

Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia

Analysis of genetic variability in *Moniliophthora roreri* with AP-PCR and RAPD in Antioquia, Colombia

Sandra Patricia Grisales Ortega¹, Lucía Afanador Kafur²

Resumen

Moniliophthora roreri es el agente causante de la moniliasis del cacao, la enfermedad más severa en las plantaciones de cacao en el departamento de Antioquia, Colombia. Los marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphism of DNA) y AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) fueron usados para estudiar la variabilidad genética de 170 aislamientos de *M. roreri* colectados en doce municipios de Antioquia. El análisis dividió la población en seis grupos, el grupo G1 fue el más grande y contenía el 95% de los aislamientos con una alta similitud genética (coeficiente de similitud de 0,7 a 1), mientras los otros cinco grupos contenían solo aislamientos de Apartadó y Dabeiba con una similitud genética moderadamente baja (coeficiente de similitud entre 0,45 a 0,55). El análisis de componentes principales mostró una alta similitud genética entre la población excepto entre los aislamientos de Apartadó y Dabeiba, que registraron los más altos niveles de variabilidad genética con valores altos del índice de Shannon y el porcentaje de loci polimórficos, mientras los otros aislamientos registraron una baja variabilidad genética. Los valores de diversidad y diferenciación genética en la población muestran una introducción reciente de *M. roreri* en las plantaciones de cacao de Antioquia, y una reproducción predominantemente clonal en la población. De acuerdo con Amova, la mayoría de la variación genética se encontró dentro de los municipios (75,68%) con solo un 5,94% presente entre las subregiones.

Palabras clave: patógeno cacao, diversidad genética, marcadores moleculares.

Abstract

Moniliophthora roreri is the causal agent of moniliasis in cocoa, the most severe disease affecting cocoa plantations in the Antioquia department in Colombia. RAPD (random amplified polymorphism of DNA) and AP-PCR (arbitrarily-primed polymerase chain reaction) molecular markers were used for studying the genetic variability of 170 *M. roreri* isolates collected from twelve municipalities in Antioquia. Cluster analysis divided the population into six groups: the G1 group was the largest containing 95% of the isolates having high genetic similarity (0.70 to 1.0 similarity coefficients) whilst the other five groups only contained isolates from Apartado and Dabeiba having moderately low genetic similarity (0.45 to 0.55 similarity coefficients). Principal component

1 Bióloga, M.Sc. en biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Minas, Laboratorio de Biomineralogía. spgrisal@unalmed.edu.co

2 Bióloga, M.Sc. en fitopatología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Agronomía. lafando@unalmed.edu.co

analysis revealed high genetic similarity amongst populations except for isolates from Apartado and Dabeiba which registered the highest levels of genetic variability, having high Shannon's index values and polymorphic loci percentage whilst low genetic variability was recorded for the other isolates. Genetic diversity and differentiation values in the population showed the recent introduction of *M. royeri* in cocoa plantations in Antioquia and predominantly clonal reproduction in the population. ANOVA revealed most genetic variation within municipalities (75.68%); only 5.94% variation was present in the sub-regions.

Key words: cacao pathogen, genetic diversity, molecular marker.

Recibido: Julio 13 de 2007

Aceptado: Noviembre 8 de 2007

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es atacado por hongos patógenos siendo los más importantes *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora perniciosa* y *M. royeri* (Antunez, 2003; Bateman et ál, 2005; Bowers et ál, 2001; Crozier et ál, 2006; Griffith et ál, 2003; Samuels et ál, 2006). A nivel mundial se han realizado estudios amplios de diversidad genética para *Phytophthora* spp. y *Moniliophthora perniciosa*, hasta ahora se están realizando los primeros estudios para *M. royeri* en América Latina (Aime y Phillips, 2005; Aime, 2006; Evans et ál, 2002; Evans et ál, 2003a; Phillips, 2003; Phillips et ál, 2005; Phillips et ál, 2006a; Phillips et ál, 2006b).

M. royeri muestra uniformidad genética en América Central, Ecuador y Perú donde se ha dispersado en forma clonal encontrándose actualmente en una fase invasiva. En Colombia, en la región del Magdalena medio, muestra un alto nivel de variación genética (Kennedy y Aime, 2005; Phillips, 2003; Phillips et ál, 2006a). La fuente de esta variación reside en las mutaciones y la reproducción sexual entre aislamientos en el hospedante silvestre *Theobroma gileri* que generan un nuevo arreglo de genes, suficiente para responder a la presión de selección, lo que explicaría por qué *M. royeri* ha desplazado rápidamente a *M. perniciosa* en el Perú a pesar de que su presencia en este país es muy reciente (Evans, 1981; Evans et ál, 2003; Phillips, 2003).

En el 2003 se designaron cinco grupos genéticos para *M. royeri* en América Latina, dos endémicos de Colombia: Grupo Co-oriente restringido al oriente, y Grupo Co-central restringido a la región central, el Grupo Gileri endémico de Ecuador localizado al noroccidente, los dos restantes se encuentran en una fase invasiva, el Grupo Bolívar localizado en el oriente de Colombia (Norte de Santander), periferia de Ecuador, Venezuela y Perú, y el Grupo Co-occidente en el occidente de Colombia, centro de Ecuador, Panamá, Costa Rica, Nicaragua y Honduras (Phillips, 2003). De estos cinco grupos genéticos cuatro se encuentran en Colombia excepto Gileri. En Colombia el grupo Co-oriente tiene la mayor diversidad genética, y el grupo Co-central muestra un grado de variación importante y parecen estar estrechamente relacionados; estos dos grupos ocupan áreas adyacentes aunque con diferentes altitudes, Co-oriente en el Magdalena medio y Co-central en la cordillera Andina Central (Phillips, 2003). Los últimos estudios de variabilidad genética en América Latina determinaron tres grupos genéticos para *M. royeri* con diferentes modelos de distribución, preferencias de huésped y aparente aislamiento reproductivo entre ellos; un primer genotipo encontrado en *Theobroma* y *Herrania* al noroccidente de Sur América, un segundo genotipo en *T. gileri* al norte del Ecuador, y un tercer genotipo en *T. cacao* en Centroamérica extendido hacia el norte, responsable de la dispersión reciente y rápida de la moniliasis causada por *M. ro-*

roreri a través de esta zona (Aime, 2006; Kennedy y Aime, 2005).

La moniliasis está restringida en Sur y Centroamérica; en algunas áreas de Suramérica ha causado pérdidas en los cultivos del 60 al 100% (Evans et ál, 1978; Evans, 1986; Phillips, 2003; Phillips et ál, 2005; Phillips et ál, 2006a; Phillips et ál, 2006b). En Colombia es la enfermedad más importante del cacao, restringida al occidente y noroccidente del país, generando pérdidas en producción de hasta un 60% (Evans, 1981; Espinal et ál, 2005). En Antioquia es la enfermedad más importante del cacao siendo los municipios más afectados Apartadó y Valdivia (Maya et ál, 2004). El objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad genética de aislamientos de *M. roreri* en zonas productoras de cacao en Antioquia con marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphism of DNA) y AP-PCR (Arbitrally Primed Polymerase Chain Reaction). Este conocimiento es fundamental para el diseño de estrategias encaminadas al control de la moniliasis, y programas de mejoramiento genético de *T. cacao* con la selección de genotipos resistentes a las variantes de *M. roreri* en Antioquia que permitirá mejorar las condiciones fitosanitarias de los cultivares de cacao en el departamento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los aislamientos de *M. roreri* fueron obtenidos de frutos de cacao con síntomas de la enfermedad colectados en doce municipios productores de cacao en Antioquia siguiendo la metodología empleada por Evans (1981). Como cepas de referencia para el estudio se utilizaron cuatro aislamientos de Colombia, Co2 de Norte de Santander (Grupo Bolívar), Co8 de Antioquia (Grupo Co-occidente), Co11 y Co18 de Caldas (Grupo Co-central) proporcionados por Wilbert Phillips Mora (Phillips, 2003). Cada aislamiento fue cultivado en medio sólido agar extracto de malta (50 g/l) hasta obtener su esporulación, de cada cultivo se preparó una suspensión acuosa de esporas (1×10^6 esporas/ml) de la cual se adicionó 1 ml a 100 ml de medio líquido caldo levadura malta (3

g/l extracto malta, 3 g/l extracto levadura, 5 g/l peptona y 10 g/l glucosa), con incubación en oscuridad total y agitación constante a 120 rpm por quince días. Al término de este tiempo se recuperó el micelio producido por filtración al vacío seguido de liofilización por 48 horas, maceración con nitrógeno líquido y almacenamiento a -20°C .

El protocolo usado para la extracción de ADN genómico total fue el descrito por Afanador et ál, (1993). La cantidad y calidad del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en solución buffer TBE 1X (Tris base PM 121.14 - ácido bórico PM 61,84 y EDTA 0,5 M, pH 8,0) teñidos con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) corriendo 4 μl de ADN con 4 μl de buffer de carga a 80 voltios durante 45 minutos. Los productos de la extracción de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz UV, y se obtuvo una imagen de estos en formatos tif y jpg con el software BioDocAnalyze. Las reacciones de amplificación para los marcadores AP-PCR se realizaron en un volumen final de 20 μl con 1,5 μl de ADN en una dilución 1:10, 2 μl de dNTP (1,25 mM), 1 μl de cebador (20 pM/ μl), 11,3 μl de agua ultrapura, 2 μl del buffer (10X) de la enzima, 2 μl de MgCl_2 (25 mM) y 0,2 μl de *Taq* polimerasa (5U/ μl) (Afanador et ál, 2003; Freeman et ál, 1993; Freeman et ál, 1995). Éstas se realizaron en un termociclador con el programa térmico de amplificación con un ciclo a 95°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos, 72°C por 1,5 minutos, un ciclo de extensión a 72°C por 5 minutos, y un ciclo de almacenamiento a 4°C por tiempo indefinido. En la tabla 1 se indican los cuatro cebadores tipo AP-PCR evaluados.

Las reacciones de amplificación para los marcadores RAPD se realizaron en un volumen final de 46 μl , ADN 1:10 4 μl , dNTP (1,25 mM) 8 μl , cebador (10ng/ μl), 2,4 μl , agua ultrapura 21 μl , Buffer (10X) 5 μl , MgCl_2 (25 mM) 5 μl y *Taq* polimerasa (5U/ μl) 0,6 μl (Andebrhan y Furtek, 1994; Andebrhan et ál, 1999). Éstas se realizaron en un termociclador con el programa térmico de amplificación con un ciclo a 95°C por 5 minutos seguido de 42 ciclos a 95°C por 30 segundos, 36°C

Tabla 1. Secuencia de bases de los cebadores tipo AP-PCR utilizados en la evaluación de 170 aislamientos de *M. rozeri* de Antioquia

Código cebador	Secuencia de bases
Oligo 1	(CAG) ₅
Oligo 2	(AGG) ₅
Oligo 3	(GACAC) ₃
Oligo 4	(GACA) ₄

por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, un ciclo de extensión a 72 °C por 5 minutos, y uno de almacenamiento a 4 °C por tiempo indefinido (Afanador et ál, 2003; Andebrhan y Furtek, 1994; Andebrhan et ál, 1999); en la tabla 2 se indican los 49 cebadores tipo RAPD evaluados. Todos los productos de amplificación, junto con un marcador de peso molecular de 1 kb, fueron corridos en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en una cámara de electroforesis horizontal a 70 voltios durante 90 minutos, visualizados en un transiluminador de luz UV con

Tabla 2. Secuencia de bases de los cebadores tipo RAPD utilizados en la evaluación de 170 aislamientos de *M. rozeri* de Antioquia

Código Cebador	Secuencias de bases	Código Cebador	Secuencias de bases
Oligo 1	5'- TCC CGA ACC C-3'	OPA 20	5'-GGT GCG ATC C-3'
Oligo 2	5'- CAA ACG TCG G-3'	OPAB 12	5'-CCT GTA CCG A-3'
Oligo 3	5'- GGG GGT CTT T-3'	OPAB 17	5'-TCG CAT CCA G-3'
Oligo 4	5'- AAA GCT GCG G-3'	OPAN 05	5'- GGG TGC AGT T-3'
Oligo 5	5'- TGT CAT CCC C-3'	OPB01	5'- GTT TCG CTC C-3'
Oligo 6	5'- CAC ACT CCA G-3'	OPB03	5'- CAT CCC CCT G-3'
Oligo 7	5'- TTC CCC CCA G-3'	OPB04	5'- GGA CTG GAG T-3'
Oligo 8	5'- GTG ACG CCG C-3'	OPB05	5'- TGC GCC CTT C-3'
Oligo 9	5'- ATC GTC CAA C-3'	OPB06	5'- TGC TCT GCC C-3'
Oligo 10	5'- GGG GGC CTC A-3'	OPB07	5'- GGT GAC GCA G-3'
OPA 02	5'- TGC CGA GCT G-3'	OPB08	5'- GTC CAC ACG G-3'
OPA 03	5'- AGT CAG CCA C-3'	OPB09	5'- TGG GGG ACT C-3'
OPA 05	5'- AGG GGT CTT G-3'	OPB10	5'- CTG CTG GGA C-3'
OPA 06	5'- GGT CCC TGA C-3'	OPB11	5'- GTA GAC CCG T-3'
OPA 08	5'- GTG ACG TAG G-3'	OPB12	5'- CCT TGA CGC A-3'
OPA 09	5'- GGG TAA CGC C-3'	OPB13	5'- TTC CCC CGC T-3'
OPA 10	5'- GTG ATC GCA G-3'	OPB14	5'- TCC GCT CTG G-3'
OPA 11	5'- CAA TCG CCG T-3'	OPB15	5'- GGA GGG TGT T-3'
OPA 12	5'- TCG GCG ATA G-3'	OPB16	5'- TTT GCC CGG A-3'
OPA 13	5'- CAG CAC CCA C-3'	OPB17	5'- AGG GAA CGA G-3'
OPA 14	5'- TCT GTG CTG G-3'	OPB18	5'- CCA CAG GAG T-3'
OPA 15	5'- TTC CGA ACC C-3'	OPB19	5'- ACC CCC GAA G-3'
OPA 16	5'- AGC CAG CGA A-3'	OPB20	5'- GGA CCC TTA C-3'
OPA 17	5'- GAC CGC TTG T-3'	OPE 17	5'- CTA CTG CCG T-3'
OPA 19	5'- CAA ACG TCG G-3'		

obtención de imágenes de éstos con el software BioDocAnalyze en formato tif y jpg.

Con los datos generados por cada tipo de marcador se elaboró una matriz binaria comparando los patrones de bandeo entre los aislamientos designando la presencia de una banda como 1 y su ausencia como 0. Con las matrices generadas se realizó un análisis de agrupamiento mediante el programa NTSYS-pc 2.0 (Rohlf, 1998; Rohlf, 2005), con el método de la media aritmética no ponderada (UPGMA) y el coeficiente de similitud de Dice, se calculó el coeficiente de correlación cofenético a cada dendrograma generado a fin de determinar su confiabilidad para representar la matriz de similitud original, y se realizó un análisis de componentes principales para visualizar las interrelaciones entre los aislamientos (Warburton y Crossa, 2000; Warburton y Crossa, 2002). Para estimar la confiabilidad de los grupos genéticos designados en cada dendrograma se calculó el valor Bootstrap (P) (Felsenstein, 1985) de los nodos de cada grupo utilizando el programa WinBoot (Yap y Nelson, 1996) basado en 1000 réplicas.

A partir de los datos conjuntos de los dos marcadores, y con el empleo del programa Popgene versión 1.31 (Yeh et ál, 1997) se estimó la variabilidad genética en la población asumiendo que ésta se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg por el uso de marcadores dominantes en el estudio. Para cada municipio se calculó el porcentaje de loci polimórficos y el índice de Shannon (Shannon y Weaver, 1949); en cada subregión de Antioquia, y en la población total se calculó el porcentaje de loci polimórficos, índice de Shannon, diversidad total de genes (H_t), diversidad de genes de los individuos relativo a su población (H_s) y diferenciación genética (G_{st}) (Nei, 1973), y entre pares de municipios se realizó un análisis de identidad y distancia genética basado en Nei (1972). Con el programa XLSTAT 2007 para los municipios se calculó el coeficiente de correlación entre índice de Shannon y porcentaje de loci polimórficos; para las subregiones el coeficiente de correlación entre índice de Shannon y porcentaje de loci polimórficos, índice de Shannon y diversidad total de genes. Para

determinar la distribución de la variabilidad genética total entre y dentro de las subregiones, y entre la población de cada municipio, los doce municipios (poblaciones) se agruparon en seis subregiones (grupos): bajo Cauca y norte (Tarazá y Valdivia), Urabá (Apartadó y Chigorodó), suroeste y oriente (Támesis y Nariño), occidente (Dabeiba y San Jerónimo), Magdalena medio (Puerto Berrío y Maceo), nordeste (Segovia y Remedios); esta estructura de la población se analizó con el Programa Arlequin Ver. 3.1 (Excoffier et ál, 2006) empleando el análisis de varianza molecular (Amova) (Excoffier et ál, 1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron un total de 170 aislamientos de *M. roreri*; el número de aislamientos para cada municipio se indica en la tabla 3. Con el protocolo de extracción de Afanador et ál, (1993) se obtuvo ADN de un peso molecular superior a 7000 pb. Los cuatro cebadores tipo AP-PCR evaluados generaron patrones de bandas con tamaños que oscilaron entre 250 y 2000 pb, el número total de fragmentos amplificados fue de 42 de los cuales nueve fueron polimórficos, 12 se obtuvieron con el Oligo 1, 13 con el Oligo 2, ocho con el Oligo 3 y nueve con el Oligo 4. En la figura 1 se presentan los productos de amplificación obtenidos con los Oligos 1, 2, 3 y 4 para 18 aislamientos. De los 49 cebadores tipo RAPD evaluados el Oligo 8, Oligo 10 y OPA-10 generaron patrones de bandas para todos los aislamientos. Solo los Oligos 8 y 10 fueron evaluados con los aislamientos de *M. roreri* generando productos de amplificación que oscilaron entre 500 a 3000 pb. Con el Oligo 8 se obtuvo un total de diez bandas y con el Oligo 10 doce para un total de 22 fragmentos, siete de ellos polimórficos. En la figura 2 se presenta los patrones de amplificación obtenidos con los Oligos 8 y 10 para 18 aislamientos.

El análisis de agrupamiento para los datos generados con AP-PCR, y a un nivel de similitud de 0,73, resolvió seis grupos genéticos para *M. roreri* designados como G1 a G6. El cálculo del coeficiente de correlación cofenético para el dendrograma arrojó un valor de $r = 0,86$, dando un grado de confiabilidad

Tabla 3. Número de aislamientos de *M. royeri* obtenidos de doce municipios productores de cacao en Antioquia.

Subregión Antioquia	Municipio	Número aislamientos
Bajo Cauca	Tarazá	15
Magdalena Medio	Maceo	24
	Puerto Berrío	17
Nordeste	Remedios	13
	Segovia	4
Norte	Valdivia	10
Occidente	San Jerónimo	7
	Dabeiba	26
Oriente	Nariño	10
Suroeste	Támesis	9
Urabá	Apartadó	28
	Chigorodó	7
	Total	170

alto de que éste representa la matriz de similitud original. El grupo G1 representó el 96% de la población evaluada, los grupos restantes fueron más pequeños y los conformaron un número reducido de aislamientos con coeficientes de similitud entre 0,60 y 0,70. Los aislamientos referencia formaron parte del Grupo G1. Los grupos G5 y G6 mostraron los coeficientes de similitud más bajos con un valor de 0,46 del grupo que los contenía con respecto a los demás. Estos resultados reflejaron que no existe un patrón de agrupamiento entre los aislamientos, y que la población de *M. royeri* en Antioquia posee una gran similitud genética con un coeficiente de similitud entre los aislamientos de 0,7 y 1,0. Sólo se encontraron coeficientes de similitud moderadamente bajos (0,46) en un número reducido de aislamientos de Apartadó y Dabeiba. En la figura 3 se muestra el fragmento inferior del dendrograma obtenido con el método UPGMA mediante marcadores AP-PCR mostrando los grupos G2 a G6.

En el análisis de componentes principales, con los datos generados por AP-PCR, los

tres primeros componentes principales explicaron el 27,3, 8,12 y 6,56% de la variación total respectivamente que, en conjunto, explican el 42% de la variabilidad observada, detectándose una gran similitud genética entre los grupos G1, G2 y G3 que representaron más del 96% de la población al observarse una gran proximidad entre los aislamientos que los conforman, una menor similitud genética entre los grupos G4, G5 y G6, y con el resto de la población al observarse muy alejados entre sí y de la gran nube de aislamientos de G1, G2 y G3, mostrando la gran homogeneidad genética en la población de *M. royeri* en Antioquia con excepción de una subpoblación muy reducida en Apartadó y Dabeiba (grupos G4, G5 y G6). En la figura 4 se presenta la representación tridimensional del análisis de componentes principales para los 170 aislamientos de *M. royeri* de Antioquia basado en el perfil de bandas generado por los marcadores AP-PCR.

El análisis de agrupamiento para los datos generados con los RAPD resolvió seis grupos genéticos para *M. royeri* designados

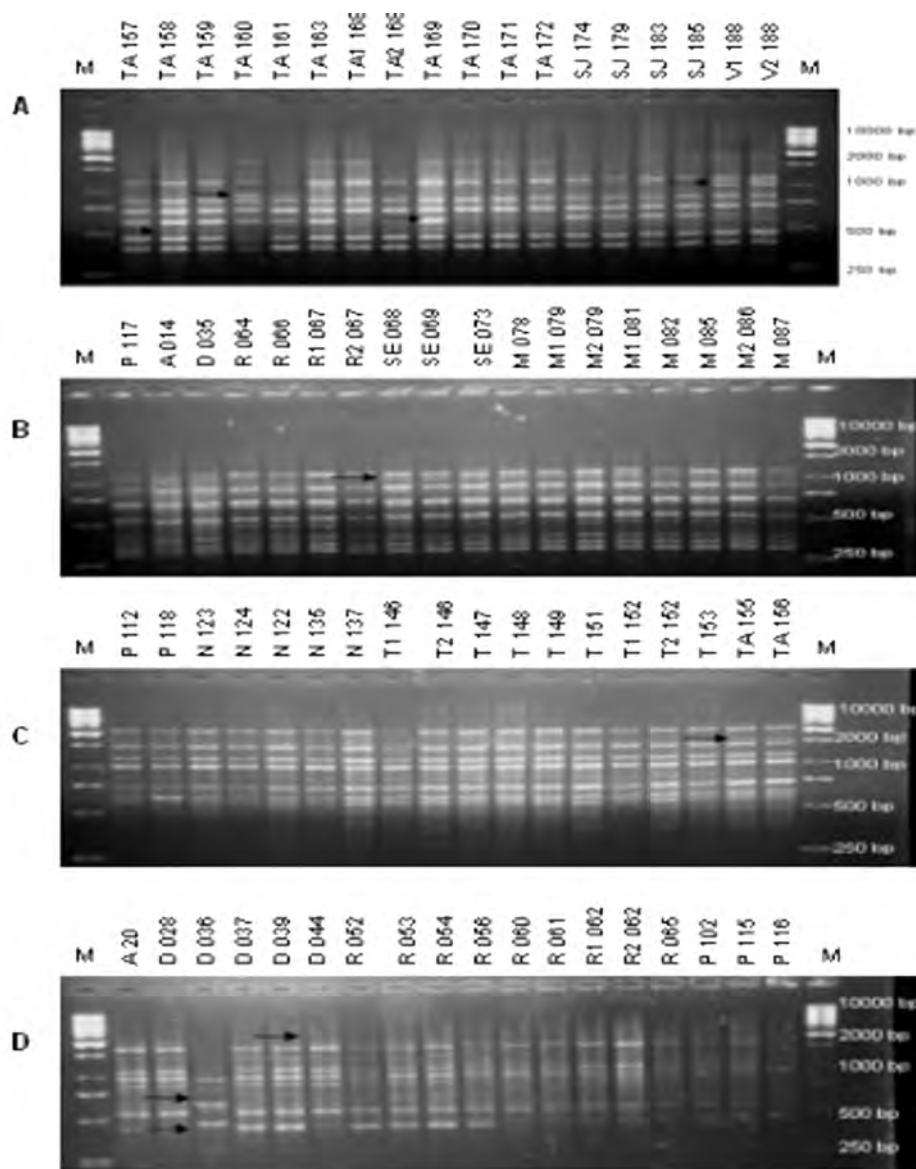


Figura 1. Patrones de bandas generados por los marcadores tipo AP-PCR a partir del ADN de 18 aislamientos **A.** Oligo 1. **B.** Oligo 2. **C.** Oligo 3. **D.** Oligo 4. Líneas 1 y 20. M: marcador de peso molecular, líneas 2 a 18 código de identificación de cada aislamiento, flechas: bandas polimórficas entre los aislamientos.

como G1 a G6 a un nivel de similitud de 0,70. El cálculo del coeficiente de correlación cofenético para el dendrograma obtenido arrojó un valor de $r = 0,78$ indicando un grado de confiabilidad alto de que este representa la matriz de similitud original. El grupo G1 representó el 83% de la población evaluada, los grupos restantes fueron más pequeños y se conformaron por un número reducido de aislamientos con coeficientes de similitud entre 0,60

y 0,70. Los aislamientos referencia formaron parte del grupo G1. Los grupos G5 y G6 mostraron los coeficientes de similitud más bajos con respecto a los demás, con un valor del coeficiente de similitud de 0,57 para el grupo que los contenía. Este análisis reveló que no existe un patrón de agrupamiento en la población de *M. roreri* en Antioquia, y entre los aislamientos de referencia, mostrando una composición genética muy homogénea

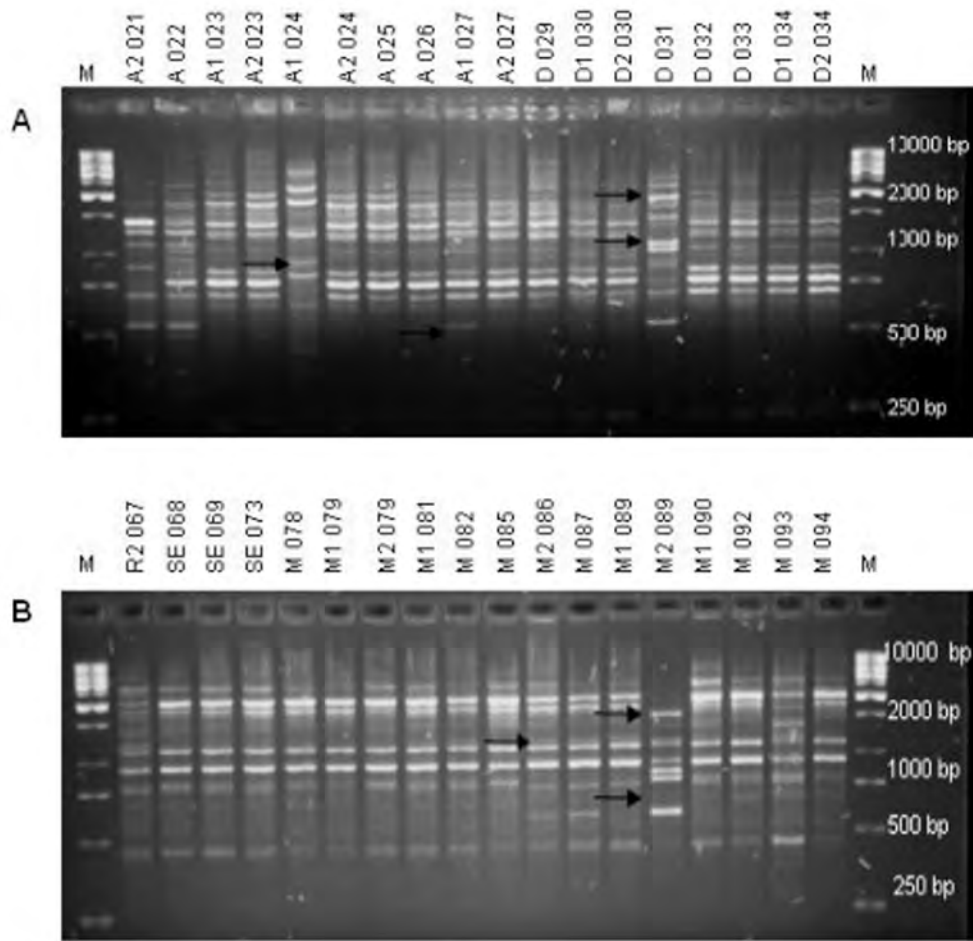


Figura 2. Patrones de bandas generados por los marcadores tipo RAPD a partir del ADN de 18 aislamientos. **A.** Oligo 8. **B.** Oligo 10. Líneas 1 y 20. M: marcador de peso molecular, Líneas 2 a 19 código de identificación de cada aislamiento, flechas: bandas polimórficas entre los aislamientos.

en la población; sin embargo, un número muy reducido de aislamientos de Apartadó y Dabeiba mostraron coeficientes de similitud moderadamente bajos con respecto a los demás aislamientos. En la figura 5 se muestra el fragmento inferior del dendrograma obtenido mediante el método UPGMA basado en el perfil de bandas generado con RAPD mostrando los grupos G2 a G6.

En el análisis de componentes principales con los datos generados por RAPD, los tres primeros componentes principales explicaron el 18,83, 12,25 y 10,56% de la variación total respectivamente que en conjunto explicaron el 41,64% de la variabilidad total observada detectándose una gran similitud genética entre los grupos G1, G2, G3, G4 y

G5A que representaron el 98% del total de la población de *M. royeri*, con una correlación muy estrecha entre estos grupos genéticos ya que los aislamientos que los conformaron se entremezclaron unos con otros siendo difícil discriminar un grupo genético de otro. Los grupos G5B y G6 mostraron una menor similitud genética entre ellos y con el resto de la población, representados por dos puntos muy alejados entre sí y de los demás grupos.

Con los análisis de componentes principales con AP-PCR se detectaron cuatro aislamientos de Apartadó y Dabeiba (A2021, A1024, D031 y D036) y con RAPD se detectaron dos aislamientos de Apartadó y Dabeiba (A1024 y D031) que difirieron genéticamente

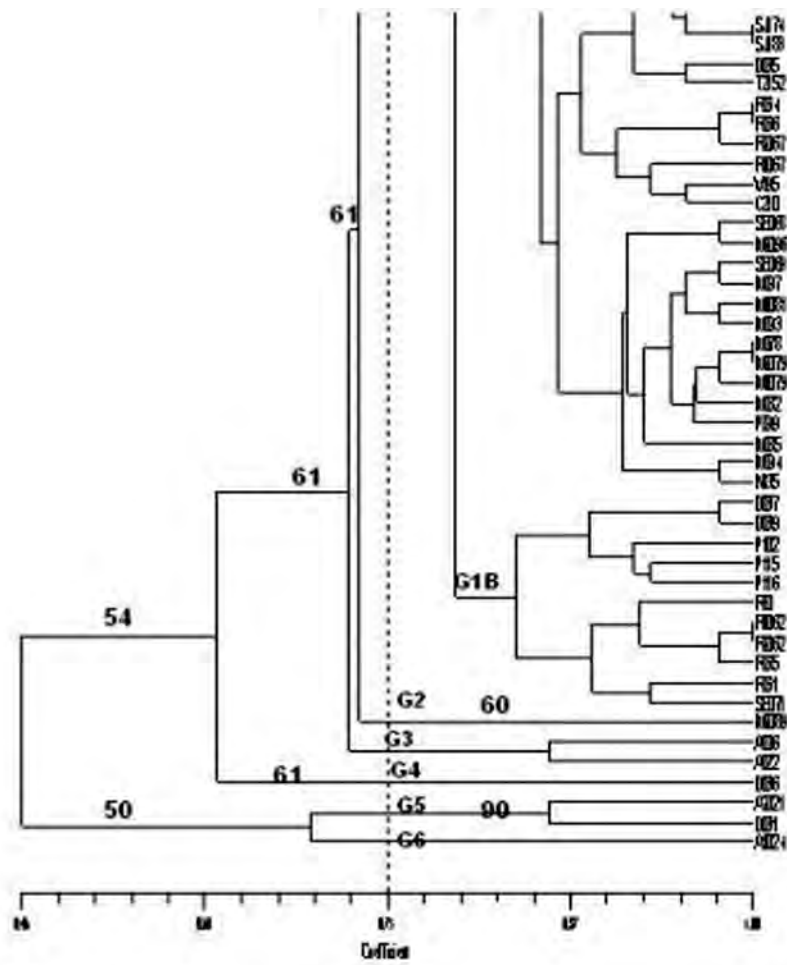


Figura 3. Fragmento inferior del dendrograma obtenido mediante UPGMA y el coeficiente de similitud de Dice para 170 aislamientos de *M. roreri* de Antioquia con base en el perfil de bandas generado por los marcadores AP-PCR. Grupos G1 a G6 resueltos a un nivel de similitud de 0,73. Los valores Bootstrap *P* se indican en el nodo correspondiente de cada grupo.

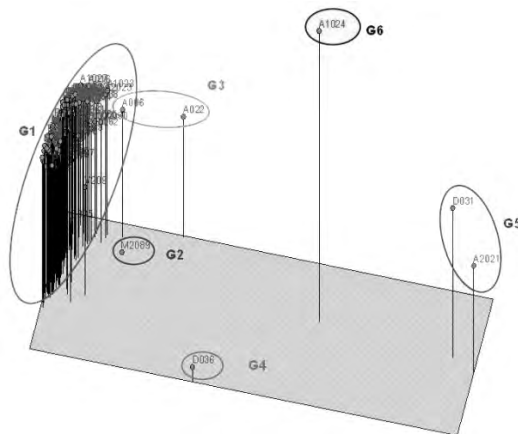


Figura 4. Análisis de componentes principales de similitud genética entre 170 aislamientos de *M. roreri* de Antioquia con base en el perfil de bandas generado por los marcadores AP-PCR. G1 a G6, grupos designados mediante el análisis de agrupamiento; la estrella amarilla indica los aislamientos que difieren significativamente del resto de la población.

entre sí y con el resto de la población. Estos resultados muestran que algunos aislamientos de Apartadó y Dabeiba posiblemente están generando una variabilidad genética importante en *M. royeri* al noroccidente de Antioquia; Apartadó fue uno de los dos municipios donde se detectó una mayor incidencia de la moniliasis (Maya et ál, 2004). En la figura 6 se presenta la representación tridimensional del análisis de componentes principales para los 170 aislamientos de *M. royeri* de Antioquia basado en el perfil de bandas generado por los marcadores RAPD.

En el análisis de diversidad genética por municipio, Apartadó y Dabeiba mostraron altos niveles de variabilidad genética con los valores más altos para el índice de Shannon con 0,304 para Apartadó y 0,312 para Dabeiba,

y un porcentaje alto de loci polimórficos de 79,03% para Apartadó y de 82,3% para Dabeiba, comparado con los demás municipios. Se detectó una correlación significativa entre el índice de Shannon y el porcentaje de loci polimórficos para los municipios (coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,987$, $P < 0,05$). En la tabla 4 se muestran los valores del índice de Shannon y el porcentaje de loci polimórficos calculados para cada municipio. El análisis de diversidad genética por subregiones mostró que la mayor variabilidad genética se encuentra en las subregiones occidente y Urabá al noroccidente de Antioquia, a las que pertenecen Dabeiba y Apartadó respectivamente. Éstas mostraron los valores más altos para el porcentaje de loci polimórficos (P), índice de Shannon (H') y Diversidad total de Genes (Ht), en las de-

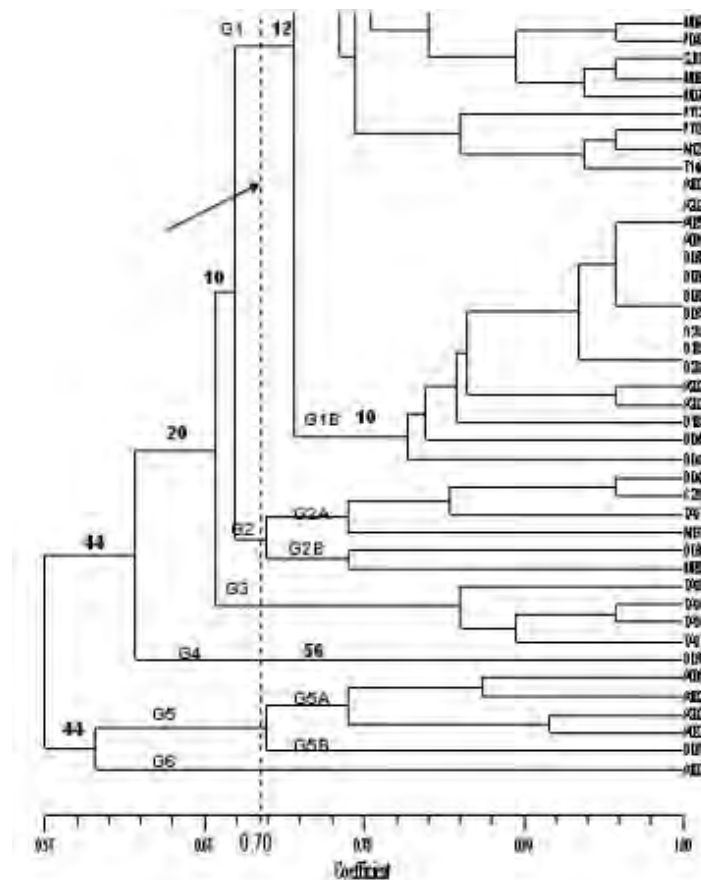


Figura 5. Fragmento inferior del dendrograma obtenido mediante el método UPGMA y el coeficiente de similitud de Dice de 170 aislamientos de *M. royeri* de Antioquia con base en el perfil de bandas generado por los marcadores RAPD. Grupos G1 a G6 resueltos a un nivel de similitud de 0,70. Los valores Bootstrap P se indican en el nodo correspondiente de cada grupo.

más subregiones la diversidad genética fue baja reflejada en los bajos valores para estos mismos estimadores de diversidad genética, lo que refleja una población de *M. roreri* genéticamente uniforme en Antioquia a excepción de Apartadó y Dabeiba, donde posiblemente se está generando una variación genética incipiente en *M. roreri*.

Para las subregiones la diversidad genética (H') inferida del índice de Shannon fue más alta que la diversidad total de genes (H_t), revelando que dicha diversidad está distribuida entre linajes clonales, atribuida principalmente a la diversidad dentro de las subregiones indicando que los aislamientos difieren genéticamente dentro de éstas. La diversidad de genes dentro de la población (H_s) osciló entre 0,10 y 0,15, y la diversidad de genes total (H_t) osciló entre 0,12 y 0,19 mostrando que la diversidad genética fue baja dentro de la población y en las subpoblaciones individuales representadas por las subregiones. También se detectó una correlación significativa entre el índice de Shannon y la diversidad total de Genes (H_t) (Coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,982$, $P < 0,05$), y entre el índice de Shannon y la diversidad de genes dentro de la población (H_s) (Coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,951$, $P < 0,05$) para las subregiones.

La diferenciación genética (G_{st}) en las subregiones osciló entre 0,12 y 0,25 que pue-

de ser atribuida a una reciente introducción de *M. roreri* en Antioquia y a una baja presión de selección. Estos valores también indican que la diversidad genética en el total de la población se encuentra en las subpoblaciones de *M. roreri*, y que éstas son muy homogéneas entre sí. El análisis de diversidad genética para la población total mostró que los municipios de Apartadó y Dabeiba están aportando la mayor proporción de variabilidad genética en la población de *M. roreri* en Antioquia, ya que los valores para el porcentaje de loci polimórficos, índice de Shannon de diversidad genotípica, y diversidad total de genes disminuyeron en la población cuando estos estimadores se calcularon al excluir estos dos municipios del análisis. En la tabla 5 se indican los valores obtenidos para los estimadores de diversidad genética en cada subregión, y en la tabla 6 los valores obtenidos para estos mismos estimadores en la población total con y sin Apartadó y Dabeiba.

El análisis de identidad y distancia genética basado en Nei (1972) entre pares de poblaciones de los municipios reflejó un alto grado de similitud genética entre los municipios de la región noroccidente de Antioquia –Apartadó, Chigorodó y Dabeiba–, con un valor promedio de identidad genética de 0,976, y los municipios del suroccidente de Antioquia –San Jerónimo y Támesis–, con un valor de identidad genética de 0,978. Para el

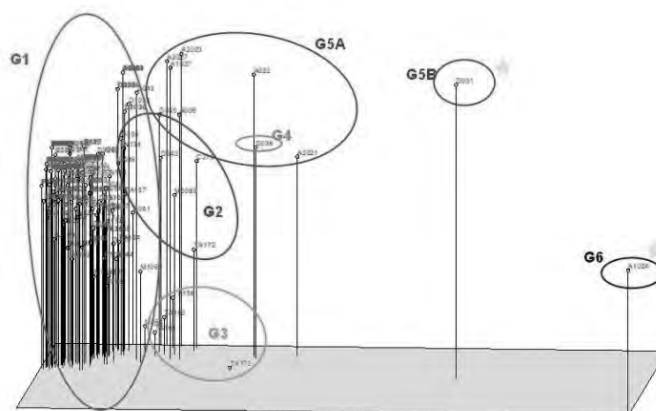


Figura 6. Análisis de componentes principales de similitud genética entre 170 aislamientos de *M. roreri* de Antioquia con base en la matriz binaria de los marcadores RAPD. G1 a G6 indican los grupos designados mediante el análisis de agrupamientos, la estrella amarilla indica los aislamientos que difieren significativamente del resto de la población.

Tabla 4. Valores de índice de Shannon y porcentaje de loci polimórficos para *M. roseri* en doce municipios productores de cacao en Antioquia.

Subregión Antioquia	Municipio	% loci polimórfico	Índice de Shannon
Bajo Cauca	Tarazá	37,10	0,18
Magdalena Medio	Maceo	54,84	0,25
	Puerto Berrío	45,16	0,215
Nordeste	Temedios	37,10	0,199
	Segovia	19,35	0,115
Norte	Valdivia	33,87	0,188
Occidente	San Jerónimo	27,42	0,157
	Dabeiba	82,26	0,312
Oriente	Nariño	33,87	0,171
Suroeste	Támesis	27,42	0,157
Urabá	Apartadó	79,03	0,304
	Chigorodó	35,48	0,177

resto de la población los valores de identidad genética entre los pares de municipios oscilaron entre 0,86 y 0,98 indicando una gran similitud genética en la población de *M. roseri*. La mayor distancia genética se encontró entre los aislamientos de Apartadó y Puerto Berrío del occidente y oriente de Antioquia respectivamente, con un valor de distancia genética entre estos de 0,141, y entre los aislamientos de Dabeiba y San Jerónimo del occidente de Antioquia con un valor de distancia genética de 0,137. Para el resto de la población la distancia genética osciló entre 0,023 y 0,141, mostrando que las poblaciones de *M. roseri* en la mayoría de municipios de Antioquia tienen muy pocas diferencias genéticas entre sí. En la tabla 7 se muestran los valores de identidad y distancia genética entre pares de poblaciones de los municipios de Antioquia.

Al determinar la distribución de la variabilidad genética en la población de *M. roseri* en Antioquia con AMOVA (análisis de varianza molecular) se encontró que el 5,94% de la variabilidad se atribuye a diferencias entre las subregiones (grupos), el 18,4% a diferencias entre los municipios (poblaciones) dentro de cada subregión, y el 75,68% restante a diferencias dentro de la población de los municipios con la mayor contribución aporta-

da por Apartadó y Dabeiba. Esta distribución de la variabilidad genética podría ser explicada por la predominancia de una reproducción de tipo clonal en *M. roseri* en Antioquia, y su gran homogeneidad genética, o al efecto de las diferencias en el tamaño de muestra entre los municipios, con un mayor número de aislamientos en Apartadó, Dabeiba y Maceo. En la tabla 8 se muestran los resultados del análisis de varianza molecular entre subregiones, dentro y entre la población de *M. roseri* en los municipios de Antioquia.

El alto nivel de similitud genética, y los bajos niveles de diversidad y diferenciación genética entre los aislamientos de la población de *M. roseri* evaluada, donde más del 95% de la población hizo parte del mismo grupo genético, muestran que su introducción en Antioquia es muy reciente, y que su propagación ha sido en una forma clonal, favorecida por la presencia de condiciones climáticas muy uniformes, y por el tipo de material vegetal utilizado para el establecimiento de los cultivos, híbrido en su gran mayoría. Estos datos son similares a los obtenidos en la caracterización morfológica de la misma población (datos no publicados) donde se encontró una gran similitud morfológica entre todos los aislamientos. También estos datos son congruentes con la defini-

Tabla 5. Valores de porcentaje de loci polimórficos, índice de Shannon, diversidad genética total, diversidad genética dentro de la población, y diferenciación genética para los aislamientos de *M. roreri* en las subregiones de Antioquia.

Subregión Antioquia	P ^a	H ^{tb}	Ht ^c	Hs ^d	Gst ^e
Bajo Cauca y Norte	46,8	0,229	0,155 ± 0,041	0,123 ± 0,028	0,210
Magdalena Medio	59,7	0,261	0,170 ± 0,039	0,150 ± 0,031	0,119
Nordeste	38,7	0,217	0,142 ± 0,038	0,106 ± 0,022	0,252
Occidente	82,3	0,320	0,190 ± 0,034	0,150 ± 0,021	0,211
Oriente y Suroeste	38,7	0,194	0,127 ± 0,032	0,110 ± 0,024	0,138
Urabá	83,9	0,304	0,172 ± 0,027	0,152 ± 0,021	0,115

- a Porcentaje de loci polimórfico
- b Índice de Shannon de diversidad genotípica
- c Diversidad de genes total
- d Diversidad de genes dentro de la población
- e Diferenciación genética

Tabla 6. Valores de porcentaje de loci polimórficos, índice de Shannon, diversidad genética total, diversidad genética dentro de la población y diferenciación genética para la población total de *M. roreri* en Antioquia

Población	P ^a	H ^{tb}	Ht ^c	Hs ^d	Gst ^e
Población total con Apartadó y Dabeiba	93	0,321	0,190 ± 0,037	0,132 ± 0,017	0,306
Población total sin Apartadó y Dabeiba	66,13	0,273	0,174 ± 0,039	0,120 ± 0,019	0,312

- a Porcentaje de loci polimórfico
- b Índice de Shannon de diversidad genotípica
- c Diversidad de genes total
- d Diversidad de genes dentro de la población
- e Diferenciación genética

ción de los tres grupos genéticos dada por Aime (2006), donde la población de *M. roreri* en Antioquia estaría relacionada con el genotipo 1 el cual se encuentra distribuido al noroccidente de Suramérica, zona en la cual se encuentra ubicado Antioquia. Además, es de anotar que el genotipo 1 de Aime (2006) encierra cuatro de los cinco grupos genéticos definidos por Phillips (2003) a excepción del grupo Gileri de Ecuador, resultados que concuerdan con los obtenidos en la presente investigación donde todos los aislamientos de referencia pertenecientes a tres de los cinco grupos genéticos definidos por Phillips (2003) (Bolívar, Co-occidente y Co-central) hicieron

parte del mismo grupo genético G1, el cual representó más del 95% de los aislamientos de Antioquia.

La estructura genética de la población de *M. roreri* en Antioquia difiere de lo reportado por Phillips (2003). La cercanía de la zona del Magdalena medio antioqueño con el Magdalena medio santandereano, hizo suponer que los aislamientos procedentes de esta región podrían mostrar la mayor variabilidad y diferenciación genética de toda la población, y que los municipios ubicados en las regiones más distantes geográficamente de esta región, como el noroccidente Antioqueño, mostrarían

Tabla 7. Valores de identidad genética (sobre la diagonal) y distancia genética (bajo la diagonal) basados en Nei (1972) entre las poblaciones de *M. roseri* de doce municipios productores de cacao en Antioquia

	Apartadó	Chigorodó	Dabeiba	Maceo	Nariño	Puerto Berrío	Remedios	San Jerónimo	Segovia	Támesis	Tarazá	Valdivia
Apartadó	*	0,954	0,977	0,923	0,912	0,868	0,901	0,889	0,904	0,941	0,922	0,928
Chigorodó	0,047	*	0,975	0,937	0,948	0,930	0,907	0,919	0,914	0,936	0,922	0,943
Dabeiba	0,023	0,048	*	0,913	0,914	0,914	0,900	0,872	0,907	0,938	0,931	0,919
Maceo	0,081	0,065	0,092	*	0,957	0,915	0,954	0,978	0,940	0,931	0,953	0,944
Nariño	0,092	0,054	0,090	0,044	*	0,926	0,940	0,939	0,930	0,938	0,927	0,939
Puerto Berrío	0,141	0,073	0,090	0,089	0,077	*	0,909	0,890	0,923	0,885	0,926	0,913
Remedios	0,104	0,098	0,105	0,048	0,062	0,095	*	0,939	0,952	0,930	0,950	0,961
San Jerónimo	0,117	0,085	0,137	0,022	0,063	0,116	0,063	*	0,912	0,921	0,930	0,928
Segovia	0,101	0,090	0,097	0,062	0,072	0,080	0,049	0,092	*	0,927	0,961	0,918
Támesis	0,061	0,066	0,065	0,072	0,064	0,123	0,073	0,083	0,076	*	0,940	0,913
Tarazá	0,081	0,082	0,072	0,049	0,076	0,077	0,051	0,072	0,040	0,062	*	0,934
Valdivia	0,075	0,059	0,085	0,058	0,063	0,092	0,040	0,075	0,086	0,091	0,069	*

Tabla 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre subregiones, dentro y entre la población de *M. roreri* en doce municipios productores de cacao en Antioquia

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de variación	P
Entre subregiones	177,22	0,388	5,94	<0,001
Entre municipios dentro de la subregión	113,50	1,2019	18,38	<0,001
Dentro de los municipios	1072,71	4,949	75,68	<0,001

la menor variabilidad y diferenciación genética. Contrario a lo esperado, Maceo y Puerto Berrío en el Magdalena medio en Antioquia mostraron una gran similitud genética con el resto de la población y una baja variabilidad genética, mientras que la mayor variabilidad genética se detectó en Apartadó y Dabeiba al noroccidente de Antioquia, la región más distante del Magdalena medio en Santander.

La moderada variabilidad genética en un número reducido de aislamientos de Apartadó y Dabeiba hace pensar en una evolución incipiente de variantes de *M. roreri* en estos municipios. Estas variantes posiblemente fueron introducidas por intervención humana desde la zona del Magdalena medio en Santander considerada el centro de origen y diversidad de *M. roreri* por Phillips (2003); sin embargo, los aislamientos de Apartadó y Dabeiba mostraron poca similitud genética con los aislamientos de la región del Magdalena medio en Antioquia adyacente a la región del Magdalena medio en Santander. Otra posible explicación sería la evolución de nuevas variantes como respuesta a una alta presión de selección impuesta por las condiciones climáticas particulares del noroccidente de Antioquia, al tipo de material vegetal utilizado en los cultivares de cacao en esta región, o a la presencia de hospedantes silvestres como *T. gileri* y *Herrania*, ya que no existen estudios previos con evidencia biológica que indiquen la ocurrencia de reproducción sexual de *M. roreri* en esta región de Antioquia.

CONCLUSIONES

La población de *M. roreri* en Antioquia posee una gran similitud genética, bajos niveles de diversidad y diferenciación indicando que su introducción en Antioquia posiblemente

es muy reciente, con una propagación de forma clonal, favorecida por la presencia de condiciones climáticas poco agresivas para el hongo y el tipo de material vegetal utilizado para el establecimiento de los cultivos, lo que impone una baja presión de selección. Sin embargo, *M. roreri* mostró una variación genética moderada en Apartadó y Dabeiba que pueden representar sitios de evolución y focos de dispersión de nuevas variantes del hongo. El mayor porcentaje de variabilidad genética se encontró dentro de los municipios con la mayor contribución aportada por los aislamientos de Apartadó y Dabeiba, con un porcentaje pequeño de variación entre los municipios dentro de cada subregión, y una variación de magnitud muy pequeña y poco significativa entre las subregiones de Antioquia. Con base en los resultados de la presente investigación se sugiere emprender estudios de variabilidad genética con la misma población estudiada o con aislamientos de la región noroccidente de Antioquia, en particular de Apartadó y Dabeiba, con marcadores codominantes u otras técnicas moleculares que permitan la estimación de parámetros en la población que no pueden ser determinados con marcadores dominantes y que permitan identificar estas posibles nuevas variantes, también para esclarecer una posible reproducción sexual de *M. roreri* en esta región, y descartar el efecto del tamaño de la muestra en los municipios con mayor número de muestras: Apartadó, Dabeiba y Maceo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, y desarrollada con el apoyo del Instituto de Cooperación para la Agricultura

IICA, Federación Nacional de Cacaoteros (Fedecacao), Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia, Compañía Nacional de Chocolates de Medellín, Posgrado en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, los Laboratorios de Sanidad Vegetal, Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Los autores expresan sus agradecimientos al doctor Wilbert Phillips Mora por la donación de los aislamientos de referencia, y a la empresa Coltabaco y el doctor Mauricio Marín por la donación de 39 cebadores tipo RAPD.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afanador-Kafuri, L., Haley, S. D. y Kelly, J. D. 1993. Adoption of a "mini-prep" DNA Extraction Method for RAPD Marker Analysis in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 36: 10-11.
- Afanador-Kafuri, L.; Minz D; Maymon, M. y Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* Isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and Identification of a Unique Species from the Genus. *Phytopathology*, 93(5): 579-587.
- Aime, Cathie Mary. 2006. New phylogenies: Revelations on cacao pathogens and the diseases they cause. *Phytopathology*, 96: S138.
- Aime, M. C. y Phillips M. W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 97(5): 1012-1022.
- Andebrhan, T. y Furtek, D. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis perniciosus* isolates from different hosts. *Plant Pathol*, 43: 1020-1027.
- Andebrhan, T.; Figueira, A.; Yamada, M.; Cascardo, J. y Furtek, D. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosus*) of *Theobroma cacao* in Bahia. Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 167-175.
- Antúnez, Mayolo, G. 2003. Genetic Engineering of *Theobroma cacao* and molecular Studies on cacao defense responses. Tesis. Universidad de Pensilvania.
- Bateman, P. R.; Hidalgo, E.; Garcia, J.; Arroyo, C.; Ten Hoopen, M. G.; Adonijah, V. y Krauss, U. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology*, 147: 129-138.
- Bowers, J. H., Bailey, B. A., Hebbbar, P. K., Sanogo, S. y Lumsden, R. D. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. *Plant Health Progress*. Disponible en doi:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV.
- Crozier, J., Thomas, S. E., Aime, M. C., Evans, H. C. y Holmes, K. A. 2006. Molecular characterization of endophytic morpho-species isolated from cocoa (*Theobroma cacao*): a potential source of biocontrol agents? *Proceedings of the 1st International Conference on Plant-Microbe Interactions: Endophytes and biocontrol agents*, Saariselka, Lapland, Finland. April: 18-22.
- Espinal, G. C; Martínez, C. H; Beltrán, L. L; y Ortiz, H. L. 2005. La cadena del cacao en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo núm. 92. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia.
- Evans, H. C., Stalpers, J. A., Samson, R. A., Benny, G. I. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*, 56: 2528-2532.
- Evans, H. C. 1981. Pod Rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. *Phytopathological Papers*, 24: 7-49.
- Evans, H. C. 1986. A reassessment of *Moniliophthora* (*monilia*) pod rot of coca. *Cocoa Growers Bulletin*. 37: 34-43.
- Evans, H. C., Holmes, K. A., Phillips, W. y Wilkinson, M. J. 2002. What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? *Mycologist*, 16 (4): 148-152.
- Evans, H. C, Holmes, K. A. y Reid, A. P. 2003a. Phylogeny of the frosty pod pathogen of cocoa. *Plant Pathology*, 52: 476-485.

- Evans, H. C., Holmes, K. A. y Thomas S. E. 2003b. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, May 2003. 2 (2): 149-160.
- Excoffier, L., Smouse, P. A. y Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier, L., Guillaume, L. y Schneider, S. 2006. Arlequin ver. 3.1: An Integrated Software Package for Population Genetics. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), University of Berne, Switzerland.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Freeman, S., Pham, M. y Rodríguez, R. J. 1993. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Exp. Mycology*, 17: 309-322.
- Freeman, S. y Rodríguez, R. J. 1995. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. *Mycology. Res.*, 99: 501-504.
- Griffith, G. W.; Nicholson, J.; Nenner, A.; Birch, N. R. y Hedger, N. 2003. Witches brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*, 41(3): 423-435.
- Kennedy, A. y Aime, C. M. 2005. Cultural studies of *Moniliophthora roreri*, an important cacao pathogen. *Inoculum*, 56 (4): 30-31.
- Maya, S.; Cubillos, G. y Botero, A. 2004. Determinación de la incidencia, severidad y pérdidas económicas de las principales enfermedades del cultivo del cacao en el departamento de Antioquia. *Revista ICA Informe*.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 70: 3321-3323.
- Phillips, M. W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao*) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et ál, as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences. The University of Reading, RG6 6AS, UK.
- Phillips, M. W.; Castillo, J.; Krauss, U.; Rodríguez, E. y Wilkinson, J. M. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology*, 54: 483-490.
- Phillips, M. W. 2006. La moniliasis del cacao: un enemigo que podemos y debemos vencer. *Memorias. Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao*. Quevedo, Ecuador.
- Phillips, M. W.; Cawich, J.; Garnett, W. y Aime, C. M. 2006a. First report of frosty pod rot (=moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. *Plant Pathology*. 55: 584.
- Phillips, M. W.; Coutino, A.; Ortiz, C. F.; López, A. P.; Hernández, J. y Aime, C. M. 2006b. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology*, 55: 584.
- Rohlf James F. 1998. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0, User Guide. Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook, NY 11794-5245. Applied Biostatistics Inc.
- Rohlf, J. F. 2005. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.2, Getting Started Guide. Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook, NY 11794-5245. Applied Biostatistics Inc.
- Samuels, J. G.; Suárez, C.; Solis, K.; Holmes, A. K.; Thomas, E. S.; Ismaiel, A. y Evans, C. H. 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological Research*, 110: 381-392.
- Shannon, C. E. y Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana.

Warburton, M. y Crossa, J. 2000. Data Analysis in the CIMMYT Applied Biotechnology Center For Fingerprinting and Genetic Diversity Studies. First Edition. International Maize and Wheat Improvement Center.

Warburton, M. y Crossa, J. 2002. Data Analysis in the CIMMYT Applied Biotechnology Center For Fingerprinting and Genetic Diversity Studies. Second Edition. International Maize and Wheat Improvement Center.

Yap, I. y Nelson, R. J. 1996. WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRRI Discussion Paper Series 14. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T. B., Ye, Z. H. y Mao, J. X. 1997. Popgene, The User Friendly Software for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.