaciones lineales de las variables ambientales. Es por ello, que conforme el número de variables ambientales se incrementa con relación al número de muestras el resultado se torna dudoso, y paradójicamente el mismo se torna cada vez más parecido al CA (McCune & Grace, 2002). Esto sucede debido a que al incrementarse el número de variables ambientales, la restricción ejercida es cada vez menor, al punto que cuando el número de variables ambientales es menor en una unidad, al número de muestras, la restricción es nula. También es cierto que a mayor número de variables ambientales incorporadas, mayor es la Inercia Restringida (IR). Es por esto que en este análisis se debería incluir sólo las variables bioclimáticas más importantes, pero no existe un método que pueda decir *a priori* cuales son estas.

Además de lo anteriormente expuesto, se entiende que siempre existirá una parte de la inercia “restringida” y una “no restringida” o “residual” (la suma de ambas es la Inercia Total ó IT). En las dos tablas (Tablas 24 y 25) que se presentan a continuación se detallan estos valores. Se puede observar que el análisis restringe un total de 63,89 % de la inercia total. En los 3 primeros ejes se incorpora un 42,56 % de esta, es decir, un total del 27,88 % de la variación total (el CA recoge 34 %). El análisis deja una inercia residual del 33,11 %. A primera vista, se puede pensar que, tratándose de datos ecológicos, el análisis ha rendido frutos bastante satisfactorios. Sin embargo, la forma correcta de verificarlo es someter a prueba la relación lineal entre las muestras y las variables ambientales. El análisis impone como restricción a los scores el ser combinaciones lineales de dichas variables, pero esto no

significa que esa relación sea estadísticamente significativa. La verificación se realiza entonces mediante la prueba de permutación de Monte Carlo, cuyos resultados se presentan en la Tabla 23. El Gráfico 34 ofrece una representación de la prueba para 1000 permutaciones.

Las hipótesis nula y alternativa se pueden enunciar de la siguiente forma.

H₀: Las datos de las muestras no están linealmente relacionados con los datos de las variables bioclimáticas.

H_a: Las datos de las muestras están linealmente relacionados con los datos de las variables bioclimáticas.

La interpretación de la prueba es como sigue:

Puesto que el valor-p calculado es mayor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, por tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula H₀. El riesgo de rechazar la hipótesis nula H₀ cuando es verdadera es de 20,50%.

Este resultado indica, que a pesar de estar observando un fenómeno que es visible a todas luces, el mismo no parece ser significativo desde el punto de vista estadístico. Esto puede ser a causa del uso de muchas variables ambientales y, por tanto, el número de estas debe ser restringido.

Tabla 23. Resultados de la prueba de permutación de Monte Carlo (22 Variables Bioclimáticas).

Permutaciones	1000
Pseudo F	1.126
valor-p	0.205
Alfa	0.050

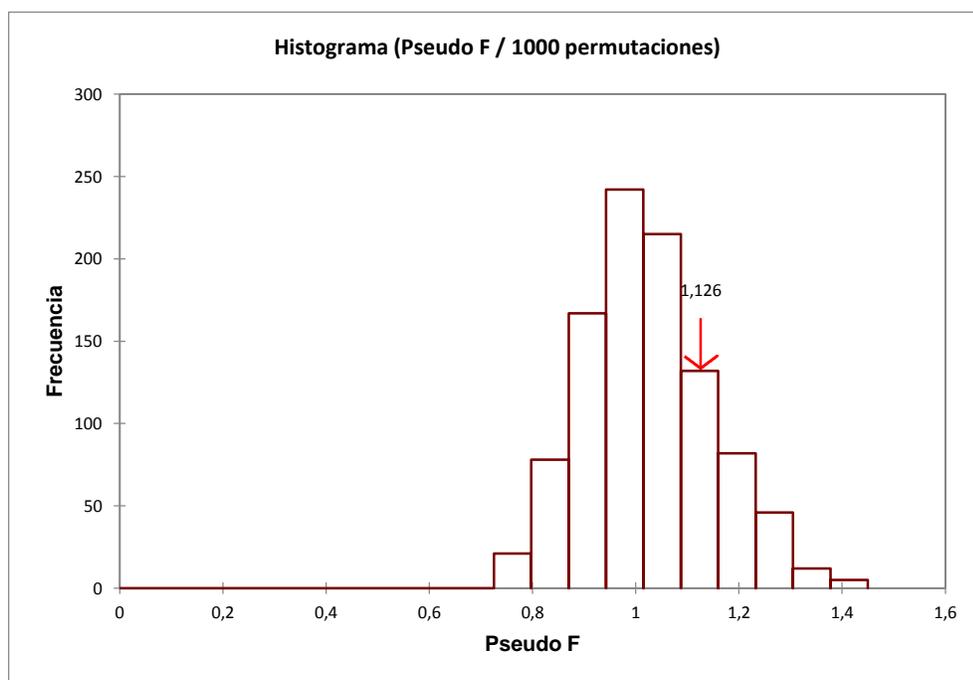


Figura 34. Histograma de la prueba de permutación de Monte Carlo para el CCA (22 Variables Bioclimáticas).

Al comparar la figura 35, en el cual se presenta el arreglo de las muestras pero ahora restringido por las variables ambientales, con las figuras 31 y 32 del aparte de CA, se puede apreciar, el gradiente de forma clara y definida, con el mismo orden (Centro-Oriente-Occidente), pero con mucha menor dispersión. Esto indica que las variables ambientales juegan un rol importante en la distribución de las especies a lo largo del gradiente. La lógica detrás de esta afirmación es la siguiente: si la distribución de las especies y por tanto, su aparición en las muestras a lo largo del gradiente, está relacionado con las variables ambientales, entonces el imponerlas como restricción mejora la visualización del mismo, pero no lo deforma de manera

sustancial. En caso contrario, si a una ordenación se le imponen restricciones, (en este caso variables ambientales) de forma que se obliga a dicha ordenación (en este caso los scores de las muestras) a ser combinación lineal de variables que no tienen mucha relación con la ordenación original, esta última sufrirá una deformación severa, producto de que se le está “obligando” a relacionarse con algo que al menos en principio, no tiene relación alguna. En otras palabras, si las variables ambientales no tuviesen importancia en la determinación del gradiente observado, los gráficos que lo representan en el CCA y el CA diferirían de forma abrupta.

Los nuevos aportes del CCA a esta discusión, giran en torno a las relaciones de estas variables con las muestras (geográficamente hablando) y las especies que les conforman. Para dilucidar estas relaciones se deben observar las figuras 36, 37 y 38. En el primero (figura 36) se observan las especies presentes en el espacio de las muestras, lo que permite reconocer patrones que ya se habían reconocido en el CCorA. Especies como *M. pernicioso*; *G. magna* y *P. palmivora* son típicas de las muestras del Centro y Oriente, mientras que *M. roreri* y *C. capsici* son especies típicas de Occidente. Encontramos además, que seis de las nueve especies de *Trichoderma* encontradas (*T. brevicompactum*, *T. spirale*, *T. ganense*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum* y *T. erinaceum*), se ubican hacia la parte derecha del diagrama donde predominan las muestras de la zona Occidental y las variables bioclimáticas que caracterizan las condiciones del Occidente del país. Mientras que las tres especies restantes de *Trichoderma* (*T. virens*, *T. harzianum* y *T. reesei*), se ubican hacia la izquierda del diagrama donde predominan las muestras de la zona Oriental y de la zona Central, así como las variables bioclimáticas que caracterizan dichas regiones (este resultado coincide con el presentado en CCorAde “Patógenos-Controladores” y Variables Ambientales).

Las figuras 37 y 38 (acercamiento) son Triplots, los cuales son gráficos en los que se representan las muestras, las especies y las variables ambientales al mismo tiempo. Las dos primeras en forma de marcas y las últimas en forma de vectores que salen desde el origen. En los mismos se observan, a las variables ambientales representadas por flechas cuyo puntero indica la dirección del cambio y su longitud es proporcional a la velocidad de ese cambio; las zonas de muestreo representadas por triángulos y rectángulos (cada uno de un color dependiendo de su región de procedencia) y las especies encontradas representados por rombos (color rojo). En estos gráficos se observa la separación de las tres zonas muestreadas, aunque con ligeras superposiciones, sin embargo es importante destacar que las variables bioclimáticas, bio3 (isotermalidad), bio17 (precipitación del trimestre más seco), y bio14 (precipitación del mes más seco), van en aumento y varían mucho más y más rápido hacia la zona de Occidente, mientras que las variables bio4 (temperatura estacionalidad), bio13 (precipitación del mes más húmedo), bio15 (precipitación estacionalidad) y bio16 (precipitación del trimestre más húmedo), tienden a aumentar rápidamente hacia las zonas del Oriente y Centro del país.

En general, se observa como las variables bioclimáticas que miden temperatura y precipitación en los meses y trimestres más fríos bio6, bio11 y bio19, temperatura y precipitación en los meses y trimestres más secos bio9, bio14 y bio17, así como la variable altitud, se direccionaron hacia la parte derecha del diagrama indicando aumento de dichos parámetros y su relación con la zona Occidental del país. Caso contrario se observa con las variables de precipitación anual bio12, Precipitación en los meses y trimestres más húmedos bio13 y bio16 y precipitación en el trimestre más cálido bio18, las cuales se direccionaron hacia la parte izquierda del diagrama indicando la disminución de dichos parámetros y su relación con las zonas Central y Oriental del país.

En términos generales se aprecian variables que incrementan en tres dimensiones diferentes: hacia la derecha, la izquierda y hacia la parte baja. Estas últimas constituyen un grupo que posee gran redundancia y que seguramente podrá ser eliminado en buena parte, sin gran alteración de la tendencia general (ver Gráfico 38, en el cual estos patrones se aprecian claramente). Para saber el peso en una cierta muestra de una de las variables ambientales basta con proyectar el punto (en ángulo recto) al vector de la variable en cuestión. La pregunta es válida también para las especies, si se quisiera saber cuál es la preferencia de una especie en términos de una variable ambiental, se podría realizar el mismo procedimiento, claro está que se debería utilizar lo que se ha denominado escalamiento “por especies” en lugar de “por muestras”, que es el que se ha usado en este caso.

Las tendencias que se han apreciado tanto de especies como de variables bioclimáticas son fuertes, sin embargo, como se comentó anteriormente no son estadísticamente significativas (en el Gráfico 39 se puede observar que la tendencia se mantiene incluso al incorporar un tercer eje).

El paso siguiente consistirá en disminuir el número de variables, seleccionando un subconjunto de las originales. Como criterio se usarán las de mejor correlación con el conjunto de datos, así como las menos redundantes.

Tabla 24. Valores propios e Inercia del CCA (22 Variables bioclimáticas).

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
Valor propio	0,403	0,367	0,268	0,221	0,189	0,165	0,143	0,114	0,109	0,100	0,089
Inercia restringida (%)	16,512	15,049	10,995	9,066	7,752	6,769	5,858	4,663	4,455	4,099	3,644
% acumulado	16,512	31,562	42,557	51,623	59,375	66,144	72,002	76,665	81,120	85,219	88,863
Inercia total	10,549	9,615	7,025	5,792	4,953	4,325	3,742	2,979	2,846	2,619	2,328
% acumulado (%)	10,549	20,164	27,188	32,980	37,933	42,258	46,000	48,979	51,825	54,444	56,772
	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	
	0,083	0,062	0,042	0,033	0,025	0,018	0,006	0,003	0,000	0,000	0,000
	3,397	2,537	1,703	1,349	1,039	0,728	0,247	0,110	0,020	0,008	
	92,261	94,798	96,501	97,850	98,888	99,616	99,863	99,973	99,992	100,000	
	2,171	1,621	1,088	0,862	0,664	0,465	0,158	0,070	0,012	0,005	
	58,942	60,563	61,652	62,513	63,177	63,641	63,799	63,869	63,882	63,887	

Tabla 25. Resumen de Inercia del CCA (22 Variables Bioclimáticas).

Inercia	Valor	%
Total	3.817	100.000
Restringida	2.439	63.887
No-restringida	1.378	36.113

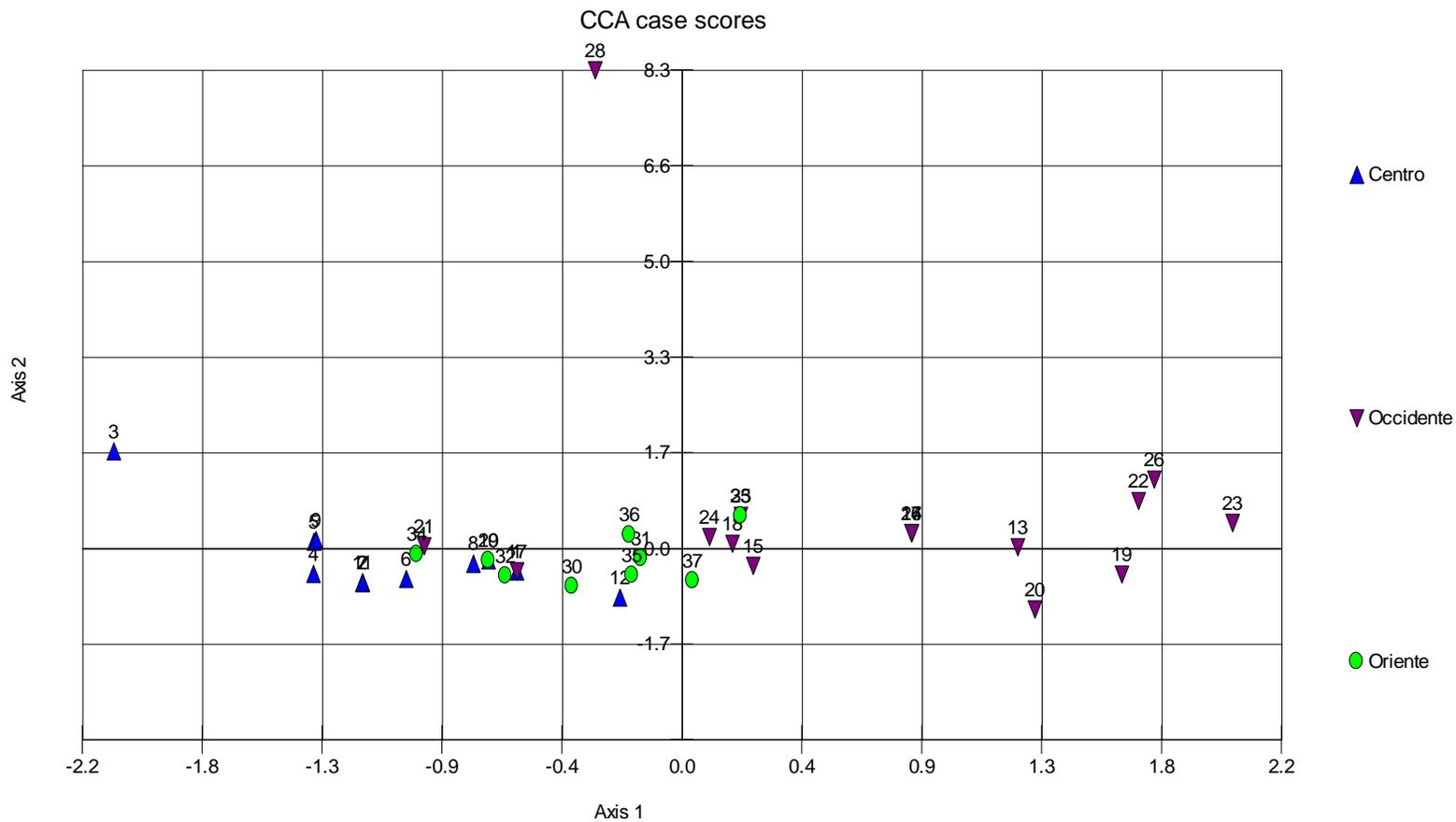


Figura 35. Ubicación relativa de las muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenida a partir del CCA (22 variables bioclimáticas). Muestras distribuidas a lo largo del primer eje. En este caso se observa nuevamente a la muestra 28 separada del grupo correspondiente.

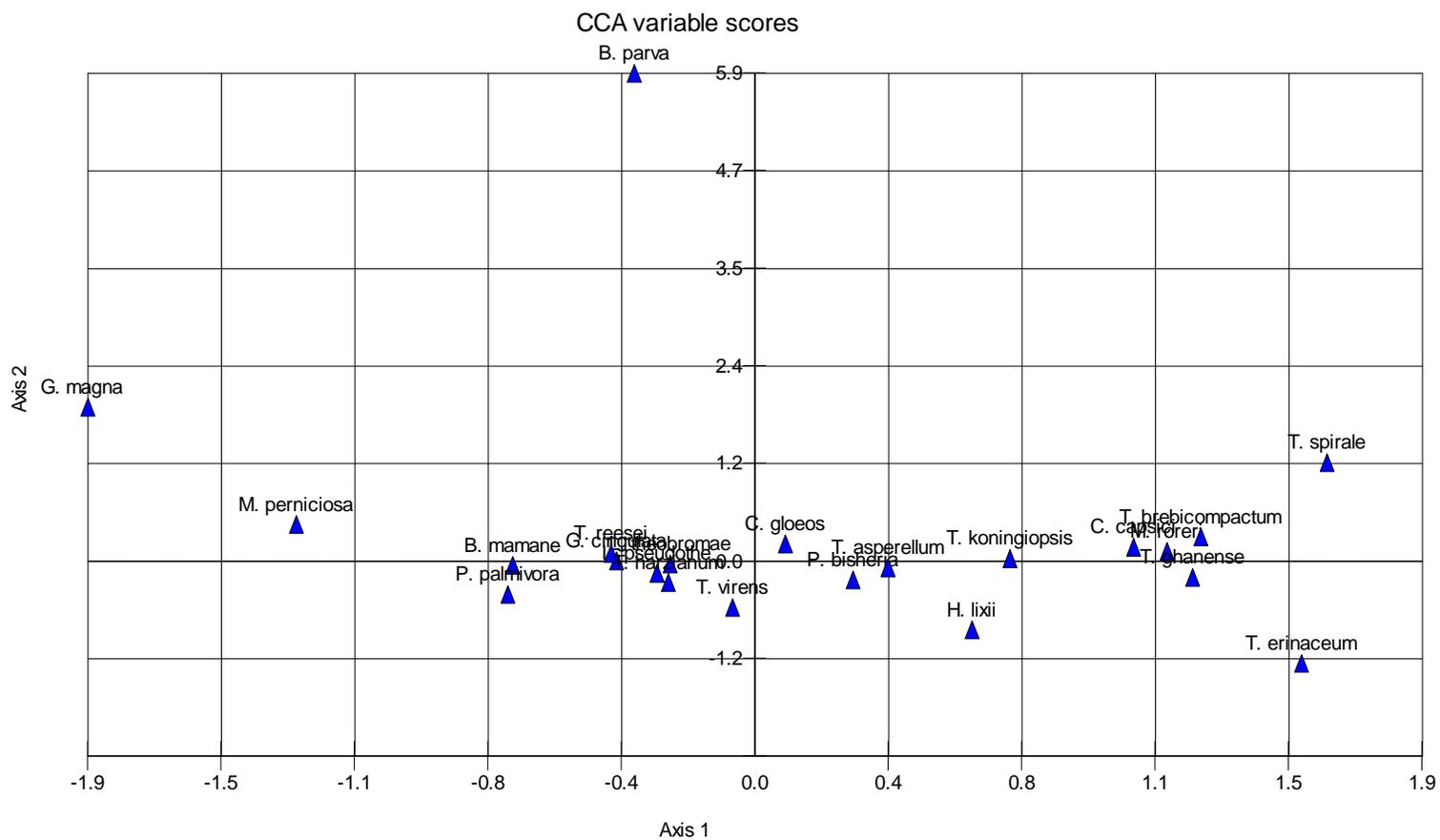
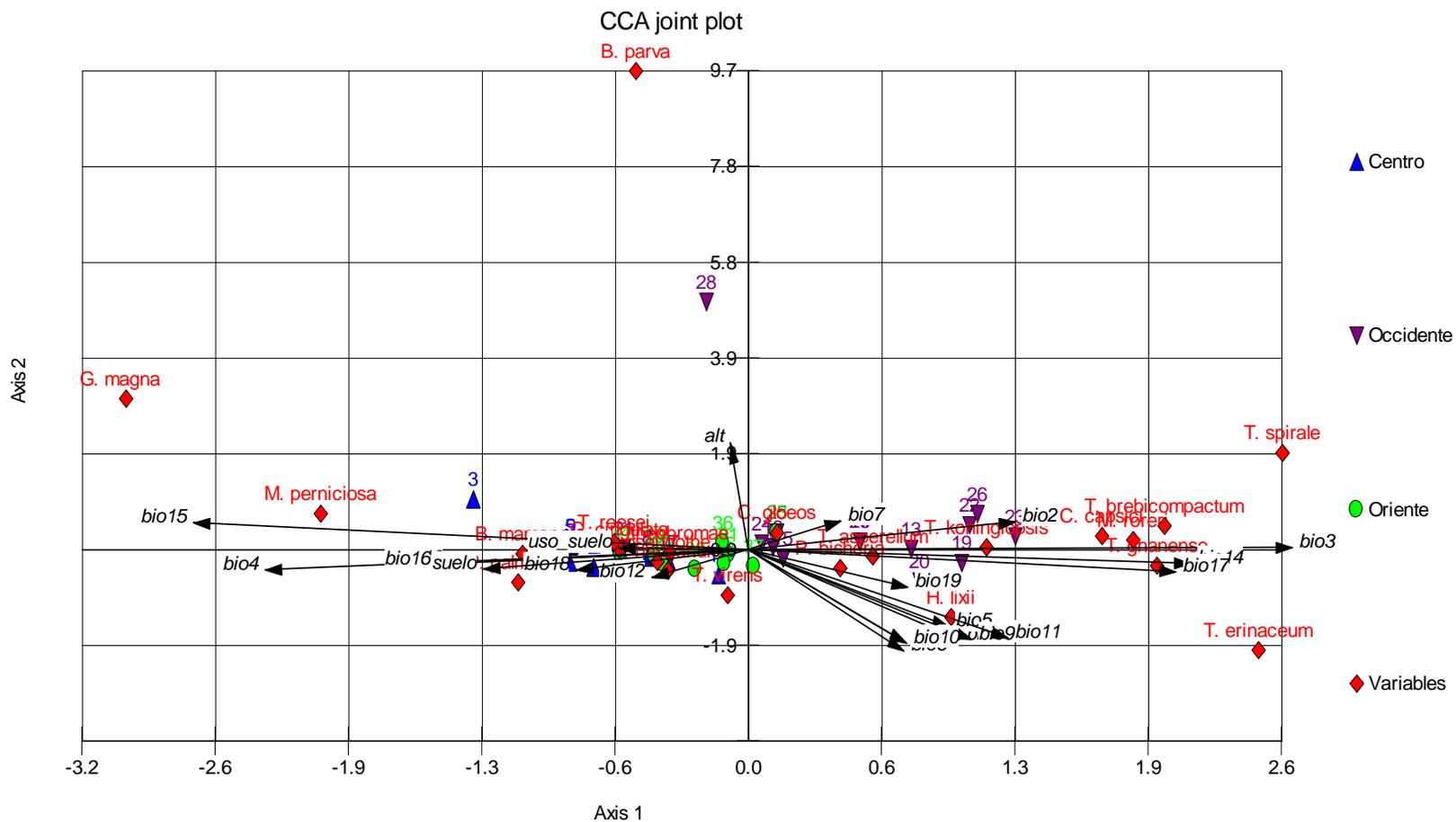
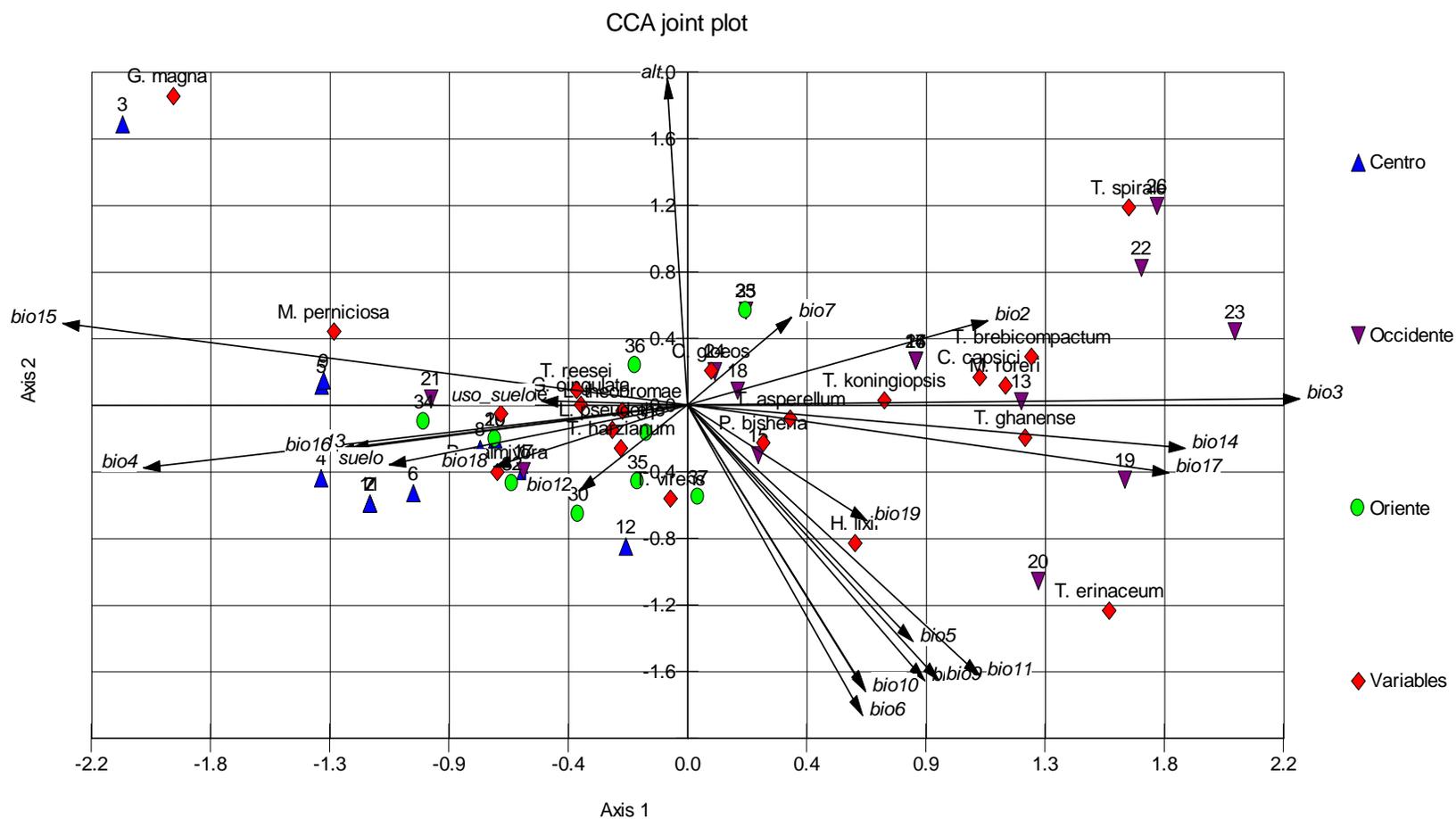


Figura 36. Ubicación relativa de las variables (especies) obtenida a partir del CCA. Se aprecian a *M. perniciososa*; *G. magna*; *P. palmivora* y a *M. roreri* y *C. capsici* en extremos opuestos.



Vector scalina: 5,47

Figura 37.Triplot obtenido a partir del CCA. Se aprecian tanto las muestras (localidades o sitios de muestreo) como las variables (especies) y además las variables bioclimáticas incorporadas al análisis (vectores).



Vector scalina: 3.00

Figura 38. Triplot obtenido a partir del CCA. Se aprecian tanto las muestras (localidades o sitios de muestreo) como las variables (especies) y además las variables bioclimáticas incorporadas al análisis (vectores). (Acercamiento).

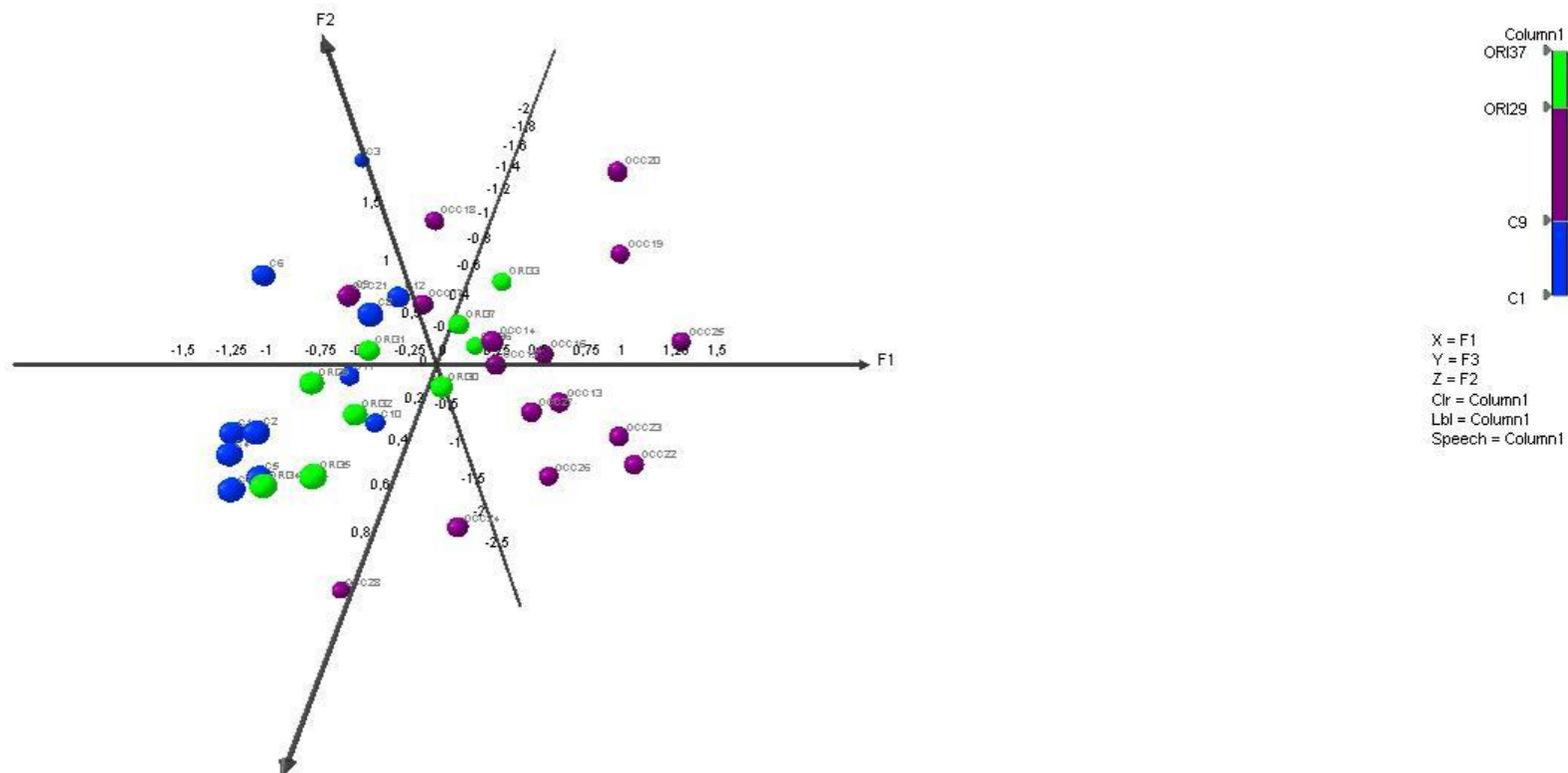


Figura 39. Arreglo tridimensional de muestras (localidades o sitios de muestreo) obtenido a partir del CCA. Se aprecia que la tendencia es consistente aun cuando se incorpora el tercer eje, obsérvese la separación de las diferentes muestras por zonas.

Las figuras del 41 al 45 presentan un nuevo CCA en el cual se han incorporado las variables bioclimáticas de la bio1a la bio15 (se han retirado 7 variables: bio16, 17, 18, 19, Altura, Suelo y Uso de Suelo). Básicamente las tendencias apreciadas son las mismas que en el caso del CCA con 22 variables bioclimáticas, con la diferencia que cuando se aplica la prueba de permutación de Monte Carlo, la misma resulta en el rechazo de la H_0 . Los resultados se presentan en la Tabla 26. El Gráfico 40 ofrece una representación de la prueba para 5000 permutaciones (se aumentó el número de permutaciones para hacer más exigente la prueba).

Las hipótesis nula y alternativa se pueden enunciar de la siguiente forma.

H_0 : Las datos de las muestras no están linealmente relacionados con los datos de las variables bioclimáticas.

H_a : Las datos de las muestras están linealmente relacionados con los datos de las variables bioclimáticas.

La interpretación de la prueba es como sigue:

Puesto que el valor-p computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar la hipótesis nula H_0 , y aceptar la hipótesis alternativa H_a . El riesgo de rechazar la hipótesis nula H_0 cuando es verdadera es inferior al 3,64%.

Tabla 26. Resultados de la prueba de permutación de Monte Carlo (15 Variables bioclimáticas).

Permutaciones	5000
Pseudo F	1.191
valor-p	0.036
Alfa	0.050

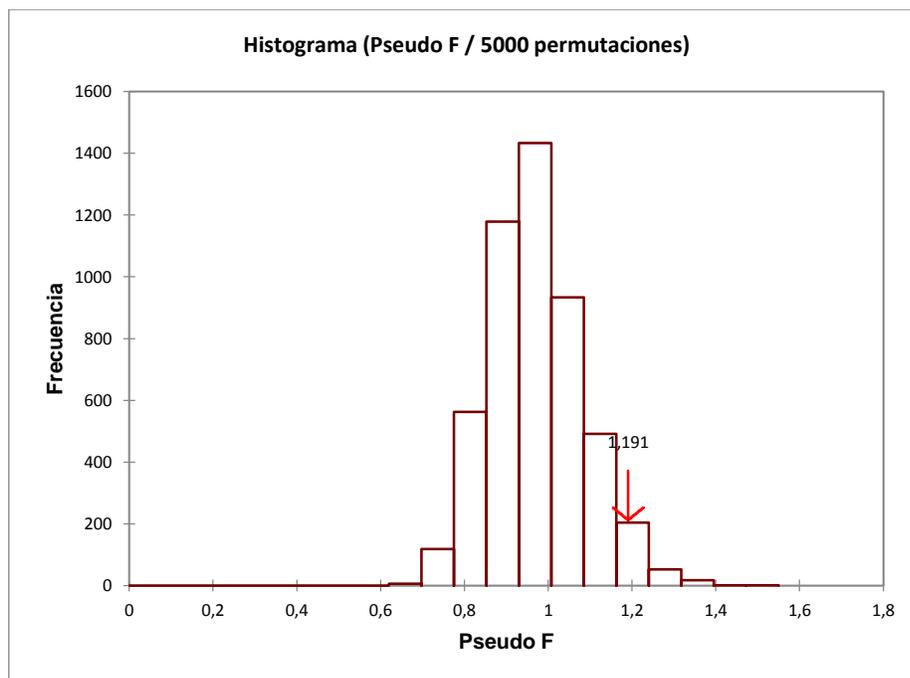


Figura 40. Histograma de la prueba de permutación de Monte Carlo para el CCA (15 Variables bioclimáticas).

En primera instancia pudiese percibirse que para aceptar la H_0 en la prueba anterior basta con eliminar variables y de esta forma el CCA arroja un mejor resultado de forma inmediata. Esta es una percepción errada. El eliminar variables tiene un costo en términos de la Inercia restringida, la cual disminuye y por tanto, la Inercia no restringida aumenta. Obsérvese (Tablas 27 y 28) que la inercia restringida cae a 44,26 % (desde 63,88 % en el CCA con 22 variables) de la cual el 54,58 % se acumula hasta el tercer eje, para un total de 24,24 % de la Inercia total (en el CCA con 22 variables se acumula un 27,18 %). Es decir, cuando se eliminan variables se pierde en IR, y por lo general, también cae la cantidad de inercia que se acumula hasta el tercer eje.

Es importante resaltar que no cualquier eliminación de variables produce buenos resultados, de hecho, se puede eliminar igual cantidad de variables y

obtener mejores y peores resultados. El resultado presentado es el óptimo, pues se eliminan 7 variables y sólo se pierde cerca de 3 % de la inercia representada.

Además, se observa en las figuras del 41 al 45, que las tendencias descritas tanto en muestras como en especies, así como la relación con las variables bioclimáticas que restringen mayoritariamente el sistema, permanecen prácticamente inalteradas.

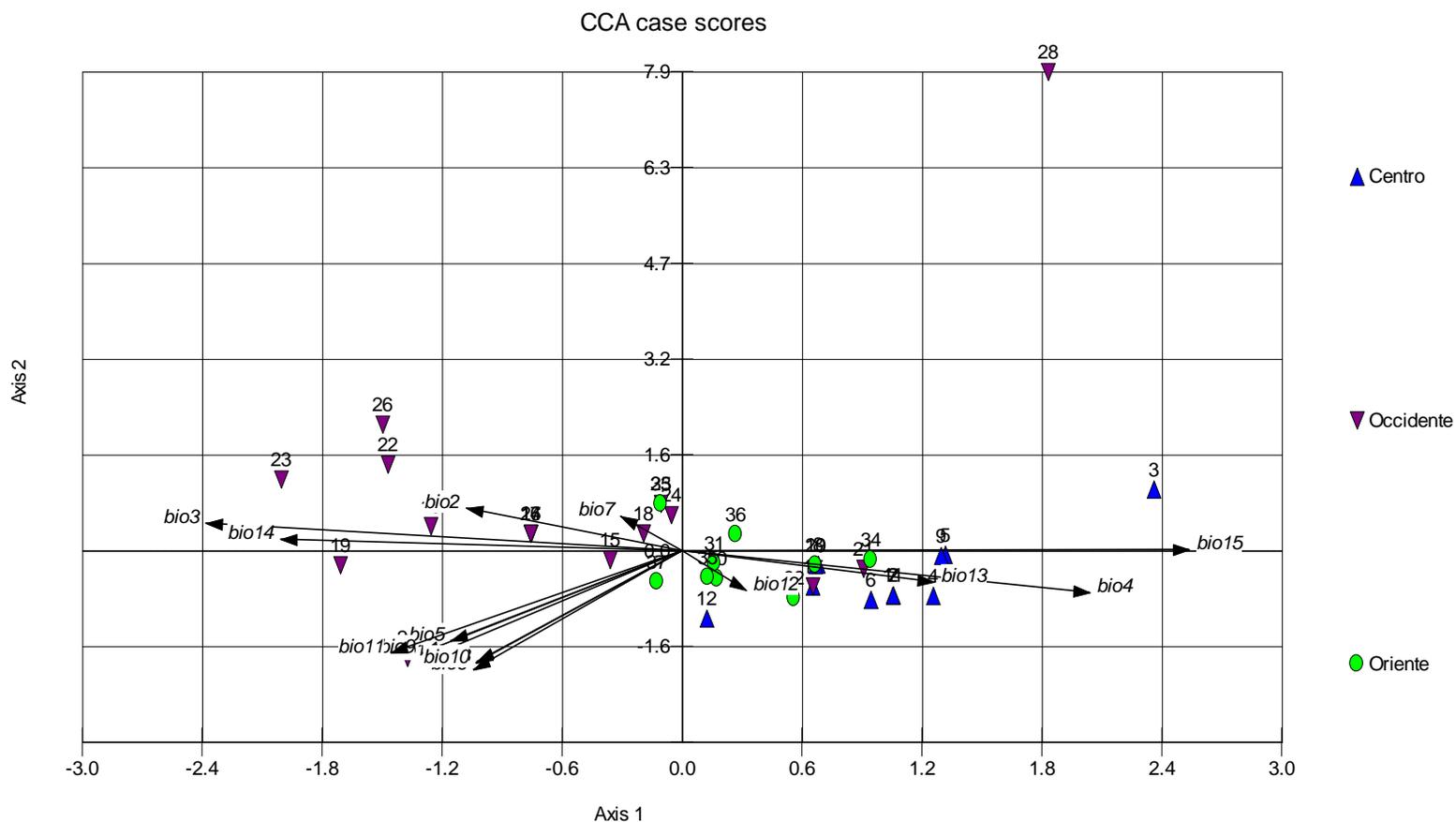
Tabla 27. Valores propios e Inercia del CCA (15 Variables bioclimáticas).

Valores propios y porcentajes de inercia (ACC):

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13
Valor propio	0,392	0,300	0,235	0,169	0,134	0,106	0,103	0,090	0,059	0,050	0,027	0,016	0,011
Inercia restringida (%)	23,172	17,723	13,888	10,028	7,931	6,249	6,066	5,332	3,503	2,930	1,587	0,925	0,666
% acumulado	23,172	40,895	54,784	64,811	72,742	78,991	85,057	90,389	93,892	96,823	98,410	99,334	100,000
Inercia total	10,256	7,844	6,147	4,438	3,510	2,766	2,685	2,360	1,550	1,297	0,703	0,409	0,295
% acumulado (%)	10,256	18,100	24,247	28,685	32,195	34,961	37,646	40,006	41,556	42,853	43,556	43,965	44,260

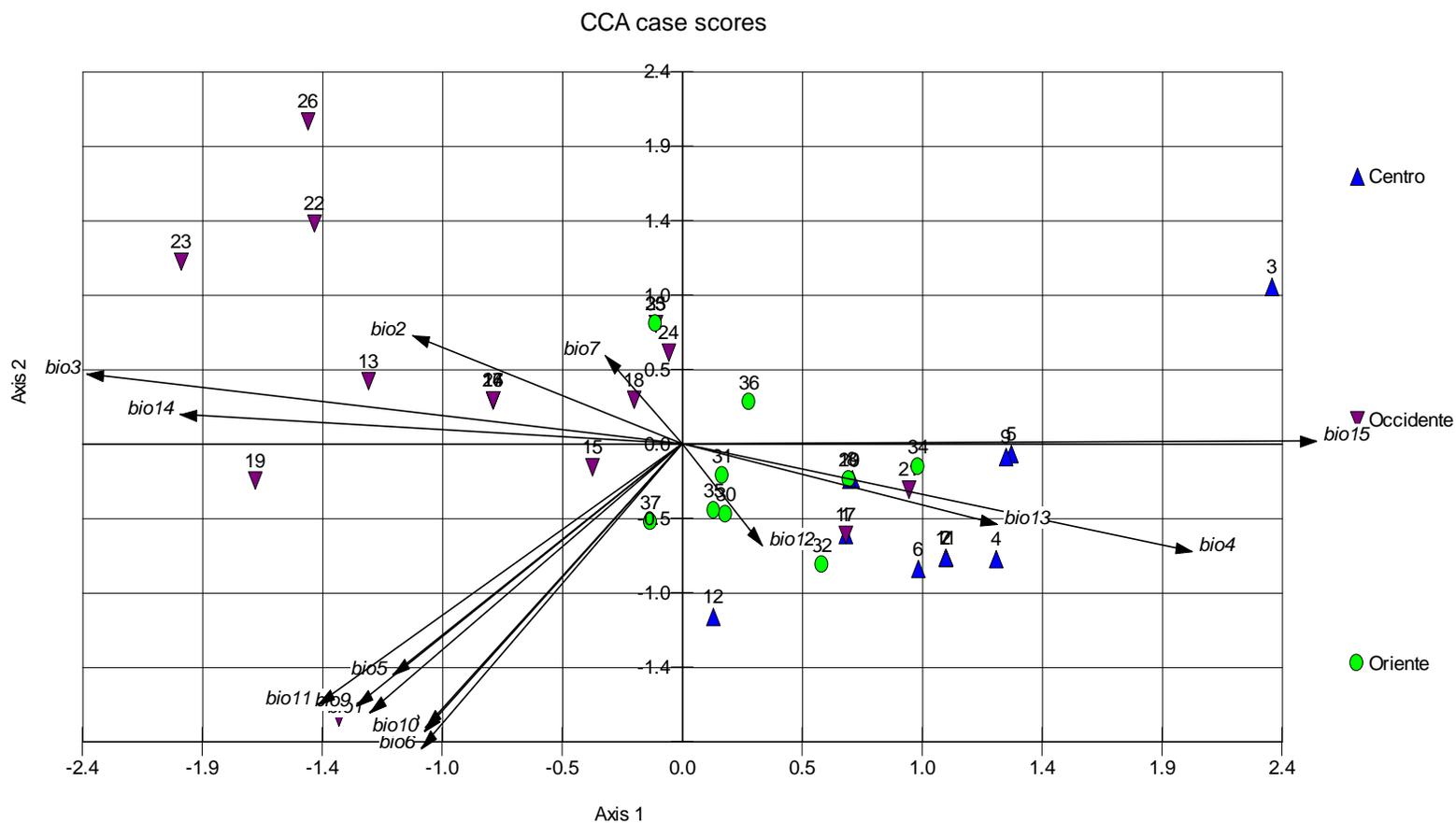
Tabla 28. Resumen de Inercia del CCA (15 Variables bioclimáticas).

Inercia	Valor	%
Total	3.819	100.000
Restringida	1.690	44.260
No-restringida	2.129	55.740



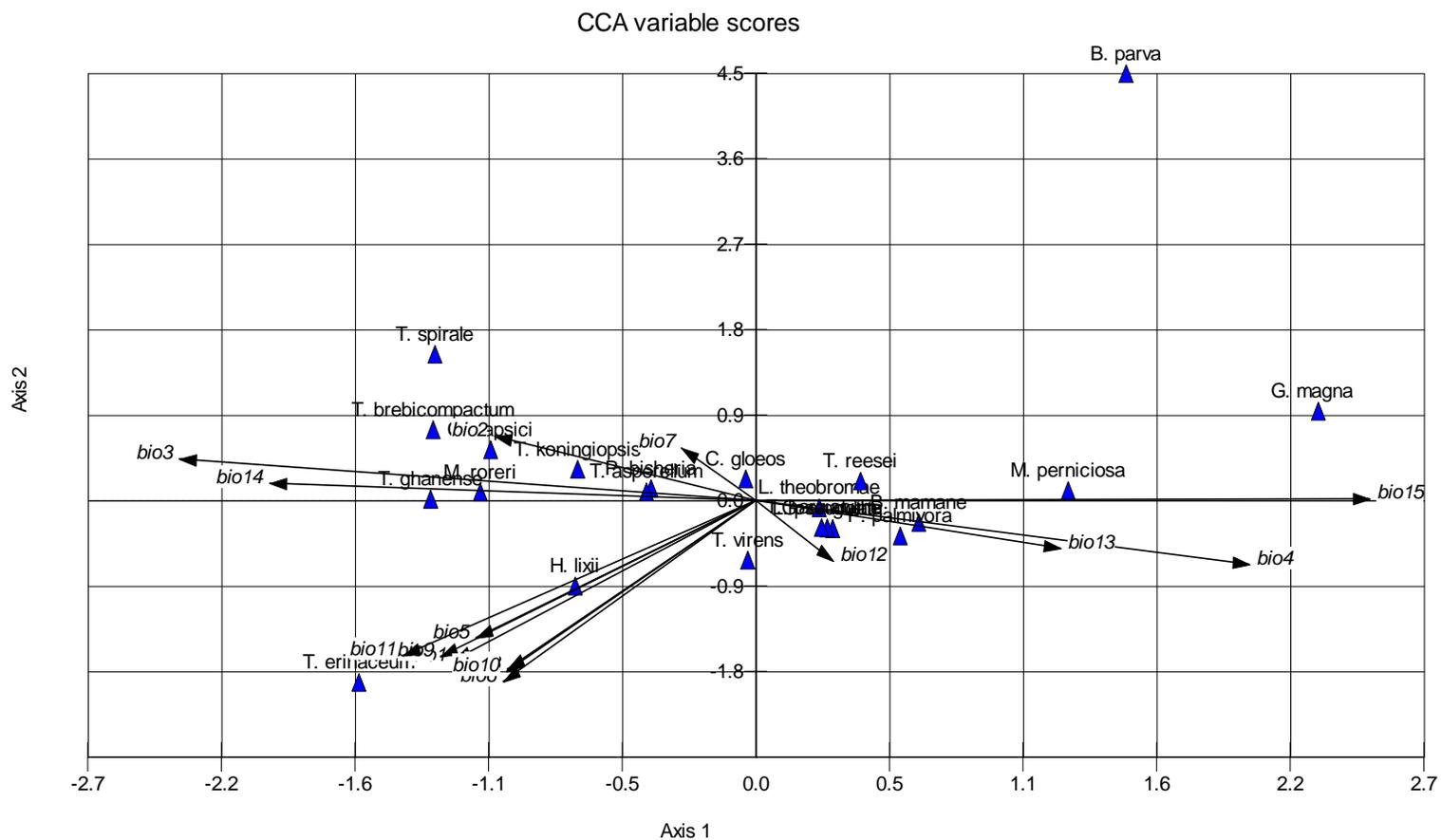
Vector scalina: 3.19

Figura 41. Biplot obtenido a partir del CCA de muestras (localidades o sitios de muestreo) y 15 variables bioclimáticas (vectores). Se aprecian las muestras alineadas con el primer eje. La muestra 28 presenta la misma tendencia descrita en el CA y CCA anterior.



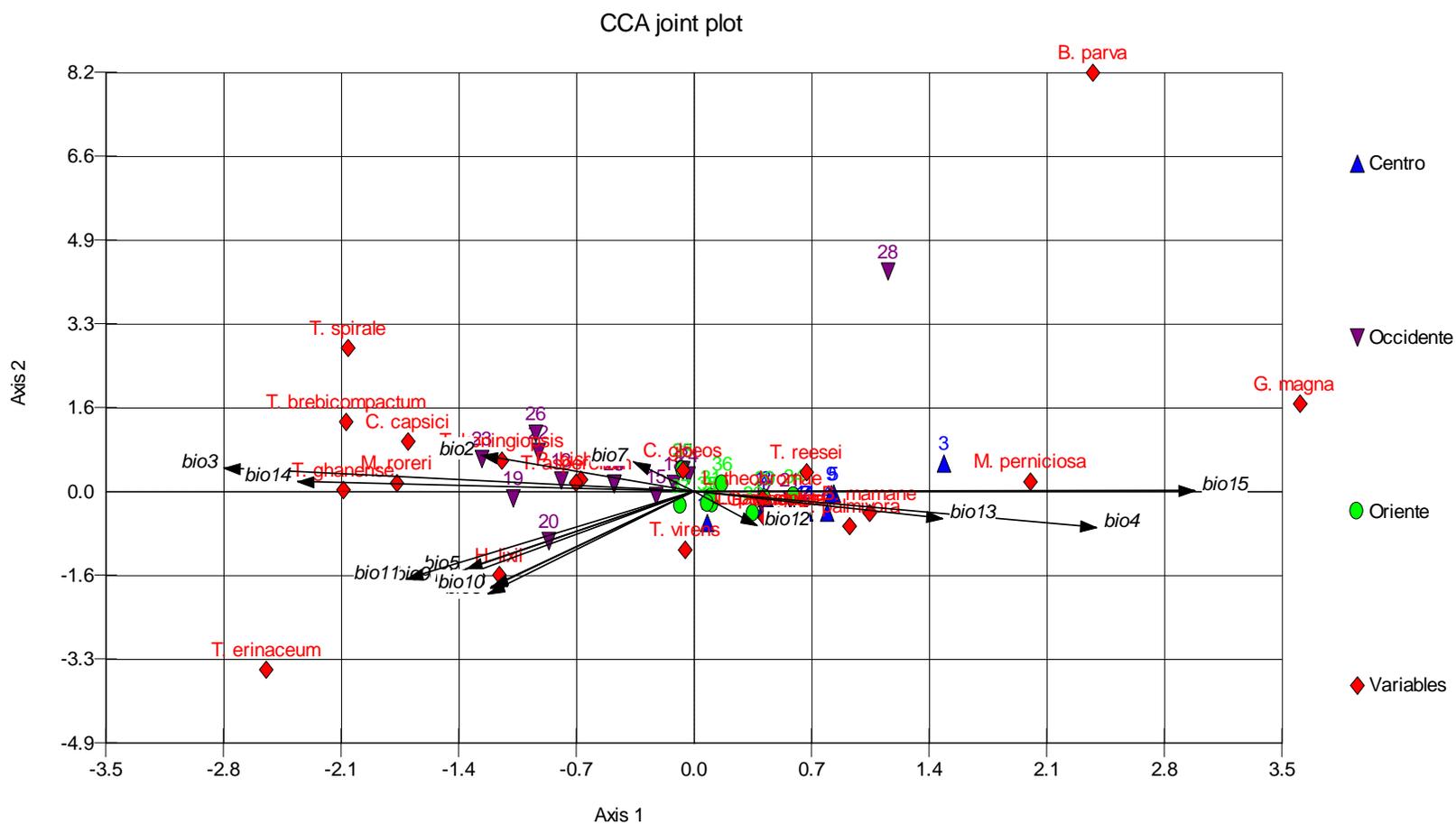
Vector scalina: 3.19

Figura 42. Biplot obtenido a partir del CCA de muestras (localidades o sitios de muestreo) y 15 variables bioclimáticas (vectores). Eliminación de la muestra 28 (Acercamiento).



Vector scalina: 3.12

Figura 43. Biplot obtenido a partir del CCA de variables (especies en azul) y 15 variables bioclimáticas incorporadas al análisis (vectores).



Vector scalina: 5.95

Figura 45. Triplot obtenido a partir del CCA de muestras (localidades o sitios de muestreo) como las variables (especies en rojo) y además las 15 variables bioclimáticas incorporadas al análisis (vectores).

A continuación se presenta un nuevo CCA, en el cual se han reducido las variables bioclimáticas a cinco: bio1 (temperatura media anual), bio3 (isotermalidad), bio4 (estacionalidad en la temperatura), bio14 (precipitación en el mes más seco) y bio15 (estacionalidad en la precipitación). Las tendencias apreciadas en las figuras 48 y 49, son similares a las que se aprecian en los gráficos correspondientes en los dos CCA anteriores. Cuando se aplica la prueba de permutación de Monte Carlo, la misma resulta en el rechazo de la H_0 . Los resultados se presentan en la Tabla 29. La figura 46 nos ofrece una representación de la prueba para 5000 permutaciones.

Las hipótesis nula y alternativa se enuncian de la misma manera que en los dos casos anteriores y en este caso el valor-p computado vuelve a ser menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, por lo que se debe rechazar la hipótesis nula H_0 , y aceptar la hipótesis alternativa H_a . El riesgo de rechazar la hipótesis nula H_0 cuando es verdadera es inferior al 0,3 %. Se observa que cada vez que se realiza esta prueba es más significativa, es decir, la certeza que se tiene acerca de la relación lineal es cada vez mayor. Esto parece indicar que la escogencia de las variables ha sido correcta (luego se corroborará esta afirmación por otra vía).

Tabla 29. Resultados de la prueba de permutación de Monte Carlo (5 Variables bioclimáticas).

Permutaciones	5000
Pseudo F	1,175
valor-p	0,003
alfa	0,050

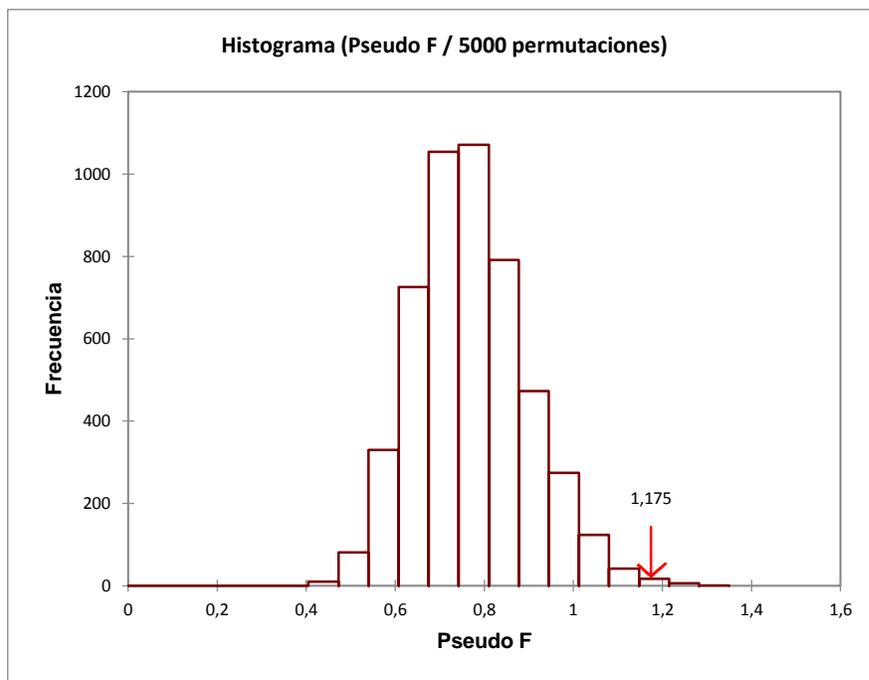


Figura 46. Histograma de la prueba de permutación de Monte Carlo para el CCA (5 Variables bioclimáticas).

Se redujo significativamente el número de variables que están constriñendo el CCA, pero esto tiene un costo en términos de la IR (Tablas 30 y 31). Se observa que la IR cae a 21,85 % (desde 44,26 % en el CCA con 15 variables) de la cual el 82,89 % se acumula hasta el tercer eje, para un total de 18,11% de la IT (en el CCA con 15 variables se acumula un 24,24 %).

Tabla 30. Valores propios e Inercia del CCA (5 Variables bioclimáticas).

	F1	F2	F3	F4	F5
Valor propio	0,343	0,205	0,144	0,077	0,066
Inercia restringida	41,064	24,588	17,245	9,231	7,873
% acumulado	41,064	65,652	82,897	92,127	100,000
Inercia total	8,974	5,373	3,769	2,017	1,720
% acumulado (%)	8,974	14,348	18,116	20,133	21,854

Tabla 31. Resumen de Inercia del CCA (5 Variables Bioclimáticas).

	Valor	%
Total	3,819	100,000
Restringida	0,835	21,854
No-restringida	2,984	78,146

Evaluando los resultados hasta este punto, donde se han reducido de 22 variables bioclimáticas a sólo 5 (reducción de un 77,27% de las variables), esto ha implicado pasar de una inercia restringida de 63,89 % a 21,85 % (se redujo la IR inicial en 65,80 %), pero lo que se incorpora en los primeros 3 ejes pasa de 27,88 % a 18,12 % (se reduce sólo un 35 %). Se pudiese pensar que esta cantidad de Inercia es baja, pero por un lado, se evidencia a lo largo del proceso que el gradiente no sufre cambios importantes, y por otro lado no se debe perder de vista que se trata de datos ecológicos en los que tienen importancia muchas variables y no solo las bioclimáticas. En el aparte de CCorAse pudo constatar que existen relaciones biológicas significativas, por ejemplo, entre los Patógenos y los Controladores. A manera de conclusión se puede indicar que el gradiente que aquí se observa es producido en parte por variables bioclimáticas, pero también por interacciones biológicas. Esta además decir que el conjunto de las variables bioclimáticas exploradas no es exhaustivo.

Las cinco variables seleccionadas para este último análisis resultaron escogidas por ser diferentes en las tres zonas delimitadas (Occidente, Centro y Oriente). Con la finalidad de probar esta hipótesis se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) para las variables bioclimáticas (variables dependientes) y colocando como factor a las diferentes zonas. Los resultados se muestran en la figura 47. Las variables que presentaron diferencias para las distintas zonas cacaoteras fueron: bio2, bio3, bio4, bio7, bio14, bio15.

Cabe destacar que bio2 y bio7, están incluidas en bio3 es decir, son redundantes y por tanto, se entiende porque no se desprenden del análisis que dio origen al grupo de variables seleccionado del CCA, donde las variables que resultaron importantes fueron bio1, bio3, bio4, bio14, bio15, es por ello que estas últimas fueron las consideradas más importantes y seleccionadas para el análisis final en términos de su variación en cada una de las zonas. Las variables que son disímiles en las distintas zonas cacaoteras son precisamente las que permiten caracterizar el gradiente, la lógica latente es entendible si se piensa que lo que permite caracterizar algo son sus diferencias (lo que los hace únicos), mientras que lo que es común a todos, no sirve para diferenciarlos. De esta misma manera, las variables que más influyen en el gradiente (Occidente-Centro-Oriente) de las zonas cacaoteras, son precisamente las que resultan distintas en dichas zonas. Por último, queda la incertidumbre asociada a bio1, que resulta importante en el CCA, pero que no presenta diferencias en términos de las diferentes zonas cacaoteras. Esto nos hace pensar, que por mucho que la escudriñemos, la naturaleza siempre guarda algo en el cofre del misterio.

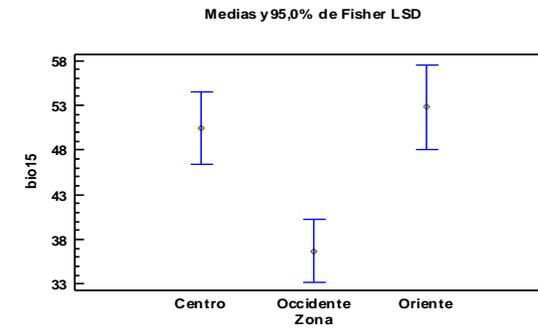
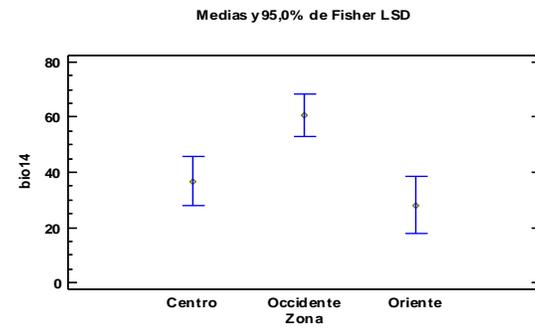
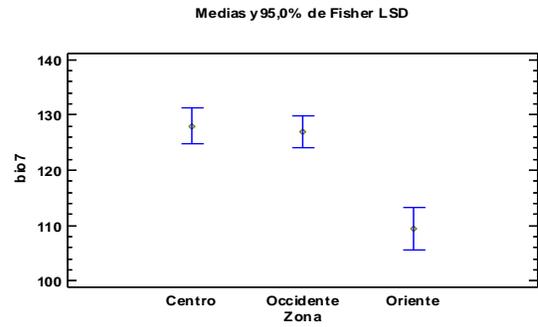
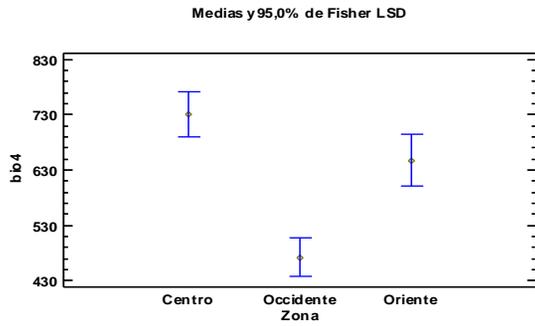
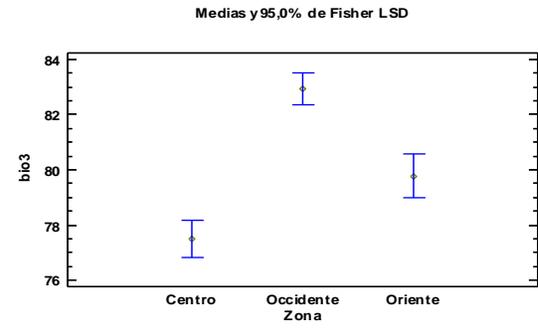
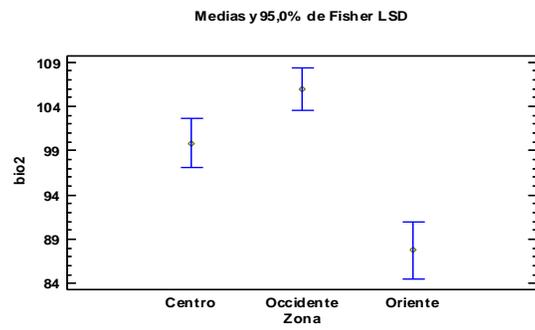
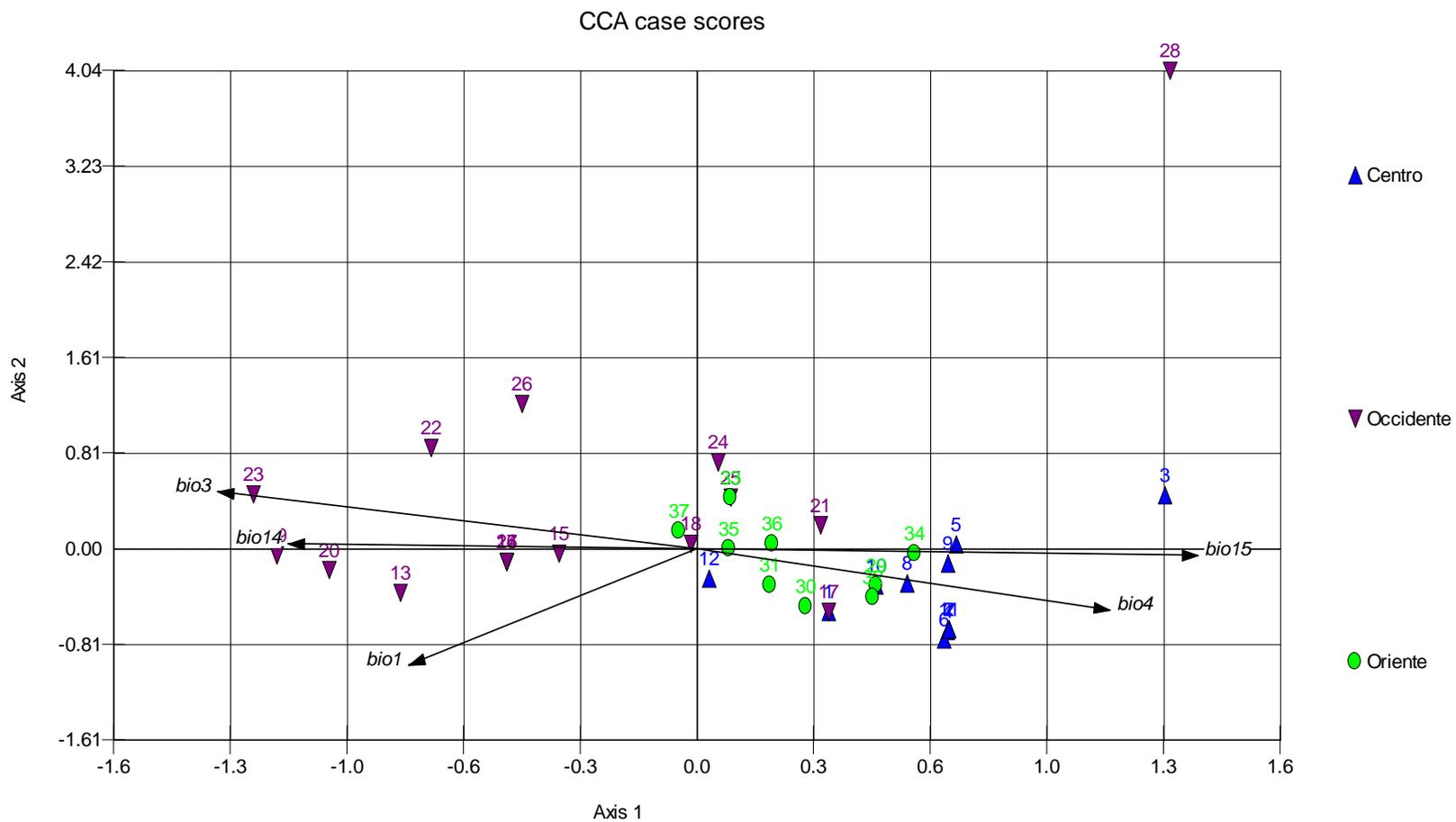
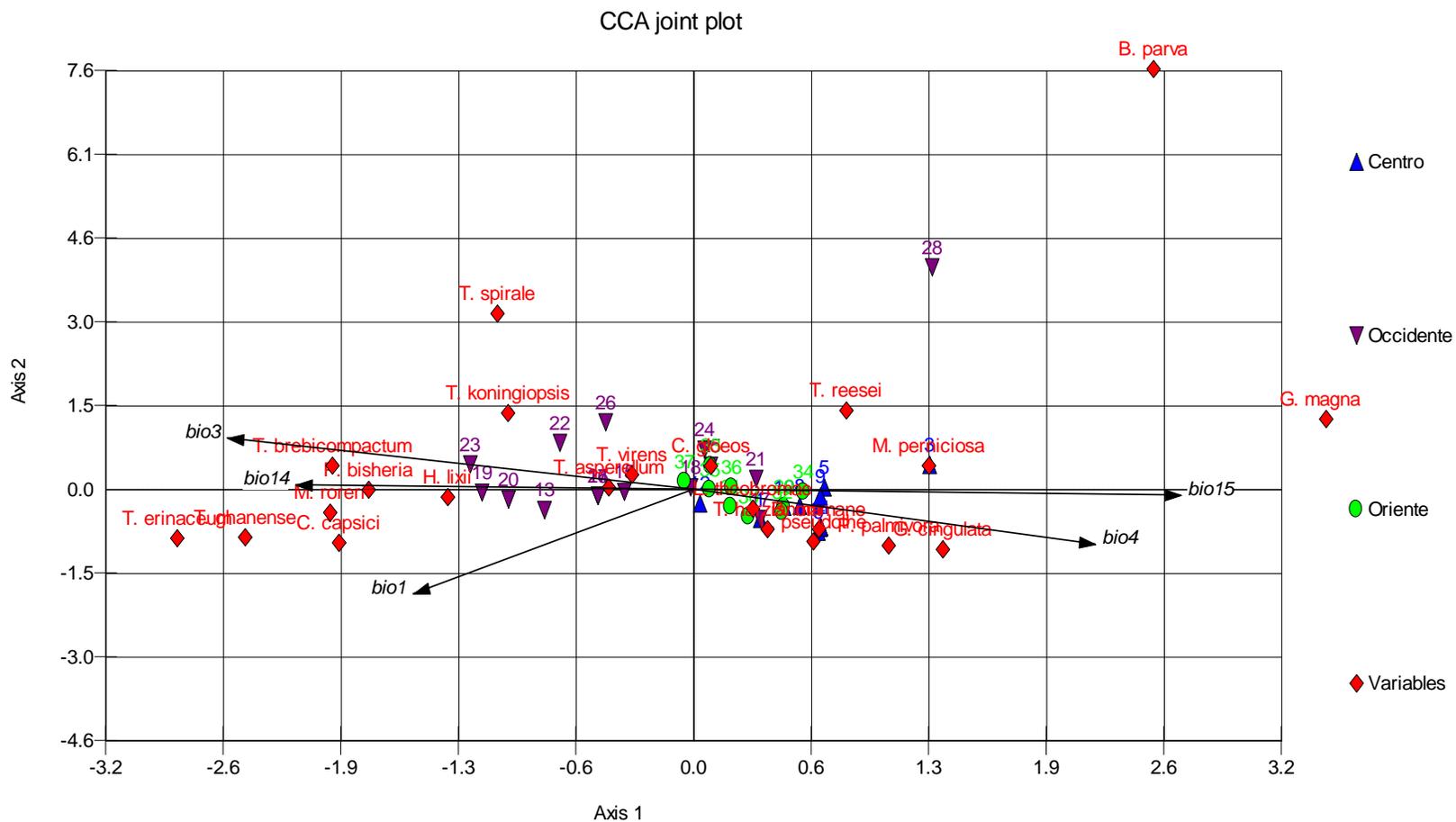


Figura 47. Medias e intervalos de confianza para las Variables Bioclimáticas. Se presentan sólo las variables en las que se obtuvo diferencias significativas para las distintas zonas cacaoteras (Occidente, Centro y Oriente).



Vector scalina: 2.72

Figura 48. Biplot obtenido a partir del CCA de muestras (localidades o sitios de muestreo) y 5 variables bioclimáticas. El patrón de las muestras permanece prácticamente idéntico.



Vector scalina: 5.25

Figura 49. Triplot obtenido a partir del CCA de las muestras (localidades o sitios de muestreo), las variables (especies en rojo) y las 5 variables bioclimáticas (vectores) incorporadas al análisis.

CONCLUSIONES

En este estudio se logró identificar a nivel de especie, mediante la región ITS, tanto patógenos como especies de *Trichoderma* asociadas al sistema agroforestal del cacao; esta región permitió evaluar la diversidad genética de esas especies, evidenciándose que en los patógenos *C. gloesporioides*, *L. theobromae* y *M. roreri* la diversidad genética es de moderada a baja y en *P. palmivora*, la diversidad genética es baja. En general no se observó diferenciación genética entre las tres zonas cacaoteras del país, solo en *L. theobromae* entre centro-oriente. En cuanto a *Trichoderma*, se encontraron nueve especies en las zonas cacaoteras del país, evidenciándose una alta diversidad genética en el género y como especies más abundantes se encontraron a *T. harzianum* y *T. koningiopsis*, siendo estas las especies con mayor diversidad genética.

Los parámetros de diversidad más la determinación del coeficiente de correlación de Pearson permitieron la determinación de los *hotspots* para las enfermedades estudiadas, siendo el *hotspots* para la enfermedad de antracnosis la zona Oriental; para las enfermedades cáncer de tronco y mancha parda la zona Central; para la enfermedad de moniliasis la zona Occidental y para la muerte regresiva, la región Centro – Oriente.

Estudiando las relaciones funcionales patógeno-controlador-ambiente, se evidenció que las abundancias de los controladores ejercen un efecto en las abundancias de los patógenos, así como las variables ambientales influyen de forma importante sobre la presencia del conjunto patógenos-controladores y sobre las especies de patógenos, indicando que éstas influyen significativamente en la presencia y distribución espacial de los patógenos de cacao, mientras que no se evidencia esta misma influencia sobre los

controladores; sin embargo se pudo apreciar a partir de los coeficientes de redundancia, una influencia (aunque no significativa) de las variables ambientales sobre los controladores. Con lo anteriormente expuesto se evidencia la influencia de las variables bioclimáticas en la dispersión de las especies estudiadas, siendo las variables relacionadas con precipitación y temperatura las que más influyeron en dicha dispersión, mientras que la altura, uso de suelo y tipo de suelo no tuvieron influencia en el modelo. Estas relaciones, significativas o no, abren un abanico de posibilidades en futuras investigaciones.

Distintos análisis estadísticos (PCA, PCO y CA) permitieron observar una tendencia zonal aunque con algunas superposiciones, simplemente analizando las especies encontradas en las tres zonas cacaoteras del país, siendo el CA, el análisis que mostró la misma tendencia de forma más clara y definida. Esto explica que las diferentes especies tienen patrones de distribución diferenciales, haciendo que se puedan distinguir zonas específicas en la geografía nacional. Es importante destacar que el análisis de correlación de Pearson realizado para la determinación de *hotspots* geográficos, aunado al CA y CCA evidenció la presencia en el país de dos regiones geográficas dadas las especies de patógenos que las conforman: Región 1 conformada por las zonas Central y Oriental y, por otro lado, la Región 2 conformada por la zona Occidental.

El análisis de correspondencia canónico, permitió observar las relaciones entre las zonas de muestreo, las especies que las conforman y las variables ambientales, así como también permitió la escogencia de las variables ambientales de mayor peso en la determinación de dichas relaciones; demostrándose que la incorporación de un gran número de variables ambientales no redundaba en resultados más confiables (con esta técnica). Las variables ambientales o bioclimáticas con mayor peso en este estudio fueron

bio1 (temperatura media anual), bio3 (isotermalidad), bio4 (estacionalidad en la temperatura), bio14 (precipitación en el mes más seco) y bio15 (estacionalidad en la precipitación), las cuales mostraron diferencias significativas en las tres zonas cacaoteras del país.

Dada la tendencia zonal evidenciada en todos los análisis y confirmada por el CCA donde se incluyen las variables bioclimáticas, se puede afirmar que la zona occidental del país tiende a estar asociada a altos valores de las variables bio1, bio3 y bio14. Mientras que para la región Central-Oriental del país las variables bio4 y bio15 presentan los mayores valores. El gradiente a lo largo del eje Este-Oeste se refleja en estas diferencias y preferencias de las especies estudiadas. Pero esta gran tendencia no descarta la interacción biológica entre los patógenos y sus posibles controladores, también moldeando la distribución de dichas especies, como ha sugerido el CCorA.

Los resultados aquí presentados son consistentes, aun con el uso de diferentes técnicas o herramientas estadísticas. Con el uso de datos como presencia-ausencia, usando diferentes distancias o inclusive restringiendo con variables bioclimáticas, se obtienen resultados que apuntan en la misma dirección y por tanto, refuerzan las tendencias observadas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda la evaluación de cada enfermedad o agente causal, por separado haciendo un muestreo más exhaustivo que permita hacer una mejor inferencia en cuanto a diferenciación geográfica, hotspots y relaciones funcionales.

Realizar muestreos tanto en época de lluvia como en época de sequía, para una mejor evaluación de la incidencia de las enfermedades.

Utilizar dos o más regiones del genoma para la identificación de los aislados a nivel de especie y la evaluación de su diversidad genética.

Determinados los *hotspots* de las enfermedades estudiadas, se deben considerar para la evaluación de genotipos resistentes o tolerantes a dichas enfermedades, sin embargo es importante tener en cuenta las restricciones legales que existen para el movimiento de material vegetal.

Evaluar en futuras investigaciones, las relaciones directas e inversas aquí observadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, Z. G., Abad, J. A., Coffey, M. D., Oudemans, P. V., Man, W. A., de Gruyter, H., & Louws, F. J. (2008). *Phytophthora bisheria* sp. nov., a new species identified in isolates from the Rosaceous raspberry, rose and strawberry in three continents. *Mycologia*, 100(1), 99-110.
- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E. M., Zare, R., & Phillips, A. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1), 1-10.
- Ali, S. S., Shao, J., Strem, M. D., Phillips-Mora, W., Zhang, D., Meinhardt, L. W., & Bailey, B. A. (2015). Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Al-Sadi, A., Al-Wehaibi, A., Al-Shariqi, R., Al-Hammadi, M., Al-Hosni, I., Al-Mahmooli, I., & Al-Ghaithi, A. (2013). Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, Citrus, and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease*, 97(10), 1363-1369.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 5:403–410.
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., & Phillips, A. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28, 1-13.
- Appiah, A., Flood, J., Archer, S., & Bridge, P. (2004). Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. *Plant Pathology*, 53(2), 209-219.
- Bailey JA, Jeger MJ (1992) *Colletotrichum: biology pathology and control*. Wallingford UK: CAB International 388 p
- Barnett HL, Hunter BB (1972) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing, Minneapolis, Minnesota, 3ra edn. 241 pp.
- Barnett HL, Hunter BB (1998) *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Barreto, M. A., Santos, J. C. S., Corrêa, R. X., Luz, E. D. M. N., Marelli, J., & Souza, A. P. (2015). Detection of genetic resistance to cocoa black pod disease caused by three *Phytophthora* species. *Euphytica*, 206(3), 677-687. doi: 10.1007/s10681-015-1490-4
- Bautista L, Acevedo R (1993) Caracterización e identificación de dieciséis aislamientos de *Trichoderma* spp (Resumen) *Fitopatología Venezolana* 6(2):54.
- Bissett J (1991) A revision of the genus *Trichoderma* II Infrageneric classification. *Can J Bot.*69:2357-2372.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S.-Y., Geiser, D. M., & Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from

- complete genome sequences. *Fungal Genetics and BIOlogy*, 45(3), 266-277.
- Burdon JJ, Silk J (1997) Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology* 87:664-669.
- Burgess T, Barber P, Mohali S, Pegg G, Beer W, Wingfield M (2006) Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98(3) pp 423–435.
- Butler EJ (1919) Report of the Imperial Mycologist 1918–1919. Scientific Report of the Research Institute of Pusa p 82.
- Cabi Bioscience (2017). CABI Databases. En: <http://www.speciesfungorum.org/Names/fundic.asp>. Accesado: 14 de junio 2017.
- Cai, L., Hyde, K., Taylor, P., Weir, B., Waller, J., Abang, M., . . . Liu, Z. (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 39(183), e204.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum*—current status and future directions. *Studies in mycology*, 73, 181-213.
- Capriles, L. (1975). Situación fitosanitaria del cultivo del cacao en Venezuela. Mesa Redonda Internacional sobre enfermedades del cacao. *Itabuna-Bahía-Brasil Estación Experimental de Caucagua Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias*, 13 p (mimeografiado).
- Capriles, L. (1977). Enfermedades del cacao en Venezuela. *Boletín del Fondo Nacional del Cacao. Venezuela*, 79 p.
- Capriles L (1978) Problemática de las enfermedades del cacao en Venezuela. Reunión Internacional sobre enfermedades del cacao. Taller sobre escoba de bruja. Manaos Brasil 17 al 23 de abril.
- Cardona, C. S., Marín Montoya, M., & Díez, M. C. (2012). Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Revista mexicana de micología*, 35, 23-34
- Cardoso JE, Wilkinson MJ (2008) Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Summa Phytopathol Botucatu* Vol. 34 N. 1 p 55-57.
- Carlile, M. and Watkinson, S. (1996). The fungi (pp. 203-250): N.Y. Academic Press.
- Cartay, R. (1997). La economía del cacao en Venezuela. *Memorias del Primer Congreso Venezolano de Cacao y su Industria. Maracay Venezuela*, 129-146.
- Chacón I, Pérez E, Vivas A, Araujo D (2009) Primer reporte de la presencia de *Moniliophthora roreri* (Cifer y Par) en el CESID-CACAO. CORPOZULIA. Trabajo presentado en el III Congreso Venezolano del Cacao y su Industria.
- Cline, E. T., Farr, D. F., & Rossman, A. Y. (2008). A synopsis of *Phytophthora* with accurate scientific names, host range, and geographic distribution. *Plant Health Progress*, (March), 0318-01.

- Coale AJ, McNeil DR (1972) The distribution by age of the frequency of first marriage in a female cohort. *Journal of the American Statistical Association*, 67(340): 743-749.
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related. *Oomycetes* 30: 17–32.
- Correa Álvarez, J., Castro Martínez, S., & Coy, J. (2014). Biology stage of *Moniliophthora roreri* in Colombia. *Acta agronómica*, 63(4), 388-399.
- Correa-Victoria, F. J., Guimarães, E. P., & Martínez, C. P. (1997). Caracterización de la estructura genética y la virulencia de *Pyricularia oryzae* Sacc. para desarrollar variedades resistentes al añublo del arroz. *GUIMARÃES, EP Selección recurrente en arroz. Cali: CIAT*, 203-215.
- Crawford AR, Bassam BJ, Drenth A, Maclean DJ, Irwin JAG (1996) Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequences. *Mycological Research* 100: 437–43.
- Cunha R (2006) Estrutura Genética de Populações De *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR. Tesis de Grado presentada en Universidad Estadual Paulista Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus De Jaboticabal Brasil.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in mycology*, 73, 37-113.
- Deberdt, P., Mfegue, C., Tondje, P., Bon, M., Ducamp, M., Hurard, C., Cilas, C. (2008). Impact of environmental factors, chemical fungicide and BIOlogical control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. *BIOlogical Control*, 44(2), 149-159.
- Díaz-Valderrama, J. R., & Aime, M. C. (2016). The cacao pathogen *Moniliophthora roreri* (Marasmiaceae) possesses biallelic A and B mating loci but reproduces clonally. *Heredity*.116, 491-501.
- Domínguez-Guerrero, I. P., Mohali-Castillo, S. R., Marín-Montoya, M. A., & Pino-Menesini, H. B. (2012). Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela.
- Doyle, V. P., Oudemans, P. V., Rehner, S. A., & Litt, A. (2013). Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* sl from wild and agricultural landscapes in North America. *PLoS One*, 8(5), e62394.
- Drenth, A., & Guest, D. I. (2016). Fungal and Oomycete Diseases of Tropical Tree Fruit Crops. *Annual Review of Phytopathology*, 54, 373-395.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(10), 813-828.

- Druzhinina I, Kubicek C (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang University Science* 6B (2): 100-112
- Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komoń-Zelazowska, M., Mulaw, T. B., & Bissett, J. (2010). The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical Biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 94.
- Ducamp, M., Nyassé, S., Grivet, L., Thévenin, J.-M., Blaha, G., Despréaux, D., & Cilas, C. (2004). Genetic diversity of cocoa tree *Phytophthora* pathogens. *Improvement of cocoa tree resistance to Phytophthora diseases'* (Eds C Cilas, D Despréaux) pp, 45-75.
- Epskamp, S., Cramer, A. O., Waldorp, L. J., Schmittmann, V. D., & Borsboom, D. (2012). qgraph: Network visualizations of relationships in psychometric data. *Journal of Statistical Software*, 48(4), 1-18.
- Evans HC (1981) Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. *Phytopathological Papers*, 24, 1-44
- Evans, H. C. (2007). Cacao diseases—the trilogy revisited. *Phytopathology*, 97(12), 1640-1643.
- Freeman S, Shabi E, Katan T (2000). Characterization of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose of Anemone (*Anemone coronaria* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. p 5267- 5272.
- Froeschke, G., & von der Heyden, S. (2014). A review of molecular approaches for investigating patterns of coevolution in marine host-parasite relationships. *Adv Parasitol*, 84, 209-252.
- Galarza, L., Akagi, Y., Takao, K., Kim, C. S., Maekawa, N., Itai, A., Kodama, M. (2015). Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 81(3), 201-210. doi: 10.1007/s10327-015-0587-x
- Gañán, L., Álvarez, E., & Castaño-Zapata, J. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(152), 339-347.
- García C, Ortiz-García CF, Boldoc XM, Bautista-Muñoz C (2006) Aislamiento e identificación molecular de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis del cacao. *XIX Reunión Científica-Tecnológica Forestal Y Agropecuaria Tabasco 2006*.
- Govindajuru RD (1989) Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. *J Evol Biol* 2:173-181.
- Gutarra, B., Silva, M., Márquez, K., & León, B. (2013). Análisis de la diversidad genética de 21 aislamientos del hongo *Moniliophthora roreri* basado en marcadores RAPD. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*, 3(2).

- Hanada, R. E., Pomella, A. W., Soberanis, W., Loguercio, L. L., & Pereira, J. O. (2009). BIOcontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *BIOlogical Control*, 50(2), 143-149.
- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E (2000) Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* species. *Appl. Environ Microbiol.* 66 (5):1890-1898.
- Herre EA, Mejía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Butler A, Van Bael S (2007) Ecological implications of antipathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* 88:50–558
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., & Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International journal of climatology*, 25(15), 1965-1978.
- Huang, J., Xu, J., Wang, Z., Khan, D., Niaz, S. I., Zhu, Y., ... & Liu, L. (2017). New lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318#. *Natural product research*, 31(3), 326-332.
- Icco.org. (2016). Fine or Flavour Cocoa. [online] Available at: <http://www.icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>, [Accessed 30 Aug. 2016].
- Irwin (1997) Biology and management of *Phytophthora* sp. attacking field crops in Australia. University of Queensland. Queensland 4072 Australia Colombia. Lagos Nigeria: Cocoa Producers Alliance 395 – 400.
- Jaimés, Y. Y., Gonzalez, C., Rojas, J., Cornejo, O. E., Mideros, M. F., Restrepo, S., & Furtado, E. L. (2016). Geographic Differentiation and Population Genetic Structure of *Moniliophthora roreri* in the Principal Cocoa Production Areas in Colombia. *Plant Disease*, 100(8), 1548-1558.
- Jaklitsch, W., & Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in mycology*, 80, 1-87.
- Jimenez, M. 2011. Evaluación de *trichoderma* spp. y acibenzolar-s-metil (bion[®]) como inductores de resistencia a la pudrición blanca en ajo (*sclerotium cepivorum* berk). Tesis Doctoral. Maracay, Venezuela; Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 208 p.
- Kohli, M. M., & Van Beuningen, L. T. (1990). *Conferencia Regional sobre la Septorios del Trigo*. CIMMYT.
- Kullnig C, Szakacs G, Kubicek CP (2000) Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia Siberia and the Himalaya. *Mycol.Res* 104 (9): 1117-1125.
- Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., & Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38(3), 310-319.

- Lalev, A. I., & Nazar, R. N. (1998). Conserved core structure in the internal transcribed spacer 1 of the *Schizosaccharomyces pombe* precursor ribosomal RNA. *Journal of molecular biology*, 284(5), 1341-1351.
- Leal, F., Avilán, L., & Valderrama, E. (1999). Áreas potenciales para el desarrollo del cacao en Venezuela. *Revista agroalimentaria*, 5(8), 39-45.
- Legendre, P., & Legendre, L. F. (2012). *Numerical ecology* (Vol. 24). Elsevier.
- Li, J., Xue, Y., Yuan, J., Lu, Y., Zhu, X., Lin, Y., & Liu, L. (2016). Lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318#. *Natural product research*, 30(7), 755-760.
- McCune, B., Grace, J. B., & Urban, D. L. (2002). *Analysis of ecological communities* (Vol. 28). Gleneden Beach: MjM software design.
- McCune, B. (1997). Influence of noisy environmental data on canonical correspondence analysis. *Ecology*, 78(8), 2617-2623.
- Martin, F. N., Blair, J. E., & Coffey, M. D. (2014). A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology*, 66, 19-32.
- Martin RR, Delano J, Levesque CA, (2000) Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 207-239 7.
- Mbenoun M, Momo Zeutsa EH, Samuels G, Nsougua Amougou F, Nyasse S (2008) Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. *Plant Pathology* 57, 381
- Mejía LC, Enith I, Rojas EI, Maynard Z, Van Bael S, Arnold AE, Hebban P, Samuels GJ, Robbins N, Herre EA (2008) Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol. Control* 46:4–14.
- Mejía, L.C., Herre, E. A., Sparks, J. P., Winter, K., García, M. N., Van Bael, S. A., & Maximova, S. N. (2014). Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. *Frontiers in Microbiology*, 5, 479.
- Miller JH, Giddens JE, Foster AA (1957) A survey of the fungi of forest and cultivated soils of Georgia *Mycologia* XLIX (6): 779–808.
- Mohali, S., Burgess, T., & Wingfield, M. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*, 35(6), 385-396.
- Mohamed, M.; Dickinson, M. and Abu Seman, I. (2015). Analysis of genetic variation in *Phytophthora palmivora*, the causal agent of Bud Rot Disease of Oil Palm. Conference paper Malaysian Palm Oil Board. 156-163
- Molina, S., Pérez-Martínez, S., Demey, J.-R., Isturiz, M., & Sosa, D. (2016). Diversidad genética de *Phytophthora* spp. en plantaciones venezolanas de cacao mediante marcadores ISSR. *Rev. Protección Veg*, Vol. 31 (1), 1-8

- Myers, N. (1988). Threatened biotas: "hot spots" in tropical forests. *Environmentalist*, 8(3), 187-208.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity *hotspots* for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Naranjo L, Urbina H, De Sisto A, León V (2007) Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potencial for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatalysis and Biotransformation* 25 4: 341- 349.
- Nolan, M. J., & Cribb, T. H. (2005). The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Advances in parasitology*, 60, 101-163.
- Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & la Cruz-Pérez, D. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 86(4), 947-961.
- Palmer, M. W. (1993). Putting things in even better order: the advantages of canonical correspondence analysis. *Ecology*, 74(8), 2215-2230.
- Parra, D., Pérez Martínez, S., Sosa, D., Rumbos, R., & Moya, A. (2009). Avances en las investigaciones venezolanas sobre enfermedades del cacao. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 55-70.
- Parra D, Subero LJ (2000) Especie de *Phytophthora* que afecta al Cacao (*Theobroma Cacao* L) en la región de Barlovento Estado Miranda. Memorias Del Primer Congreso Venezolano Del Cacao y Su Industria 1997 Maracay Venezuela pp 243-244.
- Pavone, D., & Dorta, B. (2015). Diversidad del hongo *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz de Venezuela. *Interciencia*, 40(1), 23
- Pearson, K. (1901). Principal components analysis. *The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal*, 6(2), 566.
- Peculis, B. A., & Greer, C. L. (1998). The structure of the ITS2-proximal stem is required for pre-rRNA processing in yeast. *Rna*, 4(12), 1610-1622.
- Pereira, J.L. (1985) Chemical control of *Phytophthora* pod rot of cocoa in Brazil Cocoa Growers Bull 36:23-38.
- Pereira, J. (2000) Perspectivas para el Control de las Enfermedades del Cacao I Congreso Venezolano del Cacao y su Industria p 93-109.
- Pérez Y, Escalona F (1995) Especies de *Trichoderma* aisladas de suelo cultivado con frijol (*Vigna unguiculata* (L) Walp) (Resumen) Revista Forestal Venezolana 1(1): 138.
- Phillips-Mora W, Evans H, Krauss U, Wilkinson M (2003) Genetic relationship between the fungus *Moniliophthora roreri* (CIF) Evans *et al.*, and Basidiomycetes determined through molecular techniques. Proceeding Nigeria COPAL Vol. II: 619 – 625.
- Phillips-Mora W, Aime MC, Wilkinson MJ (2007) Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56 911–922.

- Phillips-Mora W, Castillo J, Krauss U, Rodríguez E, Wilkinson M (2005) Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology* 54 483–490.
- Phyllips-Mora, W., Cerda Rolando. (2009) Catálogo Enfermedades del cacao en Centro America. Vol. 93 (pp. 24). Turrialba, Costa Rica: CATIE.
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2015). Lasiodiplodia theobromae en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 54-74.
- Pinzón Gutiérrez, Y. A., Bustamante, S. L., & Buitrago Hurtado, G. (2013). Differential molecular diagnosis Colletotrichum gloeosporioides and Fusarium oxysporum in yam (Dioscorea sp.). *Revista Colombiana de BIOTecnología*, 15(1), 52-60.
- Ploetz, R. (2007). Cacao diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide. *Phytopathology*, 97(16341639).
- Ploetz, R. (2016). The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview *Cacao Diseases* (pp. 33-59): Springer.
- Posada, D. y Crandall, K. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14: 817-818.
- Rajamanickam, S., & Sethuraman, K. (2014). Effective Method of Inoculation, Virulence, Age of Susceptibility Against Colletotrichum capsici (Syd.) Butler and Bisby Causing Anthracnose of Chill (Capsicum annum L.). *Trends in Biosciences*, 7(17), 2500-2503.
- Reyes H (1972) Etiología de una nueva enfermedad del fruto de cacao en Venezuela En: IV Conferencia Internacional sobre Investigación de Cacao St. Augustine Trinidad.
- Reyes, H., & Capriles, L. (2000). El Cacao en Venezuela Moderna Tecnología para su cultivo. *Caracas Venezuela Chocolates el Rey*, 270.
- Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., Torres-de la Cruz, M., Lagunes-Espinoza, L. C., & Valdovinos-Ponce, G. (2016). Trichoderma species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of Moniliophthora roreri. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 22(2), 149-163.
- Rivas, M., & Pavone, D. (2010). Diversidad de Trichoderma spp. en plantaciones de Theobroma cacao L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre Crinipellis pernicioso (Stahel) Singer. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 35(10), 777-783.
- Robert V, Stegehuis G, Stalpers J (2005) The MycoBank engine and related databases <http://www.mycobank.org>.
- Rojas, E. I., Rehner, S. A., Samuels, G. J., Van Bael, S. A., Herre, E. A., Cannon, P., & Peng, Y. Q. (2010). Colletotrichum gloeosporioides associated with Theobroma cacao and other plants in Panama:

- multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*, 102(6), 1318-1338.
- Rumbos R, Parra D, Moya A, Quevedo H, Gómez C (2005) Antecedentes de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*,) del cacao: Peligro de expansión en Venezuela y otras áreas del Caribe XIX Congreso Venezolano de Fitopatología Barquisimeto estado Lara.
- Rumbos R, Moya A, Quevedo H, Romero K, Parra D, Gutiérrez B, Sosa D, Monsalve LS, Pérez S (2007) Primer reporte de la mancha de agua en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L) causada por *Phytophthora megasperma* (Drechler) en el sector Bohardal Rio Chico Estado Sucre. II Congreso Venezolano del Cacao y su Industria 29/10-02/11 de 2007. Maracay- Aragua. Venezuela.
- Salazar, E., Hernández, R., Tapia, A. M., & Gómez-Alpízar, L. (2013). Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agronomía Costarricense Vol. 36 Núm. 1*.
- Samuels GJ (1996) *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus *Mycol Res* 100 (8): 923–935.
- Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF, McCray EB (2011) *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.
- Saul Maora, J., Liew, E. C. Y., & Guest, D. I. (2017). Limited morphological, physiological and genetic diversity of *Phytophthora palmivora* from cocoa in Papua New Guinea. *Plant Pathology*, 66(1), 124-130.
- Savory, F. R., Varma, V., & Ramakrishnan, U. (2014). Identifying geographic hot spots of reassortment in a multipartite plant virus. *Evolutionary applications*, 7(5), 569-579.
- Schlick A, Kuhls K, Meyer W, Lieckfeld E, Borner T, Messner K (1994) Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutations in fungal DNA implications for the identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 26: 74 – 8.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Shah, M., Verma, K., Singh, K., & Kaur, R. (2010). Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India. *Genetics and Molecular Research*, 9(2), 1217-1228.

- Sosa, D., Parra, D., Noceda, C., & Pérez-Martínez, S. (2016). Co-occurrence of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium decemcellulare* and *Lasiodiplodia theobromae* isolates in cushion galls disease of cacao (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Plant Protection Research*, 56(2), 129-138.
- Sosa, D., Pérez Martínez, S., Molina, S., Demey, J., Gómez, K., Domínguez, D., Parra, D. (2014). Diversidad genética de *Trichoderma* spp. en Venezuela, determinada mediante análisis combinado ITS-AFLP. *Revista de Protección Vegetal*, 29, 42-51.
- Souto, Cintia; Mathiasen, Paula; Quiroga, María Paula; Acosta; María Cristina; Russell, Romina Vidal; Echeverría, Cristian y Premoli, Andrea. (2015). *Hostpots* genéticos mediante el mapeo de diversidad molecular en especies leñosas de amplia distribución: cuando lo común importa. *Journal of Heredity* Spanish translation of doi: 10.1093/jhered/esv023 Symposium Article.
- Suárez C. Liliana. (2016). Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta Agronómica*, Vol. 65, Núm. 1
- Suárez, J., Hernández, Y. A., Suárez, F. Y. J., & Hernández, F. A. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)* (No. Doc. 22739) CO-BAC, Bogotá).
- Talhinhas P, Screnivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H (2005) Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology*. p 2987 - 2998.
- Tapia-Tussell, R., Cortés-Velázquez, A., Valencia-Yah, T., Navarro, C., Espinosa, E., Moreno, B., & Perez-Brito, D. (2016). First Report of *Colletotrichum magnum* Causing Anthracnose in Papaya in Mexico. *Plant Disease*.
- Ten Hoopen, G. M., & Krauss, U. (2016). Biological control of cacao diseases. In *Cacao Diseases* (pp. 511-566). Springer International Publishing.
- Ter Braak, C. J. (1986). Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 67(5), 1167-1179.
- Tirado-Gallego, P. A., Lopera-Álvarez, A., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Strategies for Control of *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa* in *Theobroma cacao* L.: A Systematic Review. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 417-430.
- Tkach, V., Pawlowski, J., & Mariaux, J. (2000). Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial lsrDNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 30(1), 83-93.

- Tollenar D (1958) *Phytophthora palmivora* of cocoa and its control Neth. J. Agr. Sci. 6 1: 24-38.
- Tondje PR, Roberts DP, Bon MC, Widmer T, Samuels GJ, Ismaiel A, Begoude AD, Tchana T, Nyemb-Tshomb E, Ndoumbe-Nkeng M, Bateman R, Fontem D, Hebbar KP (2007) Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. Biological Control 43 (2): 202–212.
- Vilas, R., Criscione, C. D., & Blouin, M. S. (2005). A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology*, 131(06), 839-846.
- Wang, X. R. y. Szmidt, A. E. (1998). Population Genetic Analysis of Pathogenic Forest Fungi Department of Forest Genetics and Plant Physiology Swedish University of Agricultural Science. <http://geneticsbiologykyushu-uacjp/pgen/abstract/xrwbook98htm>.
- Weindling R (1932) *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology 22, 837- 845.
- Weir, B., Johnston, P., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73, 115-180.
- Well HD, Bell DK, Jaworski CA (1972) Efficacy of *Trichoderma harzianum*. As a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 62: 442-447.
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics In: Innis MA, Sninsky DH, White TJ, (eds.) *PCR Protocols* London UK: Academic Press 315 – 22.
- Xiao CL, MacKenzie SJ, Legard DE (2004) Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated host. Phytopathology 94:446-453.
- Zhou S, Smith D, Stanosz G (2001) Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycol.Res.* 105 (8): 919-926.

ANEXOS