

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

**Estudio de la interacción *Phytophthora palmivora*-*Theobroma cacao*:
Evaluación de los cambios en el perfil químico de *Theobroma cacao* L.
asociados a la resistencia.**

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la Ilustre Facultad de Ciencias de la
Universidad Central de Venezuela, por la
Br. Ariannaís Chitty Rivero, para optar
por el título de Licenciado en Química.

Tutor(es): Dra. Daynet Sosa
Dra. María Rodríguez

Caracas, Mayo de 2013.

RESUMEN

Con el objetivo de aumentar el conocimiento sobre las estrategias de defensa de la planta de *Theobroma cacao L.* a la infección de *Phytophthora palmivora*, se planteó estudiar la variación en el metabolismo de dicha planta en los clones Scavina 6 (SCA-6) y Playa Alta 2 (PA 2), y así el impacto que podría tener el patógeno sobre la distribución del contenido de fenoles, ligninas, carbohidratos y aminoácidos durante la infección. Se realizó una recolección del material foliar de los dos clones de cacao a los cuales se le aplicaron tres tratamientos: control (sin tratamiento), punción más agua y punción mas hongo para evaluarse durante 5 días. Se realizó la extracción mediante una solución de metanol para extraer los compuestos fenólicos solubles y una etanólica para aminoácidos y carbohidratos, mientras que para los fenoles ligados y ligninas se realizó una hidrólisis básica del material foliar que quedó como residuo. La cuantificación se llevo a cabo utilizando la técnica de fotolorimetría.

Se encontró que el contenido de compuestos fenólicos solubles aumentó en las hojas infectadas independientemente del clon luego de aplicar los tratamientos. La mayor cantidad se observó en el clon resistente SCA-6 y el menor contenido se obtuvo en el clon susceptible PA-2. Se observó de igual manera que el contenido de lignina fue más alto en el clon SCA-6 que en el clon PA-2 y que disminuye en la interacción hoja-hongo. Al evaluar el contenido de carbohidratos, se encontró el mayor contenido para el clon SCA-6 y con respecto al perfil de aminoácidos, el contenido más elevado fue encontrado en el clon susceptible PA-2. Estos resultados indican que hay una participación importante de los fenoles, ligninas, carbohidratos y aminoácidos en los mecanismos de defensa de la planta *Theobroma cacao L.* frente al ataque de *Phytophthora p.*

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quisiera agradecerle a Dios por saberme guiar para superar los obstáculos que se me han presentado y así poder superarlos con éxito. De igual manera quisiera agradecer a mis padres Nelly Rivero y Dimas Chitty y a mi hermana Sarahís Chitty por estar siempre presentes en cada momento de mi vida, tanto buenos como malos, principalmente en éstos últimos dándome siempre su apoyo. A mi Tía Marlene Rivero, mi abuela Rosa Rivero. Especialmente a mi abuelo Dimas Alberto Chitty y a mi tía abuela Carmen Borges que en vida siempre estuvieron presentes de mis estudios y mi carrera universitaria, deseándome lo mejor.

Quiero agradecer a mi tutora y Profesora María Rodríguez y Daynet Sosa por guiarme en esta etapa final de mi carrera y a esta Ilustre Universidad por haberme enseñado tanto.

A lo largo de mi carrera conocí grandes personas, que se convirtieron en grandes amigos, compañeros de estudio y de los inolvidables “viernes de balcón”, ellos fueron: Alejandra Granadillo, Xavier Matute, Oswaldo Maza, Mariana Amorer, Luis Castillo, Lorieta Cartaya, Víctor Fernández, Saraí Tory y Delimar Pérez. En especial le tengo que agradecer a Alejandra Granadillo por ser incondicional en todos los aspectos desde el día que nos conocimos.

En el aspecto personal, tengo mucho que agradecerle a mi novio Erick Marin por ser parte importante de mi vida y por su gran colaboración en éste trabajo y sobre todo por aguantarme en los momentos de estrés que la tesis provoca. A mi amiga de toda la vida Jennys Martínez; a Jonathan Sánchez y Jesús Vergara por siempre complacer mis antojos de ir a la playa a liberar el estrés.

Al resto de personas maravillosas que conocí en mi querida Universidad profesores, amigos y compañeros de estudios, gracias totales.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
Historia	4
1.2 Producción mundial del cacao	7
1.3 Cultivo del cacao en Venezuela	9
1.4 Pudrición negra o cáncer de tronco, ramas y raíces (<i>Phytophthora palmivora</i>)	11
1.5 Manejo y control del patógeno	13
1.6 Resistencia genética. Interacción planta – patógeno	14
1.7 Espectrofotometría	16
1.7.1 Principios de espectroscopia. Espectro electromagnético	16
1.7.2 Propiedades onda partícula de la luz	17
1.7.3 Lambert y Beer, transmitancia y absorbancia	19
1.8 Reacciones colorimétricas	20
1.8.1 Determinación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu (F-C)	21
1.8.2 Determinación de carbohidratos	22
1.8.3 Determinación de aminoácidos	24
2. ANTECEDENTES	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo general	30

3.2	Objetivos específicos	30
4.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	31
4.1	Diseño experimental	31
4.2	Materiales y reactivos	32
4.3	Equipos	33
4.4	Métodos	33
4.4.1	Inoculación	33
4.4.2	Compuestos fenólicos	35
4.4.2.1	Extracción de fenoles	35
4.4.2.2	Cuantificación de fenoles	35
4.4.3	Aminoácidos y carbohidratos	36
4.4.4.1	Extracción de aminoácidos y carbohidratos	36
4.4.4.2	Determinación de carbohidratos	36
4.4.4.3	Determinación de aminoácidos	36
4.4.4	Ligninas	37
4.4.4.1	Extracción de ligninas	37
4.4.4.2	Determinación de ligninas	37
4.4.5	Análisis estadístico	37
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1	Evaluación de la resistencia/susceptibilidad a <i>Phytophthora</i> <i>palmivora</i>	39

5.2 Contenido de compuestos fenólicos en hojas de cacao durante la infección de <i>Phytophthora palmivora</i> en los clones Scavina 6 y Playa Alta 2	41
5.3 Contenido de ligninas en hojas de cacao durante la infección de <i>Phytophthora palmivora</i> en los clones Scavina 6 y Playa Alta 2	45
5.4 Contenido de carbohidratos y aminoácidos en hojas de cacao durante la infección de <i>Phytophthora palmivora</i> en los clones Scavina 6 y Playa Alta 2	48
6. CONCLUSIONES	53
7. BIBLIOGRAFÍA	55
8. ANEXOS	70

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia.

Theobroma, “el fruto de los Dioses”, fue el nombre que le dio Linneo al árbol del cacao, cultivo ligado como ningún otro a la historia de Latinoamérica por su origen e importancia comercial (Ploetz, 2007; Gesteira y col., 2007), ya que a partir de sus semillas se obtiene el chocolate y otros subproductos como la pasta, licor, la manteca, la torta y el polvo de cacao, usados en la industria farmacéutica y en la elaboración de cosméticos. El árbol se cultiva comercialmente en agro ecosistemas típicos de los bosques húmedos tropicales, concentrándose su producción mundial en una banda estrecha no mayor de 20° al norte y al sur de la línea ecuatorial. Los productos derivados del cacao son consumidos en todo el mundo y han sido estudiados por mucho tiempo debido a las propiedades antioxidantes de algunos de los constituyentes de los fenoles, como los ácidos fenólicos, las procianidinas y los flavonoides (Ren y col., 2003 cit. por Arlorio y col., 2005); así como sus propiedades anti-microbianas en contra de algunos patógenos bacterianos de alimentos y algunas bacterias cariogénicas (Osawa y col., 1990).



Figura 1. Árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.). Morfología de la planta. Foto cedida por Daynet Sosa.

La especie *Theobroma cacao* L. ($2n=20$ cromosomas), es un árbol de ciclo vegetativo perenne, cauliflora, flor hermafrodita pentámera, el tipo de polinización es alógama y entomófila, su reproducción puede ser sexual o asexual; generalmente se puede describir como un árbol cuya altura puede superar los cuatro metros, dependiendo del tipo y del ambiente. Su fruto comúnmente es denominado mazorca, el cual de acuerdo a la especie y variedad adopta diferentes formas, tamaños, colores y se clasifican en Anjoleta, Cundeamor, Amelonado y Calabacillo. Al partir el fruto se pueden distinguir dos partes bien definidas: el pericarpio, cáscara o concha que varía de espesor según la forma o tipo de cacao y las semillas, almendras o granos, recubiertas por un mucílago de color blanco, sabor dulce y acidulado. (Barros N, 1981; Mejía L y Arguello O, 2000) (Ver figura1).

Varios autores han clasificado los cacaos cultivados en varios grupos, teniendo en cuenta las características fenotípicas de la morfología del fruto y las semillas, además de la evaluación histórica de los nombres tradicionales, la distribución geográfica de las formas y el origen de las mismas. (Barros N, 1981). Según estos factores se agrupan en tres grandes grupos, Los Criollos, Los Forasteros y Los Trinitarios, términos que inicialmente fue acuñado por los productores Venezolanos durante la colonia a los genotipos cultivados.



Figura 2. Clasificación botánica del cacao. a) Criollo, b) Forastero y c) Trinitario. (Tomado y modificado de <http://www.therepublicofchocolate.net>)

Los Criollos son árboles de poco vigor, más pequeño que el tipo Forastero, presenta alto grado de susceptibilidad a enfermedades; sus rendimientos son bajos, pero se destacan por la alta calidad de sus semillas, característica por la que es reconocido en el mercado mundial como Cacao Fino o de aroma. (Quintero M. y Díaz K, 2004). Poseen estaminodios rosados, mazorcas rojas o verdes antes de la madurez, el pericarpio es muy rugoso y el mesocarpio es delgado y poco lignificado. Las semillas son gruesas de color blanco o castaño muy claro, poco pigmentadas, con alto contenido de grasa, sin astringencia, con olor de cacao dulce y sabor agradable, unido a un aroma delicado característico de los tipos finos. La morfología de la mazorca presentan cierta variabilidad y se encuentran cultivares de Criollo con una superficie casi liso, como por ejemplo los Porcelana de Venezuela. Actualmente se encuentra cultivado en México, Nicaragua, Guatemala, Colombia, Venezuela y Madagascar. (Barros N, 1981; Mejía L y Arguello O, 2000; Motamayor y col., 2002).

Los Forasteros son árboles que se caracterizan por ser de mayor vigor y tolerancia a las enfermedades. Presenta semillas aplanadas con cotiledones de color púrpura fuerte, alta astringencia y bajo contenido de grasa, en términos de calidad son denominados cacaos ordinarios; las mazorcas son de color verde y cambian a amarillas en la madurez, el pericarpio es grueso y el mesocarpio fuertemente lignificado. Este grupo está compuesto por diversas poblaciones con distinto origen geográfico: el Alto Amazonas (Perú, Ecuador y Colombia), el bajo amazonas (Brasil y Guayanas) y a lo largo de todo el río Orinoco en Venezuela. Constituyen la mayoría de los cultivares de Brasil, Oeste del África y este de Asia. (Mejía L y Arguello O, 2000; Motamayor y col, 2002).

Los Trinitarios, son una población híbrida con marcado polimorfismo, resultado del cruce entre criollos antiguos y forasteros altos amazónicos realizados de forma natural en el Siglo XVIII en la isla de Trinidad, que en esa época formaba parte de la Capitanía General de Venezuela, (Motamayor y col., 2003), además de

hibridaciones deliberadas a través de distintos programas de selección para mejoramiento desarrollados inicialmente en Trinidad. Su característica más sobresaliente es su heterogeneidad, con morfologías intermedias entre sus padres; es más resistente y productivo que el cacao “Criollo” pero de inferior calidad. Actualmente se encuentra cultivado en México, Centroamérica, Trinidad y Tobago y las Antillas, Colombia, Venezuela, en países productores del África y sur este de Asia (Mejía L y Arguello O, 2000).

De acuerdo con los trabajos de Motamayor y col. (2002;2003), se encontró gran variabilidad genética entre y dentro de los grupos de Criollos y Forasteros, lo cual ha permitido expandir el conocimiento sobre la evolución de esta especie. Con estos estudios se confirmó el origen híbrido de los cacaoteros Trinitarios y se propuso una nueva clasificación creando los grupos de: Criollo Antiguo, Criollo Moderno, Forastero Alto Amazónico y Forastero Bajo Amazónico. Además se reportó que el cacao Criollo cultivado actualmente corresponde en su mayoría a formas híbridas entre Criollo antiguo y Forastero bajo amazónico, por lo cual lo llamó Criollo Moderno, evidenciando el efecto de la domesticación del cultivo por los mayas en los Criollos antiguos.

1.2. Producción mundial del cacao.

La producción mundial de plantas de cacao se concentra en los países tropicales, principalmente en África y América, típicamente en minifundios o bajo sistemas de agricultura de subsistencia (casi el 90% de la producción de cacao corresponde a pequeños agricultores con menos de 5 hectáreas); mientras que la producción de bienes intermedios y finales se centra en los países desarrollados (Europa y América del Norte) (ICCO, 2006).

Según los estándares internacionales de cacao en el mercado mundial, los granos de cacao se clasifican según su destino en dos grandes categorías: La

primera, “ordinarios o básicos”, provenientes de genotipos forasteros procedentes en su mayoría de África y Brasil, utilizados en la fabricación de manteca de cacao y de productos con gran cantidad de chocolate y la segunda categoría contempla los granos de “cacao fino o de aroma”, producidos por los genotipos criollos, trinitarios y el Nacional producidos principalmente en Venezuela, el Caribe y en Ecuador respectivamente; que dan características específicas de sabor, aroma y color a los chocolates finos y revestimientos o capas de cobertura. Actualmente, la oferta mundial de cacao fino o de aroma representa aproximadamente el 5% del cacao producido en el mundo, por lo cual este tipo de cacao tiene, generalmente, un precio superior al cacao normal en los mercados de exportación (Quintero y Díaz, 2004).

El Convenio Internacional del Cacao, firmado en 1995, reconoce solamente a 17 países como productores de cacao fino de aroma. América Latina y el Caribe suministra el 80%, Asia el 18% y África el 2%. En el continente americano, Ecuador es el mayor abastecedor con 115.000T en 2006, le siguen Colombia (30.000T) y Santo Domingo (42.000T), según el Informe de ICCO (2006).

Para el año cacaotero 2009/10, el primer país productor a nivel mundial fue Costa de Marfil (Tabla1), con 1,24 millones de toneladas, después le siguen Ghana (632.000 tn), Indonesia (550.000 tn), Nigeria (235.000 tn), Camerún (205.000 tn) y el Brasil (161.000 tn). Luego vienen, Ecuador (150.000 tn) y Nueva Guinea (39.000 tn) (ICCO, 2011).

La importancia de Latinoamérica en el cultivo de cacao viene cayendo, representando alrededor del 14% en el año 2010 (21,9% en el 1990). En Sudamérica la producción es liderada por Brasil y Ecuador (ICCO, 2011).

Production of cocoa beans
(thousand tonnes)

	2009/10		Estimates 2010/11		Estimates 2011/12	
Africa	2486	68.4%	3225	74.8%	2891	71.4%
Cameroon	209		229		210	
Côte d'Ivoire	1242		1511		1476	
Ghana	632		1025		879	
Nigeria	235		240		220	
Others	168		221		107	
America	516	14.2%	561	13.0%	630	15.5%
Brazil	161		200		220	
Ecuador	150		161		190	
Others	205		201		220	
Asia & Oceania	633	17.4%	527	12.2%	531	13.1%
Indonesia	550		440		450	
Papua New Guinea	39		48		45	
Others	44		39		36	
World total	3636	100.0%	4313	100.0%	4052	100.0%

Tabla 1. Producción de cacao en granos. (Fuente: ICCO <http://www.icco.org>)

1.3 Cultivo del cacao en Venezuela.

La presencia venezolana en el mercado internacional del cacao se caracteriza más por su alta calidad que por el volumen comercializado, contribuyendo actualmente con el 0,64% de la producción (un estimado de 15.000 toneladas) y aproximadamente el 0,32% de las exportaciones mundiales. Estos materiales producidos en el país son denominados como “finos de aroma” (Portillo *et al.*, 2006).

La producción nacional está distribuida en tres zonas geográficas y se concentra en algunos estados costeros, llaneros y andinos. Cada región productora del país se caracteriza por presentar condiciones propias en cuanto a tamaño de la unidad de producción, condiciones geoclimáticas, genética del material de siembra,

manejo de la plantación, tratamientos post-cosecha, etc. que le permiten producir un tipo de cacao específico (Álvarez, 2007).

La región nororiental, conformada por los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro aporta cerca del 49% a la producción de cacao seco nacional, con mayor producción de forasteros e híbridos; la zona central conformada por los estados Miranda, Aragua, Carabobo y Yaracuy que produce un 27%, fundamentalmente de Trinitarios y Criollos; y la zona suroccidental compuesta por los estados Mérida, Zulia, Táchira, Apure, Barinas y Portuguesa, que produce el 24% del cacao prevaleciendo los Criollos puros, invalorable por su calidad, especialmente el cacao Porcelana (Reyes y Capriles, 2000 ; Portillo et al., 2000).

En los últimos años la producción y la calidad del cacao venezolano se ha visto afectada por numerosos factores como son: progresiva disminución del genotipo criollo como consecuencia de hibridaciones naturales con materiales trinitarios y forasteros introducidos, causando una gran variabilidad genética y pérdida de la calidad, además de la susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades que han causado grandes pérdidas en las cosechas, aproximadamente el 20% de acuerdo con las estimaciones de los especialistas. (Moreno, 2000). A esta situación se suma, las precarias políticas de mercadeo, carencia de estrategias para premiar la eficiencia y calidad y de las tecnologías post-cosechas empleadas en las zonas de producción de cacao del país, insuficiente organización de los productores y la carencia de programas integrales de extensión. Todos estos factores han provocado una caída de la calidad y de poco estímulo hacia el productor y de la falta de una política seria y cónsona con la realidad del sector cacaotero del país. La problemática cacaotera venezolana se ha centrado en las siembras de plantaciones representadas en su mayoría, por cacaos híbridos usando los tipos Forasteros, Trinitarios y Criollos como parentales. Sin embargo, a través de unas pocas líneas de investigación se ha venido fomentando el rescate de los cacaos “Criollos” aún existentes (Álvarez, 2007).

1.4. Pudrición negra o cáncer de tronco, ramas y raíces (*Phytophthora palmivora*).

Las enfermedades de cacao han constituido una de las principales limitantes del cultivo a nivel mundial según estadísticas que cuantifican las pérdidas en toneladas métricas brindadas por varios autores (Bowers y col., 2001). Según informes anuales de la Organización Internacional del Cacao, la producción mundial es muy inestable debido entre otros factores, a las enfermedades y plagas (Campo, 2005). Estimados globales indican pérdidas de más del 30% de la producción potencial del cultivo .

En Venezuela se plantea que los problemas de producción en cacao han estado vinculados a las enfermedades, incluso desde sus inicios como cultivo económico en el Siglo XVII (Reyes y Capriles, 2000). Desde la época de la colonia, las áreas cultivadas con cacao, han sufrido los azotes del género *Phytophthora*, que han provocado la reducción y hasta la desaparición de las plantaciones.

El nombre "*Phytophthora*" proviene del griego "*Phyton*" que significa planta y "*phthora*" que significa destructor, lo que es un indicativo de que el género proporciona un suministro aparentemente inagotable de problemas a los patólogos de plantas ya que es el principal género de fitopatógenos responsable de las enfermedades más devastadoras en plantas dicotiledóneas (Irwin, 1997).

La enfermedad "pudrición parda de la mazorca del cacao" es considerada una de las más destructivas, causando la mayor pérdida en la producción mundial y afectando a todos los países productores. Su agente causal es atribuido a varias especies del género *Phytophthora* sp., siendo las más importantes *P. palmivora* distribuida por todo el mundo y *P. megakarya* que solo está presente en África. (Appiah y col., 2003).

La enfermedad comienza sobre la superficie de la mazorca con una mancha descolorida, sobre la que posteriormente se desarrolla una lesión chocolate o negra con límites bien definidos (Figura 3b); y en dos semanas, ésta se empieza a dispersar hasta alcanzar toda la superficie de la mazorca. Además, *P. palmivora* afecta el tallo del árbol produciendo un síntoma conocido como "cáncer del tronco",

que se caracteriza por el desarrollo de un área necrótica marrón en la corteza alrededor del tronco. Cuando se raspa la superficie de la corteza afectada, el tejido expuesto se torna de acuoso a pegajoso y de un color opaco gris parduzco a un color rojizo claro. En el caso de un cáncer grande, éste puede rodear en círculo el tronco, causando la muerte súbita del árbol (McMahon y Purwantara, 2004). Dado que las plántulas de cacao crecen muy rápido durante los primeros meses, las hojas jóvenes son muy susceptibles al ataque del patógeno (McMahon y Purwantara, 2004).



Figura 3. Síntomas causados por *Phytophthora palmivora*. A y c) Cáncer del tronco, b) Pudrición o Mancha parda de la mazorca, 3) (Fotos cedidas por Daynet Sosa).

Para la diseminación de la enfermedad el patógeno requiere de condiciones de alta humedad características del cultivo. Su severidad y frecuencia es muy dependiente de las condiciones ambientales sobre todo de la duración del período lluvioso y de la presencia de agua en las plantaciones bien sea por persistentes lluvias, por drenajes no funcionales o por inundaciones. En condiciones de humedad, se pueden producir alrededor de 4 millones de esporangios sobre una mazorca. Estos son diseminados por el viento, la lluvia, los insectos, roedores, los restos vegetales de la cosecha, las herramientas contaminadas de la poda y el suelo; el transporte de mazorcas

enfermas b (Reyes, 2000; Vos y col, 2003). De esta forma se inicia un nuevo ciclo de la enfermedad.

1.5 Manejo y control del patógeno.

Para el manejo y control de la enfermedad se han aplicado estrategias básicas: como el control cultural y la combinación de este con métodos químicos. El Control cultural consiste en técnicas de manejo agrícola del cultivo que le hacen más difícil al patógeno diseminarse por ejemplo: inspecciones de campo al principio de la temporada de lluvia o cada dos o tres días después de lluvia, remoción de las infecciones primarias en las mazorcas, el adecuado desecho del material infectado, cosechar regularmente las mazorcas maduras y saludables para prevenir pérdidas, mejorar la circulación del aire y reducir la humedad mediante podas controladas y un buen manejo de densidad de siembra. Para que estas técnicas sean más efectivas se requiere el uso combinado de fungicidas a base de compuestos de cobre, estas prácticas han demostrado ser eficaces en la disminución de los niveles de infección, sin embargo, el alto costo de los fungicidas y la cultura de producir cacao orgánico ha obligado a buscar nuevas estrategias de control (Surujdeo-Maharaj y col., 2004).

Por lo tanto, el uso de materiales de cacao resistentes al patógeno, es una estrategia que se ha venido aplicando a nivel mundial. Con la identificación de resistencia a *P. palmivora* en el germoplasma de cacao y el establecimiento de su naturaleza heredable, se ha implementado en diferentes países productores, la selección y el uso de genotipos resistentes en programas de mejoramiento genético. Esta metodología ha sido adoptada como el método de control más efectivo y económico a largo plazo para el control de enfermedades en plantas (Amponsah y Asare-Nyako, 1973; Lawrence, 1978).

En Venezuela, los programas de mejoramiento para la selección de materiales criollos resistentes se iniciaron en la década de los 70 con los trabajos de Reyes y Capriles, en el banco de Germoplasma de Caucagua, donde se realizaron estudios de resistencia genética a *Phytophthora* spp. y otras enfermedades (Moreno, 2000).

Actualmente, se realiza la caracterización de genotipos de las colecciones de Barlovento, Selección Ocumare del 95 y Forasteros Internacionales en cuanto a su resistencia/ susceptibilidad a una variedad nativa de *P. palmivora*, mediante inoculaciones artificiales de discos de hoja y mazorca sueltas (Parra, 2008).

1.6 Resistencia genética. Interacción planta – patógeno.

El proceso de interacción entre huésped y patógeno es un proceso dinámico en el que ambos intervienen. Cada patógeno ha evolucionado de una forma distinta en cuanto al modo en que invade el apoplasto de su planta huésped, utilizando herramientas enzimáticas o físicas. Ante esto las plantas han desarrollado mecanismos de defensa contra los posibles agentes agresores. Este sistema de defensa a manera general está constituido principalmente por dos mecanismos: constitutivos o de resistencia pasiva, e inducidos o resistencia activa (Conejero, 1997; Gómez, 2005).

La primera barrera de interacción entre las plantas y los patógenos, son los mecanismos constitutivos preexistentes en la planta huésped, estos son de naturaleza estructural y de naturaleza química. Esta primera interacción puede variar con el estado de desarrollo de la planta, el órgano y el tipo de tejido afectado, lo que concuerda con la descripción de la resistencia en cacao a la penetración de *P. palmivora*, descrita por Iwaro y col (1997b), sugiriendo que ésta es específica de la morfología de cada órgano.

Los estudios de resistencia genética a esta enfermedad se han dificultado debido a la variabilidad genética del patógeno y a la influencia de las condiciones ambientales (Van der Vossen, 1997). Existiendo evidencias de que la penetración de *Phytophthora* tiene lugar a través de los estomas (Iwaro *et al.*, 1999); y se ha descrito en cacao, la existencia de dos niveles de resistencia al patógeno. El primer nivel denominado “resistencia a la penetración” y atribuido a factores morfológicos (frecuencia y tamaño de estomas), que afectan la entrada del patógeno y determinan

el número de lesiones establecidas, siendo una resistencia específica de cada órgano vegetal; y el segundo nivel, posiblemente gobernado por factores bioquímicos, el cual se describe como “resistencia a la post-penetración”; que se relaciona con la extensión de la invasión del patógeno en el tejido huésped y por lo tanto determinada por el tamaño de la lesión (Iwano y col., 1997a;b;c).

Una vez el patógeno atraviesa esta primera barrera, inicia su colonización penetrando el apoplasto vegetal y secretando una serie de efectores que interactúan con los receptores de la pared celular hospedante. Cuando la planta reconoce los efectores, producidos por los genes de avirulencia (Avr) del patógeno, responde con una batería de reacciones de defensa inicialmente asociadas a la pared y al mismo tiempo activa la reprogramación celular desencadenando una serie de cambios bioquímicos que conllevan a la muerte de las células atacadas, lo que es denominado reacción hipersensible (HR). Su estrategia es generar un medio inapropiado para el mantenimiento del patógeno con la consiguiente restricción de la multiplicación y propagación de la enfermedad. A nivel macroscópico la planta se ve salpicada de manchas necróticas cuyo tamaño depende del grado de resistencia. Esta acción concuerda con la teoría de la resistencia a la postpenetración descrita por Iwano (1997a;1997)

Conjuntamente con la reacción hipersensible, en el tejido que rodea las células necrosadas se inicia la acumulación de fitoalexinas, acompañada del fortalecimiento físico de la pared celular (producción de callo y ligninas) y la producción de un conjunto de proteínas componentes de la propia respuesta relacionadas con la patogénesis denominada PRs. Estos mecanismos en conjunto se conocen como Resistencia Local Adquirida (LAR). Un mecanismo similar también se activa en tejidos alejados al sitio de infección, por medio de una señal o mensaje que se propaga por el sistema circulatorio de la planta y genera una especie de memoria que inmuniza la planta contra infecciones posteriores de patógenos homólogos. A esto se le conoce como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR).

El estudio de la interacción planta-patógeno ha sido abordado teniendo en cuenta muchos aspectos como la interacción morfológica, fisiológica y bioquímica, y más recientemente con aproximaciones desde áreas como la genómica, transcriptómica y proteómica. Sin embargo, los resultados no siempre aportan suficiente información en relación a los productos finales que actúan en respuesta a la defensa de la planta; sugiriéndose que este problema debe orientarse hacia el estudio del metabolismo, el cual es el resultado final de la dinámica bioquímica influenciada por la expresión genética (López-Gresa, 2010).

1.7 Espectrofotometría (Skoog, 2001).

1.7.1 Principios de espectroscopia. Espectro electromagnético

Los métodos espectroscópicos se encuentran entre las técnicas analíticas más conocidas y usadas. La espectroscopia es una ciencia que estudia las interacciones que suceden entre la radiación y la materia. Los métodos espectroscópicos de análisis miden la cantidad de radiación producida o absorbida por el analito al interactuar con la radiación. Estos métodos se clasifican según la región del espectro electromagnético usado para hacer la medición, tal como se ilustra en la Tabla 2.

La absorción y fluorescencia de radiación ultravioleta y visible son de amplia aplicación cuantitativa en distintas áreas de la química, la física y la biología. Por el contrario, la absorción infrarroja se utiliza principalmente para identificar grupos funcionales en las moléculas, mientras que la resonancia magnética nuclear (RMN), se usa principalmente para identificar estructuras moleculares.

Banda	Longitud de onda	Frecuencia (Hz)	Energía (J/mol)	Cambio Cuántico
Rayos γ	< 100 pm	$>3 \times 10^{18}$	$> 10^9$	Configuración nuclear
Rayos X	100 pm-10 nm	$>3 \times 10^{16}$	$> 10^7$	Distribución electrónica (transiciones de electrones entre niveles energéticos)
UV	180-380 nm	$>3 \times 10^{14}$	$> 10^5$	
Visible	380-780 nm			
IR cercano	0,78-2,5 μm	$>3 \times 10^{12}$	$> 10^3$	Transiciones entre estados vibracionales y rotacionales de los enlaces
IR medio	2,5-50 μm			
Microondas	100 μm -1 cm	$>3 \times 10^{10}$	> 10	Orientación molecular
ERE	1 cm-100 cm	$>3 \times 10^8$	$> 10^{-1}$	Cambios en la alineación del espín del núcleo sometido a un campo magnético externo
RMN	100 cm-10 m	$>3 \times 10^6$	$< 10^{-3}$	

Tabla 2. Regiones del espectro electromagnético. Cambios cuánticos que ocasionan en la materia (Skoog, 2001).

1.7.2. Propiedades onda partícula de la luz

La radiación electromagnética es una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, que se propagan a través del espacio transportando energía de un lugar a otro sin ser necesario un medio material para propagarse. A la radiación electromagnética de la región UV/VIS suele llamársele luz. El modelo de ondas no explica satisfactoriamente los procesos de absorción y emisión de radiación, para esto se considera la radiación electromagnética como partículas, fotones o cuantos. Las teorías de la radiación como partícula y como onda se complementan entre sí, ya que la energía de un fotón es proporcional a la frecuencia de la onda electromagnética.

Los fenómenos de reflexión, interferencia, refracción y difracción se pueden entender al visualizar la radiación electromagnética como oscilaciones sinusoidales de campos magnéticos y eléctricos perpendiculares y oscilan a su vez en sentido perpendicular a la dirección en que avanzan. La amplitud A de la onda sinusoidal se define como la longitud del vector del campo eléctrico en el punto máximo de la onda. La longitud de onda λ es la distancia lineal entre dos puntos sucesivos

máximos o mínimos y se ve afectada por el medio que atraviesa la radiación. El periodo p es el tiempo necesario para recorrer la distancia λ . La frecuencia ν es el número de oscilaciones del vector del campo por unidad de tiempo, igual a $1/p$. Esta es constante independientemente del medio que atraviesa mientras que la velocidad v con que atraviesa el medio depende tanto de la naturaleza del mismo como de la frecuencia, y es igual al producto de la frecuencia por la longitud de onda. En la Figura 4 se ilustran parte de los conceptos definidos.

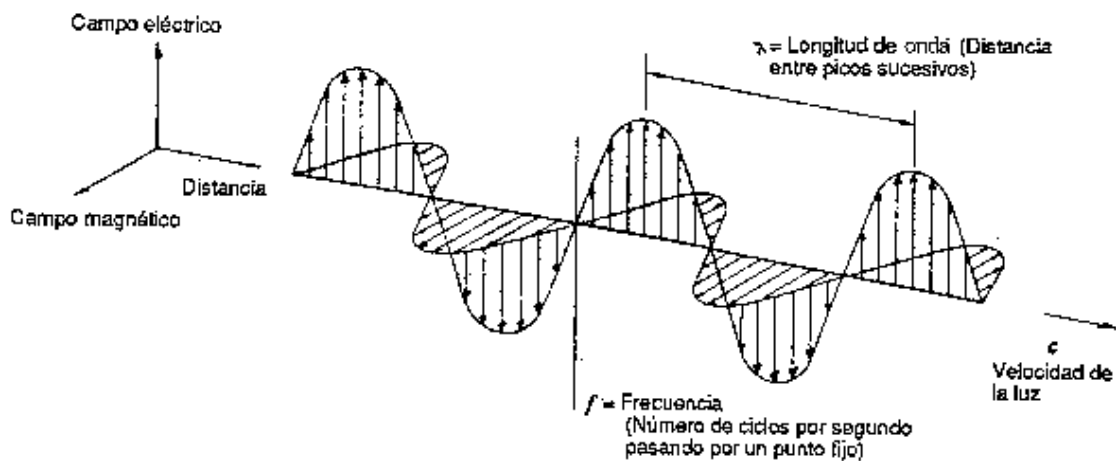


Figura 4. Radiación electromagnética. (FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations)

La luz viaja en el vacío a su máxima velocidad, estimada en $2,99792 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$. Esta disminuye en el aire sólo un 0,03 %, por lo que en el aire o en el vacío el valor se redondea a $3,00 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ y se representa con el símbolo c . La velocidad de la luz en otro medio es menor debido a la interacción del campo electromagnético con los electrones de las moléculas del medio.

El número de onda $\bar{\nu}$ se define como el número de ondas por centímetro y es igual a $1/\lambda$. Para otras interacciones de la radiación con la materia es conveniente considerar la luz como fotones o cuantos, relacionando su energía con su longitud

de onda, frecuencia y número de onda mediante la ecuación (i), donde h es la constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J·s).

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu} \quad (i)$$

1.7.3. Lambert y Beer, transmitancia y absorbancia

La ley de Lambert y Beer, también conocida simplemente como la ley de Beer o ley de absorción, relaciona cuantitativamente la intensidad de la radiación con la concentración de las moléculas que la absorben y la distancia que recorre el haz de luz en el medio absorbente. Cuando la luz atraviesa una solución con un analito, la intensidad de la radiación disminuye debido a las interacciones entre los fotones y las partículas absorbentes. En la Figura 5 se muestra como la intensidad del rayo disminuye de I_0 a I_1 al atravesar una celda de longitud l que contiene una solución de concentración c de un analito cuyo coeficiente de absorción es ϵ (abreviado también como α).

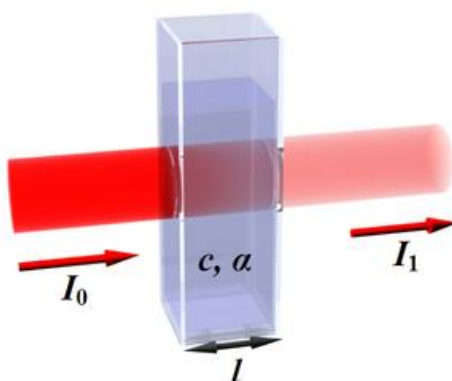


Figura 5. Absorción de un haz de luz por una solución absorbente. (R., Carlos, 2006)

La transmitancia T de la solución es la fracción de radiación incidente que transmite la solución (Ecuación ii), suele expresarse en porcentaje (Ecuación iii). La

absorbancia A de una solución se relaciona con la transmitancia de forma logarítmica, al aumentar la absorbancia disminuye la transmitancia (ecuación iv).

$$T = \frac{I_x}{I_0} \quad (\text{ii})$$

$$\% T = \frac{I_x}{I_0} \times 100 \% \quad (\text{iii})$$

$$A = -\log \frac{I_x}{I_0} \quad (\text{iv})$$

La Ecuación (v) corresponde a la expresión matemática de la Ley de Beer. De esta ecuación se observa que a partir de la medición de A es posible calcular la concentración del analito, si se conocen l y ϵ . Comúnmente, se obtiene una curva de calibración a partir de soluciones de diferente concentración. La pendiente de la recta que se obtiene al graficar A versus c corresponde a $l \cdot \epsilon$, y constituye el factor de respuesta que permite luego calcular c de una solución problema. La relación entre A y c solamente es lineal en un intervalo pequeño de concentraciones. Para fines de análisis cuantitativo es necesario verificar que las concentraciones estén dentro del rango lineal de respuesta.

$$A = \epsilon lc \quad (\text{v})$$

1.8 Reacciones colorimétricas.

Las reacciones colorimétricas son reacciones que generan productos con un color característico a partir de algún compuesto de interés no coloreado. Pueden ser usadas para fines cualitativos así como cuantitativos. Cualitativamente, al producirse el color esperado se sabe de la presencia de algún tipo de compuesto (grupo funcional) y según la intensidad del color se infiere si hay mayor o menor cantidad de este. Para el análisis cuantitativo se mide la absorbancia de una solución del complejo coloreado formado y se compara con una curva de calibración obtenida a

partir de soluciones de concentración conocida de un compuesto patrón para calcular la concentración del compuesto de interés.

1.8.1 Determinación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu (F-C).

El método Folin-Ciocalteu usado actualmente fue propuesto por Singleton y Rossi en el año 1965, se basa en la oxidación de fenoles en solución alcalina con el reactivo heteropolianiónico amarillo fosfomolibdato y fosfotungstato ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-3\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ y $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-14\text{WO}_3-4\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$).

El mecanismo básico de éste método es una reacción Redox, ya que el reactivo de Folin es una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) que se reduce, por oxidación de los fenoles presentes en la muestra, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno (Figura 6) que presentan un máximo de absorción a 765nm y se cuantifica por espectrofotometría en base a una curva patrón de un ácido de referencia (clorogénico), siendo la coloración proporcional al número de grupos hidroxilos de la molécula.

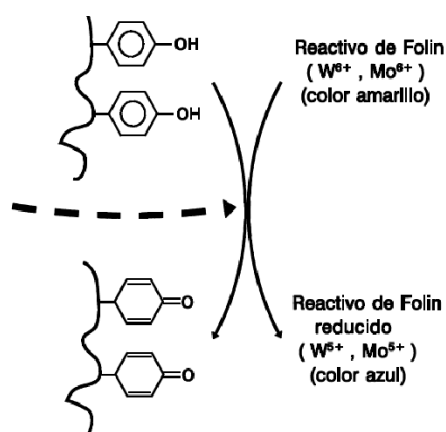


Figura 6. Oxidación de los grupos fenoles por el reactivo Folin-Ciocalteu.

<http://dc148.4shared.com/doc/NdFeuoyJ/preview.html>

Singleton y Rossi (1965), junto con otros autores unos años más tarde, estudiaron las variaciones que afectan la reproducibilidad del método, donde se incluyen las concentraciones iniciales y finales de carbonato de sodio, la secuencia de adición de los reactivos, el intervalo entre estas adiciones, el tiempo y temperatura de incubación de la mezcla de reacción, la longitud de onda específica a la que se determina la absorbancia, así como el volumen de mezcla final; sin dejar de mencionar la concentración de alcohol en la mezcla final. Por otra parte, los mismos autores afirman que con el fin de obtener resultados reproducibles, es importante mezclar la muestra y el reactivo F-C bajo condiciones diluidas, y añadir una solución de carbonato al final.

Aunque se trata de un método simple, preciso y sensible, es un procedimiento de baja reproducibilidad en algunos casos, es por ello que se deben cuidar cuidadosamente todos los parámetros experimentales para obtener resultados reproducibles.

1.8.2 Determinación de carbohidratos.

Una de las formas para la determinación de azúcares solubles (Carbohidratos) en extracto foliar es el método de la Antrona- H_2SO_4 modificado por Castrillo (1999). Este método consiste en romper los enlaces glicosídicos de la sacarosa mediante la adición de ácido sulfúrico para que los monosacáridos se unan a la antrona, generando un color verde-azulado, el cual puede medirse a una absorbancia de 630 nm. En la Figura 7 se presenta el esquema correspondiente a esta reacción.

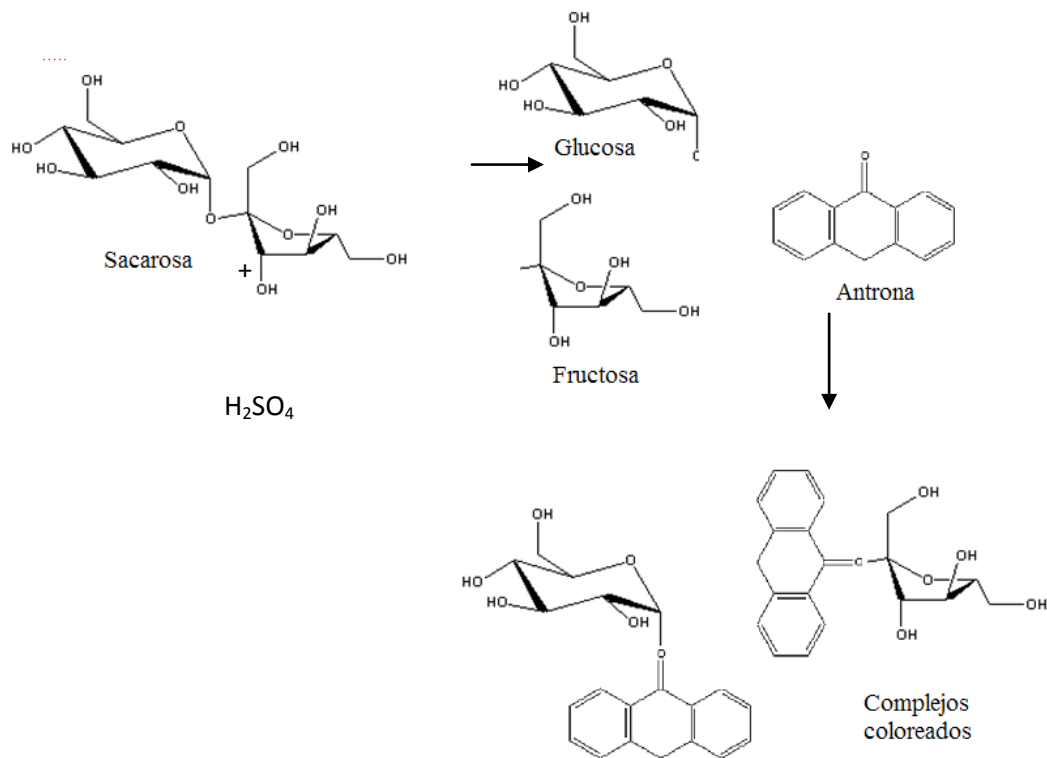


Figura 7. Unión de la antrona a los monosacáridos de fructosa y glucosa. (Fuente: Beatriz Pernía, IDEA, comunicación personal).

En un estudio llevado por Yemm y Willis (1954), se determinó que la relación entre la absorbancia y la concentración de azúcares no era estrictamente lineal, siendo necesario usar curvas de calibración particulares para cada azúcar. También encontraron que la Antrona reacciona con hexosas, pentosas y carbohidratos que se pueden encontrar en el material biológico.

Otro método muy común para la determinación de carbohidratos es el método de fenol-sulfúrico o método Dubois (1956), el cual se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de

compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol. Este método es fácil, eficaz y rápido.

Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos.

La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón. (Nielsen, 1998).

1.8.3 Determinación de aminoácidos.

Hay una amplia gama de métodos colorimétricos que permiten la determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos. Aunque son métodos muy generales, algunos de ellos permiten discriminar entre diferentes tipos de estos compuestos. Así, hay métodos de determinación de aminoácidos con el grupo amino libre (método de la ninhidrina), de los que poseen un grupo indólico (triptófano; reacción con ácido glicoxílico), un anillo fenólico (tirosina; reacción de Millon), de aminoácidos azufrados (cisteína; reacción con nitroprusiato sódico). En todos los métodos, el aminoácido reacciona con otro compuesto formando derivados coloreados que se pueden determinar cuantitativamente por espectroscopia visible.

De todos los métodos reseñados, el más general y utilizado es el de la reacción con la ninhidrina. La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) reacciona con aminoácidos que tengan el grupo amino libre, dando lugar a la formación de amoniaco y anhídrido carbónico, con reducción del reactivo (ninhidrina) a hidrindantina (Figura 8). La hidrindantina reacciona a su vez con el amoniaco y otra molécula de ninhidrina para dar un compuesto de adición doble que presenta una coloración azul-púrpura, con la excepción de la prolina que da una coloración amarillenta (recordar que en la prolina el grupo amino está sustituido (Figura 9)). El derivado coloreado presenta máximo de absorción en torno a 570 nm. La técnica es muy sensible, por lo que es ideal para detectar concentraciones bajas de aminoácidos, como por ejemplo la Prolina, que es

un aminoácido que se encuentra en bajas cantidades en las plantas cuando éstas crecen en condiciones óptimas.

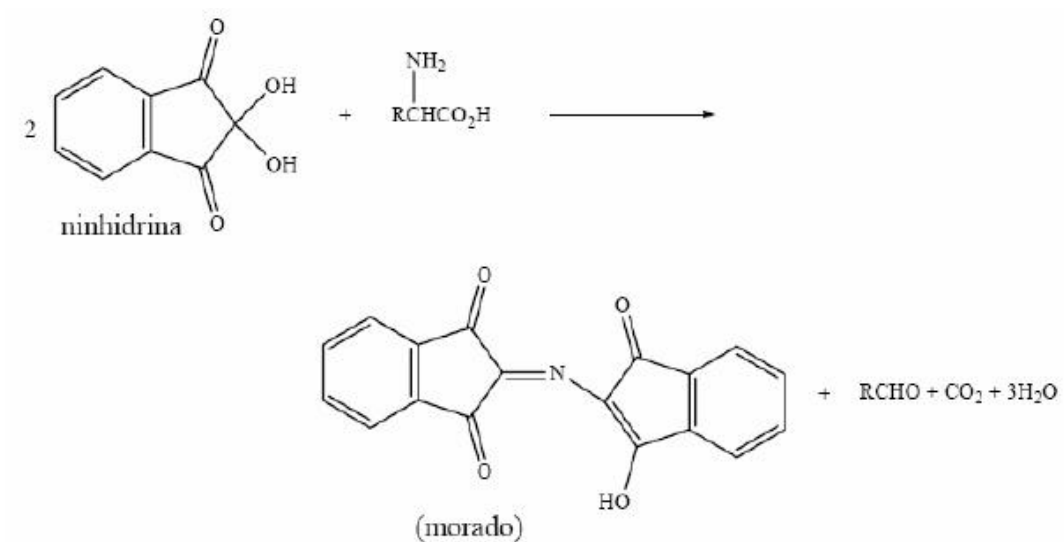


Figura 8. Reacción de aminoácidos con la ninhidrina. (Fuente: Jorrín, J. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina.)

En condiciones de estrés, se ha encontrado que el contenido de prolina aumenta para actuar como agente osmótico (Delauney & Verma 1993; Kavi Kishor et al. 1995; Yoshiba et al. 1997), protegiendo a la planta de la deshidratación. Muchas especies de plantas acumulan prolina libre en respuesta a la salinidad, la sequía y el frío. De igual manera actúa como estabilizador de proteínas y membranas, inductor de genes relacionados a estrés osmótico, fuente de carbono y nitrógeno fácilmente disponible en la rehidratación celular, fuente de equivalentes de reducción (del catabolismo de prolina) para sostener la fosforilación oxidativa y la generación de ATP durante la recuperación del estrés (Hare & Cress 1997; Hare et al., 1998).

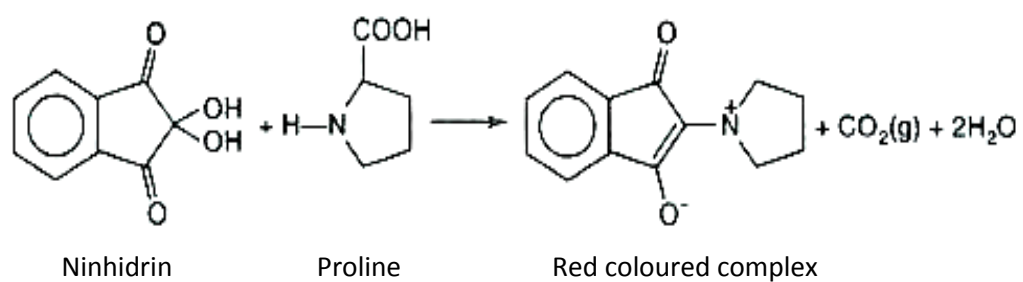


Figura 9. Reacción de la prolina con la ninhidrina. (Biblioteca virtual de la Universidad de Chile, [repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas](#))

2. ANTECEDENTES

El desarrollo de una enfermedad puede inducir cambios en el contenido de carbohidratos, fenoles y aminoácidos de las plantas hospedantes, así como alteraciones metabólicas que pueden favorecer o inhibir el desarrollo de los patógenos. Por lo tanto, existe una participación de estos compuestos en los mecanismos de defensa de la planta contra enfermedades y plagas. De hecho, las rutas metabólicas de estas sustancias están interconectadas: las rutas de los fenoles y los aminoácidos usan productos del metabolismo de los carbohidratos como precursores. También se sabe que durante la interacción patógeno/ hospedante, los aminoácidos pueden actuar como sustrato para el patógeno o pueden tener un efecto fungistático a través de su participación en la síntesis de proteínas específicas relacionadas con la infección (Ndoumou et al., 1996). Existiendo en cacao, una considerable variabilidad genética entre genotipos, en función de su contenido en carbohidratos, fenoles, nitrógeno y proteína (Ndoumou et al., 1996; Nyadanu et al., 2012).

El rol de los compuestos fenólicos en la defensa de las plantas se encuentra documentado, describiéndose que los mismos se acumulan a diferentes niveles en los tejidos infectados como respuesta a la invasión de un patógeno (Boudjeko et al., 2007). Omokolo y Boudjeko (2005) describieron a los fenoles como factores de resistencia de cacao a la infección por diferentes especies de *Phytophthora*. Omokolo y col. (2002) inocularon mazorcas de cacao con *Phytophthora megakarya* en clones susceptibles, medianamente susceptibles y resistentes a este patógeno para evaluar el cambio en los niveles de aminoácidos y carbohidratos ante la presencia del hongo y compararlos con los niveles expresados en mazorcas sanas. En el análisis de los extractos se observaron concentraciones de aminoácidos mayores para los clones menos susceptibles que para los clones susceptibles. Se obtuvo una disminución en la cantidad de carbohidratos en los clones altamente susceptibles la cual se correlacionó con la alta velocidad de evolución del área necrótica, adjudicando estos resultados al consumo de los carbohidratos por el hongo para su crecimiento y desarrollo.

De igual manera, Djocgoue y col., en el 2007 evaluaron la resistencia de las plantas de cacao contra el patógeno *Phytophthora megakarya*, así como las lesiones necróticas, el contenido fenólico y la alteración cualitativa de los compuestos fenólicos, utilizando dos clones de *T. cacao* trinitarios y sus híbridos, derivados de la cría de la crucea recíproca entre estos dos clones padres después de inoculación; encontrándose que el análisis de fenoles totales y tamaño de la lesión no deriva de la maternidad y que el análisis cualitativo de fenoles en los clones y sus híbridos mostró una modificación de los perfiles de compuestos fenólicos, principalmente apigenina relativa y derivados de luteolina, debido a la inoculación. Dando como resultado que esos compuestos, junto con otros que no pudieron ser identificados pudieran tener un papel en la reacción y mecanismo de defensa de cacao contra *P. megakarya*.

En el 2003, Nojosa y col., estudiaron los niveles de fenoles solubles totales y la actividad de las enzimas oxidativas (polifenol oxidasa y peroxidasa) en clones de cacao resistentes y susceptibles a *Crinipellis perniciososa*. Encontraron que los niveles de fenoles solubles y la actividad de las enzimas oxidativas fueron inversamente correlacionados en la mayoría de los clones estudiados, lo que sugiere una posible inhibición de las enzimas oxidativas por fenoles. Así mismo, en el análisis determinaron que el nivel de fenoles en clones estudiados en los tejidos sanos de las hojas de *T. cacao* con resistencia a *C. perniciososa* fue en general más alto que en clones susceptibles, lo que puede contribuir a la defensa contra el patógeno.

Existe poca información publicada acerca de la participación de los azúcares en las respuestas de defensa de las plantas, ya sea para prevenir o limitar la invasión del patógeno. Por lo tanto, el papel de estos compuestos en la resistencia no está bien definido; aún cuando existen algunas evidencias directas e indirectas de que participa en la resistencia a patógenos fúngicos (Bugbee, 1973). Además, los carbohidratos (manitol) que son osmoprotectores, se acumulan en el citoplasma en altas concentraciones cuando el potencial hídrico es bajo y pueden afectar al patógeno al requerir estos un potencial hídrico elevado para su desarrollo óptimo.

También las hexosas (sacarosa) inducen la expresión de muchos genes, incluyendo genes de resistencia que determinan la producción de peroxidasas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Djocgoue et al., 2011).

Estudios de Djocgoue et al. (2011) demostraron que en las mazorcas de cacao, existe una acumulación de aminoácidos y carbohidratos después de la infección con *P. megakarya*, y esta acumulación explicaría, en parte, las diferencias observadas durante el desarrollo de la enfermedad entre los clones de cacao. Nyadanu et al., (2012) evaluaron 12 genotipos de cacao a *P. megakarya* con el objetivo de identificar características bioquímicas asociadas a la resistencia a estos patógenos. Determinaron los niveles de nitrógeno, proteína, azúcares solubles e insolubles, polifenoles totales, flavonoides, taninos y ligninas en hojas y mazorcas de cacao antes y después de la inoculación con *Phytophthora*, concluyendo estos autores, que los niveles de estos compuestos se incrementaron después de la inoculación con *P. megakarya*, existiendo entonces una significativa y negativa correlación entre los fenoles totales, los azúcares y las proteínas y la resistencia al patógeno.

Considerando que i) muchos autores han mostrado que existe una correlación entre la resistencia de *Theobroma cacao* L contra *Phytophthora* sp y el área necrosada de hojas y tallos infectados artificialmente con *P. megakarya*. (Alemano et al. 2003, Djocgoué et al. 2006; Paulin et al. 2008; Wakam et al., 2011) y ii) está suficientemente documentado el uso por parte de las plantas de compuestos químicos como mecanismo de defensa natural; es de vital importancia dilucidar la relación que existe entre ciertos compuestos químicos y la resistencia a *P. palmivora* de genotipos utilizados como progenitores en Venezuela.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Determinar el efecto de la infección de *Phytophthora palmivora* sobre el contenido de compuestos fenólicos, ligninas, aminoácidos y carbohidratos en dos clones (resistente y susceptible) de *Theobroma cacao L.*

3.2 Objetivos Específicos:

1. Determinar el contenido total de fenoles presentes en dos clones de *Theobroma cacao L.* (resistente y susceptible), infectados con *Phytophthora palmivora*.
2. Determinar el contenido de ligninas presentes en dos clones de *Theobroma cacao L.* (resistente y susceptible), infectados con *Phytophthora palmivora*.
3. Determinar el contenido de aminoácidos y carbohidratos presentes en dos clones de *Theobroma cacao L.* (resistente y susceptible), infectados con *Phytophthora palmivora*.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Diseño experimental.

Se recolectaron dos genotipos de cacao (clones Scavina 6 (SCA-6) y Playa Alta 2 (PA-2), considerados como resistente y susceptible a *Phytophthora palmivora* respectivamente), del banco de Germoplasma de Cacao del INIA Miranda (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias), en el campo experimental Padrón, Parroquia Ribas, Municipio Acevedo, sector Tapipa. La recolección se realizó a las 6:00 am para asegurar que las plantas tuviesen los estomas abiertos y llevar a cabo la inoculación del patógeno. La metodología experimental general se muestra en la Figura 10.

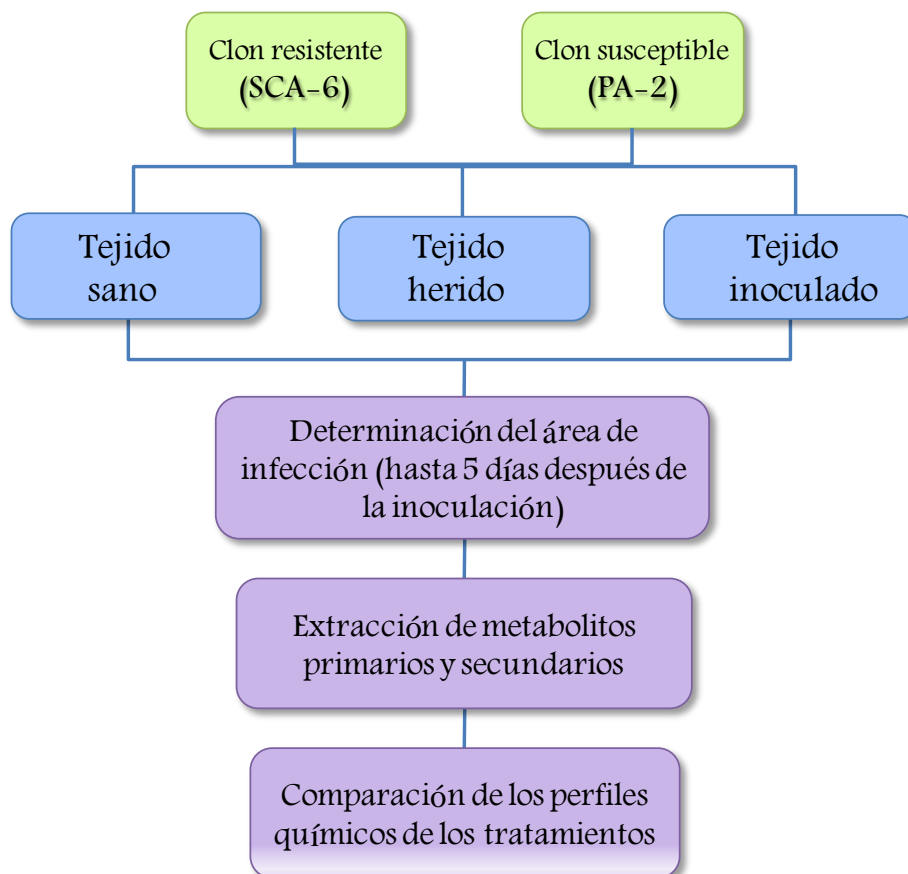


Figura 10. Diagrama de la metodología experimental.

Se manejaron treinta (30) hojas por clon o genotipo, extraídas de la misma planta, a las que se aplicaron los siguientes tratamientos: hoja intacta, hoja a la cual se le hizo una punción con agua y hoja a la cual se le hizo una punción con inóculo (*Phytophthora palmivora*). A partir del momento de la inoculación, las muestras se introdujeron en bandejas plásticas con alto porcentaje de humedad, selladas herméticamente y almacenadas bajo condiciones de oscuridad durante 5 días. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas para las determinaciones químicas (contenido de compuestos fenólicos solubles y ligados a la pared, ligninas, carbohidratos totales y aminoácidos). Transcurridos los cinco días se realizó el análisis cualitativo del avance de la inoculación y se clasificó al clon PA-2 como susceptible a *Phytophthora sp.* y al clon SCA-6 como resistente. Se extrajeron los compuestos de interés de cada una de las muestras vegetales y se utilizaron reacciones colorimétricas para el análisis de fenoles, ligninas, carbohidratos y aminoácidos. En base a conocimientos previos y a los resultados obtenidos, se correlacionó la resistencia/susceptibilidad de las variedades de cacao con la variación del contenido de los compuestos estudiados frente a las condiciones de estrés del experimento.

4.2 Materiales y reactivos:

- Etanol al 70 y 80%.
- Metanol puro.
- NaOH 2M.
- HCl 2M.
- Ácido Clorogénico.
- Solución de Fenol al 5%.
- Ácido sulfúrico.
- Ácido fosfórico 6M.
- Solución de Ninhidrina ácida.
- Ácido acético.

- Tolueno
- Tubos de plástico de 1,5 mL.
- Cápsulas de petri.
- Tijera.
- Agujas.
- Bandejas plásticas.
- Papel parafilm.
- Discos de agar zanahoria.

4.3. Equipos:

- Mortero.
- Agitador Vortex.
- Centrifugadora eppendorf.
- Incubadora eppendorf.
- Balanza.
- Plancha de calentamiento.
- Espectrofotómetro Perkin Elmer Lamda 25 UV/Visible Celdas de Cuarzo de 2ml.





4.4. Métodos:

4.4.1 Inoculación.

De los clones SCA-6 (Scavina 6) y PA-2 (Playa Alta 2) se recolectaron treinta (30) hojas de las cuales se tuvieron diez hojas testigo, diez hojas punzadas más agua y diez hojas inoculadas con *Phytophthora palmivora* cepa C149 (Elomir), obtenida del fruto de cacao de un árbol enfermo de la Hacienda de cacao La Ceiba de Barlovento, Estado Miranda y extraída como una mancha parda característica del patógeno. El inóculo fue preparado en el laboratorio de Fitopatología molecular del IDEA por la Lic. María Istúriz.

Para inocular las hojas, se limpiaron las mismas con agua corriente y agua destilada. Se realizaron 5 punciones a la hoja, en la mitad de la misma con una aguja y se colocó un disco de agar zanahoria (5mm de diámetro) con el patógeno de 10 días de edad (4 días en oscuridad total y 6 días en luz blanca a 28°C). Las hojas punzadas sin inóculo se penetraron con una aguja y se les colocaron 15µL de agua destilada. Luego de la inoculación todas las muestras se introdujeron en bandejas plásticas con alto porcentaje de humedad colocando, en el fondo de la bandeja, una lamina de goma espuma totalmente mojada y encima de ella papel absorbente, sobre éste, las hojas de cacao. Se colocó la tapa de la bandeja y se sellaron los bordes con papel parafilm; finalmente, se almacenaron bajo condiciones de oscuridad a 25°C para favorecer el proceso de inoculación durante 5 días. Luego de los 5 días se realizó el análisis cualitativo del avance de la inoculación y se hizo la clasificación en variedad susceptible y resistente a *Phytophthora palmivora* según la escala descrita por Dercy Parra (INIA-Miranda, comunicación personal) (Tabla 3).

Se tomaron muestras a los tiempos 0, 1 (24hrs), 2 (48hrs), 3 (72hrs), 4(96hrs) y 5 (120hrs) y se colocaron dos hojas de cada tratamiento en papel aluminio para luego almacenarlas a -80°C hasta el momento de las determinaciones de los compuestos de interés.

TIEMPO	LECTURA
0	 Sin síntomas, (altamente resistente), el testigo sin daño también se ubica en este punto.
1	 Puntos de penetración marrón oscuro, (resistente).
2	 Puntos de penetración pequeños con algunas conexiones entre ellos, (resistente).
3	 Manchas marrones coalescentes (intermedio- tolerante).



4		Lesiones grandes coalescentes con algunos puntos claros (susceptible).
5		Lesión marrón oscuro extendida grande uniforme (susceptible).

Tabla 3. Escala de evaluación de la reacción de la inoculación de discos de hojas con *Phytophthora palmivora*. (Dercy Parra, INIA-Miranda, comunicación personal).

4.4.2 Compuestos fenólicos.

4.4.2.1 Extracción de fenoles.

Los compuestos fenólicos se extrajeron siguiendo el procedimiento de Gurr et al., (1992). Se pesaron aproximadamente 100mg del tejido vegetal previamente macerado y se colocaron en un tubo de plástico de 1,5mL. Se adicionaron 500µL de metanol, y se agitaron en el vórtex. Luego, se centrifugó la suspensión durante 10 min a 15000 rpm y se colectó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento dos veces más utilizando 250 µL de metanol. Se unieron los tres sobrenadantes en un tubo limpio para la cuantificación de los compuestos fenólicos solubles en la planta.

El pellet (precipitado) se disolvió en NaOH 2M (250µL) y se incubó durante 16 horas a 70 °C. Finalmente, se neutralizó el sobrenadante con HCl 2M (250µL) y se utilizó para la cuantificación de los compuestos fenólicos ligados a la pared celular. El pellet final se utilizó para la determinación del contenido de ligninas.

4.4.2.2 Cuantificación de fenoles.

Para la cuantificación total de los fenoles se utilizó el procedimiento de Hoagland (1990), modificado. Se tomaron 10µL del extracto vegetal, se le adicionaron 990µL de agua destilada y 100µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejó reposar durante 5 minutos, luego se le agregaron 600µL de una solución de NaOH 1M saturada con Na₂CO₃. La mezcla se incubó por una hora a 25°C para permitir el desarrollo del

color. Se midieron las absorbancias en el a 725nm y se calculó el contenido de fenoles en la muestra en función de la curva de calibración utilizando ácido clorogénico como patrón. Se realizó el procedimiento para los fenoles solubles y los fenoles ligados a la pared de una misma muestra y se obtuvieron los fenoles totales por la suma de ambos valores.

4.4.3 Aminoácidos y carbohidratos.

4.4.3.1 Extracción de aminoácidos y carbohidratos.

Se pesaron aproximadamente 250mg de tejido vegetal y se colocaron en un tubo plástico de 15ml. Se añadieron 2,5ml de etanol al 80%, se agitó la suspensión en el vórtex y luego se centrifugó a 4000rpm durante 8 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo plástico de 15ml. Se repitió el procedimiento dos veces más y se unieron los tres sobrenadantes.

4.4.3.2 Determinación de carbohidratos.

La determinación del contenido de carbohidratos se realizó basándose en el método de Dubois y col., 1956. Se tomaron 50 μ L del extracto vegetal y se dejó evaporar el etanol presente en el extracto, luego se agregaron 0,5mL de solución fenol al 5% y 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado. La solución se agitó en el vortex y se dejó reposar de 10 a 15 min. Se leyó la absorbancia del complejo formado a 492 nm. La concentración total se midió con respecto a una curva estándar preparando patrones de glucosa de 10 a 100ppm los ensayos fueron realizados por triplicado.

4.4.3.3 Cuantificación de aminoácidos (prolina libre).

Para la cuantificación de aminoácidos (prolina libre) se tomaron 500 μ L del extracto descrito anteriormente para los carbohidratos totales, se adicionaron 500 μ L de

reactivo de ninhidrina (ninhidrina anhidra, ácido acético glacial y ácido fosfórico 6M) y 500 μ L de HAc glacial. Se agitó y se puso en un baño maría a 100°C por 1h. Se agregó 1 mL de tolueno y se agitó. Se leyó la absorbancia de la fase orgánica a 520 nm utilizando el tolueno como blanco. El contenido de prolina libre se expresó en μ g/g de masa fresca referido a una curva patrón de prolina.

4.4.4 Ligninas.

4.4.4.1 Extracción de ligninas.

Se tomó cada residuo proveniente de la extracción de fenoles ligados a la pared y se transfirió a tubos de plástico tipo Falcon. Luego, se adicionó 7mL de agua destilada, se agitó en un vórtex y se ajustó el a pH 7,5 (con NaOH/HCl) hasta un volumen de 10mL para posteriormente, filtrar.

4.4.4.2 Determinación de ligninas.

Se tomaron 2 alícuotas de 1mL de cada extracto básico a la primera se le adicionó 4mL de NaOH 0.1M (pH 12) y a la segunda 4mL de buffer fosfato (pH 7). Se determinó la absorbancia a 280nm de cada extracto a pH 12 contra los de pH 7 (blanco) a 280nm. Y se preparó una curva de calibración con lignina comercial para expresar los resultados en μ g de lignina /mg de material de partida.

4.4.5 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianzas (ANOVA) y un análisis de comparación de medias, prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC). El programa estadístico utilizado fue el INFOSTAT 2011 (Di Rienzo y col., 2008).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La interacción planta-patógeno es una de las relaciones más interesantes que se pueden establecer entre las plantas y los microorganismos patógenos que las afectan; puesto que a pesar de su interacción con gran número de ellos en condiciones naturales, las mismas permanecen sanas debido entre otras cosas, a varios mecanismos de defensa. El conocimiento de las bases (morfológicas, fisiológicas, químicas y genéticas) de esta interacción, es imprescindible a la hora de desarrollar alternativas para el control de las enfermedades de las plantas. La mayoría de los estudios realizados en este sentido, se centran en las respuestas fisiológicas y genéticas, siendo escasos todavía los estudios que abordan este conocimiento desde el punto de vista de la afectación al perfil químico de la planta.

Un punto importante a resaltar es que este estudio fue realizado con hojas aisladas y no con la planta completa, reduciendo de esta manera la capacidad de respuesta, tratando a la hoja como un compartimento aislado, sin tener el respaldo de toda la planta para defenderse de la infección. Por la falta de suministro de nutrientes y/o sustancias que ayuden a la defensa, la respuesta al patógeno es limitada, y se acelera el envejecimiento y muerte de la hoja, Todos estos factores pueden influir en la expresión de los metabolitos estudiados. Se recomienda hacer un estudio paralelo con las hojas ligadas a la planta para verificar si los resultados obtenidos en la hoja aislada son comparables. No obstante, este tipo de estudio puede presentar foco de infecciones en campo por lo cual debe realizarse en condiciones estrictamente controladas, no recomendándose para lugares donde la incidencia del patógeno es elevada. También hay que mencionar que los estudios encontrados en la literatura analizan los contenidos de fenoles, carbohidratos y aminoácidos ante la invasión por *Phytophthora* en las mazorcas; por lo que habría que correlacionar estos estudios en mazorcas inoculadas con los estudios de hojas inoculadas.

Actualmente, la inoculación de discos de hojas en el laboratorio para la selección precoz de material más resistente a *Phytophthora* spp., está incluida en la mayoría de los programas de mejora genética del cacao y otras plantas (Tahi et al., 2007;

Brooks, 2008). Estudios realizados por Nayadanu *et al.* (2013) muestran que el contenido de compuestos químicos en la hoja podría ser utilizado para predecir el contenido bioquímico en la mazorca.

Sin embargo, la aplicación de estos métodos para acelerar los programas de selección del árbol del cacao se encuentra en discusión; considerando que factores como i) La hora de la recogida de las hojas en el campo (mañana y tarde), ii) El grado de exposición al sol de las hojas en el interior de la copa (hojas en sombra, en semisombra y expuestas a la luz solar), iii) La edad de las hojas (cuatro estadios que oscilan entre 3 semanas y 6 meses de edad), iv) La duración de la incubación (observaciones de síntomas en el 3º, 5º y 7º día después de la inoculación), pueden afectar significativamente el nivel de resistencia foliar, disminuyendo la correlación con la resistencia en el campo (Tahi *et al.*, 2007) y v) La susceptibilidad de las hojas de cacao a *Phytophthora palmivora* sufre muchas variaciones que no se dirigen necesariamente hacia la misma dirección que las observadas en las mazorcas (Tarjot, 1972).

Es importante destacar que los altos valores de desviación estándar presentes en algunos resultados son debido a la dispersión de datos, lo que se traduce en una baja precisión. A pesar de esto, los resultados se podrían considerar confiables debido a que se mantiene la tendencia esperada. En este sentido, una posible explicación es que los errores sistemáticos de todo el proceso de medida pueden estar influyendo sobre los datos obtenidos.

5.1 Evaluación de la resistencia/susceptibilidad a *Phytophthora palmivora*.

Se evaluó la resistencia/susceptibilidad de la planta a la punción y a la penetración de *P. palmivora*, midiendo el avance de la enfermedad según una escala cualitativa visual del 1-5 (Tabla 3). De esta manera, los niveles 1-2 corresponden a plantas resistentes, el nivel 3 corresponde a una planta medianamente resistente (tolerante) y los niveles 4-5 pertenecen a una planta susceptible.

En la Figura 11 se muestran los resultados de la punción más inóculo en las hojas de ambos clones desde el tiempo cero (control) hasta el quinto día.

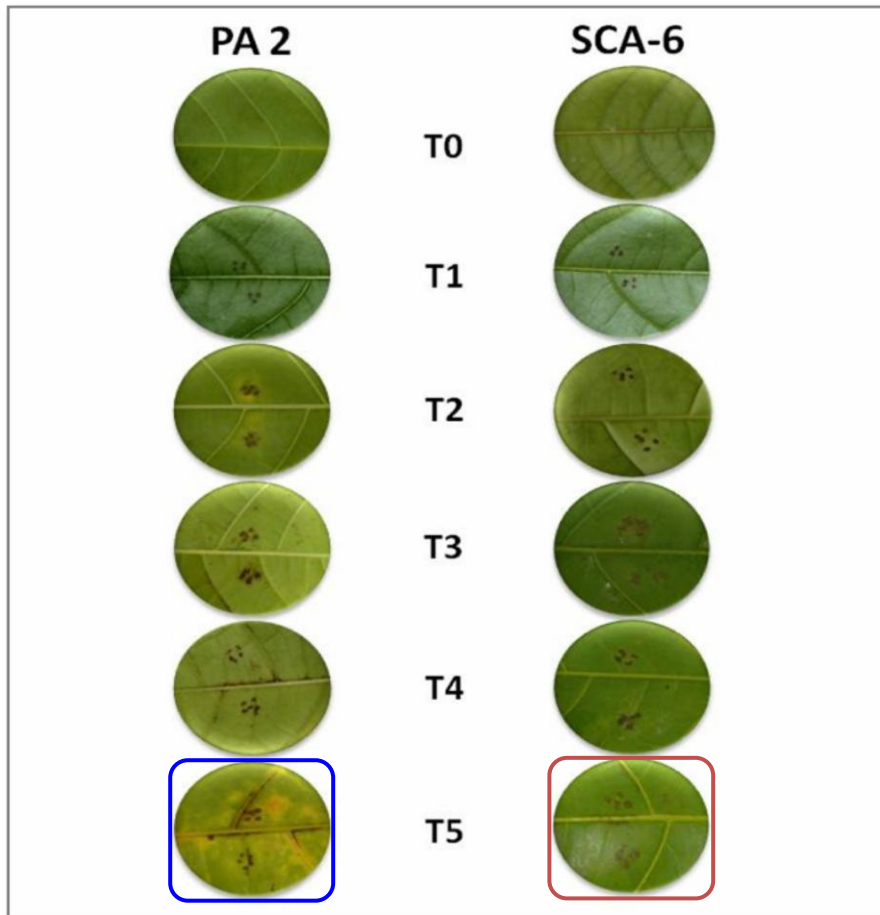


Figura 11. Evaluación visual del avance de la inoculación de hojas de *Theobroma cacao* con *Phytophthora palmivora* según escala visual de Dercy Parra (INIA Miranda). Bajo condiciones de humedad, 25 °C y oscuridad.

De esta evaluación pudimos hacer la clasificación del clon SCA-6 como **resistente** a *Phytophthora palmivora* y al clon PA-2 como **susceptible** a *Phytophthora palmivora* (Figura 12).



Figura 12. Hojas inoculadas con *Phytophthora palmivora* luego de 5 días. 1) Clon resistente (SCA-6), 2) Clon susceptible (PA-2).

5.2 Contenido de compuestos fenólicos en hojas de cacao durante la infección de *Phytophthora palmivora* en los clones Scavina 6 y Playa Alta 2.

El contenido constitutivo de fenoles solubles y ligados, y por ende, de fenoles totales (valores obtenidos de la suma algebraica de la cantidad de fenoles solubles y fenoles ligados a la pared de cada clon), fue más alto en el clon SCA-6 que en el clon PA-2 en todos los tratamientos y este comportamiento se mantuvo hasta pasados los 5 días. Los resultados se pueden apreciar en la Tabla 4 y en la Figura 12 que siguen a continuación. Cuando mencionamos “constitutivo” hacemos referencia a las 24h de inoculación del patógeno puesto que los datos obtenidos a la hora cero no se muestran en este trabajo.

TRATAMIENTO									
Tiempo	CONTROL			HOJA + AGUA			HOJA + HONGO		
	Fenoles Solubles	Fenoles Ligados	Fenoles Totales	Fenoles Solubles	Fenoles Ligados	Fenoles Totales	Fenoles Solubles	Fenoles Ligados	Fenoles Totales
SCA-6									
24	0,21 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,19 ± 2,4E-03	0,11 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,12 ± 3,3E-03	0,41 ± 0,04
48	0,27 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,29 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,14 ± 4,9E-03	0,34 ± 0,04
72	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,32 ± 0,02
96	0,18 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,23 ± 2,3E-03	0,10 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,36 ± 0,02
120	0,24 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,30 ± 0,02
PA2									
24	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,32 ± 0,02
48	0,10 ± 4,0E-03	0,08 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,11 ± 2,5E-03	0,09 ± 3,1E-04	0,20 ± 0,02
72	0,13 ± 3,7E-03	0,11 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,10 ± 3,2E-03	0,16 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,17 ± 0,02
96	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,14 ± 4,1E-03	0,23 ± 0,03
120	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,12 ± 5,0E-03	0,12 ± 5,0E-03	0,24 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,20 ± 0,02

Tabla 4. Variación en el contenido de compuestos fenólicos solubles, ligados y fenoles totales (mg/g) en hojas de cacao. (Se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu a 25°C y oscuridad; las absorbancias se midieron a 725nm. Para cada clon se realizaron tres (3) replicas (alícuota 100µL) y cada una fue medida tres (3) veces. Los valores representan el promedio de cada tratamiento ± el error estándar).

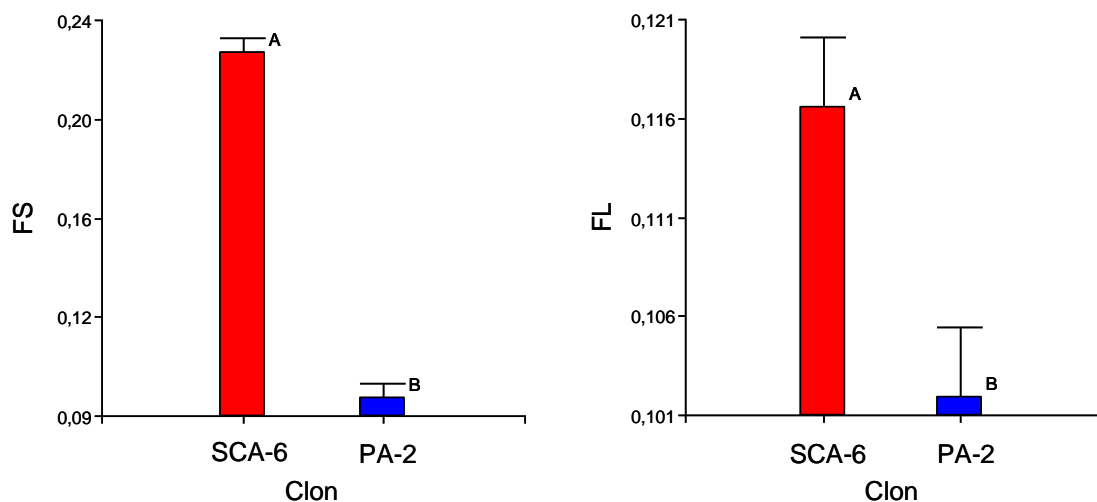


Figura 12. Variación en el contenido de fenoles solubles y ligados a la pared celular (mg/g) en hojas de los clones de cacao Scavina-6 (SCA-6) y Playa Alta 2 (PA-2).

El hecho de encontrar mayor contenido de fenoles en el clon SCA-6 que en el PA-2, se correspondería con lo esperado para un clon resistente y susceptible respectivamente, concordando con lo planteado por otros autores (Omokolo y col., (1995); Omokolo y col., 1996).

Las variaciones encontradas para estos compuestos fenólicos en los tratamientos y en el tiempo de incubación, pueden estar influenciadas por el envejecimiento de las hojas, siendo éste el único factor común que tienen las muestras. Resultados similares se han encontrado en mazorcas de cacao inoculadas con *Phytophthora megakarya*, donde se encontró una variación en el contenido de aminoácidos relacionada a la edad del árbol y a la infección (Omokolo y col., 1995; Omokolo y col., 1996).

Después de los tratamientos, el contenido de compuestos fenólicos solubles aumentó en las hojas infectadas independientemente del clon (Figura 13, tabla 4) modelo mixto por variable. En el caso de los fenoles ligados, no existieron diferencias en los tratamientos hoja agua, hoja-hongo. Este tipo de compuestos fenólicos podrían actuar como barreras físico-químicas ante la colonización del hongo, o como señales en la inducción de genes de resistencia tanto de forma local como sistémica.

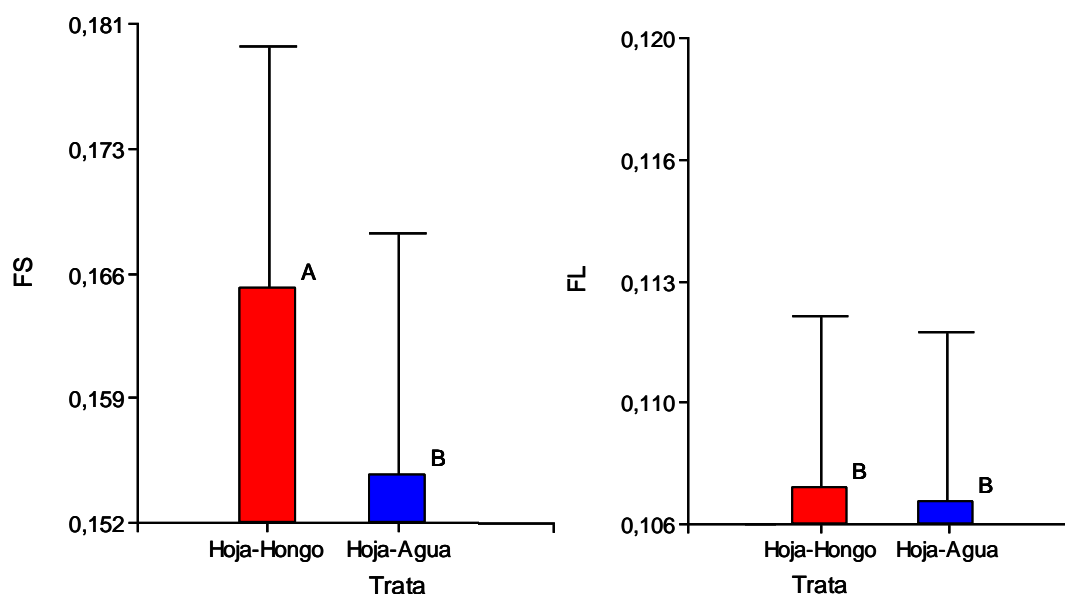


Figura 13. Contenido de fenoles solubles y ligados a la pared celular (mg/g) en hojas de los clones de cacao Scavina-6 (SCA-6) y Playa Alta 2 (PA-2). Modelo mixto por variable.

Estos resultados indicarían que el efecto inhibitorio de los fenoles en el crecimiento y desarrollo del patógeno depende del nivel de estos compuestos en los tejidos, bien sea que se encuentren solubles en el citoplasma (pueden movilizarse más rápido) o formando parte constitutiva de la pared celular. Lo anterior mostraría que la acumulación de estos compuestos no es específica de la infección, sino más bien que su acumulación puede estar influenciada por cualquier condición de estrés, bien sea de tipo mecánico, microbiológico o químico; estando relacionado a la lignificación alrededor de las paredes celulares de la zona dañada (Vance et al., 1980). De hecho, en las plantas infectadas estos compuestos serían los sustratos para la síntesis de compuestos implicados en la resistencia a enfermedades como fitoalexinas y ésteres de ácidos hidroxicinámicos (Dixon and Lamb, 1990) y para la producción en, o cerca, del sitio de la infección de polímeros fenilpropanoides bioresistentes (ligninas y suberinas) que actúan como cicatrizantes sobre la herida y/o como una barrera a la penetración o la propagación del patógeno (Ebel and Grisebach, 1988; Davin and Lewis, 1992).

Los resultados de este estudio concuerdan con lo planteado por otros autores que han observado una acumulación variable de fenoles a diferentes niveles en tejidos y órganos afectados en respuesta a la invasión por patógenos, bien sea en cacao (Omokolo y col., 2002; Djocgoue, 2007) como en otras plantas (Cahill y McComb, 1992). También Daguinet y Parvais (1981) describieron que los clones de cacao que son altamente susceptibles a *Phytophthora megakarya*, contienen menos fenoles que los clones menos susceptibles. Iwaro (1995), propuso que esto puede deberse a que en el momento del ataque del patógeno, los fenoles ligados a la pared son los que juegan un papel importante de defensa a la penetración (lo que se correspondería con lo que se conoce como resistencia a la penetración) y los fenoles solubles se movilizan una vez que el patógeno penetra en la célula (lo que se conoce como resistencia a la postpenetración).

Otros autores como Joelson *et al.*, (2006), no encontraron diferencias significativas en la concentración de fenoles entre variedades de cacao resistentes y susceptibles al hongo *Moniliophthora perniciosa*; sin embargo, observaron mayor concentración de fenoles en las hojas en las variedades resistentes que en las susceptibles. Por otra parte, Djocgoue *et al.*, 2007 describen que pudiera ser que la participación de los compuestos fenólicos en estos mecanismos de defensa de la planta sea de naturaleza cualitativa.

5.3 Contenido de ligninas en hojas de cacao durante la infección de *Phytophthora palmivora* en los clones Scavina 6 y Playa Alta 2.

Después de la celulosa, las sustancias orgánicas más abundante en las plantas son las ligninas, polímeros altamente ramificados de fenilpropanoides que forman la pared celular en las plantas. La estructura precisa de las ligninas no se conoce debido a su difícil extracción, pues se unen covalentemente a la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular. Además de proporcionar soporte mecánico, las ligninas tienen importantes funciones de protección, su resistencia física disuade a la alimentación de los animales, y hace que sea relativamente no digerible para los herbívoros. La lignificación bloquea el crecimiento de patógenos y es una respuesta frecuente a las infecciones o lesiones (Palm y Rowland, 1997; Vance *et al.*, 1980; Bell, 1981; Wally and Punja, 2010).

El contenido constitutivo de lignina fue más alto en el clon SCA-6 que en el clon PA-2. (Tabla 5) (Figura 13 izquierda), resultados que concuerdan con lo encontrado por Nyadanu *et al.*, (2013). Si bien son pocos los estudios descritos en la literatura acerca de su rol en la resistencia a *P. palmivora*, este resultado podría suponer un mecanismo por el cual el clon SCA-6 restringe el crecimiento de las hifas del patógeno en el xilema. Vance, 1980, sugiere cinco maneras en que la lignificación podría obstaculizar el crecimiento de los hongos a través del tejido de la planta: i) la lignina puede hacer las paredes más resistentes a la penetración mecánica, ii) la

lignificación de la pared en el punto de ataque puede hacerla resistente a la disolución por las enzimas fúngicas ya que la esterificación de polisacáridos de la pared celular con derivados del ácido cinámico podría alterar la idoneidad de los polisacáridos como sustratos, iii) la lignificación de las paredes puede actuar como una barrera a la difusión en primer lugar de enzimas y toxinas del hongo hacia la planta, y de agua y nutrientes de la planta al hongo (aún cuando se carece de evidencia de esto), iv) los precursores fenólicos de la lignina de bajo peso molecular y los radicales libres producidos durante la polimerización, pueden inactivar las membranas, enzimas, toxinas y elicitores de los hongos, conociéndose que muchos compuestos fenólicos tienen actividad antifúngica y v) la punta de la hifa del hongo puede comenzar a lignificarse y perder la plasticidad necesaria para el crecimiento. Esta lignificación puede ser debida a que el micelio puede adsorber lignina, y las paredes fúngicas al contener quitina, celulosa, y proteínas ricas en hidroxiprolina, pueden servir como matrices para la polimerización de los precursores de la lignina.

TRATAMIENTO			
<i>Ligninas</i>			
<i>Tiempo</i>	CONTROL	HOJA + AGUA	HOJA+HONGO
SCA-6			
24	3,19 ± 4,7E-03	3,25 ± 0,16	1,40 ± 0,09
48	1,47 ± 0,02	1,41 ± 0,06	0,61 ± 6,1E-04
72	0,82 ± 0,02	0,57 ± 0,01	0,45 ± 0,01
96	0,85 ± 0,03	1,18 ± 0,02	1,15 ± 0,03
120	1,09 ± 0,03	0,87 ± 0,03	0,88 ± 0,02
PA2			
24	0,30 ± 1,7E-04	0,21 ± 2,7E-04	0,36 ± 3,2E-03
48	0,33 ± 1,6E-03	0,22 ± 1,5E-03	0,53 ± 1,4E-03
72	0,28 ± 3,7E-03	0,20 ± 1,0E-03	0,66 ± 0,01
96	0,20 ± 1,7E-03	0,75 ± 0,01	0,84 ± 0,01
120	0,16 ± 1,1E-03	0,69 ± 0,02	1,82 ± 0,04

Tabla 5. Variación en el contenido de Ligninas (mg/g) en hojas de cacao. (Se midió la solución de ligninas a pH 12 ajustado con NaOH 0,1M contra un blanco del mismo extracto llevado a pH 7 con buffer fosfato. Las absorbancias se leyeron a 280nm. Para cada clon se realizaron tres (3) extracciones y cada una fue medida tres (3) veces. Los valores representan el promedio de cada tratamiento ± el error).

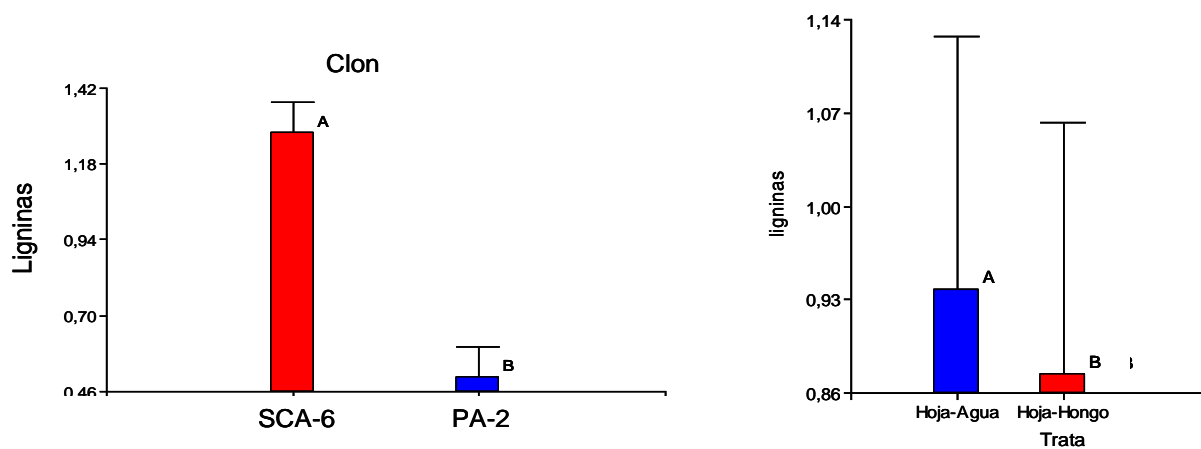


Figura 13. Izquierda: variación en el contenido de lignina (mg/g) en hojas de los clones de cacao Scavina-6 (SCA-6) y Playa Alta 2 (PA-2). Derecha: Contenido de lignina (mg/g) en hojas de los clones de cacao Scavina-6 (SCA-6) y Playa Alta 2 (PA-2). Modelo mixto por variable.

Independientemente del clon, el contenido de lignina disminuye en la interacción hoja-hongo, indicando que las zonas de reacción que contienen lignina no siempre son barreras eficaces contra la penetración del patógeno, que puede “saltarse” esta barrera bien de forma mecánica o mediante degradación enzimática (Vance, 1980). Aún cuando la evidencia histoquímica sugiere que la lignificación se induce antes de la penetración y durante la colonización, ya sea en las células de la epidermis o en otras de los tejidos, por desgracia, i) en algunas enfermedades no se ha encontrado indicio alguno de esta, ii) la capacidad de la mayoría de los patógenos de las plantas para degradar la lignina aún no se ha examinado a profundidad en los estudios de interacciones planta-patógeno y iii) los resultados tan diversos, aún cuando escasos, encontrados en la literatura, podrían interpretarse como una indicación de que la lignificación inducida fue una de las causas de la resistencia, una consecuencia de la resistencia, o de ninguna manera relacionada con la resistencia.

5.4 Contenido de carbohidratos y aminoácidos en hojas de cacao durante la infección de *Phytophthora palmivora* en los clones Scavina 6 y Playa Alta 2.

Como se observa en la tabla 6 y en las figuras 14 y 15 a continuación, para los carbohidratos y aminoácidos (prolina libre), se encontró, de manera constitutiva, el mayor contenido para el clon SCA-6 (Figura 14 derecha) y PA-2 respectivamente (Figura 14 izquierda). Se sabe que los carbohidratos solubles pueden estar (en el metabolismo de la planta) asociados con la síntesis de diversos productos químicos de defensa, tales como compuestos fenólicos, fitoalexinas, fitoanticipinas y lignina (Djocgoue *et al.*, 2011), indicando Evers *et al.* (2003) y Omokolo y Boudjeko (2005) la posible relación entre el contenido en carbohidratos y la resistencia del hospedante.

Tiempo	TRATAMIENTO					
	CONTROL		HOJA + AGUA		HOJA + HONGO	
	Aminoácidos	Carbohidratos	Aminoácidos	Carbohidratos	Aminoácidos	Carbohidratos
SCA-6						
24	0,02 ± 3,3E-05	0,07 ± 0,00	0,01 ± 4,6E-04	0,05 ± 0,00	0,01 ± 8,7E-04	0,03 ± 0,00
48	0,01 ± 1,2E-04	0,03 ± 0,00	0,02 ± 6,3E-04	0,03 ± 0,00	0,07 ± 1,0E-04	0,06 ± 3,3E-05
72	0,03 ± 5,7E-04	0,03 ± 0,00	0,04 ± 7,8E-04	0,03 ± 0,01	0,04 ± 1,3E-03	0,03 ± 0,00
96	0,02 ± 8,1E-04	0,03 ± 0,01	0,02 ± 3,2E-04	0,04 ± 0,00	0,02 ± 6,1E-04	0,04 ± 0,00
120	0,03 ± 8,3E-04	0,06 ± 3,3E-05	0,03 ± 9,8E-04	0,04 ± 0,00	0,03 ± 6,6E-04	0,04 ± 3,3E-05
PA2						
24	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,06 ± 6,7E-05	0,02 ± 0,00	0,04 ± 3,8E-04	0,02 ± 0,00
48	0,04 ± 1,5E-04	0,02 ± 0,00	0,05 ± 3,5E-04	0,02 ± 0,00	0,05 ± 1,5E-04	0,04 ± 0,00
72	0,05 ± 6,7E-04	0,02 ± 0,00	0,07 ± 3,8E-04	0,02 ± 0,00	0,04 ± 4,3E-04	0,04 ± 0,01
96	0,05 ± 4,3E-04	0,02 ± 0,00	0,02 ± 3,0E-04	0,02 ± 0,00	0,05 ± 6,9E-04	0,06 ± 0,00
120	0,07 ± 5,0E-04	0,02 ± 0,00	0,02 ± 6,7E-04	0,03 ± 0,00	0,02 ± 4,9E-04	0,06 ± 0,00

Tabla 6. Variación en el contenido de aminoácidos y carbohidratos (mg/g) en hojas de cacao. (Valores de carbohidratos obtenidos siguiendo el método de Dubois, midiendo el complejo de color amarillo a 492nm. Para los valores de aminoácidos, se utilizó el reactivo de ninhidrina para formar un complejo que se midió a 520nm. Para cada clon se realizaron tres (3) extracciones y para cada una se realizaron tres (3) medidas. Los valores representan el promedio de cada tratamiento ± el error estándar).

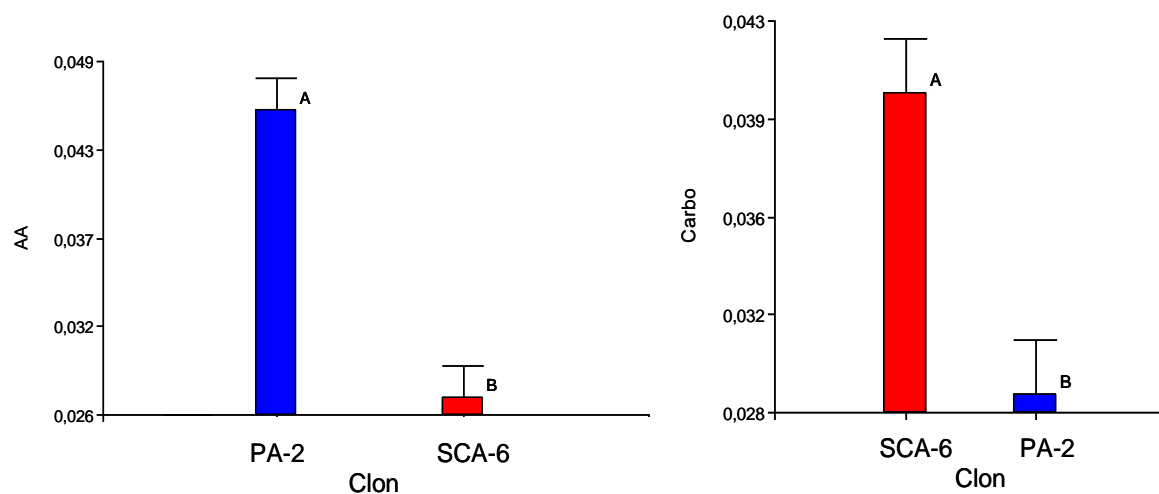


Figura 14. Izquierda: variación en el contenido de aminoácidos (prolina libre) (mg/g) en hojas de los clones de cacao Scavina-6 (SCA-6) y Playa Alta 2 (PA-2). Derecha: contenido de carbohidratos (mg/g) en hojas de los clones de cacao Scavina-6 (SCA-6) y Playa Alta 2 (PA-2).

SCA-6 presentó el mayor contenido inicial de carbohidratos, fenoles y ligninas, lo que coincide con una mejor respuesta ante la infección de *P. palmivora*.

Estos resultados, concuerdan con lo descrito por Nyadanu *et al.* (2013), quienes encontraron que los clones de cacao T60/887, Sca6, T85/799 y Pa150 (menos susceptibles a *P. palmivora* y *P. megakarya*) constitutivamente, contenían más carbohidratos (azúcares solubles e insolubles) que los clones más susceptibles Na33, Imc67 e Imc53. Lo anterior sugiere el papel de estos azúcares en la resistencia a esta enfermedad; no obstante, Omokolo *et al.*, (1996) obtuvieron justo lo contrario. Por otro lado, los resultados obtenidos por Omokolo y col. (1996), mostraron que algunos clones de cacao altamente susceptibles a *Phytophthora megakarya* contenían más carbohidratos que los clones más resistentes, atribuyendo este hecho, a que el patógeno utilizó los mismos para su crecimiento.

En aminoácidos, el contenido más elevado fue encontrado en el clon susceptible PA-2, contrario a lo descrito por (Djocgoue *et al.*, 2011), quienes encuentran mayor

contenido en los clones menos susceptibles. Sin embargo, son escasos los trabajos en la literatura que permitan realizar una discusión más profunda de estos resultados.

Sin embargo, la tendencia de la variación de los contenidos totales de azúcares solubles y aminoácidos en las plantas después de la infección es bastante variable (Djocgoue *et al.*, 2011), a pesar de la tendencia a la acumulación de aminoácidos y carbohidratos después de la infección (Djocgoue *et al.*, 2007; 2011). En la Figura 15 (izquierda y derecha), independientemente del clon, el contenido de carbohidratos y aminoácidos difiere significativamente en el tratamiento hoja-agua y hoja-hongo, siendo más elevados en este último.

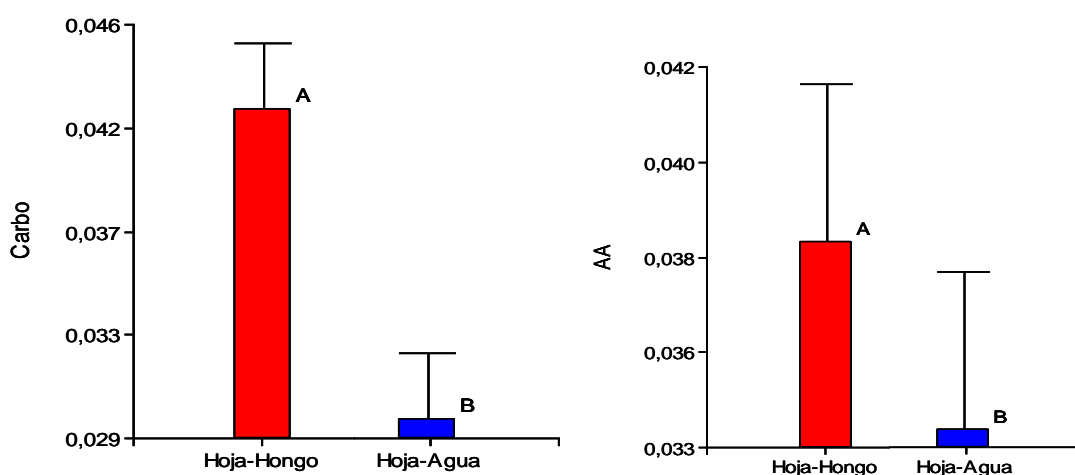


Figura 15. Contenido de carbohidratos (izquierda) y aminoácidos (derecha) (mg/g) en hojas de los clones de cacao Scavina-6 (SCA-6) y Playa Alta 2 (PA-2). Modelo mixto por variable.

Nyadanu *et al.*, (2013) describen un mayor contenido de carbohidratos después de la infección con *P. palmivora* y *P. megakarya* en hojas y mazorcas de cacao, atribuyendo estos resultados a que los carbohidratos son precursores de la síntesis de compuestos fenólicos (Djocgoue *et al.*, 2007) y a que pueden ser usados para la síntesis “de novo” de proteínas que pueden contribuir a la inhibición del crecimiento de los patógenos (Cui *et al.*, 2000).

Así mismo, Nyadanu *et al.*, (2013) demostraron que durante la infección del fruto de cacao, la concentración de azúcares solubles en los tejidos disminuye. En general, *Phytophthora* sp., presenta un alto consumo de los azúcares simples y dobles, predominando en la pared celular la glucosa, fructosa y sacarosa. Por lo tanto, este hongo no permitiría, a la planta hospedera, la síntesis de componentes relacionados con las patogénesis, similares a los fenoles en los clones susceptibles. Sin embargo, estos investigadores encontraron que los azúcares insolubles, que no son necesarios para el crecimiento y desarrollo del hongo, aumentaron en hojas y mazorcas después de la infección con *P. megakarya*. Resultados similares en cacao han sido descritos por Ndoumou *et al.*, 1996 y Omokolo *et al.*, 2002.

Los resultados encontrados por Omokolo *et al.* (2002), sugieren que las variaciones en aminoácidos y carbohidratos solubles pueden, al menos en parte, explicar las diferencias en la susceptibilidad de diferentes clones de cacao a *Phytophthora megakarya* en las mazorcas y reflejan el carácter poligénico de la resistencia del cacao a esta enfermedad, pudiendo estar los mismos relacionados también con la edad de las mazorcas (Omokolo *et al.*, 1996).

En lo que respecta a los aminoácidos, numerosos autores indican su acumulación (incremento) durante el desarrollo de la infección (Omokolo *et al.*, 2002; Omokolo y Boudjeko, 2005), pudiendo actuar de manera directa inhibiendo el crecimiento del hongo o indirectamente mediante su implicación en las rutas metabólicas asociadas con la resistencia (síntesis de compuestos del metabolismo secundario que son antimicrobianos), en este caso a *Phytophthora megasperma* (Graham *et al.*, 1990).

Así, Djocgoue *et al.*, (2011) describen que la infección en hojas y mazorcas de cacao se caracterizó por un incremento en el contenido de aminoácidos, al igual que lo descrito por otros autores en cacao, que aseveran que los aminoácidos libres son indicadores de degradación de las proteínas en los tejidos que sufren una muerte celular tipo reacción hipersensible (Scarpari, *et al.* 2005). Además, se dice que estos aminoácidos podrían ser utilizados para la síntesis de novo de proteínas que podrían contribuir a la inhibición del desarrollo de los hongos (Cui *et al.*, 2000). Sin embargo,

Omokolo et al., (2002), encuentran que durante el proceso de infección se presentó una disminución de aminoácidos, atribuyéndola estos autores, a que durante la interacción patógeno-planta hospedera, se activa la ruta de los fenilpropanoides y al final, se colapsan los tejidos vegetales. Sin embargo, estos mismos autores (1996) describen un aumento significativo en el contenido de aminoácidos de mazorcas infectadas con *P. megakarya*.

Los resultados de este estudio son preliminares y requieren ampliarse y profundizarse para confirmar las tendencias observadas, aumentando el número de réplicas de cada clon evaluado.

6. CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la participación de los fenoles, ligninas, carbohidratos y aminoácidos en los mecanismos de defensa de la planta *Theobroma cacao L.* en dos clones, SCA-6 y PA2, frente al ataque de *Phytophthora p.*

En este sentido, se evaluó la resistencia/susceptibilidad de la planta *Theobroma cacao L.* a la punción y a la penetración de *P. palmivora*, midiendo el avance de la enfermedad según una escala cualitativa visual, a partir de la cual se pudo hacer la clasificación del clon SCA-6 como **resistente** a *Phytophthora palmivora* y al clon PA-2 como **susceptible** a *Phytophthora p.*

En la determinación de fenoles se encontró que el contenido de compuestos fenólicos solubles aumentó en las hojas infectadas independientemente del clon luego de aplicar los tratamientos. La mayor cantidad se observó en el clon resistente SCA-6 y el menor contenido se obtuvo en el clon susceptible PA-2, dichos resultados corresponden a lo planteado por los autores (Omokolo y col., (1995); Omokolo y col., 1996).

El contenido constitutivo de lignina fue más alto en el clon SCA-6 que en el clon PA-2, resultados que concuerdan con lo encontrado por Nyadanu et al., (2013). Se observó de igual manera que, independientemente del clon, el contenido de lignina disminuye en la interacción hoja-hongo, indicando que no siempre están involucradas en los mecanismos de defensa en los casos de penetración mecánica o mediante degradación enzimática, como lo indica Vance, 1980.

La tendencia de la variación de los contenidos totales de azúcares solubles (carbohidratos) y aminoácidos (prolina libre) en las plantas después de la infección fue bastante variable. Al evaluar el contenido de carbohidratos, se encontró el mayor contenido para el clon SCA-6, lo que sugiere el papel de estos azúcares en la resistencia a esta enfermedad en concordancia con lo descrito por Nyadanu et al. (2013).

Con respecto al perfil de aminoácidos, el contenido más elevado fue encontrado en el clon susceptible PA-2, contrario a lo descrito por Djocgoue *et al.*, 2011, quienes encuentran mayor contenido en los clones menos susceptibles.

Finalmente, se determinó que independientemente del clon, el contenido de carbohidratos y aminoácidos difiere significativamente en el tratamiento hoja-agua y hoja-hongo, siendo más elevados en este último. El mayor contenido de aminoácidos luego de la infección, se atribuye a que estos son precursores de la síntesis de compuestos fenólicos (Djocgoue *et al.*, 2007) y que la alta concentración de carbohidratos después de la infección viene dada debido al papel importante que cumplen estos azúcares en la resistencia a las enfermedades, según trabajos de Nyadanu *et al.* (2013).

7. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Nada, Y.; Kushalappa, A. C.; Marshall, W. D.; Prasher, S.O.; Al-Mughrabi, K. 2007. Metabolic Profiling Horizontal Resistance in Potato Leaves (CVS. Caesar and AC. Novachip) Against *Phytophthora infestans*. En Nikolau and E. Syrkin Wurtele (eds.), *Concepts in Plant Metabolomics*. 269–285.

Alemanno L, Ramos T, Gargadenec A, Andary C, Ferriere N. 2003. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals of Botany (London)* 92, 613-23. Contact: Alemanno, L. ; Cirad, Avenue Agropolis, TA 80/02, 34398, Montpellier, Cedex, 5, France.

Ali, K.; Maltese, F.; Zyprian, E.; Rex, M.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. 2009. NMR Metabolic Fingerprinting Based Identification of Grapevine Metabolites Associated with Downy Mildew Resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (20): 9599-9606.

Álvarez, C; Pérez, E; Lares, M.C. 2007. Caracterización física y química de las almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, Estado de Aragua. *Agronomía Tropical*. 57(4): 249-256.

Amplosah, J.D., Asare-Nyako, A. 1973. Screening of cocoa seedlings for resistance to *Phytophthora palmivora*. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, **20**: 35-40.

Appiah A, Flood J, Bridge P, Archer S. 2003. Inter and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Pathology* 52: 168-180.

Arciniegas, A. M. 2005. Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 126 p.

Arlorio, M.; Coisson, J. D.; Travaglia, F.; Varsaldi, F.; Miglio, G.; Lombardi, G.; Martelli, A. 2005. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International*. 38: 1009–1014.

Argout, X.; Fouet, O.; Wincker, P.; Gramacho, K.; Legavre, T.; Sabau, X.; Risterucci, A. M.; Da Silva, C.; Cascardo, J.; Allegre, M.; Kuhn, D.; Verica, J.; Courtois, B.; Loor, G.; Babin, R.; Sounigo, O.; Ducamp, M.; Gultinan, M. J.; Ruiz, M.; Alemanno, L.; Machado, R.; Phillips, W.; Schnell, R.; Gilmour, M.; Rosenquist, E.; Butler, D.; Maximova, S.; Lanaud, C. 2008. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma Cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics*. 9: 512.

Ayaz, F.F. et al. (2000). Water stress effects on the content of low molecular weight carbohydrates and phenolic acids in *Ctenanthe setsa* (Rosc.) Eichler. *Can. J. Plant Sci.* (80):373.

Barros, N. 1981. Manual de asistencia técnica, Programa Nacional de Cacao ICA edn. Bogotá, Colombia.

Bartley, B. G. D. 1970. Yield variation in the early productive years in trials with cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*. 19: 199-206.

Bell, A.A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32: 21-81.

Boudjeko T., Djocgoue P. F., Nankeu J. D., Mbouobda H. D., Omokolo D. N. and El Hadrami I. 2007. Luteolin derivatives and heritability of resistance to *Phytophthora megakarya* in *Theobroma cacao*. *Australasian Plant Pathology* 36: 56–61.

Bowers, J.H., Bailey, B.A., Hebbar, P.K., Sanogo, S., Lumsden, R. D. 2001. The Impact of Plant Diseases in World Chocolate Production. Plant Health Progress (Online), En: <http://www.worldcocoafoundation.org/scientific-research/research-library/documents/Bowers2001.pdf>

Bugbee W.M., 1973. Sucrose and cell walls as factors affecting *Phoma* storage rot of sugar beet. *Phytopathology* 63, 480–484.

Cahill, D. M., & McComb, J. A. 1992. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) with *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40(5), 315-332.

Campo, J. 2005. Venezuela Se Olvida Del Cacao. Observatorio De La Economía Latinoamericana 46, en: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/ve/2005/cjm.htm>.

CAPEC. Cámara Venezolana del Cacao. La ruta del Cacao, <http://www.capecve.org/ruta.html>

Conceicao, L. F. R.; Ferreres, F.; Tavares, R. M.; Dias, A. C. P. 2006. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*. 67: 149-155.

Conejero, V. 1997. La respuesta defensiva de las plantas y su posible manipulación biotecnológica En: Biotecnología y agricultura: las plantas de Fruto (Fundación Bancaixa (ed). Valencia – España. 97 -119.

CORPOANDES. Corporación de los Andes. Cacao venezolano. <http://www.corpoandes.gov.ve>, acceso octubre 2010.

Cui Y., A.A. Bell, O. Joost and C. Magill, 2000. Expression of potential defence responses genes in cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56, 25–31.

Daguenet G, Parvais JP. 1981. Etude comparative de la resistance a' *Phytophthora palmivora* de trois espe' ces du genre *Theobroma*: mise en evidence de substances de type phytoalexines responsables de la resistance induite. *CafeU , Cacao, TheU* 20: 181-188.

Davin LB, Lewis NG. 1992. Phenylpropanoid metabolism: biosíntesis of monolignols, lignans, and neolignans, lignins and suberins. In: Stafford HA, Ibrahim RK, eds. *Phenolic metabolism in plants, Vol. 26*. New York: Plenum Press, 325-375.

Delalonde, M. et al. (1996). Development of phenolic compounds in maize anthers (*Zea mays*) during cold pretreatment prior to androgenesis. *J. Plant Physiol.* (149):61.

Delauney A.J., Verma D.P.S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4: 215–223.

Dixon R.A., Lamb C.J. 1990. Molecular communication in interactions between plant and microbial pathogens. *Annual Re.iew of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 339-367.

Dixon, R. A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411: 843-847.

Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzani M.G., Gonzales L., Tabalada M., Roberto C.W. (2008). INFOSTAT, versión 2008, Grupo infosta, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Djockoué, P.F., T. Boudjeko, D.J. Nankeu, M.I.B. Efoumban, S. Nyasse, N.D. Omokolo, 2006. Comparative assessment of the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) progenies from SNK10 x SNK413; ICS84 x ICS95 to *Phytophthora megakarya* in Camerron by measuring size of necrotic lesion along the midrib. *J . Plant Pathol.*, 5: 329-335.

Djocgoue, P. F.; Boudjeko, T.; Mbouobda, H. D.; Nankeu, D. J.; Hadrami, E.; Omokolo, N. D. 2007. Heritability of phenols in the resistance of *Theobroma cacao* against *Phytophthora megakarya*, the causal agent of black pod disease. *J. Phytopathology*. 155: 519-525.

Djocgoue P.F., Mbouobda H.D., Boudjeko T., Effa P.O. and Omokolo D.N. 2011. Amino acids, carbohydrates and heritability of resistance in the *Theobroma cacao/Phytophthora megakarya* interaction. *Phytopathol. Mediterr.* 50: 370–383.

Dubois, M; K. A. Guilles ; J. K. Hamilton; P. A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal.Chem.* 28(3):350-355.

Ebel J, Grisebach H. 1988. Defence strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma*: a molecular analysis. *Trends in Biochemical Sciences* 13: 23-27.

Evans, H.C. 1981. Pod rot of cocoa caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. Kew, Surrey, England. CMI. 44 p. (Phytopathological Paper 24).

Evers D., J. Dommès and J.F. Hausman, 2003. Carbohydrates and resistance to *Phytophthora infestans* in potato plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 25, 171–178.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estadísticas. <http://www.fao.org>

Gesteira, A. S.; Micheli, F.; Carels, N.; Da Silva, A.; Gramacho, K.P.; Shuster, I.; Macedo, J. N.; Pereira, A. G.; Cascardo, J. C. M. 2007. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. *Annals of Botany*. 100: 129-140.

Gómez, L. 2005. Mecanismos de detección y protección de las plantas contra las bacterias patógenas. *Biojournal.net*. 2 (1): ISSN 169-1591.

Gonzales, A.; Ventura, M. 2007. Autoincompatibilidad sexual de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.). In IDIAF (Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales). Santo Domingo, República Dominicana. p. 13-17.

Graham T.L., J.E. Kim and M.Y. Graham, 1990. Role of constitutive isoflavone confugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *P. megasperma*. *Molecular and Plant Microbe Interactions* 3, 157–166.

Guest, D. 2007. Black Pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology*. 97 (12): 1650-1653.

Gurr, S.I.; Mc Pherson M.I. and Bowles D.J. 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. *Molecular Plant Pathology and Practical Approach* (3):62-69.

Hare, P.D. and Cress, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21: 79-102.

Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Envir.*, 21: 535-553.

Hoagland, R. E. 1990. *Alternaria cassiae* alters phenylpropanoid metabolism in Sicklegod (Casia obstusifolia). *Phytopath.* 130:177–187.

ICCO. International Cocoa Organization, <http://www.icco.org/about/pest.aspx>

Iwaro, A.D. 1995. Mechanisms of resistance to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler in cacao (*Theobroma cacao* L.) and their genetic basis. Ph.D. Thesis, The University of the West Indies, Trinidad and Tobago.

Irwin, A.D. 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.

Iwaro, A. D., P., Umaharam and T. N. Sreenivasan. 1997. Inheritance of foliar resistance to *Phytophthora palmivora* (Butl.)Butl. In cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica* 96: 377-383.

Iwaro, A.D., Sreenivasan, T.N., Umaharan, P. 1997a. Foliar resistance to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in *Theobroma cacao*. *Plant Disease* 81. 6: 619-624.

Iwaro, A.D., Sreenivasan, T.N., Umaharan, P. 1997b. *Phytophthora* resistance in cacao (*Theobroma cacao*): Influence of pod morphological characteristics. *Plant Pathology*. 4: 557-565.

Iwaro, A.D., Umaharam, P., Sreenivasan, T.N. 1997c. Inheritance of foliar resistance to *Phytophthora palmivora* (Butl.)Butl. In cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*. 96: 377-383.

Iwaro A, Sreenivasan T, Umaharan P. 1999. *Phytophthora* resistance in Cacao (*Theobroma cacao*): Influence of pod morphological characteristics. *Plant Pathology* 46:557-565.

Joelson V. O. da Silva, Luis M. B. Leal, Pablaine R. Lawinsky, Josie Cloviane, Soraya Maria M. de Souza and Raúl R. Valle. 2006. Presence of Total Soluble Phenols in Cocoa Clones Resistant and Susceptible to *Crinipellis pernicioso*. 15TH INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE. San José de Costa Rica. Pag. 176.

Jorrín, J.V., Abril D., M. N., Bárcena, J. A. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Córdoba.

Kavi Kishor PB, Hong Z, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS. 1995. Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108,1387–1394.

Lawrence, J.S. 1978. Evaluation of methods for assessing resistance of cacao *Theobroma cacao* L. cultivars and hybrids to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. Itabuna, Bahía, Brasil. CEPLAC/CEPEC. Boletín Técnico N° 62. 47 p.

León, J. 1983. Botánica de los cultivos tropicales. 2da Edición. Editorial IICA. Torrialba, Costa Rica. 340-342.

López-Gresa, M. P.; Maltese, F.; Bellés, J. M.; Conejero, V.; Kym, H. K.; Choi, Y. H.; Veerporte, R. 2010. Metabolic Response on Tomato Leaves Upon Different Plant-Pathogen Interactions. *Phytochemical Analysis*. 21: 89-94.

Martini, Maria Helena; Figueira, Antonio; Lenci, Camila Gonçalves And Tavares, Débora de Queiroz. (2008). Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). *Rev. bras. Bot.* [online]. vol.31, n.3, pp. 425-431.

McMahon P, Purwantara A. 2004. Major crops affected by *Phytophthora*. En André Drenth y David Guest. Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. ACIAR Monograph 114: 104-105 p.

Mejía, L.; Arguello, O. 2000. Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao. Bucaramanga, Colombia. 143 p.

Moreno A. 2000. La investigación venezolana en cacao: Situación actual del mejoramiento genético. En: Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. [fecha de acceso 05 de abril de 2011]. Disponible en: <http://www.cacao.sian.info.ve/memorias/pdf/15.pdf>

Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno A, Lanaud C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89: 380-386.

Motamayor JC, Risterucci AM, Heath M, Lanaud C. 2003. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity* 91 (3): 322-330.

Motamayor, J. C.; Lanchenaud, P.; Da Silva e Mota, J. W.; Loor, R.; Kuhn, D. N.; Brown, J. S.; Schnell, R. 2008. Geographic and genetic population differentiation the amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *Plos one*. 3 (10): e3311. doi:10.1371/journal.pone.0003311

Muñoz, A., Maisincho, J., Páez, T., Oleas, A., Yánes, V. 2003 Evaluación de la tolerancia de bacterias antagonistas de *Moniliophthora roreri* a plaguicidas y productos afines utilizados en el cacao. Proyecto: Estrategias biológicas para el control de la moniliasis del cacao. Reporte Técnico-Científico. Convenio ESPE-PROMSA IQ-CV-025. Quito, EC. p. 36-42.

Ndoumou, D.O., Ndzomo, G.T., Djocgoue, P.F. 1996. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol contents in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. *Annals of Botany* 77 (2): 153-158.

Nielsen S. 1998. Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.

Nojosa, G.B.A., Resende, M.L.V., Aguilar, M.A.G., Bezerra, K.M.T. & Anher, D.E. 2003. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira* 28:148-154.

Nyadanu D., Akromah R., Adomako B., Kwoseh C., Lowor S.T., Dzahini H., Akrofi A., Owusu F., Assuah M. Histological mechanisms of resistance to black pod disease in cacao (*Theobroma cacao* L.). 2012. *Journal of Plant Sciences* 7 (2): 39-54.

Nyadanu, D., Akromah R., Adomako B., Kwoseh C., Lowor S.T., Dzahini-Obiatey H., Akrofi A.Y., Owusu Ansah F., Yaw Opoku Asiana and Assuah M.K., 2013. Biochemical Mechanisms of Resistance to Black Pod Disease in Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3: 20-37.

Okomolo, N. D., Tsala N. G., and Djocgoue P. F., 1996. Changes in carbohydrates, amino acid and phenol contents in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. *Annals of Botany* 77: 153-158.

Omokolo, N. D.; Nankeu, D. J.; Niemenak, N.; Djocgoue, P. F. 2002. Analysis of amino acids and carbohydrates in the cortex of nine clones of *Theobroma cacao* L. in relation to their susceptibility to *Phytophthora megakarya* Bra. And Grif. *Crop Protection*. 21: 395-402.

Omokolo, N.D. and T. Boudjeko, 2005. Comparative analyses of alterations in carbohydrates, amino acids, phenols and lignin in roots of three cultivars of *Xanthosoma sagittifolium* (macabo) infected by *Pythium myriotylum*. *South African Journal of Botany* 71, 432–440.

Osawa, K.; Matsumoto, T.; Maruyama, T.; Naito, Y.; Okuda, K.; Takazoe, I. 1990. Inhibitory effects of aqueous extract of cacao bean husk on collagenase of *Bacteroides gingivalis*. *Bulletin of Tokyo dental college*. 31: 125–128.

Palm, C. y Rowland, A. 1997. A minimum dataset for characterization of plant quality for decomposition. In. *Driven by nature: plant litter quality and decomposition*. Eds. Cadisch, G; Giller, K. CAB International. Wallingford, UK. p. 379-392.

Parra, Dercy. 2008. Resultados preliminares de la Caracterización de la colección de Barlovento, ubicada en el Banco de Germoplasma Campo Padrón.

PAST PAleontological Statistics. (2009). Version 1.94b Øyvind Hammer Natural History Museum University of Oslo.

Paulin, D.; Ducamp, M.; Lachenaud, P. 2008. New sources of resistance to *Phytophthora megakarya* identified in wild cocoa tree populations of French Guiana (en línea). *Crop Protection* 27: 1143-1147.
<http://www.worldcocoafoundation.org/scientific-research/research-library/documents/Paulin2008.pdf>

Ploetz, R. C. 2007. Cacao disease: Important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology*. 97 (12): 1634-1639.

Portillo E, Segnini L, Parra R. 2000. Importancia en la calidad y la denominación de origen en la producción de cacao en Venezuela. En: *Memorias I Congreso*

Venezolano del cacao y su Industria, fecha de acceso 05 de septiembre de 2010].
Disponible en: <http://www.cacao.sian.info.ve/memorias/html/16.html>

Portillo, E.; Graziani de Fariñas, L.; Cros, E. 2006. Efecto de algunos factores post-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía-LUZ*. 23 (1): 51-59.

Quintero, M.; Díaz, K. 2004. El mercado mundial del Cacao. *Agroalimentaria*. 18: 47-59.

Reyes, H.; Capriles, L. 2000. El Cacao en Venezuela. Moderna Tecnología para su cultivo. Caracas, Venezuela. Editado por Chocolates el Rey. 270 pp.

Scarpari L.M., L.W. Meinhardt, P. Mazzafera, A.W.V. Pomelle, M.A. Schiavinato, J.C.M. Cascardo and G.A.G. Pereira, 2005. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *Journal of Experimental Botany* 56 (413), 865–877.

Schwimmer S. & Bevenne A., 1956. *Science*. 123, 543.

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimeter of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol*. (299): 152-178.

Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S. 2001. *Química Analítica*. 7ma ed. Mc Graw Hill.

Skoog, Douglas A. Holler, James, (aut). Martín Gómez, María del Carmen (tr.). (2006). Principios de análisis instrumental. McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A. 7^{ma} edición.

Sukha, D. A.; Buttler D. R. 2006. The CPCP/IICO/INIAP Cocoa Flavour Project – Investigating the Spectrum of Fine Flavour Within Genotypes and Between Origins. Ingenio Newsletter. Cocoa Research Unit, University of West Indies, Trinidad. Trabajo presentado en la reunión anual de COPAL, Costa Rica. En González, E. 2007. Denominación de origen cacao Chuao Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco del estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen., 1-62.

Surujdeo-Maharaj, S.; Umaharan, P.; Butler, D. R. 2004. Assessment of resistance to witches'-broom disease in clonal and segregating populations of *Theobroma cacao*. *Plant Disease*. 88 (8). 797-803.

Surujdeo-Maharaj, S.; Umaharan, P.; Iwaro, A. D. 2001. A study of genotype-isolate interaction in cacao (*Theobroma cacao* L.): resistance of cacao genotypes to isolates of *Phytophthora palmivora*. *Euphytica*. 118 (3): 295-303.

Tahi, M.; Kebe, I.; Eskes, A. B.; Ouattara, S.; Sangare, A.; Mondeil, F. 2000. Rapid screening of cacao genotypes for field resistance to *Phytophthora palmivora* using leaves, twigs and roots. *European Journal of Plant Pathology*. 106 (1): 87-94.

Tahi, G. M., Kébe, B. I., Sangare, A., Cilas, C., and Eskes, A. B. 2007. Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in field: the effect of light intensity and time of day of leaf collection. *Plant Pathology* 56: 219-226.

Tarjot, M. 1972. Contribution a l'étude du comportement des feuilles de cacaoyer envers le *Phytophthora palmivora*. *Café, Cacao, Thé* (Francia). v. 16(4) p. 333-338).

Terry, L. A.; Joyce, D. C.; Adikaram, N. K. B.; Khambay, B. P. S. 2004. [Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues](#). Postharvest Biology and Technology, Volume 31, Issue 2. Pages 201-212.

The Republic of Chocolate <http://www.therepublicofchocolate.net/>, Acceso Septiembre 2010.

UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT (UNCTAD) 2006. Información de mercado sobre productos básicos. (En: <http://www.unctad.org>

Vance, C.P., Kirk, T.K. and Sherwood, R.T., 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann. Rev. Phytopathol. 18, 259-288.

Van der Vossen, H.A.M., 1997. Strategies Of Variety Improvement in Cocoa with Emphasis on Durable Disease Resistance: An External Review Prepared for INGENIC. INGENIC, UK., Pages: 64.

Vos, J. G.; Ritchie, B. J.; Flood, J. 2003. World cocoa Foundation-cocoa information center - Farmer and Educational Training Manuals, CABI Bioscience. (Spanish version) Parte 2.

http://www.worldcocoafoundation.org/scientific-research/research-library/pdf/cabi_part2.pdf. Acceso septiembre 2010

Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M. 1983. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. 1 Edición, Editorial Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M. 1996. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. 2 Edición, Editorial Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Wakam L.N., Tchameni N. S., Fokom R., Etoa X.F. and Debost M. 2011. Flavonoid compounds synthesis by cocoa fruits (*Theobroma cacao* L.) in response to *Phytophthora megakarya* infection. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 7(3): 335-342.

Yemm, E.W., Willis, A.J., 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthron. Biochem. J. 57, 508–514.

Yoshida Y.; Kiyosue T.; Nakashima K.; Yamaguchi-Shinozaki K.; Shinozaki K. 1997. Regulation of Levels of Proline as an Osmolyte in Plants under Water Stress. Plant Cell Physiol. 38(10): 1095-1102 (1997).

Wally, O. and Z.K. Punja, 2010. Enhanced disease resistance in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants over-expressing a rice cationic peroxidase. Planta, 232: 1229-1239.

....

8. ANEXOS

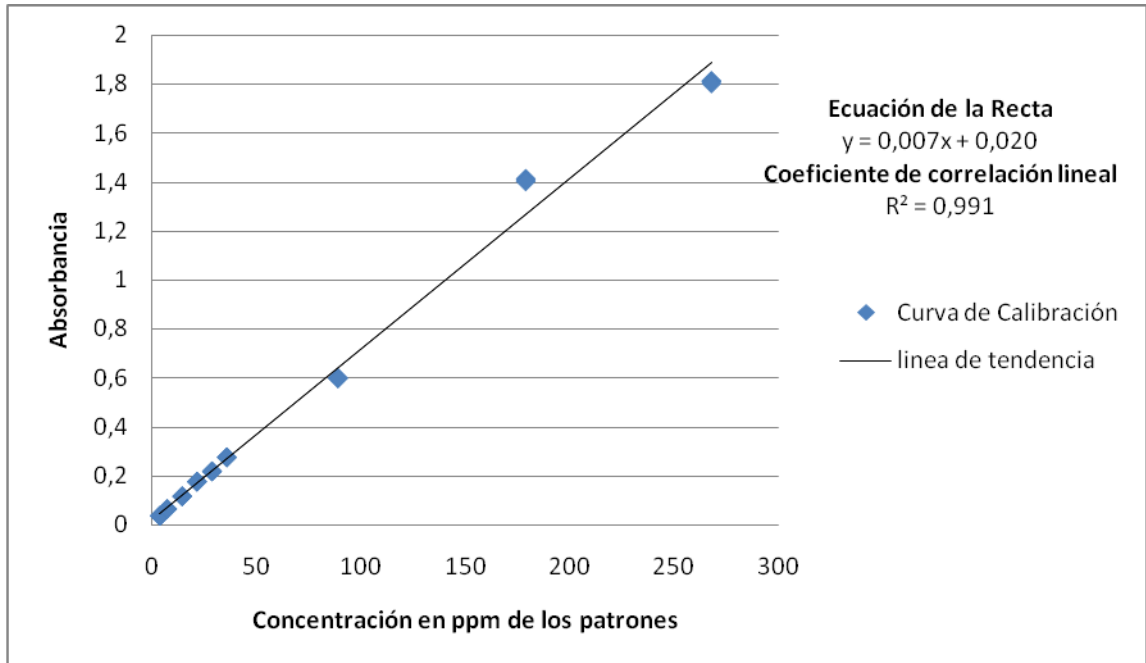


Gráfico 1. Curva de calibración externa para el ácido clorogénico.

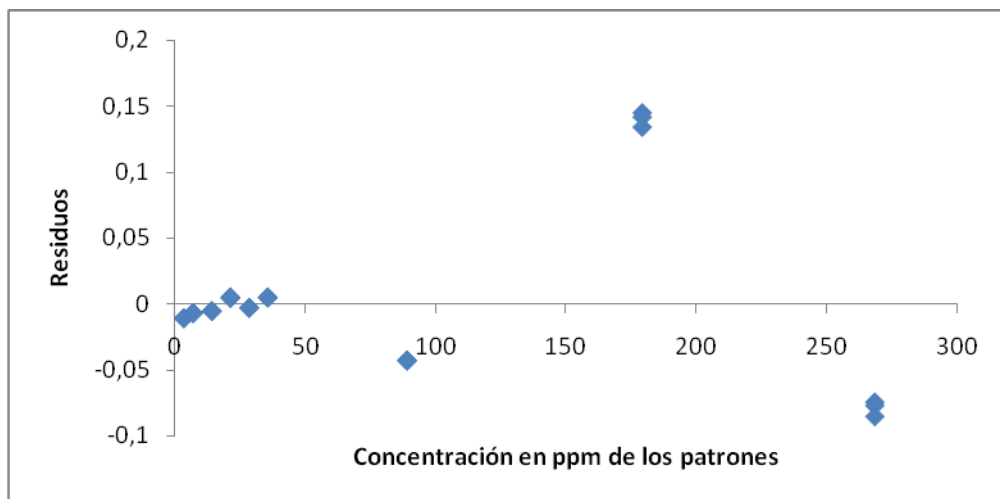


Gráfico 2. Gráfico de residuales de la curva de calibración para el ácido clorogénico.

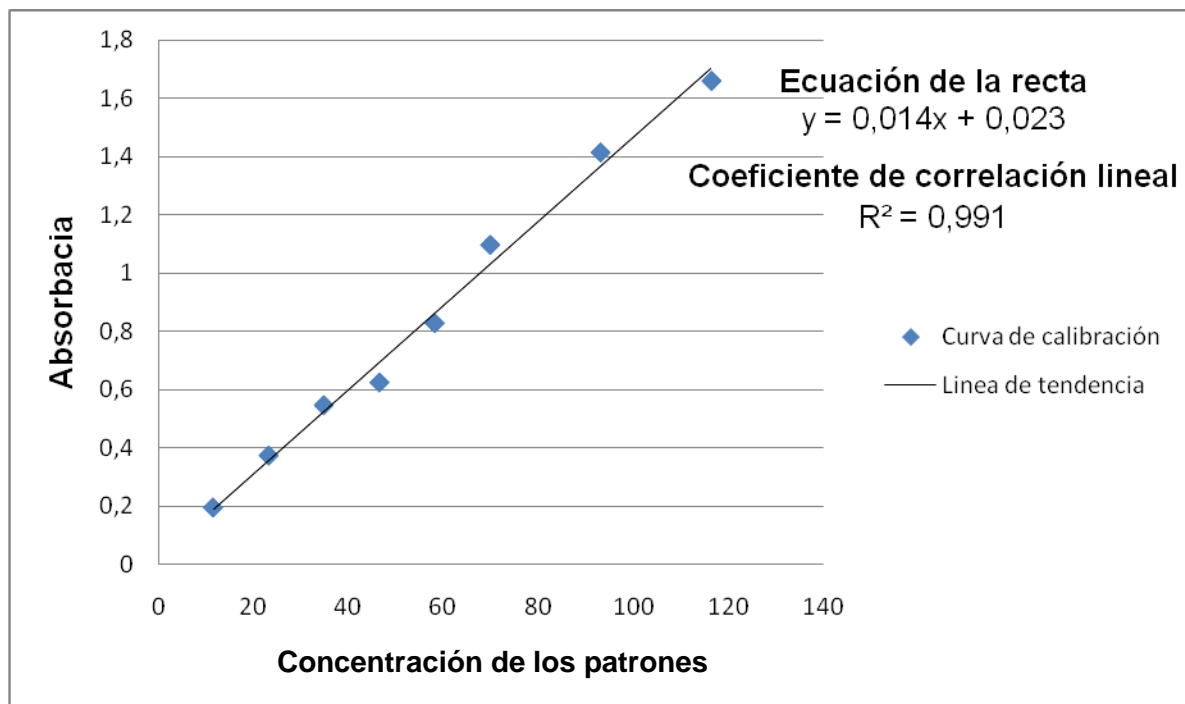
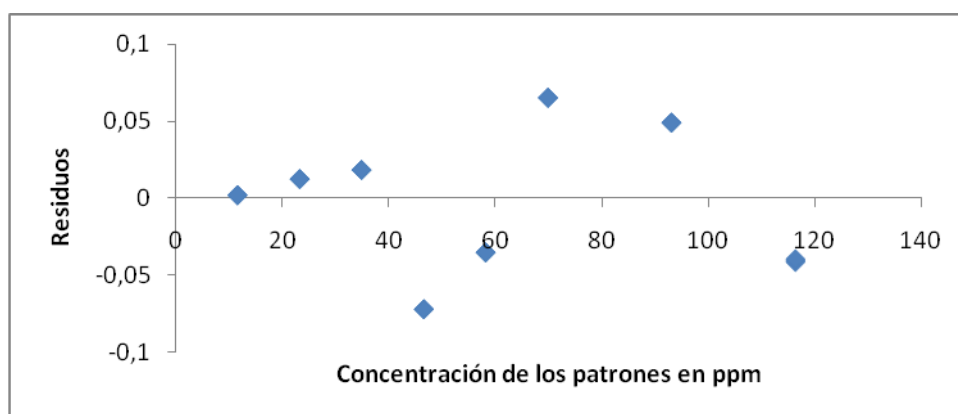
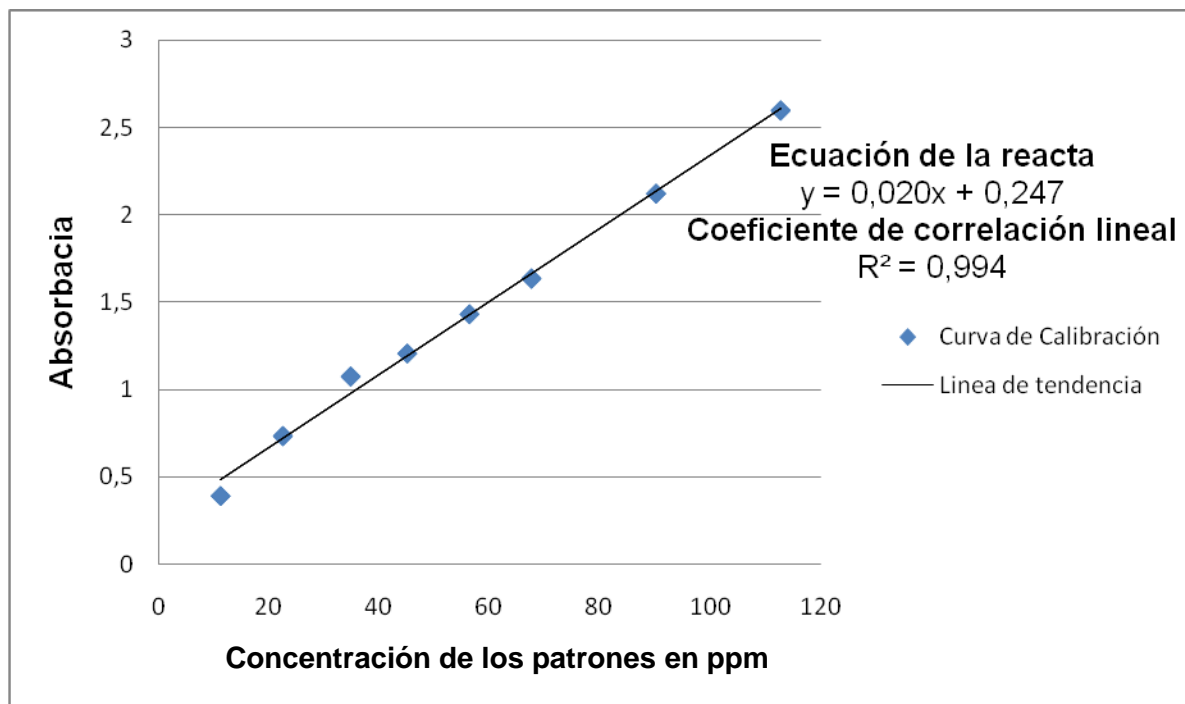


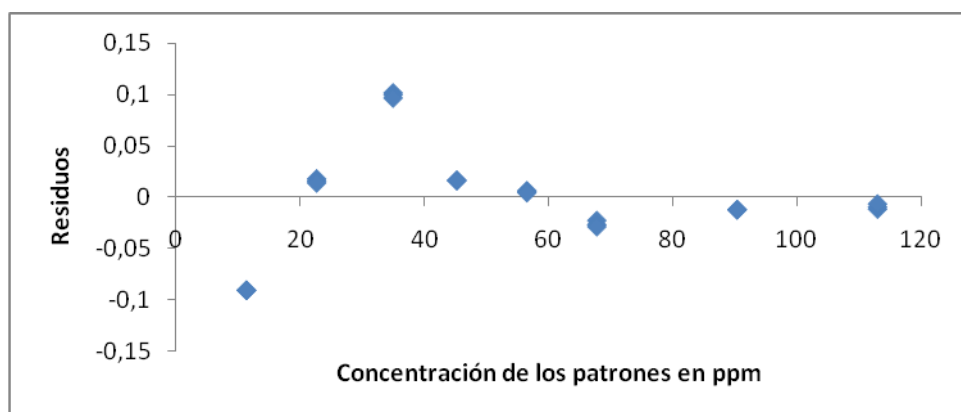
Gráfico 3. Curva de calibración externa para la D-glucosa.



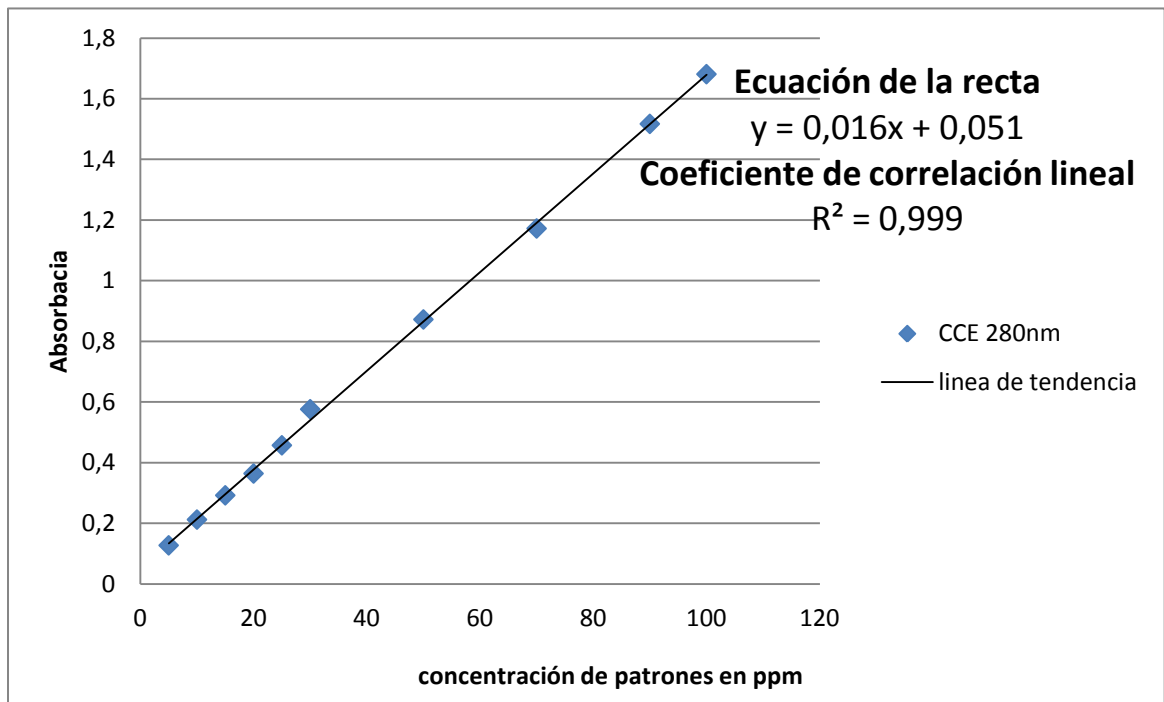
Gráfica 4. Gráfico de residuales para curva de calibración externa de la D-glucosa.



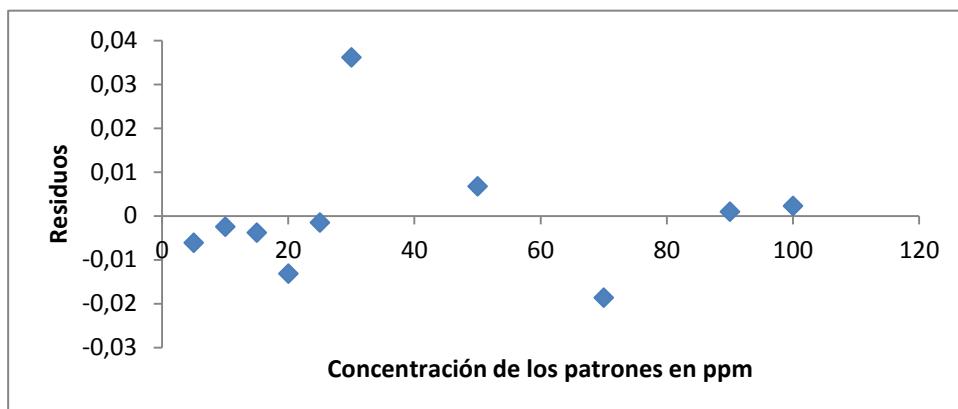
Gráfica 5. Curva de calibración externa para la L-Prolina.



Gráfica 6. Gráfico de residuales de la curva de calibración externa de la L-Prolina.



Gráfica 7. Curva de calibración externa para la lignina comercial.



Gráfica 8. Gráfico de residuales para la curva de calibración externa de la lignina comercial.

Tabla 8. Resumen de datos de Fenoles, Ligninas, Aminoácidos y Carbohidratos de los clones Playa Alta 2 (PA 2) y Scabina 6 (SCA-6) en los tiempos 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

Clon	Tiempo	Trata	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
PA 2	24	Control	FL	3	0,11	0,01	0,10	0,12
PA 2	24	Control	AA	3	0,02	3,3E-05	0,02	0,02
PA 2	24	Control	ligninas	3	3,19	4,7E-03	3,18	3,20
PA 2	24	Control	Carbo	3	0,07	0,00	0,07	0,07
PA 2	24	Control	FS	3	0,21	0,01	0,20	0,22
PA 2	24	Hoja-Agua	FL	3	0,11	0,01	0,09	0,13
PA 2	24	Hoja-Agua	AA	3	0,01	4,6E-04	0,01	0,01
PA 2	24	Hoja-Agua	ligninas	3	3,25	0,16	2,98	3,53
PA 2	24	Hoja-Agua	Carbo	3	0,05	0,00	0,05	0,05
PA 2	24	Hoja-Agua	FS	3	0,19	2,4E-03	0,19	0,20
PA 2	24	Hoja-Hongo	FL	3	0,12	3,3E-03	0,11	0,13
PA 2	24	Hoja-Hongo	AA	3	0,01	8,7E-04	0,01	0,02
PA 2	24	Hoja-Hongo	ligninas	3	1,40	0,09	1,25	1,55
PA 2	24	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,03	0,00	0,03	0,03
PA 2	24	Hoja-Hongo	FS	3	0,29	0,03	0,25	0,34
PA 2	48	Control	FL	3	0,12	0,01	0,11	0,14
PA 2	48	Control	AA	3	0,01	1,2E-04	0,01	0,01
PA 2	48	Control	ligninas	3	1,47	0,02	1,46	1,50
PA 2	48	Control	Carbo	3	0,03	0,00	0,03	0,03
PA 2	48	Control	FS	3	0,27	0,02	0,24	0,30
PA 2	48	Hoja-Agua	FL	3	0,13	0,01	0,11	0,15
PA 2	48	Hoja-Agua	AA	3	0,02	6,3E-04	0,02	0,02
PA 2	48	Hoja-Agua	ligninas	3	1,41	0,06	1,35	1,52
PA 2	48	Hoja-Agua	Carbo	3	0,03	0,00	0,03	0,03
PA 2	48	Hoja-Agua	FS	3	0,29	0,04	0,24	0,38
PA 2	48	Hoja-Hongo	FL	3	0,14	4,9E-03	0,13	0,15
PA 2	48	Hoja-Hongo	AA	3	0,07	1,0E-04	0,07	0,07
PA 2	48	Hoja-Hongo	ligninas	3	0,61	6,1E-04	0,61	0,61
PA 2	48	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,06	3,3E-05	0,06	0,06
PA 2	48	Hoja-Hongo	FS	3	0,20	0,01	0,19	0,21
PA 2	72	Control	FL	3	0,12	0,01	0,12	0,14
PA 2	72	Control	AA	3	0,03	5,7E-04	0,03	0,03
PA 2	72	Control	ligninas	3	0,82	0,02	0,78	0,84
PA 2	72	Control	Carbo	3	0,03	0,00	0,03	0,03
PA 2	72	Control	FS	3	0,14	0,01	0,13	0,16
PA 2	72	Hoja-Agua	FL	3	0,13	0,01	0,11	0,14
PA 2	72	Hoja-Agua	AA	3	0,04	7,8E-04	0,04	0,04
PA 2	72	Hoja-Agua	ligninas	3	0,57	0,01	0,56	0,60
PA 2	72	Hoja-Agua	Carbo	3	0,03	0,00	0,03	0,03
PA 2	72	Hoja-Agua	FS	3	0,21	0,02	0,16	0,24
PA 2	72	Hoja-Hongo	FL	3	0,13	0,01	0,11	0,14
PA 2	72	Hoja-Hongo	AA	3	0,04	1,3E-03	0,04	0,04
PA 2	72	Hoja-Hongo	ligninas	3	0,45	0,01	0,43	0,48
PA 2	72	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,03	0,00	0,03	0,03
PA 2	72	Hoja-Hongo	FS	3	0,19	0,01	0,17	0,21
PA 2	96	Control	FL	3	0,12	0,01	0,11	0,13
PA 2	96	Control	AA	3	0,02	8,1E-04	0,02	0,02
PA 2	96	Control	ligninas	3	0,85	0,03	0,81	0,92
PA 2	96	Control	Carbo	3	0,03	0,00	0,03	0,03
PA 2	96	Control	FS	3	0,18	0,01	0,18	0,20
PA 2	96	Hoja-Agua	FL	3	0,10	0,01	0,08	0,11

PA 2	96	Hoja-Agua	AA	3	0,02	3,2E-04	0,02	0,02
PA 2	96	Hoja-Agua	ligninas	3	1,18	0,02	1,14	1,21
PA 2	96	Hoja-Agua	Carbo	3	0,04	0,00	0,04	0,04
PA 2	96	Hoja-Agua	FS	3	0,23	2,3E-03	0,23	0,23
PA 2	96	Hoja-Hongo	FL	3	0,10	0,01	0,08	0,11
PA 2	96	Hoja-Hongo	AA	3	0,02	6,1E-04	0,02	0,02
PA 2	96	Hoja-Hongo	ligninas	3	1,15	0,03	1,09	1,21
PA 2	96	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,04	0,00	0,04	0,04
PA 2	96	Hoja-Hongo	FS	3	0,26	0,01	0,23	0,28
PA 2	120	Control	FL	3	0,12	0,02	0,08	0,15
PA 2	120	Control	AA	3	0,03	8,3E-04	0,03	0,04
PA 2	120	Control	ligninas	3	1,09	0,03	1,06	1,15
PA 2	120	Control	Carbo	3	0,06	3,3E-05	0,06	0,06
PA 2	120	Control	FS	3	0,24	0,01	0,21	0,25
PA 2	120	Hoja-Agua	FL	3	0,10	0,03	0,05	0,14
PA 2	120	Hoja-Agua	AA	3	0,03	9,8E-04	0,03	0,03
PA 2	120	Hoja-Agua	ligninas	3	0,87	0,03	0,82	0,91
PA 2	120	Hoja-Agua	Carbo	3	0,04	0,00	0,04	0,04
PA 2	120	Hoja-Agua	FS	3	0,23	0,01	0,22	0,25
PA 2	120	Hoja-Hongo	FL	3	0,10	0,01	0,09	0,13
PA 2	120	Hoja-Hongo	AA	3	0,03	6,6E-04	0,03	0,03
PA 2	120	Hoja-Hongo	ligninas	3	0,88	0,02	0,85	0,91
PA 2	120	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,04	3,3E-05	0,04	0,04
PA 2	120	Hoja-Hongo	FS	3	0,20	0,01	0,19	0,21
SCA-6	24	Control	FL	3	0,10	0,02	0,08	0,13
SCA-6	24	Control	AA	3	0,06	0,00	0,06	0,06
SCA-6	24	Control	ligninas	3	0,30	1,7E-04	0,30	0,30
SCA-6	24	Control	Carbo	3	0,03	0,00	0,03	0,03
SCA-6	24	Control	FS	3	0,10	0,01	0,09	0,12
SCA-6	24	Hoja-Agua	FL	3	0,11	0,02	0,08	0,14
SCA-6	24	Hoja-Agua	AA	3	0,06	6,7E-05	0,06	0,06
SCA-6	24	Hoja-Agua	ligninas	3	0,21	2,7E-04	0,21	0,21
SCA-6	24	Hoja-Agua	Carbo	3	0,02	0,00	0,02	0,02
SCA-6	24	Hoja-Agua	FS	3	0,07	0,01	0,05	0,08
SCA-6	24	Hoja-Hongo	FL	3	0,10	0,02	0,05	0,12
SCA-6	24	Hoja-Hongo	AA	3	0,04	3,8E-04	0,04	0,04
SCA-6	24	Hoja-Hongo	ligninas	3	0,36	3,2E-03	0,36	0,37
SCA-6	24	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,02	0,00	0,02	0,02
SCA-6	24	Hoja-Hongo	FS	3	0,12	0,01	0,09	0,13
SCA-6	48	Control	FL	3	0,08	0,01	0,06	0,09
SCA-6	48	Control	AA	3	0,04	1,5E-04	0,03	0,04
SCA-6	48	Control	ligninas	3	0,33	1,6E-03	0,32	0,33
SCA-6	48	Control	Carbo	3	0,02	0,00	0,02	0,02
SCA-6	48	Control	FS	3	0,10	4,0E-03	0,09	0,11
SCA-6	48	Hoja-Agua	FL	3	0,08	0,01	0,06	0,10
SCA-6	48	Hoja-Agua	AA	3	0,05	3,5E-04	0,05	0,05
SCA-6	48	Hoja-Agua	ligninas	3	0,22	1,5E-03	0,21	0,22
SCA-6	48	Hoja-Agua	Carbo	3	0,02	0,00	0,02	0,02
SCA-6	48	Hoja-Agua	FS	3	0,05	0,01	0,03	0,06
SCA-6	48	Hoja-Hongo	FL	3	0,09	3,1E-04	0,09	0,09
SCA-6	48	Hoja-Hongo	AA	3	0,05	1,5E-04	0,05	0,05
SCA-6	48	Hoja-Hongo	ligninas	3	0,53	1,4E-03	0,52	0,53
SCA-6	48	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,04	0,00	0,04	0,04
SCA-6	48	Hoja-Hongo	FS	3	0,11	2,5E-03	0,11	0,11
SCA-6	72	Control	FL	3	0,11	0,01	0,10	0,12

SCA-6 72	Control	AA	3	0,05	6,7E-04	0,05	0,05
SCA-6 72	Control	ligninas	3	0,28	3,7E-03	0,28	0,29
SCA-6 72	Control	Carbo	3	0,02	0,00	0,02	0,02
SCA-6 72	Control	FS	3	0,13	3,7E-03	0,13	0,14
SCA-6 72	Hoja-Agua	FL	3	0,10	3,2E-03	0,09	0,10
SCA-6 72	Hoja-Agua	AA	3	0,07	3,8E-04	0,07	0,07
SCA-6 72	Hoja-Agua	ligninas	3	0,20	1,0E-03	0,20	0,20
SCA-6 72	Hoja-Agua	Carbo	3	0,02	0,00	0,02	0,02
SCA-6 72	Hoja-Agua	FS	3	0,06	0,01	0,06	0,08
SCA-6 72	Hoja-Hongo	FL	3	0,09	0,01	0,07	0,10
SCA-6 72	Hoja-Hongo	AA	3	0,04	4,3E-04	0,04	0,05
SCA-6 72	Hoja-Hongo	ligninas	3	0,66	0,01	0,65	0,67
SCA-6 72	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,04	0,00	0,04	0,04
SCA-6 72	Hoja-Hongo	FS	3	0,08	0,01	0,07	0,09
SCA-6 96	Control	FL	3	0,13	0,02	0,10	0,18
SCA-6 96	Control	AA	3	0,05	4,3E-04	0,05	0,05
SCA-6 96	Control	ligninas	3	0,20	1,7E-03	0,20	0,20
SCA-6 96	Control	Carbo	3	0,02	0,00	0,02	0,02
SCA-6 96	Control	FS	3	0,08	0,01	0,07	0,10
SCA-6 96	Hoja-Agua	FL	3	0,09	0,02	0,05	0,13
SCA-6 96	Hoja-Agua	AA	3	0,02	3,0E-04	0,02	0,02
SCA-6 96	Hoja-Agua	ligninas	3	0,75	0,01	0,73	0,77
SCA-6 96	Hoja-Agua	Carbo	3	0,02	0,00	0,02	0,02
SCA-6 96	Hoja-Agua	FS	3	0,09	0,01	0,08	0,10
SCA-6 96	Hoja-Hongo	FL	3	0,14	4,1E-03	0,13	0,14
SCA-6 96	Hoja-Hongo	AA	3	0,05	6,9E-04	0,05	0,05
SCA-6 96	Hoja-Hongo	ligninas	3	0,84	0,01	0,82	0,86
SCA-6 96	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,06	0,00	0,06	0,06
SCA-6 96	Hoja-Hongo	FS	3	0,09	0,01	0,08	0,10
SCA-6 120	Control	FL	3	0,13	0,02	0,10	0,16
SCA-6 120	Control	AA	3	0,07	5,0E-04	0,07	0,07
SCA-6 120	Control	ligninas	3	0,16	1,1E-03	0,15	0,16
SCA-6 120	Control	Carbo	3	0,02	0,00	0,02	0,02
SCA-6 120	Control	FS	3	0,06	0,01	0,05	0,07
SCA-6 120	Hoja-Agua	FL	3	0,12	0,01	0,10	0,15
SCA-6 120	Hoja-Agua	AA	3	0,02	6,7E-04	0,02	0,03
SCA-6 120	Hoja-Agua	ligninas	3	0,69	0,02	0,66	0,72
SCA-6 120	Hoja-Agua	Carbo	3	0,03	0,00	0,03	0,03
SCA-6 120	Hoja-Agua	FS	3	0,12	5,0E-03	0,11	0,13
SCA-6 120	Hoja-Hongo	FL	3	0,07	0,01	0,06	0,09
SCA-6 120	Hoja-Hongo	AA	3	0,02	4,9E-04	0,02	0,02
SCA-6 120	Hoja-Hongo	ligninas	3	1,82	0,04	1,75	1,88
SCA-6 120	Hoja-Hongo	Carbo	3	0,06	0,00	0,06	0,06
SCA-6 120	Hoja-Hongo	FS	3	0,12	0,01	0,10	0,14