



**Estudio de la respuesta de defensa
de la especie *Theobroma cacao* L. a
la infección de *Phytophthora
palmivora* (Butler).**

Leidy Paola Delgadillo Duran

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2018

Estudio de la respuesta de defensa de la especie *Theobroma cacao* L. a la infección de *Phytophthora palmivora* (Butler).

Leidy Paola Delgadillo Duran

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Genética y Fitomejoramiento

Directora:

Ph.D. Roxana Yockteng Benalcazar

Codirectora:

Ph.D. Esperanza Torres Rojas

Línea de Investigación:

Genética y Fitomejoramiento

Grupo de Investigación:

Genética Molecular Vegetal-Corpoica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2018

Dedico este trabajo a mis padres Marco y Yolanda, por ser mi guía y mi ejemplo, por enseñarme a ser una mujer fuerte honesta y trabajadora, por aguantarme y estar conmigo en todos los momentos de mi vida, por aconsejarme y alentarme cuando estuve a punto de desfallecer.

A mis hermanos Diego y Natalia por su confianza por estar conmigo y ayudarme en los momentos difíciles siempre seremos los cinco contra el mundo juntos somos más fuertes.

"El conocimiento hace sufrir y aquel que hace crecer su conocimiento hace crecer también su sufrimiento."

Umberto Eco

Agradecimientos

A Dios y la Virgen María por la vida y por ser mi guía en los momentos de dificultad.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria por la financiación de este proyecto través de su agenda quinquenal.

A la Doctora Roxana Yockteng, por permitirme hacer parte de este proyecto, por todas sus enseñanzas, dirección y apoyo cuando estuve a punto de desfallecer, por compartir conmigo su experiencia y amistad.

A la Doctora Carolina González, por todos sus consejos y su apoyo constante, por la paciencia y por brindarme su amistad.

A la Doctora Leonora Rodríguez y al Doctor Mauricio Soto-Suárez, por todos sus consejos por la paciencia en todos los ensayos de fitopatología y por en enseñarme sobre este mágico mundo y compartir su experiencia.

A Martha Carrero y Bayardo Parra por todos los momentos que compartimos durante los ensayos fitopatológicos, por aguantarme acompañarme y sobre todo por seguir todas mis locas ideas.

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, al personal docente y administrativo de la Facultad de Ciencias Agrarias.

A la Doctora Esperanza Torres Rojas, por la orientación, por su tiempo y sus enseñanzas en el desarrollo de esta tesis.

A los docentes Teresa Mosquera, Adriana González, Gustavo Ligarreto por compartir sus conocimientos y experiencias durante el desarrollo de mi Maestría.

A mis compañeros José Omar Ospina, Ivon Magaly Arcila, y Diego Chiguachí, por todos los momentos buenos, malos, de angustia y preocupación que pasamos por cada risa durante este proceso ustedes lo hicieron un poco más fácil, siempre agradecer todo su apoyo y confianza.

A mis grandes Amigos Andrea Niño, Tatiana Báez, Sebastián Pérez, gracias por estar siempre para mi sin importar las circunstancias por su apoyo cuando quise rendirme, los quiero y espero mantener su amistad por muchos años más.

A mis compañeros de trabajo Liliana García, Viviana Franco, Jaime Osorio, Jhon Berdugo, Linda Gómez, Y Geraldine Tibasosa por cada uno de los momentos que compartimos mientras trabajaba en la elaboración de este proyecto.

A todos aquellos que de una u otra forma tuvieron que ver con el desarrollo de esta investigación.

Resumen

El cacao colombiano es considerado de sabor fino y aroma, lo cual abre la posibilidad de llegar a mercados diferenciados. En Colombia, la producción de cacao se ve afectada por limitantes de tipo fitosanitario, como la mazorca negra del cacao, enfermedad causada por los patógenos del género *Phytophthora* spp. *Phytophthora palmivora* es la especie que tiene mayor presencia en el cultivo de cacao en el mundo, pero este patógeno ha sido poco estudiado en nuestro país. La búsqueda de plantas resistentes a la enfermedad y el conocimiento de los mecanismos de defensa constituyen un objetivo primordial de estudio para el mejoramiento genético de la especie. En este trabajo, se propuso estudiar la respuesta de defensa de plántulas de *Theobroma cacao* L. a la infección de *P. palmivora* usando herramientas fenotípicas y moleculares. Se estandarizó un nuevo protocolo para la infección de plántulas. Se confirmó que existe una respuesta diferencial a nivel fenotípico y molecular entre dos genotipos contrastantes SCA-6 (tolerante) y CCN-51 (susceptible). Se evidenció una activación diferencial de genes de las vías de señalización relacionadas con las fitohormonas ácido salicílico (SA), etileno (ET) y ácido jasmónico (JA), mediante la cuantificación de la expresión de genes usando RT-qPCR. La vía del ácido salicílico se encontró activa a las 48 horas post inoculación (hpi) en el genotipo susceptible CCN-51, mientras que las vías del JA y ET estuvieron activas en el genotipo tolerante SCA-6, a las 24 hpi. De esta manera, se observó que la respuesta en cacao de las vías del JA y ET son antagonistas a la vía del SA y que los genes relacionados en éstas se manifiestan en distintas etapas durante la infección del patógeno. La información generada constituye un insumo para el entendimiento de la interacción entre este patógeno y cacao, además provee insumos para la futura selección de plantas mejoradas con resistencia a la enfermedad.

Palabras clave: *Phytophthora palmivora*, *Theobroma cacao*, inoculación, genes de respuesta, fenotipo, expresión diferencial

Abstract

The Colombian cacao is considered of fine flavor and aroma, which opens the possibility of reaching specialized markets. In Colombia, cocoa production is affected by phytosanitary restrictions, such as the black pod, a disease caused by the species of the genus *Phytophthora* spp. *Phytophthora palmivora* is the most cosmopolitan pathogen in cocoa crops in the world, but it has been little studied in our country. The presence of black pod has affected drastically the cacao production in Colombia. It is essential to look for resistant or tolerant plants to this disease for the genetic breeding program. It is also necessary to carry out comparative studies on defense mechanisms that are activated in tolerant or resistant plants. We studied the defense response of *Theobroma cacao* L. seedlings to *P. palmivora* infection using phenotypic and molecular tools comparing two genotypes with contrasting response to the pathogen, CCN-51 (susceptible) and SCA-6 (tolerant). During this project, a new protocol for seedling infection was standardized. The results showed a differential response at the phenotypic and molecular level between the two contrasting genotypes. The activation of genes of the signaling pathways related to phytohormones between the two genotypes is contrasting. The salicylic acid pathway was activated in the susceptible genotype CCN-51 at 48 hours post-inoculation (hpi). In contrast, the jasmonic acid and ethylene pathways were activated at 24 hpi in the tolerant genotype, SCA-6. These results confirmed that these pathways have a response antagonist and synergistic and genes related to these pathways are manifested at different stages during the pathogen's infection. The results of this project are important to improve the knowledge of the relationship between *P. palmivora* and *T. cacao* as well as providing insights for the selection of improved plants with resistance to disease.

Keywords: *Phytophthora palmivora*, *Theobroma cacao*, inoculation, response genes, phenotype.

Contenido

Resumen.....	IX
Abstract.....	X
Introducción.....	1
Objetivos	4
Objetivo general.....	4
1. Método de evaluación del progreso de la enfermedad “mazorca negra” en plántulas de <i>Theobroma cacao</i> L.....	5
1.1 Resumen.....	5
1.2 Palabras clave.....	6
1.3 Introducción.....	6
1.4 Materiales y métodos	8
1.4.1 Material biológico y sitios de investigación.....	8
1.4.1.1 Material Vegetal.....	8
1.4.1.2 Material fúngico	8
1.4.1.3 Lugar de estudio.....	9
1.4.2 Pruebas de inoculación.....	9
1.4.2.1 Preparación de inóculos	9
1.4.2.2 Ensayos de inoculación usando medio sólido.....	9
1.4.2.3 Ensayos de inoculación usando medio líquido	10
1.4.2.4 Ensayos de inoculación usando discos de agar y medio agar-agua	10
1.4.3 Análisis fenotípico.....	11
1.4.3.1. Siembra de porta injertos e injertación de genotipos	11
1.4.3.2. Inoculación de plántulas	11
1.4.3.3. Procesamiento de imágenes y análisis de datos	11
1.5 Resultados y Discusión	12
1.5.1 Ensayos de inoculación	12
1.5.2 Protocolo para la inoculación del patógeno <i>Phytophthora palmivora</i> en plántulas de <i>Theobroma cacao</i> L.	15
1.5.3 Validación del protocolo.....	16
1.5.4 Análisis fenotípico en genotipos contrastantes	17
1.6 Conclusiones.....	20
1.7 Agradecimientos	20
1.8 Literatura citada	20

2.	Análisis molecular de una interacción compatible e incompatible entre <i>Theobroma cacao</i> y <i>Phytophthora palmivora</i>	25
2.1	Resumen	25
2.2	Palabras clave	26
2.3	Introducción	26
2.4	Materiales y métodos	28
2.4.1	Material biológico y sitios de investigación	28
2.4.1.1	Material vegetal	28
2.4.1.2	Material fúngico	28
2.4.1.3	Lugares de estudio	28
2.4.2	Siembra de porta injertos e injertación de genotipos	29
2.4.3	Inoculación de plántulas	29
2.4.4	Toma de muestras y extracción de ARN	29
2.4.5	Diseño de cebadores para RT-qPCR	30
2.4.6	Obtención de ADNc y amplificación de cebadores para RT-qPCR y qPCR... ..	30
2.5	Resultados y discusión	33
2.5.1	Extracción de ARN y obtención de ADNc	33
2.5.2	Amplificación de cebadores para RT-PCR y RT-qPCR.	34
2.5.3	Análisis de la respuesta de defensa.	35
2.5.3.1	Genes de respuesta a defensa relacionados con la vía del ácido salicílico. .	35
2.5.3.2	Genes de respuesta a defensa relacionados con las vías ácido jasmónico y el etileno.	40
2.6	Conclusiones	44
2.7	Agradecimientos	44
2.8	Literatura citada	45
3.	Conclusiones y recomendaciones	51
3.1	Conclusiones	51
3.2	Recomendaciones	51
	Bibliografía	69

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Plántula de cacao del genotipo moderadamente susceptible IMC-67, de tres meses, en donde la hoja del tercio medio de la planta fue infectada con <i>Phytophthora palmivora</i> usando discos de agar después de 96 horas pos-inoculación (phi). La flecha indica el área de la lesión	14
Figura 2. Plántula de cacao de tres meses del genotipo IMC-67, lesiones después de 48 horas de inoculación usando la metodología agar-agua.....	14
Figura 3. Plántulas de cacao infectadas con <i>Phytophthora palmivora</i> después de 96 hpi. A. Genotipo susceptible CCN-51. B. Genotipo tolerante SCA-6.....	17
Figura 4. Síntomas de la enfermedad en los genotipos susceptible CCN-51 y moderadamente tolerante SCA-6. A. Hojas de plántulas de cacao infectadas con <i>Phytophthora palmivora</i> de las 0 a las 96 hpi. Las flechas indican los primeros puntos de infección en el genotipo susceptible. B. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) en los dos genotipos. Se presenta la media \pm SD de tres réplicas biológicas, cada réplica tenía 12 plantas por genotipo. El asterisco (*) indica que los valores entre el genotipo susceptible y el genotipo tolerante son estadísticamente significativos ($P \leq 0,05$).	18
Figura 5. Visualización de ARN de cacao extraído a partir de hojas inoculadas con <i>P. palmivora</i> . Los carriles indican el tratamiento empleado en la extracción en el genotipo susceptible CCN-51 y en el genotipo tolerante SCA-6. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y cada muestra se tiñó con GelREAD.	34
Figura 6. Estandarización de las condiciones de la temperatura de “annealing” de cebadores usando RT-PCR en gradiente de temperatura. Los números indican la temperatura de “annealing” usada, 1=62°C; 2=61°C; 3=58,1°C; 4=58,1°C; 5=55,8°C; 6=53,9°C; 7=52,7°C; 8=52,0°C.....	35

Figura 7. Análisis de la expresión de genes de defensa dependientes de la ruta del ácido salicílico. La significancia estadística fue determinada por ANOVA (* $P \leq 0.05$). Los histogramas muestran la media \pm SD de 3 réplicas biológicas, cada una con 12 plantas por genotipo. **37**

Figura 8. Vías de señalización durante la respuesta de defensa en plantas. Se muestran los genes asociados a las tres principales fitohormonas SA, JA y ET que se activan en la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos. Los genes en azul representan aquellos que presentan mayor inducción en la planta susceptible, mientras que los genes en anaranjado representan los de mayor inducción en la planta tolerante. **39**

Figura 9. Análisis de la expresión de genes de defensa dependientes de las rutas del ácido jasmónico y el etileno. La significancia estadística fue determinada por ANOVA (* $P \leq 0.05$). Los histogramas muestran la media \pm SD de 3 réplicas biológicas, cada una con 12 plantas por genotipo. **42**

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Porcentaje de daño obtenido en las hojas durante el ensayo de inoculación de <i>P. palmivora</i> en <i>T. cacao</i> L bajo condiciones de vivero. El porcentaje de daño corresponde al AUDPC en donde la media \pm SD se toma a partir de tres réplicas biológicas, cada réplica tenía 12 plantas por genotipo.	19
Tabla 2. Secuencias de cebadores diseñados para el análisis de expresión	31

Lista de Anexos

	Pág.
Anexo A. Análisis de varianza fenotípico	53
Anexo B. Concentraciones de RNA obtenidas	54
Anexo C. Selección gen endógeno	58
Anexo D. Análisis de varianza genotípico	59

Introducción

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) despierta gran interés por las oportunidades de desarrollo que este cultivo ofrece en nuestro país. La calidad del cacao colombiano tiene el potencial de acceder a mercados internacionales diferenciales. En los últimos años, la demanda de este producto se ha incrementado paulatinamente debido a su alto valor por las características de sabor y aroma que presenta el fruto, además de su utilidad en la industria farmacéutica, cosmética, y alimenticia (Fedecacao, 2017). Sin embargo, la producción del cacao en Colombia se ve afectada por la presencia de enfermedades limitantes dentro de las que se destacan la moniliasis causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, y la mazorca negra del cacao, enfermedad causada por el patógeno *Phytophthora* spp. La mazorca negra es el factor más limitante en el cultivo de cacao en el mundo puesto que afecta los cultivos en regiones de África Occidental y Central que producen aproximadamente el 70 % del cacao mundial (Castellanos *et al.*, 2007). Este impacto negativo causa pérdidas mundiales cercanas al 30 % y muerte de un 10 % de los árboles (Rodríguez, 2015).

La mazorca negra ha venido afectando la producción de frutos y la generación de plántulas en vivero en zonas productoras de Colombia como el Tolima, Huila y Nariño de una forma más fuerte que otros patógenos (Rodríguez, 2015, 2017). Aunque se han reportado materiales tolerantes a este patógeno como SCA-6, ICS-1, (Iwaro *et al.*, 1997; Thai *et al.*, 2000; Cilas y Despréaux, 2004), estos no necesariamente presentan características de fruto y aroma deseables para el mercado, aunque como SCA-6 han sido usados como parentales buscando conferir esta resistencia a su progenie (Cilas y Despréaux, 2004; Bartley, 2005).

La búsqueda de plantas de cacao resistentes a cualquier patógeno, particularmente a aquellos poco estudiados como *Phytophthora* spp. constituye una fuente primaria importancia para el mejoramiento vegetal del cultivo puesto que de este proceso depende de la disponibilidad de una base genética amplia para la selección de materiales (Lobo,

2006). Las plantas se encuentran expuestas a agentes patogénicos y en general permanecen sanas debido a mecanismos de defensa. En plantas, la expresión de genes de defensa se activa tanto ante patógenos como ante estrés ambiental como son temperaturas extremas, luz UV y estrés hídrico (Jambunathan *et al.*, 2003). Estos genes se activan con el fin de detener, aminorar o contrarrestar el efecto de un estrés biótico o abiótico (Ordeñana, 2002). Esto sugiere que la respuesta a cualquier tipo de estrés en plantas comparte rutas o componentes de señalización (Jambunathan *et al.*, 2003, López, 2007).

Las plantas se defienden del ataque de patógenos mediante un sistema complejo que tiene diferentes niveles de defensa que actúan de forma sincronizada y casi simultáneamente han desarrollado mecanismos químicos y físicos que previenen el ataque y reducen la posibilidad de que se produzca infección (Morrissey *et al.*, 1999; Nimchuk *et al.*, 2003; Glazebrook, 2005; Laredo, 2017). Algunas defensas de las plantas son constitutivas, es decir que se producen constantemente, mientras que otras son provocadas por el estrés generado por los patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa químicos constitutivos, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. (Ordeñana, 2002; Wiermer *et al.*, 2005; Laredo, 2017). Los patógenos, a su vez, han perfeccionado mecanismos para sobrepasar estos sistemas de defensa; por lo cual se habla de una carrera evolutiva armamentista entre el patógeno y la planta (Mysore *et al.*, 2004; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005; Laredo, 2017).

Adicionalmente, en las plantas se producen otro tipo de mecanismos que inducen la defensa ante el ataque de patógenos, es un mecanismo activo de defensa, que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. (Collinge *et al.*, 1994). Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson, 1998). Se conocen tres etapas de reconocimiento dos involucradas en la planta y una que involucra el patógeno. Una vez que el patógeno penetra la planta, ya sea a través de aberturas naturales (estomas), o atravesando directamente la pared celular. Las plantas reconocen Patrones Moleculares Generales Asociados a los Patógenos (PAMPs) o Patrones Moleculares Generales

Asociados a los microorganismos (MAMPs), como la flagelina en las bacterias y la quitina en las paredes celulares de los hongos. Mediante las proteínas receptores moleculares (PRRs), generalmente situadas en la membrana plasmática de la célula vegetal, se dispara una inmunidad encendida por patrones moleculares (PTI) (Navarro et al, 2004; Chisholm et al, 2006; Schulze-Lefert y Panstruga, 2011; Thomma *et al.*, 2011; Monaghan y Zipfel, 2012). Una vez un patógeno logra superar las barreras mediadas por la respuesta PTI se genera una interacción compatible mediada por (ETS) o susceptibilidad encendida por efectores (Jones & Dangl, 2006), en donde la planta ha desarrollado un mecanismo de reconocimiento para estas proteínas efectoras, suprimiendo su efecto y generando una respuesta de inmunidad encendida por efectores (ETI), mediada por proteínas de resistencia (Jones & Dangl, 2006).

Además de todo este proceso de reconocimiento, durante este tipo de ataques son inducidas diferentes vías de señalización incluyendo una compleja red de señales hormonales que controlan la respuesta de defensa en la planta (Laredo, 2017). Existen tres fitohormonas involucradas en estos procesos que han sido ampliamente caracterizadas, los cuales juegan un papel muy importante y ampliamente descrito (Laredo, 2017). Una es la vía de señalización dependiente del ácido salicílico (SA) que permite la expresión de algunas proteínas relacionadas con patogenicidad (PR). Otra vía de defensa es controlada por el etileno (ET) y /o del ácido jasmonico (JA) (Glazebrook, 2005) que se encuentran asociadas a la expresión de otras proteínas PR3 y PR4 (Van Loon *et al.*, 2006). Las tres vías están relacionadas por varios tipos de interacciones positivas y negativas, pero la activación de estas respuestas es dependiente del organismo que las induce, sin embargo, pueden ser alteradas dependiendo del tipo de atacante manipulando así la defensa (Harrison, 2005, Mur *et al.*, 2006; Pieterse y Dick, 2007; Lopez, 2007).

Esta investigación tiene como objetivo contribuir a la caracterización de la respuesta de defensa de plántulas de *Theobroma cacao* L. de dos genotipos contrastantes a la infección a *Phytophthora palmivora*, tanto a nivel molecular como a nivel fenotípico. La información obtenida podría ser de utilidad para la selección de materiales de cacao con cierto grado de tolerancia a *Phytophthora* que puedan asistir en el programa de mejoramiento genético de cacao.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la respuesta de defensa de plántulas de *Theobroma cacao* L. de genotipos contrastantes a la infección de *Phytophthora palmivora*.

Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la resistencia de genotipos de *T. cacao* a la infección de *P. palmivora*, bajo condiciones de invernadero.
- ✓ Determinar la expresión diferencial de genes involucrados en la respuesta de defensa en genotipos contrastantes de *T. cacao* L. infectados con *P. palmivora*.

1. Método de evaluación del progreso de la enfermedad "mazorca negra" en plántulas de *Theobroma cacao* L.

1.1 Resumen

El género *Phytophthora* se ha caracterizado por tener especies que son patógenos de diversas plantas cultivadas. En el cultivo de cacao, la incidencia de la mazorca negra causada por diferentes especies de *Phytophthora*, como *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. hevea* y *P. megasperma*, ocasiona alrededor del 30% de pérdidas del grano a nivel mundial. *Phytophthora palmivora* es la especie más cosmopolita y se ha reportado en todos los países productores de cacao, siendo la principal limitación en la producción de plántulas en todas las zonas de alta precipitación además de incidir directamente en la producción y la calidad de las almendras. Actualmente, la evaluación de la resistencia *in vitro* y en campo se realiza principalmente observando los niveles de infección producidos por el patógeno después de realizar una inoculación artificial a mazorcas desprendidas o en el árbol con o sin heridas y partes de hojas desprendidas. Sin embargo, los métodos desarrollados continúan produciendo resultados inconsistentes. Este proyecto tuvo como objetivo evaluar la resistencia de plántulas de genotipos de *T. cacao* reportados como contrastantes CCN-51 (susceptible) y SCA-6 (tolerante) a la infección de *P. palmivora*. Para ello, se probaron diferentes metodologías de inoculación usando diferentes genotipos de cacao a la edad de tres y cinco meses de acuerdo a lo reportado en literatura. Sin embargo, ninguna fue efectiva por lo cual se desarrolló un protocolo de inoculación de *P. palmivora* en plántulas de *Theobroma cacao*, rápido, sencillo y reproducible en vivero usando un medio agar-agua para mantener el inóculo viable. Se

confirmó que los genotipos CCN-51 y SCA-6 son contrastantes a la infección del patógeno al presentar una respuesta diferencial significativa, la cual fue cuantificada desde las 0 hasta las 96 horas después de la inoculación utilizando imágenes procesadas digitalmente usando el programa CompuEye. Con los resultados obtenidos se ofrece una alternativa para seleccionar plantas de cacao tolerantes a la mazorca negra en vivero que faciliten los programas de mejoramiento genético del cultivo.

1.2 Palabras clave

Phytophthora palmivora, digitalización de imágenes, métodos de inoculación, AUDPC.

1.3 Introducción

Phytophthora (de Bary 1876) abarca un gran género de la clase Oomycetes que contiene 80 especies (Rodríguez, 2015) y es reconocido por atacar diferentes especies de plantas cultivadas (Gunderson *et al.*, 1987, Thines 2014). Este género se define por presentar varias características bioquímicas y estructurales que lo asemejan a las plantas y algas como la morfología de las crestas mitocondriales, la bioquímica de las paredes celulares compuesta de β -1,3 y β -1,6 glucanos y no de quitina, y la síntesis de lisina por la vía del ácido diaminopimélico (Rodríguez, 2012; Rodríguez, 2015). En cacao, la incidencia y la severidad de la enfermedad causada por *Phytophthora* spp. varían de un sitio a otro y dependen de las condiciones climáticas (Akrofi *et al.*, 1997; Dakwa, 1988; Akrofi *et al.*, 2002). Se estima que las pérdidas anuales por mazorca negra, como se llama a la enfermedad producida por *Phytophthora* spp., son alrededor del 30% de la producción del cultivo (Drenth y Guest, 2013), lo que se traduce en aproximadamente 3.800 millones de dólares para los productores de todo el mundo (Bailey y Meinhardt, 2016). En algunos casos cuando las condiciones son adecuadas para el patógeno, las plantaciones de cacao pueden ser devastadas (Cilas y Desprésaux, 2004).

Aunque algunas especies de *Phytophthora* spp. son infecciosas en el cacao, sólo unas pocas se consideran realmente importantes por el daño que causan. La enfermedad

mazorca negra del cacao es causada por cinco especies del género *Phytophthora* spp., *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora* y *P. capsici/P.tropicalis* (Wood y Lass, 1985 citado por Bailey & Meinhardt, 2016). *Phytophthora palmivora* es mundialmente importante porque además del cacao infecta más de 200 plantas incluyendo papa, coco, piña, caucho, cítricos, papaya y palma de aceite (Derevnina *et al.*, 2016). Adicionalmente, es la especie más cosmopolita presente en todos los países productores de cacao y se encuentra entre los patógenos más destructivos del cultivo (Zentmyer, 1981, Rodríguez, 2015). La descomposición causada por *P. palmivora* es la principal limitación en la producción de plántulas en todas las zonas cálidas de alta precipitación (Peter y Chandra Mohanan, 2011, Stamps, 2010, Ramirez, 2016), además de incidir directamente en la producción y la calidad de las almendras de cacao (ACIAR, 2013).

La resistencia genética a patógenos es una vía prometedora para combatir la enfermedad, puesto que es un método de control efectivo (Rocha, 1972, Amponsah, 1972, Thai *et al.*, 2000). En la actualidad es posible medir ciertos fenotipos cualitativa y cuantitativamente utilizando métodos tradicionales y más recientemente tecnologías de alto rendimiento, haciendo uso imágenes hiperespectrales no invasivas, robótica, o teledetección, entre otros, en laboratorio, invernadero o campo (Breccia *et al.*, 2014). Sin embargo, los protocolos actuales para la evaluación de la resistencia a *P. palmivora* en campo e *in vitro* se caracterizan principalmente por la observación de los niveles de infección y la inoculación artificial de hojas desprendidas de las plantas (Nyassé, 1995; Cilas y Despréaux, 2004; Herail, & Blaha, 1995; Tahi *et al.*, 2006). La inoculación puede hacerse utilizando fragmentos de tejido infectado, discos de agar o suspensiones de micelio (Turner 1963; Rocha y Mariano 1969; Lellis y Peixoto Filho 1960; Bailey & Meinhardt, 2016). Sin embargo, los métodos para evaluar la enfermedad no siempre producen resultados consistentes en la medición del grado de resistencia observado en los genotipos de cacao (Iwaro 1998; Thevenin *et al.*, 2006). Además, este tipo de evaluación no permite diferenciar la respuesta de la planta a la infección por el patógeno de la respuesta al estrés por el daño causado por el corte. Por lo tanto, es necesario desarrollar métodos de inoculación temprana, que produzcan resultados consistentes (Eskes, 2001) y que permitan identificar diferentes niveles de resistencia de accesiones de colecciones de germoplasma tanto para poblaciones clonales como segregantes (Bailey y Meinhardt, 2016). De acuerdo con lo anterior, el objetivo de la primera parte de este proyecto fue estandarizar un protocolo de inoculación eficiente y consistente de *P. palmivora* (Butler) en plántulas de *T. cacao* L. que

permita evaluar la tolerancia de genotipos de cacao a la infección de dicho patógeno bajo condiciones de invernadero.

1.4 Materiales y métodos

1.4.1 Material biológico y sitios de investigación

1.4.1.1 Material Vegetal

Se utilizaron dos genotipos de *T. cacao* L., el genotipo CCN-51 reportado como susceptible a *Phytophthora* spp. y usado en estudios previos (Rodríguez, 2015) y el genotipo SCA-6 reportado como tolerante a *Phytophthora* spp. (Iwaro *et al.*, 1997), provenientes del Banco de Germoplasma de la Nación manejado por CORPOICA en el Centro de investigación La Suiza (Santander). Las plántulas de estos genotipos se injertaron sobre plantas provenientes de semilla de tres meses de edad del genotipo IMC-67 el porta-injertos más utilizado comercialmente el cual es moderadamente susceptible a *Phytophthora* spp. (Rodríguez 2015) y moderadamente resistente a *M. royeri* (Arciniegas 2005). Los primeros ensayos de inoculación se hicieron utilizando los genotipos susceptibles CCN-51, TSH-565, ICS-95 además del moderadamente susceptible IMC-67 debido a la poca disponibilidad de material de los genotipos a estudiar, CCN-51 y SCA-6. Una vez, la infección fue reproducible en uno de estos genotipos, se montó el ensayo con los dos genotipos contrastantes, SCA-6 y CCN-51, para validar el protocolo y hacer el análisis fenotípico.

1.4.1.2 Material fúngico

Para este experimento se utilizó la cepa de *P. palmivora* Tocha-325 aislada en el municipio de Chaparral en el departamento del Tolima de un fruto de cacao del material Pound 7, que ha sido reportado como material tolerante a *Phytophthora* spp. (Arciniegas 2005). Esta cepa fue descrita como la más virulenta según experimentos previos realizados en mazorcas de cacao de distintos genotipos en el Centro de Investigación Nataima (Rodríguez, 2017). Se clasificó como perteneciente a la especie *P. palmivora* según análisis morfológicos y moleculares (Rodríguez, 2017). Esta cepa fue conservada en medio agar V8 y posteriormente en medio agar-zanahoria del cual se hicieron diluciones a diferentes concentraciones.

1.4.1.3 Lugar de estudio

Este trabajo se realizó en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, en los invernaderos y el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Nataima (Km 19 vía Espinal- Chicoral, Tolima).

1.4.2 Pruebas de inoculación

1.4.2.1 Preparación de inóculos

Los inóculos se prepararon a partir de colonias del hongo reactivadas en mazorcas de cacao del genotipo susceptible CCN-51. Posteriormente, estas colonias seleccionadas crecieron en platos Petri y tubos de ensayo sobre medios sólidos agar-V8-CaCo₃ (18:200:3 gr), agar-zanahoria (18:100 gr) y medio líquido Caldo V8 +1ml de nitrato de potasio 0.1M por un lapso de 15 a 17 días en incubación a 25°C. Las suspensiones de zoosporas a partir de los medios sólidos se prepararon siguiendo la metodología de Lawrence (1978) modificada por Phillips y Galindo (1989). A cada plato de Petri se le adicionaron 15ml de agua destilada fría, con la ayuda de un pincel para homogenizar la solución. Los platos fueron conservados durante 30 minutos en una cámara oscura a 4°C y luego se mantuvieron en incubación a 25°C por un lapso igual de tiempo con el fin de inducir la liberación de las zoosporas.

Una vez obtenida la solución de zoosporas de los medios, éstas fueron contadas en cámara de Neubauer y llevadas a distintas concentraciones 3×10^5 , 3×10^6 , 3×10^8 , 5×10^5 , 6×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/ml para cada uno de los ensayos.

1.4.2.2 Ensayos de inoculación usando medio sólido

Los ensayos de inoculación se realizaron bajo invernadero a una temperatura entre 30 a 32°C utilizando una suspensión de zoosporas del patógeno crecido en medio V8 durante 15 días. Inicialmente se inocularon plántulas sin injertar de cinco meses de los genotipos TSH-565 (18 plántulas), ICS-95 (20 plántulas), y de tres meses de germinación de los genotipos IMC-67 (16 plántulas) y CCN-51 (16 plántulas). Se evaluaron dos métodos de inoculación, por aspersión y directamente al suelo y dos concentraciones diferentes de inóculo, 3×10^5 UFC/ml y 6×10^5 UFC/ml, para un total de cuatro tratamientos en un diseño imbalanceado debido al número de plántulas. Finalmente, se inocularon cuatro plántulas

con agua, una por tratamiento como control negativo. Las plántulas inoculadas por aspersión se envolvieron con una bolsa plástica para generar una cámara húmeda durante 18 horas.

1.4.2.3 Ensayos de inoculación usando medio líquido

El patógeno producido en medio líquido fue inoculado en 22 plántulas de tres meses de siembra del genotipo IMC-67. Se usaron dos metodologías de inoculación (directamente al suelo y por aspersión) y dos concentraciones diferentes, 3×10^5 y 3×10^6 UFC/ ml. Para cada ensayo de inoculación realizado directamente al suelo se usaron seis plántulas, mientras que para las inoculaciones por aspersión se usaron cinco plántulas por tratamiento. Adicionalmente, se inoculó una plántula con agua destilada estéril como control absoluto. Las plántulas que se inocularon por aspersión se mantuvieron en cámara húmeda en bolsa de plástico durante 24 horas.

1.4.2.4 Ensayos de inoculación usando discos de agar y medio agar-agua

Se tomaron discos de agar de 5 mm aproximadamente de inóculo crecido en medio agar - zanahoria durante 15 días a una concentración de zoosporas de 5×10^5 UFC/ml. Se colocaron los discos en el envés de cuatro hojas en diferentes estados de desarrollo de seis plantas de tres meses de edad del genotipo IMC-67. Las plantas fueron puestas en cámara húmeda durante 48 horas.

Adicionalmente, se utilizó un medio de agar-agua al 0.4% con una concentración del inóculo de 1×10^7 y 1×10^8 UFC/ ml. A cada caja Petri que contenía el agar-agua se le agregó 1 ml de la solución de inóculo ajustada y se homogenizó. Con la ayuda de un hisopo estéril se colocaron puntos de infección en el envés de todas las hojas de seis plantas de tres meses del genotipo IMC-67. Una vez inoculadas las plantas fueron puestas en cámara húmeda durante 48 horas. Adicionalmente, se inoculó una planta usando agar-agua sin inóculo como control.

1.4.3 Análisis fenotípico

1.4.3.1. Siembra de porta injertos e injertación de genotipos

Los porta injertos fueron sembrados a partir de semilla del genotipo IMC-67. El suelo fue esterilizado una sola vez a 120 libras de presión por 30 minutos con el fin de eliminar la flora microbiana presente en el sustrato antes de la siembra. Las plantas fueron fertilizadas usando 2 gr de fosfato diamónico (DAP) dos meses después de la germinación y 30 días después de la injertación. Cuando las plántulas alcanzaron tres meses de siembra o aproximadamente el diámetro de un “lápiz”, fueron injertadas usando los genotipos CCN-51 y SCA-6. A los 16 días, se verificó el porcentaje de prendimiento.

1.4.3.2. Inoculación de plántulas

Para la evaluación del fenotipo de resistencia, un total de 20 plántulas por réplica del genotipo susceptible y 20 plántulas del genotipo tolerante fueron inoculadas con un punto de infección en todas las hojas, siguiendo el protocolo estandarizado. Se realizaron tres réplicas biológicas y se fotografiaron las plántulas a las 0h, 24h, 48h y 96h después de la infección para hacer el seguimiento de la enfermedad.

1.4.3.3. Procesamiento de imágenes y análisis de datos

Las imágenes fueron capturadas mediante el uso de una cámara Canon sx500 con una resolución de 3000 x 4000 píxeles en el laboratorio de Fitopatología del CI Nataima a la misma hora (2 pm) con luz constante para capturar el progreso de la enfermedad. Se cortaron todas las hojas de tres plantas por cada tiempo, éstas fueron alineadas de la más joven a la más vieja, las dos plantas restantes se mantuvieron como control de inoculación para verificar que realmente se estuviera presentado la enfermedad y descartar falsos positivos.

El procesamiento de imágenes se realizó utilizando el software Compu Eye LSA (Bakr, 2005). Se seleccionó el primer plano que correspondía a la hoja el cual se separó del fondo de la imagen. Esto permitió clasificar los píxeles por conjuntos de intensidades de color que correspondían al primer plano (objetivo) y al fondo (no objetivo). El progreso de la enfermedad se midió teniendo en cuenta el cambio de color presente en las hojas y estableciendo el porcentaje del área afectada, sin embargo, no se siguió ninguna escala

para evaluar el progreso de la enfermedad debido a que no existe reportada una escala para el estado de plántulas de cacao.

También, se evaluó la variable de severidad de la enfermedad, calculando el porcentaje de daño en cada plántula AUDPC (*Area Under the Disease Progress Curve*), mediante la fórmula descrita por Shaner y Finney (1977). Una prueba ANOVA se utilizó para evaluar las diferencias de la respuesta fenotípica entre los dos genotipos contrastantes. Adicionalmente, se realizó una prueba de Tukey usando el programa Infostat (2017) para asegurar la significancia estadística y determinar las diferencias entre medias de los tratamientos realizados.

1.5 Resultados y Discusión

En esta investigación se desarrolló un protocolo para ofrecer una alternativa eficiente de inoculación que pueda ser utilizada para evaluar a nivel genético la respuesta de *T. cacao* a la infección de *P. palmivora*.

1.5.1 Ensayos de inoculación

Para lograr una infección eficiente de *P. palmivora* en plántulas de *T. cacao* se probaron varios protocolos de inoculación, en los que se incluyeron métodos tradicionales para infectar órganos desprendidos en cacao y otros protocolos probados en plantas de otras especies como la inoculación directa de la solución de zoosporas al suelo, la inoculación por aspersión al área foliar y la inoculación usando discos de agar directamente en las hojas (Lellis y Peixoto Filho 1960; Turner ,1963; Rocha y Mariano ,1969). Sin embargo, ninguno de los métodos tradicionales fue efectivo en este patosistema.

El primer protocolo probado consistió en la inoculación de plántulas de tres y cinco meses de germinación de los genotipos TSH-565, ICS-95, CCN-51y IMC-67 con los tratamientos presentados anteriormente, los resultados encontrados muestran que ninguna de estas metodologías es eficiente en plántulas de cacao. Después de diez días, ninguna de las plántulas inoculadas a partir del inóculo crecido en medio sólido (agar V8) mostró síntomas, indicando que las inoculaciones por aspersión y por aplicación al suelo no fueron efectivas. Esto contrasta con lo reportado tracionalmente en donde este patosistema se evalúa usando discos de hojas y mazorcas desprendidas y la necrosis comienza a observarse en

etapas tempranas, a los 3 a 5 días después de la inoculación (Nyassé *et al.*, 1995, Rodríguez, 2015). En todo caso, las plántulas se evaluaron por más de un mes para descartar la aparición de síntomas tardíos. Al cabo de 45 días de la inoculación, tres de las plántulas de tres meses de germinación del genotipo IMC-67, inoculadas por aspersión usando concentración 3×10^5 UFC/ml y una plántula del genotipo CCN-51 inoculada por aspersión usando concentración 6×10^5 mostraron síntomas de infección. La aparición de síntomas tardíos se puede atribuir a la poca disponibilidad de humedad en el medio, probablemente por haber utilizado poca solución de aspersión para cada planta y además del retiro de la cámara húmeda a las 18 horas. Las zoosporas móviles probablemente se deshidrataron puesto que necesitan una humedad relativa superior al 95% y temperaturas entre 18 y 20°C (Enríquez y Salazar, 1987, Rodríguez, 2015) para subsistir en el medio y lograr la infección.

Adicionalmente, en las inoculaciones realizadas directamente al suelo muy probablemente la cantidad de solución no fue suficiente para que la planta pudiera absorberla por la raíz. Podría también deberse a una quimiotaxis deficiente en la cual no hay enquistamiento de la zoospora, no hay adhesión a la superficie vegetal y por lo tanto no hay formación del tubo germinativo (Alvedro, 2015). Las zoosporas de patógenos como *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp se liberan al medio en condiciones de lluvia o eventos de riego, desplazándose por quimiotaxis hacia la planta y siguiendo un geotropismo negativo (Hardham, 1992; Lamour *et al.*, 2012; Alvedro, 2015). En el caso de cacao, la mazorca negra en condiciones naturales se propaga principalmente en los frutos y tallos por la diseminación de zoosporas mediadas por las condiciones ambientales y es poco común encontrar raíces infectadas (Rodríguez, 2012; Rodríguez 2015; Cilas y Despréaux 2004).

El tratamiento utilizando el medio líquido (V8 +CaCo3) tampoco fue exitoso. Las plántulas inoculadas no mostraron síntomas en dos meses en ninguno de los tratamientos, por lo que se concluyó que el medio líquido no es eficiente para el desarrollo del patógeno ya que posiblemente, la presión de inóculo usando esta metodología en el suelo no fue suficiente para lograr la infección. En cuanto a la inoculación por aspersión probablemente el medio se secó antes de que las zoosporas se enquisten y germinen en las hojas.

En el protocolo de infección utilizando discos de agar, se evidenció puntos de lesión luego de 24 horas después de la inoculación en el sitio donde se agregó el agar (Figura 1). Sin

embargo, las lesiones no progresaron y se mantuvieron localizadas en el sitio de la lesión inicial después de 96 horas.



Figura 1. Plántula de cacao del genotipo moderadamente susceptible IMC-67, de tres meses, en donde la hoja del tercio medio de la planta fue infectada con *Phytophthora palmivora* usando discos de agar después de 96 horas pos-inoculación (phi). La flecha indica el área de la lesión.

Al no obtener resultados satisfactorios en el ensayo anterior inoculando con discos de agar, se procedió a repetir el ensayo, cambiando el sustrato del patógeno usando un medio de agar-agua sin ningún nutriente adicional como sustrato para mantener la suspensión de zoosporas. Este protocolo fue eficiente pues la totalidad de las plántulas infectadas del genotipo IMC-67 de tres meses de germinación, mostraron lesiones necróticas de color café y clorosis a las 48 horas después de la inoculación (Figura 2). Estos síntomas son los esperados en una infección por *Phytophthora* spp. en comparación con el control negativo en el que sólo se inoculó agar-agua en el cual no se presentaron síntomas (datos no mostrados).



Figura 2. Plántula de cacao de tres meses del genotipo IMC-67, lesiones después de 48 horas de inoculación usando la metodología agar-agua.

La mazorca negra se desarrolla principalmente bajo condiciones de alta humedad (Drenth y Guest, 2004). Se presenta generalmente en donde se acumula más agua en la planta o en frutos maduros puesto que las zoosporas nadan y son atraídas quimiotáctica y

electrotácticamente hacia sitios donde la infección puede progresar (Drenth y Guest, 2004). El agar-agua provee al patógeno un medio húmedo para mantenerse viable por más tiempo. En este medio, las zoosporas pueden desplazarse más fácilmente y permanecer vivas hasta lograr la infección para así reproducirse. Las zoosporas de algunas especies de *Phytophthora* necesitan entre 20 y 30 minutos de agua libre sobre la superficie de la planta para poder enquistarse y germinar (Drenth y Guest, 2004).

1.5.2 Protocolo para la inoculación del patógeno *Phytophthora palmivora* en plántulas de *Theobroma cacao* L.

Consideraciones previas

Antes de la inoculación del patógeno *P. palmivora*, se debe garantizar la viabilidad de la cepa por lo cual se debe realizar una reactivación de ésta. Un disco de micelio debe ser puesto sobre la superficie de una mazorca previamente desinfectada del genotipo CCN-51 o en un genotipo susceptible. La mazorca debe envolverse en bolsas plásticas para lograr una cámara húmeda y al cabo de 3 ó 4 días el hongo debe ser re aislado en medio agar-zanahoria hasta obtener un cultivo puro.

Otra consideración a tener en cuenta es que las plántulas a utilizar no deben ser mayores a los tres meses después de la injertación. En caso contrario, no se puede garantizar una infección exitosa.

Descripción del protocolo

1. Deje crecer las colonias del Oomycete *Phytophthora palmivora* en platos Petri con medio de cultivo agar-zanahoria (18:100 gr) durante 15 a 17 días en incubación a 25°C.
2. Una vez la cepa del patógeno alcance la edad indicada, se realiza un choque térmico a cada caja Petri para liberar las zoosporas siguiendo la metodología de Lawrence (1978) modificada por Phillips y Galindo (1989).
3. Adicione a cada plato de Petri 15 ml de agua destilada fría (+/- 4 °C), con la ayuda de un pincel para homogenizar la solución.
4. Conserve los platos durante 30 minutos en una cámara oscura a 4°C y manténgalos en incubación a 25°C por 30 minutos.

5. Ajuste la concentración de zoosporas a 1×10^7 UFC/ml haciendo un conteo en cámara de Neubauer en microscopio
6. Prepare previamente cajas de Petri de 7 ml con agar-agua a una concentración de 0.4%.
7. Adicione a cada caja Petri con Agar-agua, 1 ml de inóculo preparado en el punto 5 usando una micropipeta. Homogenice la mezcla con la ayuda de un hisopo estéril y proceda inmediatamente al punto 8.
8. Con un nuevo hisopo estéril tome aproximadamente 1 cm^3 de la mezcla anterior (gel) y colóquelo en un punto del envés en el tercio medio de las hojas que corresponde al tercio medio de la planta. Cambie de hisopo entre planta.
9. En la base del tallo, ponga toallas de papel húmedas para mantener la humedad relativa y garantizar la infección.
10. Finalmente envuelva la planta en una bolsa plástica transparente, para mantener la humedad y garantizar la infección.

Dependiendo del genotipo, los primeros síntomas de infección pueden aparecer en diferentes tiempos. Según nuestros resultados, los primeros síntomas se hacen visibles a partir de las 24 horas después de la inoculación. Se observa entonces la presencia de pequeños puntos necróticos de 1mm o menos de espesor distribuidos en la zona infectada. A medida que aumente el tiempo después de la inoculación, las lesiones necróticas y la clorosis se hacen más evidentes.

1.5.3 Validación del protocolo

Se realizó la validación del protocolo usando plántulas de los genotipos de cacao CCN-51 (susceptible) y SCA-6 (tolerante). Se realizó seguimiento hasta las 96 horas después de la infección (Figura 3). La totalidad de las plantas infectadas mostraron síntomas, aunque había un diferente grado de respuesta a la infección entre genotipos susceptibles y tolerantes, indicando que el protocolo estandarizado es eficiente.

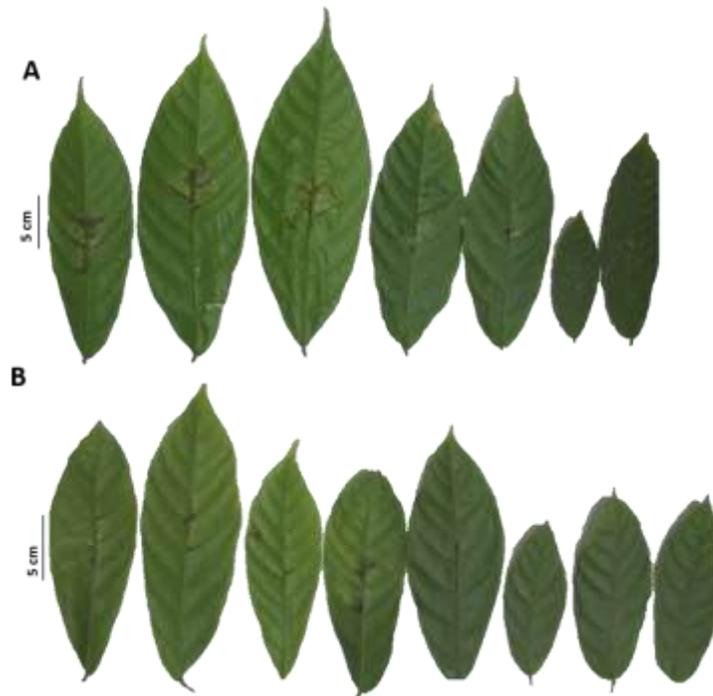


Figura 3. Plántulas de cacao infectadas con *Phytophthora palmivora* después de 96 hpi. **A.** Genotipo susceptible CCN-51. **B.** Genotipo tolerante SCA-6

1.5.4 Análisis fenotípico en genotipos contrastantes

Los primeros síntomas de lesión aparecieron a las 24 hpi en la planta susceptible CCN-51 (Figura 4). Se observaron pequeños puntos necróticos en la planta CCN-51 mientras que la planta tolerante SCA-6 no presentaba síntomas. A partir de las 48 hpi, el área de la lesión aumentó considerablemente en los dos genotipos hasta las 96 horas. Sin embargo, el mayor porcentaje de lesión se observó en la planta susceptible. La diferencia fue significativa de acuerdo con el análisis de varianza ($P \leq 0,05$) (Anexo A). La variación en la aparición de síntomas en SCA-6 concuerda con lo reportado por Thevenin *et al.*, (2012). En este estudio, se usaron discos de hojas de 186 genotipos de Guyana Francesa y de SCA-6 como control de resistencia y se identificaron varios genotipos con diferente grado de respuesta a la enfermedad (Thevenin *et al.*, 2012). El genotipo SCA-6 siempre se presentó como tolerante. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otras investigaciones en donde el valor del grado de respuesta de tolerancia de este genotipo cambia dependiendo de las condiciones experimentales y de la cepa de *P. palmivora* utilizada (Thevenin *et al.*, 2012).

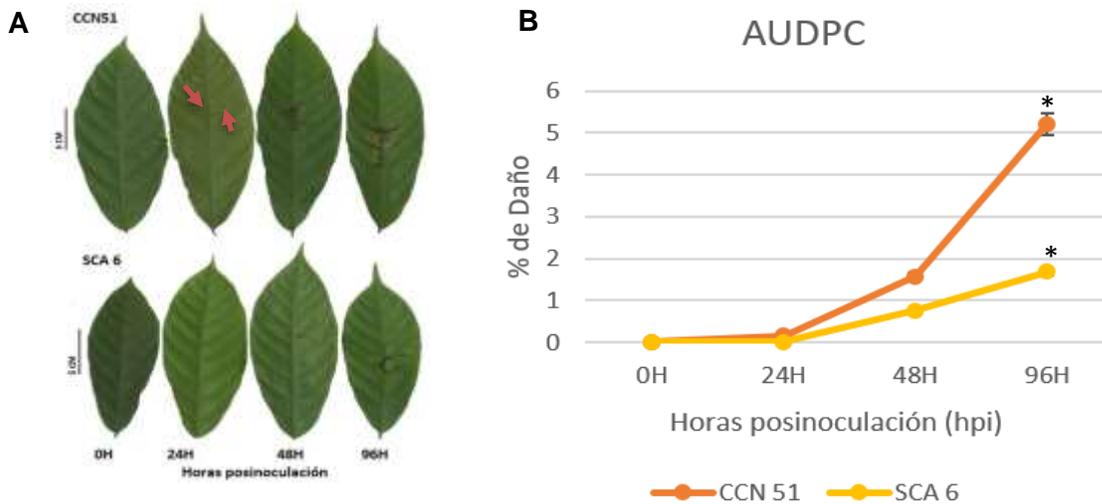


Figura 4. Síntomas de la enfermedad en los genotipos susceptible CCN-51 y moderadamente tolerante SCA-6. **A.** Hojas de plántulas de cacao infectadas con *Phytophthora palmivora* de las 0 a las 96 hpi. Las flechas indican los primeros puntos de infección en el genotipo susceptible. **B.** Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) en los dos genotipos. Se presenta la media \pm SD de tres réplicas biológicas, cada réplica tenía 12 plantas por genotipo. El asterisco (*) indica que los valores entre el genotipo susceptible y el genotipo tolerante son estadísticamente significativos ($P \leq 0,05$).

El promedio del porcentaje de la lesión a las 96 hpi en la planta susceptible fue de 5.2% el cual fue significativamente mayor que el de la planta tolerante con un porcentaje promedio de lesión del 1.67%. Este comportamiento podría explicarse por el tipo de la resistencia a *P. palmivora* que ocurre en dos etapas. En el estudio de Iwaro *et al.* (1997) donde se inocularon frutos y hojas desprendidas de varios genotipos con respuesta contrastante, se identificó que en una primera etapa el patógeno penetra y esto se manifiesta por el número de lesiones. En la segunda etapa, ocurre la pospenetración, lo que se manifiesta por el tamaño y el número de lesiones (Iwaro *et al.*, 1995; 1997; Nyassé *et al.*, 1995). El nivel de respuesta de defensa de cada genotipo se ha asociado al número y tamaño de estomas presentes en estos.

Tabla 1. Porcentaje de daño obtenido en las hojas durante el ensayo de inoculación de *P. palmivora* en *T. cacao* L bajo condiciones de vivero. El porcentaje de daño corresponde al AUDPC en donde la media \pm SD se toma a partir de tres réplicas biológicas, cada réplica tenía 12 plantas por genotipo.

	CCN-51		SCA-6	
	Promedio (%)	SD	Promedio (%)	SD
0H	0	0	0	0
24H	0,15	0,09	0,01	0,02
48H	1,57	0,72	0,76	0,30
96H	5,21	1,6	1,68	0,42

Este tipo de diferenciación ha sido confirmada por numerosos estudios en donde la respuesta de defensa es dependiente del genotipo y no del método de inoculación ni del órgano de la planta analizado (Iwaro, 1995, 1997 y 1998; Nyassé *et al.*, 1995). La respuesta de *T. cacao* a *P. palmivora* podría estar basada en resistencia constitutiva del huésped (Thevenin *et al.*, 2012, Cilas, 2006, Purwantara *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de estudios para verificarlo como evaluar la hidrofobicidad de la cutícula, cantidad de estomas, saponinas, producción de calosa, entre otros. Así como evaluar un pool mayor de genotipos con diferente grado de respuesta a la enfermedad.

En cuanto al análisis del progreso de la enfermedad, hasta el momento no se han registrado escalas en plántulas de cacao. Actualmente, la categorización es visual y es realizada usando discos de hojas y mazorcas desprendidas (Nyassé *et al.*, 1995). Por ende, no es posible comparar el método desarrollados en este estudio con los métodos utilizados tradicionalmente. Sin embargo, los resultados obtenidos podrían asociar a la escala descrita por Nyassé *et al.*, (1995), en donde 0 = asintomático, 1 = puntos de penetración localizados muy pequeños, 2 = puntos de penetración pequeños formando una red 3 = lesiones coalescentes de tamaño intermedio, 4 = grandes parches marrones coalescentes y 5 = lesiones grande y uniformes de color marrón oscuro. De acuerdo con lo anterior las lesiones descritas en este estudio en la planta susceptible CCN-51 a las 24 hpi podrían corresponder a la etapa 1 de la infección mientras que las lesiones observadas en las 96 hpi podrían encontrarse desde la etapa 4 hasta las 5. En la planta tolerante SCA-6, la etapa 2 se presentaría a las 48 hpi y la etapa 3 a las 96 hpi (Figura 4). Para futuros

análisis es necesario estandarizar una escala en plántula que permita evaluar el progreso de la enfermedad.

1.6 Conclusiones

En esta primera parte del estudio, se logró estandarizar un protocolo de inoculación de *P. palmivora* en plántulas de *T. cacao*. Se mostró que el protocolo es sencillo, eficiente y reproducible en genotipos con diferente grado de respuesta a la infección del patógeno. El medio de suspensión agar-agua permite mayor humedad en las zoosporas asegurando la penetración del patógeno a la planta. El análisis fenotípico del progreso de la enfermedad confirmó que existe una respuesta diferencial entre la planta susceptible y la planta tolerante.

1.7 Agradecimientos

Se agradece, a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria por la financiación de este proyecto, a la Doctora Eleonora Rodríguez y al Doctor Mauricio Soto-Suárez por su asesoría durante los ensayos fitopatológicos, a los profesionales Martha Carrero Edison Bayardo Parra por su ayuda con la preparación de medios de cultivo, manejo de cepas y durante los montajes experimentales, así como al técnico Jesús Guzmán por el manejo de las plántulas en invernadero.

1.8 Literatura citada

ACIAR Annual Report 2013-14. Disponible en: <http://aciar.gov.au/publication/ar2013-14>

Alvedro, M. (2015). Caracterización de la respuesta de inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* Leon. en judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) por un cultivo esterilizado de Fo47. Tesis de maestría. Universidad de Coruña.

Amponsah, J. D., & Asare-Nyako, A. (1972). Laboratory method for screening cocoa seedlings for black pod resistance. Report Cocoa Research Institute of Ghana, 1969-70, pp. 155–158.

Akrofi, A. Y. (1997). *Phytophthora megakarya*: a review on its status as a pathogen on cacao in west africa. African Crop Science Journal, 23(1), 67–87.

Akrofi, A. Y., Appiah, A. A., & Opoku, I. Y. (2003). Management of *Phytophthora* pod rot disease on cocoa farms in Ghana. Crop Protection. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00193-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00193-X).

Bakr, E. M. (2005) A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. Journal of Applied Entomology 129 (3), 173-175.

Bailey, B. A., & Meinhardt, L. W. (2016). Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters. Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>.

Breccia, G., Nestares, G. (2014). Next-Generation Phenotyping in Plants: Old Problems, New Promises. Journal of Basic & Applied Genetics. Volume 25 | Issue 1 | Article 1 – opinión.

Cilas, C., y Despréaux, D. (2004). Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases. Versailles, France: Editions Quae.

Cilas, C. (2006). Comparison of resistance to *Phytophthora* pod rot in a ring test using leaf discinoculation at ten sites. Global Approaches to Cocoa Germplasm Utilization and Conservation, pp. 116–123.

Dakwa, J. T. (1988). A serious outbreak of the black pod disease in a marginal area of Ghana. In: Cocoa Producers' Alliance (Eds.), Proceedings of the Tenth International Cocoa Research Conference (pp. 447–451), 1987, Santa Domingo: Dominican Republic.

Drenth, A., & Guest, D. (2013). *Phytophthora*: la destructora de plantas Palabras clave. Especial, Tomo I, 34.

Drenth A, Guest DI. (2004). Diversity and management of *Phytophthora* in Southeast Asia Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research. *Phytophthora* in the tropics; p. 30-41.

Enríquez GA, Salazar LG. (1987). Cocoa varietal resistance to *Phytophthora palmivora* and its inheritance at Turrialba, Costa Rica. Turrialba: Catie.

Eskes, A. (2001) Collaborative activities on cocoa germplasm utilization and conservation supported by the CFC/ICCO/IPGRI project. In: Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference, Kota Kinabalu, Malaysia, 9–14 October 2000, pp. 23–30.

Gunderson, J. H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle, K., & Sogin, M. L. (1987). Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84(16), 5823–5827.

Hardham, A.R. (1992). Cell biology of pathogenesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43: 491-526.

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

Iwaro AD, Sreenivasan TN, Umaharan P. (1997). Foliar resistance to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in *Theobroma cacao*. Plant Dis. 81(6):619-624.

Iwaro, A. D., Sreenivasan, T. N., & Umaharan, P. (1998). Cacao resistance to *Phytophthora*: Effect of pathogens species, inoculation depths and pod maturity. European Journal of Plant Pathology, 104, 11–15.

Iwaro, A.D., Thevenin, J.-M., Butler, D.R., Eskes, A.N., 2005. Usefulness of the detached pod test for assessment of cacao resistance to *Phytophthora* pod rot. Eur. J. Plant Pathology. 113, 173e182.

Infostat. (2017). Versión estudiantil disponible en: <https://www.infostat.com.ar>.

Lamour, K.H., Stam, R., Jupe, J., Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. Molecular Plant Pathology, 13: 329-337.

Lawrence, J. S. (1978). Evaluation of methods for assessing resistance of cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivars and hybrids to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. Itabuna, Bahia, Brasil. Centro de Pesquisas do Cacau. Boletim Técnico no. 62, 47 pp.

Lellis, W. T., & Peixoto Filho, O. (1960). Comunicacao preliminar sobre a resistencia do cacao 'Catongo' a *P. palmivora* (Butl.) Butl. Institute Cacau de Bahia Boletim Informativo, 61, 26–31.

Nyassé, S., Cilas, C., Herail, C., & Blaha, G. (1995). Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. Crop Protection. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(95\)00054-2](https://doi.org/10.1016/0261-2194(95)00054-2)

Nyassé S, Efombagn MIB, Kébé BI, Tahi M, Despreaux D, Cilas C. (2007) Integrated management of *Phytophthora* diseases on cocoa (*Theobroma cacao* L): Impact of plant breeding on pod rot incidence. Crop Prot. 26(1):40-45. Oliveira ML, Luz EDMN. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacau no Brasil. Ilhéus: Ceplac, Cepec, Sefit.

Peter, P. K., & Chandramohan, R. (2014). Integrated management of black pod disease of cocoa caused by *Phytophthora palmivora*. International Journal of Plant Protection, 7(1), 107–110.

Phillips-Mora W, Galindo JJ. 1989. Métodos de inoculación y evaluación de la resistencia a *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao (*Theobroma cacao*). Turrialba. 39(4):488-496.

Purwantara, A., McMahon, P., Susilo, A., Sukanto, S., Mulia, S., Nurlaila, Saftar, A., Purung, Bing H., Smilja Lambert, S., Keane, P., Guest, D. (2015). Testing local cocoa selections in Sulawesi: (ii) resistance to stem canker and pod rot (black pod) caused by *Phytophthora palmivora*. Crop Protection. Volume 77. Pages 18-26.

Ramírez JG. Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp. y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, en la hacienda Theobroma, Colombia. Revista de Protección Vegetal. 2016;31(1):42-49.

Rodríguez, E.P. Y Vera R, A. (2015). Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* spp.) en cacao. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica.

Rodríguez, E.P. (2017). Comunicación personal.

Rocha, H. M., & Machado, A. D. (1972). Control of cacao black pod disease. Revista *Theobroma* (Brazil), 2(2), 15–26.

Rocha, H. M., Mariano, A. H. (1969). Selecao de cultivares de cacao resistentes a *P. palmivora* (Butl.) Butl. In: Proceedings of the 2nd International Cocoa Research Conference, Salvador e Itabuna, Bahia, Brazil, 19–26 November 1967, pp. 166–169.

Shaner, G., & Finney, R. E. (1977). The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat Unfortunately, is only a partial September on a fine sandy loam soil on the Purdue genetically as a quantitative trait (12). Moreover, Knoxs slow-mild. Phytopathology, 67, 1051–1056.

Stamps J. (1998). *Phytophthora palmivora*. CMI Descr Pathog Fungi Bact. (831).

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

Tahi, G. M., Kébé, B. I., N’Goran, J. A. K., Sangaré, A., Mondeil, F., Cilas, C., & Eskes, A. B. (2006). Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing leaf disc inoculations with field observations. Euphytica. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-9052-9>

Thevenin, J., Umaharan, R., & Butler, D. (2006). Review of resistance screening of cocoa seedlings and genotipos to witches’ broom disease: Methods, problems and correlation with field results. The experience of the Cocoa Research Unit, Trinidad. In: Eskes, A. B., & Efron, Y. (Eds.), Global Approaches to Cocoa Germplasm Utilization and Conservation Final report of the CFC/ICCO/IPGRI project on “Cocoa Germplasm Utilization and

Conservation: a Global Approach” (1998–2004). CFC, Amsterdam, The Netherlands/ICCO, London, UK/IPGRI, Rome, Italy. CFC Technical Paper 50: 137–145.

Thevenin, J.-M., Rossi, V., Ducamp, M., Doare, F., Condina, V., & Lachenaud, P. (2012). Numerous clones resistant to *Phytophthora palmivora* in the “Guiana” genetic group of *Theobroma cacao* L. PloS One, 7(7).

Thines, M. (2014). Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes—a global overview. European Journal of Plant Pathology, 138(3), 431–447.

Turner, P. D. (1963). Black pod disease: resistance and tolerance, laboratory studies. Report WestAfrican Cocoa Research Institute of Ghana 1961-62, pp. 21–25.

Wood, G. A. R., & Lass, R. (1985). Cocoa. London: Blackwell Science.

Zentmyer GA, Kaosiri T, Idosu GO, Kellam MK. (1981). Morphological forms of *Phytophthora palmivora*. Ponencia presentada en: VII Conference Internationale sur la Recherche Cacaoyere; Douala, Camerun.

2. Análisis molecular de una interacción compatible e incompatible entre *Theobroma cacao* y *Phytophthora palmivora*

2.1 Resumen

El cacao presenta limitantes de tipo fitosanitario como la mazorca negra del cacao, enfermedad causada por el patógeno *Phytophthora* spp. La mazorca negra, poco estudiada en nuestro país, afecta la producción y la generación de plántulas en vivero en zonas productoras como Tolima, Huila y Nariño. La búsqueda de plantas resistentes a patógenos y el conocimiento de los mecanismos de defensa son de gran importancia para el mejoramiento genético de la especie. Con el fin de estudiar los mecanismos moleculares asociados a la interacción compatible e incompatible entre *T. cacao* y *P. palmivora* se estudió la respuesta de defensa de plántulas de *T. cacao* de dos genotipos identificados como tolerante SCA-6 y susceptible CCN-51 a la infección por *P. palmivora*. Para confirmar la activación de la respuesta de defensa por parte de la planta, se evaluó por RT-qPCR la expresión de genes asociados a hormonas que se activan en la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos, entre ellos, genes relacionados con la ruta del ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) a diferentes tiempos de inoculación (0, 24, 48 y 96 horas). Se evidenció que los genes de respuesta al ataque del patógeno de acuerdo con los tiempos estudiados están activados a las 24 horas después de la inoculación en plántulas tolerantes para los genes implicados de las rutas JA/ET y a las 48 horas después de la inoculación para plántulas susceptibles en genes relacionados con la vía del SA. Se encontró entonces una respuesta contrastante entre el genotipo susceptible y el genotipo tolerante.

2.2 Palabras clave

Cacao, enfermedades, mazorca negra, respuesta inmune, genes marcadores

2.3 Introducción

El género *Theobroma* perteneciente a la familia *Malvaceae* incluye 22 especies presentes en las regiones tropicales de América (Cuatrecasas, 1964; Silva 2015), *Theobroma cacao* ($2n = 2x = 20$) nativo de las regiones tropicales húmedas de la parte norte de Sudamérica (Miranda, 1962; Motamayor 2002) es la especie más importante debido a que de esta se extrae el cacao con que se fabrica el chocolate, industria multimillonaria que alcanzó una producción mundial para el año 2016 de aproximadamente de 4.154 millones de toneladas (Fedecacao, 2017; ICCO, 2017). Dicha producción, se encuentra concentrada principalmente en los países africanos con 3063 millones de toneladas, seguidos por América con 714 millones de hectáreas en donde Colombia aporta aproximadamente 56.785 hectáreas equivalentes al 1 % de la producción mundial (Fedecacao, 2017).

Sin embargo, este cultivo anualmente se ve afectado por plagas y enfermedades mitigando así su producción reportando pérdidas entre 30% a 40% (ICCO, 2017). Se estima que las enfermedades causadas por varias especies del hongo *Phytophthora* spp. en cacao son las responsables por pérdidas que alcanzan hasta el 30% del cultivo (Guest, 2007; Bailey y Meinhardt, 2016). *Phytophthora palmivora* está presente en todos los países productores y causa una pérdida de rendimiento entre el 20 y 30% y de la muerte de árboles del 10% anual (ICCO, 2017, Bailey y Meinhardt, 2016). En Colombia, con base en los reportes realizados por Mujica *et al.*, 2015 en las 10 principales zonas cacaoteras (Arauca, Córdoba, Tolima, Nariño, Meta, Norte de Santander, Santander, Antioquia, Huila y Cundinamarca) se encontró que este patógeno es la enfermedad con mayor presencia y dispersión alcanzando hasta 20% y con una incidencia de 6.0% al igual que *M. pernicioso* y después de *M. roreri* (8%) lo que está causando problemas fitosanitarios en estas zonas. Por lo tanto, se hace necesario conocer más profundamente los mecanismos de defensa relacionados con la respuesta a la infección del patógeno. La caracterización de genotipos y de genes relacionados con resistencia o tolerancia es considerada importante para acelerar los procesos de selección de materiales élite en los programas de mejoramiento genético de cacao (Evangelisti *et al.*, 2017, Fister *et al.*, 2016).

Las plantas han desarrollado mecanismos de respuesta a la infección de patógenos (Baker *et al.*, 1997; Soto-Suárez *et al.*, 2006). Son capaces de percibir diversas señales externas y su supervivencia depende en gran medida de la integración de dichas señales y la respuesta frente a ellas. Por ende, éstas han desarrollado un intrincado sistema de inmunidad innata en contra de patógenos que intentan colonizarlas. Las plantas pueden emplear una combinación específica de vías de defensa cuando se encuentran con un patógeno particular (Jalali *et al.*, 2006). Se han descrito vías de señalización relacionadas con las fitohormonas, ácido salicílico (SA), jasmónico (JA) y etileno (ET) las cuales están estrechamente vinculadas a estas respuestas (Sánchez *et al.*, 2010, Laredo, 2017). El SA, muy probablemente participa en el sistema de defensa de las plantas contra el ataque por patógenos biotróficos (patógenos que infectan su hospedero sin causar muerte celular) y hemibiotróficos (patógenos que mantienen vivas las células de su hospedero al inicio de la infección, pero luego las matan), mientras que el JA y ET están asociados principalmente con la defensa al ataque de patógenos necrótrofos (patógenos que matan las células de su hospedero) (Adie 2007, Loake y Grant, 2007, Sánchez *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha descrito que estas vías presentan interacciones sinérgicas, sugiriendo que la red de señalización activada y utilizada por la planta es dependiente de la naturaleza del patógeno (Anderson *et al.*, 2004; Adie 2007; Loake y Grant, 2007, Sánchez *et al.*, 2010;).

Durante la interacción entre patógenos hemibiotrófos como *Phytophthora* y las plantas hospederas como *T. cacao* ocurre un intercambio de señales moleculares y químicas complejas desde ambos lados y depende también del genotipo de la planta hospedera. En este patosistema, este tipo de vías de señalización han sido poco estudiadas. Los estudios relacionados con la interacción a los patógenos del género *Phytophthora* spp. se concentran principalmente en identificar genes bajo distintos enfoques evaluando la diversidad genética tanto de los patógenos como de la planta (Palacio, 2007; Motamayor *et al.*, 2008; Murillo *et al.*, 2011; Ruiz, 2014; Thomas *et al.*, 2012, Osorio *et al.*, 2017). Se han identificado regiones QTLs (*Quantitative trait locus*, locus de un carácter cuantitativo) del genoma ligados a la resistencia a *Phytophthora*, aunque hasta el momento ninguno de estos QTLs ha mostrado una asociación constante con la resistencia (Silva y Figueira, 2005). Otros estudios han evaluado la expresión diferencial de genes en genotipos con respuesta contraste de cacao durante la primera fase de infección a *P. megakarya* usando microarreglos de ESTs (Legavre *et al.*, 2015). Sin embargo, las muestras provenían de discos de hojas por lo cual no se puede distinguir si los genes expresados están

relacionados con la herida o con la infección del patógeno (Legavre *et al.*, 2015). Adicionalmente, se han identificado familias de proteínas relacionadas con resistencia (PRs) *in silico*, y a partir de análisis realizados usando microarreglos se han identificado genes de las familias PR-1, PR-3, PR-4, y PR-10 que probablemente están involucrados en la defensa del cacao contra *P. palmivora* y *Colletotrichum* que podrían ser potencialmente útiles para la selección asistida por marcadores (Fister *et al.*, 2016, Ali *et al.*, 2017). Este proyecto evalúa algunos de los genes marcadores en las vías de señalización de SA, JA y ET asociadas a la respuesta de defensa de plántulas *T. cacao* de genotipos contrastantes a la infección de *P. palmivora*.

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Material biológico y sitios de investigación

2.4.1.1 Material vegetal

Para este estudio se usaron dos genotipos de *Theobroma cacao*, el genotipo CCN-51 reportado como susceptible a *Phytophthora* spp. (Rodríguez, 2015) y el genotipo SCA-6 reportado como tolerante a *Phytophthora* spp. (Iwaro *et al.*, 1997). Estos genotipos provenían del Banco de Germoplasma de la Nación manejado por CORPOICA del centro de investigación La Suiza (Santander) y fueron injertados sobre el genotipo IMC-67 que es el porta-injertos más utilizado comercialmente.

2.4.1.2. Material fúngico

En esta investigación se usó la cepa de *P. palmivora* (Tocha 325) procedente del municipio de Chaparral en el departamento del Tolima, descrita como la más virulenta según experimentos previos realizados en el centro de investigación Nataima e identificada morfológicamente y molecularmente (Rodríguez, 2016). La solución de inoculación se usó a una concentración de 1×10^7 UFC/ml.

2.4.1.3 Lugares de estudio

Este trabajo se realizó en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. El montaje experimental para la inoculación de las plantas se realizó en los

invernaderos y laboratorios de fitopatología del Centro de Investigación (CI) Nataima (Km 19 vía Espinal-Chicoral, Tolima). Los experimentos de biología molecular se realizaron en el laboratorio de Genética Molecular ubicado en el centro de Investigación Tibaitatá (Km 14 vía Bogotá-Mosquera, Cundinamarca).

2.4.2 Siembra de porta injertos e injertación de genotipos

Los porta injertos fueron sembrados a partir de semilla del genotipo IMC-67, seleccionado por ser el más usado comercialmente. Para ello, inicialmente el suelo fue esterilizado una sola vez a 120 libras de presión por 30 minutos con el fin de eliminar la flora microbiana presente en el sustrato antes de la siembra. Las plantas fueron fertilizadas usando 2 gr de DAP (Fosfato diamónico), dos meses luego de la germinación y nuevamente 30 días después de la injertación. Cuando las plántulas alcanzaron tres meses de siembra aproximadamente que corresponde al diámetro de un “lápiz”, fueron injertadas usando los genotipos CCN-51 y SCA-6, con injertos denominados de parche. A los 16 días, se verificó el porcentaje de prendimiento.

2.4.3 Inoculación de plántulas

Para determinar la expresión de genes de respuesta de defensa en *T. cacao* se inocularon plántulas de ambos genotipos usando el protocolo estandarizado y descrito en el primer capítulo de esta tesis. Se infectaron cuatro hojas de cacao ubicadas en el tercio medio de cada plántula por presentar mayor grado de homogeneidad. El experimento se repitió tres veces a tiempos diferentes con el fin de obtener tres réplicas biológicas. Por cada réplica biológica, se inocularon 12 plantas de cada genotipo y se tomaron muestras a 0h, 24h, 48h y 96h después de inoculación de los dos genotipos.

2.4.4 Toma de muestras y extracción de ARN

Se tomaron hojas de las plántulas de cada uno de los tratamientos en los cuatro tiempos indicados anteriormente (0, 24, 48 y 96 horas). Las hojas se conservaron en tubos de 50 ml congelados en nitrógeno líquido para detener la degradación del material. Las muestras fueron almacenadas a -80°C en el CI Nataima y posteriormente se transportaron en nitrógeno líquido al laboratorio de Genética Molecular del CI Tibaitatá. Una vez en el laboratorio, las muestras se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y

el ARN fue extraído usando el protocolo estandarizado por Yockteng *et al* (2013). La concentración y la calidad del ARN obtenido se cuantificaron en un Nanodrop (Thermo Scientific) usando el software NanoDrop® 2000 y se visualizó en geles de agarosa al 1.5% teñidos con *GelRed* (Biotium).

2.4.5 Diseño de cebadores para RT-qPCR

A partir de la revisión bibliográfica, se diseñaron 12 pares de cebadores de genes marcadores identificados en *Arabidopsis thaliana* como genes de respuesta a defensa implicados en las rutas metabólicas del SA (*SID*, *EDS*, *PR-1*, *PR4*, *NPR1*) y JA/ET (*PDF1.2*, *PAD4*, *JAZ1*, *COI*, *ERF*, *EIN*) y un gen identificado como candidato de respuesta a defensa en cacao *Tc06g000490* (Fister *et al.*, 2016). Utilizando la herramienta Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), las secuencias descritas de *A. thaliana* se mapearon contra el genoma de *T. cacao* (<http://cocoagendb.cirad.fr/blast.html>) (Argout *et al.*, 2017) y se seleccionaron los genes de copia única. Para el diseño de los cebadores se utilizó la herramienta “RealTime qPCR Assay Entry” del Integrated DNA technology (IDT) (<https://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR>). Los genes se diseñaron sobre las secuencias codificantes mapeadas del genoma del cacao, con tamaños de amplicones entre 150 y 200 pb, porcentaje de guanina-citosina entre 40 y 60% y una longitud de 20 a 22 nucleótidos (Tabla 2). Para normalizar la expresión, se utilizaron los genes endógenos β -actina y α -tubulina (Legavre *et al*, 2015).

2.4.6 Obtención de ADNc y amplificación de cebadores para RT-qPCR y qPCR.

Se obtuvo el ADN complementario de los genotipos seleccionados (genotipo tolerante y genotipo susceptible) para las muestras inoculadas con el patógeno, usando kit comercial iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit BiO_RAD® siguiendo las recomendaciones del fabricante. A partir del ADNc sintetizado, se estandarizó el RT-PCR; para esto se optimizaron las temperaturas de “annealing” y se preparó una mezcla que contenía 1 ug de ADNc (1:10), 1X Phire reaction buffer, 0,1 mM de dNTPs, 2 U/ μ L Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific®); la concentración de cada cebador en la mezcla fue de 1 μ M.

Tabla 2. Secuencias de cebadores diseñados para el análisis de expresión.

Identificación del marcador	Gen en <i>Arabidopsis</i>	Gen en <i>T. Cacao</i>	Crom	Inicio Hit	Final Hit	Ruta	Secuencia Cebadores (5'-3')
TC_1PR1SA	<i>At2g14610</i>	<i>Tc02cons_t002770.1</i>	2	1710185	1710976	SA	F-TGACAGAGTGGCTGCCTATG R-ACTCCCCACCAACACAAGAG
TC_3-PDF1.2	<i>At5g44420</i>	<i>Tc02cons_p007330.1</i>	2	4059809	4060352	JA	F-GCTATGTCTCTTAAATCTGTTCACTTC R-TGTGCTTTCTCCCATTTCTG
TC_4-NPR1- SA+ET	<i>At1g64280</i>	<i>Tc09cons_t007540.1</i>	9	4497795	4502674	SA/ET	F-TTGTGCGTTGAGATACTGGAG R-GGAATTGATGCTGGCTAATGTG
TC_6-PAD4-SA	<i>At3g52430</i>	<i>Tc01cons_t012190.1</i>	1	7873218	7877076	SA	F-TTGGATGCTGAAGACGGTG R-TTGGAGAAGACATGGACTGC
TC2_PR4/HEL_ET-F	<i>At3g04720</i>	<i>Tc06v2_t002080.1</i>	6	2220485	2221270	SA	F-GCTCAACTTGGGATGCAAAC R-TCTTCCATCCGTGTCAATCTG
TC_8JAZ1_JA	<i>At1g19180</i>	<i>Tc09v2_g006460</i>	9	3828900	3831558	JA	F-GTCAGAAATCGGCTAGGTCAC R-AATTCATGGTAGGACGCAGG
TC_9 ERF1_ET-F	<i>At3g23240</i>	<i>Tc04v2_g020700</i>	4	29062038	29063061	ET	F-GGGTGAATTTGAAGATATTGGAGC R-GCTTTTCTGCAGCCTGTTG
TC_12EIN3_ET	<i>At3g20770</i>	<i>Tc09v2_g028440</i>	9	37209195	37213021	ET	F-CTTTGAGCTTTGTGGAATCGG R-GTCTGAAACTTGCGGGAAATC
TC15_ COI1 JA/ET	<i>At2g39940</i>	<i>Tc10v2_g002140</i>	10	1298194	1302511	JA	F-GTGTTCCCTTTTGCATCCTTG R-CATCAGCACCCCTTTCAATTC
TC_PR3-06g000490 ¹	--	<i>Tc06_g000490/ Tc06v2_g000370</i>	6	450363	453184	JA	F-ATCTGGGTTTCGGGACAAC R-_GGAGCACAGGGATACACATAC
Tc03v2_SID2	<i>At1g74710</i>	<i>Tc03v2_g006180</i>	3	17256784	17261596	SA	F-GAAGCAGCTCACCCTCATTA

							R-TCCTTCAACCTGCAGACAAG
Tc03v2_1_EDS1	<i>At3g48090</i>	<i>Tc03v2_g000110</i>	3	183125	185687	SA	F- CCATGCTGCCTGTCAACTA
TC_actin²	-	<i>Tc08v2_t006820.1</i>	8	3850773	3852813	-	R-CAACAACCAGCTTCCCATTTC F-CCATGCCAACCATCACACC
TC_aTubilina³	-	<i>Tc01_g010900</i>	1	-	-	-	R-GAACAGGAATGGTTAAGGC F-ACCAATCTTAACCGCCTTGTCT R-GTTAGTCTGGA ACTCAGTCACAT

Secuencias obtenidas de ¹Fister *et al.*, 2016, ²Legavre *et al.*, 2015, ³Teixeira *et al.*, 2012 SA (ácido salicílico) JA (ácido jasmónico), ET(Etileno)

El programa de amplificación incluyó un ciclo inicial de 30s a 98°C, 35 ciclos de 5s a 98°C, 30s, “annealing” 56°C por 5s, y 10s a 72°C y por último un ciclo de un minuto a 72°C. Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con *GelRed* (Biotium).

Los RT-qPCRs fueron realizados en placas de 96 pozos ópticos en una máquina tiempo real Biorad CFX 96™ usando SsoAdvanced™ Universal Inhibitor-Tolerant SYBR Green Supermix (Biorad). Se midieron los niveles de expresión mediante cuantificación relativa utilizando α -tubulina como gen de referencia para la comparación de los valores promedio Δ ct. Se analizaron las tres réplicas biológicas con tres repeticiones técnicas cada una con 12 plantas del genotipo tolerante y 12 plantas del genotipo susceptible. Una prueba ANOVA se utilizó para evaluar las diferencias en la expresión génica.

2.5 Resultados y discusión

2.5.1 Extracción de ARN y obtención de ADNc

Se realizó la extracción de ARN de cada una de las muestras obtenidas por duplicado. El ARN obtenido fue de buena calidad (Figura 5), con concentraciones entre 135.8 ng/ μ l y 1377,6 ng/ μ l y la relación 260/280 con promedios entre 1.97 y 2.18 (Anexo B). La obtención de ácidos nucleicos de plantas como cacao es particularmente difícil debido al alto contenido de polifenoles y polisacáridos que están presentes en los diferentes tejidos y que se coprecipitan con los ácidos nucleicos durante la extracción (Jones *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2003). El protocolo utilizado en este estudio permitió el aislamiento de un ARN de buena calidad y buena concentración. A partir de este ARN, fue posible entonces obtener un ADNc de buena calidad para todas las muestras extraídas.

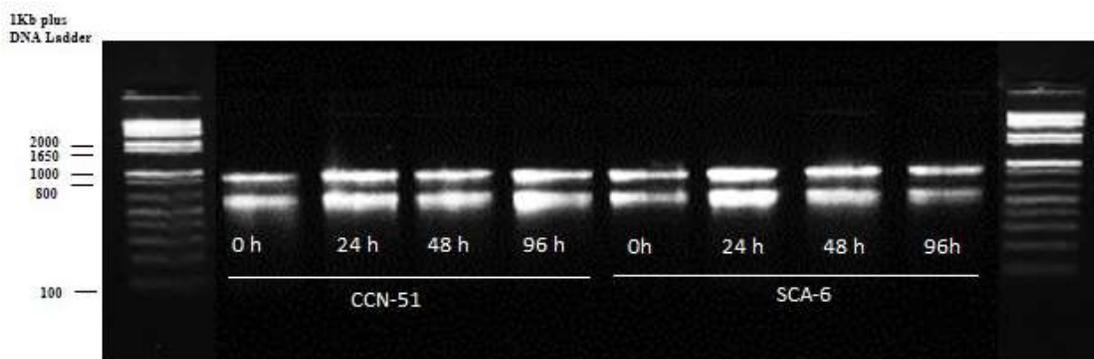


Figura 5. Visualización de ARN de cacao extraído a partir de hojas inoculadas con *P. palmivora*. Los carriles indican el tratamiento empleado en la extracción en el genotipo susceptible CCN-51 y en el genotipo tolerante SCA-6. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y cada muestra se tiñó con GelREAD.

2.5.2 Amplificación de cebadores para RT-PCR y RT-qPCR.

Inicialmente se realizó una RT-PCR para validar la amplificación de los cebadores diseñados. Los cebadores TC_3-PDF1.2 y TC_6-PAD4-SA no amplificaron (Figura 6), por lo cual fueron eliminados del análisis. Se realizó un gradiente de temperatura para cada gen y se determinó que la temperatura óptima de “annealing” para los marcadores restantes era de 56°C incluyendo los controles endógenos β -actina y α -tubulina.

Se probó la eficiencia de los genes endógenos β -actina y α -tubulina para normalizar la expresión diferencial de los genes analizados. Para esto, se determinó la estabilidad de estos genes mediante amplificación por RT-qPCR en diluciones seriadas de ADNc 1:1, 1:4, 1:16, 1:64. Los datos generados para cada gen se analizaron por regresión lineal (Anexo C). Se espera que un gen endógeno presente un comportamiento lineal con respecto a la concentración del ADNc y del número de ciclos. El gen endógeno que tuvo un comportamiento lineal fue α -tubulina, éste presentó mayor estabilidad en todas las diluciones realizadas, comparadas con el gen β -actina, en donde se presentaban incongruencias en la regresión. A partir de estos resultados, se decidió utilizar la dilución 1:16 para todos los tratamientos (Anexo C).

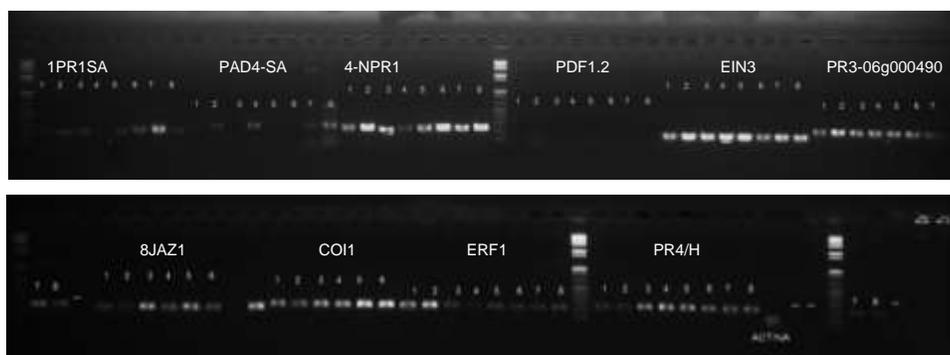


Figura 6. Estandarización de las condiciones de la temperatura de “annealing” de cebadores usando RT-PCR en gradiente de temperatura. Los números indican la temperatura de “annealing” usada, 1=62°C; 2=61°C; 3=58,1°C; 4=58,1°C; 5=55,8°C; 6=53,9°C; 7=52,7°C; 8=52,0°C.

2.5.3 Análisis de la respuesta de defensa.

En este estudio, se analizó la expresión de un total de diez marcadores candidatos a la respuesta de defensa en cacao. Este análisis permitió elucidar las vías de respuesta implicadas en la interacción planta-patógeno durante las primeras horas de la infección. Mediante el cálculo de la eficiencia relativa normalizando con respecto al gen endógeno *alfa tubulina*, se identificaron diferentes tipos de respuesta las cuales se describen a continuación.

2.5.3.1 Genes de respuesta a defensa relacionados con la vía del ácido salicílico.

De acuerdo con los análisis realizados se observó que hay una mayor inducción en la planta susceptible en algunos genes implicados en la ruta del ácido salicílico. Los genes *EDS1*, *SID2*, *PR1*, mostraron en su mayoría, una mayor expresión a partir de las 48hpi en el genotipo susceptible CCN-51, comparado con el genotipo tolerante SCA-6 en donde no se observa un aumento significativo en la expresión (Figura 7). El gen *EDS1* (*Enhanced disease susceptibility*) muestra un aumento progresivo a partir de las 24 horas hasta las 96 hpi, mientras que el gen *SID 2* (*salicylic-acid induction deficient 2*) muestra una mayor expresión a partir de las 48 y 96 horas después de la inoculación (hpi) en la planta susceptible CCN-51 (Figura 7).

Los resultados encontrados muestran que en la planta tolerante SCA-6, la expresión del gen *EDS1* es baja desde las 24 hasta las 96 horas, pero el gen *SID2* presenta un aumento en su expresión a las 24 hpi. Sin embargo, esta inducción disminuye a las 48 y 96 horas. Por su parte, los genes que codifican para proteínas PR, TC_1PR1SA y TC2_PR4/HEL_ET-F, aumentan su inducción a partir de las 48 hpi en la planta susceptible comparado con la planta tolerante (Figura 7).

Por otro lado, en el genotipo tolerante SCA-6 se observa una mayor inducción en el gen *NPR1* a las 24 hpi, comparado con el genotipo susceptible CCN-51 en donde también se produce una respuesta, aunque mucho menor. Esta inducción de este gen en el genotipo tolerante permanece hasta las 96 hpi.

El ácido salicílico (SA) juega un papel importante en la ruta de transducción de señales que conduce a la activación de genes que codifican para algunas proteínas PR (del inglés, *Pathogenesis Related*) (Sanchez *et al.*, 2010). El gen *EDS1* es necesario para que se produzca la acumulación del SA y para el aumento en la respuesta de defensa que implica la producción de ROS (especies de oxígeno reactivas). Este último juega un papel importante en la defensa de las plantas puesto que interviene en la señalización celular y contribuye a reforzar la pared celular (Falk *et al.*, 1998; López, 2007). Sin embargo, se ha reportado que la respuesta de defensa requiere la activación de otros genes como *PAD4* (*phytoalexin deficient*) y *SAG101* (*Senescence associated gene 101*) (López, 2007) (Figura 8).

Se ha demostrado que el gen *EDS1* al ser silenciado afecta la señalización del ácido salicílico y aumenta la sensibilidad a la infección del patógeno (Wildermuth *et al.*, 2001). Este gen *EDS1* y el gen *SID2* son necesarios para la biosíntesis del SA, que, a su vez, es necesario para impulsar las moléculas señales para desencadenar la activación de ciertas proteínas tipo PRs. De acuerdo con los resultados presentados, a pesar de que en la planta susceptible se produce la inducción de los genes de la vía del SA, esta respuesta no es suficiente para evitar el progreso de la enfermedad.

El gen *SID2* regula positivamente la enzima Iscristato sintasa (ICS) que está involucrada junto con otras moléculas en la regulación de la respuesta sistémica adquirida (SAR) (Wildermuth *et al.*, 2001; Riveros, 2010), además este gen activa la codificación de enzimas que están directamente involucradas en la biosíntesis de SA (Ng *et al.*, 2011). SAR

implica la producción de señales en la planta que están involucradas en la activación de mecanismos de respuesta en partes no infectadas, de esta forma la planta se predispone para resistir ataques adicionales (Sánchez *et al.*, 2010).

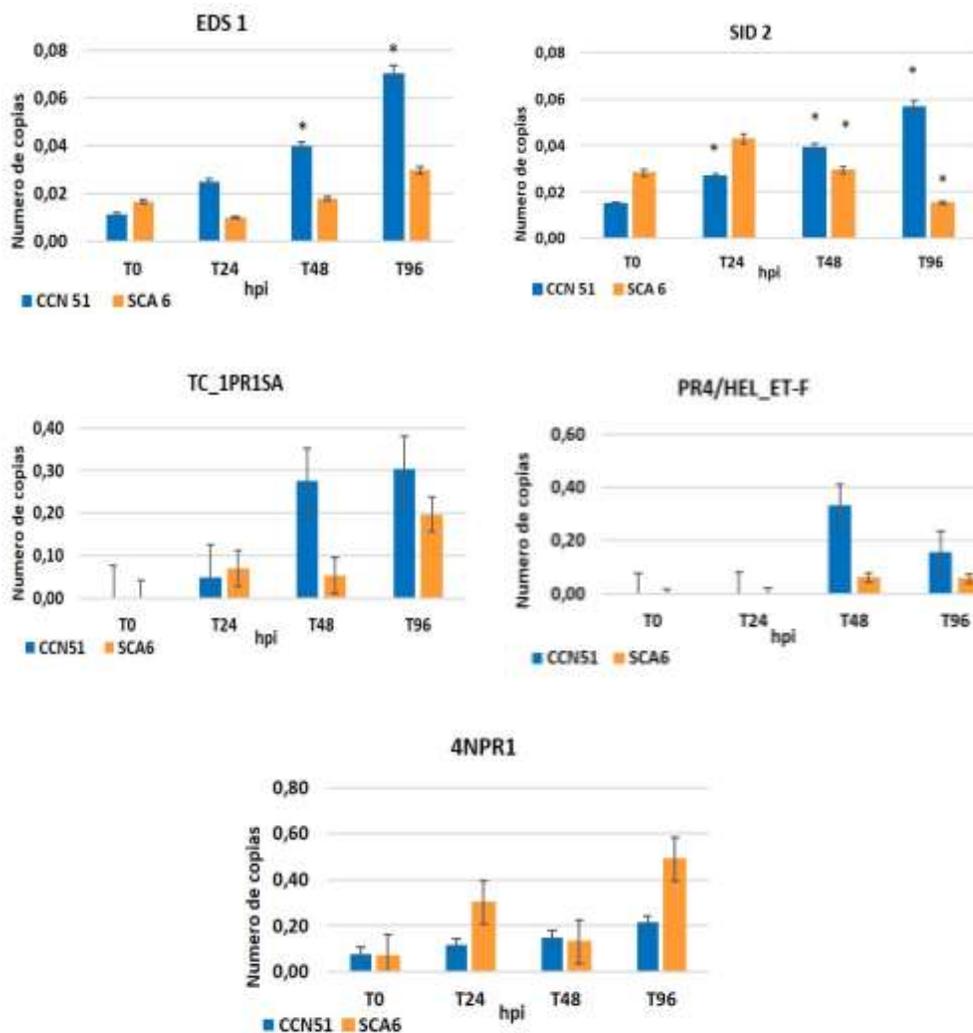


Figura 7. Análisis de la expresión de genes de defensa dependientes de la ruta del ácido salicílico. La significancia estadística fue determinada por ANOVA (* $P \leq 0.05$). Los histogramas muestran la media \pm SD de 3 réplicas biológicas, cada una con 12 plantas por genotipo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la expresión a las 24 hpi del gen *SID2* podría estar promoviendo SAR en la planta tolerante debido al ataque del patógeno y la activación de la cascada de señalización que preceden la biosíntesis de SA, intentando detener la infección en los tejidos sanos. Es importante notar que el gen *NPR1* (*Non-expressor of*

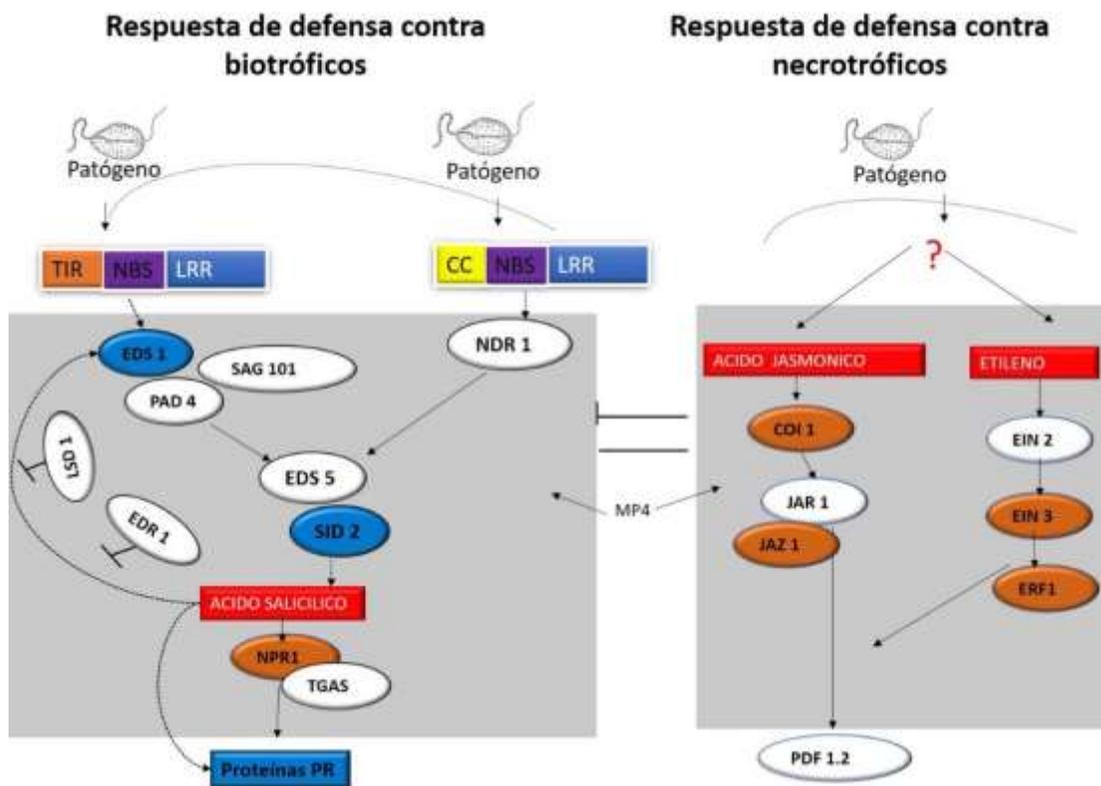
Pathogenesis Related genes 1) puede interactuar directa e indirectamente con SA y es responsable de la inducción de más de 2000 genes *PR* (*Pathogenesis Related*). Los resultados muestran que el gen *NPR1* presenta un nivel más bajo de expresión en el genotipo susceptible CCN-51 que en el genotipo tolerante SCA-6. Sin embargo, los genes *EDS1* y *SID2* los cuales están corriente-arriba del gen *NPR1* en la cascada de señalización (Figura 8), tienen una mayor inducción en el genotipo susceptible CCN-51 y ambos genes están directamente implicados con la acumulación de SA. (Shi *et al.*, 2010; Feechan *et al.*, 2015).

El gen *NPR1* es uno de los principales componentes que regulan la vía de señalización del SA (Ng *et al.* 2011), interviene en la regulación de la respuesta sistémica (RS) en las plantas tanto en SAR como en ISR (del inglés, Induced Systemic Resistance) (Gonzalez, 2012, Nie *et al.*, 2017, Van Loon, 2006). En general se ha descrito que la respuesta ISR es inducida principalmente por organismos benéficos mientras que SAR está asociada con la respuesta contra organismos patógenos (Guillaume *et al.*, 2012). Sin embargo, en los últimos años se ha reportado en varios estudios una capacidad defensiva potenciada sin una relación de genes de defensa específicos a la cual se le ha llamado “priming” (Mauch-Mani *et al.*, 2017). Esta capacidad de defensa potenciada es producida cuando la planta se encuentra ante un estímulo proveniente de un patógeno, de un organismo benéfico, un compuesto químico o ante señales abióticas y produce en la planta cambios fisiológicos, transcripcionales, metabólicos y epigenéticos (Mauch-Mani *et al.*, 2017).

El rol del gen *NPR1* de *T. cacao* en la defensa contra patógenos fue funcionalmente confirmado al transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* con este gen y observar un incremento de la resistencia a patógenos (Shi *et al.* 2010). Un resultado análogo se ve en la respuesta de *Arabidopsis* contra *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Ng *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha demostrado el papel positivo de *NPR1*, como principal regulador de SAR en la respuesta de cacao a la infección por *Phytophthora* spp. (Fister *et al.* 2015). Esto debido a que el gen *NPR1* regula la activación de factores de transcripción de tipo general (TAG) que regulan positivamente o negativamente SAR (López 2007).

Aunque el papel de *NPR1* ha sido descrito en cacao como regulador de SAR, de acuerdo con los resultados de la expresión de este gen en el patosistema *T. cacao*- *P. palmivora*,

podría interpretarse que el gen *NPR1* está activando una respuesta sistémica, aunque no es claro de qué tipo. Por ende, debe ser dilucidada con experimentos adicionales.



Modificado de González, 2016 y López, 2007

Figura 8. Vías de señalización durante la respuesta de defensa en plantas. Se muestran los genes asociados a las tres principales fitohormonas SA, JA y ET que se activan en la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos. Los genes en azul representan aquellos que presentan mayor inducción en la planta susceptible, mientras que los genes en anaranjado representan los de mayor inducción en la planta tolerante.

Las proteínas PR (*Pathogenesis Related*), son inducidas y se acumulan en tejidos vegetales generalmente después del ataque de patógenos, estas familias proteicas han sido ampliamente caracterizadas. Se han descrito las familias de proteínas *PR1* y *PR4* como de acción antifúngica y antioomycete (Lopez, 2007). El análisis de los genes de la familia PR1 como *TcPR-1f* y *TcPR-1g* (Tc10_g000980) en cacao han mostrado una regulación positiva durante la etapa biotrófica de la infección por el basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Texeira *et al.*, 2013). En este estudio, los resultados de la expresión del gen *TcPR_1g* en la planta susceptible inoculada con *P. palmivora*

concuerdan con lo reportado por Texeira *et al.*, (2013) en donde el perfil de expresión de *TcPR-1g* aumenta después de la percepción del patógeno en interacciones compatibles (Texeira *et al.*, 2013). Otros ensayos como los realizados por Fister *et al.*, (2016) para el mismo gen *TcPR-1g* en *P. palmivora-T. cacao* no muestran ninguna respuesta. Sin embargo, la familia proteica *PR-1* ha sido ampliamente reportada en la activación de la defensa en plantas (Loake y Murray, 2007; Mitsuahara *et al.*, 2008), aunque su papel en cacao aún debe ser analizado a profundidad.

Según Menezes *et al.*, (2014), el gen *TcPR-4b* perteneciente a la familia *PR4* en un genotipo de cacao susceptible a *M. pernicioso* se expresó en las etapas finales de la infección (45-90 días después de la infección) correspondiente al inicio de la fase necrótropa. Esto concuerda con los resultados hallados en este estudio para *P. palmivora*, en donde a partir de las 48 hpi la lesión es mayor en el genotipo susceptible (ver capítulo 1) y corresponde a un aumento en la expresión de este gen. Para poder confirmar el rol de este gen, es necesario establecer en este patosistema el inicio de la etapa necrotrofica de *P. palmivora* en cacao.

2.5.3.2. Genes de respuesta a defensa relacionados con las vías ácido jasmónico y el etileno.

Los genes *COI* (*Coronatine Insensitive 1*), *EIN3* (*Ethylene Insensitive 3*) y *ERF1* (*Ethylene-Response-Factor1*) se expresan en la planta tolerante a las 24 hpi (Figura 9, Anexo D) y hay una disminución de la expresión a las 48 hpi seguido de un aumento para los tres genes a las 96 hpi. La planta tolerante estaría entonces activando su sistema de defensa conteniendo de esta forma el desarrollo de los síntomas y el avance de la lesión. Por el contrario, en la planta susceptible no se produce una inducción significativa de dichos genes.

El papel de los genes *COI*, *EIN*; *ERF* y *JAZ* en las vías de señalización JA y ET ha sido estudiado a nivel funcional en *Arabidopsis* (Jalali *et al.*, 2006). En algunos casos, el ataque de patógenos necrotrofos induce la acumulación de JA y ET (Penninckx *et al.*, 1998 citado por Jalali *et al.*, 2006). En el presente estudio, hay una asociación entre la aparición de los primeros puntos de necrosis (Figura 9) y la expresión de estos genes en la planta tolerante SCA-6. Estos resultados podrían ser un indicador del paso del patógeno a la

etapa necrotrófica, sin embargo, se deben realizar estudios histológicos para comprobar que esto esté pasando.

Por su parte, las proteínas *JAZ* son represoras de la señalización de JA y su degradación permite que factores de transcripción como *MYC2* activen la expresión de genes que responden a JA (Bari, 2009). El gen *COI* (*coronelina insensible1-1* o *coi1-1*) que codifica una proteína con un dominio F-box participa en la formación de complejos *COI1-JAZ* que es responsable de la degradación de las proteínas *JAZ* por el proteosoma 26S y regula positivamente la señalización de JA (Lorenzo *et al.*, 2005, Katsir *et al.*, 2008). La expresión significativa ($P \leq 0.05$) del gen *JAZ* y del gen *COI1* a través del tiempo a partir de las 24 hpi en la planta tolerante SCA-6 podría ser una evidencia de la activación de la señalización de JA.

El gen *ERF* ha sido descrito en *Arabidopsis* como un gen de respuesta inmediata tanto a ET y como a JA, asimismo puede ser regulado sinérgicamente por ambas hormonas (Solano *et al.*, 1998 citado por Lorenzo *et al.*, 2003, 2005). Se ha reportado que este gen es inducido tras la infección por patógenos necrótrofos (Berrocal-Lobo y Molina 2004). La expresión de este gen en las plantas de SCA-6 a partir de las 24 hpi indicaría la activación de respuesta de defensa por las vías del etileno y del ácido jasmónico. La expresión mayor en la planta tolerante SCA-6 comparada a la expresión en la planta susceptible podría relacionarse con una defensa más efectiva por parte de la planta tolerante.

El gen *TC_PR3-06g000490* (Figura 9) muestra una expresión alta en la planta tolerante a las 24 hpi comparada con la susceptible, la cual disminuye después de las 48 hpi en los dos genotipos. Este gen fue identificado por Fister *et al.*, (2016), los cuales evaluaron la interacción de *P. palmivora* y *Colletotrichum theobromicola* en *T. cacao*, observando una alta expresión de este gen en las primeras etapas de infección. Los genes de la familia *PR3* han sido descritos con actividad quitinasa, enzimas capaces de degradar la quitina de los hongos (Lopez *et al.*, 2007). La señal mediada por *PAMP* (Pathogen Associated Molecular Patterns) o el gen R podría estar activando la expresión de este gen el cual podría causando la degradación de la quitina de los patógenos. Este gen PR3 se ha reportado con una mayor resistencia a los patógenos al degradar las hifas fúngicas en las raíces y así limitar la infección (Chen *et al.*, 2014). Aunque la mayoría de la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis, PR, se han asociado con la respuesta a la vía de SA, se ha demostrado que algunos genes relacionados con la expresión de algunas de

estas proteínas como PR3 están más involucrados en respuesta inducidas por las vías del ET y JA (Pieterse *et al.*, 1999, Van Loon *et al.*, 2006).

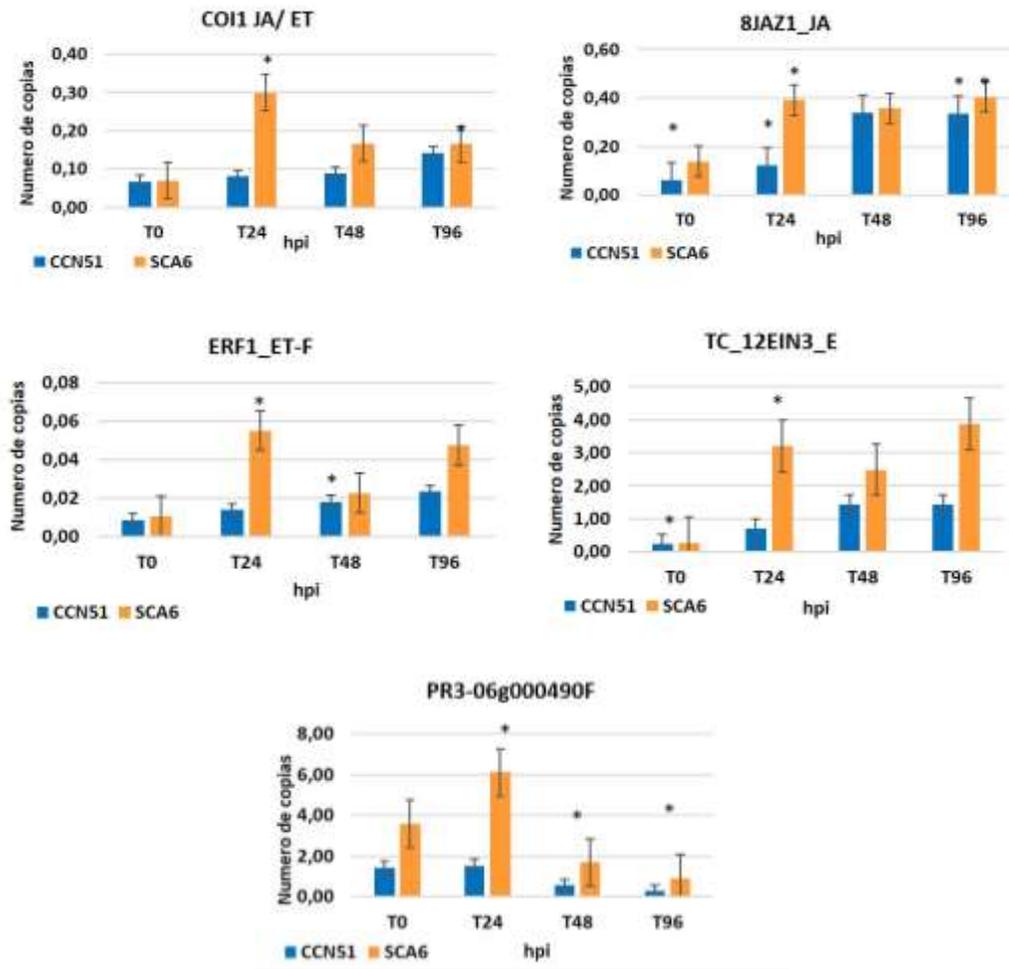


Figura 9. Análisis de la expresión de genes de defensa dependientes de las rutas del ácido jasmónico y el etileno. La significancia estadística fue determinada por ANOVA (* $P \leq 0.05$). Los histogramas muestran la media \pm SD de 3 réplicas biológicas, cada una con 12 plantas por genotipo.

En este estudio, la presencia de las proteínas *NPR1* y *PR3* en la planta tolerante parece ser necesaria para una respuesta de defensa eficiente. En el futuro es necesario establecer

ensayos en el patosistema *T. cacao*- *P. palmivora*, para reconocer el momento en el que se produce el cambio de la fase biotrófica a la fase necrotrófica con el fin de ratificar los resultados aquí reportados. Adicionalmente, se necesitan ensayos en los cuales se validen el rol de estos dos genes a nivel funcional.

En general, el estilo de vida de un patógeno suele imponer el tipo de defensa en el huésped, por ejemplo, éste puede ser capaz de manipular la conversación cruzada de las vías de respuesta SA y JA/ET para tener una colonización exitosa. Por ejemplo, el estudio del patosistema *Sesamum indicum* L- *Macrophomina phaseolin* (Chowdury *et al.*, 2017) mostró que los genes relacionados con las vías de JA y ET tiene una mayor inducción en la planta tolerante en la etapa necrótrófica del patógeno. En el patosistema *T. cacao* – *P. palmivora* se detectó una mayor expresión en los genes relacionados con la vía del JA/ET en la planta tolerante que la vía del SA. Sin embargo, esta información no es suficiente para establecer una relación entre las vías de defensa SA, JA/ET entre las fases biotrófica y necrotrófica.

En este estudio, de acuerdo con los resultados de expresión diferencial de los genes estudiados, el genotipo SCA-6 (tolerante) es capaz de activar efectivamente una respuesta sistémica, al detectar el patógeno, y controlar el avance de la enfermedad. Esto comparado con el genotipo CCN-51 (susceptible) en donde a pesar de que la mayoría de los genes de SA se encuentran inducidos se produce una interacción compatible entre el patógeno y la planta. Con los resultados obtenidos, no es posible elucidar si la respuesta de SCA-6 se trata de SAR o de ISR, aunque los genes que se encuentran mayormente inducidos corresponden a la de la vía de JA/ET (*COI*, *EIN*, *ERF* y *JAZ*) y esto fortalecería la hipótesis de una respuesta ISR, probablemente ayudada por la activación de los genes *MYC2* y *PDF1.2* (Enoki y Susuki, 2016). Esta respuesta es probablemente desencadenada de un efecto “priming” derivado de estímulos por la presencia de los PAMPs del patógeno o del patógeno mismo (Mauch-Mani *et al.*, 2017). De acuerdo con lo anterior, es necesario realizar estudios adicionales para determinar el comportamiento y sincronización de las respuestas SAR e ISR con las fases biotrófica y necrotrófica de *P. palmivora*.

2.6 Conclusiones

Se confirmó, que existe una respuesta diferencial en genotipos contratantes de *T. cacao* cuando se infectan con *P. palmivora*. Los genes relacionados con la vía del SA muestran una mayor activación en el genotipo CCN-51 (susceptible) a las 48 hpi comparados con el genotipo SCA-6 (tolerante). En contraste, la activación de genes de la vía del JA presentan niveles de expresión mayores en el genotipo SCA-6 (tolerante) a las 24 hpi.

Los genes *NPR1* y *PR3* (*TC_PR3-06g000490*) muestran una mayor inducción en el genotipo SCA-6 (tolerante) lo cual podría relacionarse con una respuesta inducida por el ataque del patógeno. Adicionalmente, la planta tolerante podría presentar una respuesta de tipo sistémico, la cual podría tratarse de ISR mediada por un efecto “priming” estimulado por la presencia del patógeno o moléculas producidas por éste.

Finalmente, **se ratificó** que en el patosistema *T. cacao*- *P. palmivora*, existe una respuesta sinérgica entre las vías del JA/ET, ya que en genes de ambas vías presentan una inducción en el genotipo tolerante SCA-6. Sin embargo, es necesario establecer el momento del cambio entre biotrofia y necrotrofia en *P. palmivora* para determinar si la activación de estos genes está relacionada con el inicio de necrosis o con otro tipo de respuestas como una respuesta de tipo hipersensible.

2.7 Agradecimientos

Se agradece, a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria por la financiación de este proyecto, a la Doctora Eleonora Rodríguez, a los profesionales Martha Carrero, Edison Bayardo Parra, así como al técnico Jesús Guzmán por su ayuda durante el montaje experimental y el manejo fitopatológico y agronómico de las plántulas, al doctor Mauricio Soto-Suárez, a la Doctora Carolina González por su asesoría en muchos de los temas de este trabajo, al profesional Johan Barbosa por su colaboración durante el montaje experimental.

2.8 Literatura citada

Adie B. A., Perez-Perez J., Perez-Perez M. M., Godoy M., Sanchez-Serrano J. J., Schmelz E. A., et al. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19

Anderson J.P., Badruzsaufari. E., Schenk. P., Manners. M., Desmond. O., Ehlert. C., Maclean. D., Ebert. P., Kazan. K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 3460-3479 doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025833>.

Argout, X., Salse, J., Aury, J.M., Guiltinan, M.J., Droc, G., Gouzy, J., Allegre, M. *et al.* (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nat. Genet.* 43, 101–108.

Argout, X., Martin, G., Droc, G., Fouet, O., Labadie, K., Rivals, E., Aury, J.M. *et al.* (2017) The cacao Criollo genome v2.0: an improved version of the genome for genetic and functional genomic studies. *BMC Genom.* 18, 730.

Bailey, B. A., & Meinhardt, L. W. (2016). Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters. *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>.

Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, P. (2007). Signaling in Plant-Microbe Interactions. *Science*. Vol. 276, Issue 5313, pp. 726-733. DOI: 10.1126/science.276.5313.726.

Bari R., Jones J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69: 473–488.

Berrocal-Lobo, M., Molina, A. (2004). Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant-microbe interactions*. Vol.17, Issue 7, pp 763-770.

Chowdhury S, Basu A, Kundu S. (2017). Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases. *PMC. Sci Rep.* 2017 Dec 8;7(1):17251. doi: 10.1038/s41598-017-17248-7.

Chen, W., Lee, M. K., Jefcoate, C., Kim, S. C., Chen, F., & Yu, J. H. (2014). Fungal cytochrome p450 monooxygenases: Their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin. *Genome Biology and Evolution*, 6(7), 1620–1634.

Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies, a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. In *Contributions from the United States National Herbarium* (Vol. 35, pp. 379–614). Washington, DC: Smithsonian Institution.

da Silva, AG., Micheli, F., Fortes C., de Mattos, J.C. (2003), Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. *BioTechniques* 35:494-500.

Enoki, S., y Suzuki, S. (2016). Pathogenesis-Related Proteins in Grape. In *Grape and Wine Biotechnology*. InTech. DOI: 10.5772/64873.

Evangelisti, E., Gogleva, A., Hainaux, T., Doumane, M., Tulin, F., Quan, C., Yunusov, Kévin Floch and Sebastian Schornack. (2017). Time-resolved dual transcriptomics reveal early induced *Nicotiana benthamiana* root genes and conserved infection-promoting *Phytophthora palmivora* effectors. *BMC Biology* 201715:39. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0379-1>.

Falk, A., Feys, B., Frost, L., Jones Jonathan D. G., Daniels, M.J., and Parker, J.E. (1998). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *PNAS*. vol. 96 no. 6 > Anders Falk, 3292–3297, doi: 10.1073/pnas.96.6.3292.

Feechan, A., Turnbull, D., Stevens L.J, Engelhardt, S., Birch PRJ, Hein, I., Gilroy E.M. (2015). The hypersensitive response in PAMP- and effector-triggered immune responses. In AN Gunawardena, PF McCabe, eds, *Plant Programmed Cell Death*. Springer Publishing, pp 235–268

Fister A.S., O'Neil S.T., Shi, Z., Zhang, Y., Tyler B.M., Gultinan M.J., Maximova, S. (2015). Two *Theobroma cacao* genotypes with contrasting pathogen tolerance show aberrant transcriptional and ROS responses after salicylic acid treatment. *J Exp Bot*. 66(20):6245–58.

Fister A. S., Mejia L. C., Zhang Y., Herre E. A., Maximova S. N., Gultinan M. J. (2016). *Theobroma cacao* L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. *BMC Genomics* 17:363 10.1186/s12864-016-2693-3

FEDECACAO. (2017). Programa de investigación en Cacao. [en línea]. Bogotá, D.C. Director de Tecnología, Fedecacao. Disponible en internet: <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/nacionales>.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.0 b40204.135923.

González, A. (2016). Clases de fitopatología avanzada. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

Guest, D. (2007). Black pod: Diverse pathogens with global impact on cacao yield. *Phytopathology*, 97, 1650–1653.

Guillaume, H., Thonart, P., Ongena, M. (2011). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. soc. Environement* 16(2), 257-268

ICCO-Organización Internacional del Cacao (2017). Disponible en: <https://www.icco.org/iscr2017/es.html>.

Infostat. (2017). Versión estudiantil disponible en: <https://www.infostat.com.ar>

Jalali B. L., Bhargava. S., Kamble A. (2006). Signal Transduction and Transcriptional Regulation of Plant Defence Responses. Full publication history. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2006.01073.

Jones PG, Allaway D, Gilmour DM, Harris C, Rankin D, Retzel ER, Jones CA. Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. *Planta*. (2002). 216:255–264.

Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J., and Howe, G.A. (2008). Jasmonate signaling: A conserved mechanism of hormone sensing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 428–435.

Kilaru, A., Bailey, B. A., & Hasenstein, K. H. (2007). *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiology Letters*, 274, 238–244.

Laredo, E. I., Martínez, J.L., Iliná, A., Guillen, L., and Hernández, F. (2017). Application of jasmonic acid as an inducer of plant resistance to pathogens. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.8 Núm.3 01 de abril - 15 de mayo, 2017 p. 673-683.

Legavre L, Ducamp M, Sabau X, *et al.* (2015). Identification of *Theobroma cacao* genes differentially expressed during *Phytophthora megakarya* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 92, 1–13.

Loake y Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol: 10, Issue 5, Pages 466-472. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.008>.

Lujan, F. (2012). Identificación de una secuencia parcial del gen NPR1 en *Persea Americana* var hass “palto”. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.

Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*. Vol. 68:485-512

Menezes S, de Andrade SE, Matos Lima E, Oliveira de Sousa A, Silva Andrade B, Santos Lima Lemos L, Peres Gramacho K, da Silva Gesteira A, Pirovani C, Micheli F. (2014). The pathogenesis-related protein PR-4b from *Theobroma cacao* presents RNase activity, Ca²⁺

and Mg²⁺ dependent- DNase activity and antifungal action on *Moniliophthora perniciosa*. BMC Plant Biol. 2014;14(1):161.

Miranda, F. (1962). Wild cacao in the Lacandona forest, Chiapas, México. Cacao (Turrialba), 7:7. CATIE: Costa Rica.

Mitsuhashi I., Iwai T., Seo S., Yanagawa Y., Kawahigasi H., Hirose S., Ohkawa Y., Ohashi Y. (2008). Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180) Mol. Genet. Genom. ;279: 415–427. doi: 10.1007/s00438-008-0322-9.

Motamayor, J.C., Riesterucci, A.M., López, P. A., Ortiz, C.F., Moreno, A. y Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. Heredity, 89(5), 380-386. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>

Motamayor, J., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J., Loo, R., Kuhn, D., Brown, J., et al. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). PloS One, 3, e3311.

Murillo, J.; Gil, D.; Aguilar, S., Rivera, F. y López, G. (2011). Caracterización molecular de clones de *Theobroma cacao* L., por medio de marcadores moleculares microsatélites. En: Revista Luna Azul, no 32, enero – junio, p. 52 – 60.

Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., Y Niu, D. (2017). Induced Systemic Resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-Dependent Signaling Pathway and Activates PAMP-Triggered Immunity in Arabidopsis. Frontiers in Plant Science. 8: 238. doi: 10.3389/fpls.2017.00238.

Ng. G., Seabolt. S, Zhang. C, Salimian S, Watkins TA, et al. (2011) Genetic dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks in Arabidopsis. Genetics 189: 851–859.

Osorio-Guarin. J., Berdugo-Cely, J., Coronado, R., Yockteng, R. (2017). Colombia a source of cacao genetic diversity as revealed by the population structure analysis of Germplasm bank of *Theobroma cacao* L. Front. Plant Sci.

Palacio, D. Caracterización (Fingerprinting) de clones de *Theobroma cacao* L., de interés comercial de la zona cafetera marginal baja (ZCMB) utilizando marcadores tipo AFLP. (2007). Tesis Magister en Ciencias Biológicas. Bogotá: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas. p. 6 – 55.

Penninckx IAMA., Thomma BPHJ., Buchala A, Métraux J-P, Broekaert WF. (1998). Cooperative activation of jasmonate and ethylene response pathways in parallel is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. Plant Cell. 1998; 10:2103–2114.

Pieterse, C. M. J. y Van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defense pathways. Trends Plant Sci. 4, 52–58.

Riveros A, A. S. (2010). Inducción de resistencia en plantas. Interacción planta patógeno. San José, C.R; IICA. AGRIS. ISBN 978-92-9248-185-8

Rodríguez, E.P. Y Vera R, A. (2015). Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora sp.*) en cacao. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica.

Rodríguez, E.P. (2017). Comunicación personal.

Sánchez, R.A., Castro-Mercado, E., Beltrán, E., Reyes de la Cruz, H., García, H. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*. 12(2): 90 – 95

Sanzón, D., Zavaleta, E. (2011). Hypersensitive reaction, a programmed cell death to defend from attack by plants pathogens. *Revista mexicana de fitopatología*. V 4: 29:154-164.

Sawai Y, Tamotsu S, Kuchits K y sakai A. (2010). Effects of wrowth phase and cell density on cryptogein-induced programmed cell death in suspensión-cultured tobacco BY-2 cells: development of a model system for 100% efficient hypersensitive cell death. *Cytologia* 75:389-396.

Shi, Z., Maximova, S., Liu,Y., Verica, J., and Guiltinan, M.(2010). Functional analysis of the *Theobroma cacao* NPR1 gene in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*.10; 2010PMC3095330.

Silva, C. R. S., & Figueira, A. (2005). Phylogenetic analysis of *Theobroma* (*Sterculiaceae*) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 250, 93–104.

Soto-Suárez, M., Restrepo, S., Mosquera, G., Verdier, A., Tohme, J. (2006). Gene expression analysis during cassava defense response to bacterial blight disease. *Rev.Colomb.Biotecnol.*, Volumen 8, Número 2, p. 16-28, 2006. ISSN electrónico 1909-8758. ISSN impreso 0123-3475.

Teixeira PJPL., Costa GGL., Fiorin GL., Pereira GAG., Mondego JMC. Novel receptor-like kinases in cacao contain PR-1 extracellular domains. (2013). *Mol Plant Pathol.*;14(6):602–9.

Teixeira PJPL, Thomazella DPT, Vidal RO, Do Prado PFV, Reis O, Baroni RM, Franco SF, Mieczkowski P, Pereira GAG, Mondego JMC. (2012) The fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* has genes similar to plant *PR-1* that are highly expressed during its interaction with cacao. *Plos One*.

Thomas, E., van Zonneveld, M., Loo, J., Hodgkin, T., Galluzzi, G., & van Etten, J. (2012). Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the neotropics reflect genetic differentiation in Pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. *PLoS One*, 7, e47676. doi:10.1371/ journal. pone.0047676.

Van Loon, L.C., Geraats, B.P.J. Y Linthorst, H.J.M. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 11, 184–191.

Wildermuth, M., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562-565
doi:10.1038/35107108

Yockteng R, Almeida AM, Stephen Y, Thiago A, Hill C, Specht C. (2013). A method for extracting high-quality RNA from Diverse plants for next-generation sequencing and gene Expression analyses. *PROTOCOL NOTE. Applications in Plant Sciences* 2013 1 (12): 1300070.

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

Durante el desarrollo de este trabajo se logró estandarizar una nueva metodología de inoculación eficiente y reproducible de *P. palmivora* en plántulas de *T. cacao* que puede ser usada para identificar el grado de respuesta diferencial entre genotipos de cacao.

Se determinó que existe una respuesta diferencial a nivel fenotípico y molecular entre los dos genotipos usados genotipo susceptible CCN-51 y genotipo tolerante SCA-6, que se hace más significativa a partir de las 48 hpi. Sin embargo, es necesario dilucidar el cambio de etapa biotrófica a necrotrófica en el patógeno.

Fue posible evidenciar, que a nivel molecular se presentan diferentes tipos de interacciones compatibles e incompatibles en los dos genotipos de cacao a la infección de *P. palmivora* y que están relacionadas con la activación de distintos genes de las vías del ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno.

3.2 Recomendaciones

Es preciso evaluar el protocolo de inoculación desarrollado en diferentes órganos de la planta para establecer si existe una relación positiva con lo encontrado en las hojas, adicionalmente se sugiere probar este protocolo de inoculación en otros genotipos con diferente grado de respuesta a la planta.

Se recomienda evaluar a nivel fenotípico todas las etapas de desarrollo de la enfermedad en diferentes genotipos para lograr estandarizar una escala del progreso de la enfermedad.

Se recomienda realizar estudios de expresión usando técnicas como RNA-seq para identificar genes puntuales implicados en la expresión diferencial en la interacción *T. cacao*-*P. palmivora*.

Se ha encontrado en patógenos como *Moniliophthora perniciosa* en cacao, un aumento en su crecimiento en presencia de niveles elevados de AS, Por ende, se recomienda estudiar

si el aumento de AS favorece el crecimiento, colonización y patogenicidad de *P. palmivora* en varios genotipos de *T. cacao*.

A. Anexo: Análisis de varianza fenotípico.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
data6	19	0.72	0.53	69.17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.01	7	8.0E-04	3.95	0.0212
genotipo6	0.01	7	8.0E-04	3.95	0.0212
Error	2.2E-03	11	2.0E-04		
Total	0.01	18			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04911

Error: 0,0002 gl: 11

genotipo6	Medias	n	E.E.
CCN51 T0	0.01	3	0.01 A
CCN51 T48	0.01	2	0.01 A
SCA6 T48	0.01	2	0.01 A
SCA6 T0	0.02	3	0.01 A
SCA6 T96	0.02	2	0.01 A
CCN51 T24	0.02	3	0.01 A
CCN51 T96	0.02	2	0.01 A B
SCA6 T24	0.07	2	0.01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

B. Anexo: Concentraciones de RNA obtenidas

Nombre de la muestra	[] ng/ μ l	260/280	230/260
CCN 51 mock P1 0 Horas R1	677,2	2	1,11
CCN 51 mock P2 0 Horas R1	274,9	2,16	1,85
CCN 51 mock P3 0 Horas_R1	511,1	1,98	2
CCN 51 inoculado P1 0 Horas R1	338	2,17	2,14
CCN 51 inoculado P2 0 Horas R1	893	2,13	1,92
CCN 51 inoculado P3 0 Horas_R1	348,2	2,03	1,95
SCA6 mock P1 0 horas R1	484,1	2,12	1,66
SCA6 mock P2 0 horas R1	795,9	2,08	2,35
SCA6 mock P3 0 horas R1	221,3	2,11	1,75
SCA6 inoculado P1 0 horas_R1	803,3	2,18	2,23
SCA6 inoculado P2 0 horas R1	450,4	1,99	1,98
SCA6 inoculado P3 0 horas R1	462,6	2,11	2,09
CCN 51 mock P1 24 Horas R1	237,9	2,01	1,4
CCN 51 mock P2 24 Horas R1	277,5	2,17	1,85
CCN 51 mock P3 24 Horas_R1	479	2,18	2,31
CCN 51 inoculado P1 24 Horas R1	504,9	2,18	2,18
CCN 51 inoculado P2 24 Horas R1	503,8	2,14	2,11
CCN 51 inoculado P3 24 Horas_R1	266,5	2,09	2,12
SCA6 mock P1 24 horas R1	524,2	2,11	1,51
SCA6 mock P2 24 horas R1	829,6	2,06	2,15
SCA6 mock P3 24 horas R1	489,6	2,1	2,16
SCA6 inoculado P1 24 horas_R1	546,8	2,17	2,25
SCA6 inoculado P2 24 horas R1	690,8	2	1,5
SCA6 inoculado P3 24 horas R1	274,8	2	1,13
CCN 51 mock P1 48 Horas R1	983,1	2,1	1,71
CCN 51 mock P2 48 Horas R1	469,8	2,1	2,01
CCN 51 mock P3 48 Horas_R1	406,1	2,11	2,16

CCN 51 inoculado P1 48 Horas R1	1200,4	2,13	2,11
CCN 51 inoculado P2 48 Horas R1	1042,4	2	1,11
CCN 51 inoculado P3 48 Horas_R1	331,4	2,06	2,12
SCA6 mock P1 48 horas R1	790,2	2,11	1,84
SCA6 mock P2 48 horas R1	263,8	1,99	2
SCA6 mock P3 48 horas R1	668,8	2,09	2,38
SCA6 inoculado P1 48 horas_R1	630,3	2,17	2,2
SCA6 inoculado P2 48 horas R1	741,7	2,18	2,12
SCA6 inoculado P3 48 horas R1	293,8	2,11	1,58
CCN 51 mock P1 96 Horas R1	485	2,04	1,61
CCN 51 mock P2 96 Horas R1	289,3	2,15	1,63
CCN 51 mock P3 96 Horas_R1	884,7	2,1	1,94
CCN 51 inoculado P1 96 Horas R1	670,3	2	1,42
CCN 51 inoculado P2 96 Horas R1	519,2	2,09	2,41
CCN 51 inoculado P3 96 Horas_R1	1603,2	2	1,81
SCA6 mock P1 96 horas R1	908,6	1,99	1,39
SCA6 mock P2 96 horas R1	578	2	1,04
SCA6 mock P3 96 horas R1	220,8	2,06	2,15
SCA6 inoculado P1 96 horas_R1	177,6	2,02	2,15
SCA6 inoculado P2 96 horas R1	801,4	2,06	2,11
SCA6 inoculado P3 96 horas R1	285,1	2,13	1,56
CCN 51 mock P1 0 Horas R2	356,1	2,08	1,49
CCN 51 mock P2 0 Horas R2	714,6	2,03	1,45
CCN 51 mock P3 0 Horas_R2	612,3	2,18	2,06
CCN 51 inoculado P1 0 Horas R2	547,1	2,1	1,53
CCN 51 inoculado P2 0 Horas R2	198,8	2,07	1,6
CCN 51 inoculado P3 0 Horas_R2	555,6	2,13	2,19
SCA6 mock P1 0 horas R2	544,7	1,98	1,19
SCA6 mock P2 0 horas R2	366,1	2,1	2,19
SCA6 mock P3 0 horas R2	420,6	2,11	2,1
SCA6 inoculado P1 0 horas_R2	405,3	2,08	1,95
SCA6 inoculado P2 0 horas R2	393,2	2,07	1,83
SCA6 inoculado P3 0 horas R2	531,1	2,08	2,35
CCN 51 mock P1 24 Horas R2	483	2,04	1,58
CCN 51 mock P2 24 Horas R2	322,9	2,13	2,15
CCN 51 mock P3 24 Horas_R2	769,5	2,17	2,3
CCN 51 inoculado P1 24 Horas R2	519,2	2,12	1,85
CCN 51 inoculado P2 24 Horas R2	1424,5	2,04	1,69
CCN 51 inoculado P3 24 Horas_R2	300,1	2,07	2,15
SCA6 mock P1 24 horas R2	565,3	2,17	1,86
SCA6 mock P2 24 horas R2	542,9	2,04	2,2
SCA6 mock P3 24 horas R2	300,1	2,07	2,15

SCA6 inoculado P1 24 horas_R2	347,9	2,07	2
SCA6 inoculado P2 24 horas R2	194,1	2,01	2,23
SCA6 inoculado P3 24 horas R2	730,3	2,12	2,11
CCN 51 mock P1 48 Horas R2	586,5	2,1	1,67
CCN 51 mock P2 48 Horas R2	1189,3	2,14	2,04
CCN 51 mock P3 48 Horas_R2	227,8	2,08	2,5
CCN 51 inoculado P1 48 Horas R2	572,8	2,08	2,02
CCN 51 inoculado P2 48 Horas R2	688,9	2	1,64
CCN 51 inoculado P3 48 Horas_R2	2133,3	1,97	1,83
SCA6 mock P1 48 horas R2	804,6	2,03	1,17
SCA6 mock P2 48 horas R2	647,3	2,19	2
SCA6 mock P3 48 horas R2	294,2	2,09	2,1
SCA6 inoculado P1 48 horas_R2	392	2,08	2,09
SCA6 inoculado P2 48 horas R2	189,2	2,12	2,04
SCA6 inoculado P3 48 horas R2	360,1	2,11	2,04
CCN 51 mock P1 96 Horas R2	344	2,07	1,53
CCN 51 mock P2 96 Horas R2	1588,3	2	1,05
CCN 51 mock P3 96 Horas_R2	301,8	2,03	2,27
CCN 51 inoculado P1 96 Horas R2	428,1	2,12	2,11
CCN 51 inoculado P2 96 Horas R2	388,4	2,13	2,06
CCN 51 inoculado P3 96 Horas_R2	325,6	2	1,41
SCA6 mock P1 96 horas R2	903	1,99	1,25
SCA6 mock P2 96 horas R2	715,4	2,13	1,92
SCA6 mock P3 96 horas R2	135,8	2,19	1,86
SCA6 inoculado P1 96 horas_R2	244,6	2	1,57
SCA6 inoculado P2 96 horas R2	220,8	2,06	2,15
SCA6 inoculado P3 96 horas R2	559,8	2,13	2,36
CCN 51 mock P1 0 Horas R3	314,4	2,11	1,68
CCN 51 mock P2 0 Horas R3	1004,8	2	1,01
CCN 51 mock P3 0 Horas_R3	262,1	2,04	2,28
CCN 51 inoculado P1 0 Horas R3	1241,8	2,05	2,49
CCN 51 inoculado P2 0 Horas R3	237,4	2,06	2,34
CCN 51 inoculado P3 0 Horas_R3	189,2	2,12	2,04
SCA6 mock P1 0 horas R3	786,4	2	1,28
SCA6 mock P2 0 horas R3	1139,4	2,02	1,82
SCA6 mock P3 0 horas R3	347,8	2,07	2,25
SCA6 inoculado P1 0 horas_R3	324,1	2,03	1,77
SCA6 inoculado P2 0 horas R3	420,6	2,11	2,1
SCA6 inoculado P3 0 horas R3	555,3	2,19	2,26
CCN 51 mock P1 24 Horas R3	318,6	2,09	1,46
CCN 51 mock P2 24 Horas R3	1064,4	2	1,84

CCN 51 mock P3 24 Horas_R3	288,6	2,05	2,27
CCN 51 inoculado P1 24 Horas R3	1356,8	2,15	2,01
CCN 51 inoculado P2 24 Horas R3	630,3	2	1,6
CCN 51 inoculado P3 24 Horas_R3	879,3	2,04	1,86
SCA6 mock P1 24 horas R3	1207,1	2	1,28
SCA6 mock P2 24 horas R3	504,8	2,15	2,03
SCA6 mock P3 24 horas R3	251,9	2,14	1,15
SCA6 inoculado P1 24 horas_R3	721,3	2,16	2,18
SCA6 inoculado P2 24 horas R3	438,3	2,07	2,09
SCA6 inoculado P3 24 horas R3	269,3	2,1	1,47
CCN 51 mock P1 48 Horas R3	338,6	2,1	1,23
CCN 51 mock P2 48 Horas R3	514,5	2,07	2,66
CCN 51 mock P3 48 Horas_R3	563,6	2,09	2,41
CCN 51 inoculado P1 48 Horas R3	261	2,13	1,98
CCN 51 inoculado P2 48 Horas R3	655,9	2,12	2,05
CCN 51 inoculado P3 48 Horas_R3	472,3	2,1	1,97
SCA6 mock P1 48 horas R3	451,1	2,15	1,66
SCA6 mock P2 48 horas R3	951,4	2	1,34
SCA6 mock P3 48 horas R3	251,8	2,15	1,83
SCA6 inoculado P1 48 horas_R3	383,6	2,11	2,12
SCA6 inoculado P2 48 horas R3	357,3	2,13	2,05
SCA6 inoculado P3 48 horas R3	471,5	2,05	2,04
CCN 51 mock P1 96 Horas R3	277	2,14	1,4
CCN 51 mock P2 96 Horas R3	197,7	2,14	2,07
CCN 51 mock P3 96 Horas_R3	321,5	2,11	2,08
CCN 51 inoculado P1 96 Horas R3	712,4	2	1,25
CCN 51 inoculado P2 96 Horas R3	708,5	2,08	2,26
CCN 51 inoculado P3 96 Horas_R3	202,8	2,09	2,03
SCA6 mock P1 96 horas R3	614,7	2,07	1,61
SCA6 mock P2 96 horas R3	1112,3	2	1,86
SCA6 mock P3 96 horas R3	225,1	2,14	1,57
SCA6 inoculado P1 96 horas_R3	394,5	2,06	1,85
SCA6 inoculado P2 96 horas R3	1073,7	2,11	2,22
SCA6 inoculado P3 96 horas R3	841	2,12	2,35

C. Anexo: Regresión lineal de la amplificación en diluciones seriadas de los dos controles endógenos



D. Análisis de varianza genotípico

- Análisis de varianza marcador del gen EDS 1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Data	24	0,81	0,71	25,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,5E-03	8	5,6E-04	8,20	0,0003
Genotipo	4,5E-03	8	5,6E-04	8,20	0,0003
Error	1,0E-03	15	6,8E-05		
Total	0,01	23			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02731

Error: 0,0001 gl: 15

Genotipo	Medias	n	E.E.	
CCN51 T0	0,01	3	4,8E-03	A
SCA6 T96	0,02	3	4,8E-03	A
CCN51 T24	0,03	3	4,8E-03	A B
SCA6 T0	0,03	3	4,8E-03	A B
SCA6 T48	0,03	3	4,8E-03	A B
CCN51 T48	0,04	3	4,8E-03	A B C
SCA6 T24	0,04	2	0,01	B C
SCA6 T25	0,04	1	0,01	B C
CCN51 T96	0,06	3	4,8E-03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- Análisis de varianza marcador del gen SID2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Data	24	0,81	0,71	25,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,5E-03	8	5,6E-04	8,20	0,0003
Genotipo	4,5E-03	8	5,6E-04	8,20	0,0003
Error	1,0E-03	15	6,8E-05		
Total	0,01	23			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02731

Error: 0,0001 gl: 15

Genotipo	Medias	n	E.E.	
CCN51 T0	0,01	3	4,8E-03	A
SCA6 T96	0,02	3	4,8E-03	A
CCN51 T24	0,03	3	4,8E-03	A B
SCA6 T0	0,03	3	4,8E-03	A B
SCA6 T48	0,03	3	4,8E-03	A B
CCN51 T48	0,04	3	4,8E-03	A B C
SCA6 T24	0,04	2	0,01	B C
SCA6 T25	0,04	1	0,01	B C
CCN51 T96	0,06	3	4,8E-03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- **Análisis de varianza marcador del gen Tc_1PR1SA**

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
data	18	0,48	0,12	109,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,28	7	0,04	1,34	0,3238
Genotipo	0,28	7	0,04	1,34	0,3238
Error	0,29	10	0,03		
Total	0,57	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,61551

Error: 0,0294 gl: 10

Genotipo	Medias	n	E.E.
SCA6 T0	0,00	3	0,10 A
CCN51 T0	1,6E-04	2	0,12 A
CCN51 T24	0,05	2	0,12 A
SCA6 T24	0,17	2	0,12 A
SCA6 T96	0,19	3	0,10 A
SCA6 T48	0,28	2	0,12 A
CCN51 T48	0,30	2	0,12 A
CCN51 T96	0,33	2	0,12 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- **Análisis de varianza marcador del gen PR4/HEL-EF**

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
data	20	0,37	0,00	210,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,85	7	0,12	1,00	0,4788
genotipo	0,85	7	0,12	1,00	0,4788
Error	1,47	12	0,12		
Total	2,32	19			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,15505

Error: 0,1222 gl: 12

genotipo	Medias	n	E.E.
SCA6 T0	2,6E-04	2	0,25 A
CCN51 T0	6,0E-04	3	0,20 A
SCA6 T24	2,0E-03	2	0,25 A
CCN51 T24	0,01	2	0,25 A
SCA6 T96	0,06	3	0,20 A
SCA6 T48	0,15	2	0,25 A
CCN51 T96	0,42	3	0,20 A
CCN51 T48	0,52	3	0,20 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- **Análisis de varianza marcador del gen 8JAZ-JA**

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
data5	19	0.66	0.45	52.47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.08	7	0.01	3.11	0.0454
genotipo5	0.08	7	0.01	3.11	0.0454
Error	0.04	11	3.5E-03		
Total	0.11	18			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20280

Error: 0,0035 gl: 11

genotipo5	Medias	n	E.E.		
CCN51 T48	0.05	2	0.04	A	
SCA6 T0	0.06	2	0.04	A	
CCN51 T0	0.07	3	0.03	A	B
CCN51 T24	0.08	2	0.04	A	B
SCA6 T96	0.10	3	0.03	A	B
CCN51 T96	0.12	2	0.04	A	B
SCA6 T48	0.16	3	0.03	A	B
SCA6 T24	0.26	2	0.04		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- Análisis de varianza marcador del gen COI

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
data6	19	0.72	0.53	69.17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.01	7	8.0E-04	3.95	0.0212
genotipo6	0.01	7	8.0E-04	3.95	0.0212
Error	2.2E-03	11	2.0E-04		
Total	0.01	18			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04911

Error: 0,0002 gl: 11

genotipo6	Medias	n	E.E.	
CCN51 T0	0.01	3	0.01	A
CCN51 T48	0.01	2	0.01	A
SCA6 T48	0.01	2	0.01	A
SCA6 T0	0.02	3	0.01	A
SCA6 T96	0.02	2	0.01	A
CCN51 T24	0.02	3	0.01	A
CCN51 T96	0.02	2	0.01	A B
SCA6 T24	0.07	2	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- Análisis de varianza marcador del gen ERF-ET

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Data	19	0,72	0,53	69,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	7	8,0E-04	3,95	0,0212
Genotipo/ERF	0,01	7	8,0E-04	3,95	0,0212
Error	2,2E-03	11	2,0E-04		
Total	0,01	18			

Test:Bonferroni Alfa=0,05 DMS=0,05462|

Error: 0,0002 gl: 11

Genotipo/ERF	Medias	n	E.E.
SCA6 T24	0,07	2	0,01 A
CCN51 T96	0,02	2	0,01 A B
CCN51 T24	0,02	3	0,01 A B
SCA6 T96	0,02	2	0,01 A B
SCA6 T0	0,02	3	0,01 B
SCA6 T48	0,01	2	0,01 B
CCN51 T48	0,01	2	0,01 B
CCN51 T0	0,01	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- **Análisis de varianza marcador del gen EIN3-E**

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
data2	17	0,55	0,20	70,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26,23	7	3,75	1,59	0,2545
genotipo2	26,23	7	3,75	1,59	0,2545
Error	21,26	9	2,36		
Total	47,49	16			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,77961

Error: 2,3627 gl: 9

genotipo2	Medias	n	E.E.
CCN51 T0	0,21	2	1,09 A
SCA6 T0	0,44	2	1,09 A
CCN51 T24	1,25	2	1,09 A
CCN51 T48	2,42	2	1,09 A
CCN51 T96	2,54	2	1,09 A
SCA6 T96	2,91	3	0,89 A
SCA6 T24	3,35	2	1,09 A
SCA6 T48	3,91	2	1,09 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- **Análisis de varianza marcador del gen PR3-06g000490**

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
data	19	0,91	0,86	28,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29,12	7	4,16	16,18	0,0001
Genotipo/PR3	29,12	7	4,16	16,18	0,0001
Error	2,83	11	0,26		
Total	31,94	18			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,74439

Error: 0,2570 gl: 11

Genotipo/PR3	Medias	n	E.E.	
SCA6 T24	3,71	3	0,29	A
SCA6 T0	3,60	2	0,36	A
SCA6 T48	1,76	2	0,36	B
CCN51 T24	1,67	2	0,36	B
CCN51 T0	1,53	3	0,29	B
CCN51 T48	0,64	2	0,36	B
SCA6 T96	0,51	3	0,29	B
CCN51 T96	0,42	2	0,36	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bibliografía

Castellanos O, Torres L, Fonseca S, Montanez V, Sánchez A. (2007). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de cacao-chocolate en Colombia. Grupo de Investigación y Desarrollo en Gestión, Productividad y Competitividad - Biogestión, Universidad Nacional de Colombia; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - MADR, Bogota.

Chisholm S., Coaker G., Day, B. y Staskawicz, B. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-804

Collinge, B., Gregersen, P., Thordal-Christensen, H. (1994). The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In *Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches*. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.

FEDECACAO. (2017). Programa de investigación en Cacao. [en línea]. Bogotá, D.C. Director de Tecnología, Fedecacao. Disponible en internet: <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/nacionales>

Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic And Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205-227

Harrison M.J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:19-42.

Hutcheson, SW. (1998). Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36:59-90.

Jones J.; J. Dangl. The plant immune system. *Nature* 444:323-329. EE.UU. (2006). Lopez M. Martins E. 2005. Principales doencas do cacauero no Brasil. Ilheus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. p 132

Laredo, E. I., Martínez, J.L., Iliná, A., Guillen, L., and Hernández, F. (2017). Application of jasmonic acid as an inducer of plant resistance to pathogens. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.8 Núm.3 01 de abril - 15 de mayo, 2017 p. 673-683.

Lobo, A. (2006). "Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual."

- López C. E. (2007). Fitopatología Molecular. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Biología. p39.
- Monaghan J. y C. Zipfel. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in plant Biology* Volume 15, issue 4, August. Pages 349-357. United Kingdom
- Morrissey, J. and Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 708-715
- Mur L. A. J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140 249–262 10.1104/pp.105.07234
- Mysore, K.; Ryu C. (2004). Nonhost resistance: How much do we know?. *TRENDS in Plant Science*. 9: 2. EE.UU.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt Iii, B. F. and Dangl, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 579-609
- Ordeñana, K. M. (2002) “Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno” *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 63 p. 22 – 32.
- Pieterse C. M. J., Dicke M. (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci.* 12 564–569 10.1016/j.tplants.2007.09.004
- Rodríguez-Polanco, E. (2017). Comunicación personal.
- Rodríguez, E.P. Y Vera R, A. (2015). Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* sp.) en cacao. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica.
- Schulze-iefert P. y Panstruga R. (2011). —A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends Plant Science*. 16: 117-125. Alemania
- Thatcher, L. F., Anderson, J. P. and Singh, K. B. (2005). Plant defence responses: what have we le RNAt from Arabidopsis *Functional Plant Biology*, 32(1), 1-19.
- Thomma B.; T. Nurnberger; M. Joosten. 2011. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell* 23: 4 -15. Holanda.
- Wiermer, M., Feys, B. J. and Parker, J. E. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 383-389

