

# Variabilidad genética de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime y Phillips-Mora, comb. nov. (Agaricales - Marasmiaceae) en variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Genetic variability of *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, comb. nov. (Agaricales – Marasmiaceae) in varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.)

Carolina Osorio-Solano<sup>1</sup>, Carlos Alberto Orozco-Castaño<sup>1</sup>, Germán Ariel López-Gartner<sup>2</sup>,  
y Fredy Arvey Rivera-Páez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Biólogos, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales (Caldas, Colombia).

<sup>2</sup> Profesores Grupo de Investigación Genética, Biodiversidad y Fitomejoramiento, GEBIOME. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales (Caldas, Colombia).

\*Autor para correspondencia: fredy.rivera@ucaldas.edu.co

Rec.: 07.07.11 Acept.: 30.05.12

## Resumen

*Moniliophthora perniciosa*, agente causante de la ‘escoba de bruja’ en cacao (*Theobroma cacao*), presenta una elevada variabilidad genética y discrepancias en su taxonomía y es una de las enfermedades más importantes en plantaciones cacaoteras que ocasiona pérdidas económicas a nivel mundial cercanas a 70%, y de 40% a nivel nacional. La caracterización de la diversidad genética de los biotipos es importante para la ejecución de proyectos encaminados al manejo de este patógeno y el desarrollo de materiales resistentes de cacao. En este estudio se analizaron 12 aislamientos del hongo obtenidos de diferentes materiales de cacao. Cada una de las muestras se evaluó con marcadores moleculares que tienen como blanco una región del ADN ribosomal (ADNr) nuclear conocida como ITS (Internal Transcribed Spacer), una región intergénica (IGS-1) y cinco secuencias simples repetidas (SSR). El marcador IGS-1 permitió la determinación del biotipo C, no obstante se encontró una variabilidad genética evidente dentro de este biotipo, aún no registrada. El análisis de la diversidad genética de *M. perniciosa* por medio de marcadores microsatélite arrojó un valor total de 0.4260, una heterocigosidad total de 0.6143 y un índice de información polimórfica (PIC) de 0.3407, valores considerados de rango medio a alto para los aislamientos estudiados y que estiman la variabilidad genética presente en *M. perniciosa*.

**Palabras clave:** Biotipos, cacao, Colombia, hongos, marcadores moleculares, *Moniliophthora perniciosa*, patógeno, *Theobroma cacao*.

## Abstract

*Moniliophthora perniciosa*, the founder agent of the ‘witch’s broom’ on cocoa (*Theobroma cacao* L.) is one of the most important diseases in cocoa plantations, causing economic losses close to 70% worldwide and 40% nationwide. It shows a high genetic variability and discrepancies in its taxonomy. Characterization of the genetic diversity of biotypes is important for projects aimed towards the handling of this pathogen and the development of resistant cocoa materials. Twelve isolations of the fungus were analyzed in this study from different cocoa material. Each sample was evaluated with molecular markers directed towards a nuclear ribosomal DNA (rDNA) region known as ITS (Internal Transcribed Spacer), an intergenic region (IGS-1), and five simple sequence repeats (SSR). The IGS-1 allowed the

determination of biotype C, however, an evident genetic variability was found within this biotype that has not been yet reported. The genetic diversity analysis of *M. pernicioso* by microsatellite markers gave a total value of 0.4260, a total heterozygosity of 0.6143, and a polymorphism information content (PIC) of 0.3407; these values are considered to be within a medium to high range for the studied isolations, and are an estimation of the genetic variability present in *M. pernicioso*.

**Key words:** Biotipo, cacao, Colombia, fungi, molecular markers, *Moniliophthora pernicioso*, pathogen, *Theobroma cacao*.

## Introducción

La producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el mundo se concentra en Africa y América tropical; en este contexto, Costa de Marfil es el primer productor con 39% del mercado internacional, mientras Colombia con 1% no es un actor importante en el comercio exterior y ocupa un octavo lugar. La producción de cacao en Colombia esta concentrada en Huila, Tolima, Antioquia, Costa Atlántica, Meta y el eje cafetero donde existen 90,000 hectáreas sembradas en 24,500 fincas, con un rendimiento promedio por hectárea cosechada de 450 kg de cacao en grano. El cultivo de cacao presenta problemas claramente identificados, entre ellos: el estado fitosanitario de las plantaciones, la falta de tecnología apropiada, escasa capacitación del recurso humano y erosión de la variabilidad genética de las plantaciones, lo que ha incidido en la pérdida de interés por parte de los productores (MADR, 2004).

La planta de cacao presenta fundamentalmente dos patógenos de alta incidencia: *Moniliophthora pernicioso* (Stahel) Aime y Phillips-Mora, comb. nov. (Aime y Phillips-Mora, 2005) y *M. roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.*, agentes causantes de la enfermedad de la 'escoba de bruja' y la moniliasis del cacao, respectivamente. Estos patógenos producen las mayores pérdidas en producción del fruto, cercanas a 70% a nivel mundial y 40% a nivel nacional (Griffith *et al.*, 2003). El agente causante de la escoba de bruja se clasificó inicialmente por Stahel en 1915, como *Marasmius pernicioso*; más tarde, se reclasificó y transfirió en el género *Crinipellis* por Singer (1942) y posteriormente, en el 2005, Aime y Phillips-Mora lo denominaron *Moniliophthora pernicioso*. Este patógeno se ha detectado infectando brotes, inflorescencias y frutos de *T. cacao*, es endémico para

muchas otras especies del género *Theobroma*, *Herrania*, y de las familias Solanácea, Bignoniaceae y Malpighiaceae (Resende *et al.*, 2000).

Dependiendo del hospedero vegetal donde se encuentra el hongo se han identificado los biotipos: **C**, presente en las plantaciones de cacao y otras plantas de la familia Malvaceae, **S**, que se ha encontrado infectando especies pertenecientes a la familia Solanaceae, **L** que infecta lianas, especialmente *Arrabidaea verrucosa* perteneciente a la familia Bignoniaceae, y **B**, que infecta a *Bixa Orellana* (Evans, 1978; Bastos y Andebrhan, 1986; Griffith y Hedger, 1994).

A escala molecular, en estudios del ADN ribosomal en numerosos Basidiomycetes se ha observado que los espaciadores internos transcritos (ITS) muestran una variación que se convierte en un marcador taxonómico muy útil para distinguir entre especies (Vilgalys y González, 1990; White *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000). De la misma manera, los espaciadores intergénicos (IGS) han sido utilizados como herramienta para discriminar biotipos (Arruda y Marisa, 2003) y la utilización de microsatélites (SSR) ha soportado estudios de variabilidad genética en biotipos de *M. pernicioso* (Gramacho *et al.*, 2007). Ante la falta de mayor conocimiento sobre *M. pernicioso* en Colombia, en este trabajo se evalúa la variabilidad genética de este hongo por medio de marcadores moleculares, en busca de fortalecer el conocimiento taxonómico del patógeno que representa un problema fitosanitario serio y por tanto requiere la ejecución de estudios encaminados a conocer su epidemiología y sus mecanismos de manejo, con el fin de trazar estrategias que permitan reducir el impacto negativo sobre las plantaciones de cacao en Colombia.

## Materiales y métodos

Las muestras utilizadas en el estudio correspondieron a basidiocarpos presentes en tallos para *M. perniciosa* y en frutos para *M. roleri*, provenientes de *T. cacao* (IMC 67, TCA644, EET 8, ICS 95, CAP 34, CCN 51, Escabino, ICS 60, ICS 1, ICS 39, TSH 565 y Luker 40 para *M. perniciosa*; y Escabino y EET 8 para *M. roleri*) recolectados de la granja Casa Luker S.A (Palestina, Caldas, Colombia) ubicada a 5° 05' N y 75° 40' O, a 1010 m.s.n.m. Se evaluaron las condiciones para la obtención de cultivos monospóricos mediante descarga de esporas. Las muestras de basidiocarpos con diferentes estados de desarrollo recolectadas en campo fueron llevadas a laboratorio; cuando algunas de las escobas presentaron basidiocarpos en estadios tempranos de crecimiento se almacenaron en cámara húmeda y cuando mostraron basidiocarpos en estadio óptimo de desarrollo se almacenaron en bolsas y se guardaron a -4 °C. Una vez que los basidiocarpos se sacaron de las cámaras húmedas y de las neveras fueron mantenidos a temperatura ambiente por 30 min con el fin de que al momento de la descarga de las esporas los basidios no estuvieran congelados. También se evaluó la efectividad de los métodos de obtención de ADN con fines de amplificación por PCR (Orozco *et al.*, 2011).

La extracción de ADN del cultivo monospórico de *M. perniciosa* correspondió a 0.5 cm de micelio del hongo que se maceró con 200 µl de buffer de lisis (EDTA 0.5 M, NaCl 5 M, SDS 10 mM) y calentamiento en baño maría por 5/96 °C, más extracción por fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación

con etanol y acetato de sodio (Goodwin y Lee, 1993; Orozco *et al.*, 2011). La extracción directa del ADN de fructificaciones de *M. perniciosa* y *M. roleri*, correspondió a cortes de 0.5 cm de basidiocarpos previamente desinfectados con hipoclorito al 3% durante 1 min y agua destilada por 5 min y maceración con 200 µl de buffer de lisis (EDTA 0.5 M, NaCl 5 M, SDS 10 mM) más calentamiento por 1 hora a 56°C y extracción por fenol-cloroformo alcohol isoamílico (adicionando 0.3 g de perlas de vidrio al inicio de la extracción) y precipitación con etanol y acetato de sodio, resuspendiendo el ADN en 30 µl de Tris-EDTA pH: 8.0 (Tris HCl 10 mM, EDTA 0.1M) que se conservó a 4 °C de acuerdo con NIH (2005) y Orozco *et al.* (2011). La calidad y cantidad del ADN fueron determinadas por comparaciones con concentraciones conocidas en geles de agarosa al 1%.

Los iniciadores utilizados en el estudio (Cuadro 1) diferencian *M. perniciosa* y *M. roleri*, por la amplificación de secuencias repetidas del ADNr que contienen regiones espaciadoras parciales ITS1, ITS2 y el gen 5.8S, con los iniciadores propuestos por White *et al.* (1990) y Sartorato *et al.* (2006). La diferenciación de biotipos se llevó a cabo por la amplificación de secuencias repetidas del ADNr que corresponden al espaciador intergénico (IGS-1) y regiones parciales de los genes 5S y 28S, con los iniciadores propuestos por Hsiang y Mahuku (1999) y Mwenje *et al.* (2006). La variabilidad genética dentro de los biotipos se evaluó por medio de marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR) propuestos por Gramacho *et al.* (2007) y Silva *et al.* (2007).

**Cuadro 1.** Marcadores moleculares utilizados para evaluar la diversidad genética de *Moniliophthora perniciosa* en cacao.

Iniciador	Tipo de marcador	Secuencia del iniciador 5' - 3'	FUENTE
ITS1		F: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Sartorato <i>et al.</i> , 2006;
ITS4	ITS	R: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> , 1990
O-1		F: AGTCCTATGGCCGTGGAT	Mwenje <i>et al.</i> , 2006;
CNL 12	IGS	R: CTGAACGCCTCTAA GTCAG	Hsiang y Mahuku, 1999
Mscepec_Cp15	SSR	F:AAAGGGAGGAAGCGAAGTCT R: TGTCGAGCACTAGCATGTGA	
Mscepec_Cp23	SSR	F: ACCTCCTCATATGGCGTCAC R: GCGGTTGGTGACTCTTGATT	
Mscepec_Cp45	SSR	F: ATGACCAGACAAATGAAAC R: CAAAGAGAAATCACAGAGC	Gramacho <i>et al.</i> , 2007
Mscepec_Cp47	SSR	F: CAACATCAATCCACGAC R: GAAGGCTGCGGAAGTAA	
mMpCena19	SSR	F: AACAAGGACAGGCACAAC R: GTATCAATGTAGGGGAGGA	Silva <i>et al.</i> , 2007

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenían de 100 - 200 ng de ADN, 200 - 800 µM de la mezcla dNTP's, 1.0 - 2.0 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen®), 0.75 - 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 - 2 µM de cada iniciador y 2 µl del buffer 10X (Invitrogen®). El programa de PCR comprendió una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, anillamiento a 55 °C por 1 min, extensión de 72 °C por 1 min y una elongación final de 72 °C por 5 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador BioRad PTC-200 y para su lectura se usó un marcador de peso molecular de 1 Kpb.

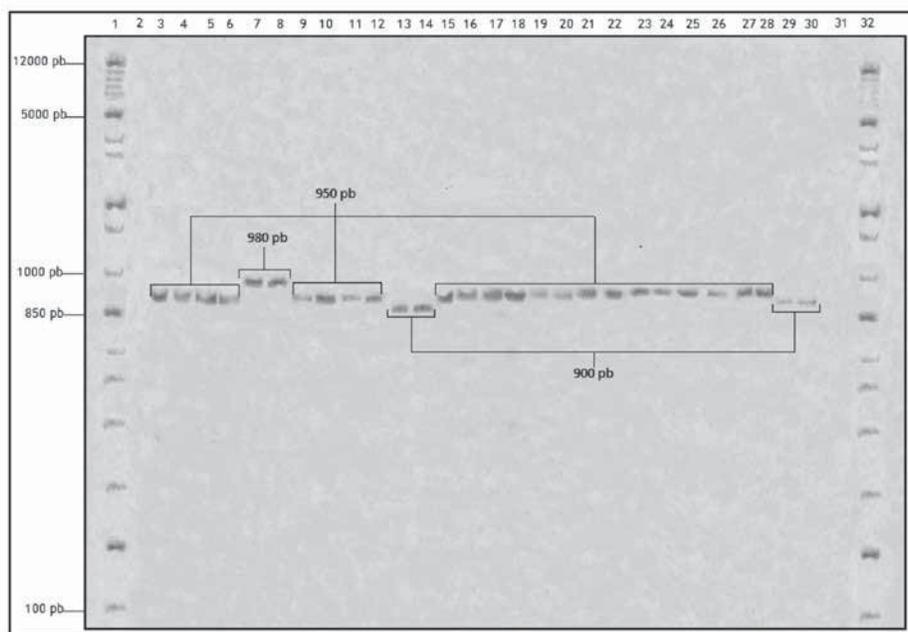
Los productos de amplificación fueron separados en geles denaturantes de acrilamida al 4% y cámaras de secuenciamento C.B.S Scientific Corp, revelados con nitrato de plata (Sanguinetti *et al.*, 1994) y analizados fotográficamente por medio del programa Corel Photo Paint, 2006 (versión 11.633). Se analizaron frecuencias basadas en distancia genética y se utilizó el algoritmo de agrupamiento NJ (Sneath y Sokal, 1973), para ge-

nerar la correspondiente matriz de similitud con los índices de Nei (1983). Se estimaron las frecuencias alélicas, fenotípica, y de distancia; diversidad genética; heterocigocidad y PIC (Contenido de Información Polimórfica) con el uso del programa Power Marker Versión 3.25 (Liu y Muse, 2005).

## Resultados

La amplificación por PCR de secuencias parciales de los espaciadores ITS1, ITS2 y el gen 5.8S del ADNr, utilizando los iniciadores, confirmaron la presencia de dos aislados para *M. rozeri*, con un peso molecular de 710 pb y de doce aislados para *M. pernicioso* con una banda diagnóstica de 750 pb. Las amplificaciones fueron reproducibles y sensibles, lo que se comprobó por la realización de amplificaciones por PCR de diluciones seriadas de ADN hasta de 1/400.

La caracterización molecular de biotipos con los iniciadores CNL12 y O-1 presentó en nueve aislados productos de amplificación de 950 pb, que pueden corresponder al biotipo C (Foto 1). Tres aislados presentan variaciones



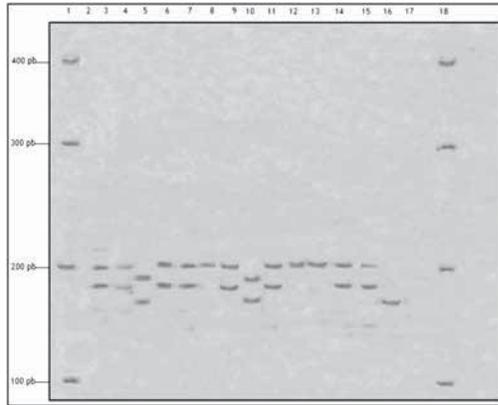
**Foto 1.** Amplificación espaciador intergénico (IGS-1) y regiones parciales de los genes 28S y 5S, con los iniciadores O-1 y CNL 12. Gel de poliacrilamida al 4%, coloreado con nitrato de plata. 1. Marcador de peso molecular (1Kpb), 2. Control de reacción, 3 y 4. Cultivo monospórico de *M. p.* (EET8), 5 y 6. Cultivo monospórico de *M. pernicioso* (Escabino), 7 y 8. *M. p.* (IMC 67), 9-10. *M. p.* (TCA 644), 11-12. *M. p.* (EET8), 13-14. *M. p.* (ICS95), 15-16. *M. p.* (CAP34), *M. p.* 17-18. *M. p.* (CCN51), *M. p.* (Escabino), 19-20. *M. p.* (Escabino), 21-22. *M. p.* (ICS60), 23-24. *M. p.* (ICS1), 25-26. *M. p.* (ICS39), 27-28. *M. p.* (TSH565), 29-30. *M. p.* (Luker 40), 31. Control negativo, 32. Marcador de peso molecular (1Kpb).

\* *M. p.* (*Moniliophthora pernicioso*).

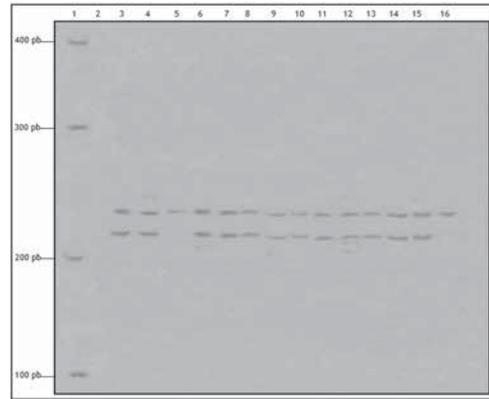
de tamaño, de los cuales dos revelaron una banda de aproximadamente 900 pb y el otro, un amplificado aproximado de 980 pb, que no han sido registrados en la literatura.

La diversidad genética de *M. perniciosa* evaluada con los microsatélites Mscepec\_

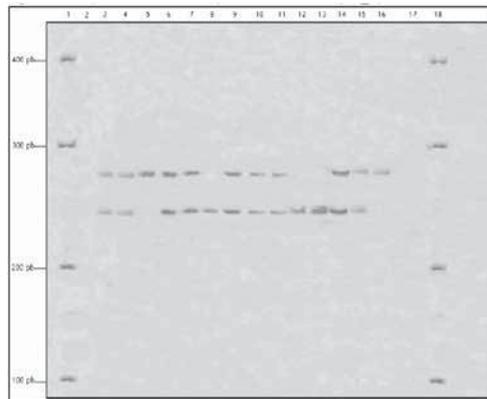
Cp15; Mscepec\_Cp23; Mscepec\_Cp45; Mscepec\_Cp47 y mMpCena 19 (Foto 2) presentaron una buena reproducibilidad, donde el iniciador Mscepec\_Cp15 fue el más polimórfico con cuatro alelos y pesos moleculares entre 170 pb y 200 pb; el iniciador mMpCena 19



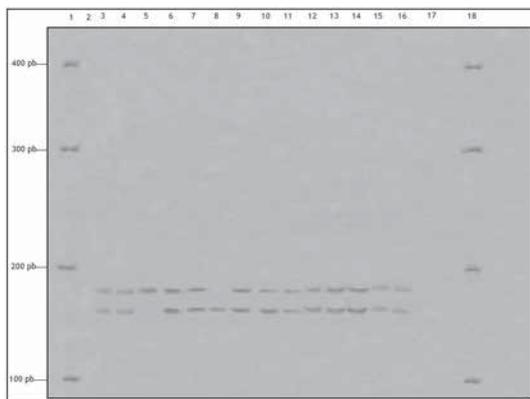
Mscepec\_Cp15



Mscepec\_Cp23



Mscepec\_Cp45



Mscepec\_Cp47



mMpCena19

**Foto 2.** Productos de PCR SSR (Repetición de secuencias discretas). Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb); Carril 2: control negativo; Carril 3 y 4 *M. perniciosa* hospedero EET8 y Escabino, ambos extracción desde cultivo monospórico; Carril 5 - 17 *M. perniciosa* hospederos (IMC 67, TCA 644, EET 8, ICS 95, CAP 34, CCN 51, Escabino, ICS 60, ICS 1, ICS 39, TSH 565, Luker40, respectivamente) provenientes de extracción de ADN directa.

se comportó como monomórfico con un solo alelo de 195 pb.

La diversidad genética total analizada por los microsatélites fue de 0.4260, la heterocigocidad total de 0.6143 y el índice de información polimórfica o PIC de 0.3407, donde el marcador Mscepec\_Cp15 fue el más informativo de los utilizados en este estudio y el que mostró un mayor polimorfismo.

### Discusión

La amplificación por PCR de regiones parciales de los espaciadores ITS1, ITS2 y el gen 5.8S, permitieron diferenciar *M. pernicioso* de *M. roreri*, resultados que son similares a los encontrados por Arruda *et al.* (2003) quienes destacan este marcador molecular para la diferenciación a nivel de especie en Basidiomycetes; así mismo, no se encontraron limitantes para la extracción de ADN de fructificaciones o cultivos, por lo cual se pueden adoptar las fructificaciones como fuente directa de ADN, que es una manera rápida de diagnóstico y que puede reflejar la situación fitosanitaria real del cultivo, tal como lo citan Orozco *et al.* (2011).

Los resultados obtenidos a través de la amplificación del espaciador intergénico (IGS-1), y regiones parciales de los genes 28S y 5S para la diferenciación de biotipos, permitió visualizar en nueve de los aislados un peso molecular correspondiente a 950 pb, lo cual concuerda con los estudios de Arruda *et al.* (2003) en los cuales aislados de *M. pernicioso* de *Theobroma cacao* (biotipo C) y de *Solanum lycocarpum* (biotipo S) presentaron un producto de amplificación cercano a 950 pb, y el biotipo L correspondiente a *Heteropterys acutifolia* reveló un amplificado de 1200 pb. No obstante, dos aislados presentaron un producto de amplificación cercano a 900 pb y un tercer aislado un amplificado de 980 pb, que también pueden ser considerados como biotipo C, dados los estudios de Arruda *et al.* (2003) que registran variabilidad genética dentro del biotipo C, atribuible al hospedero y a su origen geográfico.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son otra prueba de la variabilidad de las regiones intergénicas (IGS), tal como han sido registradas por Duchesne

y Anderson (1990) en la discriminación de poblaciones de hongos fitopatógenos; así, en el presente estudio se encontró variabilidad intraespecífica para los aislados de *M. pernicioso*, inclusive en este caso donde las muestras estaban restringidas a un sólo sitio geográfico. Arruda *et al.* (2003) encontraron variabilidad dentro de las regiones IGS en términos de peso molecular y la presencia de polimorfismos en los sitios de restricción, atribuibles a diferentes arreglos de sus repeticiones en tándem o la existencia de inserciones y deleciones. Por otra parte, se debe tener en cuenta que en algunas regiones geográficas se presume que *M. pernicioso* ha coevolucionado con sus hospederos de *Theobroma cacao* (Purdy y Schmidt, 1996; Evans *et al.*, 2002).

Arruda y Marisa (2003) analizaron 120 aislados de *M. pernicioso* (*T. cacao*, *H. acutifolia* y *S. lycocarpum*) procedentes de las regiones de Bahía, Minas, Distrito Federal y la región amazónica (Brasil) y encontraron variaciones genéticas de acuerdo con la procedencia del hospedero. Estos resultados también concuerdan con los de Arruda *et al.* (2003) quienes en la evaluación molecular mediante la técnica ERIC PCR de 50 aislados de *M. pernicioso* provenientes de *T. cacao*, *H. acutifoliae* y *S. lycocarpum* encontraron agrupación de aislados de acuerdo con el hospedero de infección del hongo, mostrando una considerable variabilidad intraespecífica dentro de los aislados provenientes de *T. cacao*, además la existencia de correlación entre el origen geográfico de *M. pernicioso* con el polimorfismo de los grupos. Rincones *et al.* (2006) proporcionan una visión general de la diversidad genética que existe entre los biotipos de *M. pernicioso* y sus resultados son utilizados para entender cómo la variabilidad afecta la interacción hospedero-patógeno así como el desarrollo de la enfermedad; sumado a esto, el análisis de secuencias en ese estudio demostró que este patógeno posee varias familias de elementos transponibles que contribuyen significativamente a la diversidad encontrada.

Bartley (1986) afirma que el biotipo C rompió la resistencia de materiales de cacao después de unas pocas generaciones; la variabilidad genética fue observada a nivel cromosómico.

somal en este biotipo, después de quince años de su introducción en Bahía (Brasil). Rincónes *et al.* (2003) observaron múltiples copias de elementos tipo transposones en el genoma de *M. pernicioso* biotipo C y propusieron que estos arreglos cromosomales pueden ser los causantes de la recombinación ectópica, que causa la activación de elementos que hacen que este hongo sea capaz de romper la resistencia natural o inducida en materiales de cacao. Esta variación de la región IGS de los aislados de *M. pernicioso* es un indicativo de diferenciación intraespecífica, no sólo por la composición genética ribosomal sino también por la variación cromosómica. Kistler y Miao (1992) y Zolan (1995) en estudios realizados con hongos fitopatógenos, especialmente con *M. pernicioso*, demostraron que estos poseen cromosomas muy largos, lo que los hace muy polimórficos y de fácil observación durante las fases sexual y asexual; así como en los procesos mitóticos y meióticos de la especie (Griffith y Hedger, 1994).

La diversidad genética detectada por los marcadores microsatélites fue limitada por el bajo número de iniciadores utilizados en este estudio y por la restringida cantidad de muestras analizadas, sin embargo los resultados revelan una alta tasa de heterocigosidad y un buen índice de información polimórfica para algunos de los iniciadores. Tres de los iniciadores usados en este estudio fueron de tipo trinucleótidos [mMpCena 19 - (AAC)18, el Mscepec\_Cp47- (CGT)8 y el iniciador compuesto Mscepec\_Cp15- (GAT)7(GAA)6], características de los microsatélites que son recomendadas por Gramacho *et al.* (2007) quienes lograron la amplificación de 12 loci polimórficos y recomiendan el uso de microsatélites trinucleótidos por encima de los tetra y dinucleótidos, además los recomiendan para el análisis de poblaciones naturales de *M. pernicioso* y en estudios que involucren especies altamente relacionadas.

El bajo número de aislados analizados en la presente investigación indica que existen buenas fuentes de diversidad genética para las plantaciones en la granja Casa Luker, lo que concuerda con lo hallado por Lana (2004) quien utilizando marcadores RAPD para 37 aislados de *M. pernicioso* en el municipio de

Piracicaba del Estado de São Paulo, Brasil, encontró mediante análisis de agrupamiento ocho grupos diferentes, lo que refuerza la hipótesis de que los aislados genéticamente diferentes pueden ocupar una misma planta hospedera. La baja diversidad alélica observada por Gramacho *et al.* (2007) corrobora una estrategia de homotalismo, donde las hifas de *M. pernicioso* son capaces de autofecundarse y producir estructuras sexuales de una única cepa genética, sin que se presente entrecruzamiento entre individuos de la misma especie.

Gramacho *et al.* (2007) indican que los marcadores microsatélites para *M. pernicioso* son abundantes en el genoma, pero que su variabilidad es baja comparada con otros registros para hongos. Un número de alelos en cada locus dentro del rango de 2 a 7 es bajo, si se tiene en cuenta que en este estudio se analizaron muestras de diferentes regiones geográficas y de varios hospederos. Sin embargo, los autores recomiendan el uso de los iniciadores utilizados en este estudio como herramientas útiles en investigaciones de estructura genética de poblaciones *M. pernicioso* y *M. roreri*, teniendo en cuenta que el iniciador más polimórfico fue Mscepec\_Cp15- (GAT)7(GAA)6, lo cual concuerda con el estudio de Silva *et al.* (2007) quienes al desarrollar 30 iniciadores tipo microsatélite para estudiar diversidad de diferentes aislados en *M. pernicioso* hallaron un total de nueve loci polimórficos, con un promedio de 2.9 alelos por locus. Así, aunque el nivel de polimorfismo es bajo, los iniciadores permiten la evaluación de la diversidad de este patógeno y el establecimiento de perfiles genéticos que ayudan a los esfuerzos en el mejoramiento de cacao y en la búsqueda de materiales resistentes.

Esta baja diferenciación genética puede ser atribuida a las barreras topográficas, los cultivos monoclonales, las barreras genéticas seguidas de eventos de colonización del hongo, bajo flujo genético entre las poblaciones de *M. pernicioso*, los mecanismos de homotalismo del biotipo C y en especial, al ciclo asexual y sexual de la especie. Cabe anotar que esta variabilidad genética es baja ya que la basidiospora es haploide y es la estructura principal para iniciar el ciclo de vida de un

hongo, en este caso *M. pernicioso* (Purdy y Schmidt, 1996).

### Conclusión

El biotipo C de *M. pernicioso* fue el único encontrado en cultivos de cacao en la granja Casa Luker; sin embargo, fue evidente la variabilidad genética dentro del biotipo, la cual aún no ha sido registrada.

### Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a: la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas por la financiación total del proyecto; la Casa Luker S.A. por facilitar el acceso al material de estudio; Luis Eduardo Zuluaga por su asesoría en el trabajo de campo y a María José Botero, por su asesoría en los estudios de laboratorio.

### Referencias

Aime, M. C. y Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycol.* 97(5):1012 - 1022.

Arruda, M. y Marisa, A. 2003. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. *Mycol. Res.* 107:25 - 37.

Arruda, M. C.; Miller, R. N.; Ferreira, M.; y Felipe, M. 2003. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence based PCR genomic fingerprinting. *Plant Pathol.* 52(2):236 - 244.

Bartley, B. G. D. 1986. *Theobroma cacao*. En: Breeding for durable resistance in perennial crops. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Roma: p. 25 - 42.

Bastos, C. N. y Andebrhan, T. 1986. Urucu (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira da vasourade-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. *Fitopat. Brasil.* 11(4):963 - 965.

Chen, W.; Grau, R.; Adee, E.; y Meng, X. 2000. A molecular marker identifying subspecific populations of the soybean brown stem rot pathogen, *Phialophora gregata*. *Ecol. Popul. Biol.* 90:875 - 883.

Corel Corporation. 2006. Corel Photo Paint (versión 11,633) Corel DRAW Graphics Suite.

Duchesne, L. C. y Anderson, J. B. 1990. Location and direction of transcription of the 5S rRNA gene in *Armillaria*. *Mycol. Res.* 94:266 - 269.

Evans, H. C. 1978. Witches broom disease of cocoa

(*Crinipellis pernicioso*). *Ann. Appl. Biol.* 89:185 - 92.

Evans, H. C.; Holmes, K. A.; Phillips, W.; y Wilkinson, M. J. 2002. What is in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cacao. *Mycol.* 16(4):148 - 152.

Goodwin, D. C. y Lee, S. B. 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists, and animals for PCR. *Biotech.* 15:438 - 444.

Gramacho, K. P.; Risterucci, A. M.; Lanaud, C.; Lima, L. S. y Lopes, U. V. 2007. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Mol. Ecol. Notes* 7:153 - 155.

Griffith, G. W. y Hedger, J. N. 1994. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. *Heredity* 72:278 - 289.

Griffith, G. W.; Nicholson, J.; Nenninger, A.; Birch, N. R.; y Hedger, N. 2003. Witches brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *Nueva Zelandia. J. Botany* 41(3):423 - 435.

Hsiang, G. y Mahuku, S. 1999. Genetic variation within and between southern Ontario populations of *Sclerotinia homoeocarpa*. *Plant Pathol.* 48:83 - 94.

Kistler, H. C. y Miao, V. P. 1992. New modes of genetic change in filamentous fungi. *Ann. Rev. Phytopath.* 30:131 - 152.

Lana, T. G. 2004. Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso*. Tese Doutorado em Fitopatologia - Escola Superior de Agricultura, Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. São Paulo Brasil. p. 91.

Liu, K. y Muse, S. V. 2005. Power Marker: A integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21(9):2128 - 2129.

MADR (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural). 2004. Programa para el Desarrollo de la Amazonia. En: Proamazonia. Manual del Cultivo del Cacao. p. 132 - 139.

Miller, R.; Soares, A.; y Lopes, C. 1999. Molecular comparison of *Fusarium eumartii* populations causing wilt and dry rot of potato in Brazil. *Fitopatol. Brasil.* 24:149 - 155.

Mwenje, E.; Wingfield, B. D.; Coetzee, M. P.; Nemato, H.; y Wingfield, M. J. 2006. *Armillaria* species on tea in Kenya identified using isozyme and DNA sequence comparisons. *Plant Pathol.* 55:343 - 350.

Nei, M. L. 1983. Mathematical model for studying genetic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:5269 - 5273.

NIH (National Institute of Health). 2005. DNA preparation from blood. Maryland, US. (Disponible en: [http://www.riedlab.nci.nih.gov/publications/DNA%20Prep\\_Blood%20.pdf/12-01-2009](http://www.riedlab.nci.nih.gov/publications/DNA%20Prep_Blood%20.pdf/12-01-2009) [Fecha de revisión: septiembre 14 de 2008].

- Orozco, C. A.; Osorio, S. C.; Botero, M. J.; Rivera, P. F.; y López, G. G. 2011. Evaluación microbiológica y molecular de *Moniliophthora perniciosa*. Universidad de Caldas. Bol. Cient. 15(1).
- Purdy, L. H. y Schmidt, R. A. 1996. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Phytopathol.* 34:573 - 594.
- Resende, M. L.; Gutemberg, B. A.; Silva, L. H.; Niella, G. R.; Carvalho, G. A.; Santiago, D. V.; y Bezerra, J. L. 2000. *Crinipellis perniciosa* proveniente de um novo hospedeiro *Heteropterys acutifolia* é patogênico ao cacauero. *Fitopatol. Brasil.* 25(10):88 - 91.
- Rincones, J.; Mazotti, G. D.; y Griffith, G. W. 2006. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa* from various plant hosts in South America. *Mycol. Res.* 110:821 - 832.
- Rincones, J.; Meinhardt, L. W.; Vidal, B. C.; y Pereira, G. A. G. 2003. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycol. Res.* 107(4):452 - 458.
- Sanguinetti, C. J.; Dias, N.; y Simpson, A. J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separate on polycrylamide gels. *Biotechniques* 17:914 - 921.
- Sartorato, A.; Kátia, L.; Nechet, B.; y Halfeld, V. 2006. Diversidad e genética de aislados de *Rhizoctonia solani* coletados em feijão-caupi no Estado de Roraima. *Fitopat. Brasil.* 31:24 - 33.
- Silva, A. F.; Gonçalo A. G.; Jurema, R. Q.; y Pereira, P. A. 2007. Development of novel microsatellites from *Moniliophthora perniciosa*, causal agent of the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mol. Ecol. Res.* 8:783 - 785.
- Singer, R., 1942. Monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. *Lilloa Tucuman* 8:441 - 514.
- Sneath, P. H. y Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy. En: Freeman W. H. Co., San Francisco. p. 230 - 234.
- Stahel, G. 1915. *Marasmius pernicius*, the cause of the krulloten disease of cacao in Suriname. *Transl. AMW ter lag, Dep. Van den Landbouw, Suriname Bull.* p. 25.
- Vilgalys, R.; y Gonzalez, D. 1990. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Current Genet.* 18:277 - 280.
- White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. En: M. A. Innis, D. H. Gelgard, J. J. Sninsky y T. J. White (eds.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego. p. 315 - 322.
- Zolan, M. E. 1995. Chromosome - length polymorphism in fungi. *Microbiol. Rev.* 59:686 - 698.