



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL MECANISMO DE LA
ENFERMEDAD DE LA MONILIASIS EN LA INTERACCIÓN *Moniliophthora roreri*
– *Theobroma cacao*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

VÍCTOR JESÚS ALBORES FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

DR. MIGUEL SALVADOR FIGUEROA, Instituto de Biociencias. UNACH.

COTUTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA, Instituto de Investigaciones en
Ecosistemas y Sustentabilidad. UNAM.

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN, Departamento de Ecología
Funcional. UNAM.

MÉXICO, Cd. Mx.

DICIEMBRE DE 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL MECANISMO DE LA
ENFERMEDAD DE LA MONILIASIS EN LA INTERACCIÓN *Moniliophthora roreri*
– *Theobroma cacao*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

VÍCTOR JESÚS ALBORES FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

DR. MIGUEL SALVADOR FIGUEROA, Instituto de Biociencias. UNACH.

COTUTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA, Instituto de Investigaciones en
Ecosistemas y Sustentabilidad. UNAM.

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN, Departamento de Ecología
Funcional. UNAM.

MÉXICO, Cd. Mx.

DICIEMBRE DE 2017.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de agosto de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ALBORES FLORES VÍCTOR JESÚS** con número de cuenta **512028017** con la tesis titulada: "**Descripción morfológica y bioquímica del mecanismo de la enfermedad de la Moniliasis en la interacción Moniliophthora roreri-Theobroma cacao**", realizada bajo la dirección del **DR. MIGUEL SALVADOR FIGUEROA**:

Presidente:	DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
Vocal:	DR. JOHN LARSEN
Secretario:	DRA. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN
Suplente:	DR. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA
Suplente	DR. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 26 de septiembre de 2017.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir el espacio para desarrollar estudios de doctorado y fomentar a través de su gente la generación de conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por el apoyo económico bajo el esquema de beca (becario número 269597) otorgado para la realización de estudios de doctorado.

A los integrantes del Comité Tutoral, quienes guiaron el curso de la investigación y de mi formación como estudiante posgraduado.

Dr. Miguel Salvador Figueroa.

Dr. Francisco Javier Espinosa García.

Dra. María Graciela García Guzmán.

AGRADECIMIENTO A TITULO PERSONAL

Este documento es el resultado del trabajo colaborativo de muchas personas e instituciones. A TODAS GRACIAS POR SU APORTACIÓN TÉCNICA, INTELECTUAL Y MORAL.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a su gente y a sus programas por fomentar la formación de seres humanos, serviciales, sensibles a las problemáticas del país y por aceptarme como estudiante en el Posgrado en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el apoyo económico.
A la Universidad Autónoma de Chiapas, especialmente al Centro de Biociencias (CenBio) ahora convertido en Instituto de Biociencias (IBC) que aportó sus recursos, materiales y humanos para el desarrollo experimental del proyecto y me permitió convivir en un espacio laboral de trabajo en equipo.

Agradezco intensamente al director de la tesis, Dr. Miguel Salvador Figueroa. Por su decisivo empeño en que realizara los estudios de doctorado, por revisar mi progreso académico, por darme la confianza y libertad en el desarrollo de la investigación como estudiante de doctorado vigilando arduamente mis avances, por compartir su amistad e incorporarme a su grupo de trabajo.

A mi cotutor, el Dr. Francisco Javier Espinosa García, por escuchar, encausar de manera adecuada el curso de la investigación, por aceptarme en su laboratorio, por sus atinados y valiosos comentarios, y por compartir conmigo su conocimiento y experiencia como investigador.

A la Dra. María Graciela García Guzmán, miembro de mi comité tutor, por su dedicación, observaciones, sugerencias acertadas, por compartir su conocimiento y apoyo durante mi estancia como estudiante de doctorado en la UNAM.

A los revisores de la Tesis, Dres. Juan S. Núñez Farfán, John Larsen, Graciela García Guzmán, Alma Rosa González Esquinca y Julio César Vega Arreguín, por su cuidadosa aportación y sus críticas que enriquecieron a la misma.

A la Dra. María de Lourdes Adriano Anaya, por su apoyo sostenido y la enseñanza continúa en todas las áreas del quehacer de la investigación. Más por su amistad y conservado ímpetu de formar recurso humano, de calidad. A todos los colegas que participaron en mi formación y tuvieron la amabilidad de compartir conmigo un momento de sus vidas (tiempo y espacio), en el Instituto de Biociencias de Chiapas, en el Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de Morelia, Michoacán, y en el Colegio de Posgraduados, Montecillos, estado de México.

Agradezco al Dr. Gustavo Mora Aguilera, por su valioso conocimiento, enseñanza y apoyo invaluable en el área de la Epidemiología, en el Colegio de Posgraduados (COLPOS), de Montecillos Estado de México.

Agradecimiento a la Dra. Leticia Miron Melo, por su amistad, conocimiento y e invaluable apoyo durante mi estancia en el IIES y en los trámites de los procesos administrativos en la UNAM. A la Ingeniero y Técnico de Laboratorio Yolanda García a cargo del Dr. Francisco Espinosa García, por su amistad e invaluable apoyo y enseñanza, durante mi estancia en el IIES. A los futuros ingeniero Biotecnólogo Isaac Toledo y Melesio Marto Gonzales, por su incansable apoyo en la colecta de muestras en campo y manejo de ellas en laboratorio. Al M. B. Rito Coronel Niño y su esposa Veronika, por su apoyo incondicional en la colecta y manejo de muestras de frutos de cacao, en campo y laboratorio; y también por su amistad.

A la M. B. María Guadalupe de Gyves Córdova, por su apoyo en aspectos laborales y administrativos dentro del IBC y por su valiosa amistad.

A los doctores Julieta Grajales Conesa, Rodolfo Torres de los Santos y al Maestro Alfonso López García, por su amistad incondicional y apoyo, por sus certeras observaciones y sugerencias en el desarrollo de la tesis y artículo de investigación.

A los colegas, con quienes compartimos historias propias del quehacer cotidiano, MB. Sonia Ruíz González, MB. Rito Coronel Niño, IBT Gemelli López Martínez, MB Adriana Sánchez Gutiérrez, Dr. Isidro Ovando Medina, Dr. Alfredo Vázquez Ovando.

A la MC. Nancy Gálvez Reyes por su invaluable apoyo en las gestiones administrativas en la coordinación del Instituto de Biología y por su valiosa e incondicional amistad.

Agradezco a la Dra. Alma Rosa González Esquinca de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, por su asesoría, observaciones y apoyo certero en el desarrollo textual de la Tesis, incluyendo el apoyo de los procesos administrativos como coordinadora del programa de Posgrado en Chiapas. En este mismo sentido, a la MC. Christian Anabi Riley Saldaña por su invaluable apoyo.

Agradezco a Dios, infinitamente a mi MADRE, Martha Flores Morales, por apoyo incondicional, sus palabras de aliento para proseguir en mi formación académica y profesional, y a mi Hermana, Claudia Ivette Albores Flores, por sus palabras y apoyo moral. La familia es el pilar más grande de todo ser humano, y el origen de su formación.

A todos los demás que apoyaron la realización de este trabajo, indicando de esta manera para evitar OMITIR algún nombre. A todos ustedes, que habrán sido Peones o Alfiles, durante el desarrollo de esta Tesis..... Mil Gracias.

INDICE

	Pags
Resumen	1
Abstract	3
CAPITULO 1. Introducción	5
CAPITULO 2. Co-evolución entre hongos hemibiotrófos y plantas hospederas	17
CAPITULO 3. Degree of domestication influences susceptibility of <i>Theobroma cacao</i> to frosty pod rot: a severe disease devastating Mexican cacao.	34
CAPITULO 4. La susceptibilidad de <i>Theobroma cacao</i> a moniliasis está relacionado con la edad	59
CAPITULO 5. Análisis epidémico de la moniliasis del cacao en el Soconusco, Chiapas	86
CAPITULO 6. Discusión general y Conclusiones	103
REFERENCIAS	106

RESUMEN

La interacción planta-patógeno, es generada por la relación susceptibilidad / resistencia que presenta el hospedero dependiendo de factores como: el grado de domesticación de la planta, las prácticas agrícolas aplicadas durante los procesos de producción, las condiciones ambientales y la estrategia usada por el patógeno (biotrófo, necrotrófo o hemibiotrófo). La patogénesis formada de dicha interacción, es el resultado de procesos evolutivos (hospedero) y co-evolutivos (durante el proceso de domesticación de las plantas). El objetivo del presente trabajo fue, determinar las características fisicoquímicas y morfológicas en el desarrollo de la moniliasis de cacao en la interacción *Theobroma cacao* – *Moniliophthora roreri*.

Para cubrir este objetivo, en la zona del Soconusco, Chiapas se seleccionaron diez municipios con un mínimo de una hectárea comercial, evaluando mensualmente la incidencia de la enfermedad en 50 plantas seleccionadas de la variedad Trinitario, retirando los frutos enfermos mensualmente. En dos de los diez predios se seleccionaron 10 plantas de cada variedad (Criollo, Trinitario y Forastero), en ambos predios se evaluó semanalmente el desarrollo de la incidencia de la moniliasis, marcando los frutos enfermos cada semana para evitar confusiones en las semanas posteriores, además se aseguraron frutos después del amarre, por 12 semanas, para evitar que se infectaran de *M. roreri*.

En los dos predios se colectaron frutos sanos en la cuarta, octava y doceava semana de desarrollo, para determinar la zona más susceptible a la moniliasis y sus características fisicoquímicas después del amarre. Se analizó contenido de compuestos fenólicos, actividad peroxidasa (POX), humedad, pH, firmeza, en histoquímica fue concentración de lignina y fenoles, en frutos sanos. Los resultados muestran una relación directa con la edad fenológica del fruto (4<8<12), observando que la variedad Forastero presenta mayor actividad POX, mayor concentración de compuestos fenólicos, mayor firmeza y menor humedad, y fue la variedad con menor valor de incidencia (4: 5.0, 8: 7.6 y 12:1.0 %). La zona con menor cantidad de lignina, firmeza y compuestos fenólicos, es la zona media del fruto en las tres variedades de cacao, siendo la variedad Criollo la que presenta una relación directa con los valores mayores de incidencia en esta zona del fruto.

En el segundo de los dos predios seleccionados, los frutos con edades de cuatro, ocho y doce semanas, se analizaron las variables fisicoquímicas antes mencionadas y se realizó la inoculación de esporas de *M. roreri*, fijados con una biopelícula de quitosán. Se encontró que las edades de cuatro y ocho semanas son los más susceptibles a ser infectados por *M. roreri* y a desarrollar la enfermedad.

La susceptibilidad expresada por los frutos de cacao, en cada municipio, está relacionado a las condiciones ambientales de humedad y temperatura. Los municipios con mayor daño

fueron Villa comaltitlan y Tapachula. El síntoma más expresado fue el de necrosis, en todos los municipios. Acacoyahua es el municipio con menor presencia de moniliasis, seguido por Tuzantan.

Se determino que la relación susceptibilidad / resistencia está asociado a la edad del fruto, a las propiedades fisicoquímicas del pericarpio, a las condiciones edafoclimaticas y al grado de domesticación de la variedad.

Palabras claves: Propiedades Fisicoquímicas, variedades, cacao, moniliasis, incidencias, susceptibilidad.

ABSTRACT

The plant - pathogen interaction is caused by the relationship between susceptibility and resistance, which depends on many factors, such as; degree of domestication, agricultural practices in processes production, environmental conditions and the pathogen infection strategy. Then, this pathogenesis is produced as a result of evolutive processes (host) and co-evolutive (in plant domestication process). Therefore, the aims of this study was to determine the physicochemical and morphological characteristics of frosty pod rot cacao on *Moniliophthora roreri* - *Theobroma cacao* interaction.

In the Soconusco, Chiapas, ten municipalities were selected with minimum area of one cacao hectares, then, 50 plants were marked to evaluate the incidence each month by eliminating the infected fruits. In two municipalities, two plots cultivated were chosen with ten plants of each cacao variety, and incidence was evaluated weekly. Twenty fruits of every cacao variety for each age were washed with sterile saline solution and kept in a cellophane bag to protect them from the possible arrival of *M. roreri* conidia.

In the two plots the healthy cultivated fruits were collected to determine the susceptibility fruit zone to moniliasis and the physicochemical properties. The phenolics and lignin content, peroxidase activity, moisture, pH, firmness were evaluated in healthy fruits.

Our results showed a direct relationship between physicochemical properties and the phenological fruit age, where forastero variety registered the highest value of peroxidase activity, phenolics compounds content, firmness and lower moisture values. This cacao variety registered lower incidence values (4: 5.0, 8: 7.6 y 12:1.0 %). The fruit zone with lower lignin, firmness and phenolics compounds content was the middle zone for the three cacao varieties. In the criollo variety a significant association between the lower values of physicochemicals properties and the highest incidence values was found.

In the second municipalitie, fruits were inoculate with *M. roreri* spores on fruit pericarp and a chitosan bio layer was used for protection. We found that the fruits of 4 and 8 weeks age were more susceptible to infection and to produce the disease.

The cacao fruits susceptibility in each municipalities is related to moisture and temperature. The municipalities that showed more fruits damage were Villa Comaltitlan and Tapachula. The symptom more expressed in cacao fruits was necrosis, on all the plot cultivate of each municipalities. The municipalities with lower presence of moniliasis were Acacoyahua and Tuzantan.

It was found that the relationship between susceptibility and resistance is associated with the fruits age, physical-chemical properties of pericarp, environmental condition and degree of domestication.

Key Word: Physicochemical properties, varieties, cacao, moniliasis, susceptibility, incidence.

CAPITULO 1
INTRODUCCIÓN
MONILIASIS DEL CACAO

INTRODUCCIÓN

El árbol del cacao (*Theobroma cacao. L.*), es nativo del Sur de América. La alta diversidad genética encontrada en la región Amazónica del Perú, Colombia y Ecuador, lo sitúa como su centro de origen (Romero et al. 2010). Los tres grupos genéticos descritos y cultivados en el mundo, son el Criollo (*T. cacao ssp, cacao*), Forastero (*T. cacao ssp, Sphaerocarpum*) (Loor et al. 2009; Rangel-Fajardo et al. 2012), y el tercer grupo generado por la cruce entre Criollo y Forastero, denominado Trinitario, se originó en Trinidad y Tobago (Sánchez – Mora et al. 2012).

La variedad Criolla, con características organolépticas deseables, fue domesticada por los mayas (o sus antepasados) hace 3800 años en el sur de México (Whitkus et al. 1998; Powis et al. 2011). La variedad Forastero (*T. cacao sphaerocarpum*) fue cultivada en América del Sur y se constituyó hace 500 años, con un menor proceso de domesticación. Por su alto rendimiento y con característica de resistencia a las enfermedades fúngicas, la variedad Forastero se ocupa en la mayoría de la producción de chocolate en América. La tercera variedad, Trinitario, originado hace 250 años y con características derivadas de sus progenitores, es considerada como de resistencia media a enfermedades (Whitkus et al. 1998; Arguello et al. 2000; Motamayor et al. 2008).

El fruto de la variedad Criolla se caracteriza por ser alargado, con surcos profundos paralelos a la forma del fruto y con ligeras protuberancias en la superficie que le dan un aspecto rugoso (Figura 1). El ápice del fruto es puntiagudo o con forma similar a cola de raton. Las semillas son de color blanco o crema. Los principales tipos de Criollo son cacao Pentágona, cacao Real y cacao Porcelana (Arguello et al. 2000; Motamayor et al. 2002).

El fruto de la variedad forastero, presenta una estructura morfológica amenolada, una superficie lisa o ligeramente rugosa, con surcos ligeramente pronunciados paralelo a la forma del fruto (Figura 2). El Forastero se diferencia del Criollo, por tener mayor dureza en

su pericarpio. La semilla es mas rosa por el mayor contenido de fenoles. Esta variedad es denominada amazónica. Los tipos de frutos Forasteros son: Iquito, Nanay, Parinari y Scavina (Braudeu, 1970; Arguello et al. 2000; Motamayor et al. 2002).

La variedad Trinitario, presenta un fruto ovalado similar a la forma de un balón de futbol americano, un ligero apice de terminación en punta, con surcos ligeramente pronunciados paralelos a la forma del fruto y una superficie ligeramente rugosa (Figura 3). La dureza del pericarpio es intermedia, respecto a las otras dos variedades (Davies, 1986; Arguello et al. 2000; Motamayor et al. 2002).



Figura 1. Fruto variedad Criollo



Figura 2. Fruto variedad Forastero.



Figura 3. Frutos variedad Trinitario.

Theobroma cacao es la especie más representativa del género *Theobroma* y por sus características agroalimentarias es la de mayor importancia comercial a nivel mundial. Por los requerimientos edafo-climáticos, el cultivo de cacao es producido en la franja ecuatorial de América, Asia y África (Witkus et al. 1998; Efombagn et al. 2007; Espinosa-García et al. 2015).

La semilla es la parte más importante del cultivo de cacao y se produce en promedio de 40 por fruto. Por sus propiedades, las semillas del cacao son utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y en la elaboración de chocolate (por la manteca de cacao, torta de cacao y licor de cacao) (Ploetz, 2007; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). La producción de cacao se ha reducido en un 80% y únicamente se cosecha el 20 % del total de los frutos amarrados después de la etapa de fructificación (Bowers et al. 2001; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007).

El fruto de cacao es el único órgano de la planta donde se expresa la moniliasis y genera efectos devastadores en todas las regiones donde se introduce esta enfermedad (Bowers et al. 2001; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Phillips-Mora y Cerda, 2009). A pesar que la diversificación agrícola amortiza los efectos de la moniliasis, los productores de cacao abandonan las plantaciones o cambian de cultivo (por café, flores o pastos) (Franzen y Borgerhoff, 2007).

El estudio de la moniliasis inicio con la investigación de J. B. Rorer (1917), continuado por Evans (1978, 1981, 2003), Griffith (2004) y Phillips – Mora (2003, 2005 y 2007). El agente causal de la moniliasis es *Moniliophthora roreri*, que pertenece a la familia de los

Marasmiaceae, del orden Agaricales y es específico del fruto de cacao (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Correa et al. 2014; Meinhardt et al. 2014). Este hongo es hemibiotrófo y posterior a la penetración en el fruto genera inicialmente la fase biotrófica (considerada como parasítica), la segunda fase es la destructiva y se expresa después de la tercera u octava semana de haber infectado el fruto (Phillips-Mora et al. 2005; Rodríguez et al. 2006; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Bailey et al. 2013; Meinhardt et al. 2014; Correa et al. 2014).

Se reportan cinco grupos genéticos de *M. roreri*, de los cuales en Colombia se encuentran los grupos clasificados como Co-East (Primero) y Co-Central (segundo), los dos se consideran endémicos y están localizados en la región del Magdalena Medio y Santander. El tercero (el grupo Gilari) está en Ecuador, el cuarto (grupo Bolívar) se ubica en el Oriente de Colombia, periferia de Ecuador, Venezuela y Perú. Y el quinto se ubica en el Occidente de Colombia, centro de Ecuador y América Central denominado como grupo Co-occidente (Phillips-Mora et al. 2005; Phillips-Mora et al. 2006; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Sanchez -Mora y Garces, 2012).

La moniliasis del cacao, se desarrolla en el pericarpio del fruto por tener características adecuadas para el crecimiento del patógeno (Evans et al. 2003). El pericarpio está formado por tres partes, 1) el exocarpo o sección exterior, formado por un tejido esponjoso, con o sin pigmentaciones y de espesor variable (según variedad y edad), 2) el mesocarpo, es una capa de células semileñosas, dura, cuya características varía según la variedad (en criollos es suave y en forasteros es dura), y c) endocarpo, es carnoso y suave, unido por continuidad al mucílago que rodea a todas las semillas, generando una protección a estas (Avendaño et al. 2011, 2013). Acorde al arreglo de sus células, las primeras dos partes del pericarpio presentan mayor acumulación de lignina en la pared celular y menor en la parte más interna y este arreglo está directamente relacionado con la edad y variedad del fruto (Nyadanu et al. 2012).

Las condiciones climáticas y el estado fenológico del fruto, influyen sobre diferentes tonalidades de color marron que se expresan en los síntomas de la moniliasis y en la formación del halo amarillo que lo acompaña (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Johnson et

al. 2008; Sánchez-Mora y Garcés, 2012). Además, la necrosis externa llega a cubrir toda la superficie del pericarpio del fruto, en un tiempo no mayor de 5 a 9 días. La necrosis interna se distribuye en todas las partes del pericarpio y puede llegar hasta las semillas (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Johnson et al. 2008; Sánchez-Mora y Garcés, 2012; Bailey et al. 2013; Melnick et al. 2013).

Entre otros síntomas, se reporta el desarrollo de deformaciones con posterior necrosis y la muerte de frutos pequeños (Chireles). La muerte de chireles es confundida con la muerte fisiológica, denominada aborto (Johnson et al. 2008; Melnick et al. 2013). Por otro lado, en frutos de 60 a 80 días de edad (infectados), se ve limitada la fase de madurez fisiológica sin detener su crecimiento. Es normal que después de los 60 días los frutos no expresen síntomas externos y el avance de necrosis se genera en el tejido interno, sin alcanzar la zona donde están las semillas. Al final de la necrosis interna, estos frutos expresan un síntoma de color amarillo, denominado madurez prematura (Reuck, 1997; Johnson et al. 2008; Sánchez y Garcés, 2012).

La edad del fruto de cacao influye en el grado de severidad que alcanza el síntoma de la moniliasis (externo o interno), en el pericarpio. En frutos menores a nueve semanas de edad, el micelio de *M. roseri* alcanza la zona de las semillas evitando su desarrollo y genera la pérdida de todas estas. El daño de las semillas, se observa con la generación de una sola masa compacta (mucilago y semillas) donde los tejidos son rodeados de una sustancia acuosa completa o parcialmente (debido a la descomposición de ellos) (Sánchez y Garcés, 2012).

La moniliasis del cacao se presenta en los primeros tres meses de desarrollo del fruto, reduciéndose la incidencia en la treceava semana, sin observar síntoma en la semana 14. El proceso de infección de los frutos inicia con el establecimiento de los conidios (propágulos infectivos de *M. roseri*), en la superficie del fruto (Phillips-Mora et al. 2005; Rodríguez et al. 2006; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Posterior a la germinación de los conidios, el micelio forma un apresorio para penetrar directamente a los frutos de cacao (Sánchez-Mora y Garcés, 2012; Bailey et al. 2013).

El micelio secundario (denominado infectivo) se origina del apresorio y avanza de forma inter-celular para establecerse en el interior del pericarpio, este micelio se considerada en la fase biotrófica (Bailey et al. 2013). La etapa biotrófica del patógeno en el hospedero puede durar de tres a ocho semanas (este tiempo se considera de incubación antes de expresar los síntomas de moniliasis) y depende de la condición ambiental y nutrimental del cultivo (Phillips-Mora 2005; Phillips-Mora and Wilkinson 2007; Sánchez-Mora y Garcés, 2012). Durante el tiempo de incubación el crecimiento del fruto no se ve afectado y algunos autores postularon que tampoco sus características fisiológicas (Van der Plank, 1977; Evans, 1981, 2003; Krauss y Soberani, 2001; Agrios, 2005).

Posterior al periodo de incubación, el hongo expresa la etapa necrotrófica y el micelio se desarrolla de forma intracelular, excretando enzimas para la degradación de los componentes celulares y de esta forma poder tener acceso a los nutrimentos de la célula. Cuando se genera la etapa necrotrófica, tanto el hospedero como el hongo acumulan metabolitos que producen oxidación del tejido. El hospedero lo realiza como mecanismo de defensa para eliminar o detener el avance del micelio necrotrófico y el patógeno los acumula para matar a las células del hospedero, para alimentarse de ellas (Bailey et al. 2013; Melnick et al. 2013).

La etapa reproductiva del patógeno (conidióforos) se genera después del deterioro del tejido del pericarpio, observándose conidios globosos, elípticos y ovals (oscilando entre 7.0 – 10.5, 6.3 – 9.3 y 7.5 – 11.6 μm , respectivamente), que se convierten en una nueva fuente de inóculo al ser transportados por el viento, agua e insectos (Evans, 2003; Phillips-Mora and Wilkinson, 2007; Villavicencio y Jiménez, 2010). Las conidias son la única estructura del hongo capaz de causar infección, distribuidos tanto en el área cultivada como a las áreas aledañas, transportadas por el viento, insectos, lluvia y por frutos infectados (Evans et al. 2003; Torres et al, 2013).

Posterior a la esporulación, los frutos comienzan a deshidratarse, momificándose gradualmente (este proceso dura aproximadamente de dos a ocho semanas), permaneciendo unido al árbol. La diseminación de la moniliasis permitió que esta llegará

hasta México (Phillips-Mora and Wilkinson, 2007; Johnson et al. 2008; Sánchez-Mora y Garcés, 2012).

En México, existe una superficie potencial para la producción del cultivo de cacao en 9 estados, las regiones con mejores características edafo-climáticas son Puebla, Veracruz, Tabasco, Oaxaca y Chiapas. El área cultivada es de aproximadamente de 61 612 ha, y se ha reportado una producción de 27, 844 t principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas (SIAP, 2015; Espinosa-García et al. 2015).

En México el cultivo del cacao fue afectado por la moniliasis a partir del 2005, se introdujo por la zona Sur del país correspondiente al estado de Chiapas (Phillips-Mora et al. 2006). Posteriormente se distribuyó a las demás zonas productoras del país, generando un decremento tanto productivo como financiero (Torres et al. 2013).

Las condiciones ambientales de las regiones infectadas, han facilitado el establecimiento de la enfermedad y la prevalencia de éste en cada ciclo productivo (Díaz-Jose et al. 2013). El daño a frutos de cacao por la moniliasis se ha observado en Tabasco y Chiapas. El manejo agronómico tradicional no reduce la incidencia de la enfermedad, y esta se relaciona directamente con las condiciones ambientales y los ciclos productivos (Torres et al. 2013; López-Báez et al. 2015). Los factores relacionados al decremento de la producción del fruto de cacao son: 1) el establecimiento de *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis, 2) el abandono de las plantaciones motivado por la baja rentabilidad en muchas de las zonas de producción de Tabasco y Chiapas, y 3) desventajas competitivas en el mercado internacional. Todo lo anterior ha impactado en la baja productividad de las zonas productoras de cacao (Torres et al. 2013; Díaz-Jose et al. 2014; López-Báez et al. 2015).

En Chiapas, las zonas productoras de cacao se ubican en los municipios de Tuxtla Chico, Huehuetán, Pichucalco, Tuzantán, Villa Comaltitlan, Ostucán (Díaz-Jose et al. 2013), Tapachula (López Báez et al. 2015), Acacoyahua, Acapetahua, Mapastepec, Cacahoatan y Cd Hidalgo (Sociedad de Productores de cada municipio). Posterior a la introducción de la moniliasis, la producción en la zona no supera el 22 % (en el mejor de los casos) y en otros es del 0%, provocando el abandono del cultivo. Los productores de cacao han orientando

el cambio del cultivo base a frutales o flores e incluso han vendido las áreas (de 1 a 20 ha) para zonas residenciales (Comunicación personal con productores).

Con base a lo antes expuesto, se generaron varias deducciones. Primero, el desarrollo de la moniliasis en el pericarpio del fruto de cacao, hace pensar que las características físicas y químicas de esta parte del fruto, durante las primeras doce semanas de desarrollo, son apropiadas para el establecimiento del patógeno. Además estas edades del fruto, son las susceptibles a la infección por *M. rozeri*, y no las edades que corresponden a la fase madura. Tercero, la susceptibilidad observada entre variedades de cacao, sugieren que la composición del pericarpio del fruto entre ellas es diferente. Cuarto, la distribución de la enfermedad en las zonas cultivadas y la severidad del daño entre ellas, sugieren que las condiciones edafo-climáticas influyen en el establecimiento del patógeno y en la expresión de la moniliasis.

Para demostrar las deducciones propuestas, en el presente trabajo se establecieron los siguientes objetivos:

- 1) Caracterizar las propiedades fisicoquímicas del pericarpio del fruto de cacao de las variedades Criollo, Trinitario y Forastero susceptible a la moniliasis.
- 2) Determinar el grado de susceptibilidad a moniliasis que presentan los frutos de la variedad Criollo, Trinitario y Forastero en la etapa infantil y juvenil, relacionados con sus características físico-químicas.
- 3) Evaluar el comportamiento epidémico de la enfermedad de la moniliasis del cacao en el Soconusco, Chiapas y su relación con las condiciones ambientales de cada región.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, N. G. (2005). Plant Pathology. 5th Edn. New York. Elsevier Academic Press
2. Arguello, O., Mejia, L. y Palencia, C. 2000. Origen y descripción botánica. In Tecnología para el mejoramiento de sistemas de producción de cacao. Corpoica, Bucaramanga, Colombia. Pps. 10 -12.

3. Avendaño A., C. H., Villareal F., J. M., Campos R., E., Gallardo M., R. A., Mendoza L., A., Aguirre M., J. F., Sandoval E., A. y Espinosa Z., S. 2011. Diagnostico del cacao en México. Editado por Universidad Autónoma de Chapingo. Pps 80.
4. Avendaño, A., Mendoza L., A., Hernández G., E., López G., G., Martínez B., M., Caballero P., J. F., Guillen D., S. y Espinoza Z., S. 2013. Mejoramiento genético participativo en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agroproductividad*. 6(5): 71-80.
5. Bailey, B. A., Crozier, J., Strem, M. D., Melnick, R. L., Zhang, D., Maximova, S., Gultinan, M. y Meinhardt, L. W. 2013. Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 81, 84-96.
6. Bowers, J. Bailey, B., Hebbbar, P., Sanogo, S. y Lumsden, R. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. *Plant health progress*. Doi: 10.1094/PHP-2001-0709-01-RV.
7. Correa A. J., Castro M. S. y Coy J. 2014. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronomica*. 63(4): 399- 399.
8. Diaz J., O., Aguilar A., J., Rendón M., R., Santoyo C., V. H. (2013). Situación actual y perspectivas de la producción del cacao en México. *Cienc. Investig. Agrar.* 40(2), 279-289.
- 9.
10. Efombagn, M., Nyassé, S., Sounigo, O., Kolesnikova, M. y Eskes, A. 2007. Participatory cocoa *Theobroma cacao* L., selection in Cameroon: *Phytophthora* pod tor resistant accesions identified in farmers' fields. *Crop protection*. 26:1467 – 1473.
11. Espinosa – García, J. A., Urestil G. J., Vélez I. A., Moctezuma L. G., Inurreta A. H. D. y Gongora G. S. F. 2015. Productividad y rentabilidad potencial del cacao (*Theobroma cacao*) en el tropic mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(5): 1051 – 1063.

12. Evans, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (Monilia) *roreri*. Phytopathological paper. 24, 44.
13. Evans, H. C.; Holmes, K. A. y Reid A. P. 2003. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology*. 52: 476-485.82
14. Franzen, M. y Borgerhoff M., M. 2007. Ecological, economic and social perspective on cocoa production worldwide. *Biodiversity and Conservation* 16(13): 3835 – 3849.
15. Johnson J., Bonilla J. and Aguero L. 2008. Manual de manejo y producción de cacaotero. Leon Nicaragua. Pags. 40.
16. Krauss, U. y Soberani, W. 2001. Rehabilitation of diseased cacao fields in Peru through shade regulation and timing of biocontrol measures. *Agroforestry System*. 53: 179.
17. López B., O., Ramírez G., S. I., Espinosa Z., S., Moreno M., J. L., Ruiz B., C., Villarreal F., J. M. y González M., O. (2015). Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. *Acta Agríc. Pec.* 1(1), 16-23
18. Loor, R., Risterucci, A., Courtois, B., Fouet, O., Jeanneasu, M., Rosenquist, E., Amores, F., Vasco, A., Medina, M. y Lanaud, C. 2009. Tracing the native ancestor of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genetics and Genomes*. 5: 421 – 433.
19. Meinhardt, L. W., Thomazella, D. P., Teixeira, P. J., Costa, G. G., Carazzolle, M., Schuster, S., Carlson, J. E., Gultinan, M. J., Mieczkowski, P., Crow, J., Farmer, A., Ramaraj, T., Crosier, J., Davis, R. E., Shao, J. Y., Pereira, G. A. y Bailey, B. A. 2014. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which cause frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phase. *Biomed Central (BMC) Genomics*. 15: 164.
20. Melnick R. L., Strem, M. D., Crozier, J., Sicher, R. C., Bailey, B. A. 2013. Molecular end metabolic changes of cherelle wilt of cacao and its effect on *Moniliophthora roreri*. *Physiol. Mol. Plant P.* 84, 153-162.

21. Motamayor J. C., Risterucci, A. M., López, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A. and Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivate by the Mayas. *Heredity*. 89, 380-386.
22. Nyadanu , D., Akromah, R., Adomako, B., Kwoseh, C., Dzahini-Obiatey, H., Lowor, S. T., Akrofi, A. Y. and Assuah, M. K. 2012. Host plant resistance to *Phytophthora* pod rot in Cacao (*Theobroma cacao* L.): the role of epicuticular wax on pod and leaf surfaces. *International J. Bot-London*. 8 (1), 13-21.
23. Phillips-Mora, W., Castillo, J., Krauss U., Rodríguez E., y Wilkinson M. J. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombia isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology*. 54, 483-490
24. Phillips-Mora, W., Cawich, J., Garnett, W. y Aime, M. C. 2006. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cocoa in Belize. *Plant pathology*. 55: 584.
25. Phillips-Mora, W. y Wilkinson, M. J. 2007. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97, 1644 – 1647.
26. Phillips-Mora, W. y R. Cerda. 2009 Catalogo: Enfermedades del cacao. Turrialba, Costa Rica. CATIE. Pp. 24.
27. Ploetz, R. C. 2007. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide . *Phytopathology*. 97: 1634 – 1639.
28. Powis, T., Cyphers, A., Gaikwad, N., Grivetti, L. and Cheong, K. 2011. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (21), 8595-8600
29. Rangel – Fajardo, Ma. A., Zavaleta – Mancera, H. A., Córdova – Téllez, L., López – Andrade, A. P., Delgado – Alvarado, A., Vidales – Fernández, I. y Villegas – Monter, A. 2012. Anatomía e histoquímica de la semilla del cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo mexicano. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35(3): 189 – 197.
30. Reuck, D. 1997. Moniliasis del cacao. ¿Una amenaza semejante a la escoba de bruja? *Revista Café y Cacao*. 2(1): 1-2.

31. Rodríguez E. 2006. Técnica de reducción de inóculo para controlar la moniliasis del cacao en Santander . *Revista Corpoica*. 4, 68-78.
32. Romero, C., Bonilla, J., Santos, E. y Peralta, E. 2010. Identificación varietal de 4 plantas seleccionadas de cacao *Theobroma cacao* L., provenientes de cuatro cultivares distintos de la región amazónica ecuatoriana, mediante el uso de marcadores microsatélites. *Revista Tecnológica ESPOL*. 23(1): 121 – 128.
33. Sánchez, - Mora, F. D. y Garcés – Fiallos, F. R. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et al. en el cultivo del cacao. *Scientia Agropecuaria*. 3,249-258.
34. Torres de la C., M., Ortiz G., C. F., Téliz O., D., Mora A., A. y Nava D., C. 2013. Efecto del Azoxystrobin sobre la *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31(1): 65-69.
35. Van der Plank, J. E. 1977. Principles of plant infection. *Journal of Applied Ecology*. 14(2): 661-663.
36. Villavicencio, M. y Jiménez, M. 2010. Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislado de cinco provincias de la costa Ecuatoriana. Tesis de Grado.
<http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/10957>.

CAPITULO 2

COEVOLUCIÓN ENTRE HONGOS HEMIBIOTRÓFOS Y PLANTAS HOSPEDERAS

Víctor J. Albores Flores.

Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad

Universitaria, México D.F.

alboresflores@hotmail.com.

RESUMEN

Desde el inicio de la domesticación de las plantas hasta la fecha, cambios morfológicos y fisiológicos se han presentado, siendo todos heredables. En el proceso de domesticación han influido las prácticas agrícolas, la condición edafo- climática y las interacciones intra-específicas antes y durante la generación de cada especie y variedad que actualmente se cultivan. Durante la selección de los especímenes vegetales, generación tras generación, la reducción de la diversidad genética ha sido una variante que ha generado susceptibilidad en cada planta hacia microorganismos fito-patógenos. Durante la reducción de diversidad, diversos microorganismos interaccionaron con estas nuevas especies vegetales, que durante el proceso de adaptación y co-evolución, se fijaron fuertemente caracteres heredables que codificaron hacia una mayor susceptibilidad a fito-patógenos. Los fito-patógenos fúngicos que se mencionan en este trabajo, son del tipo hemibiotrófo y expresan dos fases. La primera fase, la biotrófica, se genera durante la infección del hospedero y determina el éxito que tendrá este hongo en la planta. La fase biotrófica es considerada clave para definir el desarrollo de la enfermedad tanto en las variedades tolerantes como en las susceptibles de las plantas hospederas, y ha sido un factor que determinó la función biológica de estos hemibiotrófos después del proceso de domesticación. Durante el proceso de domesticación, como parte de la interacción planta – patógeno, se generó la síntesis de metabolitos nuevos en el fitopatógeno hemibiotrófo para tolerar los mecanismos de defensa del hospedero, en todos los niveles de vulnerabilidad. Contrario a lo anterior, se generaron nuevos metabolitos en las plantas domesticadas, para contrarrestar las nuevas modificaciones producidas por los hongos fitopatógenos hemibiotrófos, sin lograr alcanzar un éxito en su detención. El proceso de

co-evolución entre plantas y fitopatógenos fúngicos hemibiotrófos, se explica con los modelos de la carrera de armamentos (Arms Races) y la reina roja (Queen Red). Lo anterior hace pensar que los fitopatógenos fúngicos que estuvieron interaccionando con las plantas durante el período de disminución de diversidad genética, estimulo la formación de metabolitos nuevos y la generación de variedades, con capacidades bioquímicas diferentes, en ambos organismos. El estudio de la co-evolución generada entre plantas y patógenos, permitirá comprender el papel que juegan los hongos fitopatógenos en los pato-sistemas y la variación de respuesta de defensa generadas por el hospedero acorde al grado de susceptibilidad que tiene cada variedad de los cultivo.

Palabras clave: Domesticación, evolución, hongos, interacción.

Importancia

Los problemas emergentes con mayor impacto en la producción agrícola, por cada ciclo productivo, son las enfermedades [Wingfield, 2013]. De estas últimas, las generadas por hongos fitopatógenos, han sido las de mayor importancia, y las de tipo hemibiotrófico (HTH) son las devastadoras. Hasta la fecha, la falta de información sobre el comportamiento del patógeno en el agro-sistema y la interacción generada entre el patógeno y la planta, han hecho ineficiente la selección de métodos de control [Gervasi et al. 2013; Bailey et al. 2013].

Variados son los síntomas generados en la planta hospedero durante el desarrollo de la enfermedad producida por HTH y entre los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad se encuentra el tipo de hospedero, el grado de domesticación de la planta, la edad del órgano infectado y de la variedad del cultivo. Entre los factores derivados del patógeno se encuentra la capacidad bioquímica que tiene el HTH para engañar a la planta durante la formación del estado biotrófico y la velocidad en producir la necrosis en el tejido infectado [Horsbach and Deising, 2013; Jupe et al. 2013; Correa et al., 2014]. Por último, el factor historia de vida, el rango de hospederos que tiene cada HTH [Fernández

et al. 2013], y las condiciones ambientales en el sistema agrícola favorecen el desarrollo de la enfermedad [Northfield and Ives, 2013, Wingfield, 2013].

En el agro-sistema de monocultivo (se denominará pato-sistema tropical), durante la interacción planta – patógeno, ambos organismos se ajustan en su fisiología y acervo genético para adaptarse a los cambios ambientales [Strauss et al. 2012]. En el caso del fito-patógeno, la adaptabilidad que presenta los HTH en las diferentes condiciones ecológicas del pato-sistema y del hospedero, se debe a sus mecanismos de variabilidad genética [Kleemann et al. 2012, Dunn and Perkins, 2012; Feeney et al. 2014].

Antes del proceso de domesticación de las plantas, la co-evolución que existió no favorecía al microorganismo patógeno, si no a todas las interacciones que presentaba la planta con los microorganismos para sostener su adaptación y cumplir su ciclo de vida, como un holobionte [Vandenkoornhuysen et al. 2015; Mitter et al. 2016]. En el inicio del proceso de domesticación, los eventos de adaptación de las plantas seleccionadas a los sitios de siembra (muy repetitivos) generaban interacciones con los microorganismos presentes, siendo seleccionados estos últimos por las características que presentaban las nuevas generaciones de plantas. Posteriormente, se presentó la co-evolución, donde se fijaron caracteres heredables en cada cruce realizada, produciendo características fenotípicas de interés agrícola [Casacuberta et al. 2016], y mostrando susceptibilidad a fito-patógenos del tipo HTH. La susceptibilidad observada en las plantas domesticadas, es el resultado de la pérdida de caracteres de tolerancia y resistencia a fito-patógenos HTH, que se presentó gradualmente en el proceso de domesticación [Castro et al. 2012; Casacuberta et al. 2016].

El éxito de los fitopatógenos HTH en los diferentes ecosistemas agrícolas, se ha atribuido al paralelismo geográfico y ambiental que existe en las áreas tropicales cultivables. Los vectores ambientales, animales y humanos, generan la dispersión de los propágulos del HTH que generan las epidemias en tiempo y espacio [Phillips Mora y Wilkinson, 2007; Dunn and Perkins, 2012; Horsbach and Deising, 2013]. En este trabajo se presentan una revisión sobre la posible co-evolución que se genera en la interacción planta – hongo hemibiotrófo.

Hongos Hemibiotrofos

Son organismos intermediarios (evolutivamente hablando) que expresan una transición entre la fase biotrofa y necrotrofa [McCann et al 2013]. Tienen la capacidad de infectar múltiples hospederos (ejemplo, especies del género *Colletotrichum* [Gautam, 2014]) o de especializarse en hospederos específicos (ejemplo, especies del género *Moniliophthora*) [Phillips-Mora et al. 2007].

En el proceso de infección, los HTH desarrollan estructuras (apresorio) para fijarse al área seleccionada y para la introducción (tubo germinativo y haustorio) al tejido susceptible [Jupe et al. 2013; Brunner et al. 2013; Avasthi et al. 2015]. Con la llegada del conidio o espora (propágulo infectivo), se genera el proceso de contacto (fijación o anclaje) y posterior a la germinación del propágulo se inicia la búsqueda del sitio susceptible del tejido en el hospedero [Bailey et al. 2013; Rodríguez et al. 2013]. En la primera etapa de la interacción, los HTH definen (mediante señales químicas con su posible hospedero) cual será la función biológica que desempeñará en esa planta, parásito o endófito [McCann et al. 2013; Doehlemann and Hemetsberger, 2013].

En el tejido del hospedero, las hifas infectivas pueden ubicarse inter e intracelularmente y producen efectores que son indispensables para infectar y alimentarse de las células de la planta [Horsbach and Deising, 2013; Jupe et al. 2013; Bailey et al. 2013; Brunner et al. 2013]. En la fase biotrófica, el HTH efectúa procesos que retienen la expresión de mecanismos de defensa y fisiológicos del hospedero [Alvarez, 2012; Castro et al. 2012; Bhadauria et al. 2012; Jupe et al. 2013; Li and Smigocki, 2016]. Se considera que el tiempo de existencia de la fase biotrófica es relativo al tiempo de incubación que tiene el patógeno, y esta fase va depender tanto del estado fisiológico, fenológico del hospedero y de las condiciones abióticas [Texeira et al. 2012; McDowell, 2013; Bailey et al. 2013; Fernández et al. 2013; Doehlemann and Hemetsberger, 2013; Delaye et al. 2013].

La fase necrotrófica involucra la muerte celular del tejido del órgano infectado o de todo el hospedero, provocada por la respuesta hipersensible de la planta durante el tiempo final de expresión de la fase biotrofica [Bhadauria et al., 2012]. Durante la transformación de biotrófico a necrotrófico, que ocurre en minutos, se genera una cascada de

acumulación de peróxido de hidrógeno en el tejido colonizado [Bailey et al. 2013; Eloy et al. 2015]. No se conoce con exactitud el mecanismo de señalización y/o las señales que encienden este proceso de generación de la fase necrotrófica. En la formación de la fase necrotrófica existe una relación directa entre la edad del órgano infectado, la fisiología de este y su condición nutricional [Bhadauria et al. 2012; Bailey et al. 2013; Brunner et al. 2013; Juper et al. 2013; Fernández et al. 2013; Aguirre et al. 2015]. Es común la acumulación de metabolitos en el tejido colonizado por parte del micelio necrotrófico (normalmente más delgado que el biotrófico), también por parte de la planta como un mecanismo de defensa [Bailey et al., 2013, Bhadauria et al., 2013; Zhao et al., 2013]. Desde la formación de la patogénesis, hasta la expresión de la fase necrotrófica, hay una relación directa con la reducción de la expresión de genes Avr implicados en la compatibilidad planta – hongo. Además se consideran como indicadores visuales de muerte celular a la expresión conjunta de los síntomas de clorosis y oscurecimiento del tejido [Van Damme et al. 2012].

Entre los hongos hemibiotrófos más estudiados, se mencionan a *Mycosphaerella fijiensis* [Ploetz, 1994], *Colletotrichum gloeosporioides* [McDowell, 2013], *C. truncatum* [Bhadauria et al. 2012], *Septoria tritici* (Shetty et al. 2009), *Moniliophthora peniciosa* [Texeira et al. 2012] y *M. royeri* [Bailey et al. 2013]. Estos HTH afectan con rapidez a sus hospederos, variando entre género y especie la formación de la patogénesis según sea el órgano infectado (expresando síntomas variados). También existe variación en el tiempo de latencia del conidio (acorde al género y especies del patógeno), en la variedad de señales en la germinación y formación del apresorio, incluyendo el tiempo de duración de la fase biotrófica (Alvarez, 2012; Castro et al. 2012; Bhadauria et al. 2012; Bailey et al. 2013; Brunner et al. 2013; Juper et al. 2013; Fernández et al. 2013).

La domesticación de plantas hospederas.

Durante el proceso de domesticación de las plantas, se produjeron cambios genotípicos y fenotípicos en éstas inducidos por el hombre, importantes desde el punto de vista costo *versus* beneficio [Gepts y Pope, 2002; Chacón, 2009; Dempewolf et al. 2012]. Este proceso que es unidireccional, tuvo su origen en plantas silvestres [Pickersgill, 2007; Chacón,

2009]. La domesticación redujo la diversidad genética en las plantas comparado con sus ancestros y se fortaleció la afinidad a los fitopatógenos [Chacón, 2009; Le Van et al., 2012; He, 2014]. El resultado final de este fortalecimiento, entre plantas y fitopatógenos, fue el incremento en la agresividad y la virulencia de cada HTH [Le Van et al., 2012; Delmas et al. 2016]. A diferencia de cereales y gramíneas, en frutales este proceso de domesticación fue más lento, porque el período infantil y juvenil es más tardado, complicándose en la etapa de madurez sexual donde la fase de reproducción es esporádica [Goldschmidt, 2013]. Los resultados generados en la domesticación de frutales, varían según la ubicación del fruto en el árbol y edad de estos [Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Melnick et al., 2013; Bailey et al., 2013; Yaacoubi et al. 2016].

Las modificaciones generadas durante el proceso de selección de plantas y adaptación a las condiciones climáticas de las regiones utilizadas para la producción masiva [Eckardt, 2010; Hacquard et al., 2013], generó un proceso de co-domesticación con especies fúngicas (parasitas) ya presentes en sus tejidos [Win et al., 2012; Kellner et al., 2014]. La trayectoria de vida de cada patógeno HTH durante la interacción sostenida con su hospedero produjo un patrón de adaptación que contrasta con la falta de diversidad y diferenciación genética en las plantas [Gladieux et al., 2011; Delaye et al., 2013; Manamgoda et al., 2013]. Este patrón de adaptación se proyectó sobre la fase parasítica del patógeno, generando una trayectoria de aptitud, reflejada en variantes más adaptadas a variedades resistentes del hospedero y más agresivas en las plantas susceptibles [Brown, 2010; Win et al., 2012; Delmas et al. 2016].

El estado biotrófico, clave en la co-evolución.

Antes y durante el proceso de domesticación de las plantas, cada planta sostuvo interacciones con microorganismos (se postula que la función de cada microorganismo fue como endófito antes de ser patógeno, [Gladieux et al., 2011; Delaye et al., 2013; Manamgoda et al., 2013]) presentes en el área de siembra, en la rizosfera y filosfera, e incluso dentro de los tejidos vegetales. Entre los microorganismos presentes, se encontraron patógenos que fueron de tipo hemibiotrófo y que se favorecieron por su

capacidad de adaptación a los nuevos hospederos formados [Brown, 2010; Kellner et al., 2014].

Durante el proceso de adaptación, se generaron cambios bioquímicos en la planta estimulados por las condiciones ambientales y nutrimentales del suelo que sostuvo el desarrollo de ésta. Es probable que lo anterior influyó, durante la interacción sostenida entre el patógeno y la planta, en el proceso de infección y en el desarrollo del micelio en tejido intra e inter celular [Yadeta and Thomma, 2013; Rodríguez et al., 2013; Bhadauria et al., 2015; Andargie and Li et al., 2016]. Durante la adaptación en el proceso de domesticación, la fase biotrófica del patógeno HTH fue afectada influyendo directamente en el período de latencia dentro de la planta alargando el tiempo en días, semanas ó meses, sin expresar síntoma alguno que demostrara la presencia de la fase necrotrófica [Gladieux et al. 2011; García et al. 2012; Bailey et al. 2013]. En la adaptación que presentó el HTH durante el proceso de cambio de silvestre a domesticado (en todos los eventos de cruce), la formación de nuevas estrategias bioquímicas derivadas de nuevos rasgos genéticos (siendo el principal cambio) y desde el punto de vista evolutivo estuvieron fuertemente ligadas al hospedero. Dio como resultado una mayor interacción con las nuevas plantas y mayor éxito reproductivo [Ponomarenko et al., 2011; Guzmán et al. 2012].

Con nuevas estrategias de comunicación y camuflaje bioquímico, la interacción sostenida entre el patógeno y el nuevo tipo de plantas generó mayor severidad en el desarrollo de las enfermedades. La comprensión de esta interacción se ha estudiado desde el aspecto bioquímico – molecular que se consideran claves en la compatibilidad y dialogo estrecho, que se establece entre el patógeno y la planta. Lo anterior esta acumulado en la historia de vida del patógeno que estuvo sometido a los ciclos co-evolutivos en todo el proceso de domesticación de la planta. Esta información almacena nuevos cambios genéticos que han sido dependientes de las nuevas variedades vegetales, iniciando desde poblaciones silvestres hasta las domesticadas [Guzmán et al. 2012; Rico-Hernández, 2011]. El modelo de co-evolución desarrollado por los hongos HTH en la planta hospedera se aproxima al de la carrera de armamentos bioquímicos (Arms Races; [Occhipinti et al. 2012]), provocando

un proceso de patogénesis eficiente y severo [Van der Linde et al., 2012; Ruiz Herrera J., 2012], lo que ha permitido que la fase biotrófica, según sea el hospedero, sea corto o largo en tiempo [Bhadauria et al. 2012; Castro et al. 2012; Bailey et al., 2013; Delaye et al., 2013; Brunner et al. 2013; Jupe et al. 2013; Kellner et al., 2014].

En el proceso de co-evolución el HTH presentó el estilo de vida similar al de un biotrófo, ventajoso para el patógeno y una desventaja para el hospedero [Estrada et al. 2013; Manamgoda and Udayanga, 2013; Delaye et al. 2013; Terán, 2013]. El tejido vegetal de las variedades nuevas, de plantas, proporcionaron condiciones fisiológicas y ambientales propicias para la expresión de la fase necrotrófica [Occhipinti et al. 2012; Castro et al. 2012; Horsbach and Deising, 2013; Bailey et al., 2013].

Durante el proceso de adaptación de la fase biotrófica del HTH a las nuevas defensas de la planta, se promovió la capacidad de su variación polimórfica que presenta el patógeno siendo esta una estrategia evolutiva y ventajosa sobre el hospedero [Van der Linde et al., 2012; Fabre et al. 2015]. Al cambio co-evolutivo de las características del patógeno, referente a su polimorfismo cambiante que promueve la formación de nuevos patógenos, se apega al modelo de la reina roja (Queen Red), explicando el proceso de adaptación – evolución para el patógeno. Lo anterior permitió encontrar variantes genotípicas del HTH que se relacionaron con el gradiente de hospederos y cada variante del patógeno se adaptó a los cambios fenológicos del entorno ambiental y fisiológico del hospedero. Con ello se explica parte del éxito de especies o razas del patógeno sobre especies tolerantes del hospedero [Raberg et al. 2014; Fabre et al. 2015; Masri et al. 2015; Souza et al. 2016]. La variación genotípica del patógeno, el gradiente de hospederos susceptibles y las condiciones ambientales, permitió generar selectividad en el proceso de infección en el hospedero (compatibilidad), gradientes de severidad del desarrollo de la patogénesis y capacidad de comunicación química para evadir las defensas del hospedero [Raberg et al. 2014; Souza et al. 2016].

La co-evolución del HTH generado en las variantes de cada planta hospedera, además de producir nuevas moléculas bioquímicas, elevó la capacidad para infectar en diferentes edades de desarrollo de la planta hospedera, incluyendo la formación de un estado

quiescente. Además, acorde a las condiciones bioquímicas del hospedero, el HTH estableció que la formación de la fase necrotrófica se relacionara a la presencia o concentración de una o varias moléculas generadas (hipotéticas) por el hospedero, produciendo variaciones en la severidad y velocidad de formación de la fase necrotrófica [Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Rodríguez et al. 2009; Bhadauria et al, 2012; McDowell, 2013; Landero et al. 2013; Melnick et al., 2013; Bailey et al., 2013]. La formación de la última fase, poco estudiada, está relacionada a un decremento en las respuestas metabólicas y defensas del hospedero, incluyendo la reducción de expresión de genes Avr [Brown and Tellier, 2012; Texeira et a. 2012; Rafiqi et al., 2012; Petre et al. 2014]) que no pudo ser conservada. Esta reducida expresión pudo provocar variaciones en el tiempo de incubación y en la agresividad del patógeno, haciendo dependiera de la capacidad de interacción que tenga con la planta [Van Damme et al. 2012].

Considerando la información expuesta

En este artículo, el entorno cambiante provoca ajustes metabólicos tanto en plantas como en los patógeno hemibiotrófico, que relacionado con la domesticación de la planta ha sido lo que determina el tipo de interacción a generar como estrategia co-evolutiva. Lo anterior permitió que el patógeno expresara la interacción mutualista o parasítica, para lograr sobrevivir y evitar ser eliminado.

En la formación de la patogénesis provocada por un HTH que forma las dos fases, biotrófica y necrotrófica, la primera fase pudo ser la clave en el proceso de domesticación. Al principio posiblemente se condicionó como obligatoria y conforme se presentaron los cambios respectivos, genético y bioquímico, existió una fase adaptativa que transitó a co-evolutivo durante la interacción con su hospedero en el proceso de domesticación de las plantas. Se consideró que probablemente se hayan originado los patógenos hemibiotróficos de un organismo biotrófico que co-evolucionó con su hospedero durante el proceso de domesticación, teniendo en su material genético toda la información de cómo generar la enfermedad en la planta acumulada durante una historia de vida genómica.

REFERENCIAS

- 1.- Alvarez G., T. B. (2012) MC. Thesis. Instituto Politécnico Nacional
- 2.- Aguirre S. E, Piraneque N. V. and Rodríguez J. (2015). Relationship between the nutritional status of banana plants and black sigatoka severity in the Magdalena region of Colombia. 33(3): 348 – 355.
- 3.- Andargie M. and Li J. (2016). Arabidopsis thaliana: a model host plant to study plant – pathogen interaction using rice false smut isolates of *Ustilainoidea virens*. Front Plant Sci. 7:192. Doi: 10.3389/fpls.2016.00192.
- 4.- Avasthi S., Gautam . K. and Bhadauria R. (2015) First report of anthracnose disease of Aloe vera caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. J. Research Biol. 6: 408 – 410
- 5.- Ávila M., M. E. et al. (2012) Diversidad génica y grupos de compatibilidad vegetativa en *Fusarium oxysporum* causante de marchitez en agave (Agave tequilana Weber var. Azul). Gayana Bot. 40-48.
- 6.-Bailey, B. A. et al.(2013) Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 81, 84-96.
- 7.- Bhadauria, V. et al. (2012) Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector CtNUDIX in hemibiotrophic fungal phytopathogens cause incompatibility with their host plant. Eukariotic Cell. DOI: 10.1128/EC.00192-12. (<http://ec.asm.org>).
- 8.- Brown, J. K. M. and Tellier, A. (2012) Plant-parasite coevolution: bridging the Gap between genetics an ecology. Annual. Review of. Phytopathology. 49, 345-67.
- 9.- Brunner, P. C. et al. (2013) Coevolution and life cycle specialization of plant cell wall degrading enzymes in a hemibiotrophic pathogen. Molecular Biology and Evolution. DOI: 0.1093/molbev/mst041 (<http://mbe.oxfordjournals.org>).
- 10.- Casacuberta J. M., Jackson S., Panaud O., Purugganan M. and Wendel J. (2016), Evolution of plant phenotypes, from genomes to traits. G3: Genes/Genomes/Genetics. 6(4): 775 – 778.

- 11.- Castro R., A. et al. (2012). Mecanismos de defensa del Chile en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. Rev. Mexicana de Fitopatología. 30 (1), 49-65
- 12.- Correa A. J., Castro M. S. y Coy J. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. Acta Agronom.63(4): 399- 399.
- 13.- Chacón S., M. I. (2009). Darwin y la domesticación en plantas en las Américas: el caso del maíz y el frijol. Acta biol Colomb. 14, 351 – 363
- 14.- Delaye, L. et al. (2013) Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens – are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? Fungal Diversity. DOI: 10.1007/s13225-013-0240-y (<http://link.springer.com>).
- 15.- Delmas C. E. L., Fabre F., Jolivet J., Mazet I. D., Richard C. S., Deliere L. and Delmotte F. (2016). Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. Evol. Appl. 9(5): 709 – 725.
- 16.- Dempewolf H., Hodgins K. A., Rummell S. E., Ellstrand N. C. and Rieseberg L. H. (2012) Reproductive isolation during domestication. Plant Cell 24(7): 2710 – 2717
- 17.- Derksen, H. et al. (2013) Signaling cross –talk in plant disease resistance. Plant Science. 207, 79-87.
- 18.- Doehlemann G. and Hemetsberger C. (2013) Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. New Phytologist. 198: 1001–1016.
- 19.- Dunn, A. M. and Perkins, S. E. (2012) Invasion and infections. Functional Ecology.26, 1234-1237
- 20.- Eloy Y. R., Vasconcelos I. M., Barreto A. L. H., Freire F. F. R. and Oliveira J. T. A. (2015). H₂O₂ plays an important role in the lifestyle of *Colletotrichum gloeosporioides* during interaction with cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Fung. Biol. 747 – 757.
- 21.-Estrada, C. et al. (2013) Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. New Phytologist. DOI: 10.1111/nph.12140. (<http://onlinelibrary.wiley.com>).
- 22.- Fabre F., Rousseau E., Mailleret L. and Moury B. (2015). Epidemiological and evolutionary management of plant resistance: optimizing the deployment of cultivar mixtures in time and space in agricultural landscapes. Evol. Appl. 8(10): 919-932.

- 23.- Feeney W. E., Welbergen J. A. and Langmore N. E. (2014) Advances in the study of coevolution between Avian brood parasite and their hosts. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 45: 227 – 246.
- 24.-Fernández D., Talhinhos, P. and Duplessis, S. (2013) Rust Fungi: achievements and future Challenges on genomics and host-parasite interactions. *The Mycota.* (2nd edn) (K. Esser, eds) pp.315 – 342. Springer Heidelberg
- 25.- Garcés, F. R. and Reis, E. M. (2012) Unbral numeric de infección de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow en folíolos de soya. *Avances en Investigación Agropecuaria.* 16 (1), 79-88.
- 26.- García G., G. y Heil, M. (2013) Life histories of hosts and pathogens predict patterns in tropical fungal plant diseases. *New Phytologist.* DOI: 10.1111/nph.12562 (www.newphytologist.com)
- 27.- Gautam A. K. (2014) *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, pathogenicity and management in India. *J. Plant Physiol. Pathol.* 2(2): 1 – 11.
- 28.- Gepts, P. y Pope, R. (2002). Evolution during domestication. *Enc life sci.* 1-7.
- 29.- Gervasi, S. S. et al. (2013) Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to *Chytrid* fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth.* DOI: 10.1007/s10393-013-0832-8 (<http://people.oregonstate.edu>).
- 30.- Gibson, A. K. et al. (2012) Life-history strategy defends against disease and may select against physiological resistance. *Ecology and Evolution.* 3 (6), 1741 – 1750.
- 31.- Goldschmidt E. E. (2013) The evolution of fruit tree productivity: a review. *Econ. Bot.* 67(1): 51-62.
- 32.- Gladieux, P. , Byrnes III, E. J., Aguileta, G, Fisher, M. C., Heitman, J. and Giraud, T. 2011. Epidemiology and evolution of fungal pathogens in plant and animals. *Genetic and Evolution of Interactions Diseases.* (1st edn) (Michel Tabayren, ed) pp. 59 – 135, Elsevier.
- 33.- Hacquard S., Kracher B., Maekawa T., Vernaldi S., Schulze L. P. and Loren v. T. E. V. (2013). Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(24): E2219 – E2228.

- 34.- He, T. (2014). Ecological divergence and evolutionary transition of resprouting types in *Banksia attenuate*. *Ecol. Evol.* 4 (16), 3162 – 3174.
- 35.- Horsbach R. and Deising, H. B. (2013) The biotrophy –necrotrophy switch in fungal pathogenesis. *The Mycota*. (2nd edn) (K. Esser, eds) pp.343 – 360. Springer Heidelberg.
- 36.- Huang,Y.et al. (2013) Historical and ecological factors affecting regional patterns of endemism and species richness: the case squamates in China. *Current Progress in Biological Research* (1a edn) (Silva- Opps, M. eds) pps 169-201. In Tech.
- 37.- Jupe, J. et al. (2013) *Phytophthora capsici* – tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biology*. DOI: 10.1186/gb-2013-14-6-r63 (<http://genomebiology.com>).
- 38.- Kellner R., Bhattacharyya A., Poppe S., Hsu T. Y., Brem R. B. et al. (2014) Expression profiling of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveals genomic patterns of transcription and host-specific regulatory programs. *Genome Biol. Evol.* 6: 1353–1365
- 39.- Kleemann, J. et al. (2012) Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appresoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoSPathogens*. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002643. (www.plospathogens.org).
- 40.- Landero, N. V. et al. (2013) Potencial anti fúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. *Revisa Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 4 (1), 47-62.
- 41.- Lé Van, A., Gladieux, P., Lemaire, C., Comille, A. Giraud, T., Durel, C. E., Caffier, V. y Le Cam, B. (2012) Evolution of pathogenicity traits in the Apple scab fungal pathogen in response to the domestication of its host. *Evolutionary Applications*. 5: 694 – 704.
- 42.- Li H. and Smigocki A. C. (2016). Wound induced *Beta vulgaris* polygalacturonase-inhibiting protein genes encode a longer leucine-rich repeat domain and inhibit fungal polygalacturonases. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 8-18.
- 43.- Manamgoda, D. and Udayanga, D. (2013) Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. *Fungal Diversity*. DOI: 10.1007/s13225-013-0256-3. (<http://link.springer.com>).

- 44.- Melnick R. L., Strem, M. D., Crozier, J., Sicher, R. C., Bailey, B. A. (2013). Molecular end metabolic changes of cherelle wilt of cacao and its effect on *Moniliophthora roreri*. *Physiol. Mol. Plant P.* 84, 153-162.
- 45.- McCann, H. C. et al. (2013) Genomic Analysis of the Kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidaie* provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLOS Pathogens* DOI: 10.1371/journal.ppat.1003503. (www.plospathogens.org).
- 46.- McDowell (2013) Genomic and transcriptomic insights into lifestyle transitions of a hemi-biotrophic fungal pathogen. *New Phytologist*. 197, 1032–1034
- 47.- Northfield, T. D. and Ives, A. R. (2013) Coevolution and the effects of climate change on interacting species. *PLOS Biology*. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001685. (www.plosbiology.org)
- 48.- Occhipinti A. (2013). Plant coevolution: evidences and new challenges. *Journal of Plant Interactions*, 8:3, 188-196, DOI: 10.1080/17429145.2013.816881
- 49.- Petre B, Joly DL, Duplessis S. (2014) Effector proteins of rust fungi. *Frontiers in Plant Science*. 5:416. doi:10.3389/fpls.2014.00416
- 50.- Ploetz R. C. et al. (1994) Compendium of tropical fruit diseases. The American phytopathological Society. A. P. S. Press. 2- 22.
- 51.- Phillips-Mora, W. y Wilkinson, M. J. (2007). Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97, 1644 – 1647.
- 52.- Ponomarenko A, Goodwin SB, Kema GHJ (2011) Septoria tritici blotch (STB) of wheat Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *Plant Heal Instr*: 1–7. doi: 10.1094/pd-77-1266
- 53.- Pickersgill, B. (2007). Domestication of plant in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Ann. Bot-London*. 100, 925
- 54.- Raberg L., Alacid E., Garces E. and Figueroa R. (2014) The potential for arms race and Red Queen coevolution in a protist host-parasite system. *Ecol Evol*. 4(21): 4775 – 4785.
- 55.- Rafiqi M., Ellis J. G., Ludowici V. A., Hardham A. R., Dodds P. N. (2012). Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Curr. Opin. Plant Biol* 15 477–82 10.1016/j.pbi.2012.05.003

- 56.- Rastogi, G. et al. (2013) New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiology Letter*. 348, 1-10.
- 57.- Rauf, S., Khan, A. A., Teixeira da Silva, J. A. y Naveed, A. (2010). Consequences of plant breeding on genetic diversity. *Int. J. Plant Breeding*. 4, 1-21.
- 58.- Rico, H. G. (2011) Evolución de interacciones parásito-hospedero: Co-evolución, selección sexual y otras teorías propuestas. *Revista U.D.C.A. Act. & Div. Cient.* 14 (2), 119-130.
- 59.- Rodríguez López E. S., Cárdenas Soriano, E., Hernández D., S. J., Gutiérrez D., A. y Mayek P., N. (2013). Analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc. Infection of avocado fruits. *Rev. Bras. Frutic.* 35 (3), 898-905
- 60.- Rodríguez L., E. S. et al. (2009). La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. En Aguacatero (*Persea americana* Mill): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Rev. Mexicana de Fitopatología* 27 (1), 53-63..
- 61.- Rojas, E. I. (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*. 102 (6), 1318-1338.
- 62.- Ruiz H. J. (2012) *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis and Assembly*. (Second Ed) CRC Press. 73-95.
- 63.- Saltz, J. B. y Nuzhdin, S. V. (2014) Genetic variation in niche construction: implications for development and evolutionary genetics. *Trends in Ecology & Evolution*. 29 (1), 8-14.
- 64.- Sasek, V. et al. (2012) Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic Ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in *Brassica napus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25, 1238-1250.
- 65.- Sharma, G. and Damodara S., B. (2013) *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. DOI: 10.1080/03235408.2013.833749. (<http://www.tandfonline.com>).

- 66.- Shetty N. P., Jensen J. D., Knudsen A., Finnie C., Geshi N., Blennow A., Collinge D. B. and Lyngs J. H. J. (2009) Effects of beta-1, 3 glucan from *Septoria tritici* on structural defence response in wheat. *J. Exp. Bot.* 60 (15): 4287 – 4300.
- 67.- Souza A. M., Granada C. E. and Sperotto R. A. (2016). Plant pathogens affecting the establishment of plant – symbiont interaction. *Front. Plant. Sci.* 7:15. Doi: 10.3389/fpls.2016.00015.
- 68.- Strauss, A. et al. (2012) Invading with biological weapons: the importance of disease-mediated invasions. *Functional Ecology.* 26, 1249-1261.
- 69.- Texeira, P. J. P.L. et al. (2012) The fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* has genes similar to plant PR-1 that are highly expressed during its interaction with cacao. *PLOS one.* DOI: 10.1371/journal.pone.0045929. (www.plosone.org).
- 70.- Terán V., A. P. (2013) Roya asiática de la Soya, *Phakopsora pachyrhizi*.(Ficha técnica 23) LANREF. Pp. 24.
- 71.- Thomazella, D. P. T. et al. (2012) The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytologist.* 194, 1025-1034.
- 72.- Van Damme, M. et al. (2012). The Iris potato famine Pathogen *Phytophthora infestans* translocates the CRN8 kinase into host plant cells. *Plos pathogens.* doi:10.1371/journal.ppat.1002875 8: 1-12. (www.plospathogens.org)
- 73.- Van der Linde JA, Six DL, Wingfield MJ, Roux J. (2012) **Lasiodiplodia species associated with dying Euphorbia ingens in South Africa.** *Southern Forests: a Journal of Forest Science* **73:3-4**:165-173. [10.2989/20702620.2011.639499](https://doi.org/10.2989/20702620.2011.639499)
- 74.- Van Damme, M. et al. 2012. The Iris potato famine Pathogen *Phytophthora infestans* translocates the CRN8 kinase into host plant cells. *Plos pathogens.* doi:10.1371/journal.ppat.1002875 8: 1-12. (www.plospathogens.org)
- 75.- Veneault F., C. and Martin, F. (2013) New insights into Ectomycorrhizal symbiosis evolution and function. *The Mycota.* (2nd edn) (K. Esser, eds) pp.273 – 294. Springer Heidelberg.

- 76.- Wingfield, J. C. (2013) Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. *Functional Ecology*. 27, 37-44.
- 77.-Win J., Chaparro G. A., Belhaj K., Saunders D. G. O., Yoshida K., Dong S., Schornack S., Zipfel C., Robatzek S., Hogenhout S. A, and Kamoun S. (2012) Effector biology of plant – associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* Doi: 10.1101/sqd.2012.77.015933.
- 78.- Yaacoubi E., Malagi G., Oukabli A., Citadin I., Hafidi M., Bonhomme M. and Legave J. M. (2016) Differentiated dynamics of bud dormancy and growth in temperate fruit trees relating to bud phenology adaptation, the case of apple and almonds trees. *Int. J. Biometeorol.* Doi:10.1007/s00484-016-1160-9.
- 79.-Yadeta K. A. and Thomma B. P. H. J. (2013) The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens *Front Plant Sci*. 4: 97. doi: [10.3389/fpls.2013.00097](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097)
- 80.- Yang, F. et al.(2013) Transcriptional reprogramming of Wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PLOSone*. DOI: 10.1371/journal.pone.0081606. (www.plosone.org).
- 81.- Yoshino, K. et al. (2012). Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25 (5), 625-636.
- 82.- Zhao, Z. et al. (2013) Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*. 14: 274, 1-15.

CAPITULO 3

Degree of domestication influences susceptibility of *Theobroma cacao* to frosty pod rot: a severe disease devastating Mexican cacao.

El grado de domesticación influye en la susceptibilidad de *Theobroma cacao* a la moniliasis: una enfermedad grave que devasta al cacao mexicano.

Albores-Flores Víctor J.^{1,4}; García-Guzmán Graciela.³; Espinosa-García Francisco J.² and Salvador-Figueroa Miguel.¹

1 Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Principe Akishino S /N Colonia Solidaridad 2000. Tapachula, Chiapas C. P. 30798, México;

Tel (fax) 52 962 6427972. Email: miguel.salvador@unach.mx

2 Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad. Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua carretera a Pátzcuaro, no. 8701, Colonia Ex - Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190, Morelia Michoacán, México; Email:

espinosa@cieco.unam.mx

3 Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510. México D.F;

Email: mggarcia@ecologia.unam.mx

4 Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D.F.

Authors contributions:

Víctor Albores-Flores, data analysis, performed the experiments, wrote the paper.

Graciela García-Guzmán, revised of manuscript critically and writing.

Francisco Espinosa-García revised of manuscript critically and writing.

Miguel Salvador-Figueroa conceived, designed the research, wrote the paper.

Abstract

Background: The three-main cacao (*Theobroma cacao*) varieties cultivated in México are: Criollo, Forastero, and Trinitario. Each variety has a different fruit setting time and has been subjected to several selection stages. The aim of this study was to determine the susceptibility of the three cacao varieties to Frosty pod rot caused by *Moniliophthora roreri*. We also analyzed the physical-chemical properties of the pericarp of the three varieties and its domestication age

Question: Is there a relationship between the degree of domestication of the cacao variety and its susceptibility to Frosty pod rot?

Studied species: *Theobroma cacao* fruits at the ages of 4, 8 and 12 weeks.

Study site: A cacao plantation in Chiapas, Mexico.

Methods: The content of moisture, lignin, phenols, peroxidase activity and hardness of the pericarp were analyzed in the middle zone of healthy fruits at 4, 8 and 12 weeks of development. Number of healthy and infected fruits were recorded every week.

Results: The highest susceptibility to Frosty pod rot was found in the immature stage of fruits from the Criollo variety. The disease was mostly found in the mid-zone of the fruit. The *Criollo* variety was the most susceptible. This variety showed the highest moisture values and the lowest values of the other measured parameters.

Conclusions: The Criollo variety, the one with the highest degree of domestication, was the most susceptible to frosty pod rot. We suggest using material from wild populations and from the Forastero and Trinitario varieties in breeding programs.

Keys words: Cacao frosty pod rot disease, plant defenses, plant infection, *Moniliophthora roreri*, pericarp.

RESUMEN

Antecedentes: Las tres principales variedades de cacao (*Theobroma cacao*) cultivadas en México son: Criollo, Forastero y Trinitario. El tiempo de producción y el número de etapas sometidas en el proceso de selección de cada variedad, es diferente. El objetivo de este estudio fue determinar la susceptibilidad de las tres variedades de cacao a la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri*. También se analizó las propiedades físico-químicas del pericarpio del fruto de las tres variedades y su edad de domesticación.

Pregunta: ¿Existe una relación entre el grado de domesticación de la variedad de cacao y la susceptibilidad a la moniliasis?

Especie estudiada: *Theobroma cacao*, frutas de 4, 8 y 12 semanas de edad.

Sitio de estudio: Una plantación de cacao en Chiapas, México.

Métodos: Se analizó el contenido de humedad, lignina, fenoles, actividad peroxidasa y dureza del pericarpio en la zona media de frutos sanos a las 4, 8 y 12 semanas de edad. Cada semana, se evaluó el número de frutos sanos e infectados.

Resultados: La mayor susceptibilidad a la moniliasis se encontró en la etapa inmadura de los frutos de la variedad Criollo. La enfermedad se encontró principalmente en la zona media de la fruta. Se observó que la variedad Criollo fue la más susceptible. Esta variedad presentó los valores altos de humedad y con valores bajos en los otros parámetros medidos.

Conclusiones: La variedad Criollo, considerada con mayor grado de domesticación, fue la más susceptible a moniliasis. Sugerimos el uso de material de poblaciones silvestres y de las variedades Forastero y Trinitario en programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: Moniliasis del cacao, defensas de las plantas, infección de plantas, *Moniliophthora roreri*, pericarpio.

The domestication process of wild plants has usually produced heritable changes in morphological and physiological characteristics (Pickersgill 2007, 2013, Rival & McKey 2008, Chacón 2009, McKey *et al.* 2012; Gepts & Pope 2002). Cereals are the best example, with a longer domestication time. Throughout domestication, cereals have lost their capacity of seed dispersal and modified their plant architecture in order to increase yield and production (Gepts & Pope 2002, Pickersgill 2007, 2013, Mondolot *et al.* 2008, Chacón 2009, Bautista *et al.* 2012, He 2014). Selection of specific traits has reduced the genetic diversity of the domesticated varieties (Chacón 2009, Rauf *et al.* 2010, Bautista *et al.* 2012).

Compared to cereals, the domestication process of cacao (*Theobroma cacao*), a native tree of the Amazonian rainforest (Cheesman 1944) is more recent. Traditionally, three domesticated varieties of cacao are recognized: Criollo, Forastero and Trinitario. Domestication of the Criollo variety began 4,000 years ago in southern Mexico (Powis *et al.* 2011). The onset of the process for the Forastero variety is dated in 1700 in Brazil (Ji *et al.* 2012). The Trinitario variety, a hybrid between the aforementioned varieties Criollo and Forastero, began to be cultivated in Trinidad and Tobago after 1727 (Pound 1945).

The cacao fruit is highly valuable in the market, since chocolate is obtained from its seeds. The mature fruit is a berry, commonly known as cacao-pod, with an oblong-oval shape. The mature cacao-pod pericarp, constituted by exocarp and endocarp, is composed of cellulose, hemi-cellulose, lignin, water and mineral salts in a laminated arrangement (Daud *et al.* 2013). In mature fruits, the proportion of the components of the cacao-pod pericarp is unknown. Likewise, the composition of the "cacao-pod pericarp" of immature fruits, or "cherelle" (0 to 5 weeks after fruit mooring) and juvenile (6 to 10 weeks after fruit mooring) stages is unknown (Sánchez-Mora and Garcés-Fiallos, 2012; Martijn ten Hoopen *et al.* 2012).

Like other plant organs, the cacao fruit is susceptible to infection caused by Oomycetes such as *Phytophthora* and fungi like *Moniliophthora* (Motamayor *et al.* 2008). In the last decade, in the Americas, the production of cacao fruits has declined between 80 and

100% due to the infection caused by *Moniliophthora roreri* (a specific pathogen of the fruit) (Phillips-Mora & Wilkinson 2007, Phillips-Mora & Cerda 2009). The susceptibility to *M. roreri*, causal agent of moniliasis or frosty pod rot (FRP) disease, depends on the cacao variety and fruit age. In this sense, Phillips-Mora *et al.* (2005), Rodriguez (2006) and Phillips-Mora & Wilkinson (2007) reported that young fruits are more susceptible to infection by *M. roreri* than mature fruit. Likewise, the initial evaluations of the incidence of FRP in cacao plantations in Chiapas, Mexico, carried out by our working group suggest that the medium zone of the fruit is the most susceptible to *M. roreri* infection. Therefore, the aim of this study was to determine the susceptibility of Criollo, Forastero and Trinitario cocoa fruit varieties to FRP caused by *Moniliophthora roreri*, and to assess if susceptibility correlates with its domestication age.

Methods

Study site, symptoms and incidence of FRP. This study was carried out at a cacao plantation in Chiapas, México (N 14° 59' 51.30"; W 92° 10' 49.55"; 411 m.a.s.l.), where the Criollo (C), Forastero (F) and Trinitario (T) varieties are grown. The symptoms of FRP (Phillip-Mora *et al.*, 2005) were evaluated from fruit setting to harvest in 20 trees of each variety (60 trees in total) from February to June and from July to November 2013 (two full harvest periods). Every week, the numbers of healthy and infected fruits were recorded. The location of the symptoms on the surface of the infected fruits was also documented. The fruits were divided equidistantly, in peduncle, middle and apical zones. The incidence of disease per age (week) and cacao variety was calculated using the formula:

$$I (\%) = (IF/TF) \times 100$$

where I = incidence, IF = number of infected fruits and TF = total fruits. During the study, 390, 605 and 475 fruits of the Criollo, Trinitario, and Forastero varieties, respectively, were collected (average of 9.8, 15.1 and 11.9 fruits. Tree⁻¹.year⁻¹).

Fruits free of FPR symptoms. Twenty fruits of every cacao variety were washed with sterile saline solution and kept in a cellophane bag to protect them from the possible arrival of *M. royeri* conidia.

Physicochemical studies of healthy mature fruits. For the physicochemical study of the pericarp, healthy fruits at the ages of 4, 8, and 12 weeks without FPR symptoms, were sampled. The content of lignin, peroxidase activity, moisture, hardness and phenolic compounds were measured in the middle area of the pericarp, where the highest frequency of FRP symptoms has been observed.

Preparation of pericarp for histochemical determination of lignin. To determine the content of lignin in the pericarp, we sampled five fruits of each of the three varieties of cacao, and five cubes of tissue were obtained (1.5 x 1.5 x 1.5 cm) from the middle area of the pericarp (5 cubes.fruit⁻¹; 25 cubes.variety⁻¹). The cubes were initially dehydrated for 72 h, in a mixture of formaldehyde-ethyl alcohol-glacial acetic acid (2:10:1 v:v; FAA mixture). Subsequently, the samples were placed in aqueous solutions of ethyl alcohol of 10, 25, 50, 75 and 96% v:v (6 h in each solution). The cubes were placed in solutions of 10, 25, 50, 75 and 100% of xylol (3h in each solution). Finally, the cubes were embedded in paraffin

(McCormick^R) and ten cuts of 5 µm thickness (Microtome Microm HM 315) were obtained and each cut placed on a slide.

Staining used for the identification of lignin in the pericarp. The identification of lignin was carried out following the method proposed by Sánchez *et al.* (2010). Each excised sample was incubated for five minutes with 40 µL of 30% HCl and 80 µL of phloroglucinol (1% w:v in 70% ethyl alcohol). The excess of reagents was removed with water and the resulting product was observed and photographed under an optical microscope (Carl Zeiss Axioscope) (Carl Zeiss MicroImaging camera model AxioCam MRc) for further analysis. The red-violet color was indicative of the presence of lignin (Figure 1) and the color intensity was proportional to its concentrations (Almaraz 2011).

Content of lignin in the pericarp of the different cacao varieties. To determine the content of lignin in the pericarp of the different cacao varieties, the intensity value (In) of the red (R), green (G) and blue (B) color was determined at each microphotograph using the Zen program, version 2011. The In parameter takes values between 0 and 250. Thus, the combination 0.0.0 (R,G,B) represents the black color and the combination 250.250.250 represents the white color; The combinations 250.0.0; 0.250.0 and 0.0.250 represent the red, green and blue colors respectively (Triana *et al.* 2013). The determination was made in six optical fields (1300 x 1300 pixels) of each microphotograph, representing 78.5% of the cut (9.810 655.4 mm² photo⁻¹; 58.863.9323 mm² in total).

Peroxidase activity (Pox) in the pericarp of fruits. The Pox activity in fruit pericarp was determined using the Kar & Mishra (1976) method with some modifications. Briefly, 100

mg of tissue, were ground in liquid Nitrogen using a pestle and mortar. The mixture was homogenized with one mL of phosphate buffer (100 mM at pH 6.8) and centrifuged at 11,600 rpm. The supernatant was diluted (1:20) with distilled water. To 360 μL of the dilution, 922 μL of H_2O and 90 μL of phosphate buffer were added and strongly shaken. The mixture was incubated at 30 °C for 10 min, after adding 360 μL of pyrogallol and 18 μL of H_2O_2 and the absorbance was determined at 420 nm (Genesys 20 Spectrophotometer Thermo Scientific Model 4001/4). The Pox activity was reported in $\text{nkatal} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{dry weight of tissue}} \cdot \text{min}^{-1}$, taking into account that the oxidation product of pyrogallol has a molar extinction coefficient (E) of $2.47 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Determination of moisture in the pericarp. To determine the moisture in the pericarp of the fruits, 10 g of tissue, from the middle zone, were placed in a porcelain capsule. The samples were placed at 70 °C until constant weight was achieved. The moisture was determined using the formula:

$$\text{Moisture (\%)} = \left[\frac{W_i - W_f}{W_i} \right] \times 100.$$

Where, W_i : initial weight of the sample, W_f : final weight of the sample. The determination was performed three times.

Determination of the pericarp hardness. The hardness of the pericarp of the different varieties of cacao was determined as the force required to penetrate it (N cm^2) using a

penetrometer (Fruit firmness tester, Touroni, Mod. 53205, Italy). The determination was conducted in triplicate in the middle zone of each fruit.

Total phenol content. Five fruits were collected per age and variety, in order to analyze total phenol content. The phenols extraction was made using the method proposed by Restrepo *et al.* (2009). We took 5 g of tissues of pericarp, which were ground in a mortar and added 10 mL metanol-water (50:50 v/v). Phenol content was measured by the Feng *et al.* (2010) method, using the Folin Ciocalteu reagent. To 10 μ l sample, we added 500 μ L of Folin-Ciocalteu's reagent diluted 1/10 with water, to which 400 μ L of sodium carbonate (Na_2CO_3) was added. Subsequently, the mixture was in total darkness for 15 min for reaction. Absorbance at 765 nm was then recorded against a blank with a mixture of methanol:water (1:1). A calibration curve was performed to estimate polyphenol content with a solution of gallic acid in methanol:water solution. Results of total polyphenol content are expressed as mg equivalents of gallic acid per 1 g of sample.

Statistical data analysis. The FPR incidence data were arcsine-transformed prior to an analysis of variance (ANOVA). The data of the physicochemical properties of the pericarp were subjected to the multivariate analysis of variance (MANOVA), canonical discriminant analysis (CDA) and principal component analysis (PCA). All statistical analyses were performed using the InfoStat software (v. 2015).

Results

Incidence of FPR. In the fruits of the Criollo variety, the first symptoms of FRP were observed two weeks after fruit mooring; in the Trinitario and Forastero varieties after

three weeks (Figure 2). The disease reached maximum values between the fourth and fifth week after fruit mooring (average incidence was $8.70 \pm 1.07\%$, $6.20 \pm 0.90\%$ and $7.19 \pm 0.43\%$ for the Criollo, Forastero, and Trinitario varieties, respectively), remaining in this condition for five weeks. The differences were statistically significant ($F_{1, 2} = 185.18$, $p < 0.0001$). After week 10, the incidence of FPR decreased, reaching a value of 0 in week 14. During the study period, the percentage of fruits with FPR was 82.4%, 63.6% and 51.9% for the Criollo, Trinitario, and Forastero varieties, respectively. The dynamics of the incidence of FPR between the two production periods evaluated did not show significant differences ($F_{2, 1} = 0.0$, $p = 0.9999$).

Frequency of FPR in the different zones of the cacao fruit. Considering all the fruits of the Criollo variety with symptoms of FPR, 62.7% were registered in the middle zone; in the Trinitario and Forastero varieties the frequency was registered at 63.5% and 64.5%, respectively. In the apex and peduncle zones of the Criollo, Trinitario, and Forastero varieties, the frequencies were 26.6, 26.6 and 36.2% and 10.6, 9.9 and 9.1%, respectively. Among the fruit areas, the difference was significant ($F_{3, 2} = 92.77$, $p < 0.0001$).

Relative lignin content, peroxidase (Pox) activity, phenols content, moisture and hardness in the pericarp. Table 1 shows the values of Ln (for lignin), Pox, phenols, moisture and hardness of the middle zone of healthy fruits of the three cacao varieties. The values of all the variables were higher at the age of 12 weeks than at the 4 weeks. The MANOVA (Table 2) showed significant differences between varieties, age of fruit development and their interaction

The CDA of the data, showed that 97.3% of the variance was explained by the first canonical function and the remainder by the second function. The lignin content was the most important variable for the discrimination of the groups on the canonical axis 1 (Table 3a) so that the individuals with the highest lignin content appear in the right side of the scatter plot in the discriminant space (Figure 3). The discriminant dispersion centroids (Table 3b) showed that the group of individuals of the Criollo variety opposes the groups of the Trinitario and Forastero varieties in the canonical axis 1. This means that the differences in lignin (In) distinguish the Criollo variety fruits from those of the Forastero and Trinitario varieties. On the other hand, canonical axis 2 explains little variation between groups. Finally, the cross-classification table (Table 5) shows that all individuals initially assigned to the Criollo, Trinitario, and Forastero varieties were well classified using the discriminant function (0% error).

On the other hand, the PCA of the data, showed that the first two components explained 92.15% of the variance. In PC 1 all variables had a positive coefficient, highlighting the variable "variety" as the lowest value. Due to the above, the higher the value of the variable the greater the resistance to FPR. Likewise, in PC 2 the variables "moisture" and "time of development of the fruit (age)" had the highest negative coefficients, whereas the variable "variety" had the highest positive value. The lower moisture and age, the lower the resistance of fruits to FPR. Forastero variety was more resistant than Trinitario and Criollo (Figure 4).

Discussion

In the present study we found that the Criollo variety, which is the most domesticated (Motamayor *et al.* 2008; Powis *et al.* 2011), was also the most susceptible to cocoa frosty pod rot.

Phillips-Mora *et al.* (2005) and Phillips-Mora & Wilkinson (2007) reported the FPR disease symptoms observed after eight weeks of the arrival of conidia. Here, we detected disease symptoms in the second week after fruit setting in the Criollo variety, and in the third week in the Trinitario and Forastero varieties (Figure 2). This pattern may be due to

the arrival of conidia during floral anthesis, as previously reported by Omolaja *et al.* (2009) and Frimpong *et al.* (2014). Another possibility is that the strain of *M. roreri* present in the area is very aggressive (Sánchez & Garcés, 2012). Yet, this question warrants further research. Delay of the onset of symptoms in the Forastero and Trinitario, or disease progression in Criollo varieties, is related to the physicochemical parameters of the pericarp of the fruit (Nyadanu *et al.* 2013, Takam *et al.* 2013).

The incidence of FPR, between the second and tenth week after fruit setting (Figure 2) coincides with reports by Leandro (2011) and Sánchez & Garcés (2012). This development period (to second and tenth week) is depends on the longitudinal growth path of the fruit (Martijn ten Hooper *et al.* 2012, Sheng & Maisen 2012), when cells are in mitotic activity and lack cellular differentiation. During that initial phase of fruit development, the orientation of the lignin fibers (Agrios 2005, Lira 2007, Keegstra 2010, Fanwoua *et al.* 2013), the lack of polymers consolidation in the cell wall, and the exudate produced (Filonow 2002, Zelinger *et al.* 2006, Rodríguez-López *et al.* 2013), can promote conidia germination of *M. roreri* on the fruit surface.

On the other hand, decrease in FPR after the tenth week of fruit development (Figure 2) may be associated with changes in the composition of the pericarp resulting from an increment in cell size and a decrement in the rate of duplication (Agrios 2005, Lira 2007, Keegstra 2010, Fanwoua *et al.* 2013, Rodríguez-López *et al.* 2013). These changes coincide directly with the transition from the immature to the juvenile stage of the fruit (Martijn ten Hooper *et al.* 2012, Sheng & Maisen 2012). The above phenomenon is similar to the one reported by Ando *et al.* (2009), who found that mature fruits of *Cucumis sativus* are more resistant to infection by *Phytophthora capsici* than the immature fruits. Moreover, the absence of FPR symptoms in fruits after thirteen weeks of development supports the hypothesis that the physicochemical characteristics of the pericarp do not allow the development of *M. roreri*.

Incidence of FPR seems to be related to both fruit age and the physicochemical properties of the epidermis of the fruit pod husk, and the most probably to molecules involved in plant defense (Ando *et al.* 2009, Jing & Chapple 2010, Zeng *et al.* 2014).

Furthermore, it has been documented that the pericarp develops from the cells of the ovary wall (Rangel *et al.* 2012), that the size of the fruit is defined by the number of cells that form the pericarp (Okello *et al.* 2015), and that the final volume of the fruit is biophysically limited by the extensibility of the epidermis (Bertin 2005). So, we believe that the Pox activity, concentration of lignin and phenols in the pericarp of the cacao fruit during the immature and juvenile stages are similar to the one found in mature fruits. Consequently, the greater susceptibility to RPF observed in the equatorial region of immature and juvenile fruits, may be the result of the differential distribution of physicochemical properties. Likewise, the lower amount of lignin, phenols and Pox activity in the equatorial region of the fruits may be the result of both the rate of cell division (Evans *et al.* 1978) and the area, which are higher in this region than in the peduncle and the apex (Bekele *et al.* 2006).

The observed differences in epicarp physicochemical characteristics of three cacao varieties (*cf.* Table 1, Figure 3 and 4), and in the FPR susceptibility, may be associated with its life history (domestication). In this sense, the Criollo variety has been grown in the Soconusco region of Chiapas, for more than 4,000 years. Cheesman (1944) proposes that the seeds of the Mexican Criollo variety were initially selected, in the upper Amazonas, due to their low astigmatism and clear color. The transference of these seeds to the west of the Andes mountain range, and their subsequent transport to the Soconusco region, also contributed to the selection (Motamayor *et al.* 2002, 2003). On the other hand, the Forastero variety has 400 years of domestication (Ji *et al.* 2012), and the Trinitario variety (a cross between of the Criollo variety with the Forastero variety) was obtained in the island of Trinidad and Tobago 300 years ago (Pound 1945), although its introduction to continental America occurred 100 years ago (Motamayor *et al.* 2003).

Considering that during the process of cacao domestication, man has played an important role in the selection of seed (Chacon 2009, Raya-Pérez et al., 2010), that pollination is cross, and that on average, a cacao tree has a productive life of 40 years (Somarriba et al. 2013), we inferred that: 1) at least 100 selection processes have taken place for the Criollo variety, 13 for the Forastero variety, and three for Trinitario variety, 2) as a result of the lack of wild specimens in the domestication region of the Criollo variety, the existing population presents a genetically low diversity, as shown by Motamayor et al. (2002), and 3) the Trinitario variety can be considered as an improved Criollo variety. This is particularly supported by co-clustering in the clades generated from lignin content and phenols (cf. Table 3, Figures 3 and 4).

Although the domestication process has improved the quality and quantity of fruit and seed, and has allowed a sustainable production of cacao all along the year, it has also affected susceptibility to frosty pod rot. Our study shows that the Criollo variety, which has been under domestication for the longest time, is the most susceptible to *Moniliophthora roreri*. It is clear that there is a need for research on enhancing the resistance of cacao to this fungal pathogen while keeping the commercial qualities of plants, and as a first step we suggest using material from wild populations and from the Forastero and Trinitario varieties in breeding programs.

Acknowledgments

Víctor Jesús Albores Flores acknowledges the scholarship provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and thanks the Posgrado en Ciencias Biológicas, from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This manuscript was written by Víctor Jesús Albores Flores as a requirement to obtain his doctoral degree. We thank Jannette Dolly Carrion Rodríguez and Beatriz González Patchen for reviewing a previous version of this manuscript. We also thank Javier Francisco Valle Mora for his help with the data statistic analyses, and Coronel Rito for his assistance in the collection of fruits

and handling of samples in the laboratory. We declare that the experiments conducted in this study complied with the current laws of Mexico.

Literature cited

Agrios NG. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edn. New York. Elsevier Academic Press.

Ando K, Hammar SA, Grumet R. 2009. Age-related resistance of diverse cucurbit fruit to infection by *Phytophthora capsici*. *Journal of American Society for Horticultural Science* 134: 176–182.

Almaraz BI. 2011. Degradación in vitro de la pared celular, variables ruminales y actividad enzimática de microorganismos adheridos a sólidos del complejo Lolium-festuca. Doctor Thesis. Colegio de Posgraduados, campus Montecillos, Texcoco, Edo. De México.

Bautista LA, Parra RF, Espinosa-García FJ. 2012. Efectos de la domesticación de plantas en la diversidad fitoquímica. In: Rojas JC, Malo EA, eds, *Temas selectos en Ecología Química de Insectos Colegio de la Frontera Sur*. México. pp 253-264.

Bekele FL, Bekele I, Butler DR, Bidaisee GG. 2006. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 933-948.

Bertin N, Gautier H, Roche C. 2002. Number of cells in tomato fruit depending on fruit position and source-sink balance during plant development. *Plant Growth Regulation* 36 (2): 105–112.

Bertin N. 2005. Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication. *Annals of Botany* 95: 439–447.

Chacón MIS. 2009. Darwin y la domesticación en plantas en las Américas: el caso del maíz y el frijol. *Acta biológica Colombiana* 14: 351 – 363.

Cheesman EE. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Tropical Agriculture* 21: 144–159.

Daud Z, Kassim ASM, Aripin AM, Awang H, Hatta MZM. 2013. Chemical composition and morphological of cocoa pod husks and cassava peels for pulp and paper production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 7(9): 406-411.

Evans HC, Stalpers JA, Samson RA, Benny GL. 1978. On the taxonomy of *Monilia rozeri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany* 56(20):2528-2532.

Fanwoua, J, de Visser PHB, Heuvelink Ep, Yin X, Struik PC, Marcelis LFM. 2013. A dynamic model of tomato fruit growth integrating cell division, cell growth and endoreduplication. *Functional Plant Biology* 40: 1098 – 1114.

Filonow AB. 2002. Mycoactive acetate esters from Apple fruits stimulate adhesion and germination of conidia of the gray mold fungus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (11): 3137- 3142.

Frimpong-Anin K, Adjalo MK, Kwabong PK, Oduro W. 2014. Structure and stability of cocoa flowers and their response to pollination. *Journal of Botany* ID: 513623. <http://dx.doi.org/10.115/2014/513623>.

Gepts P, Pope R. 2002. Evolution during domestication. *Encyclopedia of life science* 1-7.

He T. (2014) Ecological divergence and evolutionary transition of resprouting types in *Banksia attenuate*. *Ecology and Evolution* 4 (16): 3162 – 3174.

Ji K., Zhang D., Motilal L. A., Boccara M., Lachenaud P. & Meinhard L. W. 2012.. Genetic diversity and parentage in farmer varieties of cacao (*Theobroma cacao* L.) from Honduras and Nicaragua as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* Doi. 10.1007/s1072201298471.

Jing Ke W. and Chapple, C. 2010.. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187: 273-285

Kar M, Mishra D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57 (2): 315-319.

Keegstra K. 2010. Plant cell wall. *Plant Physiology* 154: 483-486.

Leandro ME. 2011. *Efecto de los factores macro y microclimáticas y las características productivas del cacao sobre la epidemiología de la moniliasis*. MSc. Thesis, CATIE, Costa Rica.

Lira SRH. 2007. *Fisiología vegetal*. 2ª Edn México. Ed. Trillas.

Mckey DB, Elias M, Pujol B, Duputié A. 2012. Ecological Approaches to crop domestication. In: Gepts P, Famula T, Bettinger R, Brush SB, Damania AB, Mcguire PE, Qualset CO, eds, *Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution and Sustainability*. Cambridge University Press. Pp 377-406.

Martijn ten Hoopen G, Deberdt P, Mbenoun M, Cilas C. 2012. Modelling cacao frosty pod growth: implications for disease control. *Annals of Applied Biology* 160 (160): 260 – 272.

Mondolot L, Marlas AA, Barbeau D, Gargadennec A, Pujol B, Mckey D. 2008. Domestication and defence: foliar tannins and C/N ratios in *cassava* and a close wild relative. *Acta Oecologica* 34: 147-154.

Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva eMJW, Loo R, Kuhn DN, Brown JS, Schnell RJ. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.) *Plos One* 3, e3311, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>

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

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

Nyadanu D, Akromah R, Adomako B, Kwoseh C, Lowor ST, Dzahini-Obiatey H, Akrofi AY, Owusu AF, Opoku AY, Assuah MK. 2013. Biochemical mechanisms of resistance to black pod disease in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 3(1), 20-37.

Okello RCO, Heuvelink Ep, de Visser PHB, Struik PC, Marcelis LFM. 2015. What drives fruit growth? *Functional Plant Biology* 42 (9): 817-827.

Omolaja SS, Aikpokpodoin P, Oyedeji S, Vwoiko DE. 2009. Rainfall and temperature effects on flowering and pollen productions in cocoa. *African Crop Science Journal* 17 (1): 41-48.

Phillips-Mora W, Wilkinson MJ. 2007. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97: 1644 – 1647.

Phillips-Mora W, Castillo J, Krauss U, Rodríguez E, Wilkinson MJ. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombia isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology* 54: 483-490.

Phillips-Mora W, Cerda R. 2009. *Catalogo: Enfermedades del cacao*. Turrialba, Costa Rica. CATIE. Pp. 24.

Pickersgill B. 2007. Domestication of plant in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany* 100: 925 – 940.

Pickersgill B. 2013. Some current topics in plant domestication: an overview with particular reference to amazonia. Tipití: *Journal of the Society for the Anthropology of Lowland South America* 11 (2): 16-29.

Pound FJ. 1945. *A note about the cacao populations of South America*. In Report and Proceedings Cocoa Research. Conference, reprinted (1982) in Archive Cocoa Res 1: 93–97, London. Colonial 192:95–7.

Powis TG, Cyphers A, Gaikwad NW, Grivetti L, Cheong K. 2011. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proceeding of the National Academy Sciences USA* 108 (21): 8595-8600.

Rangel F. M. A., Zavaleta M. H. A., Córdova T. L., López A. A. P., Delgado A. A., Vidales F. I., & Villegas M. A. 2012. Anatomía e histoquímica de la semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) *Revista Fitotecnia Mexicana* 35 (3), 189-197.

Rauf S, Teixeira da Silva JA, Khan AA, Naveed A. 2010. Consequences of plant breeding on genetic diversity. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 4: 1-21.

Raya-Pérez JC, Aguirre-Mancilla CK, Gil-Vega K, Simpson J. 2010. La domesticación de plantas en México: Comparación de la forma cultivada y silvestre de *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae). *Polibotánica* 30: 239-256.

Rival L, Mckey D. 2008. Domestication and diversity in manioc (*Manihot esculenta* Crantz ssp. *esculenta*, Euphorbiaceae). *Current Anthropology* 49 (6): 1119-1128.

Rodríguez-López ES, Cárdenas- Soriano E, Hernández-Delgado SJ, Gutiérrez-Diez A, Mayek-Pérez N. 2013. Analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc. Infection of avocado fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35 (3): 898-905.

Rodríguez PE. 2006. Técnica de reducción de inóculo para controlar la moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica* 4: 68-78.

Sánchez GC, Alvarado CY, Cruz MM, Acosta SM, Leiva MM, Roque B. 2010. Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa spp.* Inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología vegetal* 10 (2): 89 – 97.

Sánchez-Mora FD, Garcés FFR. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et al. en el cultivo del cacao. *Scientia Agropecuaria* 3: 249-258.

Sheng CAL, Maisin N. 2012. Solving cocoa pod sigmoid growth model with Newton Raphson method. *International Journal of Modern Physics* 9: 44–51.

Somarriba E, Cerda R, Quesada F, Astorga C, Orozco L, Villalobos M, Orozco S, Corrales A, Villegas R, Say E, Deheuvels O. 2013. *El ciclo de vida y el manejo del cacaotal*. Serie técnica. Materiales de extensión/CATIE: no. 9. CATIE. Turrialba, C.R. pp.47.

Takam SP, Ndoumbé-Nkeng M, Sache I, Ndong NEP, Gwet H, Chadoeuf J. 2013. Development stage – dependent susceptibility of cocoa fruit to pod rot caused by *Phytophthora megakarya*. *European Journal of Plant Pathology* 135: 363 – 370.

Triana JG, Romero LC, Roldán DG. 2013. Digital image restoration by partial differential equations. *Revista U.D.C.A. Actual & Divulgación Científica* 16 (2): 511 – 518.

Zelinger E, Hawes CR, Gurr SJ, Dewey FM. 2006. Attachment and adhesion of conidia of *Stagonospora nodorum* to natural and artificial surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68: 209 -215.

Zeng Y, Zhao S, Yang S, Ding SY. 2014. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 38-45

Tables

Table 1. Mean value of physicochemical properties in the middle zone of the pericarp of the three cacao varieties used in this study. Relative content of lignin (In), peroxidase activity (Pox), phenols (P), moisture (H) and hardness (D).

Cacao variety	Fruit Age (weeks)	In	POX (nkatal.s.g-1)	P (mg AG.g-1)	H (%)	D (N cm ²)
Criollo	4	77.6±5.5	1.22±0.02	0.71±0.03	55.12±1.7	116.2±4.9
	8	118±1.7	1.33±0.02	0.89±0.08	68.66±1.0	114.8±2.5
	12	126.6±3.3	2.11±0.04	1.13±0.05	75.10±0.8	148.8±2.3
Trinitario	4	100.6±6.6	1.28±0.02	0.82±0.04	53.73±2.1	113.2±3.1
	8	132±2.1	1.39±0.03	0.83±0.05	67.40±2.0	118.6±2.3
	12	142.6±4.1	3.55±0.06	1.22±0.02	72.27±1.3	173.7±3.7
Forastero	4	110.3±7.2	1.49±0.02	0.91±0.04	55.06±1.1	112.8±5.0
	8	148±1.9	1.48±0.03	1.07±0.04	65.44±0.8	121.2±2.1
	12	169±6.2	4.49±0.08	1.35±0.05	73.51±1.1	178.7±4.8

Table 2. MANOVA test of physicochemical properties in the middle zone of fruits at different ages and cacao varieties.

	Test Stat	Aprox. F	Num. Df	Den Df	Pr (>F)
Age	1.93	184.91	10	66	<0.0001
Variety	1.31	12.6	10	66	<0.0001
Variety: Age	1.6	4.64	20	140	<0.0001

Table 3. Canonical discriminant analysis A) Discriminant function on each variable age, Pox, phenols, moisture, hardness and lignin for relationship between cacao varieties in middle zone. B) Dispersion centroids of each cacao variety in discriminant space, and C) Cross classification of the three cacao varieties.

(A)

Variable	Can 1	Can 2
Age	-5.17	0.43
Pox	0.25	1.03
Phenols	1.27	3.43
Moisture	-1.12	0.26
Hardness	1.58	-3.61
Lignin	3.61	-1.67

(B)

Variable	Axis 1	Axis 2
Criollo	-4.21	0.37
Forastero	4.05	0.42
Trinitario	0.17	-0.79

(C)

Variable	Cri	For	Tri	Total	Error
Criollo	15	0	0	15	0
Forastero	0	15	0	15	0
Trinitario	0	0	15	15	0
Total	15	15	15	45	0

Figures legends

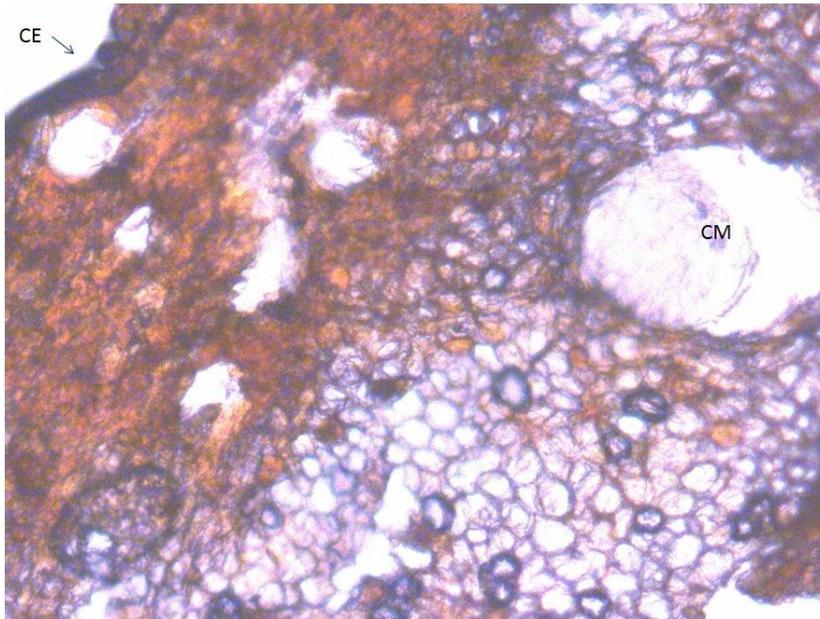


Figure 1. Lignin accumulation (red) in the pericarp tissue of the cacao fruit at 40x. CM: mucilaginous cavity, CE: epidermis.

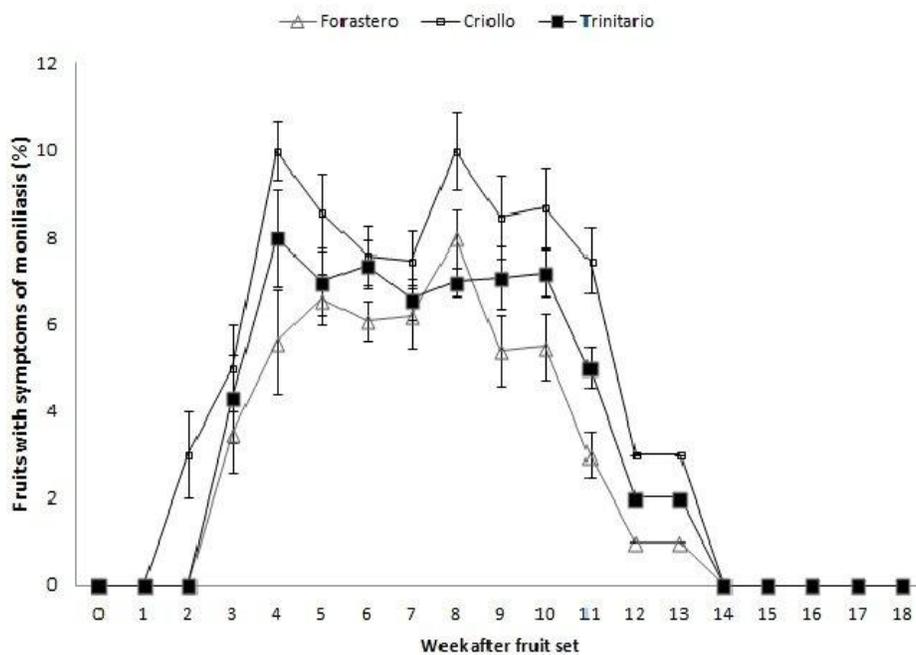


Figure 2. Incidence of Frosty pod rot in the cacao fruits of the *Criollo*, *Forastero* and *Trinitario* varieties along nine months (February-November 2012). Zero represents fruit setting.

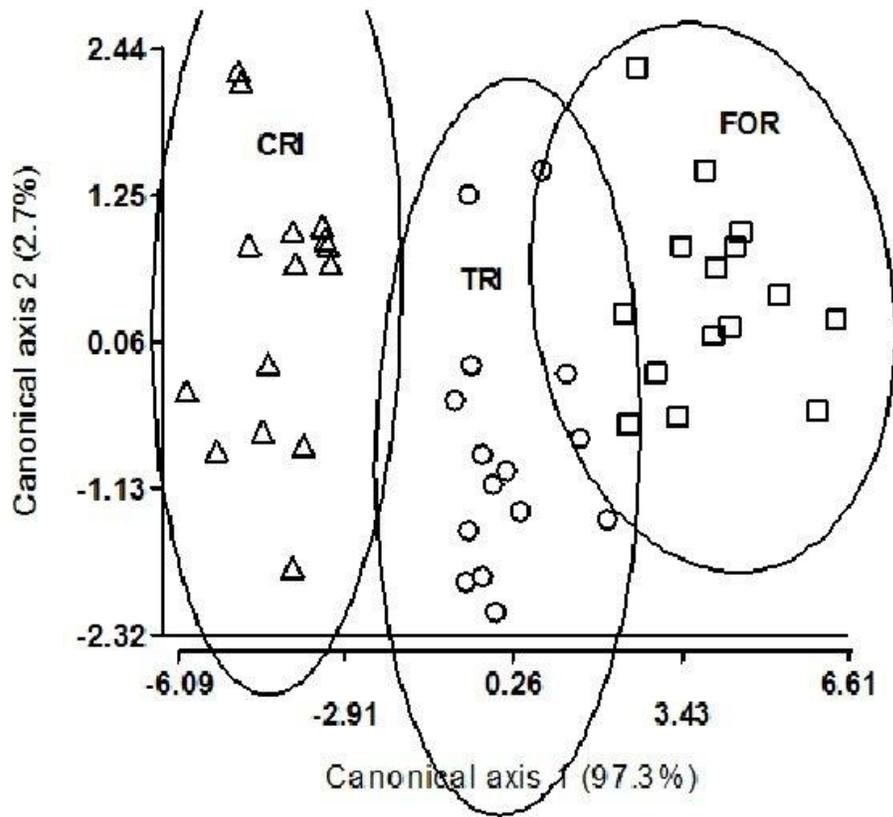


Figure 3. Canonical discriminant analysis for cacao varieties in middle zone. Variety: CRI = Criollo, TRI = Trinitario, FOR = Forastero.

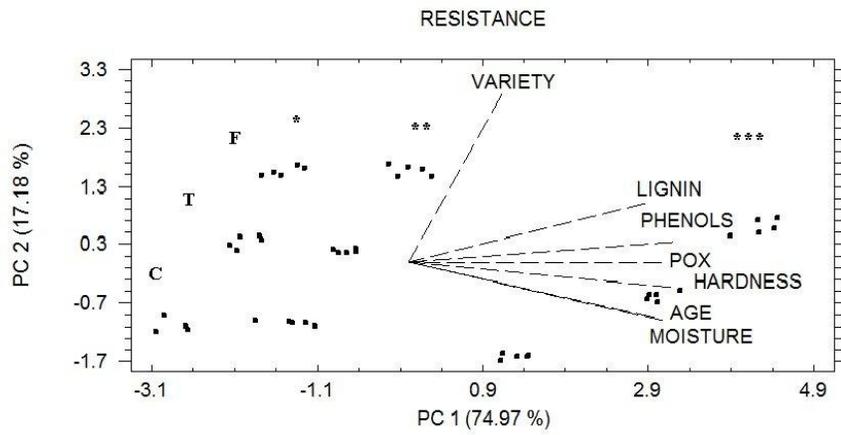


Figure 4. Principal components analysis of resistant to FRP on middle zone. F: Forastero, T: Trinitario, C: Criollo, *: 4-weeks, **: 8-weeks, ***: 12-weeks.

CAPITULO 4

LA SUSCEPTIBILIDAD DE *Theobroma cacao* A MONILIASIS ESTA RELACIONADO CON LA EDAD DEL FRUTO.

Albores-Flores Víctor J.^{1,4}; García-Guzmán Graciela.³; Espinosa-García Francisco J.² and Salvador-Figueroa Miguel.¹

1 Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Príncipe Akishino S /N Colonia Solidaridad 2000. Tapachula, Chiapas C. P. 30798, México;
Tel (fax) 52 962 6427972. Email: miguel.salvador@unach.mx

2 Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad. Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua carretera a Pátzcuaro, no. 8701, Colonia Ex - Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190, Morelia Michoacán, México; Email:
espinosa@cieco.unam.mx

3 Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510. México D.F;
Email: mggarcia@ecología.unam.mx

4 Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D.F.

RESUMEN

Las variedades de cacao, expresan una diferencia en expresión de susceptibilidad a las enfermedades fungicas, siendo más evidente en la enfermedad de la moniliasis. La variedad Criollo, ha sido reportada como la mas susceptible y que la presencia, al igual que el daño del fruto esta relacionado a las condiciones ambientales de cada zona productora de cacao. Escaso es la información referente a las características del pericarpio del fruto, que es la parte de este organo donde infecta *Moniliophthora roreri*. El objetivo del presente estudio fue determinar el grado de susceptibilidad a moniliasis en frutas de la variedad Criollo, Trinitario y Forastero en etapa inmadura y juvenil. En 20 arboles de cada variedad de cacao, Forastero, Trinitario y Criollo, se evaluó las características fisicoquímicas de los frutos sanos en las edades de cuatro, ocho y doce semanas de desarrollo. Se realizó inoculación inducida en frutos de cuatro, ocho y doce semanas de edad, con conidios de *M. roreri*, fijando a estas con una biopelícula de quitosán de bajo peso molecular, en la superficie del pericarpio. En la expresión del primer síntoma de la enfermedad, se analizó concentración de fenoles, actividad peroxidasa, humedad y pH del tejido. Los frutos de la variedad Criollo, fueron los más susceptibles a la infección de *M. roreri*, encontrando una asociación con la menor concentración de fenoles, menor actividad peroxidasa, menor valor de pH y mayor humedad en el tejido. La edad del fruto y los valores de las propiedades fisicoquímicas evaluadas, presentan una relación directa, entre ellos. Los frutos infantil y juvenil, independientemente de la variedad de cacao, son los susceptibles a la infección de *M. roreri*, observando mayor incidencia en los primeros. En frutos sanos, se observó una relación directa entre los valores de pH y la edad, donde el valor de los frutos con mayor grado de madurez es próximo a la neutralidad. En frutos infectados, los valores de pH oscilan entre 6.3 y 6.5. En los frutos infectados los valores de humedad fueron menores, independientemente de la edad y de la variedad.

Palabras clave: Propiedades fisicoquímicas, infección, síntomas, cacao.

INTRODUCCIÓN

La susceptibilidad que muestran las plantas a los fitopatógenos es atribuida a factores como la condición nutrimental, ambiental, genética, características bioquímicas del hospedero y al grado de domesticación (Agrios, 2005, Pujol et al. 2005; Motamayor et al. 2008; Van Tassel et al. 2010). Estos eventos favorecen la pre infección, el desarrollo de la enfermedad y la especialización del patógeno por el hospedero (Lé Van et al. 2012; Nyadanu et al., 2013; Melnick et al., 2013). Todos los órganos de las plantas están sometidos a diversos tipos de estrés biótico y abiótico durante su crecimiento y desarrollo (Savicka y Skute, 2012). El estrés altera los procesos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos a nivel celular, y regulan el grado de susceptibilidad a una infección (Lira, 2007). La especie del hospedero también influye a esta condición (Agrios, 2005; Huerta-Palacios et al., 2009).

México tiene el quinto lugar como productor de cacao a nivel internacional, pero su producción actual se ha reducido en un 80%. Los frutos de cacao son afectados severamente por el hongo basidiomiceto *Moniliophthora roreri* (Evans, 1978) que causa la enfermedad de la moniliasis (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). La moniliasis se presenta en los primeros tres meses de desarrollo de los frutos y está relacionada con la variedad de cacao, la edad de desarrollo (Efombagn et al., 2007, 2007; Phillips-Mora et al., 2005; Hebbbar, 2007; Nyadanu et al., 2013), el grado de domesticación de la variedad (Motamayor et al, 2002, 2008), la posición del fruto en el árbol, la época de producción, las condiciones agroclimáticas de la región, al grado de competencia que exista entre los frutos presentes en el árbol y la edad del árbol (Asomaning et al., 1971; Torres et al., 2011; Takam et al., 2013; Bailey et al., 2013; Villalba et al., 2013; Melnick et al., 2013).

La moniliasis ataca únicamente el fruto del cacao y el pericarpio de éste es la zona más afectada, donde los síntomas aparecen entre tres u ocho semanas posterior a la infección por *M. roreri* (Johnson et al. 2008; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). En frutos menores a las nueve semanas de edad, el patógeno puede avanzar a la zona del endocarpio y colonizar el mucílago, generando una masa compactada de mucílago y semillas que después se necrosa (Sánchez y Garcés, 2012).

En el sur de Chiapas, México, se cultivan principalmente tres variedades domesticadas de cacao: Criollo, Forastero y Trinitario, cada una con diferentes grados de susceptibilidad a la enfermedad de la moniliasis (Motamayor et al., 2008). En frutos de estadio inmaduro ó chirel correspondiente de una a cinco semanas de desarrollo, la susceptibilidad a la moniliasis está relacionada con la concentración de carbohidratos, la presencia de aminoácidos y de ácidos orgánicos en el pericarpio (Martijn et al. 2012; Melnick et al., 2013). Además, la producción de moléculas implicadas en los mecanismos de defensa como las peroxidasa y fenoles, son inducidos por la presencia del patógeno (Nyadanu et al., 2012, 2013; Takam et al., 2013; Bailey et al., 2013); y la acumulación de lignina en la pared celular del pericarpio, que le confiere la dureza, está relacionada con la edad y la variedad del fruto (Nyadanu et al., 2012).

A pesar de que se conocen aspectos generales del desarrollo de los frutos de cacao (Lira, 2007; Stamm and Kumar, 2010; McAtee et al 2013; Kumar et al 2014), los eventos específicos implicados en la diferenciación celular del pericarpio durante el proceso de elongación del fruto, por cada edad y etapa de desarrollo se desconocen. Observaciones preliminares realizadas por el grupo de trabajo, durante la evaluación de la incidencia en plantaciones de cacao, sugieren que en el estado inmaduro de los frutos (cuando hay un alto valor de división celular), se encuentran involucrados metabolitos que participan en los mecanismos de defensa y que la concentración de éstos en los frutos de cacao no confiere protección contra la infección por *M. rozeri*. Probablemente existe una relación entre los metabolitos generados en el pericarpio del fruto en las primeras dos etapas de desarrollo y la susceptibilidad a la infección por *M. rozeri*. Acorde a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el grado de susceptibilidad a moniliasis en frutas de la variedad Criollo, Trinitario y Forastero en etapa inmadura y juvenil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Incidencia de la moniliasis

La incidencia de moniliasis se evaluó en 60 árboles de cacao (20 árboles de cada variedad, criollo, trinitario y forastero) ubicados en el Municipio de Tuxtla Chico, Chiapas, (N 14° 56'26.17" W 92°10' 19.55"). El estudio evaluó el desarrollo del fruto desde el amarre

hasta la cosecha del fruto en los dos periodos de producción: el primero comprendió del mes de Febrero a Junio, y el segundo de Julio a Noviembre. La cantidad de frutos totales por cada variedad fue de: en Criollo 400, en Trinitario 635 y 488 de Forastero (el promedio de frutos por período y por árbol fue de 10.0, 15.875 y 12.2, para cada variedad respectivamente). Los síntomas observados en el pericarpio del fruto (manchas marrón-chocolate y la presencia de esporas) se identificaron según el manual de moniliasis del cacao Phillips-Mora (2005), Phillips-Mora y Wilkinson (2007), Johnson et al. (2008) y Sánchez-Mora y Garcés (2012). La enfermedad se estimó por la cuantificación del total de mazorcas producidas por variedad, número de mazorcas sanas y número de mazorcas enfermas. Con base en esto, se determinó el porcentaje de incidencia mediante siguiente fórmula: Incidencia (%): (total de mazorcas enfermas/total de mazorcas cosechadas) x 100.

Producción de frutos sanos

Se seleccionaron 100 frutos de cada variedad de cacao con una semana de edad post-amarre. Los frutos seleccionados se protegieron en bolsas de celofán transparente para evitar la infección evaluar su desarrollo semanalmente hasta las doce semanas de edad. Únicamente se utilizaron los frutos de cuatro, ocho y doce semanas que no presentaron síntomas (Phillips-Mora 2005; Phillips-Mora y Wilkinson 2007; Sánchez y Garcés 2012).

Evaluación de la susceptibilidad a moniliasis

La susceptibilidad de los frutos de cacao se evaluó en 100 frutos sanos/variedad con edades de cuatro, ocho y doce semanas, los cuáles fueron inoculados con propágulos de *M. royeri* cepa TUXCT02012, proporcionada por el Instituto de Biociencias (IBC-UNACH) a una concentración de propágulos de 1×10^6 conidios mL^{-1} . Los frutos inoculados se cubrieron con una biopelícula de quitosán de baja densidad. La presencia de síntomas de moniliasis en la zona inoculada se evaluó diariamente hasta los 65 días post-inoculación (dpi). De los primeros frutos que mostraron síntomas característicos de la moniliasis, se realizaron aislamientos del patógeno para confirmar su presencia según los postulados de Koch.

Cuantificación de fenoles totales

Se colectaron cinco frutos sanos y enfermos por edad y por variedad. La extracción de fenoles se realizó con el procedimiento descrito por Restrepo et al. 2009. La extracción de fenoles totales se realizó utilizando 5 grs. de tejido del pericarpio macerado y adicionando 10 mL de metanol acuoso (50:50 v v⁻¹), se calentó por 30 min a 50 °C. La cuantificación de fenoles totales se realizó según lo reportado por Feng et al. (2010) con algunas modificaciones. A 10 µl de extracto metanólico se adicionaron 500 µl de Folin y 400 µl de 1 M de Na₂CO₃ y se mantuvo por 15 min en oscuridad. El producto de la reacción se cuantificó a 760 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 20). Se elaboró una curva estándar de ácido gálico, expresando los resultados en términos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG g⁻¹ de peso seco).

Cuantificación de la actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa (Pox) se cuantificó en tres zonas del fruto según lo reportado por Kar y Mishra (1976) con las siguientes modificaciones; se trituraron 100 mg de tejido a 4 °C en un mortero en 1 mL de buffer de fosfato (100mM a pH 6.8) y se centrifugó a 11600 rpm. El sobrenadante se diluyó con agua destilada (1:20). A una alícuota del extracto diluido (360 µL) se le adicionaron 922 µL de H₂O y 90 µL de buffer de fosfato. La mezcla se agitó en vortex y se le adicionaron 360 µL de pirogalol y 18 µL de H₂O₂. La mezcla resultante se incubó a 30 °C por 10 min. La reacción se detuvo con 180 µL de H₂SO₄ concentrado. Se cuantificó la concentración del producto de la oxidación del pirogalol a 420 nm en un espectrofotómetro (Genesys 20 Thermo Scientific modelo 4001/4). La actividad enzimática se reportó en nKatales g⁻¹ de peso seco, considerando la constante de extinción del producto de la oxidación del pirogalol E: 2.47 mM⁻¹cm⁻¹.

Cuantificación de pH

La cuantificación de pH se realizó en las muestras pericarpio de los frutos de *T. cacao* L. de acuerdo a la norma oficial NMX-F-317-S-1978 utilizando un potenciómetro (Hanna), calibrado a pH 4, 7 y 10, respectivamente. Se pesaron 5 g de tejido de pericarpio y se maceró en mortero hasta hacer una pasta fina. Se agregaron 1000 µL de agua destilada, se mezcló vigorosamente con un agitador y se tomó lectura del pH con el potenciómetro.

Cuantificación de la humedad

Se colocaron 10 g de muestra de la zona distal, media y proximal de pericarpio del fruto en una capsula de porcelana (mantenidas a peso constante). Las muestras se secaron a una temperatura de 110°C hasta obtener peso constante. La humedad del tejido se determinó mediante la fórmula: $Humedad (\%) = \left[\frac{P_i - P_f}{P_i} \right] \times 100$. Pi: peso inicial de la muestra, Pf: peso final de la muestra.

Análisis estadístico

Los valores de incidencia de la enfermedad fueron evaluados con análisis de varianza (ANOVA). Las variables fenoles, humedad, peroxidasa, dureza, pH y la diferencia de estas propiedades entre sanos e inoculados, fueron analizados con un análisis discriminante y un análisis multivariado (AMOVA). La relación entre las variables se determinó con un análisis de componentes principales.

RESULTADOS

Incidencia de frutos a diferentes edades

La dinámica de la enfermedad fue similar en ambos ciclos productivos (F: 2.48, p= 0.0459) durando 13 semanas (Figura 1). La mayor incidencia se observó en la variedad Criollo (75.11%) y la menor en la variedad Forastero (60.83 %). La variedad Trinitario presentó valores intermedios de incidencia (68.27 %). Lo anterior indica que la variedad Criollo es la más susceptible.

Los primeros síntomas de moniliasis se observaron en frutos de dos semanas de edad de la variedad Criollo, a diferencia de las variedades Trinitario y Forastero, que se observaron en frutos de tres semanas. La mayor acumulación de frutos enfermos en la variedad Criollo, fue entre la semana cuatro a la diez, a diferencia de las variedades Trinitario y Forastero, que fue entre la semana cuatro y la ocho. En la variedad Criollo, posterior a la decima semana los valores decrecieron, y en las variedades Trinitario y Forastero fue a partir de la semana ocho. El valor se reduce hasta el 3.5, 2.0 y 1.0 % en la semana 12, llegando a cero en la semana 14, en las variedades Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente. La diferencia entre las variedades fue significativa (F: 36.27, p<0.0001).

Pruebas de patogenicidad.

Los primeros síntomas de moniliasis se observaron a los cuatro ddi en las tres variedades de cacao, en frutos de cuatro y ocho semanas de edad (Figura 2). La presencia de frutos enfermos de moniliasis, posterior a la inoculación se detuvo al 7º día. Este último valor acorde a la cantidad de inóculo utilizado, sería el tiempo de incubación necesario para generar la patogénesis y el mínimo de 4 ddi, para observar la expresión de los síntomas característicos de la moniliasis. Los valores de incidencia entre los días 4 y 7 ddi presentaron diferencias en promedio, independientemente de la edad, de 16.5 ± 9.53 , 7.96 ± 5.68 y 5.6 ± 3.23 , para las variedades Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente. Por otra parte, los frutos de 12 semanas no se enfermaron. El valor mayor de frutos enfermos se presentó en frutos de cuatro semanas y el menor en frutos de ocho semanas. Se encontró diferencias entre edades y variedades de cacao (F: 50.12, $p < 0.0001$). Respecto a lo anterior, las edades susceptibles a la infección de *M. rozeri*, son entre 1 a 8 semanas de desarrollo (F: 63.86, $p < 0.0001$).

Propiedades fisicoquímicas.

Peroxidasa. La actividad peroxidasa se detectó en las tres variedades de cacao y en las tres edades de fruto, tanto en sanos como en inoculados (Cuadro 1). Los frutos sanos de 12 semanas de edad, fueron los únicos que presentaron los valores más altos de actividad peroxidasa, diferenciándose de los de 8 semanas en valores promedio de 0.99, 3.65 y 3.49 veces más actividad, en las variedades Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente. Entre frutos de 4 y 8 semanas de edad, los valores fueron similares ($p < 0.05$). En los frutos inoculados, todas las edades presentaron actividad peroxidasa diferente (F: 365.32, $p < 0.0001$), observando una relación directa entre la edad con la actividad, sin importar la variedad.

Contenido de fenoles. La concentración de fenoles totales en las edades 4 y 8 en frutos sanos, fueron similares en la variedad Criollo y Trinitario, diferenciándose la variedad Forastero (Cuadro 1). En la edad de doce semanas para frutos sanos, las tres variedades se diferencian en concentración. En ambas condiciones de sanidad, frutos sanos e inoculados, en las tres variedades, se observó una relación directa entre la concentración

de fenoles y el aumento de la edad. En frutos sanos, entre las edades de 4 y 8 semanas hubo una variación de 0.32, 0.24 y 0.77 mg EAGg⁻¹, y entre las edades de 12 y 8 fue de 0.1, 0.25 y 1.16 mg EAGg⁻¹, para Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente. En frutos inoculados, la diferencia observada entre las edades de 4 y 8 fue de 7.69, 13.14 y 16.48 mg EAGg⁻¹, y entre las edades de 12 y 8 fue de 7.55, 5.91 y 18.12 mg EAGg⁻¹ en concentración de fenoles en Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente.

La diferencia observada en concentración de fenoles, entre sanos e inoculados, en frutos de 4 semanas de edad fue de 0.42, 0.51 y 0.28 mg EAGg⁻¹, en frutos de 8 semanas fue de 7.79, 13.41 y 15.99 mg EAGg⁻¹, y en frutos de 12 semanas fue de 15.24, 19.07 y 32.95 mg EAGg⁻¹ en Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente.

Valores de pH. En los valores de pH del pericarpio de los frutos de cacao (Cuadro 1), se observó una relación directa con el desarrollo del fruto y los valores tienden de ácidos a neutros en frutos sanos. En frutos sanos, en las tres edades por separado cada una, los valores de pH fueron similares entre las tres variedades. La diferencia en el valor de pH entre edades, en sanos entre 4 y 8 semanas fue de 0.09, 0.12 y 0.15, y entre edades de 8 y 12 fue de 0.36, 0.43 y 0.47, en Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente. En frutos inoculados la diferencia entre frutos de 4 y 8 semanas fue de 0.05, 0.09 y 0.07, y entre frutos de 8 y 12 semanas fue de 0.32, 0.40 y 0.39, para Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente.

La diferencia en el valor de pH entre sanos e inoculados, en frutos de 4 semanas fue de 0.0, -0.03 y 0.04, en frutos de 8 semanas fue de -0.04, -0.06 y -0.04, y en frutos de 12 semanas fue de -0.08, -0.09 y -0.12, para Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente.

Humedad en el pericarpio. El contenido de humedad en el pericarpio de frutos sanos e inoculados en las tres edades para cada variedad (Cuadro 1), muestra que el mayor valor se encontró en frutos de 12 semanas de edad. El contenido de humedad está relacionado con la edad en frutos sanos e inoculados. En frutos sanos, la diferencia observada entre la edad de 4 con la de 8 fue de 12.85, 15.83 y 15.94 %, y entre la edad 8 y 12 fue de 5.86, 2.16 y 6.12 % para Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente. La diferencia observada

en frutos inoculados entre las edades 4 y 8 fue de 12.18, 14.79 y 7.31 %, y entre 8 y 12 fue de 7.29, 5.31 y 7.31 % para Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente.

Se observó que la diferencia en los valores de humedad entre sanos e inoculados en frutos de 4 semanas fue de -4.53, -4.59 y -4.82 %, en frutos de 8 semanas fue de -5.2, -5.63 y -3.9 %, y en frutos de 12 semanas fue de -3.77, -2.48 y -2.6 % menos humedad en Criollo, Trinitario y Forastero, respectivamente.

El análisis de varianza multivariado (Cuadro 2), muestra que existen diferencias significativas entre la sanidad, variedad y edad, incluyendo sus interacciones.

El análisis discriminante de los datos, mostró que el 84.61 % de la varianza fue explicada por las primeras dos funciones canónicas. El valor de pH es la variable más importante en la discriminación de grupos del primer factor canónico, considerando que los individuos con mayor valor de pH se ordenan a la derecha del eje en el espacio discriminante (Figura 3). La dispersión de centroides mostró que los grupos de individuos que presentan las edades inmaduras (4 y 8 semanas) se oponen al de 12 semanas de edad, en el eje canónico 1. Por otro lado, el eje canónico 2, explica la pequeña variación entre las condiciones de fruto sano e inoculado y la variable más importante de clasificación son los fenoles.

El análisis de componentes principales (ACP), entre frutos sanos y enfermos, muestra que el 92.20 % del total de la varianza puede ser explicado con los primeros tres componentes (Figura 4). El componente uno (CP1, 46.36 %), está integrado por las variables edad, fenoles, humedad y pH. El segundo componente (CP2, 31.55 %), agrupa a las variables sanidad y peroxidasa. En el tercer componente (CP3, 14.28 %), se ubicó a la variable variedad.

Con base en nuestros resultados la etapa susceptible a la moniliasis se presenta a partir del evento de la formación del fruto hasta la octava semana de desarrollo. Posteriormente (a partir de la semana nueve) se genera un estado transitorio que produce resistencia en el fruto de cacao, inhibiendo el proceso de infección y desarrollo de la moniliasis de cacao (Figura 5).

DISCUSIÓN

La susceptibilidad observada en los frutos, estuvo relacionada a la edad de desarrollo en las tres variedades de cacao, donde los correspondientes a la fase inmadura (de 4 y 8 semanas) son las susceptibles, similar a lo observado por Phillips-Mora et al (2005).

La presencia de frutos de la variedad Criollo con síntomas de moniliasis en la segunda semana después del amarre, y en la tercera semana en las variedades Trinitario y Forastero (Figura 1). Lo anterior podría asociarse con la presencia de conidios durante la antesis floral, observado con anterioridad por Albores *et al.* (2017), Frimpong *et al.* (2014), y Omolaja *et al.* (2009). Otra posibilidad, es que la cepa de *M. rozeri* presente en el área de estudio sea más agresiva (Sánchez & Garcés, 2012), por observar un tiempo de incubación menor a lo reportado por Phillips-Mora *et al.* (2005) y Phillips-Mora & Wilkinson (2007). El retraso en la aparición de los síntomas observado en las variedades Forastero y Trinitario, o progresión de la enfermedad en las variedades Criollo, fue relacionado por Albores *et al.* (2017) a los parámetros físico-químicos del pericarpio de la fruta.

La mayor incidencia observada en edades menores a nueve semanas (dos meses), hace pensar que la etapa inicial de desarrollo, que corresponde a la de alta tasa de división celular (Albores et al. 2017), es la etapa más susceptible de los frutos de cacao. Phillips-Mora et al. 2005; Johnson et al. 2008; Sánchez-Mora y Garcés, 2012, reportan que independientemente de la variedad, el periodo de mayor incidencia y susceptibilidad es entre los meses 0 a 3, considerando a este periodo como de frutos infantil y juvenil, similar a lo observado en el presente estudio.

En la dinámica de la enfermedad de la moniliasis (Figura 1), se observa una diferencia entre las tres variedades de cacao estudiadas. Los datos sugieren que la composición química del pericarpio del fruto de cada variedad es diferente y que está directamente relacionado al grado de susceptibilidad que presenta cada variedad. Lo anterior coincide con lo reportado en otros estudios (Takam et al. 2013; Nyadanu et al. 2013), quienes proponen que la susceptibilidad observada es el reflejo de las condiciones bioquímicas de la fruta, y la más susceptible es la variedad Criollo (Motamayor et al. 2008).

Pruebas de patogenicidad

A diferencia de otras investigaciones donde el tiempo de incubación es de tres y ocho semanas (Phillips –Mora y Wilkinson, 2007; Sánchez y Garcés, 2012), en el presente estudio el tiempo de incubación encontrado fue de una semana o menos (Figura 2). Los resultados sugieren que tanto la cantidad de inóculo como la fijación de estos en la superficie del pericarpio, influyeron en el proceso de infección. La cantidad de inóculo, traducido a mayor cantidad de conidios germinados y micelios infectivos, provocó mayor competencia por los nutrimentos en el área de penetración; posterior a ello se acortó el tiempo en la expresión de la fase necrotrófica, y se observaron los síntomas en la parte externa del pericarpio. Lo anterior explicaría la presencia de síntomas de la moniliasis en siete días, o menos. Similares resultados se presentaron en cultivos de rosa por Filgueira y Zambrano (2014) y en el cultivo de cebolla por Buloviené y Surviliené, (2009).

Por otro lado, el tiempo en que se genera los primeros síntomas en campo comparado con el tiempo observado en frutos inoculados, hace pensar que la cantidad de conidios que recibe la superficie de los frutos de cacao en una inoculación natural, es menor al utilizado en la inoculación inducida. Además, se deduce que son pocos los conidios que logran retenerse en la superficie del fruto después de llegar al pericarpio, a través de un proceso natural de transporte. Los posibles impedimentos de retención de los conidios son el ser arrastrado por el viento, insectos y lluvia (Agrios, 2005). La posible retención en la superficie del fruto de forma natural, podría estar ocasionado por polímeros de la pared celular de las células epidérmicas del fruto y por los exudados de éste (Filonow, 2002; Zelinger et al 2006; Rodríguez-López et al 2013).

La mayor incidencia generada en frutos de cuatro semanas por la infección de *M. rozeri*, comparado con la reducida incidencia en frutos de ocho semanas (Figura 2), sugieren que existe una relación entre la edad del fruto con la susceptibilidad a la infección del patógeno y desarrollo de la moniliasis. El proceso de división celular, mayor en frutos de cuatro semanas, hace pensar que los procesos generados en la etapa infantil están dirigidos a la generación de biomasa (etapa I, descrito por Martijn et al. 2012) y no a protección de tejido (Agrios, 2005). Lo anterior es similar a lo observado en cultivo de

pepino (Ando et al. 2009), algodón (Asran y Mohamed, 2014), Champa (Balaguera-López y Herrera, 2012) y cacao (Takam et al., 2013, Nyadanu et al. 2013).

Es importante destacar que la falta de desarrollo de la moniliasis en frutos de 12 semanas en el presente estudio, sugiere que la susceptibilidad expresada en los frutos de cacao a la infección de *M. roseri* está relacionada a la etapa de división celular y que existe un efecto refractario en la etapa de diferenciación del fruto (> 8 semanas). La composición del pericarpio, en los frutos de 12 semanas, evita la entrada y el establecimiento del patógeno, por no permitir una condiciones apropiadas para el desarrollo del micelio (Agris, 2005). Lo anterior ha sido observado en cultivo de pepino (Ando et al. 2009), aguacate (Freeman et al. 1996), Ñame (Castro et al. 2003) y arándanos (Miles y Schilder, 2013).

Propiedades fisicoquímicas

Encontramos una relación entre el aumento progresivo de AP, FT, pH y Humedad y la edad del fruto sano. El presente estudio sugiere que durante el crecimiento del fruto de cacao, se presentan cambios físico-químicos asociados al desarrollo, que determinan las tres etapas que describe Martijn et al, (2012) (E1: división celular, E2: alargamiento e inicio de diferenciación, E3: diferenciación y madurez). También esta asociación fue observada en Champa (Balaguera-López y Herrera, 2012), en pepino (Ando et al. 2009), en arroz (Koch and Mew, 1991) e *Inga* (Lokvam and Kursar, 2013).

La condición de fruto enfermo, en las edades de cuatro y ocho semanas, se asociaron a la falta de aumento de humedad y a un efecto amortiguador al valor de pH en tejido infectado del pericarpio. Durante el proceso de incubación que se llevó acabo en los frutos inoculados e infectados, se deduce que varias rutas metabólicas implicadas en la división celular fueron detenidas (Di Feo et al. 2010; Alkan et al. 2013; Prusky et al. 2016), dando como resultados un valor constante de pH, coincidiendo con lo observado en el proceso de infección del mango con *Phomopsis mangiferae* (Davidson et al. 2010) y en la infección del fruto de almendra, por *Alternaria alternata* (Dieguéz – Uribeondo et al, 2008). Es posible que durante el desarrollo miceliar de *M. roseri* en el tejido del pericarpio, se excretaron moléculas de naturaleza ácida, como ácidos orgánicos (Dieguéz-Uribeondo et

al. 2008; Di Feo et al. 2010; Alkan et al. 2013; Prusky et al. 2016), que redujeron moléculas co-factores el proceso de crecimiento celular del hospedero y afectaron a los mecanismos de detección y defensa.

Por otro lado, el reducido valor de humedad en los frutos enfermos respecto a los sanos podría ser el resultado de una opstrucción del transito de agua por los conductos vasculares (capturando nutrimentos y agua por el micelio, (Agrios, 2005; Diéguez et al. 2008; Alkan et al. 2013)) tanto en el área de tejido infectado como en tejidos aledaños que dependen de éste elemento. Lo anterior, promovió la reducción de procesos metabólicos indispensables para la célula (Bailey et al. 2013; Agrios, 2005), generando la muerte del tejido del pericarpio y la deshidratación de este, observándose como una momificación del fruto, que son los síntomas comunes de la moniliasis (Phillips-Mora y Wilkinson 2007).

La cantidad de fenoles y de actividad peroxidasa observados, en frutos de cacao enfermos, esta relacionado como respuesta de defensa, almacenándose en tejido para inhibir el avances de patógenos (Agrios, 2005; Bailey et al 2013; Nyadanu et al. 2013), los cuales difieren entre edades del fruto, ejerciendo un mayor efecto inhibitorio en frutos con mas tiempo de madurez (Bailey et al, 2013, Ando et al, 2009).

Por otro lado, la falta de síntomas visibles en los frutos inoculados de doce semanas, sugieren que el pericarpio del fruto, independientemente de la variedad, es diferente a las otras edades en el contenido de fenoles, pH, humedad y peroxidasa. El valor encontrado de estas variables en tejido del pericarpio, no permitieron la penetración del patógeno y tampoco su establecimiento. Estos resultados coinciden a lo observado por Ando et al. (2009), en pepino. Es posible que en los procesos metabólicos implicados en la formación del tejido del pericarpio al alcanzar doce semanas de edad, la resistencia observada en fruto de cacao sean el resultado de el decremento de la división celular y el aumento de la diferenciación celular. La división celular es un factor clave que genera susceptibilidad a la infección de *M. rozeri* en los frutos de cacao en la etapa infantil. Lo anterior también fue observada en Champa (Balaguera-López y Herrera, 2012), en pepino (Ando et al. 2009), en *Oryza sativa* (Koch and Mew, 1991) y en *Inga* (Lokvam and Kursar, 2013).

Los cambios metabólicos efectuados en los frutos, específicamente del tejido del pericarpio durante el desarrollo de este órgano, están relacionados directamente con la susceptibilidad que presenta a la infección de *M. royeri*. Los frutos infantiles y juveniles, con menor cantidad de fenoles, actividad peroxidasa, valor de pH y menor cantidad de humedad en el pericarpio, son susceptibles a una infección por *M. royeri*, a diferencia de los frutos de doce semanas.

Desde nuestra perspectiva, es necesario continuar con estudios relacionados con las enzimas que genera el fruto y que participan en el proceso de infección, incluyendo la conexión con los niveles de defensa que produzca en el fruto en las diferentes etapas de desarrollo. También correlacionar la expresión de genes del hospedero que participan en la susceptibilidad y en la formación del estado de transición, con los procesos de división y diferenciación celular.

BIBLIOGRAFÍA.

Agrios NG. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edn. New York. Elsevier Academic Press.

Albores F., V.J, García G., G., Espinosa G., F. J., and Salvador F., M. (2017). Degree of domestication influences susceptibility of *Theobroma cacao* to frosty pod rot: a severe disease devastating Mexican cacao. *Botanicals Science* (en imprenta).

Alkan N., Meng X., Friendlander G., Reuveni E., Sukna S., Sherman A., Thon M., Fluhr R. and Prusky D. (2013) Global aspects of pacC regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis. *Molecular Plant Microbe Interactions* 6(11): 1345.

Ando K, Hammar SA, Grumet R. 2009. Age-related resistance of diverse cucurbit fruit to infection by *Phytophthora capsici*. *Journal of American Society for Horticultural Science* 134: 176–182.

Asomaning E. J. A., Kwakwa R. S. and Hutcheon W. V. (1971) Physiological studies on an Amazon shade and fertilizer trial at the Cocoa Research Institute, Ghana. *Journal Agriculture Science*. 4(1): 47 – 64.

Asran A. A. and Mohamed H. I. (2014) Use of phenols, peroxidase and polyphenoloxidase of seed to quantify resistance of cotton genotypes to Fusarium wilt disease. Bangladesh Journal of Botany 43(3): 353- 357.

Bailey, B. A., Crozier, J., Strem, M. D., Melnick, R. L., Zhang, D., Maximova, S., Guiltinan, M. y Meinhardt, L. W. 2013. Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 81, 84-96.

Balaguera L. H. E. y Herrera A. A. (2012) Estudio de algunos cambios bioquímicos durante el crecimiento y hasta la cosecha del fruto de Champa (*Campomanesia lineatifolia* R. and P. familia Myrtaceae) Rev. Bras. Fruct., Jaboticalba. 34(2): 460 – 468.

Castro P., L. M., Saquero, M. J. y Beltrán H., J. D. (2003) Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum sp.* Como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea sp.* Revista Colombiana de Biotecnología. 5(1): 24-35.

Davidson M., Alkan N., Kobiler I. and Prusky D. (2010) Acidification by gluconic acid of mango fruit tissue during colonization via stem end infection by *Phomopsis mangiferae*. Postharvest Biology and Technology. 55: 71-77.

Di Feo L. del V., Laguna I. G. y Biderbost E. Q. (2010) Alteraciones fisiológicas asociados a la infección con Mal de Rio cuarto virus (MRCV) y a fitotoxicidad provocada por su insect vector (*Delphacodes kuscheli* Fennah) en trigo. Tropical Plant Pathology 35(2): 079 – 087.

Diéguez U. J., Forster H. and Adaskaveg J. E. (2008) Visualization of localized pathogen – induced pH modulation in almond tissue infected by *Colletotrichum acutatum* using confocal scanning laser microscopy. Phytopathology 98: 1171- 1178

Efombagn, M., Nyassé, S., Sounigo, O., Kolesnikova, M. y Eskes, A. 2007. Participatory cocoa *Theobroma cacao* L., selection in Cameroon: *Phytophthora* pod rot resistant accessions identified in farmers' fields. Crop protection. 26:1467 – 1473.

Evans HC, Stalpers JA, Samson RA, Benny GL. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany* 56(20):2528-2532.

Feng S., Zeng W., Luo F., Zhao J., Yang Z. and Sun Q. (2010) Antibacterial activity of organic acids in aqueous extracts from pine needles (*Pinus massoniana* Lamb.). *Food Sci. Biotechnol.* 19: 35-41.

Filgueira D. J. J. and Zambrano A. (2014) Temperature effect on rose downy mildew development under environmental controlled conditions. *Agronomía Colombiana.* 32(1): 29-35.

Filonow AB. 2002. Mycoactive acetate esters from Apple fruits stimulate adhesion and germination of conidia of the gray mold fungus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (11): 3137- 3142.

Freeman S., Katan T. and Shabi E. (1996) Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 1014 – 1020.

Frimpong-Anin K, Adjalo MK, Kwabong PK, Oduro W. 2014. Structure and stability of cocoa flowers and their response to pollination. *Journal of Botany* ID: 513623. <http://dx.doi.org/10.115/2014/513623>.

Hebbar, P. (2007). Cacao Diseases: A global perspective from an industry point of view. *Phytopathology.* 97, 1658-1663.

Huerta P., G., Holguin M., F., Benitez C., F. A., Toledo A., J. (2009). Epidemiología de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz, and Sacc] en mango (*Mangifera indica* L.) cv ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 27(2): 93-105

Johnson J., Bonilla J. and Aguero L. 2008. Manual de manejo y producción de cacaotero. Leon Nicaragua. Pags. 40.

Kar M, Mishra D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57 (2): 315-319.

Koch M. F. y Mew T. W. (1991) Effect of plant age and leaf maturity on the quantitative resistance of rice cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *Orizae*. *Plant Disease*. 75: 901-904.

Kumar R., Khurana A., Sharma A. K. (2014) Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*. 65: 4561 – 4575

Lé Van, A., Gladioux, P., Lemaire, C., Comille, A. Giraud, T., Durel, C. E., Caffier, V. y Le Cam, B. (2012) Evolution of pathogenicity traits in the Apple scab fungal pathogen in response to the domestication of its host. *Evolutionary Applications*. 5: 694 – 704.

Lira SRH. 2007. *Fisiología vegetal*. 2ª Edn México. Ed. Trillas.

Lokvam J. and Kursar T. A. (2013) Divergence in structure and activity of phenolic defenses in young leaves of two co-occurring *Inga* species. *J. Chem. Ecol.* 31(11): 2563 – 2580.

McAtee P., Karim S., Schaffer R. and David K. (2013) A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation and ripening. *Frontiers in Plant Science*. 4(79): 1-7.

Martijn ten Hoopen G, Deberdt P, Mbenoun M, Cilas C. 2012. Modelling cacao frosty pod growth: implications for disease control. *Annals of Applied Biology* 160 (160): 260 – 272.

Melnick R. L., Strem, M. D., Crozier, J., Sicher, R. C., Bailey, B. A. 2013. Molecular end metabolic changes of cherelle wilt of cacao and its effect on *Moniliophthora roreri*. *Physiol. Mol. Plant P.* 84, 153-162.

Miles, J. D. y Schilder A. C. (2013) Host defense associated with fruit infection by *Colletotrichum* species with on emphasis on anthracnose of blueberries. *Plant Health Progress* 1 – 10.

Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva eMJW, Llor R, Kuhn DN, Brown JS, Schnell RJ. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.) *Plos One* 3, e3311, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>

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

Nyadanu D, Akromah R, Adomako B, Kwoseh C, Lowor ST, Dzahini-Obiatay H, Akrofi AY, Owusu AF, Opoku AY, Assuah MK. 2013. Biochemical mechanisms of resistance to black pod disease in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 3(1), 20-37.

Nyadanu , D., Akromah, R., Adomako, B., Kwoseh, C., Dzahini-Obiatay, H., Lowor, S. T., Akrofi, A. Y. and Assuah, M. K. 2012. Host plant resistance to *Phytophthora* pod rot in Cacao (*Theobroma cacao* L.): the role of epicuticular wax on pod and leaf surfaces. *International J. Bot-London*. 8 (1), 13-21.

Omolaja SS, Aikpokpodoin P, Oyedeji S, Vwoiko DE. 2009. Rainfall and temperature effects on flowering and pollen productions in cocoa. *African Crop Science Journal* 17 (1): 41-48.

Phillips-Mora W, Wilkinson MJ. 2007. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97: 1644 – 1647.

Phillips-Mora, W., Cawich, J., Garnett, W. y Aime, M. C. 2006. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cocoa in Belize. *Plant pathology*. 55: 584.

Phillips-Mora W, Castillo J, Krauss U, Rodríguez E, Wilkinson MJ. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombia isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology* 54: 483-490.

Prusky D., Barad S., Ment D. y Fangcheng B. (2016) The pH modulation by fungal secreted molecules: a mechanism affecting pathogenicity by postharvest pathogens. *Israel Journal of Plant Science* 63(1): 22-30.

Pujol, B., Mühlen, G., Garwood, N., Horoszowski, Y., Douzery, E. J. P. and Mckey, D. (2005). Evolution under domestication: contrasting functional morphology of seedling in domesticated *cassava* and its closest wild relatives. *New Phytol.* 166, 305- 318.

Restrepo S. D. C., Narváez C. C. E. and Restrepo S. P. L. (2009) Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez Santander, Colombia. *Quimica Nova*, 32: 1517- 1522.

Rodríguez-López ES, Cárdenas- Soriano E, Hernández-Delgado SJ, Gutiérrez-Diez A, Mayek-Pérez N. 2013. Analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc. Infection of avocado fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35 (3): 898-905.

Sánchez-Mora FD, Garcés FFR. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et al. en el cultivo del cacao. *Scientia Agropecuaria* 3: 249-258.

Savicka M. y Skute N. (2010) Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija* 56: 26-33.

Stamm P. and Kumar P. P. (2010) The phytohormone signal network regulating elongation growth during shade avoidance. *Journal Experimental Botany*. 61(11): 2889 – 2903.

Takam SP, Ndoumbé-Nkeng M, Sache I, Ndong NEP, Gwet H, Chadoeuf J. 2013. Development stage – dependent susceptibility of cocoa fruit to pod rot caused by *Phytophthora megakarya*. *European Journal of Plant Pathology* 135: 363 – 370.

Torres de la C. M., Ortiz G. C. F., Teliz O. d., Mora A. A. y Nava D. C. (2011) Efecto de Azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). Revista Mexicana.

Van Tassel, D. L., DeHann, L. R. y Cox, T. S. (2010) Missing domesticated plant forms: can artificial selection fill the gap? *Evolutionary Applications*. 3 (5-6), 434 – 452.

Zelinger E, Hawes CR, Gurr SJ, Dewey FM. 2006. Attachment and adhesion of conidia of *Stagonospora nodorum* to natural and artificial surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68: 209 -215.

FIGURAS Y CUADROS

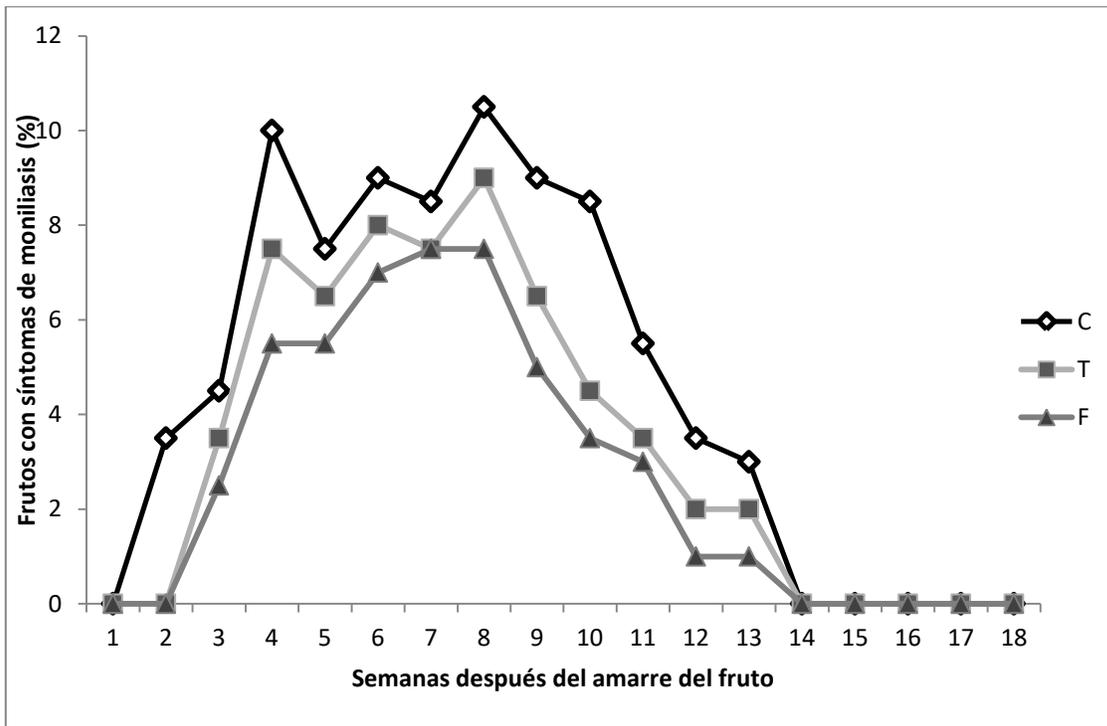
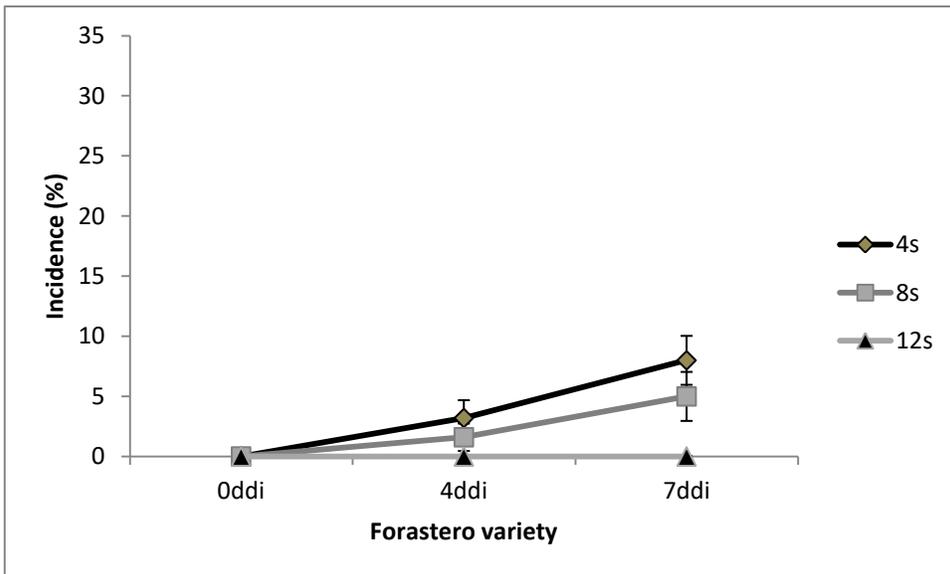
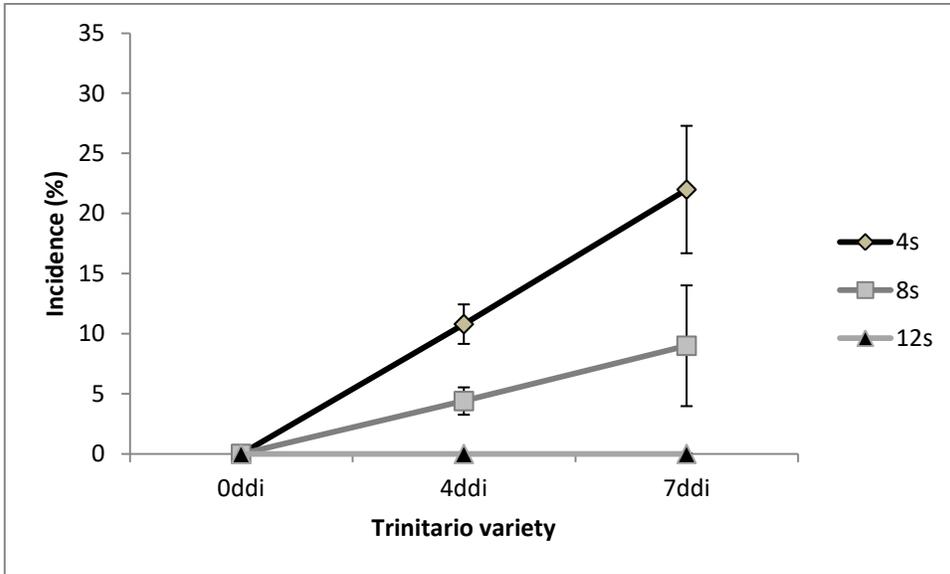


Figura 1. Incidencia de moniliasis en frutos de cacao de la variedades Criollo, Forastero y Trinitario. El cero representa el amarre del fruto. Los datos de la figura son resultado del seguimiento de fructificación por diez meses (Febrero –Noviembre, 2013).



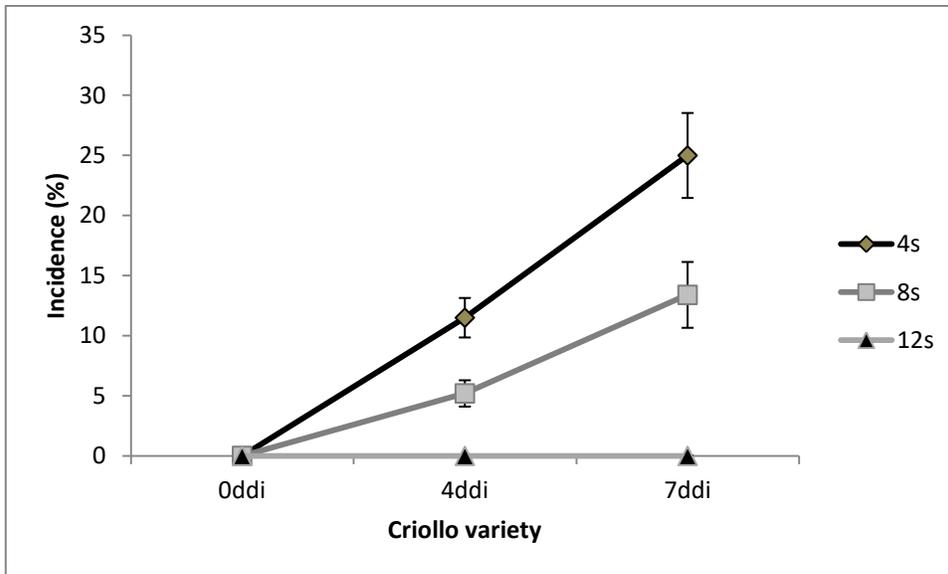


Figura 2 Cinética de frutos enfermos después de la inoculación de la cepa TUXCT02012 por cada variedad de cacao y por cada edad de fruto (ddi: Días después de la inoculación, s: semanas de edad)

Cuadro 1. Valores de actividad enzimática POX, humedad, pH y fenoles en el pericarpio de frutos de cacao (*Theobroma cacao*) en diferentes edades, en frutos sanos y después de la inoculación. (is: fruto inoculado sin enfermarse).

Sanidad	Variedad	Edad del fruto	Actividad Peroxidasa (nKatalesg ⁻¹)	Concentración de Fenoles (mg EAGg ⁻¹)	pH	Humedad (%)
Sanos	Criollo	4	1.30±0.067	0.71±0.044	6.46±0.015	55.78±2.021
		8	1.33±0.042	1.03±0.051	6.55±0.033	68.63±1.560
		12	2.31±0.130	1.13±0.084	6.91±0.027	74.49±0.700
	Trinitario	4	1.41±0.130	0.71±0.047	6.42±0.034	54.83±3.774
		8	1.48±0.096	0.95±0.054	6.54±0.053	70.66±3.518
		12	5.10±0.056	1.20±0.134	6.97±0.042	72.82±3.091
	Forastero	4	1.58±0.046	0.93±0.070	6.33±0.038	50.96±2.662
		8	1.63±0.458	1.70±0.035	6.48±0.046	66.90±2.599
		12	5.10±0.134	2.86±0.144	6.95±0.029	73.02±3.708
7 ddi	Criollo	4	7.36±0.935	1.13±0.029	6.46±0.031	51.25±0.011
		8	11.77±0.023	8.82±0.486	6.51±0.053	63.43±0.923
		12is	16.25±0.336	16.37±1.104	6.83±0.024	70.72±0.723
	Trinitario	4	12.53±0.621	1.22±0.031	6.39±0.060	50.24±0.219
		8	15.77±0.234	14.36±0.667	6.48±0.042	65.03±0.278
		12is	18.23±1.023	20.27±1.152	6.88±0.028	70.34±0.711

Forastero	4	17.23±0.884	1.21±0.019	6.37±0.035	46.14±0.526
	8	27.16±1.351	17.69±1.222	6.44±0.027	63.11±0.925
	12is	40.13±2.163	35.81±0.833	6.83±0.053	70.42±0.521

Cuadro 2. AMOVA de las propiedades fisicoquímicas en las dos condiciones de sanidad, para las tres variedades de cacao y edades de frutos.

	Estadístico	F	gl (núm.)	g (denom.)	p
SANIDAD	0.0022	7694.78	4	69	<0.0001
VARIEDAD	0.01	144.09	8	138	<0.0001
EDAD	0.00052	736.86	8	138	<0.0001
SANIDAD : VARIEDAD	0.01	157.45	8	138	<0.0001
SANIDAD : EDAD	0.01	159.19	8	138	<0.0001

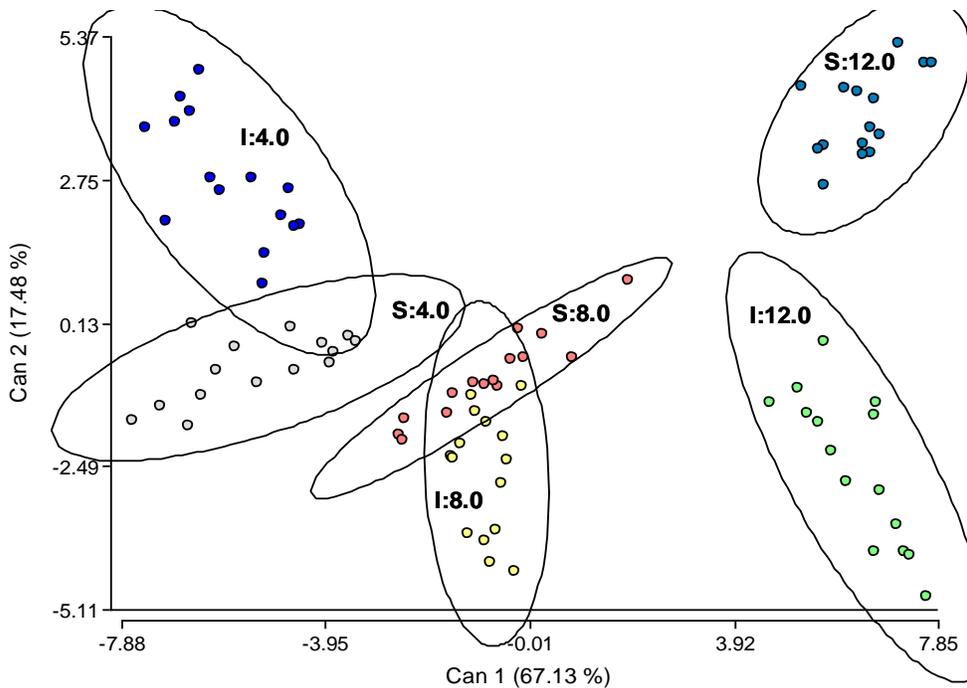


Figura 3 Análisis discriminante de frutos sanos (S) e inoculados (I).

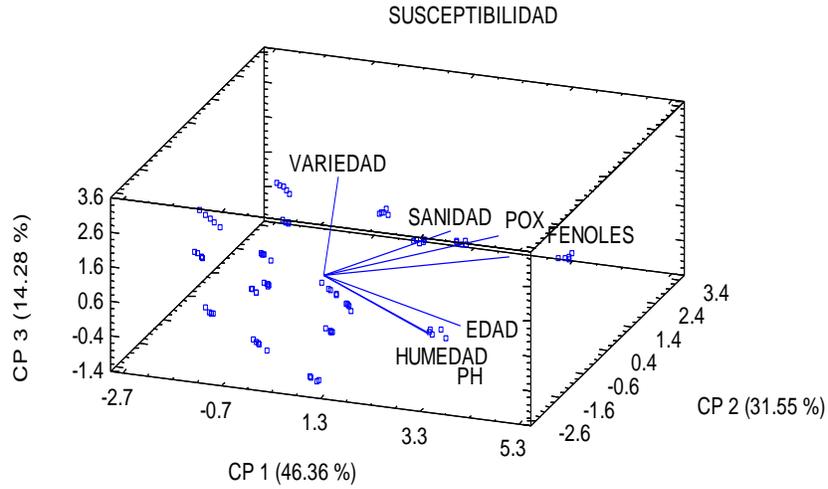


Figura 4. Análisis de componentes principales, de tres componentes, de la relación frutos sanos con inoculados.

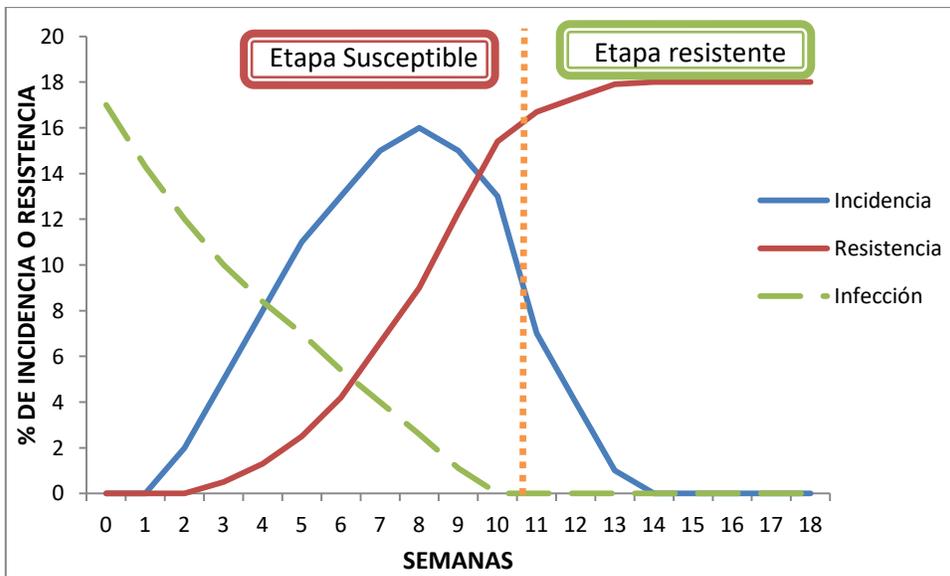


Figura 5. Propuesta de modelo de la relación susceptibilidad / resistencia en frutos de cacao durante su desarrollo.

CAPITULO 5

ANÁLISIS EPIDEMICO DE LA MONILIASIS DEL CACAO EN EL SOCONUSCO, CHIAPAS.

Víctor Jesús Albores-Flores^{1, 5}; Graciela García-Guzmán³; Francisco Javier Espinosa-García²,
Gustavo Mora-Aguilera⁴ and Miguel Salvador-Figueroa¹.

1 Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Príncipe Akishino sin número km. 2. Tapachula, Chiapas, C. P. 30700, México. Tel (fax): 52 962 6427972.

Email: msalvad@hotmail.com

2 Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua carretera a Pátzcuaro, No. 8701, Col. Ex - hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190, Morelia Michoacán, México.

3 Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510. México D.F.

4 Departamento de Epidemiología, Área de Fitopatología. Colegio de Posgraduados, Montecillos, Edo. De México.

5 Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D.F.

Palabras clave: Moniliasis, Epidemics behavior, symptoms, Soconusco, cocoa fruit.

RESUMEN

La moniliasis del cacao, afecta a todas las zonas productoras de este fruto en México, reduciendo la producción en un 80 % y generando en algunos casos el abandono de los predios. En Chiapas, lugar de introducción de la enfermedad, existe un desconocimiento del comportamiento que presenta ésta en las zonas productoras de cacao en la costa, específicamente el Soconusco, Chiapas. El presente estudio, lleva como objetivo analizar el comportamiento epidémico de la enfermedad de la moniliasis del cacao en el Soconusco, Chiapas y su relación con las condiciones ambientales de cada región. Se seleccionaron 10 municipios, con un área de estudio de una hectárea. Se evaluó la incidencia y severidad de la moniliasis durante 12 meses, que comprendió dos ciclos de producción. Se determinó los síntomas comunes expresados durante el tiempo de estudio. Los municipios con mayor incidencia fueron Villa Comaltitlan y Tapachula, contrario a Tuzantan y Acacoyahua. La mayor tasa de infección se encontró en Tuzantan y la menor en Huehuetan. El mayor daño en frutos de cacao, se observó en el municipio de Villa comaltitlan y el menor en Mapastepec. La necrosis en frutos, fue el síntoma con mayor expresión en todas las áreas estudiadas y los de menor frecuencia de expresión fueron: presencia de giba acompañada de necrosis y arillo amarillo, giba con arillo amarillo y la presencia de mazorca amarilla. Los frutos en estado infantil y juvenil, fueron los más afectados. La moniliasis del cacao esta asociada a temperaturas de 18 a 25 °C, a la humedad relativa superior al 63 % y a la precipitación. La variable que mas afecta al desarrollo y distribución de la moniliasis del fruto de cacao, es la severidad que presentan los frutos por la expresión de la enfermedad, seguido por la variable temperatura.

INTRODUCCIÓN

La moniliasis del cacao, enfermedad que afecta específicamente al fruto de *Theobroma cacao* L. Después de infectar el fruto, los síntomas característicos se observan de tres a ocho semana después de la penetración, generando una necrosis que termina en destruir a este órgano (Sánchez et al, 2008; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Esta enfermedad es

la principal limitante de las zonas productoras de cacao, afectando en un 50% en el Sur y centro de América, y un 80 % en México (Torres de la Cruz et al. 2011; Jaimes et al, 2011; Villamil et al. 2015; Torres de la Cruz et al. 2013).

Desde que en México, a partir del 2005, se introdujo la moniliasis del cacao por la zona Sur (Chiapas (Phillips-Mora et al. 2006)) la distribución a las demás zonas productoras del país fue rápido, incrementado la incidencia de la moniliasis y aumentado los daños al fruto del cacao, reduciendo la producción hasta alcanzar valores entre 20 a 0 % (Torres et al. 2011). Las condiciones ambientales en todos los estados productores de cacao Puebla, Veracruz, Tabasco, Oaxaca y Chiapas, fueron favorables para la moniliasis, generando reducción en la cosecha, principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas, en ciclos productivos consecutivos (Phillips y Wilkinson, 2007; Phillips M. y Cerda, 2009; Espinosa-García et al. 2015). Lo anterior ha transformado a la Costa Sur del Pacífico en un ecosistema frágil en la producción del cacao, que enfrenta una problemática fitosanitaria relacionada con las condiciones ambientales ideales para el desarrollo de la enfermedad, generando en el caso más extremo el abandono de los predios (Espinosa-García et al. 2015; López-Báez et al. 2015).

Las zonas productoras de cacao en Chiapas, se ubican en los municipios de Tuxtla Chico, Huehuetán, Pichucalco, Tuzantán, Villa Comaltitlán, Ostucán (Díaz-Jose et al. 2014), Tapachula (López Báez et al. 2015), Acacoyahua, Acapetahua, Mapastepec, Cacahoatan y Cd Hidalgo (Sociedad de Productores de cada municipio). Estas zonas son propicias para la generación de la enfermedad, presentando las condiciones ambientales óptimas (IMN) tanto para el establecimiento del patógeno como de su permanencia (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007; Espinosa-García et al. 2015; López-Báez et al. 2015). Las investigaciones realizadas en la región del soconusco, Chiapas, sobre la enfermedad de la moniliasis, han permitido conocer el grado de persistencia y daño en los municipios estudiados. Hasta el momento se desconoce a detalle la relación de la enfermedad con los ciclos productivos, tiempo de incubación, el comportamiento en cada zona productora y la edad límite del fruto al desarrollo de la enfermedad. El presente estudio tiene como objetivo analizar el

comportamiento epidémico de la enfermedad de la moniliasis del cacao en el Soconusco, Chiapas y su relación con las condiciones ambientales de cada región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y evaluación de la enfermedad

Se evaluó la incidencia de la moniliasis del cacao en 10 municipios (Cuadro 1), en la región Soconusco, Chiapas, México. El área mínima cultivada por predio seleccionado fue de un hectárea, con plantas correspondiente a la variedad Trinitario.

Para evaluar el desarrollo temporal de la enfermedad, se seleccionaron 30 plantas de cacao distribuidas en tres parcelas (cada fila contenía cinco plantas) separadas por cuatro surcos de arboles de cacao, por cada municipio. La incidencia de la enfermedad para cada mes se calculó con la fórmula $\% I = (nFE/nFT) \times 100$, donde I: es incidencia, nFE: es número de frutos enfermos y nFT: es el total de frutos. La presencia de frutos enfermos fue registrada cada mes durante el ciclo Enero – Diciembre 2012, con dos ciclos productivos (Enero - Junio y Julio- Diciembre), eliminándolos para evitar confusiones en el mes contiguo. Se consideró los síntomas reportados por Phillips-Mora and Wilkinson (2007), Sánchez-Mora y Garcés (2012) and Johnson et al. (2008).

Análisis temporal

El progreso temporal de la enfermedad se determinó utilizando los parámetros epidemiológicos basados en el valor de incidencia de los frutos de cacao, a cada tiempo de evaluación. Se determinó la incidencia inicial (Y_0), la final de la dinámica (Y_f), la incidencia no acumulada al tercer mes ($Y_i \text{ nac}$) y la final no acumulada ($Y_f \text{ nac}$), incluyendo el área bajo la dinámica de la enfermedad (ABCPE). El ABCPE fue determinado a través del cálculo de integración del trapecioide (Barbosa et al. 2016), utilizando la fórmula: $ABCPE = \sum \left(\frac{Y_i + Y_b}{2} \right) (t_b - t_i)$, donde $b = i+1$, los Y_i y Y_b son los valores de incidencia observados en dos observaciones distintas, a respectivos tiempos, t_b y t_i . Para describir el comportamiento que presento cada una de las epidemias observadas, se determinó el modelo apropiado para describir el progreso de la enfermedad junto con los parámetros estimados, considerando a el Logístico ($x = 1/(1 + be^{-rt})$), el de Gempertz ($x =$

$e^{(-be^{(-rt)})}$ y el Monomolecular ($x = 1 - be^{(-rt)}$). La tasa de infección se estimó mediante el valor de la pendiente de la ecuación $\ln\left[\frac{x}{1-x}\right]$ con respecto a t .

Análisis de severidad

El nivel de daño ocasionado por la enfermedad en los frutos, se determinó considerando los tipos de síntomas clasificándolos por el grado de coloración, considerando a la necrosis sin otro color de síntoma, como la más severa (Tabla 3). La severidad de la enfermedad se calculó empleando la fórmula de Townsend y Heuberguer (Delgado et al. 2005) $ISE = \sum nb [(N - 1)(T)] - 1 \times 100.$, donde IS= índice de severidad; n= número de hojas en cada grado.; b= grado.; N= número de grados empleados en la escala; T= número total de hojas evaluadas.

Análisis de síntomas

Se determinó el porcentaje del tipo de síntoma, acorde a la siguiente clasificación: a) necróticos (N), b) Necróticos con halo amarillo (NA), c) Presencia de giba y necrosis (GN), d) giba con necrosis y halo amarillo (GNA), e) Giba acompañado de color amarillo (GA), f) Giba (G) y g) Tonos de amarillo y otros (A).

Datos ambientales.

Los datos ambientales de todos los municipios fueron proporcionados por el Sistema Meteorológico Nacional, de la sede ubicada en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Análisis estadístico

Los valores de incidencia de cada epidemia, ISE, los valores de R, r, Yo, Yi nac, Yf, Yf nac, el ABCPE, síntomas y los factores ambientales, fueron analizados por ANOVA. Donde existió diferencias significativas se aplicó una comparación de medias por Tukey ($p < 0.05$). Se determinó la relación de las variables con las condiciones ambientales y se aplicó un análisis discriminante. El programa utilizado fue Infostat 2016.

RESULTADOS

Dinámica de la enfermedad

La dinámica de la enfermedad de la moniliasis de los diez municipios estudiados se presenta en la figura 1. Las epidemias presentaron una duración aproximada de 13 semanas cada una. El número de epidemias por ciclo, con excepción de los municipios

Tapachula y Suchiate que presentaron tres epidemias en el segundo ciclo, fue de dos por cada municipio.

La primera epidemia se encontró en el primer mes de estudio en los municipios de Suchiate, y Tuzantan, en el segundo mes en Acapetahua, Mapastepec, Huehuetan, Tuxtla Chico y Tapachula, y en el tercer mes en Acacoyahua, Villa Comaltitlan y Cacahoatan. La presencia de la segunda epidemia, con excepción de Suchiate y Tuzantan que la presentaron en el segundo mes, en los demás municipios fue en el tercer mes. En la mayoría de los municipios se encontró el inicio de la tercera epidemia en el séptimo mes, a diferencia de los municipios de Tapachula y Suchiate que lo presentaron en el sexto mes y Acacoyahua junto con Cacahoatan, la presentaron en el octavo mes. Seis municipios presentaron la cuarta epidemia en el octavo mes, observándose que en Tapachula y Suchiate inició en el séptimo mes, y el resto (Cacahoatan y Acacoyahua) en el noveno mes. Únicamente los municipios de Tapachula y Suchiate presentaron una quinta epidemia que inicio en el octavo mes.

En el tercer mes de cada epidemia, todos los municipios presentaron una incidencia máxima no acumulable (Y_i nac) donde el valor máximo fue 57.20 y el valor mínimo fue de 28.6 %. Las diferencias entre municipios fue significativa ($F: 9558.78, p < 0.0001$). Se agruparon los municipios de forma descendente acorde al dendograma presentado en la figura 2. Se ordeno a los municipios de la siguiente manera: Villa comaltitlan > Tapachula > Cacahoatan > Suchiate > Huehuetan = Acapetahua > Tuxtla Chico > Mapastepec > Tuzantan = Acacoyahua.

En el cuarto mes se presentó una reducción de la incidencia (Incidencia <6%). En los municipios de Tapachula, Cacahoatan y Villa Comaltitlan, la reducción presentó valores < 0.3%. Todas las dinámicas presentan un comportamiento sigmoideal con duración de cuatro meses, observándose una prevalencia de la enfermedad al existir generación de nuevas epidemias que son sucesivas a las observadas en el primer ciclo productivo en todos los municipios. En la generación de la quinta epidemia (Tapachula y Suchiate), no se observa que le anteceda una epidemia.

El valor de incidencia al inicio de cada epidemia fue diferente entre municipios, (Cuadro 2, F: 155.91, $p \leq 0.0001$). El valor más alto de incidencia inicial fue del 10 % y se presentó en los municipios de Acacoyahua, Suchiate, Huehuetan, Tuxtla Chico y Villa comaltitlan, independientemente del ciclo. El valor más alto de incidencia en general se encontró en el municipio de Villa Comaltitlan (81.0 %) y entre los demás municipios los valores fueron similares entre ellos (57.0 a 67.0 %, F: 1.96, $p \leq 0.0545$). La incidencia final de cada dinámica de la enfermedad no acumulada (Y_f nac), fue menor en los municipios de Tapachula y Villa comaltitlan que se presentó en ambos ciclos productivos. En el municipio de Cacahoatan en el segundo ciclo y en Mapastepec en el primero. En los demás municipios la incidencia fue mayor, presentándose en Acacoyahua y Tuzantan (primer ciclo) el valor más alto (F: 491.23, $p \leq 0.0001$).

Los valores de área bajo la curva fue diferente en todos los municipios (F: 17.74, $p < 0.0001$) pero no entre ciclos (Cuadro 2, F: 4.48, $p = 0.6053$). Los valores de ABCPE oscilaron entre 2551 a 3814, agrupando a los municipios de mayor a menor como sigue: Villacomatitlan > Tapachula > Tuzantan > Tuxtla Chico > Acapetahua > Suchiate > Acacoyahua > Cacahoatan > Huehuetan > Mapastepec.

La tasa de infección (r) se presenta en la Tabla 3, independientemente del ciclo, el menor valor se encontró en el municipio de Huehuetan y el valor mayor se presentó en Acacoyahua. Los demás municipios se agruparon con valores intermedios. El valor de infección aparente fue diferente entre los diez municipios (F: 97.62, $p < 0.0001$). La mayor severidad obtenida se presentó en el municipio de Villa Comaltitlan, en ambos ciclos (57.87 y 58.01) y la menor se obtuvo en el municipio de Mapastepec en el segundo ciclo, (28.07). En los demás municipios, los valores oscilaron entre 30.58 a 45.72, encontrando diferencias significativas entre los diez municipios (F: 25.12, $p < 0.0001$). Las epidemias en los 10 municipios, en los dos ciclos, presentan una dinámica de tipo Logística y el de Gambertz ($R = 0.999$) diferenciándose del modelo Monomolecular (F: 833.99, $p < 0.0001$).

Síntomas

En el análisis de síntomas expresados en los frutos de cacao en cada municipio (Cuadro 5), se encontró diferencias estadísticas entre los tipos de síntomas (F: 124.54, $p < 0.0001$),

siendo el síntoma N el de mayor valor promedio de incidencia en la mayoría de los municipios y los síntomas GNA, GA y A presentaron los valores menores. El ordenamiento de los tipos de síntomas de forma descendente fue: N>NA>G>GN>GNA>GA>A.

En los meses de desarrollo del fruto, respecto a la dinámica de cada epidemia, se encontró diferencias significativas en los tipos de síntomas expresados ($F: 41.57, p < 0.0001$), observando mayor valor de incidencia de síntomas en el tercer mes de desarrollo de los frutos, que corresponde a la fase juvenil. No se encontró diferencias estadísticas significativas entre ciclos, epidemias y municipios.

Relación con factores ambientales

La generación de cada incidencia obtenida por epidemia presentada, se asocio positivamente a temperaturas entre 18 y 25 °C ($r=0.98$), de forma negativa a temperatura entre 32 y 38 °C ($r= -0.54$) y también una asociación negativa con la precipitación ($r= -0.98$). Los ciclos de producción de frutos de cacao, presentó una ligera asociación con las temperaturas entre 18 y 25 °C ($r=0.54$).

El análisis discriminante de los datos muestra que un 94.19 % de la variación se explica en los primeros dos componentes. Considerando al índice de severidad como la principal variable de clasificación de los municipios (Can 1, Cuadro 7). En el resto, Can 2, el valor de la temperatura mínima es la más importante. Esta clasificación permite observar, mediante la distribución de los centroides, que en el eje axial 1 a la derecha se agrupan los municipios con mayor valor de ISE (Figura 2). En el eje axial 2, se distribuyen los municipios con mayor valor de temperatura mínima.

DISCUSIÓN

La presencia de la moniliasis en todos los municipios estudiados del soconusco, Chiapas, está relacionado a la falta de eliminación continua de frutos enfermos y de frutos cubiertos de esporas, que promovieron la prevalencia de la enfermedad en ambos ciclos productivos sin importar la ubicación del área de estudio. Lo anterior concuerda con lo encontrado por Torres et al. (2011), quienes además indican que esta prevalencia es favorecida por las condiciones ambientales de la zona productora de cacao, que facilita la germinación de los conidios de *M. rozeri* que están presentes en el ambiente todo el año.

Las condiciones ambientales y edáficas de la región del Soconusco, Chiapas, están relacionadas con la generación de dos ciclos productivos de cacao. Lo anterior difiere parcialmente de lo reportado por Yanes, (1994) y Torres et al, (2011), quienes encontraron la presencia de tres ciclos productivos en las zonas donde se cultiva cacao en Tabasco, Febrero – Junio, Junio – Septiembre y Septiembre – Febrero. Probablemente, el tipo de suelo y las condiciones ambientales, sean los factores principales de dicha diferencia (Torres et al. 2013; Nyadanu et al. 2012).

La dinámica de incidencia de la moniliasis se presentó durante los primeros tres meses de desarrollo, coincidiendo con lo reportado por otras investigaciones (Sánchez y Garcés, 2012; Phillips-Mora, 2006; Navarro y Mendoza, 2006). El número de dinámicas de moniliasis observadas (una dinámica = una epidemia), se relaciona al florecimiento y al tipo de municipio, observando que los municipios con temperaturas $>28^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa $>63\%$, tuvieron más epidemias. Las condiciones ambientales promovieron la liberación de conidios, germinación de estos y la penetración en el pericarpio del fruto de cacao, generando la presencia de la enfermedad en todo el año, donde probablemente las temperaturas mayores de 26°C y humedad relativa baja son las más apropiadas para su permanencia en las zonas cacaoteras (Phillips – Mora, 2006; Torres et al., 2011, 2013).

La variación en el daño ocasionado por la moniliasis entre municipios, se asocia a las condiciones climáticas, el tipo de suelo, las condiciones nutrimentales de cada planta, las propiedades bioquímicas del fruto y a las actividades de saneo, como podas y deshoje, condición reportada por Torres et al, (2011) y Ponce-Herrera et al. (2008). Lo anterior promovió que en algunos municipios existiera la presencia de agregados climáticos (zonas de mayor humedad y baja temperatura), similar a lo observado en el cultivo de cebolla por Silva-Rojas et al. (2009), y en cacao por Torres et al. (2011). Nuestros resultados sugieren que existió una relación entre los valores de severidad y las condiciones edafo-climáticas de cada municipio cacao, considerando probablemente una diferencia genética en el cultivo entre municipios (López Báez et al. 2015), determinaron el grado de daño del fruto de cacao en el municipio de Tapachula, y en las demás regiones de Chiapas. Los factores ambientales que impactaron, al desarrollo de las epidemias por municipio fueron la

Humedad relativa y la precipitación, contrario a lo observado en cebolla por Ponce-Herrera et al. (2008).

La incidencia final no acumulada de moniliasis, puede estar asociada al grado de madurez y composición que presenta el pericarpio de los frutos de cacao, que fue aportado por las condiciones nutrimentales que tiene el suelo de cada zona, por ejemplo Tapachula y Villa comaltitlan.

La variación en el número de síntomas característicos de la moniliasis del cacao entre municipios, hace pensar que las características químicas y físicas del pericarpio del fruto por municipio, es diferente. Estas propiedades fisicoquímicas del pericarpio son proporcionadas por los nutrimentos que las plantas absorben y su capacidad metabólica para formar el fruto, donde el suelo por ser la principal fuente de nutrimentos es el único factor influyente en esta variación.

La formación de necrosis es un indicador de muerte del tejido (Agrios, 2005), y en todos los municipios de este estudio estuvo presente este síntoma, por lo que se deduce con nuestros resultados que independientemente del municipio, se generará la muerte del fruto después del proceso de infección y la expresión de la fase necrotrófica (del hongo *M. rozeri*). Por otro lado, la formación de la malformación denominada giba (Johnson, et al.), considerada como una expresión de la fase biotrófica (xxxx et al., 20xx), se expresa con menor incidencia en todos los municipios, deduciendo que es menos favorable el fruto para el desarrollo de este síntoma y que en los municipios Acapetahua y Mapastepec, posiblemente tanto las característica del patrón utilizado en la formación de las plantas en campo como las condiciones ambientales del municipio, pudieran influir.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, N. G. (2005). *Plant Pathology*. 5th Edn. New York. Elsevier Academic Press.
- Días, L. A. S., Santos, M. M., Santos, A. O. S., Almeida, C. M. V. C., Cruz, C. D. y Carneiro, P. C. S. 2000. Effect of planting density on yield and incidence of witches' broom disease in a Young plantation of hybrid cacao tres. *Experimental Agriculture* 36: 501-508.
- Diaz J., O., Aguilar A., J., Rendón M., R., Santoyo C., V. H. (2014). Situación actual y perspectivas de la producción del cacao en México. *Cienc. Investig. Agrar.* 40(2), 279-289.

Espinosa G. J. A., Urestil G. J., Vélez I. A., Moctezuma L. G., Inurreta A. H. D. y Gongora G. S. F. (2015) Productividad y rentabilidad potencial del cacao (*Theobroma cacao*) en el tropic mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(5): 1051 – 1063.

Frenkel, O., Sherman, A., Abbo, S. y Shtienberg, D. 2008. Different ecological affinities and aggressiveness patterns among *Didymella rabiei* isolates from sympatric domesticated chickpea and wild *Cicer judaicum*. *Phytopathology* 98: 600- 608.

Gioia, T., Nagel, K. A., Beleggia, R., Fragasso, M., María F., D. B., Pieruschka, R., De Vita, P., Forani, F. y Papa, R. 2015. Impact of domestication on the phenotypic architecture of durum wheat under constrasting nitrogen fertilization. *J. Exp. Bot.* 66 (18): 5519-5530.

Jaimez R. E., Araque O., Guzman D., Mora A., Espinoza W. and Tezara W. (2013) Agroforestry system of timber species and cocoa: survival and growth during the early stages. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics*. 114 (1) 1-11.

Johnson J., Bonilla J. and Aguero L. (2008). Manual de manejo y producción de cacaotero. Leon Nicaragua. Pags. 40.

López B., O., Ramírez G., S. I., Espinosa Z., S., Moreno M., J. L., Ruiz B., C., Villarreal F., J. M. y González M., O. (2015). Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. *Acta Agríc. Pec.* 1(1), 16-23.

Mahajan, S. y Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139- 158.

Phillips-Mora, W. y Wilkinson, M. J. (2007). Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97, 1644 – 1647.

Phillips-Mora, W. y R. Cerda. (2009) Catalogo: Enfermedades del cacao. Turrialba, Costa Rica. CATIE. Pp. 24.

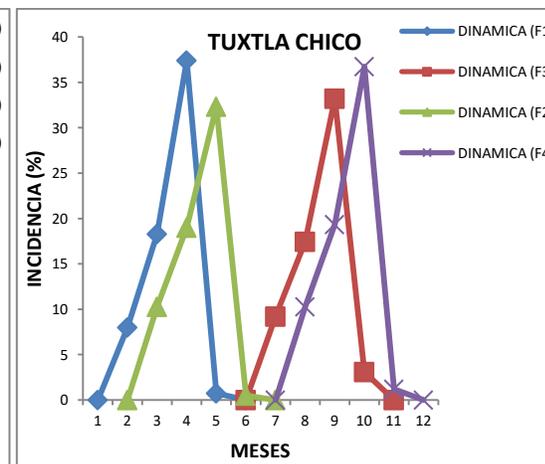
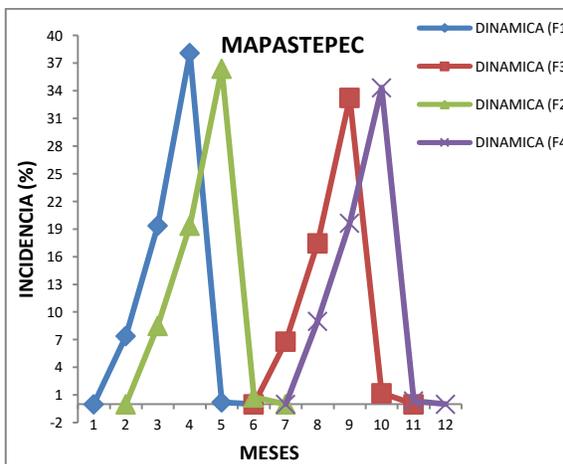
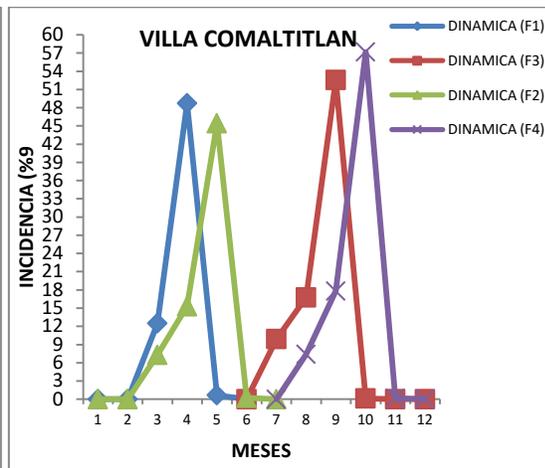
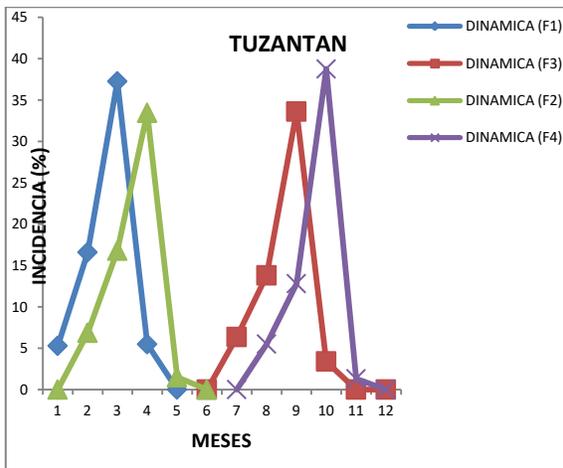
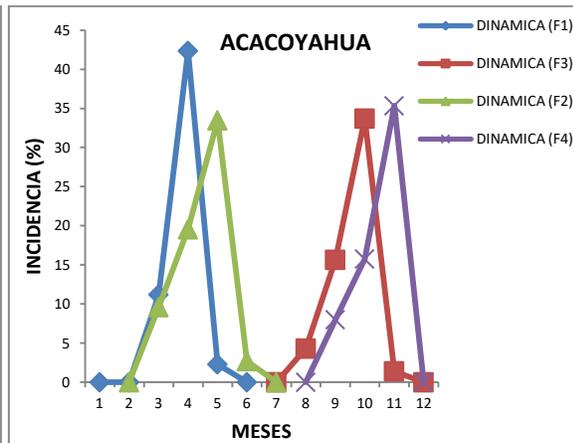
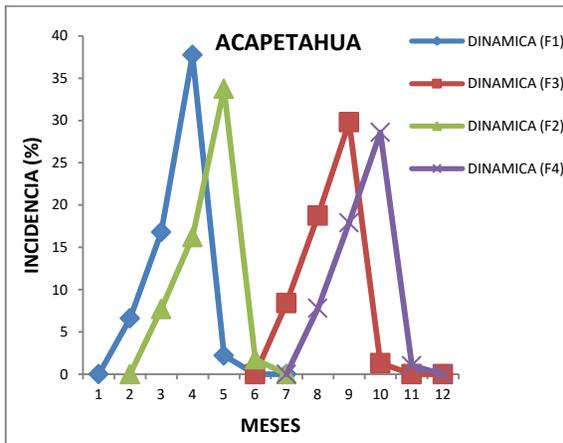
Ponce H. V., García E. R., Rodríguez G. M. P. y Zavaleta M. E. (2008) Análisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa*) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. *Agrociencia*. 42(1): 71-83.

Sánchez, M. F. D. y Garcés, F. F. R. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et al. en el cultivo del cacao. *Sci Agrop.* 3,249-258.

Silva R. H. V., Fernández P. S. P., Góngora C. C., Macías L. B. C. y Ávila Q. G. D. (2009) Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annum L.*) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(2): 134 – 147.

Torres de la C. M., Ortiz G. C. F., Teliz O. d., Mora A. A. y Nava D. C. (2011) Efecto de Azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología.* 31(1): 65 – 69.

FIGURAS Y CUADROS



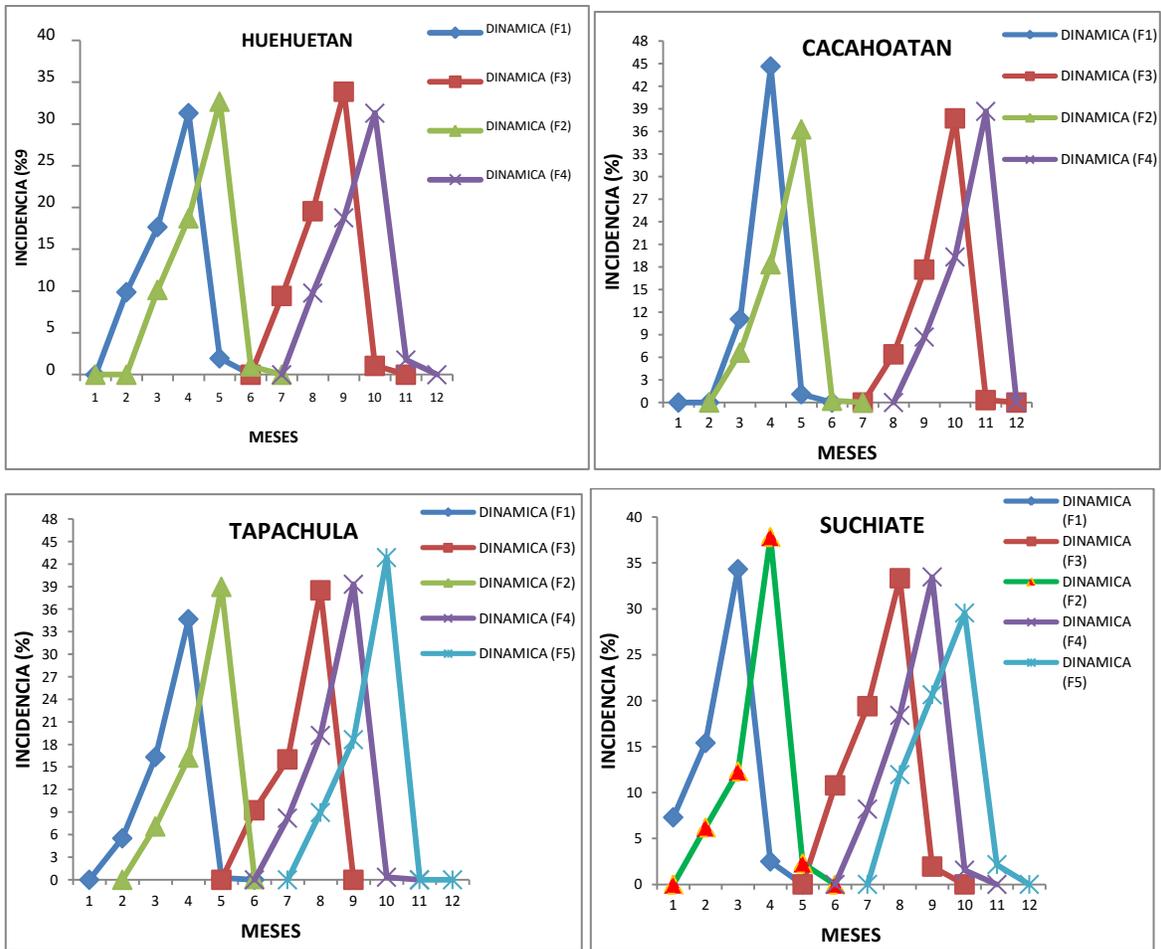


Fig. 1. Dinámica de la enfermedad de la moniliasis del fruto de cacao, en los diferentes municipios durante el ciclo productivo Enero – Diciembre, 2012. F: correspondiente a una floración; 1, 2, 3, 4, 5: las floraciones sucedidas.

Cuadro 1. Datos climáticos anuales y de geo-referencia de los municipios considerados en el presente estudio, pertenecientes a la región Soconusco, del estado de Chiapas. Z: zona, Ll: llanura, S: sierra, Temp: temperatura

Municipio	Ubicación	Altura (MSNM)	Temp (°C)	Precipitación (mm)	Z
Acacoyahua	N15°20' 30.79" W 92°40'7.28"	89 - 97	14 - 30	2500 - 4000	Ll
Acapetahua	N15° 16' 28.44" W 92°42' 0.85"	35	26 - 30	1500 - 3500	Ll
Cacahoatan	N 14°59'51.30" W 92°10'49.55"	411	10 - 26	4000 - 4500	S
Huehuetan	N 15°00.785' W 092°26.508.	125 - 130	24 - 30	1500 - 4500	Ll
Mapastepec	N 15°28' 7.38" W 92°48'41.91"	319	14 - 30	1500 - 4000	S
Suchiate	N 14°35' 28.41" W 92°11'56.11"	11	26 - 30	1000 - 2000	Ll
Tapachula	N 14°51' 38.05" W 92°17'53.49"	106	14 - 30	1000 - 5000	Ll
Tuxtla C.	N 14° 56'26.17" W 92°10' 19.55"	61	24 - 30	1200 - 5000	S
Tuzantan	N 15°8' 1.07" W 92° 25'33.27	53 - 72	20 - 30	2000 - 5000	S
Villa C.	N 15°15'9.40" W 92°36'18.37"	42	22 - 30	1500 - 4000	Ll

Cuadro 2.- Valores promedio de Yo, Yf, Yf nac y ABCPE en los dos ciclos productivos de los diez municipios analizados del Soconusco, Chiapas, de Enero a Diciembre del 2012.

Municipio	Ciclo	Yo	Yf	Yf nac	ABCPE
Cacahoatan	1	0.09 cde	0.59 b	0.01 ab	3100 f
	2	0.08 gh	0.64 b	0.0016 b	2700 g
Tuxtla Chico	1	0.09 bcd	0.63 b	0.01 ab	3627 bc
	2	0.10 ab	0.65 b	0.02 ab	3743 b
Suchiate	1	0.07 ij	0.59 b	0.02 ab	3136 ef
	2	0.10 a	0.64 b	0.02 ab	3738 b
Tapachula	1	0.06 jk	0.60 b	0.0017 b	2511 h
	2	0.09 cde	0.67 b	0.0011 b	2577 gh
Huehuetan	1	0.10 ab	0.62 b	0.01 ab	3548 c
	2	0.10 bc	0.63 b	0.01 ab	3642 bc
Tuzantan	1	0.06 k	0.62 b	0.03 a	3270 de
	2	0.06 k	0.58 b	0.02 ab	3059 f
Villa Comaltitlan	1	0.10 ab	0.65 b	0.0045 b	3273 de
	2	0.09 ef	0.81 a	0.0015 b	4356 a
Acacoyahua	1	0.01 a	0.61 b	0.03 a	3166 ef
	2	0.06 jk	0.57 b	0.01 ab	2314 i
Acapetahua	1	0.07 hi	0.61 b	0.02 ab	3382 d
	2	0.08 fg	0.57 b	0.01 ab	3351 d
Mapastepec	1	0.08 g	0.65 b	0.0048 b	3669 bc
	2	0.08 g	0.61 b	0.01 ab	3548 c

*Letras iguales no presentan diferencias significativas

Cuadro 3. Valores promedio de tasa de infección (r), valor de índice de severidad (ISE) y los valores de R de los modelos epidemiológicos de las epidemias en los dos ciclos productivos de los 10 municipios del Soconusco, Chiapas. (c: ciclo productivo).

Municipio	c	r	ISE	Logístico	Gambertz	Monomol
Cacahoat.	1	0.08 bc	30.58 cd	0.999 a	0.990 a	0.920 c
	2	0.09 a	38.11 bcd	0.999 a	0.990 a	0.910 cd
Tux. Ch.	1	0.07 fgh	34.84 bcd	0.999 a	0.999 a	0.920 c
	2	0.07 gh	39.20 bcd	0.999 a	0.999 a	0.920 c
Suchiat	1	0.08 bcde	31.6 cd	0.999 a	0.990 a	0.900 cd
	2	0.07 gh	35.01 bcd	0.999 a	0.999 a	0.930 c
Tapachu	1	0.08 bcd	42.3 bc	0.999 a	0.990 a	0.900 cd
	2	0.09 a	46.76 ab	0.990 a	0.980 ab	0.870 d
Huehuet	1	0.06 h	34.43 bcd	0.999 a	0.999 a	0.930 c
	2	0.07 gh	36.18 bcd	0.999 a	0.999 a	0.920 c
Tuzant	1	0.08 bc	42.78 bc	0.999 a	0.990 a	0.890 cd
	2	0.08 bcd	45.72 ab	0.999 a	0.990 a	0.890cd
Villa Com.	1	0.08 b	57.87 a	0.990 a	0.980 a	0.890 cd
	2	0.08 b	58.01 a	0.999 a	0.990 a	0.890 cd
Acacoyah	1	0.08 cde	36.01 bcd	0.999 a	0.999 a	0.940 bc
	2	0.10 a	34.42 bcd	0.999 a	0.990 a	0.900 cd
Acapetah	1	0.08 bcde	40.18 bcd	0.999 a	0.990 a	0.900 cd
	2	0.07 gh	36.56 bcd	0.999 a	0.999 a	0.920 c
Mapast	1	0.08 def	28.07 d	0.999 a	0.990 a	0.910 cd
	2	0.07efg	28.07 d	0.999 a	0.990 a	0.910 cd

*Letras iguales no presentan diferencias significativas

Cuadro 4. Porcentaje promedio de tipo de síntomas expresados por cada municipio.

MUNICIPIOS	SÍNTOMAS						
	N	NA	GN	GNA	GA	G	A
Acapetahua	18.52 b	6.65 klm	2.64 st	2.09 ux	10.85 fgh	10.11 ghij	2.14 u
Acacoyahua	12.40 fg	16.52 cde	4.29 pq	2.59 stu	3.93 qr	6.08 lmn	4.74 no
Cacahoatan	16.06 cde	11.18 fgh	5.88 mn	2.14 u	8.05 ij	9.43 hij	3.08 rs
Huehuetan	19.58 a	13.44 fg	4.05 pqr	0.0 z	8.11 ij	10.07 ghij	2.31 tu
Mapastepec	19.37 a	10.08 ghij	4.34 pq	2.28 tu	3.28 r	12.63 fg	0.0 z
Suchiate	15.32 efg	15.32 efg	4.78 no	4.98 mno	4.27 pq	6.86 kl	4.48 opq
Tapachula	17.31 bcd	16.79 cde	4.76 no	4.71 no	4.06 pqr	6.42 klm	0.0 z
Tuxtla Chico	17.79 bc	17.41 bcd	4.40 pq	2.76 st	6.45 kl	8.13 ij	1.83 ux
Tuzantán	18.65 b	15.64 def	8.0 ijk	4.29 pq	6.21 lm	1.27 x	1.10 x
Villa Comalt.	17.93 bc	18.89 a	6.19 lm	0.0 z	4.57 op	9.76 hij	0.0 z

N: necrosis, NA: necrosis con halo amarillo, GN: giba con necrosis, GNA: giba con necrosis y halo amarillo, GA: giba y amarillamiento, G: giba, A: Amarillamiento.

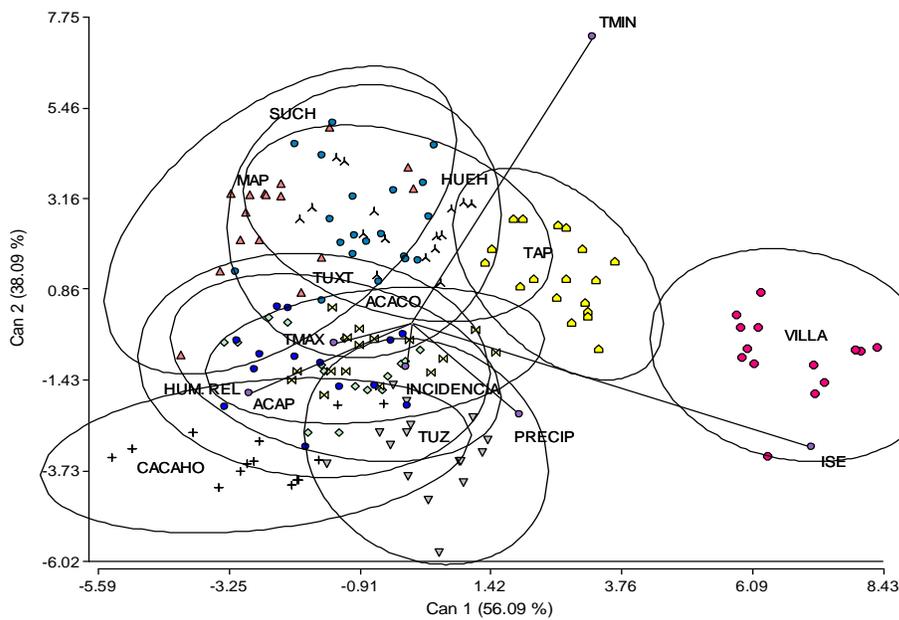


Figura 2. Análisis discriminante de los municipios, acorde a las condiciones climaticas.

CAPITULO 6

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Los aportes principales obtenidos en la presente investigación, están enfocados a explicar la reducción de la incidencia de la enfermedad durante el término de la etapa dos de desarrollo de la fruta, la variación en concentración de algunos componentes fisicoquímicos del pericarpio que están relacionados con la susceptibilidad a moniliasis durante el desarrollo del fruto posterior al cuajado de éste y parte del comportamiento epidémico que se presenta en la zona productora de cacao en el Soconusco, Chiapas. Se encontraron tres aspectos importantes, dos de ellos se presentan durante el desarrollo del fruto que explican la vulnerabilidad de éste a la enfermedad de la moniliasis y la posible resistencia expresada por el mismo, una vez que ha alcanzado la diferenciación celular del tejido del pericarpio. El tercero, observado en el presente estudio en el híbrido, originado por la variedad Criollo y Forastero, que explica parte de la susceptibilidad encontrada en los diferentes municipios estudiados y que depende de las características fisicoquímicas que presenta el fruto durante su proceso de formación, proponiendo que esta soportado principalmente por el tipo de suelo de cada región, el cual es diferente para cada una de ellas.

La variación en susceptibilidad encontrada en cada variedad de cacao (Ver capítulos 3 y 4) parece ser el resultado del proceso de domesticación que presenta la variedad Criolla y la Forastero. Durante este proceso la selección de individuos con características deseables, provocó el entrecruzamiento entre las dos variedades existentes realizándose de forma controlada como no controlada, produciendo una variedad de individuos que expresaron respuestas diferentes entre cada variedad de cacao conocida. Esta diversificación de respuestas, bioquímicas todas, ejerció una presión de selección sobre las interacciones sostenidas entre microorganismos y plantas de cacao, donde el correspondiente a un organismo patógeno permitió la expresión de síntomas, que al principio pudieron ser insignificantes. Lo anterior, como ya se menciona y ahondando un poco se debió a un proceso de fijación de caracteres, heredables todos, empleados durante la domesticación

y que fueron fluyendo hacia las otras dos variedades, con posibles recombinaciones que se han venido suscitando desde la introducción de Forasteros a zonas de cultivos Criollos, y de Trinitarios. Por lo que se deduce que la variedad Criollo, que por ser la más domesticada fue la primera en presentar el proceso de patogénesis y generar variantes en especies microbianas, en su mayoría de tipo fúngicas que le parasitaron y se diferenciaron como patógenos importantes. Posteriormente este fenómeno se hubo propagado a variedades alternas, como el Forastero donde la incidencia no generó de forma sustancial daño que fuera considerado como importante obteniendo una variedad más tolerante a la enfermedades fúngicas, como la moniliasis. Esta última interacción, se ha venido mejorando dando como producto cepas de *M. rozeri* más severas y eficientes en el proceso de infección de las tres variedades.

Aunque actualmente existen tres variedades importantes y bien definidas, Criollo, Trinitario y Forastero, las razas y clones derivadas de éstos mantienen cierto grado de susceptibilidad a las enfermedades fúngicas, donde algunas presentan cierto nivel de tolerancia, principalmente las generadas por el género *Moniliophthora*. Aun con esto, nuestros resultados revelan que la susceptibilidad que presenta el fruto de cacao, independientemente de la variedad, está directamente relacionada al proceso de división celular, que se presenta durante las primeras siete semanas de crecimiento. Posterior a este período, el grado de susceptibilidad a la moniliasis se va reduciendo de forma gradual, conforme aumenta el grado de diferenciación del fruto, deduciendo con nuestros resultados que se diferencian zonas en el fruto durante el proceso de diferenciación en el desarrollo de éste, proponiendo que se generan tres zonas en el fruto, diferenciándose como zona P y A, las menos susceptibles a la moniliasis y con mayor grado de diferenciación celular, y la zona M que es la más susceptible del fruto de cacao presenta menor grado de diferenciación y con menor proceso de división celular, donde se mantiene el alargamiento del fruto durante la etapa II de desarrollo.

El aspecto de diferenciación celular relacionada con el cambio fisicoquímico (Ver capítulo 4), es una de las características más importantes en el desarrollo del fruto de cacao que genera susceptibilidad / resistencia durante las primeras dos etapas de desarrollo

abordado en esta investigación. La caracterización fisicoquímica del fruto de cacao en tres edades diferentes durante su desarrollo, permitió establecer una relación entre estas propiedades y la susceptibilidad al proceso de infección. Con nuestros resultados se deduce que un fruto de cacao, independientemente de la variedad, es susceptible a la infección de *M. royeri* en las primeras ocho semanas de crecimiento por contener menor cantidad de fenoles, actividad enzimática peroxidasa y menor valor de pH en tejido. El aporte de nuestra investigación es establecer las condiciones fisicoquímicas de la susceptibilidad y resistencia del fruto de cacao, agrupando a las muestras en susceptibles y tolerantes. Otro aporte, es demostrar que un fruto que logra desarrollarse hasta las doce semanas, sin haberse infectado, ya no será objeto de desarrollar la enfermedad de la moniliasis. La baja producción que se presentan en las plantaciones cacaoteras de la región del Soconusco, Chiapas, es el reflejo del descuido que se presenta posterior al florecimiento del cultivo y durante los primeros dos meses del crecimiento del fruto, incluyendo la eliminación de frutos enfermos, que son fuente de infección para las demás floraciones.

En nuestro estudio, no se encontró diferencias entre municipios respecto al desarrollo de la enfermedad, infección, y número de epidemias (Ver capítulo 5). Lo que estuvo acorde a todos los estudios realizados respecto al desarrollo de la enfermedad, tanto en Tabasco como en Chiapas. La diferencia radica en las temporadas en que se presentan los ciclos productivos, donde las condiciones ambientales y las propiedades del suelo, podrían estar ejerciendo una influencia significativa. El análisis de síntomas, tanto número como tipo, que fue diferente entre municipios hace pensar que la variedad y el desarrollo de estos son indicadores de la capacidad bioquímica que presentan los patrones donde están sostenidos la parte productora de la planta de cacao, adjunto a esto las propiedades del suelo que sostiene el crecimiento y desarrollo del cultivo. Por lo anterior es indispensable realizar pruebas de asociación entre las variables edafo-climáticas y las propiedades fisicoquímicas de las variedades de cacao, para determinar la razón epidémica entre zonas cacaoteras y la distribución espacial de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agama A. E., Ottenhof M. A., Farhat M. I., Paredes L. O., Ortiz C. J. y Bello P. L. A. (2004). Efecto de la nixtamalización sobre las características moleculares de almidón de variedades pigmentadas de maíz. *Iterciencia*. 29: 643 – 649.
2. Agama A. E., Salinas Y. M., Pacheco V. G. y Bello P. L. A. (2011) Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidon. *Rev. Mex. De Cienc. Agric.* 2: 317 – 329.
3. Agrios, N. G. (2005). *Plant Pathology*. 5th Edn. New York. Elsevier Academic Press.
4. Aguirre S. E, Piraneque N. V. and Rodríguez J. (2015). Relationship between the nutritional status of banana plants and black sigatoka severity in the Magdalena region of Colombia. *33(3)*: 348 – 355.
5. Alvarez G., T. B. (2012) MC. Thesis. Instituto Politécnico Nacional.
6. Alkan N., Meng X., Friendlander G., Reuveni E., Sukna S., Sherman A., Thon M., Fluhr R. and Prusky D. (2013) Global aspects of pacC regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis. *Molecular Plant Microbe Interactions* 6(11): 1345.
7. Andargie M. and Li J. (2016). *Arabidopsis thaliana*: a model host plant to study plant – pathogen interaction using rice false smut isolates of *Ustilainoidea virens*. *Front Plant Sci.* 7:192. Doi: 10.3389/fpls.2016.00192.
8. Ando K, Hammar SA, Grumet R. (2009) Age-related resistance of diverse cucurbit fruit to infection by *Phytophthora capsici*. *J Amer Soc Hort Sci*; 134: 176–182.

9. Asomaning E. J. A., Kwakwa R. S. and Hutcheon W. V. (1971) Physiological studies on an Amazon shade and fertilizer trial at the Cocoa Research Institute, Ghana. *Journal Agriculture Science*. 4(1): 47 – 64.
10. Asran A. A. and Mohamed H. I. (2014) Use of phenols, peroxidase and polyphenoloxidase of seed to quantify resistance of cotton genotypes to *Fusarium* wilt disease. *Bangladesh Journal of Botany* 43(3): 353- 357.
11. Avasthi S., Gautam . K. and Bhadauria R. (2015) First report of anthracnose disease of *Aloe vera* caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Research Biol*. 6: 408 – 410.
12. Ávila M., M. E. et al. (2012) Diversidad génica y grupos de compatibilidad vegetativa en *Fusarium oxysporum* causante de marchitez en agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul). *Gayana Bot*. 40-48.
13. Bailey B. A., Crozier J., Sicher R. C., Strem M. D., Melnick R., Carazzolle M. F., Costa G. G. L., Pereira G. A. G., Zhang D. P., Maximova S., Gultinan M. and Meinhardt L. (2013). Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 81, 84-96.
14. Balaguera-López, H. E. y Herrera A., A. (2012). Biochemical changes during growth and until harvest of champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P. *Myrtaceae* family) fruit. *Rev. Bras. Frutic.*, 34 (2), 460-468.
15. Brown, J. K. M. and Tellier, A. (2012) Plant-parasite coevolution: bridging the Gap between genetics an ecology. *Annual. Review of. Phytopathology*. 49, 345-67.

16. Brunner, P. C. et al. (2013) Coevolution and life cycle specialization of plant cell wall degrading enzymes in a hemibiotrophic pathogen. *Molecular Biology and Evolution*. DOI: 0.1093/molbev/mst041 (<http://mbe.oxfordjournals.org>).
17. Bautista L., A., Parra R., F. and Espinosa G., F. J. (2012). Efectos de la domesticación de plantas en la diversidad fitoquímica. In: J. C. Rojas and E. A. Malo (ed), *Temas select. en Ecol. Quím. de Insect. Coleg., Front Sur. México*. (Pp 253-264).
18. Bailey, B. A. et al. (2013) Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 81, 84-96.
19. Balaguera L. H. E. y Herrera A. A. (2012) Estudio de algunos cambios bioquímicos durante el crecimiento y hasta la cosecha del fruto de Champa (*Campomanesia lineatifolia* R. and P. familia Myrtaceae) *Rev. Bras. Fruct., Jaboticalba*. 34(2): 460 – 468.
20. Bekele , F. B., Bekele, I., Butler, D. R. y Bidaisee, G. G. 2006. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Genetic Resource Crop. Evolution*. 53: 933-948.
21. Bhadauria, V. et al. (2012) Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector CtNUDIX in hemibiotrophic fungal phytopathogens cause incompatibility with their host plant. *Eukariotic Cell*. DOI: 10.1128/EC.00192-12. (<http://ec.asm.org>).
22. Brown, J. K. M. and Tellier, A. (2012) Plant-parasite coevolution: bridging the Gap between genetics an ecology. *Annual. Review of. Phytopathology*. 49, 345-67.

23. Buloviené V. and Surviliené E. (2009) Effect of environmental conditions and inoculum concentration on sporulation of *Peronospora destructor*. *Agronomy Research*. 4: 147 – 150.
24. Caicedo, O.; Higuera, B. L. y Martínez, S. (2009). Induction of peroxidase and total phenols as a response of lulo (*Solanum quitoense* L.) fruit to pathogen causing anthracnose. *Rev. Colomb. Quím.* 38(1), 25-42.
25. Casacuberta J. M., Jackson S., Panaud O., Purugganan M. and Wendel J. (2016), Evolution of plant phenotypes, from genomes to traits. *G3: Genes/Genomes/Genetics*. 6(4): 775 – 778.
26. Castro P., L. M., Saquero, M. J. y Beltrán H., J. D. (2003) Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. Como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 5(1): 24-35.
27. Castro R., A. et al. (2012). Mecanismos de defensa del Chile en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. *Rev. Mexicana de Fitopatología*. 30 (1), 49-65.
28. Cavette, P. C., Rodríguez L., N. F., Martins, S. C. V., Mattos, M. S., Sanglard L., M. V. P. and DaMatta, F. M. (2012). Functional analysis of the relative growth rate, chemical composition, construction and maintenance costs, and the payback time of *Coffea arabica* L. leaves in response to light and water availability. *J. Exp. Bot.* 1-12. Doi 10.1093/jxb/ers027.
29. Chacón S., M. I. (2009). Darwin y la domesticación en plantas en las Américas: el caso del maíz y el frijol. *Acta biol Colomb.* 14, 351 – 363

30. Correa A. J., Castro M. S. y Coy J. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronom.* 63(4): 399- 399
31. Counet C., Ouwerx, C., Rosoux, D. and Collin, S. (2004). Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *J. Agr. Food Chem.* 52, 6243-6249.
32. Davidson M., Alkan N., Kobiler I. and Prusky D. (2010) Acidification by gluconic acid of mango fruit tissue during colonization via stem end infection by *Phomopsis mangiferae*. *Postharvest Biology and Technology.* 55: 71-77.
33. Daud, Z., Mohd K., A. S., Mohd A., A., Awang, H. y Zainuri H., M. (2013). Chemical composition and morphological of cocoa pod kuskus and cassava peels for pulp and paper production. *Aust. J. Bas. and Appl. Sci.* 7 (9), 406 – 411.
34. Delaye, L. et al. (2013) Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens –are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? *Fungal Diversity.* DOI: 10.1007/s13225-013-0240-y (<http://link.springer.com>).
35. Delmas C. E. L., Fabre F., Jolivet J., Mazet I. D., Richard C. S., Deliere L. and Delmotte F. (2016). Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evol. Appl.* 9(5): 709 – 725.
36. Dempewolf H., Hodgins K. A., Rummell S. E., Ellstrand N. C. and Rieseberg L. H. (2012) Reproductive isolation during domestication. *Plant Cell* 24(7): 2710 – 2717.
37. Derksen, H. et al. (2013) Signaling cross –talk in plant disease resistance. *Plant Science.* 207, 79-87.

38. Días, L. A. S., Santos, M. M., Santos, A. O. S., Almeida, C. M. V. C., Cruz, C. D. y Carneiro, P. C. S. 2000. Effect of planting density on yield and incidence of witches' broom disease in a Young plantation of hybrid cacao trees. *Experimental Agriculture* 36: 501-508.
39. Diaz J., O., Aguilar A., J., Rendón M., R., Santoyo C., V. H. (2013). Situación actual y perspectivas de la producción del cacao en México. *Cienc. Investig. Agrar.* 40(2), 279-289.
40. Diéguez U. J., Forster H. and Adaskaveg J. E. (2008) Visualization of localized pathogen – induced pH modulation in almond tissue infected by *Colletotrichum acutatum* using confocal scanning laser microscopy. *Phytopathology* 98: 1171- 1178.
41. Di Feo L. del V., Laguna I. G. y Biderbost E. Q. (2010) Alteraciones fisiológicas asociados a la infección con Mal de Rio cuarto virus (MRCV) y a fitotoxicidad provocada por su insect vector (*Delphacodes kuscheli* Fennah) en trigo. *Tropical Plant Pathology* 35(2): 079 – 087.
42. Doehlemann G. and Hemetsberger C. (2013) Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist.* 198: 1001–1016.
43. Dunn, A. M. and Perkins, S. E. (2012) Invasion and infections. *Functional Ecology.* 26, 1234-1237.
44. Eckardt N. A. (2010) Evolution of domesticated bread wheat. *The Plant Cell* 22: 993
45. Efombag, M. I. B., Marelli, J. P., Ducamp, M., Cilas S., C., Nyasse and D. Vefonge. (2004). Effect of fruiting traits on the field resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones to *Phytophthora megakarya*. *J. Phytopathol.* 152, 557-562.

46. Eloy Y. R., Vasconcelos I. M., Barreto A. L. H., Freire F. F. R. and Oliveira J. T. A. (2015). H₂O₂ plays an important role in the lifestyle of *Colletotrichum gloeosporioides* during interaction with cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Fung. Biol.* 747 – 757.
47. Espinosa G. J. A., Urestil G. J., Vélez I. A., Moctezuma L. G., Inurreta A. H. D. y Gongora G. S. F. (2015) Productividad y rentabilidad potencial del cacao (*Theobroma cacao*) en el tropic mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(5): 1051 – 1063.
48. Estrada, C. et al. (2013) Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *New Phytologist*. DOI: 10.1111/nph.12140. (<http://onlinelibrary.wiley.com>).
49. Evans, H. C. (1981). Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. *Phytopathological paper*. 24, 44.
50. Evans, H. C. (2007). Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide cacao diseases. *The trilogy Rev. Phytopatology*. 97, 1640-1643.
51. Evans, H. C.; Holmes, K. A. y Reid A. P. (2003). Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathol.* 52: 476-485.82
52. Fabre F., Rousseau E., Mailleret L. and Moury B. (2015). Epidemiological and evolutionary management of plant resistance: optimizing the deployment of cultivar mixtures in time and space in agricultural landscapes. *Evol. Appl.* 8(10): 919-932.
53. Fanwoua, J., Visser, P. H. B., Heuvelink, E., Yin, X., Struik, P. C. y Marcelis, L. F. M. (2013). A dynamic model of tomato fruit growth integrating cell division, cell growth and endoreduplication. *Funct. Plant Biol.* 40, 1098 – 1114.

54. Feeney W. E., Welbergen J. A. and Langmore N. E. (2014) Advances in the study of coevolution between Avian brood parasite and their hosts. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 45: 227 – 246.
55. Feng S., Zeng W., Luo F., Zhao J., Yang Z. and Sun Q. (2010) Antibacterial activity of organic acids in aqueous extracts from pine needles (*Pinus massoniana* Lamb.). *Food Sci. Biotechnol.* 19: 35-41.
56. Fernández D., Talhinhos, P. and Duplessis, S. (2013) Rust Fungi: achievements and future Challenges on genomics and host-parasite interactions. *The Mycota.* (2nd edn) (K. Esser, eds) pp.315 – 342. Springer Heidelberg.
57. Filgueira D. J. J. and Zambrano A. (2014) Temperature effect on rose downy mildew development under environmental controlled conditions. *Agronomía Colombiana.* 32(1): 29-35.
58. Flint G. S. A. (2013) Genetics and consequences of crop domestication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 8267 – 8276.
59. Freeman S., Katan T. and Shabi E. (1996) Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 1014 – 1020.
60. Frenkel, O., Sherman, A., Abbo, S. y Shtienberg, D. 2008. Different ecological affinities and aggressiveness patterns among *Didymella rabiei* isolates from sympatric domesticated chickpea and wild *Cicer judaicum*. *Phytopathology* 98: 600- 608.

61. FHIA. 2012 La moniliasis del cacao: enemigo a vencer. Proyecto de promoción de sistemas agroforestales de alto valor con cacao en Honduras. 1a Ed. La Lima, Cortés, Honduras. Pgs 30.
62. Filonow, A. B. (2002) Mycoactive acetate esters from Apple fruits stimulate adhesion and germination of conidia of the gray mold fungus. *J. Agric. Food. Chem.* 50 (11): 3137- 3142.
63. Frimpong-Anin, K., Adjalo, M. K., Kwabong, P. K. and Oduro, W. (2014). Structure and stability of cocoa flowers and their response to pollination. *J. Bot-London*. <http://dx.doi.org/10.115/2014/513623>.
64. .- Garcés, F. R. and Reis, E. M. (2012) Unbral numeric de infección de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow en folíolos de soya. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 16 (1), 79-88.
65. García G., G. y Heil, M. (2013) Life histories of hosts and pathogens predict patterns in tropical fungal plant diseases. *New Phytologist*. DOI: 10.1111/nph.12562 (www.newphytologist.com)
66. Gautam A. K. (2014) *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, pathogenicity and management in India. *J. Plant Physiol. Pathol.* 2(2): 1 – 11.
67. Gepts, P. y Pope, R. (2002). Evolution during domestication. *Enc life sci.* 1-7.
68. Gervasi, S. S. et al. (2013) Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to *Chytrid* fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth*. DOI: 10.1007/s10393-013-0832-8 (<http://people.oregonstate.edu>).

69. Gibson, A. K. et al. (2012) Life-history strategy defends against disease and may select against physiological resistance. *Ecology and Evolution*. 3 (6), 1741 – 1750.
70. Gioia, T., Nagel, K. A., Beleggia, R., Fragasso, M., María F., D. B., Pieruschka, R., De Vita, P., Forani, F. y Papa, R. 2015. Impact of domestication on the phenotypic architecture of durum wheat under contrasting nitrogen fertilization. *J. Exp. Bot.* 66 (18): 5519-5530.
71. Gladieux, P. , Byrnes III, E. J., Aguilera, G, Fisher, M. C., Heitman, J. and Giraud, T. 2011. Epidemiology and evolution of fungal pathogens in plant and animals. *Genetic and Evolution of Interactions Diseases*. (1st edn) (Michel Tabayren, ed) pp. 59 – 135, Elsevier.
72. Goldschmidt E. E. (2013) The evolution of fruit tree productivity: a review. *Econ. Bot.* 67(1): 51-62.
73. González, V. (2005). Cacao en México: competitividad y medio ambiente con alianzas. INIFAP e IPCR para USAID. Pg. 80.
74. Grimmer, M. K., John F., M. y Paveley, N. D. (2012). Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *J. Exp. Bot.* 4, 1-11.
75. Guzman C, Caballero L, Martin LM, Alvarez JB (2012) Waxy genes from spelt wheat: new alleles for modern wheat breeding and new phylogenetic inferences about the origin of this species. *Annals of Botany* 110 (6): 1161–1171.
76. Hacquard S., Kracher B., Maekawa T., Vernaldi S., Schulze L. P. and Loren v. T. E. V. (2013). Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and

- conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(24): E2219 – E2228.
77. He, T. (2014). Ecological divergence and evolutionary transition of resprouting types in *Banksia attenuate*. *Ecol. Evol.* 4 (16), 3162 – 3174.
78. Hebbar, P. (2007). Cacao Diseases: A global perspective from an industry point of view. *Phytopathology.* 97, 1658-1663.
79. Horsbach R. and Deising, H. B. (2013) The biotrophy –necrotrophy switch in fungal pathogenesis. *The Mycota.* (2nd edn) (K. Esser, eds) pp.343 – 360. Springer Heidelberg.
80. Huang, Y. et al. (2013) Historical and ecological factors affecting regional patterns of endemism and species richness: the case squamates in China. *Current Progress in Biological Research* (1a edn) (Silva- Opps, M. eds) pps 169-201. In Tech.
81. Huerta P., G., Holguin M., F., Benitez C., F. A., Toledo A., J. (2009). Epidemiología de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz, and Sacc] en mango (*Mangifera indica* L.) cv ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 27(2): 93-105.
82. Jaimez R. E., Araque O., Guzman D., Mora A., Espinoza W. and Tezara W. (2013) Agroforestry system of timber species and cocoa: survival and growth during the early stages. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics.* 114 (1) 1-11.
83. Jing Ke W. and Chapple, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.* 187, 273-285.

84. Johnson J., Bonilla J. and Aguero L. (2008). Manual de manejo y producción de cacao. Leon Nicaragua. Pags. 40.
85. Jupe, J. et al. (2013) *Phytophthora capsici* – tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biology*. DOI: 10.1186/gb-2013-14-6-r63 (<http://genomebiology.com>).
86. Kar, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57 (2), 315-319.
87. Keegstra, K. (2010). Plant cell wall. *Plant Physiol.* 154, 483-486.
88. Kellner R., Bhattacharyya A., Poppe S., Hsu T. Y., Brem R. B. et al. (2014) Expression profiling of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveals genomic patterns of transcription and host-specific regulatory programs. *Genome Biol. Evol.* 6: 1353–1365.
89. Kleemann, J. et al. (2012) Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appresoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLOS Pathogens*. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002643. (www.plospathogens.org).
90. Koch M. F. y Mew T. W. (1991) Effect of plant age and leaf maturity on the quantitative resistance of rice cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *Orizae*. *Plant Disease*. 75: 901-904.
91. Kumar R., Khurana A., Sharma A. K. (2014) Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*. 65: 4561 – 4575.

92. Landero, N. V. et al. (2013) Potencial anti fúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 4 (1), 47-62.
93. LANREF (2013) Roya anaranjada de la caña de azúcar, *Puccinia kuehnii* (Ficha Técnica) pp. 24.
94. Lé Van, A., Gladieux, P., Lemaire, C., Comille, A. Giraud, T., Durel, C. E., Caffier, V. y Le Cam, B. (2012) Evolution of pathogenicity traits in the Apple scab fungal pathogen in response to the domestication of its host. *Evolutionary Applications*. 5: 694 – 704.
95. Leiva Mora M., Alvarado Capo Y., Acosta S. M., Cruz M. M., Sánchez G. C. y Roque B. (2010). Protocolo para la inoculación artificial de *M. fijiensis* y evaluación de la respuesta de *Musa spp* con variables epifitológicas y componentes de la resistencia. *Biotechnol. Veg.* 10(2), 79-88.
96. Leiva Mora M., Alvarado Capo Y., Acosta S. M., Cruz M. M., Sánchez G. C., Roque B. y Mena M. E. (2015). Components of resistance to assess Black Sigatoka response in artificially inoculated *Musa* genotypes. *Rev. Protec. Veg.* 30(1), 60-69.
97. Li H. and Smigocki A. C. (2016). Wound induced Beta vulgaris polygalacturonase-inhibiting protein genes encode a longer leucine-rich repeat domain and inhibit fungal polygalacturonases. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 8-18.
98. Lira S., R. H. (2007). *Fisiología vegetal*. México. Ed. Trillas. 2ª edition.

99. Lokvam J. and Kursar T. A. (2013) Divergence in structure and activity of phenolic defenses in young leaves of two co-occurring *Inga* species. *J. Chem. Ecol.* 31(11): 2563 – 2580.
100. López B., O., Ramírez G., S. I., Espinosa Z., S., Moreno M., J. L., Ruiz B., C., Villarreal F., J. M. y González M., O. (2015). Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. *Acta Agríc. Pec.* 1(1), 16-23.
101. Mahajan, S. y Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139- 158.
102. Manamgoda, D. and Udayanga, D. (2013) Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. *Fungal Diversity*. DOI: 10.1007/s13225-013-0256-3. (<http://link.springer.com>).
103. McAtee P., Karim S., Schaffer R. and David K. (2013) A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation and ripening. *Frontiers in Plant Science.* 4(79): 1-7.
104. McCann, H. C. et al. (2013) Genomic Analysis of the Kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidaie* provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLOS Pathogens* DOI: 10.1371/journal.ppat.1003503. (www.plospathogens.org).
105. McDowell (2013) Genomic and transcriptomic insights into lifestyle transitions of a hemi-biotrophic fungal pathogen. *New Phytologist.* 197, 1032–1034

106. Mckey D. B., Elias M., Pujol B. and Duputié, A. (2012). Ecological Approaches to crop domestication. In: Gepts P., Famula T., Bettinger R., Brush S. B., Damania A. B., Mcguire P. E. and Qualset C. O. Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution and Sustainability. Cambridge University Press. Pp. 377-406.
107. Martijn ten Hoopen G., Deberdt, P., Mbenoun, M. y Cilas, C. (2012). Modelling cacao frosty pod growth: implications for disease control. *Ann. Appl. Biol.* 160, 260 – 272.
108. Melnick R. L., Strem, M. D., Crozier, J., Sicher, R. C., Bailey, B. A. (2013). Molecular end metabolic changes of cherelle wilt of cacao and its effect on *Moniliophthora roreri*. *Physiol. Mol. Plant P.* 84, 153-162.
109. Mena V., L.; Tamargo S., B.; Salas O., E.; Plaza P., L. E.; Blanco H., Y.; Otero G., A. y Sierra G., G. (2015). Determination of saponins and others secondary metabolites in aqueous extracts of *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Rev. Cubana Plant. Medic.* 20 (1), 106 – 116.
110. Ménard L., Mckey D., Mühlen G. S., Clair B. and Rowe N. P. (2013). The evolution fate of phenotypic plasticity and functional traits under domestication in manioc: changes in stem biomechanics and the appearance of stem brittleness. *P. one.* 8(9), e74727.
111. Michel-Aceves A. C.; Otero S., M. A.; Martínez R., R. D.; Rodríguez M., N. L.; Ariza F., R. y Barrios A., A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Rev. Chapingo ser. Hort.* 142 (2), 185-191.

112. Miles, J. D. y Schilder A. C. (2013) Host defense associated with fruit infection by *Colletotrichum* species with on emphasis on anthracnose of blueberries. *Plant Health Progress* 1 – 10.
113. Mondolot, L., Marlas, A., Barbeau, D., Gargadennec, A., Pujol, B. y Mckey, D. (2008). Domestication and defence: foliar tannins ans C/N ratios in *cassava* and a close wild relative. *Acta Ecol.* 34, 147-154.
114. Motamayor J. C., Risterucci, A. M., López, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A. and Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivate by the Mayas. *Heredity.* 89, 380-386.
115. Motamayor J. C., Lachenaud P., da Silva e M. J. W., Loor R., Kuhn D. N., Brown J. S., Schnell R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.) *P. One.* 3, e3311.
116. Motilal L., A., Zhang, D., Umaharan, P., Mischke, S., Mooleedhar, V. and Meinhardt L. W. (2010). The relic Criollo cacao in Belize – genetic diversity and relationship with Trinitario and other cacao clones held in the international cocoa gene bank, Trinidad. *Plant Gen Resour.* 8(2), 106-115.
117. **Nakano, J., and Meshitsuka, G.** (1992). The detection of lignin. In *Methods in Lignin Chemistry.* In: C.W. Dence and S.Y. Lin, (eds) New York: Springer-Verlag. pp. 23–61.
118. Nair N. G. and Allen R. N. (1993) Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Micological Research* 97: 1012- 1014.

119. Navarro P. M. y Mendoza A. I. (2006) Guía técnica para promotores. Cultivo de cacao. Catie Costa Rica.
120. Northfield, T. D. and Ives, A. R. (2013) Coevolution and the effects of climate change on interacting species. PLOS Biology. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001685. (www.plosbiology.org)
121. Nyadanu, D., Akromah, R., Adomako, B., Kwoseh, C., Lowor, S. T., Dzahini-Obiatay, H., Akrofi, A. Y., Owusu A., F., Opoku A., Y. and Assuah, M. K. (2013). Biochemical mechanisms of resistance to black pod disease in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Am. J. Biochem. Mol. Biol.* 3(1), 20-37.
122. Nyadanu, D., Akromah, R., Adomako, B., Kwoseh, C., Dzahini-Obiatay, H., Lowor, S. T., Akrofi, A. Y. and Assuah, M. K. (2012). Host plant resistance to *Phytophthora* pod rot in Cacao (*Theobroma cacao* L.): the role of epicuticular wax on pod and leaf surfaces. *International J. Bot-London.* 8 (1), 13-21.
123. O'Connell, R. J. et al. (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics.* 44 (9), 1060 – 1067.
124. Occhipinti A. (2013). Plant coevolution: evidences and new challenges. *Journal of Plant Interactions*, 8:3, 188-196, DOI: 10.1080/17429145.2013.816881
125. Omolaja S. S., Aikpokpodoin, P., Adedeji, S. y Vwoiko, D. E. (2009). Rainfall and temperature effects on flowering and pollen productions in cocoa. *Afr. Crop Sci. J.* 17(1), 41-48.

126. Othman, A., Mhd Jalil, A. M., Kin W., K., Ismail, A., Abd Ghani, N. and Ilham A. (2010). Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (7), 1052-1059.
127. Oyekale, A. S., Bolaji, M. B., and Olowa, O. W. (2009). The effects of climate change on cocoa production and vulnerability assessment in Nigeria. *Agr. J.* 4(2), 77 – 85.
128. Pacheco J. y Pineda, J. (2004). Efecto de exudados de raíces de dos variedades de cebolla (*Allium cepa*) sobre el desarrollo de *Pyrenochaeta terrestris*. *Fitopatología Venez.* 7(2), 33-37.
129. Petre B, Joly DL, Duplessis S. (2014) Effector proteins of rust fungi. *Frontiers in Plant Science.* 5:416. doi:10.3389/fpls.2014.00416.
130. Phillips-Mora, W. y Wilkinson, M. J. (2007). Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97, 1644 – 1647.
131. Phillips-Mora, W., Castillo, J., Krauss U., Rodríguez E., y Wilkinson M. J. (2005). Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombia isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathol.* 54, 483-490.
132. Phillips-Mora, W. y R. Cerda. (2009) Catalogo: Enfermedades del cacao. Turrialba, Costa Rica. CATIE. Pp. 24.
133. Pickersgill, B. (2007). Domestication of plant in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Ann. Bot-London.* 100, 925 – 940.

134. Pickersgill, B. (2013). Some current topics in plant domestication: an overview with particular reference to amazonia. Tipití: *J. Soc. Anthropol. Lowland South Am.* 11(2), 16-29.
135. Ploetz R. C. et al. (1994) Compendium of tropical fruit diseases. The American phytopathological Society. A. P. S. Press. 2- 22.
136. Ponomarenko A, Goodwin SB, Kema GHJ (2011) Septoria tritici blotch (STB) of wheat Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *Plant Heal Instr*: 1–7. doi: 10.1094/pd-77-1266
137. Ponce H. V., García E. R., Rodríguez G. M. P. y Zavaleta M. E. (2008) Análisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa*) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. *Agrociencia.* 42(1): 71-83.
138. Powis, T., Cyphers, A., Gaikwad, N., Grivetti, L. and Cheong, K. (2011). Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (21), 8595-8600.
139. Prusky D., Barad S., Ment D. y Fangcheng B. (2016) The pH modulation by fungal secreted molecules: a mechanism affecting pathogenicity by postharvest pathogens. *Israel Journal of Plant Science* 63(1): 22-30.
140. Pujol, B., Mühlen, G., Garwood, N., Horoszowski, Y., Douzery, E. J. P. and Mckey, D. (2005). Evolution under domestication: contrasting functional morphology of seedling in domesticated *cassava* and its closest wild relatives. *New Phytol.* 166, 305- 318.
141. Raberg L., Alacid E., Garces E. and Figueroa R. (2014) The potential for arms race and Red Queen coevolution in a protist host-parasite system. *Ecol Evol.* 4(21): 4775 – 4785.

142. Rafiqi M., Ellis J. G., Ludowici V. A., Hardham A. R., Dodds P. N. (2012). Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Curr. Opin. Plant Biol* 15 477–82 10.1016/j.pbi.2012.05.003
143. Ramirez G., N. y Mejia F., L. A. (2000). Origen y descripción botánica. In: Tecnología para el mejoramiento de sistemas de producción de cacao, Corpoica, Bucaramanga, Colombia.
144. Rastogi, G. et al. (2013) New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiology Letter*. 348, 1-10.
145. Rauf, S., Khan, A. A., Teixeira da Silva, J. A. y Naveed, A. (2010). Consequences of plant breeding on genetic diversity. *Int. J. Plant Breeding*. 4, 1-21.
146. Restrepo S. D. C., Narváez C. C. E. and Restrepo S. P. L. (2009) Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez Santander, Colombia. *Quimica Nova*, 32: 1517- 1522.
147. Rico, H. G. (2011) Evolución de interacciones parásito-hospedero: Co-evolución, selección sexual y otras teorías propuestas. *Revista U.D.C.A. Act. & Div. Cient.* 14 (2), 119-130.
148. Rival, L., and Mckey, D. (2008). Domestication and diversity in manioc (*Manihot esculenta Crantz ssp. esculenta*, Euphorbiaceae). *Curr. Anthropol.* 49(6), 1119-1128.
149. Rodríguez López E. S., Cárdenas Soriano, E., Hernández D., S. J., Gutiérrez D., A. y Mayek P., N. (2013). Analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc. Infection of avocado fruits. *Rev. Bras. Frutic.* 35 (3), 898-905.

150. Rodríguez L., E. S. et al. (2009). La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. En Aguacatero (*Persea americana* Mill): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Rev. Mexicana de Fitopatología* 27 (1), 53-63.
151. Rodríguez E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la moniliasis del cacao en Santander. *Rev. Corpoica*. 4, 68-78.
152. Rojas, E. I. (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* s.1. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*. 102 (6), 1318-1338.
153. Ruiz H. J. (2012) *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis and Assembly*. (Second Ed) CRC Press. 73-95.
154. Saltz, J. B. y Nuzhdin, S. V. (2014) Genetic variation in niche construction: implications for development and evolutionary genetics. *Trends in Ecology & Evolution*. 29 (1), 8-14.
155. Sánchez G., C., Alvarado C., Y., Cruz M., M., Acosta S., M., Leiva M., M. y Roque, B. (2010). Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa spp.* Inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotechnol. veg.* 10(2), 89 – 97.
156. Sánchez, M. F. D. y Garcés, F. F. R. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et al. en el cultivo del cacao. *Sci Agrop.* 3, 249-258.
157. Santos, E. S. L., Cerqueira S., C. B. M., Mori G., M., Ahnert D., Mello D., L. N., Pires, J. L., Correa, R. X. and De Souza A., P. (2015). Genetic structure and molecular diversity of cacao plants established as local varieties for more than two centuries: the genetic

- history of cacao plantations in Bahia, Brazil. *P. one.* 10(12), e0145276. Doi: 10.1371/journal.pone.0145276.
158. Sasek, V. et al. (2012) Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic Ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in *Brassica napus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 25, 1238-1250.
159. Savicka M. y Skute N. (2010) Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija* 56: 26-33.
160. Shaik M., Dickinson T. A. and Steadman J. R. (1989). Variation in rust susceptibility in beans: predicting lesion size from leaf developmental stage measured by leaf age, length and plastochron index. *The American phytopathological society.* 9(10): 1035 – 1042.
161. Sharma, G. and Damodara S., B. (2013) *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* DOI: 10.1080/03235408.2013.833749. (<http://www.tandfonline.com>).
162. Shetty N. P., Jensen J. D., Knudsen A., Finnie C., Geshi N., Blennow A., Collinge D. B. and Lyngs J. H. J. (2009) Effects of beta-1, 3 glucan from *Septoria tritici* on structural defence response in wheat. *J. Exp. Bot.* 60 (15): 4287 – 4300.
163. Silva R. H. V., Fernández P. S. P., Góngora C. C., Macías L. B. C. y Ávila Q. G. D. (2009) Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(2): 134 – 147.
164. Souza A. M., Granada C. E. and Sperotto R. A. (2016). Plant pathogens affecting the establishment of plant – symbiont interaction. *Front. Plant. Sci.* 7:15. Doi: 10.3389/fpls.2016.00015.

165. Stack, J. C., Royaert, S., Gutiérrez C., O., Nagai, Araújo H., I. S., Schnell, R. and Motamayor, J. C. (2015). Assessing microsatellite linkage disequilibrium in wild, cultivated, and mapping populations of *Theobroma cacao* L. and its impact on association mapping. *Tree Genet Genomes*. 11,19 Doi 10.1007/s11295-015-0839-0.
166. Stamm P. and Kumar P. P. (2010) The phytohormone signal network regulating elongation growth during shade avoidance. *Journal Experimental Botany*. 61(11): 2889 – 2903.
167. Strauss, A. et al. (2012) Invading with biological weapons: the importance of disease-mediated invasions. *Functional Ecology*. 26, 1249-1261.
168. Somarriba, E. and Orozco, S. (ed) (2009). Catalog cacao diseases in Central America. Costa Rica. CATIE. 1^a edition, (pgs 24).
169. Takam S., P., Ndoumbé N., M., Sache, I., Ndong N., E. P., Gwet, H. y Chadoeuf, J. (2013). Development stage – dependent susceptibility of cocoa fruit to pod rot caused by *Phytophthora megakarya*. *Eur. J. Plant Pathol*. 135, 363 – 370.
170. Tardieu F. (2013) Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Frontiers in Physiology*. 4: 17
171. Terán V., A. P. (2013) Roya asiática de la Soya, *Phakopsora pachyrhizi*. (Ficha técnica 23) LANREF. Pp. 24.
172. Texeira, P. J. P.L. et al. (2012) The fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* has genes similar to plant PR-1 that are highly expressed during its interaction with cacao. *PLOS one*. DOI: 10.1371/journal.pone.0045929. (www.plosone.org).

173. Thatcher L. F., Gao L. L. and Singh K. B. (2016). Jasmonate signalling and defense responses in the model Legume *Medicago truncatula* – a focus on responses to *Fusarium* wilt diseases. *Plants* 5(1), 11, Doi: 10.3390/plants5010011.
174. Thomazella, D. P. T. et al. (2012) The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytologist*. 194, 1025-1034
175. Torres de la C. M., Ortiz G. C. F., Teliz O. d., Mora A. A. y Nava D. C. (2011) Efecto de Azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31(1): 65 – 69.
176. Triana G. J., Romero, L. C. y Roldán, D. G. (2013). Digital image restoration by partial differential equations. *Revista U.D.C.A. Actual. & Divul. Cientif.* 16(2), 511 – 518.
177. Van der Plank. (1975) Principles of plant infection. New York. Academic Press, Inc. pp115.
178. Van Damme, M. et al. 2012. The Iris potato famine Pathogen *Phytophthora infestans* translocates the CRN8 kinase into host plant cells. *Plos pathogens*. doi:10.1371/journal.ppat.1002875 8: 1-12. (www.plospathogens.org)
179. Van der Linde JA, Six DL, Wingfield MJ, Roux J. (2012) ***Lasiodiplodia* species associated with dying *Euphorbia ingens* in South Africa**. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* **73:3-4**:165-173. [10.2989/20702620.2011.639499](https://doi.org/10.2989/20702620.2011.639499)
180. Van Tassel, D. L., DeHann, L. R. y Cox, T. S. (2010) Missing domesticated plant forms: can artificial selection fill the gap? *Evololutionary Applications*. 3 (5-6), 434 – 452.

181. Veneault F., C. and Martin, F. (2013) New insights into Ectomycorrhizal symbiosis evolution and function. *The Mycota*. (2nd edn) (K. Esser, eds) pp.273 – 294. Springer Heidelberg.
182. Win J., Chaparro G. A., Belhaj K., Saunders D. G. O., Yoshida K., Dong S., Schornack S., Zipfel C., Robatzek S., Hogenhout S. A, and Kamoun S. (2012) Effector biology of plant – associated organisms: concepts and perspectives. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Doi: 10.1101/sqd.2012.77.015933.
183. Wingfield, J. C. (2013) Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. *Functional Ecology*. 27, 37-44.
184. Wostemeyer, J. (2013) Disease Management of *Phoma* Infections *The Mycota*. (2nd edn) (K. Esser, eds) pp.173 – 198. Springer Heidelberg.
185. Yaacoubi E., Malagi G., Oukabli A., Citadin I., Hafidi M., Bonhomme M. and Legave J. M. (2016) Differentiated dynamics of bud dormancy and growth in temperate fruit trees relating to bud phenology adaptation, the case of apple and almonds trees. *Int. J. Biometeorol*. Doi:10.1007/s00484-016-1160-9.
186. Yadeta K. A. and Thomma B. P. H. J. (2013) The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens *Front Plant Sci*. 4: 97. doi: [10.3389/fpls.2013.00097](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097)
187. Yang, F. et al.(2013) Transcriptional reprogramming of Wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PLOSone*. DOI: 10.1371/journal.pone.0081606. (www.plosone.org).

188. Yoshino, K. et al. (2012). Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25 (5), 625-636.
189. Zelinger E., Hawes, C. R., Gurr, S. J. y Dewey, F. M. (2006). Attachment and adhesion of conidia of *Stagonospora nodorum* to natural and artificial surfaces. *Physiol. Mol. Plant P.* 68, 209 -215.
190. Zeng, Y., Zhao, S., Yang, S. and Ding, S. Y. (2014). Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Curr. Opin Biotech.* 27, 38-46
191. Zhao, Z. et al. (2013) Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*. 14: 274, 1-15.