

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**



**"RESPUESTA FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE
TRES CULTIVARES DE CACAO (*Theobroma cacao*)
AL ESTRÉS HÍDRICO"**

Presentada por:

RODOLFO EUSTAQUIO HUERTA GUILLÉN

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**

Lima - Perú

2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**

**"RESPUESTA FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE
TRES CULTIVARES DE CACAO (*Theobroma cacao*)
AL ESTRÉS HÍDRICO"**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

RODOLFO EUSTAQUIO HUERTA GUILLÉN

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado

Mg.Sc. Julian Chura Chuquiya
PRESIDENTE

Dra. Luz Gómez Pando
ASESOR

Dr. Alberto Julca Otiniano
MIEMBRO

Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

Dedicada

“...Here’s to the ones who dream

Foolish, as they may seem

Here’s to the hearts that ache

Here’s to the mess we make...”

The fools who dream – La La Land

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a las siguientes personas e instituciones, que de una u otra forma han colaborado en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Patricia Sheen y al Dr. Mirko Zimic, por su apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, así como el agradecimiento a todo su equipo de investigación.

A la Dra. Luz Gomez, por compartir sus conocimientos conmigo y por su gran disposición para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

Al Dr Wilfredo Gonzales, por la colaboración en la proporción de sus equipos y ambientes para la evolución fisiológica de las plantas.

Al Instituto de Cultivos Tropicales - Tarapoto (ICT) y a al agricultor Cesar Patiño de la asociación de pequeños productores de cacao – Palo Blanco, Piura por el apoyo que me brindaron al proporcionarme el material vegetal necesario para la ejecución de la investigación.

A mi familia y mi ¡Lili bella!, por su inmenso amor incondicional hacia mí.

A todos muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

I	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivo general	3
1.2	Objetivos específicos	3
II	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1	Características generales del cultivo de cacao	4
2.1.1	Inflorescencia y polinización	4
2.1.2	Fruto	5
2.1.3	Raíz	5
2.1.4	Requerimientos ambientales	6
2.1.4.1	Temperatura	6
2.1.4.2	Precipitación	7
2.2	Origen y distribución	7
2.3	Porcelana de Piura	7
2.3.1	Descriptores de identidad	8
2.3.2	Descriptores morfológicos	8
2.3.3	Descriptores agronómicos	8
2.3.4	Descriptores industriales	9
2.3.5	Condiciones climáticas	9
2.3.5.1	Precipitación	9
2.3.5.2	Temperatura	10
2.3.5.3	Humedad relativa (HR)	10
2.4	Efecto de la sequía en plantas	10
2.4.1	Respuesta fisiológica	10
2.4.1.1	Ajuste osmótico	11
2.4.1.2	Fotosíntesis	11
2.4.1.3	El ácido abscísico (ABA) y el comportamiento estomático	12
2.4.2	Respuesta Molecular	13
2.4.2.1	Fotosistema II (PSII)	13
2.4.2.2	Modo de acción molecular del ácido abscísico (ABA)	15
III	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1	Ubicación	18
3.2	Material vegetal	18
3.3	Unidad experimental	18
3.4	Condiciones de crecimiento y tratamientos	19
3.5	Impacto de la sequía en las variables fisiológicas	20
3.5.1	Potencial hídrico foliar (Ψ_w)	20
3.5.2	Eficiencia fotoquímica máxima (Fv/Fm)	20
3.5.3	Contenido de clorofila (C _{lof})	20
3.5.4	Tamaño y densidad de estomas	21
3.6	Impacto de la sequía en expresión genética	21
3.7	Diseño experimental y análisis estadístico	22

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Efecto de la sequia en las variables fisiológicas.....	24
4.2 Efecto de la sequia en la expresión genética	28
V CONCLUSIONES	31
VI RECOMENDACIONES	32
VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
VIII ANEXOS.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Precipitación promedio en la región Piura. Fuente: ANA (2012).....	9
Tabla 2 Lista de Variedades	18
Tabla 3 Fuentes de variación para el diseño completamente aleatorio con arreglo factorial	22
Tabla 4 Fuentes de variación del diseño completamente aleatorio	23
Tabla 5 Cambios en la eficiencia fotosintética (Fm/Fv), contenido de clorofila (C _{lof}) y el potencial hídrico foliar (Ψ_w) para las variedades de cacao (ICS_1, PP, P7) al ser sometidos al tratamiento sin estrés hídrico (SH) y con estrés hídrico (EH). Los valores corresponden a la media \pm error estándar.....	26
Tabla 6 Ranking de susceptibilidad a la sequía. Diferencia de medias (Δ) del tratamiento sin estrés hídrico (SH) menos estrés hídrico (EH) para la eficiencia fotosintética (Fm/Fv), cantidad de clorofila (C _{lof}) y potencial hídrico foliar (Ψ_w) calculado para los tres genotipos. Si el resultado de la suma de las diferencias es más cercano a cero la variedad se clasifica con menor ranking. A menor ranking se considera menor efecto de la sequía.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la flor de cacao. Fuente: Enríquez (1985).....	5
Figura 2. Ubicación y distribución de los países productores de cacao. Fuente: Gomez (2014).....	6
Figura 3. Distribución de plantas y condiciones hídricas.....	19
Figura 4. Correlación entre densidad y tamaño de estomas para las 3 variedades de cacao de las plantas no sometidas a sequía. La regresión lineal (línea puntea), su coeficiente de regresión cuadrado (R^2), ecuación y nivel significancia (p) calculados son mostrados.	28
Figura 5. Variación de los niveles de expresión relativa representado para cada gen (HAI, PsbA, PsbO, PLIP2, PLIP3) y entre las variedades de cacao (ICS_1, PP, P7) en respuesta a la condición de estrés hídrico. Valores positivos de la expresión relativa indica incremento del gen mientras que valores negativos disminución. La expresión relativa fue calculada según el método livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) y están representado en el eje Y a una escala \log_2 . En la expresión de cada gene evaluado las plantas sin sequia fueron se usaron como el calibrador y el gen actina de referencia. Cada barra muestra la media. Diferentes letras en las barras expresan que las medias son significativamente distintas ($p < 0.05$) determinado por el test de Duncan.	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Medición de potencial hídrico foliar	54
Anexo 2.	Protocolo hibrido (Kit RNeasy Mini/CTAB) de extracción de RNA de hojas frescas cacao.....	55
Anexo 3.	Pares de sondas usadas en el qPCR.....	58
Anexo 4.	Método de cuantificación para evaluar el nivel de expresión relativa de los genes PsbA, PsbO, HAI-1, PLIP2 y PLIP3 en las variedades de cacao POUND_7 (P7), ICS_1 y Porcelana de Piura (PP).....	59
Anexo 5.	Salidas del diseño completamente aleatorio con arreglo factorial	60
Anexo 6.	Salidas para el diseño completamente aleatorio	66

ABREVIATURAS

Área	: A
Clorofila	: Clo
Densidad	:D
Diferencia de medias	: Δ
Eficiencia fotoquímica máxima	: Fv/Fm
El ácido abscísico	: ABA
Especies reactivas de oxígeno	: ROS
Estrés hídrico	:EH
Fotosistema I	: PSI
Fotosistema II	: PSII
Humedad relativa	: HR
Porcelana de Piura	: PP
Potencial de presión	: Ψ_p
Potencial hídrico foliar	: Ψ_w
Potencial osmótico	: Ψ_s
POUND_7	: P7
Sin estrés hídrico	: SH

RESUMEN

En el Perú el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*) se ha venido expandiendo como alternativa al cultivo de la coca. Sin embargo, las catástrofes ambientales tales como la sequía que se viene incrementando en todo el mundo y las predicciones desfavorables, sobre el futuro desabastecimiento de cacao por problemas en la disponibilidad del agua, exige reconocer y desarrollar variedades que usen de forma más eficiente este recurso. Por ello, el objetivo de la investigación fue explicar la adaptabilidad de la variedad nativa de cacao Porcelana de Piura (PP), cultivada tradicionalmente en condiciones con escasa dotación de agua. Para lo cual, se evaluó la respuesta fisiológica y molecular de PP y se comparó con las variedades ICS_1 y POUND_7 (P7), tolerante y susceptible al Estrés hídrico (EH), respectivamente. Esta investigación demostró, que la variedad PP fue la menos afectada al tratamiento con EH cual presentó el menor efecto en los parámetros diferencial de potencial hídrico foliar ($\Delta\Psi_w = 2.07$) y diferencial de eficiencia fotoquímica máxima ($\Delta F_v/F_m = -0.023$), en comparación, con la variedad ICS_1 ($\Delta\Psi_w = 7.06$ y $\Delta F_v/F_m = 0.042$) y P7 ($\Delta\Psi_w = 3.62$ y $\Delta F_v/F_m = -0.017$). Además, la reducción e incremento del área (A) y densidad estomática (D), respectivamente mostraron estomas más eficientes para responder de PP al EH en la presente investigación. En conclusión, la expresión de los genes HAI-1 y PLIP2 permitió proteger y regular, de forma más eficiente, la respuesta de PP al EH.

Palabras claves: *Theobroma cacao*, Porcelana de Piura, estrés hídrico.

ABSTRACT

In Perú, cacao (*Theobroma cacao*) cultivation has been expanding as an alternative to coca cultivation. However, environmental catastrophes such as the increasing drought around the world and unfavorable predictions of the future shortage of cocoa due to water deficiency require the recognition and development of varieties that use this supplied. Therefore, the objective of the current research was to explain the adaptive capacity of the native variety of cacao Porcelana de Piura (PP), traditionally cultivated in conditions with short water supply. The physiological and molecular response of PP was evaluated and compared with the varieties ICS_1 and POUND_7 (P7), which were tolerant and susceptible to water stress (WS), respectively. Results showed that the variety PP was the less affected by the WS treatment, resulting in less effect in parameters leaf water potential differential ($\Delta\Psi_w = 2.07$) and maximum photochemical efficiency differential ($\Delta F_v/F_m = -0.023$) than varieties ICS_1 ($\Delta\Psi_w = 7.06$ y $\Delta F_v/F_m = 0.042$) and P7 ($\Delta\Psi_w = 3.62$ y $\Delta F_v/F_m = -0.017$). Also, the reduction and increase of the stomatal area (A) and density (D), respectively, shows more efficient stomata to respond the WS treatment by variety PP. In conclusion, the expression of the HAI-1 and PLIP2 genes, allowed protect and regulate more efficiently the response of PP to WS.

Keywords: *Theobroma cacao*, Porcelana de Piura, water stress

I INTRODUCCIÓN

La sequía es uno de los desastres naturales más catastrófico, complejo y poco entendido que afecta enormemente la producción de alimentos en el mundo. Los datos del The International Disasters Database (EM-DAT) (He *et al.* 2011) muestran que del total de desastres naturales producidos la sequía representa solo el 5%. Sin embargo, en función de todas las pérdidas socioeconómicas causadas por los desastres naturales el 30% se debe a las sequías.

El porcentaje del mundo afectado por sequía extrema aumentará del 1% al 30% para fines del siglo XXI. De igual modo aumentarán en la cantidad de eventos, en severidad y en duración (Burke *et al.* 2006). Las áreas de agricultura globalmente propensas a la sequía se han incrementado significativamente de 16.97% en 1902-1949 a 41.09% en 1950-2008 (Wang *et al.* 2014). La región tropical y subtropical de Sudamérica son altamente susceptible a la sequía. Entre 2015-2016, ambas regiones se vieron afectadas por intensas sequías con consecuencias eco hidrológicas y socioeconómicas más graves e intensas que las sequías del 2005 y 2010 (Erfanian *et al.* 2017). Los datos del experimento científico ECOSTRESS (Ecosystem Spaceborne Thermal Radiometer Experimento on Space Station) han señalado que los incendios forestales producidos en el Amazonas en el 2019 estarían confinados principalmente dentro de las áreas del bosque con alta deficiencia de agua (NASA 2020). Por lo tanto, las sequías podrían llevar a perder importantes ecosistemas necesarios para equilibrio ecológico e influir con el aumento de la inseguridad alimentaria.

El chocolate es reportado como uno de los alimentos más deseados probablemente por: su buen sabor, la respuesta neurológica de placer causado por sus ingredientes y su asociación con situaciones agradables (Pelchat 1997; Weingarten y Elston 1991). De tal manera, que su consumo continúa creciendo en todo el mundo año tras año. El principal ingrediente para la elaboración del chocolate y responsable de su cautivador sabor es el cacao (*Theobroma cacao*). El cacao es uno de los commodities agrícolas más valiosos del mundo y es cultivado por aproximadamente seis millones de pequeños agricultores alrededor del mundo (Baligar *et al.* 2008).

En África occidental se encuentra alrededor del 70 % de la producción mundial del cacao (International Cocoa 2013). Mientras que el 18% de la producción mundial del cacao se realiza en América (International Cocoa 2014). Resaltando sobre todo Sudamérica por sus cacaos finos de aroma. Los cuales son producidos principalmente por el Perú (MINAGRI 2016).

Si bien se observa una demanda creciente del cacao, hay una disminución continua en el rendimiento del cultivo por efectos climáticos adversos. La sequía es uno de los factores limitante del incremento y el nivel productivo de las plantaciones de cacao ya que gran parte de ellos dependen en gran medida del suministro regular de agua de la lluvia (Balasimha *et al.* 1988; Abo-Hamed *et al.* 1985; Belsky y Siebert 2003; Mohd Razi *et al.* 1992; Wood y Lass 2008). Las predicciones para el 2050 han mostrado que el cultivo de cacao en el continente productor más grande del mundo (África) probablemente se verá seriamente afectado por el impacto del cambio climático (Läderach *et al.* 2013; Schroth *et al.* 2016). Además, los constantes eventos de sequía reportados en Sudamérica pondrían aún más en peligro porque no solo afectan la producción y calidad sino la diversidad del cacao, porque al norte del continente en el alto amazonas, los bosques lluviosos son el centro de la mayor diversidad de las poblaciones naturales de cacao (Loor Solorzano *et al.* 2012; Motamayor *et al.* 2002, 2008; Thomas *et al.* 2012).

Considerando la importancia del cacao en la economía de los agricultores de pequeña escala que lo producen y su valor como cultivo alternativo a la coca se hace necesario desarrollar variedades con tolerancia a la sequía y mayor eficiencia de uso de agua considerando las predicciones desfavorables sobre el futuro desabastecimiento de cacao a causa del aumento de las sequías. Para lograr este gran objetivo se requiere evaluar los niveles de tolerancia a la sequía del material genético disponible en el Perú. -. La gran variedad de climas del Perú determina la existencia de diversidad genética en el cacao; especialmente en el norte cerca al alto amazonas, considerado el centro de origen y domesticación del cacao (Loor Solorzano *et al.* 2012; Motamayor *et al.* 2002, 2008; Thomas *et al.* 2012; Zarrillo *et al.* 2018). Entre el material genético disponible destaca la variedad nativa de cacao conocida como Porcelana de Piura (PP), la cual crece en condiciones climáticas contrastantes durante su ciclo de vida. La región es tropical árida, calurosa todo el año, con precipitaciones escasas menores a 100 mm por año, con una distribución irregular de lluvias, periodos muy secos y otros con lluvias torrenciales, acentuados por el fenómeno del niño (Moscol Saavedra y Espinoza Tamariz 2012). En

este aspecto, la aplicación de agua para suplir las necesidades hídricas deficitarias del cultivo son necesarias. El riego proporcionado, deberá ser oportuno para garantizar la realización plena de las funciones fisiológicas de crecimiento, producción y óptimo resultado económico del cultivo de cacao (Pinzón y Rojas 2007). Pero, todavía los agricultores presentan limitaciones con el uso del agua debido a la carencia de reservorios adecuados para el almacenamiento, la falta de prácticas adecuadas de riegos y al aumento escases de agua por el cambio climaticos. A pesar de ello, bajo estas condiciones contrastantes, el PP mantiene su rendimiento sin mostrar una marcada reducción por efecto de los periodos de estrés.

Por lo anteriormente señalado, es importante evaluar el comportamiento agronómico y molecular de la variedad tradicional PP para su uso en programas de mejoramiento genético del cacao.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de los efectos de la sequía en la productividad y calidad del cacao (*Theobroma cacao*).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la respuesta al estrés hídrico de tres cultivares de cacao: ICS_1, POUND_7 y Porcelana de Piura bajo condiciones de vivero mediante la determinación de la eficiencia fotoquímica máxima (Fv/Fm), el potencial hídrico foliar (Ψ_w), el contenido de clorofila (Clo), área (A) y densidad (D) estomática.
- Evaluar y contrastar la transcripción de cuatros genes (HAI, PLIP2, PLIP3, PsbA y PsbO) relacionados con la tolerancia al estrés hídrico de los tres cultivares de cacao.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CULTIVO DE CACAO

El cacao es una especie diploide ($2n=2x=20$) con un pequeño genoma (380 Mbp) (Figueira *et al.* 1992; Lanaud *et al.* 1992) que pertenece al género *Theobroma* la cual se encuentra dentro de la subfamilia *Sterculioidea* y que este a su vez pertenece a la familia *Malvaceae* (Afoakwa 2014). El nombre genérico *Theobroma* proviene del griego “Theos” que significa dios y “broma” alimento. Este nombre fue dado por el botánico suizo Linnaeus y señala lo valioso del cultivo.

El árbol de cacao es perenne y puede llegar a medir una altura de 8 a 15 m, pero en agricultura intensiva es limitada a 2.5 a 3 m, mediante podas, para mejorar el control fitosanitario (Fowler 2008; Wood y Lass 2008).

2.1.1 Inflorescencia y polinización

Las flores de cacao surgen en grupos directamente de sectores especializados que se denominan cojinetes florales. Estos están localizados alrededor del punto de inserción de las hojas, tanto en el tronco como en las ramas. Típicamente el cacao es cauliflor, es decir que sus flores se desarrollan en el tronco (Enríquez 1985; Aneja *et al.* 1999). La flor se abre de 20 a 25 días después de aparecer el diminuto botón floral y de no ser fecundada o por problema de incompatibilidad genética, esta cae después de tres días (Vera *et al.* 1987)

Cada flor contiene cinco sépalos rosas prominentes, cinco pétalos amarillos más pequeños, cada una de las cuales forma una bolsa, una espiral exterior con cinco estaminodios, y una espiral interna de cinco estambres, cada estambre que lleva hasta cuatro anteras (Enríquez 1985; Afoakwa 2014). El pistilo está formado por un ovario súpero constituido de la fusión de cinco lóculos y cada uno puede contener de 5 a 15 óvulos fecundados dependiendo del genotipo. El estilo está formado por la fusión de cinco apéndices de unos 5 mm de largo, que terminaran en un estigma compuesto de cinco filamento (Enríquez 1985) (Figura 1). Las flores de cacao pueden ser autocompatibles o autoincompatibles, pero ambos tipos de flores son visitadas por diferentes insectos pequeños, principalmente por mosquitos del género *Forcipomyia* (Cheesman 1944; Purseglove 1968; Adjaloo y Oduro 2013).

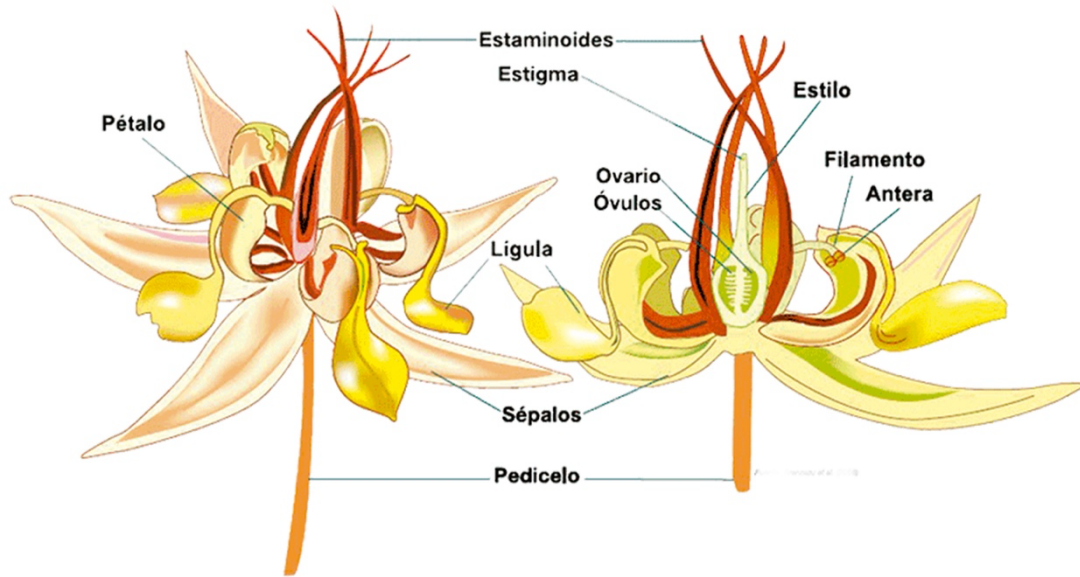


Figura 1. Estructura de la flor de cacao. Fuente: Enríquez (1985)

2.1.2 Fruto

El fruto del cacao botánicamente es una drupa indehiscente (Fowler 2008; Wood y Lass 2008). Usualmente llamado mazorca en el Perú. Es de forma ovalada, mide entre 12 a 30 cm, y contiene entre 30 a 40 semillas que están embebidas en una pulpa mucilaginoso, la cual aproximadamente comprende el 40% del peso fresco de la semilla (Schwan y Wheals 2004).

Cada semilla de cacao está constituida de dos cotiledones y un pequeño embrión, todo encerrado en una cáscara semilla (Schwan y Wheals 2004). Los cotiledones están comprendidos de dos tipos de células: células parenquimáticas o almacenamiento, contienen grasas, proteínas y almidón y células pigmentadas que contienen polifenoles y metilxantinas (Del Boca 1962; Biehl *et al.* 1977). La variación del porcentaje de estos dos componentes son los encargados del sabor del chocolate amargo (Forsyth y Quesnel 1957; Kim y Keeney 1984)

2.1.3 Raíz

El cacao tiene una raíz principal (raíz pivotante) que crece principalmente hacia abajo con sólo unas pocas ramificaciones. Cuando es suelo es profundo y las condiciones de crecimiento son favorables, la raíz principal puede crecer hasta una profundidad de aproximadamente 150 cm. La función principal de esta raíz es el anclaje. Las raíces laterales que emergen de la raíz principal cumplen la función de nutrición para la planta.

Estas raíces se concentran justo por debajo de la superficie del suelo hasta una profundidad de 15-20 cm (Wahid *et al.* 1989).

2.1.4 Requerimientos ambientales

La temperatura y la precipitación son los parámetros climáticos que afectan principalmente a la planta de cacao. Otros factores como la altitud y la latitud influyen en el crecimiento cacao, principalmente por su efecto sobre la temperatura y las precipitaciones.

2.1.4.1 Temperatura

El árbol del cacao se cultiva en las regiones tropicales. Es comercialmente cultivada entre 15° al norte y 15° al sur de la línea ecuatorial. Sin embargo, se puede encontrar hasta las latitudes subtropicales entre 23°26' (límite del Trópico de Cáncer) al norte y 23°26' (límite del trópico de Capricornio) al sur de la línea ecuatorial. El rango de temperatura promedio anual va de 23°C a 30°C, siendo el óptimo de 25°C. Se cultiva desde el nivel del mar hasta los 1,200 msnm, siendo el óptimo de 500 a 800 msnm. Asimismo, necesita humedad relativa anual promedio de entre el 70% y 80% (Gomez 2014) **Figura 2**.

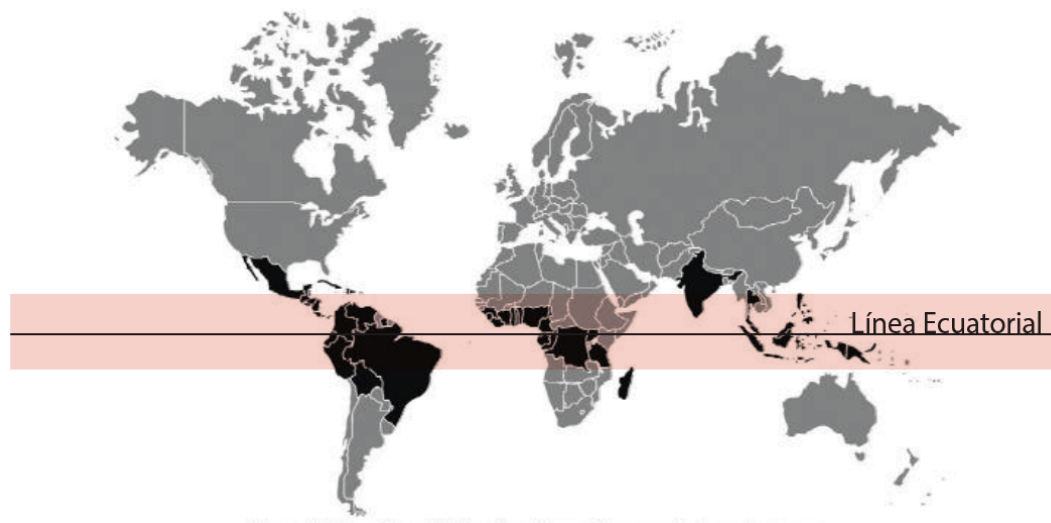


Figura 2. Ubicación y distribución de los países productores de cacao.

Fuente: Gomez (2014)

2.1.4.2 Precipitación

La precipitación pluvial mínima y máxima manejable es de 1,400 y 3,000 mm, respectivamente (Gomez 2014) y optima de 1,600 a 2,500 mm con alto grado de distribución a lo largo del ciclo (Arce 2003). Los árboles son muy sensibles a una deficiencia de agua lo que causada pérdidas en la producción del cultivo (Augusto y De Miranda 1994; Afoakwa 2014).

2.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Los estudios genómicos y morfológicos han mostrado que el centro de origen y mayor diversidad del cacao se encuentra al noreste de Sudamérica en la región del alto amazonas que incluyen a partes de Ecuador, Perú, Brasil y Colombia (Llor Solórzano *et al.* 2012; Motamayor *et al.* 2002, 2008; Thomas *et al.* 2012; Vojta *et al.* 2016; Bartley 2005; Chessman 1944; Pound 1945; Dias 2001) Además, evidencias arqueológicas han demostrado que el cacao fue domesticado primero en Sudamérica y no en Mesoamérica como tradicionalmente se señalaba (Zarrillo *et al.* 2018).

Tradicionalmente, el cacao se clasifica en Criollos, Forasteros y Trinitarios (Cheesman 1944). Sin embargo, en un análisis más reciente, realizado con 1000 individuos de diferentes áreas geográficas y haciendo uso de microsátélites, se han identificado 10 grupos genéticos que han sido nombrados como: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guiana (Motamayor *et al.* 2008). Esta nueva clasificación muestra la gran diversidad del cacao lo que es favorable para un uso adecuado en los programas de mejoramiento.

En el catálogo de cultivares de cacao de Perú se ha agrupado a los cacaos en los siguientes grupos: Trinitarios (11), Forasteros (7), Criollo (4), nacional (6). Además, se agregan a ellos, los cultivares Misceláneos (5), Huallaga (10), Ucayali-Urubamba (10), Marañón (9) y Nativos (2) (García 2010). Este documento ubica al cacao blanco de Piura (Porcelana), dentro de los cultivos nativos, perteneciente al grupo genético forastero alto Amazonas Raza Nativa-Piura.

2.3 PORCELANA DE PIURA

Nombre varietal: Porcelana

2.3.1 Descriptores de identidad

- Grupo genético/genealógico: Forastero Alto Amazonas.
- País de origen: Perú

2.3.2 Descriptores morfológicos

- De la flor
 - Color del pedúnculo: verde.
 - Antocianina en la lígula del pétalo: presente.
 - Antocianina en el filamento estaminal: ausente.
 - Antocianina en los estaminodios: presente.
 - Antocianina en la parte superior del ovario: ausente.
 - N°óvulos por ovario: dnd (datos no determinados)
- Del fruto
 - Color al estado inmaduro: verde oscuro.
 - Forma básica: elíptico; oblongo.
 - Forma de ápice: atenuado; agudo.
 - Rugosidad: ligera.
 - Construcción basal: ligera; ausente.
 - Grosor de cascara: variable.
 - Separación de un par de lomos: intermedia; ligera.
 - Profundidad de surcos: superficial; intermedia.
- De la semilla
 - Forma en sección longitudinal: elíptica; ovada.
 - Forma en sección transversal: aplanada; intermedia.
 - Color de cotiledones: morado y blanco; blanco.

2.3.3 Descriptores agronómicos

- De productividad
 - Tamaño del fruto: intermedio.

- N° de semillas por fruto: 24-48
 - Tamaño de semilla: pequeña-intermedia.
 - Peso seco de semilla: 1.0 - 1.4 g.
 - Índice de mazorca: 23.
 - Rendimiento: 652-1,956 Kg/ha.
 - Compatibilidad: autocompatible.
- De sanidad
 - Reacción a enfermedades
 - Pudrición parda (*Phytophthora palmivora*): susceptible.
 - Escoba de bruja (*Crinipellis pernicioso*): moderadamente susceptible.
 - Moniliasis (*Moniliophthora roreri*): susceptible.

2.3.4 Descriptores industriales

- Contenido de grasa: dnd.
- Sabores básicos y específicos de pulpa: dulzura (media), acidez (baja a media), astringencia (baja a media); amargor de almendra (medio); floral (bajo); frutal (medio) y hierba (bajo).
- Sabores básicos y específicos del licor: acidez (media a baja); astringencia (media-alta); floral(bajo); frutal (medio); nuez(medio), y panela/malta(medio).

2.3.5 Condiciones climáticas

2.3.5.1 Precipitación

En la región de Piura varían según la altura a la cual se encuentra la localidad. En el **Tabla 1** se presenta la información respectiva (ANA 2012).

Tabla 1 Precipitación promedio en la región Piura. Fuente: ANA (2012)

Altura	Precipitación
0-80 m.s.n.m.	10 y 80 mm/año
80- 500 m.s.n.m.	100 y 600 mm/año
500-1500 m.s.n.m.	700-1100 mm/año

2.3.5.2 Temperatura

La temperatura media anual, para la producción de cacao no debe exceder los 32°C. EL nivel adecuado es de 24°C a 26°C(Gomez 2014; Arce 2003). En la región Piura, la temperatura máxima llega a más de 34°C y la mínima a 15°C, en los meses de febrero y junio, respectivamente (Moscol Saavedra y Espinoza Tamariz 2012).

2.3.5.3 Humedad relativa (HR)

La humedad relativa óptima para la producción de cacao se encuentra entre 70% a 80% (Liberato y Díaz 2000). La HR, en la región Piura es de 66%, considerada como HR baja (Moscol Saavedra y Espinoza Tamariz 2012).

2.4 EFECTO DE LA SEQUÍA EN PLANTAS.

Las plantas son organismos sésiles que están expuestos a diferentes condiciones ambientales estresantes del tipo biótico y abiótico (Keyvan 2010; Rahdari y Hoseini 2012; Rana *et al.* 2013; Zlatev y Lidon 2012). La sequía es uno de los más importantes estreses abióticos que influye negativamente en el crecimiento y desarrollo de la planta (Rahdari y Hoseini 2012; Rana *et al.* 2013; Zlatev y Lidon 2012). En el medio ambiente la sequía ocurre en casi todas las áreas, especialmente en regiones áridas y semiáridas, y su comportamiento pueden ser muy diferentes de una región a otra (Bray 2001; Zlatev y Lidon 2012).

La definición de sequía aun no es clara. Sin embargo, en general, desde el punto de vista agrícola y fisiológico, el estrés por sequía se produce cuando el agua disponible para la planta en el suelo disminuye debido a la baja humedad en el suelo en un momento determinado (Dai 2011; Keyvan 2010). Por otro lado, la deficiencia de agua en la planta ocurre cuando la tasa de transpiración en la superficie de las hojas es mayor que el agua absorbido por las raíces (Lisar *et al.* 2012). Este desbalance en la absorción de agua y la pérdida de agua ocurre principalmente cuando potencial hídrico del suelo es menor que el potencial hídrico en la raíz.

2.4.1 Respuesta fisiológica

Algunos de los mecanismos fisiológicos que usan las plantas para tolerar la sequía son: el ajuste osmótico, la dinámica estomática, la actividad fotosintética, el uso eficiente del agua, etc.

2.4.1.1 Ajuste osmótico

Mientras que algunas plantas son muy sensibles al estrés hídrico, otras pueden soportar condiciones secas sin pérdida evidente de su turgencia. Para extraer agua del suelo, la raíz de una planta debe establecer un gradiente de potencial hídrico para que el agua fluya hacia la superficie de la raíz desde el suelo (es decir, el potencial hídrico debe ser menor en la raíz que en el suelo que lo rodea). El potencial hídrico se define según la ecuación:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$$

Donde:

Ψ_w : Potencial hídrico

Ψ_s : Potencial osmótico

Ψ_p : Potencial de presión

Muchas plantas tolerantes a sequía regulan su potencial osmótico (Ψ_s) para compensar periodos transitorios o prolongados de estrés hídrico (Kramer y Boyer 1995). Este proceso, es llamado ajuste osmótico, resulta de un incremento neto en el número de partículas de soluto en la célula de planta lo que causa que el Ψ_s adquiera un efecto negativo sobre el Ψ_w (Cramer *et al.* 2011). El decrecimiento del Ψ_s , por medio del ajuste osmótico, puede conducir a que los valores del Ψ_w de la raíz sea inferior al Ψ_w del suelo, permitiendo así que el agua se mueva del suelo a la planta en dirección descendente de la gradiente de potencial.

Un método relativamente rápido para estimar el Ψ_w de grandes piezas de tejidos, como hojas o pequeños brotes, es mediante el uso de la bomba de presión o Scholander (Scholander *et al.* 1965). En esta técnica, el órgano a evaluar se extirpará de la planta, se sella parcialmente en la cámara de presión del equipo y se procesadora a medir el Ψ_w .

2.4.1.2 Fotosíntesis

En las plantas superiores las hojas son el órgano principal que realiza la fotosíntesis. Los efectos que causa la sequía en este órgano incluyen: el decrecimiento en la expansión foliar, disminución de la temperatura de la hoja, senescencia prematura y deterioro de la

maquinaria fotosintética (Bhargava y Sawant 2013; Farooq *et al.* 2009; Zare *et al.* 2011). Los estomas son células localizadas en la superficie de la hoja que permiten a las plantas regular la transpiración y la asimilación del CO₂ del ambiente. Los estomas se cierran durante las primeras etapas del estrés hídrico aumentando el uso eficiente del agua, es decir, se absorbe más CO₂ por unidad de agua transpirada (Bray 2001; Sapeta *et al.* 2013; Zlatev y Lidon 2012). Sin embargo, la limitación del CO₂ debido al cierre prolongado de los estomas, especialmente bajo condiciones saturadas de luz, conducen a la acumulación de los componentes reducidos de la cadena transportadora de electrones. La acumulación de estos componentes puede reducir el oxígeno molecular y dar lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tal como superóxidos e hidroxilos, así como H₂O₂, causando daño oxidativo en los cloroplastos (Arbona *et al.* 2013; Bhargava y Sawant 2013; Osakabe *et al.* 2014; Salehi-lisar *et al.* 2012). Además, ambos fotosistemas PSI y PSII en los cloroplastos son afectados por la acumulación de ROS y disminución de la actividad de la cadena transportadora de electrones (Bhargava y Sawant 2013; Chernyad'ev 2005). Otro factor, involucrado en la reducción de la tasa fotosintética, es la disminución de la clorofila en las hojas afectadas por la sequía a causa de la baja capacidad para captar la luz (Keyvan 2010; Rahdari y Hoseini 2012; Sapeta *et al.* 2013). Por ello, el contenido de la clorofila y la fluorescencia de la clorofila(indicador de la eficiencia fotosintética) son parámetros que son usados para monitorear la respuesta de la planta cuando estas son sometidas a un estrés biótico o abiótico (Ibaraki y Murakami 2006; Li *et al.* 2006; Sayed 2003).

2.4.1.3 El ácido abscísico (ABA) y el comportamiento estomático

Otro mecanismo de resistencia a nivel fisiológico es el cierre de estomas, ya que estos son los responsables en la mayor proporción de la pérdida de agua en las plantas. El proceso de cierre de estomas, cuando el mesófilo comienza a sufrir deshidratación, está regulado por ABA (Cramer *et al.* 2011). El contenido de ABA en las hojas se incrementa debido: a la síntesis de novo en los cloroplastos, redistribución de la hormona en las células del mesófilo, importación desde la raíz y recirculación desde de otras hojas. Entonces el ABA es liberado al apoplasto para llegar a las células guarda a través de la corriente de transpiración (Davies y Zhang 1991; Christmann *et al.* 2007, 2005). Aparte de regular la apertura de los estomas, ABA juega un importante rol en la regulación de la actividad de las acuaporinas (Bhargava y Sawant 2013; Farooq *et al.* 2009) y reduce la producción de etileno (Bhargava y Sawant 2013; Bray 2001).

La variación en el tamaño y la densidad de las estomas puede lograr maximizar la actividad fotosintética mientras se minimiza la pérdida de agua. Existe una relación inversa entre estos dos rasgos estomáticos (Franks y Beerling 2009; Hetherington y Woodward 2003). Se ha observado que esta correlación negativa ha permitido a las plantas responder a los cambios medioambientales y a lo largo de su evolución y adaptarse (Dilcher 2000; Ohsumi *et al.* 2007; Franks *et al.* 2009; Doherty-Adams *et al.* 2012; Taylor *et al.* 2012; Sun *et al.* 2014). Asimismo, la densidad y el tamaño estomático varía entre especies y entre cultivares de la misma especie (Romero-Aranda *et al.* 1994; Hong *et al.* 2018; Camargo y Marengo 2011; Kardiman y Ræbild 2018). De tal manera, que la evolución de estos parámetros resulta útil para determinar la respuesta de las plantas a la deficiencia de agua.

2.4.2 Respuesta Molecular

La respuesta molecular a condiciones ambientales desfavorables incluye una serie de genes y vías de traducción de señales que están altamente reguladas permitiendo a las plantas sobrevivir a condiciones de estrés (Qin *et al.* 2011).

La respuesta temprana a la sequía involucra la expresión de genes, tales como los traductores de señales, promotores de transcripción y factores de traducción. Estos cambios conducen a una respuesta tardía que involucra cambios en el transporte del agua, balance osmótico, estrés oxidativo conduciendo a la reparación de daños ocurridos (Bhargava y Sawant 2013; Osakabe *et al.* 2014; Xoconostle-Cazares *et al.* 2010).

2.4.2.1 Fotosistema II (PSII)

Los fotosistemas son unidades funcionales que intervienen en la fotosíntesis los cuales se definen como complejos proteicos unidos a pigmentos. Estos están compuestos del complejo captador de la luz y un centro de reacción (Clayton 1962; Reed y Clayton 1968; Clayton y Wang 1971; Gisriel *et al.* 2017).

Hay dos tipos de fotosistemas: fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) que físicamente están ubicados dentro de los cloroplastos. Los PSII son más abundantes en las regiones apiladas (granadas) de las membranas del tilacoide, mientras que PSI se encuentra casi exclusivamente en las lamelas de los estromas (Andersson y Anderson 1980; Anderson y Andersson 1982; Chow *et al.* 1991; Anderson 1999).

Los sistemas fotosintéticos PSII y PSI enfrentan un desafío especial. Debido a que son diseñados para absorber grandes cantidades de energía luminosa para convertirla en energía química. A nivel molecular, esta energía puede ser dañina, particularmente bajo condiciones de estrés.

El decrecimiento de la fotosíntesis, a causa de la sequía, conduce a la absorción de más energía lumínica de la que puede ser absorbida por el PSII para la fijación del CO₂. En estas condiciones desfavorables la energía de la luz puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS) causando daño al PSII si la energía no es disipada de forma segura (Horton *et al.* 1996; Asada 1999; Müller *et al.* 2001).

Además, han demostrado que se dificulta la regulación de la síntesis y degradación de la proteína D1, codificada por el gen *psbA* (Yamamoto 2001; Takahashi y Murata 2008). Esta proteína tiene un rol estructural importante en el PSII además junto a la proteína D2 forman un complejo donde se unen todo los cofactores necesarios para la transferencia de electrones desde el complejo OEC (oxígeno evolving complex) hacia la plastoquinona (Pospíšil 2012).

La importancia de la proteína D1 ha resultado crucial porque, en plantas tolerantes a la sequía, han observado la sobreexpresión del gen *psbA* (Huo *et al.* 2016; Wang *et al.* 2018; Wei *et al.* 2019). Por lo cual, desarrollar variedades con esta característica podría mejorar la adaptación para desarrollarse en condiciones limitantes de agua.

El OEC (oxígeno evolving complex) es el complejo responsable de la foto-oxidación del H₂O en las plantas. Está conformado del cluster catalítico Mn₄Ca junto a cuatro proteínas extrínsecas que son PsbO, PsbP, PsbQ y PsbR que funcionan protegiendo al cluster catalítico (De Las Rivas y Barber 2004; Suorsa y Aro 2007). Todo el complejo está asociado con el lado luminal del PSII y es necesario para la evolución del oxígeno (Bricker y Burnap 2005; Roose *et al.* 2011). La proteína PsbO desempeña un papel crucial en el funcionamiento del OEC, manteniendo las concentraciones óptimas de manganeso, calcio y cloruro en el estado activo de PSII (Bricker y Frankel 2011). Además, PsbO puede participar en la protección del PSII contra el fotodaño, ya que recientes reportes indican que la fotoinhibición de PSII podría iniciarse exactamente en el grupo Mn estabilizado por PsbO (Sarvikas *et al.* 2006). Además, existe evidencia que sugiere que PsbO está involucrado en el mantenimiento de la capacidad de PSII durante el estrés por

salinidad y sequía (Sugihara *et al.* 2000; Fatehi *et al.* 2013; Ngamhui *et al.* 2012). Es así que los cambios en la expresión de la proteína afectan drásticamente en la eficiencia fotosintética de PSII y su reparación.

2.4.2.2 Modo de acción molecular del ácido abscísico (ABA)

El déficit de agua o deshidratación puede inducir o reprimir miles de genes vegetales. Los productos de estos genes tienen una función importante en la respuesta celular de la planta y en la adaptación a la sequía.

Ensayos realizados en plantas modelo han revelado cómo el estrés abiótico desencadena la biosíntesis de ABA y suministra la hormona a los tejidos estresados. Estos traducen la señal para inmediatamente promover la respuesta celular y junto con la reprogramación del patrón de los genes expresados permiten a la planta poder sobrevivir (Cutler *et al.* 2010; Kim *et al.* 2010).

Una vez que se ha inducido la síntesis y/o bioactivación de ABA. Esta se traslada a las células, tejidos y órganos donde juega un papel importante en la respuesta fisiológica de toda la planta a las condiciones de estrés. En esta situación la hormona puede ingresar a las células atravesando la membrana biológica de forma pasiva cuando se encuentra protonada (Wilkinson y Davies 2010; Ng *et al.* 2014) y/o emplear transportadores tipo ABC (Kang *et al.* 2010; Kuromori *et al.* 2010).

En las células la expresión genética debido a la deshidratación está regulado por las vías ABA - dependiente y ABA – independiente (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006). En presencia de ABA, las proteínas receptoras PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin Resistance/Pyrabactin Resistance-Like/Regulatory Component Of ABA Receptor) rápidamente captan la hormona (Cutler *et al.* 2010). ABA unido al receptor interactúa con la familia de proteínas PP2C (Protein phosphatases 2C) inhibiendo su actividad de fosfatasa. Entre los miembros de estas enzimas se incluyen ABI1 (ABA – insensitive 1), ABI2, HAB1 (hypersensitive to ABA1), HAB2, AHG1 (ABA – hypersensitive germination 1), AHG3, HAI1 (highly ABA – induced PP2C gene 1), HAI2 y HAI3 (Bhaskara *et al.* 2012; Gonzalez-Guzman *et al.* 2012; Ma *et al.* 2009; Nishimura *et al.* 2010; Park *et al.* 2009). El complejo ABA-PYR/PYL/RCAR-PP2C permite la activación de SnRK2 (sucrose non-fermenting 1 – related protein kinase 2s) resultando en la fosforilación y activación de componentes corriente abajo, tales como factores de

transcripción y canales iónicos (Furihata *et al.* 2006; Geiger *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009). Entre los factores de transcripción que se activan se encuentran miembros de la familia bZIP conformado por AREBs (ABA – responsive element binding proteins), ABFs (ABRE binding factors) y ABI5 (ABA insensitive 5) (Choi *et al.* 2000; Uno *et al.* 2000; Jakoby *et al.* 2002). A continuación, estos se unen a la región promotora ABRE (ABA – responsive elements) que se encuentra corriente arriba de los genes que serán inducidos por ABA (Busk y Pagès 1998; Lumba *et al.* 2014).

Es probable que ABA sea el elemento en común de las vías señalización para cada tipos de estrés que enfrenta la planta (Leung y Giraudat 1998; Thomashow 1999; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000; Finkelstein *et al.* 2002). Sin embargo, la señalización en respuesta al estrés osmótico causada por altas concentraciones de sal o sequía parece no depender únicamente de ABA. Los estudios han mostrado la regulación de varios genes mediante la vía ABA – independiente en respuesta a la sequía (Thomashow 1999; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000). Los responsables de regulación de los genes en esta vía son las regiones promotoras DRE (drought responsible element) y CRT (C – repeat) (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006) que en combinación con los factores de transcripción DREB (DRE – binding protein) o CBF (C-repeat binding factor) permiten responder a la planta a sequía (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000; Liu *et al.* 2019; Tran *et al.* 2004; Sakuma *et al.* 2006).

Las vías ABA – dependiente y ABA – independiente han revelado una red de genes que son regulados bajo el estrés osmótico con el propósito de adquirir tolerancia. Sin embargo, aún no se tiene claro el funcionamiento, su interacción y la participación de cada elemento. Aparentemente, la finalidad de la vía ABA – dependiente es regular la apertura de los estomas y reclutar antioxidantes y osmoprotectores (prolina) en la células (Liu *et al.* 2011; Qin *et al.* 2012; Kim *et al.* 2010). Mientras que la vía ABA – independiente involucraría el reclutamiento de proteínas protectoras como LEA y dehidrinas (Bassett *et al.* 2009; Egawa *et al.* 2006). Recientes estudios han planteado la posibilidad de integrar estas vías principales siendo probablemente la proteína SnRK2 la que probablemente participa en la convergencia de ambas rutas regulando la expresión de AREB/ABF y DREB bajo condiciones de sequía (Yoshida *et al.* 2014; Fujita *et al.* 2013).

Distintas vías de señalización, que regulan la expresión genética, involucran un mosaico de factores de transcripción y genes en respuesta a ABA y al estrés hídrico (Yoshida *et al.* 2014; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006). Sin embargo, ha surgido una red más completa de señalización de estrés hídrico que involucra otras hormonas como el ácido jasmónico (JA), etileno, auxinas, citoquinina y brasinoesteroides que juegan diversos papeles para ajustar la biosíntesis de ABA y, por lo tanto, la señalización de la respuesta fisiológica frente al estrés hídrico (de Ollas y Dodd 2016).

El JA juega un rol importante frente al estrés biótico especialmente cuando hay un ataque por herbívoros (Wasternack y Hause 2013). Sin embargo, han propuesto que ABA y JA podrían tener un sistema común para la regulación de la expresión genética. Lo que podrían explicar por qué el JA podría funcionar tanto para la tolerancia al estrés abiótico como biótico (Kim *et al.* 2018; de Ollas y Dodd 2016; Munemasa *et al.* 2011). Además, han descubierto la existencia de dos enzimas del tipo fosfolipasa A1 (PLIP2 y PLIP3), ubicadas en el cloroplasto, que vincula la biosíntesis JA mediada por ABA en respuesta al distintos estrés abióticos (Wang *et al.* 2018).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El estudio se realizó en dos fases. La fase de campo se realizó en un vivero. La fase de laboratorio se hizo en el laboratorio de Bioinformática de Biología Molecular 306. Ambos espacios se encuentran en los laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.

3.2 MATERIAL VEGETAL

Se tomaron las semillas de 4 a 5 mazorcas de cacao de las variedades señaladas en la **Tabla 2**. Entre 50 a 60 semillas fueron remojadas por 5 días en agua y lavadas cada 24 horas para facilitar la remoción del mucilago. Cuando el hipocótilo alcanzó un tamaño de 1 cm se procedió a sembrar a una profundidad de 3cm aproximadamente. Luego cada semilla germinada fue sembrada en una maceta que contenía un sustrato compuesto de tierra negra (autoclavada) y vermiculita en la proporción 3:1.

Tabla 2 Lista de Variedades

Variedad	Compatibilidad gamética	Tolerancia a sequía	Origen	Procedencia
Porcelana de Piura (PP)	Autocompatible	Sin Información	Perú	Palo Blanco-Piura
POUND_7 (P7)	Autocompatible	Susceptible (Aphara <i>et al.</i> 2013)	Perú	Instituto de cultivos tropicales-Tarapoto
ICS_1	Autocompatible	Tolerante*	Trinidad y Tobago	Instituto de cultivos tropicales-Tarapoto

* Información proporcionado por el Instituto de cultivos tropicales no están publicados

3.3 UNIDAD EXPERIMENTAL

Cada maceta conteniendo una planta represento una unidad experimental. Se emplearon 20 plantas seleccionadas al azar por cada variedad de cacao haciendo un total de 60 plantas por ser tres variedades.

3.4 CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y TRATAMIENTOS

Cuando las 20 plantas, mencionadas en la sección 3.3, cumplieron 6 meses de edad se agruparon en 2 grupos de 10 plantas. La asignación de cada planta a un grupo fue al azar. El propósito de crear los grupos fue someterlos a los tratamientos que se explicara a continuación.

Aun grupo se le asigno el tratamiento de estrés hídrico (EH) que consistió en reducir gradualmente la cantidad de agua contenida en el sustrato hasta un potencial mátrico (Ψ_m) de -0.06 a -0.07 MPa. El segundo grupo de plantas son usadas como control (tratamiento sin estrés hídrico (SH)) y fueron regadas manteniendo el suelo a capacidad de campo con un Ψ_m de -0.01 a -0.02 MPa. La **Figura 3** ilustra la distribución de plantas, las variedades y sus tratamientos.

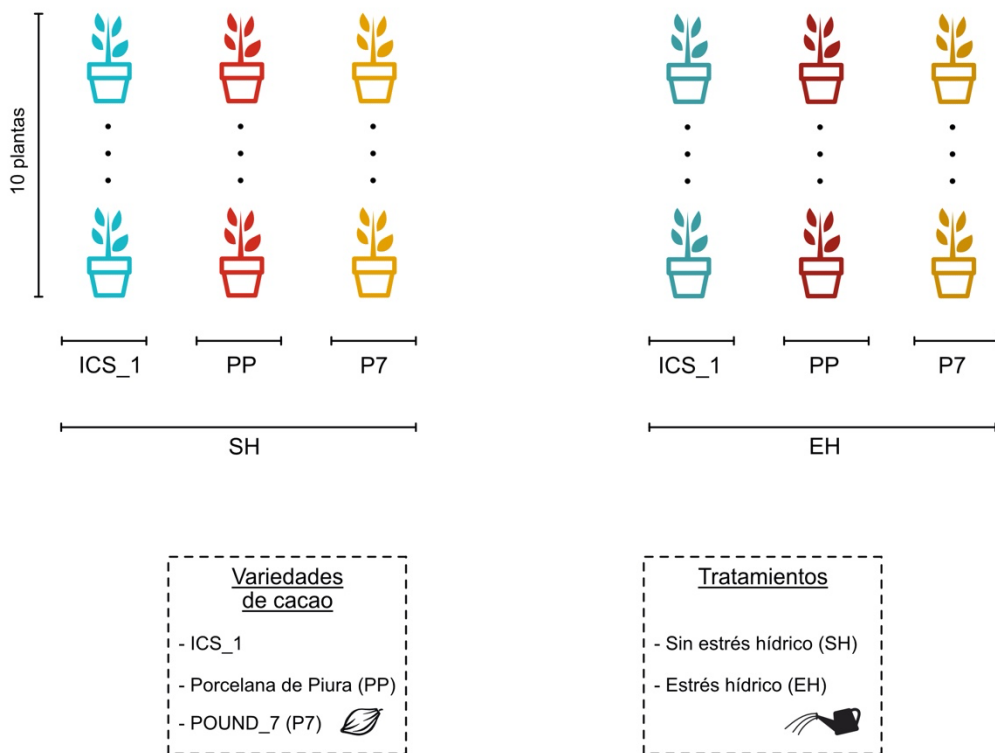


Figura 3. Distribución de plantas y condiciones hídricas

3.5 IMPACTO DE LA SEQUIA EN LAS VARIABLES FISIOLÓGICAS

Para determinar este objetivo se emplearon protocolos establecidos y adaptados a las facilidades del laboratorio y se describen a continuación con el propósito de comparar el efecto de los tratamientos y contrastar entre las variedades:

3.5.1 Potencial hídrico foliar (Ψ_w)

El estado hídrico de la planta está asociado con el potencial hídrico foliar (Ψ_w) y es usado con frecuencia como indicador de la tolerancia a sequía en cultivos de cacao y otros cultivos, valores más negativos indican la dificultad del transporte de agua y, por consiguiente, origina daños en las plantas (Araque *et al.* 2012; Apshara *et al.* 2013).

En la medición de Ψ_w se usó la bomba de Scholande (Model 1000, PMS Instrument Company, Albany, OR, USA), se tomó la segunda o tercera hoja madura contada a partir del ápice y entre las 4:00 pm a 5:00pm. Ver Anexo 1

3.5.2 Eficiencia fotoquímica máxima (Fv/Fm)

Para la detección de perturbaciones o daños en el aparato fotosintético, producto de la condición a sequía, se usó la medición de la relación Fv/Fm para lo cual se empleó el fluorómetro OS30P+ (OPTI-SCIENCES, Hudson, USA). Se midieron hojas completamente expandidas y maduras. Previo a las mediciones, las hojas se exponen a la oscuridad con pinzas de exclusión de luz.

La relación Fv/Fm indica la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II (PSII) y su disminución está asociado con distintos tipos de estrés (Smillie y Hetherington 1990; Baker y Rosenqvist 2004; Paknejad *et al.* 2007)

3.5.3 Contenido de clorofila (C_{lof})

La clorofila es una molécula verde, presente en las células de las plantas y que juega un importante rol en la fotosíntesis. Es sabido, que la sequía es el factor que afecta a la fotosíntesis y al contenido de clorofila. Distintas investigaciones reportan que el contenido de clorofila puede ser usado como un parámetro para estimar la influencia del estrés ambiental sobre el crecimiento porque este parámetro está estrechamente correlacionado con la tasa de intercambio de carbono (Araus *et al.* 1998; Fracheboud *et al.* 2004; Vojta *et al.* 2016).

Se empleó el equipo CCM-30 (OPTI-Sciences) para medir la cantidad de clorofila presente en variedades de cacao de ambas condiciones hídricas o tratamientos.

3.5.4 Tamaño y densidad de estomas

El método de impresión de la superficie de la hoja para la cuantificación del tamaño y la densidad estomática consistió en utilizar esmalte transparente de uñas para hacer una impresión o molde de la superficie de 2 hojas por planta. Se tomaron 4 plantas que no estuvieron sometidas a sequía.

La impresión se retiró con cinta adhesiva y se coloca en una lámina portaobjetos para luego ser vista al microscopio a 100x de magnificación. La superficie de la impresión tuvo las dimensiones 1cm x 2 cm. Se observaron 4 campos y sus respectivas imágenes fueron registradas con la cámara Touptek modelo XCAM1080HD y el programa Touptview 3.7.

El tamaño (μm^2) del estoma fue calculado como la longitud por el ancho del par de células guardianas de los estomas para lo cual, se tomaron 20 estomas de cada imagen registrada. La densidad (mm^{-2}) fue calculada como el número de estomas del campo visual multiplicado por el tamaño del campo (0.1452 mm^{-2}). El análisis de las imágenes fue realizado con el programa ImageJ 2.0.

3.6 IMPACTO DE LA SEQUIA EN EXPRESIÓN GENÉTICA

En este caso se buscó cuantificar el efecto del tratamiento EH sobre SH en 5 genes que fueron reportados por estar relacionados con la tolerancia a la sequía. El cálculo consistió en medir expresión relativa de los genes usando el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak y Schmittgen 2001; Bio-Rad 2006) ver Anexo 4.

Para ello, primero se extrajo el ARN mediante el método híbrido (Anexo 2) y tomando la tercera hoja por debajo de la parte apical. Luego, se usó el Kit TaqMan Reverse Transcription Reagents (ThermoFisher scientific, USA) para obtener el cDNA y finalmente se realizó un qPCR (quantitative PCR) empleando las sondas (Anexo 3) para medir la cantidad de amplicones en tiempo real usando el kit SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher scientific, USA) y equipo lightCycler 96 Instrument (Roche, USA).

Los 5 genes que fueron evaluados en este trabajo fueron HAI - 1, PLIP2, PLIP3, psbA y psbO. Además, se uso el gen constitutivo actina en las tres variedades de cacao necesario para calcular la expresión relativa.

3.7 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Evolución fisiológica

Para comparar el efecto de los tratamientos y las variedades sobre los parámetros fisiológicos mencionados en los puntos 3.4.1 – 3.4.4, se aplicó un diseño completamente aleatorio con un arreglo factorial con el modelo aditivo lineal que es representado por:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$i = 1, 2, \dots, v$ (variedades)

$j = 1, 2, \dots, t$ (tratamientos)

$k = 1, 2, \dots, r$ (repeticiones)

μ = media general

A = efecto de la i -ésima variedad

B = efecto del j -ésimo tratamiento

AB = efecto de la interacción de la i -ésima variedad con el j -ésimo tratamiento.

ε_{ijk} = Error experimental

Tabla 3 Fuentes de variación para el diseño completamente aleatorio con arreglo factorial

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma cuadrado	Cuadrados medios	F ₀
Variedades	2	SC variedad	CM _{variedad}	F ₀ = CM _{variedad} / CM _{error}
Tratamiento	1	SC _{tratamiento}	CM _{tratamiento}	F ₀ = CM _{tratamiento} / CM _{error}
Variedades x Tratamiento	2	SC _{variedad x tratamiento}	CM _{variedad x tratamiento}	F ₀ = CM _{variedad} / CM _{error}
Error	54	SC error	CM _{error}	
Total	59	SC total		

Evolución molecular

En el caso de la comparación de la variación de la expresión relativa para cada gen entre las tres variedades se hizo usando el diseño completamente aleatorio que fue representado por el modelo aditivo:

$$y_{ij} = \mu + X_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$i = 1, 2, \dots, v$ (variedades)

$j = 1, 2, \dots, r$ (repeticiones)

μ = media general

X = efecto de la i -ésima variedad

ε_{ij} = Error experimental

Tabla 4 Fuentes de variación del diseño completamente aleatorio

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma cuadrado	Cuadrados medios	F₀
Variedades	2	SC _{variedad}	CM _{variedad}	F ₀ = CM _{variedad} / CM _{error}
Error	27	SC _{error}	CM _{error}	
Total	29	SC _{total}		

En ambos modelos cuando el resultado fue significativo en el análisis de varianza, se aplicó la prueba de Duncan para la comparación de medias. Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados usando Rstudio 1.1.456. Las salidas de los análisis estadísticos son mostrados en el Anexo 5 correspondiendo al diseño completamente aleatorio con arreglo factorial empleado para los parámetros fisiológicos y en el Anexo 6 correspondiendo al diseño completamente aleatorio empleado para respuesta molecular

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EFECTO DE LA SEQUIA EN LAS VARIABLES FISIOLÓGICAS

La comparación del efecto de los tratamientos SH y EH sobre las tres variedades de cacao es resumida en la **Tabla 5**

En las variedades ICS_1, P7 y PP se observó diferencias significativas de los valores de Cl_f y Ψ_w entre ambos tratamientos mientras que F_v/F_m no mostró variación significativa (**Tabla 5**).

Los valores de F_v/F_m pueden reflejar la máxima capacidad fotosintética de las plantas viéndose reducida significativamente bajo algún tipo de estrés abiótico (Xiao *et al.* 2019; Krause y Weis 1991). En el tratamiento SH para F_m/F_v se observa un rango de 0.574 a 0.766, correspondiendo el valor más bajo al genotipo P7 y el más alto al ICS_1. En el tratamiento con EH el rango fue de 0.591 a 0.754, correspondiendo el valor más bajo a P7 y el más alto a ICS_1. Los valores en general son similares observándose una disminución en el valor para ICS_1 e incremento para PP y P7 en el ambiente de estrés hídrico; siendo el valor del incremento mayor para PP.

Este resultado concuerda con estudios previos para otros cultivos en los cuales, durante el estrés hídrico, no se observó el decrecimiento del F_v/F_m (Lee *et al.* 2004; Yang *et al.* 2016; Tambussi *et al.* 2002). Por lo contrario, bajo nuestras condiciones experimentales se obtuvo incremento del F_v/F_m para la variedad PP con el tratamiento EH (**Tabla 5**) lo que concuerda con lo reportado en distintas variedades de cacao, tolerantes a la sequía, en las cuales el valor de F_v/F_m se elevó en condiciones de deficiencia de agua (Apshara *et al.* 2013; Balasimha *et al.* 2013). Esto sugiere que en las variedades tolerante de cacao no se estaría produciendo daños sobre PSII o que el exceso de luz bajo las condiciones de sequía estaría siendo disipada, en forma de energía térmica, por la vía NPQ (Non-photochemical quenching) de manera más eficiente y/o rápida. Incluso podría involucrando otro tipo de vía de disipación de energía dentro del PSII, PSI y la cadena transportadora de electrones.

El contenido de clorofila en el ambiente control vario de 322.6 a 553.08 mg/m^2 y en el ambiente estrés hídrico vario de 370 a 536.2 mg/m^2 . Se puede apreciar que los valores para ICS_1 disminuyen, siendo esta disminución significativa para ICS_1 y para P7 se

observó un incremento significativo por efecto del estrés hídrico. El contenido de clorofila (C_{lof}) depende en gran medida de la respuesta fisiológica de la especie y su capacidad para tolerar el estrés hídrico (Siddiqui *et al.* 2015). De tal modo, que es usual que el contenido se reduzca en plantas susceptibles a la sequía mientras que en las tolerantes aumenta o se mantenga por periodos más prolongados en la condición de déficit hídrico (Li *et al.* 2006; Sallam *et al.* 2019; Abid *et al.* 2016; Sivakumar *et al.* 2017). Según esto, los datos obtenidos para clorofila mostraron discrepancia con lo esperado debido a que la variedad ICS_1, que se considera como tolerante, mostró disminución en la cantidad de clorofila mientras que la variedad P7, definida como susceptible, reportó aumento en su contenido de clorofila (**Tabla 5**). Esto podría sugerir que solo considerar al C_{lof} como un parámetro para discriminar entre variedades de cacao tolerante o susceptible no sería del todo correcto siendo necesario emplear múltiples variables. Usualmente, en distintas investigaciones emplean distintos parámetros con el propósito de identificar variedades tolerantes a sequía (Balasimha *et al.* 2013; Apshara *et al.* 2013; dos Santos *et al.* 2014). En algunos, casos las variedades categorizadas como tolerantes resultan afectadas en su actividad fotosintética y cantidad de clorofila cuando son sometidas a sequía (Atayese *et al.* 2012; Kunikullaya *et al.* 2018; Araque *et al.* 2012; Apshara *et al.* 2013).

Los tres genotipos estudiados mostraron valores menores de Ψ_w en el ambiente con estrés hídrico; siendo esta disminución significativa para los tres genotipos. El rango en el ambiente control fue igual a -4.38 a -6.70 Bar y en el ambiente estrés hídrico varió de -8 a -15.95 Bar. Por su parte, el Ψ_w se considera un indicador efectivo para evaluar el estado hídrico de las plantas (Lima *et al.* 2002). Además, se ha observado que el decrecimiento del Ψ_w , debido al efecto de la sequía, está estrechamente correlacionado con la reducción de los parámetros que miden la actividad fotosintética como: F_v/F_m, Φ_{PSII} (eficiencia fotoquímica de PSII) y qP (quenching fotoquímico) (Wang *et al.* 2018; Zulini *et al.* 2005). En el experimento, los resultados obtenidos muestran disminución del Ψ_w sin embargo, no se produjo la reducción del F_v/F_m por efecto del estrés hídrico.

Tabla 5 Cambios en la eficiencia fotosintética (Fm/Fv), contenido de clorofila (Clof) y el potencial hídrico foliar (Ψ_w) para las variedades de cacao (ICS_1, PP, P7) al ser sometidos al tratamiento sin estrés hídrico (SH) y con estrés hídrico (EH). Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

Variedad	Fm/Fv			Clof (mg/m ²)			Ψ_w (Bar)		
	SH	EH	Sig	SH	EH	Sig.	SH	EH	Sig.
ICS_1	0.766 \pm 0.007	0.754 \pm 0.006	NS	553.8 \pm 8.0	501.2 \pm 6.9	***	-6.70 \pm 0.25	-13.76 \pm 0.84	***
PP	0.703 \pm 0.022	0.726 \pm 0.012	NS	560 \pm 16.78	536.2 \pm 9.56	NS	-4.21 \pm 0.20	-6.28 \pm 0.34	***
P7	0.574 \pm 0.016	0.591 \pm 0.013	NS	322.6 \pm 11.17	370 \pm 9.33	***	-4.38 \pm 0.13	-8 \pm 0.30	***

La diferencia de las medias entre las columnas SH y EH fue acorde a la prueba del test de Duncan y son denotadas. NS: No significativo, **: P = 0.01, ***: P = 0.001

Empleando los datos obtenidos para los parámetros evaluados, en ambos ambientes, se clasifico las variedades por el nivel de tolerancia al estrés hídrico y los resultados se presentan en el **Tabla 6**. La variedad PP fue la que menos afectada por la sequía. Por otra parte, se complementó este resultado con la medición de la densidad y el tamaño estomática de las tres variedades. Los estomas permiten absorber el CO₂ para la fotosíntesis y ejercen gran influencia en la tolerancia a la sequia (Anderegg *et al.* 2017; Farquhar y Sharkey 1982; Hetherington y Woodward 2003). En la **Figura 4** se muestra la correlación entre área (A) y densidad (D) estomática. En la variedad P7 se obtuvo un $A = 230.4 \pm 3.48 \mu\text{m}^2$ y $D = 535 \pm 10.85 \text{mm}^{-2}$. Por el contrario, en la variedad PP el valor de A se redujo ($161.1 \pm 2.30 \mu\text{m}^2$) y D se incrementó ($739 \pm 14.51 \text{mm}^{-2}$). Estos resultados coinciden con la correlación negativa que sugieren existe entre estas dos características estomáticas (Hetherington y Woodward 2003; Doheny-Adams *et al.* 2012). Esta relación inversa observada, en otras especies, ha permitido desarrollar una plasticidad en la respuesta a los cambios en el entorno confiriendo mayor tolerancia a la sequía en distintos cultivos debido a que estomas más pequeños y densos son más sensibles y rápidos en responder (Bosabalidis y Kofidis 2002; Dunlap y Stettler 2001; Fu *et al.* 2013; Pearce *et al.* 2006; Drake *et al.* 2013; Aasamaa *et al.* 2001; Lawson y Blatt 2014; Baloch *et al.* 2013; Shahinnia *et al.* 2016; Sun *et al.* 2014). Por lo tanto, la variedad PP habría desarrollado habilidad para reducir el tamaño y la densidad de sus estomas por lo tanto adaptándose a lo largo de la evolución a las condiciones limitantes de agua que se presenten en su entorno.

Por otro lado, la reducción de A ($135.2 \pm 3.37 \mu\text{m}^2$) en la variedad ICS_1 no se tradujo en el aumento de D (642.62 ± 24.2) lo que podría explicar su alto nivel de susceptibilidad (**Tabla 6**) que sumado al mas bajo Ψ_w reportado en la **Tabla 5** ocasionaría problemas de embolismo en el xilema y reducción de la tasa fotosintética (Martin-StPaul *et al.* 2017; Henry *et al.* 2019). Además, si tenemos en cuentas los resultados mostrados para la variedad ICS_1, nos indica que esta variedad se debe considerar como susceptible a la sequía ello coincide con lo obtenido en el trabajo de (Torres Pezo 2019; Lahive *et al.* 2021) lo que es contrario a la información que brindo el Instituto de Cultivos Tropicales.

Tabla 6 Ranking de susceptibilidad a la sequía. Diferencia de medias (Δ) del tratamiento sin estrés hídrico (SH) menos estrés hídrico (EH) para la eficiencia fotosintética (Fm/Fv), cantidad de clorofila (C_{lof}) y potencial hídrico foliar (Ψ_w) calculado para los tres genotipos. Si el resultado de la suma de las diferencias es más cercano a cero la variedad se clasifica con menor ranking. A menor ranking se considera menor efecto de la sequía.

Variedad	Δ Fm/Fv	Δ C _{lof}	$\Delta \Psi_w$	Ranking suma
ICS_1	0.042	52.6	7.06	3
PP	-0.023	23.8	2.07	1
P7	-0.017	-47.4	3.62	2

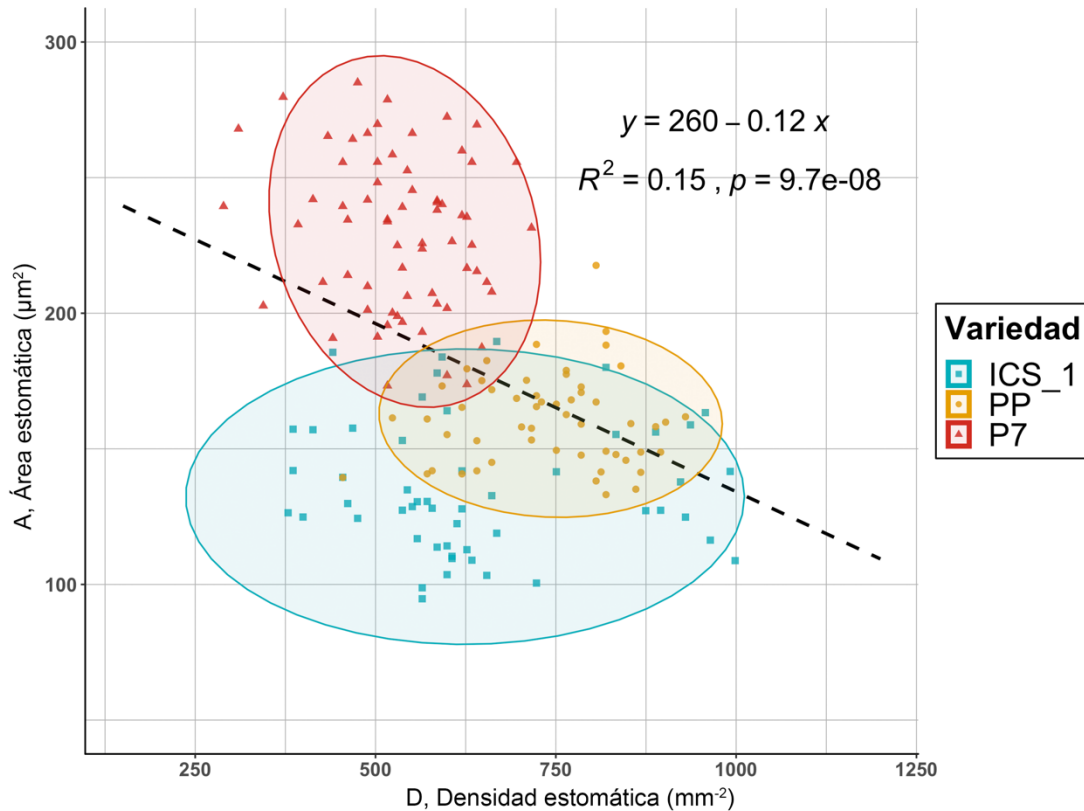


Figura 4. Correlación entre densidad y tamaño de estomas para las 3 variedades de cacao de las plantas no sometidas a sequía. La regresión lineal (línea punteada), su coeficiente de regresión cuadrado (R^2), ecuación y nivel significancia (p) calculados son mostrados.

4.2 EFECTO DE LA SEQUIA EN LA EXPRESIÓN GENÉTICA

Los genes HAI y PLIP2 incrementaron su expresión en 6 veces, en ambos casos, en la variedad PP cuando fue sometido al tratamiento de estrés hídrico (EH) (**Figura 5A y D**) mientras que el gen PLIP3 se incrementó de manera sutil (0.9 veces) (**Figura 5E**). Por lo contrario, ambos genes junto PLIP3 se redujeron en la variedad P7 en 2 veces (**Figura 5A y D**). En los genes PsbA y PsbO no se apreció un claro incremento ni reducción en la expresión en todas las variedades sometidas a la condición de deficiencia de agua (**Figura 5B y C**). Asimismo, en la variedad ICS_1 se observaron ligeros aumentos (0.5 veces) para los genes HAI y PLIP2 (**Figura 5A y D**).

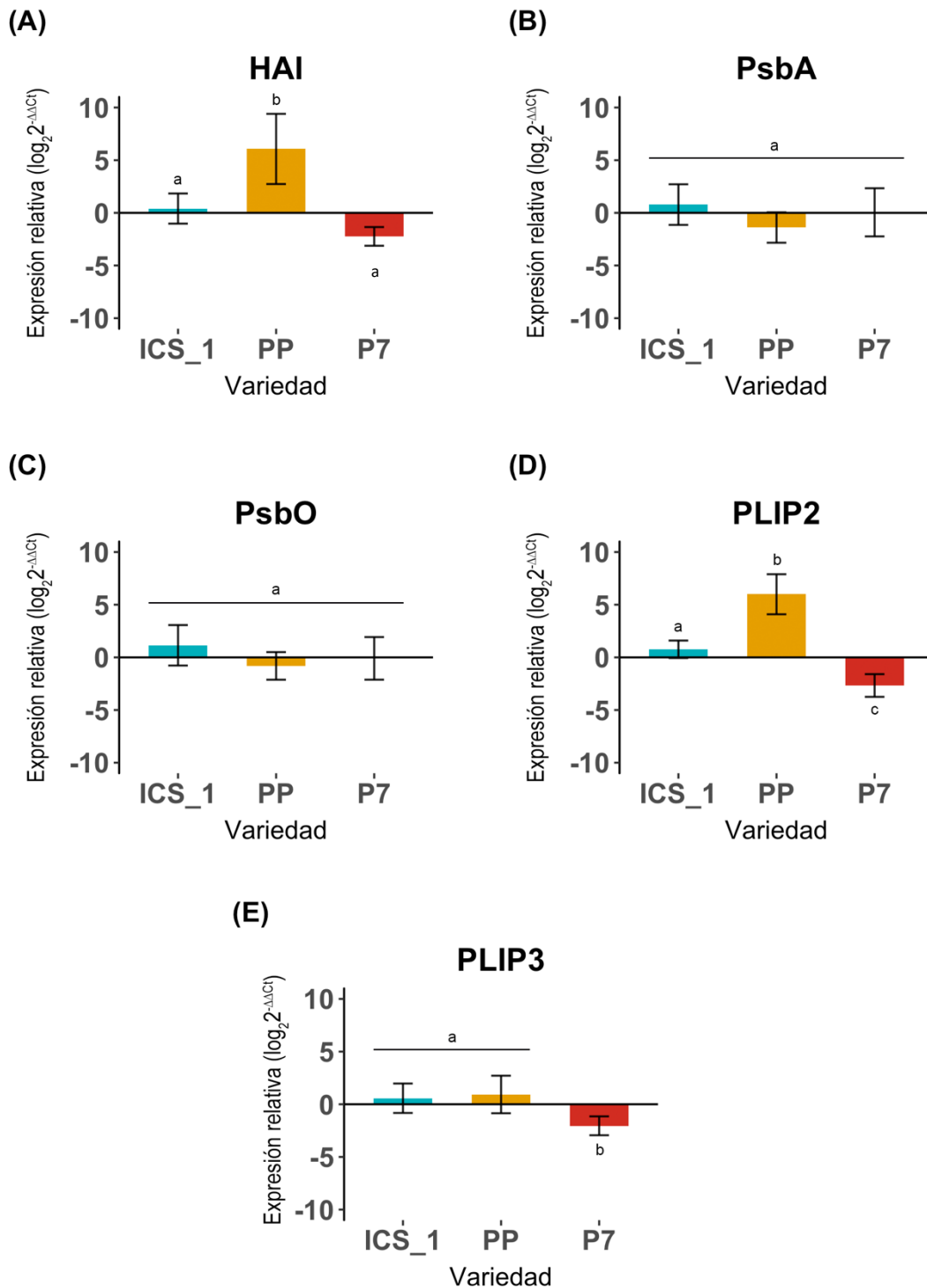


Figura 5. Variación de los niveles de expresión relativa representado para cada gen (HAI, PsbA, PsbO, PLIP2, PLIP3) y entre las variedades de cacao (ICS_1, PP, P7) en respuesta a la condición de estrés hídrico. Valores positivos de la expresión relativa indica incremento del gen mientras que valores negativos disminución. La expresión relativa fue calculada según el método livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) y están representado en el eje Y a una escala \log_2 . En la expresión de cada gene evaluado las plantas sin sequia fueron se usaron como el calibrador y el gen actina de referencia. Cada barra muestra la media. Diferentes letras en las barras expresan que las medias son significativamente distintas ($p < 0.05$) determinado por el test de Duncan.

El clado A de las proteínas fosfatasa 2C (PP2C) tiene un rol predominante en las rutas de señalización de ABA y el estrés hídrico; de manera tal, que cuando interacciona con el receptor de ABA PYR/PYL/RCAR regula la actividad de la proteína SnRK2 (Cutler *et al.* 2010; Raghavendra *et al.* 2010). Entre los miembros del clado A se encuentran HAI-1, HAI-2/AKP y HAI-3, los cuales son fuertemente inducidos cuando se reduce Ψ_w lo que conduce a la regulación del crecimiento, acumulación de prolina y el ajuste osmótico (Wong *et al.* 2019; Bhaskara *et al.* 2012). Además, la interacción de HAI-1 con la proteína HIN1 (HAI-1 – interactor 1) observado mostro un efecto positivo en la aclimatación a la sequía al mantener el crecimiento en la planta lo que estuvo mediado por un splicing más eficiente en genes que estarían relacionados con la respuesta a la sequía los cuales son propensos a la retención de intrones (Chong *et al.* 2019). Po consiguiente, HAI-1 actuaría protegiendo y regulando la respuesta de la PP a la deficiencia de agua.

Por otro lado, han descubierto la existencia de dos enzimas del tipo fosfolipasa A1 (PLIP2 y PLIP3), ubicadas en el cloroplasto, que están vinculas con la biosíntesis JA y esta ruta es mediada por ABA en respuesta al distintos estrés abióticos (Wang *et al.* 2018). Además, reportes previos han demostrado que el aumento de la acumulación JA posiblemente se debería a la necesidad de mantener la homeostasis de los lípidos en los plastos (Wan *et al.* 2020). Lo que probablemente podría contribuir al incremento de la proporción de ácidos grasos insaturados porque estos favorecen en la tolerancia al frio, salinidad y sequia (Zhang *et al.* 2005; Liu *et al.* 2008).

Por consiguiente, nuestros resultados explicarían los efectos de los genes HAI1 y PLIP2 en la tolerancia a la sequía por parte de la variedad PP y; por lo tanto, responder a la deficiente de agua que se presenta en la región de Piura. Es más, la capacidad de respuesta de PP podría estar asociado con la calidad de chocolate que se logra de esta variedad. Debido que a, la composición lipídica en las semillas es afectado por las condiciones ambientales y la acumulación de JA (Mustiga *et al.* 2019; Wasternack *et al.* 2013; Ghassemi-Golezani y Farhangi-Abriz 2018; Nouraei *et al.* 2016).

V CONCLUSIONES

- Dentro del análisis realizado podemos deslucir que la variedad PP mostro una mejor performas a la deficiencia de agua debido a que este impacto en menor medida en el Ψ_w y Fm/Fv, Además, con respecto a las características estomáticas para esta variedad se estableció que existe una relación inversa entre la densidad y tamaño estomática que favorece a su tolerancia. Todo ello, nos lleva a pensar que estos parámetros son importantes en la regulación hídrica del cacao.
- Con respecto a la evolución molecular la expresión de los genes HAI-1 y PLIP2, nos lleva pensar que protegen y regular de forma más eficiente la respuesta de PP a la deficiencia de agua. Al mismo tiempo, se cree que la sobre expresión del gen PLIP2 aportaría al sabor peculiar de este cacao debido a que causaría una reconfiguración de lípidos en las semillas.

VI RECOMENDACIONES

- Es necesario emplear una cantidad mayor de variables morfológicas y fisiológicas para comprender mejor el comportamiento de la variedad PP con el propósito de mejorar la comprensión de la respuesta a la deficiencia de la variedad.
- La evaluación de las plantas debe ser a partir de clones para evitar la variación genética presente al usar semillas sexuales. Asimismo, tener un mejor control de las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla las plantas.
- El emplear la tecnología RNA-Seq para el análisis del perfil transcripcional de la planta resultara útil para ampliar y identificar otros posibles genes cantidades que estén involucrados en la respuesta particular de PP a la sequía.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aasamaa, K; Söber, A; y Rahi, M. 2001. Leaf anatomical characteristics associated with shoot hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in temperate deciduous trees. *Functional Plant Biology* 28(8):765–774.

Abid, M; Tian, Z; Ata-Ul-Karim, ST; Cui, Y; Liu, Y; Zahoor, R; Jiang, D; y Dai, T. 2016. Nitrogen Nutrition Improves the Potential of Wheat (*Triticum aestivum* L.) to Alleviate the Effects of Drought Stress during Vegetative Growth Periods (en línea). s.l., s.e., vol.7. p. 981. Disponible en <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00981>.

Abo-Hamed, S; Collin, HA; y Hardwick, K. 1985. Biochemical and physiological aspects of leaf development in cocoa (*Theobroma cacao* L.) IX: Water relations and abscisic acid in the control of leaf development. *Café, cacao, thé* 29(3):155–161.

Adjaloo, MK; y Oduro, W. 2013. Insect assemblage and the pollination system in cocoa ecosystems. *Journal of Applied Biosciences* 62:4582–4594.

Afoakwa, EO. 2014. Cocoa production and processing technology. s.l., CRC Press.

ANA. 2012. Diagnóstico de la Gestión de los Recursos Hídricos de la Cuenca Chira-Piura (en línea). s.l., s.e. Disponible en <http://repositorio.ana.gob.pe/handle/20.500.12543/1962>.

Anderegg, WRL; Wolf, A; Arango-Velez, A; Choat, B; Chmura, DJ; Jansen, S; Kolb, T; Li, S; Meinzer, F; y Pita, P. 2017. Plant water potential improves prediction of empirical stomatal models. *PloS one* 12(10).

Anderson, JM. 1999. Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *Functional Plant Biology* 26(7):625–639.

Anderson, JM; y Andersson, B. 1982. The architecture of photosynthetic membranes: lateral and transverse organization. *Trends in Biochemical Sciences* 7(8):288–292.

Andersson, B; y Anderson, JM. 1980. Lateral heterogeneity in the distribution of

chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 593(2):427–440.

Aneja, M; Gianfagna, T; y Ng, E. 1999. The roles of abscisic acid and ethylene in the abscission and senescence of cocoa flowers. *Plant Growth Regulation* 27(3):149–155.

Apshara, SE; Rajesh, MK; y Balasimha, D. 2013. Assessment of morphological, physiological and molecular characteristics of cocoa accessions from Central and South America in relation to drought tolerance. *Journal of Plantation Crops* 41(3):389–397.

Araque, O; Jaimez, RE; Tezara, W; Coronel, I; Urich, R; y Espinoza, W. 2012. Comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile Criollo cacao cultivars (*Theobroma cacao*) during dry and wet seasons. *Experimental agriculture* 48(4):513–522.

Araus, JL; Amaro, T; Voltas, J; Nakkoul, H; y Nachit, MM. 1998. Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions (en línea). *Field Crops Research* 55(3):209–223. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00079-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00079-8).

Arbona, V; Manzi, M; Ollas, C De; y Gómez-Cadenas, A. 2013. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences* 14(3):4885–4911.

Arce, INGMP. 2003. *Manual de Cultivo del Cacao*. Ministerio de Agricultura-Programa para el Desarrollo de la Amazonia (PROAMAZONIA) .

Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology* 50(1):601–639.

Atayese, MO; Olaiya, AO; Adedeji, AR; y Hamed, LA. 2012. Evaluation of the three cocoa varieties for drought tolerance in Nigeria. *Niger. J. Hort. Sci* 17:177–187.

Augusto, R; y De Miranda, C. 1994. Partitioning of rainfall in a cocoa (*Theobroma cacao* Lour.) plantation. *Hydrological Processes* 8(4):351–358.

Baker, NR; y Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of*

experimental botany 55(403):1607–1621.

Balasimha, D; Elain Apshara, S; y Jose, CT. 2013. Genotypic variations in chlorophyll fluorescence and stomatal conductance of cocoa in relation to drought tolerance. .

Balasimha, DR; Daniel, V; Nair, E V; y Rv Bhagavan, S. 1988. Comparative drought tolerance of cacao accessions. *Tropical Agriculture (Trinidad y Tobago)* v. 65 (3) p. 271-274 .

Baligar, V; Bunce, J; Machado, RC; y Elson, M. 2008. Photosynthetic photon flux density, carbon dioxide concentration, and vapor pressure deficit effects on photosynthesis in cacao seedlings. s.l., s.e., vol.46. 216–221 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0035-7>.

Baloch, MJ; Dunwell, J; Khan, NU; Jatoi, WA; Khakhwani, AA; Vessar, NF; y Gul, S. 2013. Morpho-physiological characterization of spring wheat genotypes under drought stress. *International Journal of Agriculture and Biology* 15(5).

Bartley, BGD. 2005. *The genetic diversity of cacao and its utilization*. s.l., Cabi.

Bassett, CL; Wisniewski, ME; Artlip, TS; Richart, G; Norelli, JL; y Farrell, RE. 2009. Comparative expression and transcript initiation of three peach dehydrin genes. *Planta* 230(1):107–118.

Belsky, JM; y Siebert, SF. 2003. Cultivating cacao Implications of sun-grown cacao on local food security and environmental sustainability. *Agriculture and Human Values* 20(3):277–285.

Bhargava, S; y Sawant, K. 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding* 132(1):21–32.

Bhaskara, GB; Nguyen, TT; y Verslues, PE. 2012. Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade A protein phosphatase 2Cs. *Plant physiology* 160(1):379–395.

Biehl, B; Passern, U; y Passern, D. 1977. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28(1):41–52.

- Bio-Rad, L. 2006. Real-time PCR applications guide. Bio-Rad Laboratories, Inc :41.
- Del Boca, C. 1962. Cocoa beans: quality requirements and methods of assessment. *Rev. Int. Chocolaterie* 17:218–221.
- Bosabalidis, AM; y Kofidis, G. 2002. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant science* 163(2):375–379.
- Bray, EA. 2001. *Plant Response to Water-deficit Stress*. e LS .
- Bricker, TM; y Burnap, RL. 2005. The extrinsic proteins of photosystem II in: *Photosystem II: The water/plastoquinone oxido-reductase of photosynthesis* (Wydrzynski, T. and Satoh, K., Eds.). s.l., Springer, Dordrecht.
- Bricker, TM; y Frankel, LK. 2011. Auxiliary functions of the PsbO, PsbP and PsbQ proteins of higher plant Photosystem II: a critical analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104(1–2):165–178.
- Burke, EJ; Brown, SJ; y Christidis, N. 2006. Modeling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with the Hadley Centre climate model. *Journal of Hydrometeorology* 7(5):1113–1125.
- Busk, PK; y Pagès, M. 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant molecular biology* 37(3):425–435.
- Camargo, MAB; y Marengo, RA. 2011. Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia. *Acta Amazonica* 41(2):205–212.
- Cheesman, EE. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. s.l., IPC Science and Technology Press {.
- Chernyad'ev, II. 2005. Effect of water stress on the photosynthetic apparatus of plants and the protective role of cytokinins: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41(2):115–128.
- Chessman, EE. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Trop. Agr* 21:144–159.
- Choi, H; Hong, J; Ha, J; Kang, J; y Kim, SY. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive

element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* 275(3):1723–1730.

Chong, GL; Foo, MH; Lin, W-D; Wong, MM; y Verslues, PE. 2019. Highly ABA-Induced 1 (HAI1)-Interacting protein HIN1 and drought acclimation-enhanced splicing efficiency at intron retention sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(44):22376–22385.

Chow, WS; Miller, C; y Anderson, JM. 1991. Surface charges, the heterogeneous lateral distribution of the two photosystems, and thylakoid stacking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1057(1):69–77.

Christmann, A; Hoffmann, T; Teplova, I; Grill, E; y Müller, A. 2005. Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant physiology* 137(1):209–219.

Christmann, A; Weiler, EW; Steudle, E; y Grill, E. 2007. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal* 52(1):167–174.

Clayton, RK. 1962. PRIMARY REACTIONS IN BACTERIAL PHOTOSYNTHESIS—I. THE NATURE OF LIGHT-INDUCED ABSORBANCY CHANGES IN CHROMATOPHORES; EVIDENCE FOR A SPECIAL BACTERIOCHLOROPHYLL COMPONENT. *Photochemistry and Photobiology* 1(3):201–210.

Clayton, RK; y Wang, RT. 1971. [69] Photochemical reaction centers from *Rhodospseudomonas spheroides*. s.l., Elsevier, vol.23. p. 696–704.

Cramer, GR; Urano, K; Delrot, S; Pezzotti, M; y Shinozaki, K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology* 11(1):163.

Cutler, SR; Rodriguez, PL; Finkelstein, RR; y Abrams, SR. 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology* 61:651–679.

Dai, A. 2011. Drought under global warming: a review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* 2(1):45–65.

Davies, WJ; y Zhang, J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual review of plant biology* 42(1):55–76.

- Dias, LAS. 2001. Origin and distribution of *Theobroma cacao* L: a new scenario. Genetic improvement of cacao. Available at: <http://ecoport.org/ep> .
- Dilcher, D. 2000. Toward a new synthesis: major evolutionary trends in the angiosperm fossil record. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(13):7030–7036.
- Doheny-Adams, T; Hunt, L; Franks, PJ; Beerling, DJ; y Gray, JE. 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1588):547–555.
- Drake, PL; Froend, RH; y Franks, PJ. 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of experimental botany* 64(2):495–505.
- Dunlap, JM; y Stettler, RF. 2001. Variation in leaf epidermal and stomatal traits of *Populus trichocarpa* from two transects across the Washington Cascades. *Canadian Journal of Botany* 79(5):528–536.
- Egawa, C; Kobayashi, F; Ishibashi, M; Nakamura, T; Nakamura, C; y Takumi, S. 2006. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes & genetic systems* 81(2):77–91.
- Enríquez, GA. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. s.l., Bib. Orton IICA/CATIE.
- Erfanian, A; Wang, G; y Fomenko, L. 2017. Unprecedented drought over tropical South America in 2016: significantly under-predicted by tropical SST. *Scientific reports* 7(1):1–11.
- Farooq, M; Wahid, A; Kobayashi, N; Fujita, D; y Basra, SMA. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. s.l., Springer. p. 153–188.
- Farquhar, GD; y Sharkey, TD. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual review of plant physiology* 33(1):317–345.
- Fatehi, F; Hosseinzadeh, A; Alizadeh, H; y Brimavandi, T. 2013. The proteome response of *Hordeum spontaneum* to salinity stress. *Cereal research communications*

41(1):78–87.

Figueira, A; Janick, J; y Goldsbrough, P. 1992. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117(4):673–677.

Finkelstein, RR; Gampala, SSL; y Rock, CD. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* 14(suppl 1):S15–S45.

Forsyth, WGC; y Quesnel, VC. 1957. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 8(9):505–509.

Fowler, MS. 2008. *Cocoa Beans: From Tree to Factory* (en línea). s.l., Wiley-Blackwell. p. 10–47 DOI: <https://doi.org/10.1002/9781444301588.ch2>.

Fracheboud, Y; Jompuk, C; Ribaut, JM; Stamp, P; y Leipner, J. 2004. Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize (en línea). *Plant Molecular Biology* 56(2):241–253. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-004-3353-6>.

Franks, PJ; y Beerling, DJ. 2009. CO₂-forced evolution of plant gas exchange capacity and water-use efficiency over the Phanerozoic. *Geobiology* 7(2):227–236.

Franks, PJ; Drake, PL; y Beerling, DJ. 2009. Plasticity in maximum stomatal conductance constrained by negative correlation between stomatal size and density: an analysis using *Eucalyptus globulus*. *Plant, cell & environment* 32(12):1737–1748.

Fu, QS; Yang, RC; Wang, HS; Zhao, B; Zhou, CL; Ren, SX; y Guo, Y-D. 2013. Leaf morphological and ultrastructural performance of eggplant (*Solanum melongena* L.) in response to water stress. *Photosynthetica* 51(1):109–114.

Fujita, Y; Yoshida, T; y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2013. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia plantarum* 147(1):15–27.

Furihata, T; Maruyama, K; Fujita, Y; Umezawa, T; Yoshida, R; Shinozaki, K; y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(6):1988–1993.

García, CL. 2010. Catálogo de cultivares de cacao del Perú. Ministerio de Agricultura-DEVIDA. Lima-Perú 111.

Geiger, D; Scherzer, S; Mumm, P; Stange, A; Marten, I; Bauer, H; Ache, P; Matschi, S; Liese, A; y Al-Rasheid, KAS. 2009. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(50):21425–21430.

Ghassemi-Golezani, K; y Farhangi-Abriz, S. 2018. Changes in oil accumulation and fatty acid composition of soybean seeds under salt stress in response to salicylic acid and jasmonic acid. *Russian Journal of Plant Physiology* 65(2):229–236.

Gisriel, C; Sarrou, I; Ferlez, B; Golbeck, JH; Redding, KE; y Fromme, R. 2017. Structure of a symmetric photosynthetic reaction center–photosystem. *Science* 357(6355):1021–1025.

Gomez, R. 2014. Paquete Tecnológico del Cultivo del Cacao Fino de Aroma (en línea). s.l., s.e. Disponible en http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/01/Paquete_Tecnologico_Cultivo_Cacao.pdf.

Gonzalez-Guzman, M; Pizzio, GA; Antoni, R; Vera-Sirera, F; Merilo, E; Bassel, GW; Fernández, MA; Holdsworth, MJ; Perez-Amador, MA; y Kollist, H. 2012. Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *The Plant Cell* 24(6):2483–2496.

He, B; Lü, A; Wu, J; Zhao, L; y Liu, M. 2011. Drought hazard assessment and spatial characteristics analysis in China. *Journal of Geographical Sciences* 21(2):235–249.

Henry, C; John, GP; Pan, R; Bartlett, MK; Fletcher, LR; Scoffoni, C; y Sack, L. 2019. A stomatal safety-efficiency trade-off constrains responses to leaf dehydration. *Nature communications* 10(1):1–9.

Hetherington, AM; y Woodward, FI. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424(6951):901–908.

Hong, T; Lin, H; y He, D. 2018. Characteristics and correlations of leaf stomata in different *Aleurites montana* provenances (en línea). *PloS one* 13(12):e0208899–

e0208899. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208899>.

Horton, P; Ruban, A V; y Walters, RG. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annual review of plant biology* 47(1):655–684.

Huo, Y; Wang, M; Wei, Y; y Xia, Z. 2016. Overexpression of the maize psbA gene enhances drought tolerance through regulating antioxidant system, photosynthetic capability, and stress defense gene expression in tobacco. *Frontiers in plant science* 6:1223.

Ibaraki, Y; y Murakami, J. 2006. Distribution of chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm within individual plants under various stress conditions. *In XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Advances in Environmental Control, Automation* 761. s.l., s.e. p. 255–260.

International Cocoa, O. 2013. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, Vol. XXXIX, No. 4, Cocoa year 2012/13. s.l., International Cocoa Organization London, UK.

_____ 2014. *ICCO Annual Report 2014/2015*. s.l., ICCO London, UK.

Jakoby, M; Weisshaar, B; Dröge-Laser, W; Vicente-Carbajosa, J; Tiedemann, J; Kroj, T; y Parcy, F. 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science* 7(3):106–111.

Kang, J; Hwang, J-U; Lee, M; Kim, Y-Y; Assmann, SM; Martinoia, E; y Lee, Y. 2010. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of sciences* 107(5):2355–2360.

Kardiman, R; y Ræbild, A. 2018. Relationship between stomatal density, size and speed of opening in Sumatran rainforest species. *Tree physiology* 38(5):696–705.

Keyvan, S. 2010. The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *J. Anim. Plant Sci* 8(3):1051–1060.

Kim, H; y Keeney, PG. 1984. (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *Journal of Food Science* 49(4):1090–1092.

- Kim, J; Bhatnagar, N; Kwon, SJ; Min, MK; Moon, S-J; Sun Yoon, I; Kwon, T-R; Tae Kim, S; y Kim, B-G. 2018. Transcriptome Analysis of ABA/JA-Dual Responsive Genes in Rice Shoot and Root. *Current genomics* 19(1):4–11.
- Kim, T-H; Böhmer, M; Hu, H; Nishimura, N; y Schroeder, JI. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual review of plant biology* 61:561–591.
- Kramer, PJ; y Boyer, JS. 1995. *Water relations of plants and soils*. s.l., Academic press.
- Krause, GH; y Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual review of plant biology* 42(1):313–349.
- Kunikullaya, A; Suresh, J; Balakrishnan, S; Kumar, M; Jeyakumar, P; Kumaravadivel, N; y Jegadeeswari, V. 2018. Effect of water stress on photosynthetic parameters of cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes. *IJCS* 6(6):1021–1025.
- Kuromori, T; Miyaji, T; Yabuuchi, H; Shimizu, H; Sugimoto, E; Kamiya, A; Moriyama, Y; y Shinozaki, K. 2010. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(5):2361–2366.
- Läderach, P; Martinez-Valle, A; Schroth, G; y Castro, N. 2013. Predicting the future climatic suitability for cocoa farming of the world's leading producer countries, Ghana and Côte d'Ivoire (en línea). *Climatic Change* 119(3):841–854. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10584-013-0774-8>.
- Lahive, F; Handley, LR; Hadley, P; y Daymond, AJ. 2021. Climate Change Impacts on Cacao: Genotypic Variation in Responses of Mature Cacao to Elevated CO₂ and Water Deficit. *Agronomy* 11(5):818.
- Lanaud, C; Hamon, P; y Duperray, C. 1992. Estimation of nuclear DNA content of *Theobroma cacao* L. by flow cytometry. *Café, cacao, thé* 36(1):3–8.
- De Las Rivas, J; y Barber, J. 2004. Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications. *Photosynthesis Research* 81(3):329–343.
- Lawson, T; y Blatt, MR. 2014. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on

photosynthesis and water use efficiency. *Plant physiology* 164(4):1556–1570.

Lee, HY; Jun, S-S; y Hong, Y-N. 2004. Increased photoinhibition in dehydrated leaves of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) is not accompanied by an incremental loss of functional PSII. *Journal of Plant Biology* 47(2):83–91.

Lee, SC; Lan, W; Buchanan, BB; y Luan, S. 2009. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(50):21419–21424.

Leung, J; y Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annual review of plant biology* 49(1):199–222.

Li, R; Guo, P; Michael, B; Stefania, G; y Salvatore, C. 2006. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China* 5(10):751–757.

Liberato, T; y Díaz, E. 2000. (2000). Paquete Tecnológico del Cacao para Jaén, Tocache y Tingo Maria. PRISMA. Proyecto de Desarrollo Alternativo del Bajo Huallaga. Naciones Unidas. PNU. Seminario Taller del Cacao en el Perú. s.l., PNDA-CONTRADROGAS/CICAD-OEA. Lima, Perú, 14 y 15 de Diciembre 2000.

Lima, ALS; DaMatta, FM; Pinheiro, HA; Totola, MR; y Loureiro, ME. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and experimental botany* 47(3):239–247.

Lisar, SYS; Motafakkerzad, R; y Hossain, MM. 2012. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. *Water Stress*, Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-963-9. Tech. doi 10:39363.

Liu, H; Zhou, X; Dong, N; Liu, X; Zhang, H; y Zhang, Z. 2011. Expression of a wheat MYB gene in transgenic tobacco enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*, and to drought and salt stresses. *Functional & Integrative Genomics* 11(3):431–443.

Liu, J; Zhao, Y; Shi, Z; y Bai, Y. 2019. Antitumor effects of helenalin in doxorubicin-resistant leukemia cells are mediated via mitochondrial mediated apoptosis, loss of mitochondrial membrane potential, inhibition of cell migration and invasion and

downregulation of PI3-kinase/AKT/m-TOR signal. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 24(5):2068–2074.

Liu, X-Y; Li, B; Yang, J-H; Sui, N; Yang, X-M; y Meng, Q-W. 2008. Overexpression of tomato chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene alleviates the photoinhibition of photosystems 2 and 1 under chilling stress. *Photosynthetica* 46(2):185.

Livak, KJ; y Schmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods* 25(4):402–408.

Loor Solorzano, RG; Fouet, O; Lemainque, A; Pavek, S; Boccara, M; Argout, X; Amores, F; Courtois, B; Risterucci, AM; y Lanaud, C. 2012. Insight into the wild origin, migration and domestication history of the fine flavour Nacional Theobroma cacao L. variety from Ecuador. *PLoS One* 7(11):e48438. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048438>.

Lumba, S; Toh, S; Handfield, L-F; Swan, M; Liu, R; Youn, J-Y; Cutler, SR; Subramaniam, R; Provar, N; y Moses, A. 2014. A mesoscale abscisic acid hormone interactome reveals a dynamic signaling landscape in Arabidopsis. *Developmental Cell* 29(3):360–372.

Ma, Y; Szostkiewicz, I; Korte, A; Moes, D; Yang, Y; Christmann, A; y Grill, E. 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324(5930):1064–1068.

Martin-StPaul, N; Delzon, S; y Cochard, H. 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecology letters* 20(11):1437–1447.

MINAGRI. 2016. Estudio del cacao en el Perú y el mundo (en línea). s.l., s.e. Disponible en <http://www.minagri.gob.pe/portal/analisis-economico/analisis-2016?download=10169:estudio-del-cacao-en-el-peru-y-en-el-mundo>.

Mohd Razi, I; Abd Halim, H; Kamariah, D; y Noh, M. 1992. Growth, plant water relation and photosynthesis rate of young Theobroma cacao as influenced by water stress. *Pertanika (Malaysia)* .

Moscol Saavedra, M; y Espinoza Tamariz, E. 2012. (2012). Manual [de] técnico del

cultivo de cacao blanco de Piura. s.l., Ministerio de Agricultura, Lima (Peru).

Motamayor, JC; Risterucci, AM; Lopez, PA; Ortiz, CF; Moreno, A; y Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* (Edinb) 89(5):380–386. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>.

Motamayor, JC; Lachenaud, P; da Silva e Mota, JW; Loor, R; Kuhn, DN; Brown, JS; y Schnell, RJ. 2008. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L) (en línea). *PLOS ONE* 3(10):e3311. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>.

Müller, P; Li, X-P; y Niyogi, KK. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant physiology* 125(4):1558–1566.

Munemasa, S; Mori, IC; y Murata, Y. 2011. Methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid in guard cells. *Plant Signaling & Behavior* 6(7):939–941.

Mustiga, GM; Morrissey, J; Stack, JC; DuVal, A; Royaert, S; Jansen, J; Bizzotto, C; Villela-Dias, C; Mei, L; y Cahoon, EB. 2019. Identification of climate and genetic factors that control fat content and fatty acid composition of *Theobroma cacao* L. beans. *Frontiers in plant science* 10:1159.

NASA. 2020. 2020. Drought-Stressed Forest Fueled Amazon Fires | NASA (en línea, sitio web). Consultado 3 mar. 2020. Disponible en <https://www.nasa.gov/feature/jpl/drought-stressed-forest-fueled-amazon-fires>.

Ng, LM; Melcher, K; Teh, BT; y Xu, HE. 2014. Abscisic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica* 35(5):567–584.

Ngamhui, N; Akkasaeng, C; Zhu, YJ; Tantisuwichwong, N; Roytrakul, S; y Sansayawichai, T. 2012. Differentially expressed proteins in sugarcane leaves in response to water deficit stress. *Plant Omics* 5(4):365.

Nishimura, N; Sarkeshik, A; Nito, K; Park, S; Wang, A; Carvalho, PC; Lee, S; Caddell, DF; Cutler, SR; y Chory, J. 2010. PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*

61(2):290–299.

Nouraei, S; Rahimmalek, M; Saeidi, G; y Bahreininejad, B. 2016. Variation in seed oil content and fatty acid composition of globe artichoke under different irrigation regimes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 93(7):953–962.

Ohsumi, A; Kanemura, T; Homma, K; Horie, T; y Shiraiwa, T. 2007. Genotypic variation of stomatal conductance in relation to stomatal density and length in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science* 10(3):322–328.

de Ollas, C; y Dodd, IC. 2016. Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. *Plant molecular biology* 91(6):641–650.

Osakabe, Y; Osakabe, K; Shinozaki, K; y Tran, L-SP. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science* 5:86.

Paknejad, F; Nasri, M; Moghadam, HRT; Zahedi, H; y Alahmadi, MJ. 2007. Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content and grain yield of wheat cultivars. *J Biol Sci* 7:841–847.

Park, S-Y; Fung, P; Nishimura, N; Jensen, DR; Fujii, H; Zhao, Y; Lumba, S; Santiago, J; Rodrigues, A; y Tsz-fung, FC. 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *science* 324(5930):1068–1071.

Pearce, DW; Millard, S; Bray, DF; y Rood, SB. 2006. Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. *Tree physiology* 26(2):211–218.

Pelchat, ML. 1997. Food cravings in young and elderly adults. *Appetite* 28(2):103–113.

Pinzón, J; y Rojas, J. 2007. *Guía Técnica para el Cultivo de Cacao*. 2^a. s.l., Edicion.

Pospíšil, P. 2012. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1817(1):218–231.

Pound, FJ. 1945. A note on the cocoa population of South America. *In Report and Proceedings of the 1945 Cocoa Conference*. London. s.l., s.e. p. 131–133.

- Purseglove, JW. 1968. Tropical crops. Dicotyledons 1 and 2. Tropical crops. Dicotyledons 1 and 2. .
- Qin, F; Shinozaki, K; y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2011. Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant and Cell Physiology* 52(9):1569–1582.
- Qin, Y; Wang, M; Tian, Y; He, W; Han, L; y Xia, G. 2012. Over-expression of TaMYB33 encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Biology Reports* 39(6):7183–7192.
- Raghavendra, AS; Gonugunta, VK; Christmann, A; y Grill, E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends in plant science* 15(7):395–401.
- Rahdari, P; y Hoseini, SM. 2012. Drought stress: a review. *International Journal of Agronomy and Plant Production* 3(10):443–446.
- Rana, RM; Rehman, SU; Ahmed, J; y Bilal, M. 2013. A comprehensive overview of recent advances in drought stress tolerance research in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian Journal of Agriculture and Biology* 1:29–37.
- Reed, DW; y Clayton, RK. 1968. Isolation of a reaction center fraction from *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochemical and biophysical research communications* 30(5):471–475.
- Romero-Aranda, R; Cantó-Garay, R; y Martínez, PF. 1994. Distribution and density of stomata in two cultivars of *Gerbera jamesonii* and its relation to leaf conductance. *Scientia horticultrae* 58(1–2):167–173.
- Roose, JL; Yocum, CF; y Popelkova, H. 2011. Binding stoichiometry and affinity of the manganese-stabilizing protein affects redox reactions on the oxidizing side of photosystem II. *Biochemistry* 50(27):5988–5998.
- Sakuma, Y; Maruyama, K; Osakabe, Y; Qin, F; Seki, M; Shinozaki, K; y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell* 18(5):1292–1309.

- Salehi-lisar, SY; Motafakkerazad, R; Hossain, MM; y Rahman, IMM. 2012. Water stress in plants: causes, effects and responses, water stress. InTech .
- Sallam, A; Alqudah, AM; Dawood, MFA; Baenziger, PS; y Börner, A. 2019. Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research. *International journal of molecular sciences* 20(13):3137.
- dos Santos, IC; de Almeida, A-AF; Anher, D; da Conceicao, AS; Pirovani, CP; Pires, JL; Valle, RR; y Baligar, VC. 2014. Molecular, physiological and biochemical responses of *Theobroma cacao* L. genotypes to soil water deficit. *PloS one* 9(12).
- Sapeta, H; Costa, JM; Lourenco, T; Maroco, J; Van der Linde, P; y Oliveira, MM. 2013. Drought stress response in *Jatropha curcas*: growth and physiology. *Environmental and Experimental Botany* 85:76–84.
- Sarvikas, P; Hakala, M; Pätsikkä, E; Tyystjärvi, T; y Tyystjärvi, E. 2006. Action spectrum of photoinhibition in leaves of wild type and npq1-2 and npq4-1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 47(3):391–400.
- Sayed, OH. 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* 41(3):321–330.
- Scholander, PF; Bradstreet, ED; Hemmingsen, EA; y Hammel, HT. 1965. Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148(3668):339–346.
- Schroth, G; Läderach, P; Martinez-Valle, AI; Bunn, C; y Jassogne, L. 2016. Vulnerability to climate change of cocoa in West Africa: patterns, opportunities and limits to adaptation. *Science of the Total Environment* 556:231–241.
- Schwan, RF; y Wheals, AE. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition* 44(4):205–221.
- Shahinnia, F; Le Roy, J; Laborde, B; Sznajder, B; Kalambettu, P; Mahjourimajd, S; Tilbrook, J; y Fleury, D. 2016. Genetic association of stomatal traits and yield in wheat grown in low rainfall environments. *BMC plant biology* 16(1):150.
- Shinozaki, K; y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular responses to dehydration

and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current opinion in plant biology* 3(3):217–223.

Siddiqui, MH; Al-Khaishany, MY; Al-Qutami, MA; Al-Wahaibi, MH; Grover, A; Ali, HM; y Al-Wahaibi, MS. 2015. Morphological and physiological characterization of different genotypes of faba bean under heat stress. *Saudi journal of biological sciences* 22(5):656–663.

Sivakumar, R; Nandhitha, GK; y Nithila, S. 2017. Impact of drought on chlorophyll, soluble protein, abscisic acid, yield and quality characters of contrasting genotypes of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Current Journal of Applied Science and Technology* :1–10.

Smillie, RM; y Hetherington, SE. 1990. Screening for stress tolerance by chlorophyll fluorescence. *Measurement Techniques in Plant Science*, Academic Press, New York :229–261.

Sugihara, K; Hanagata, N; Dubinsky, Z; Baba, S; y Karube, I. 2000. Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. *Plant and Cell Physiology* 41(11):1279–1285.

Sun, Y; Yan, F; Cui, X; y Liu, F. 2014. Plasticity in stomatal size and density of potato leaves under different irrigation and phosphorus regimes. *Journal of plant physiology* 171(14):1248–1255.

Suorsa, M; y Aro, E-M. 2007. Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants. *Photosynthesis Research* 93(1–3):89–100.

Takahashi, S; y Murata, N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in plant science* 13(4):178–182.

Tambussi, EA; Casadesus, J; Munné-Bosch, S; y Araus, JL. 2002. Photoprotection in water-stressed plants of durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum): changes in chlorophyll fluorescence, spectral signature and photosynthetic pigments. *Functional Plant Biology* 29(1):35–44.

Taylor, SH; Franks, PJ; Hulme, SP; Spriggs, E; Christin, PA; Edwards, EJ; Woodward, FI; y Osborne, CP. 2012. Photosynthetic pathway and ecological adaptation explain stomatal trait diversity amongst grasses. *New Phytologist* 193(2):387–396.

Thomas, E; van Zonneveld, M; Loo, J; Hodgkin, T; Galluzzi, G; y 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 (en línea). *PloS one* 7(10):e47676–e47676. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047676>.

Thomashow, MF. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual review of plant biology* 50(1):571–599.

Torres Pezo, G. 2019. Selección e identificación de 20 genotipos de cacao peruano (silvestres y domesticados) e internacionales, tolerantes al estrés hídrico en condición de vivero. .

Tran, L-SP; Nakashima, K; Sakuma, Y; Simpson, SD; Fujita, Y; Maruyama, K; Fujita, M; Seki, M; Shinozaki, K; y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell* 16(9):2481–2498.

Uno, Y; Furihata, T; Abe, H; Yoshida, R; Shinozaki, K; y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(21):11632–11637.

Vera, J; Mite, F; Páliz, V; Sotomayor, I; Moreira, M; y Suárez, C. 1987. Manual de cultivo de Cacao. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental „Pichilingue“. p 50.

Vojta, P; Kokáš, F; Husičková, A; Grúz, J; Bergougnoux, V; Marchetti, CF; Jiskrová, E; Ježilová, E; Mik, V; Ikeda, Y; y Galuszka, P. 2016. Whole transcriptome analysis of transgenic barley with altered cytokinin homeostasis and increased tolerance to drought stress (en línea). *New Biotechnology* 33(5, Part B):676–691. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.010>.

- Wahid, PA; Kamalam, N V; Ashokan, PK; y Vikraman Nair, R. 1989. Root activity pattern of cocoa (*Theobroma cacao*). *J Nuclear Agric Biol* 18:153–156.
- Wan, H; Liu, H; Zhang, J; Lyu, Y; Li, Z; He, Y; Zhang, X; Deng, X; Brotman, Y; y Fernie, AR. 2020. Lipidomic and transcriptomic analysis reveals reallocation of carbon flux from cuticular wax into plastid membrane lipids in a glossy “Newhall” navel orange mutant. *Horticulture research* 7(1):1–18.
- Wang, K; Guo, Q; Froehlich, JE; Hersh, HL; Zienkiewicz, A; Howe, GA; y Benning, C. 2018. Two abscisic acid-responsive plastid lipase genes involved in jasmonic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 30(5):1006–1022.
- Wang, Q; Wu, J; Lei, T; He, B; Wu, Z; Liu, M; Mo, X; Geng, G; Li, X; y Zhou, H. 2014. Temporal-spatial characteristics of severe drought events and their impact on agriculture on a global scale. *Quaternary International* 349:10–21.
- Wang, Y; Wei, S; Wang, J; Su, X; Suo, B; Qin, F; y Zhao, H. 2018. Exogenous application of 5-aminolevulinic acid on wheat seedlings under drought stress enhances the transcription of psbA and psbD genes and improves photosynthesis. *Brazilian Journal of Botany* 41(2):275–285.
- Wang, Z; Li, G; Sun, H; Ma, L; Guo, Y; Zhao, Z; Gao, H; y Mei, L. 2018. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology open* 7(11).
- Wasternack, C; y Hause, B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany* 111(6):1021–1058.
- Wasternack, C; Forner, S; Strnad, M; y Hause, B. 2013. Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie* 95(1):79–85.
- Wei, W; Liang, D; Bian, X; Shen, M; Xiao, J; Zhang, W; Ma, B; Lin, Q; Lv, J; y Chen, X. 2019. GmWRKY54 improves drought tolerance through activating genes in abscisic acid and Ca²⁺ signaling pathways in transgenic soybean. *The Plant Journal* 100(2):384–398.

- Weingarten, HP; y Elston, D. 1991. Food cravings in a college population. *Appetite* 17(3):167–175.
- Wilkinson, S; y Davies, WJ. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment* 33(4):510–525.
- Wong, MM; Bhaskara, GB; Wen, T-N; Lin, W-D; Nguyen, TT; Chong, GL; y Verslues, PE. 2019. Phosphoproteomics of Arabidopsis Highly ABA-Induced1 identifies AT-Hook-Like10 phosphorylation required for stress growth regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(6):2354–2363.
- Wood, GAR; y Lass, RA. 2008. *Cocoa*. s.l., John Wiley & Sons.
- Xiao, M; Li, Y; Wang, J; Hu, X; Wang, L; y Miao, Z. 2019. Study on the Law of Nitrogen Transfer and Conversion and Use of Fertilizer Nitrogen in Paddy Fields under Water-Saving Irrigation Mode. *Water* 11(2):218.
- Xoconostle-Cazares, B; Ramirez-Ortega, FA; Flores-Elenes, L; y Ruiz-Medrano, R. 2010. Drought tolerance in crop plants. *Am J Plant Physiol* 5(5):1–16.
- Yamaguchi-Shinozaki, K; y Shinozaki, K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:781–803.
- Yamamoto, Y. 2001. Quality control of photosystem II. *Plant and Cell Physiology* 42(2):121–128.
- Yang, A; Akhtar, SS; Amjad, M; Iqbal, S; y Jacobsen, S. 2016. Growth and physiological responses of quinoa to drought and temperature stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 202(6):445–453.
- Yoshida, T; Mogami, J; y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2014. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current opinion in plant biology* 21:133–139.
- Zare, M; Azizi, MH; y Bazrafshan, F. 2011. Effect of drought stress on some agronomic traits in ten barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Tech. J. Eng. Appl. Sci* 1(3):57–62.

Zarrillo, S; Gaikwad, N; Lanaud, C; Powis, T; Viot, C; Lesur, I; Fouet, O; Argout, X; Guichoux, E; y Salin, F. 2018. The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature ecology & evolution* 2(12):1879–1888.

Zhang, M; Barg, R; Yin, M; Gueta-Dahan, Y; Leikin-Frenkel, A; Salts, Y; Shabtai, S; y Ben-Hayyim, G. 2005. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct ω -3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *The Plant Journal* 44(3):361–371.

Zlatev, Z; y Lidon, FC. 2012. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emirates Journal of Food and Agriculture* :57–72.

Zulini, L; Rubinigg, M; Zorer, R; y Bertamini, M. 2005. Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence and photosynthetic pigments in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. 'White Riesling'). *In* International Workshop on Advances in Grapevine and Wine Research 754. s.l., s.e. p. 289–294.

VIII ANEXOS

Anexo 1. Medición de potencial hídrico foliar

En esta técnica, el órgano a medir se extirpa de la planta y se sella parcialmente en la cámara de presión. Antes de la escisión, la columna de agua en el xilema está bajo tensión. Sin embargo, la tensión se elimina cuando se realiza la escisión del órgano (es decir, el Ψ_w tiende hacia cero). Además, el agua será extraída rápidamente del xilema por las células vivas circundantes mediante osmosis. En consecuencia, la superficie de corte aparece opaca y seca. Para realizar la medición del Ψ_w del órgano, se debe presurizar la cámara con gas comprimido hasta que la distribución de agua entre las células vivas y los conductos del xilema vuelve a su estado inicial previo a la escisión. Esto se puede detectar visualmente observando cuando el agua vuelve a los extremos abiertos de los conductos de xilema que se pueden ver en la superficie de corte en forma de gota de agua. La presión necesaria para el agua vuelva a su distribución inicial se llama presión de equilibrio y se detecta fácilmente por el cambio en la apariencia de la superficie de corte, que se vuelve húmeda y brillante cuando se alcanza esta presión. La presión de equilibrio será equivalente al Ψ_w del tejido que se pretenderá evaluar.

Anexo 2. Protocolo híbrido (Kit RNeasy Mini/CTAB) de extracción de RNA de hojas frescas cacao.

1. Pesar 250-500 mg aproximadamente de muestras de hojas frescas, colocar en el mortero y agregar suficiente cantidad de Nitrógeno líquido que cubra la muestra y con ayuda del pilón triturar la muestra hasta obtener un polvo fino. (Evite que la muestra se humedezca).
2. Transferir el polvo obtenido a un tubo de 15mL y agregar 5ml de buffer extracción, 400ul buffer RLT y 100ul de β -mercaptoetanol (Agregado al momento de la extracción). Incubar a 65°C por 20min.
3. Luego centrifugar a 12000g por 5 min a 4°C y transferir la parte superior a un tubo nuevo de 15mL.
4. Agregar 2mL de Trizol. Mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente por 2min.
5. Agregar 1mL de cloroformo:alcohol isoamilico(24:1). Mezclar por inversión y centrifugar a 8000 g por 30min a 4°C. Transferir la fase superior a un tubo nuevo de 15mL.
6. Agregar 0.5mL de Isopropanol frio por cada 600uL de la fase aislada acuosa y mezclar por inversión.
7. Agregar 700uL de la solución del paso 6, incluyendo cualquier precipitado, a la columna RNeasy Mini spin* y ponerla sobre el tubo colector. Cerrar la tapa y centrifugar 8000 g por 1min. Luego descarta el eluido.
8. Repetir este pasó hasta pasar todo el volumen de la solución del paso 6.
9. Agregar 350uL del buffer RW1* dentro de la columna. Centrifugar a 8000g por 1min. Descartar el eluido.
10. Agregar 80uL de DNAsa I mix directamente a la columna y deja incubar por 15min a temperatura ambiente.

11. Agregar 350uL del buffer RW1* dentro de la columna. Centrifugar a 8000g por 1min. Descartar el eluido.
12. Agregar 500uL del buffer RPE* dentro de la columna. Centrifugar a 8000g por 1min. Descartar el eluido.
13. Agregar 500uL del buffer RPE* dentro de la columna. Centrifugar a 8000g por 2min. Descartar el eluido.
14. Ubicar la columna en un tubo nuevo de 1.5mL. Centrifugar a máxima velocidad por 1min. Descartar el eluido junto con el tubo nuevo.
15. Ubicar la columna en un tubo nuevo de 1.5mL. Abrir la tapa y cuidadosamente agregar 30-50uL de Agua libre de RNAsa (DEPC-H₂O). Después, centrifugar a 8000g por 1min para eluir el RNA.
16. Mediar la concentración de RNA por Nanodrop y almacenar a -20°C.

Componentes buffer de extracción RNA

Componentes	Concentración inicial	Concentración Final
CTAB	-	2 %
NaCl	-	2 M
EDTA	0.5 M	25 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	100 mM
PVP(40000)	-	2 %
Espermidina	-	0.5 g/L

*Autoclavar la mezcla dos veces.

Preparación EDTA (0.5M) pH 8.0

- Pesar 186.1 g de EDTA y agregar 800 mL de H₂O.
- Diluir completamente sobre el stir magnético. Ajustar el pH a 8 con NaOH.
- Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: La sal de EDTA no se disolverá hasta que el pH de la solución sea aproximadamente de 8.

Preparación Tris-HCl (1M) pH 8

- Disolver 121.1 g de Tris base en 800 mL de H₂O DEPC.
- Ajustar el pH al valor deseado empleando HCl.

Preparación DNAsa I mix

	Vol(1Rx)	Vol(10Rx)
DNase I (Cat: AM2222)	2.5uL (5U)	25uL
10X DNase I Buffer	8uL	80uL
H ₂ O DEPC	69.5	695uL

Anexo 3. Pares de sondas usadas en el qPCR.

Gen	Sonda	Tamaño de producto
PsbO	5'...GCAAACGCTGAAGGAGTT...3' 5'...GGCTTGAAGGCAAATGAGTC...3'	139pb
PsbA	5'...GGTTTGCACCTTTACCCGA...3' 5'...CTCATAAGGACCGCCATT...3'	72pb
PLIP2	5'...ACTTGATGCTGCTAACTAGG...3' 5'...CTAGTATCTTTTGGCCTCCG...3'	102pb
PLIP3	5'...TTCGGTAGACTTGTTGCTTC...3' 5'...TGTATGCACCCAAGAGTAAC...3'	85pb
HAI-1	5'...AGGGCTCGAGTGACTTTTCA...3' 5'...CCGATGAAGACGGGAATAAA...3'	89pb
Actina	5'...TCCTCTTCCAGCCATCTCTC...3' 5'...TCTCCTTGCTCATTCGGTCT...3'	171pb

Anexo 4. Método de cuantificación para evaluar el nivel de expresión relativa de los genes PsbA, PsbO, HAI-1, PLIP2 y PLIP3 en las variedades de cacao POUND_7 (P7), ICS_1 y Porcelana de Piura (PP)

El nivel de expresión en las plantas con el tratamiento con sequía (CS) mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se determinó respecto al calibrador es decir plantas con el tratamiento sin sequía (SS). El nivel transcripcional actina (act) se utilizó como gen normalizador (housekeeping) de las expresiones en los genes de interés (Gi).

Normalización:

$$\Delta Ct1 = Ct (Gi, CS) - Ct (act, CS)$$

$$\Delta Ct2 = Ct (Gi, SS) - Ct (act, SS)$$

Unidades de expresión relativa:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 - \Delta Ct2$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{unidades de expresión relativa}$$

Anexo 5. Salidas del diseño completamente aleatorio con arreglo factorial

El diseño fue aplicado a los parámetros fisiológicos evaluadas en el estudio los cuales son Eficiencia fotosintética, contenido de clorofila y potencial hídrico mostrados en este orden a continuación. El análisis comenzó revisando la salida del análisis de varianza y luego el posthoc para la comparación de medias. Apreciándose los grupos formados con respecto a las variables independientes condición, variedad y variedad:condición.

EFICIENCIA FOTOSINTETICA (FM/FV)

analysis of variance

Fuentes variacion	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Condicion	1	0.0000	0.00000	0.000	0.614
Variedad	2	0.3389	0.16943	93.359	<2e-16 ***
Condicion:Variedad	2	0.0021	0.00105	0.607	0.549
Residuals	54	0.0930	0.00172		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

posthoc multiple comparisons of means

Statistics

MSError	Df	Mean	CV
0.001722574	54	0.6870663	6.040742

Parameters

Test	alpha
Duncan	0.05

Comparison

Condicion

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
SS-CS	-0.0002155203	-0.02170033	0.02126929	0.984

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Fm Fv	groups
SS	0.6869586	a
CS	0.6871741	a

Variedad

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
P7-ICS	-0.17751296	-0.20388362	-0.15114230	< 2e-16 ***
PP-ICS	-0.04545476	-0.07232679	-0.01858274	0.0010 **
PP-P7	0.13205820	0.10457833	0.15953807	4.4e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Fm Fv	groups
ICS	0.7573000	a
PP	0.7210286	b
P7	0.5828704	c

Condicion:variedad

	diff	lwr.ci	upr.ci	pval
SS:ICS-CS:ICS	0.01190000	-0.02258696	0.0463869632	0.4964
CS:P7-CS:ICS	-0.16321111	-0.20174484	-0.1246773823	7.8e-15***
SS:P7-CS:ICS	-0.17991481	-0.21935994	-0.1404696892	7.2e-15***
CS:PP-CS:ICS	-0.05076667	-0.09076629	-0.0107670412	0.0125*
SS:PP-CS:ICS	-0.02824286	-0.06624564	0.0097599254	0.1441
CS:P7-SS:ICS	-0.17511111	-0.21455624	-0.1356659855	7.5e-15***
SS:P7-SS:ICS	-0.19181481	-0.23196992	-0.1516597113	5.1e-15***
CS:PP-SS:ICS	-0.06266667	-0.10399624	-0.0213370924	0.0025**
SS:PP-SS:ICS	-0.04014286	-0.08014248	-0.0001432317	0.0492*
SS:P7-CS:P7	-0.01670370	-0.05305615	0.0196487474	0.3654
CS:PP-CS:P7	0.11244444	0.07358204	0.1513068494	5.7e-08***
SS:PP-CS:P7	0.13496825	0.09406384	0.1758726703	2.5e-10***
CS:PP-SS:P7	0.12914815	0.08824373	0.1700525645	1.2e-09***
SS:PP-SS:P7	0.15167196	0.10940751	0.1939364063	3.2e-12***
SS:PP-CS:PP	0.02252381	-0.01869600	0.0637436146	0.2820

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Fm Fv	groups
SS.ICS	0.7663333	a
CS.ICS	0.7544333	ab
SS.PP	0.7261905	ab
CS.PP	0.7036667	b
CS.P7	0.5912222	c
SS.P7	0.5745185	c

CLOROFILA

Analysis of variance

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Condicion	1	1400	1400	0.563	0.45645
Variedad	2	493164	246582	99.114	< 2e-16 ***
Condicion:Variedad	2	26448	13224	5.315	0.00781 **
Residuals	54	134345	2488		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Posthoc multiple comparisons of means

Statistics

MSerror	Df	Mean	CV
2487.863	54	473.9921	10.52306

Parameters

test	alpha
Duncan	0.05

Comparison

Condicion

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
SS-CS	9.660317	-16.15966	35.4803	0.4564

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	clorofila	groups
SS	475.4615	a
CS	465.2308	a

Variedad

	diff	lwr.ci	upr.ci	pval
P7-ICS	-181.16667	-212.78955	-149.54378	4.5e-13***
PP-ICS	20.64286	-10.98003	52.26574	0.1962
PP-P7	201.80952	168.54663	235.07242	2.2e-13***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Clorofila	groups
PP	548.1429	a
ICS	527.5000	a
P7	346.3333	b

Condicion:Variedad

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval	
SS:ICS-CS:ICS	52.60000	24.765323	80.43468	0.00019	***
CS:P7-CS:ICS	-131.20000	-158.369785	-104.03021	1.6e-15	***
SS:P7-CS:ICS	-178.53333	-207.130745	-149.93592	< 2e-16	***
CS:PP-CS:ICS	35.08571	5.944604	64.22682	0.01862	*
SS:PP-CS:ICS	58.80000	27.107855	90.49214	0.00020	***
CS:P7-SS:ICS	-183.80000	-213.348248	-154.25175	< 2e-16	***
SS:P7-SS:ICS	-231.13333	-261.380454	-200.88621	< 2e-16	***
CS:PP-SS:ICS	-17.51429	-46.655396	11.62682	0.23689	
SS:PP-SS:ICS	6.20000	-22.941110	35.34111	0.67480	
SS:P7-CS:P7	-47.33333	-75.208945	-19.45772	0.00100	**
CS:PP-CS:P7	166.28571	134.919587	197.65184	< 2e-16	***
SS:PP-CS:P7	190.00000	156.824444	223.17556	< 2e-16	***
CS:PP-SS:P7	213.61905	181.210027	246.02807	< 2e-16	***
SS:PP-SS:P7	237.33333	203.560646	271.10602	< 2e-16	***
SS:PP-CS:PP	23.71429	-9.554516	56.98309	0.16467	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	clorofila	groups
SS.PP	560.0000	a
SS.ICS	553.8000	a
CS.PP	536.2857	ab
CS.ICS	501.2000	b
CS.P7	370.0000	c
SS.P7	322.6667	d

POTENCIAL HIDRICO

Analysis of variance

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Condicion	1	270.62	270.62	183.01	< 2e-16	***
Variedad	2	279.85	139.93	94.63	< 2e-16	***
Condicion:Variedad	2	65.25	32.63	22.06	9.91e-08	***
Residuals	54	79.85	1.48			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Posthoc multiple comparisons of means

Statistics

MSerror	Df	Mean	CV
1.48	54	-7.913462	-16.83166

Parameters

test	alpha
Duncan	0.05

Comparison

Condicion

	diff	lwr.ci	upr.ci	pval
SS-CS	4.247513	3.618031	4.876995	4.4e-13***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Potencial_hidrico	groups
SS	-5.230769	a
CS	-9.348571	b

Variedad

	diff	lwr.ci	upr.ci	pval
P7-ICS	4.0355556	3.2646008	4.806510	4.6e-13***
PP-ICS	4.9800000	4.1690623	5.790938	2.2e-13***
PP-P7	0.9444444	0.1734897	1.715399	0.0173 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Potencial_hidrico	groups
PP	-5.250000	a
P7	-6.194444	b
ICS	-10.23000	c

Condicion:Variedad

	diff	lwr.ci	upr.ci	pval
SS:ICS-CS:ICS	9.2500000	7.9939380	10.50606202	< 2e-16 ***
CS:P7-CS:ICS	7.9500000	6.7239418	9.17605825	< 2e-16 ***
SS:P7-CS:ICS	11.5611111	10.1961856	12.92603660	< 2e-16 ***
CS:PP-CS:ICS	9.6642857	8.2341524	11.09441906	< 2e-16 ***
SS:PP-CS:ICS	11.7357143	10.2454056	13.22602302	< 2e-16 ***
CS:P7-SS:ICS	-1.3000000	-2.5260582	-0.07394175	0.0378 *
SS:P7-SS:ICS	2.3111111	1.0206301	3.60159216	0.0004 ***
CS:PP-SS:ICS	0.4142857	-0.9007302	1.72930160	0.5346
SS:PP-SS:ICS	2.4857143	1.0555809	3.91584763	0.0005 ***
SS:P7-CS:P7	3.6111111	2.2430836	4.97913864	1.4e-07 ***
CS:PP-CS:P7	1.7142857	0.2988642	3.12970726	0.0172 *
SS:PP-CS:P7	3.7857143	2.2886408	5.28278776	2.9e-07 ***
CS:PP-SS:P7	-1.8968254	-3.2415869	-0.55206387	0.0060 **
SS:PP-SS:P7	0.1746032	-1.1701583	1.51936470	0.7979
SS:PP-CS:PP	2.0714286	0.5701473	3.57270983	0.0065 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Potencial hidrico	groups
SS.PP	-4.214286	a
SS.P7	-4.388889	a
CS.PP	-6.285714	b
SS.ICS	-6.700000	b
CS.P7	-8.000000	c
CS.ICS	-13.760000	d

Anexo 6. Salidas para el diseño completamente aleatorio

El diseño fue aplicado para la evaluación de expresión genética realizada en el estudio. La expresión de cada gen fue sometido al modelo y los resultados son mostrados en el siguiente orden para los genes HAI, PsbA, PsbO, PLIP2, PLIP3. El análisis comenzó revisando la salida del análisis de varianza y luego el posthoc para la comparación de medias. Apreciándose los grupos formados con respecto a la variable independiente variedad.

GEN HAI

analysis of variance

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Variedad	2	328.0	163.99	14.1	6.42e-05***
Residuals	27	314.1	11.63		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

posthoc multiple comparisons of means

Statistics

MSerror	Df	Mean	CV
11.63166	27	1.277229	267.0251

Parameters

test	alpha
Duncan	0.05

Variedad

	diff	lwr.ci	upr.ci	pval
PP-ICS_1	5.672672	2.214924	8.4739595	0.0016 **
P7-ICS_1	-2.597997	-5.727515	0.5315201	0.1000 .
P7-PP	-7.942439	-11.230427	-4.6544523	2.7e-11 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

groups

	Log2_doble_delta	groups
PP	6.0801968	a
ICS_1	0.4075253	b
P7	-2.2362500	b

GEN PSBA

analysis of variance

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Variedad	2	23.2	11.60	0.738	0.487
Residuals	27	424.2	15.71		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

posthoc multiple comparisons of means

Statistics

MSerror	Df	Mean	CV
15.71147	27	-0.2094004	-1892.914

Parameters

test	alpha
Duncan	0.05

Variedad

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
PP-ICS_1	-2.1793459	-4.6787729	0.320081	0.0876 .
P7-ICS_1	-0.7358712	-3.0511055	1.579363	0.5283
P7-PP	1.4434747	-0.7926149	3.679564	0.2023

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

groups

	Log2_doble_delta	groups
ICS_1	0.78545455	a
P7	0.04958333	a
PP	-1.39389140	a

GEN PSBO

analysis of variance

	Df	Sum Sq	Mean	F value	Pr(>F)
Variedad	2	18.3	9.13	0.687	0.512
Residuals	27	358.7	13.29		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Statistics

MSerror	Df	Mean	CV
13.28612	27	0.08092548	4504.159

Parameters

test	alpha
Duncan	0.05

posthoc multiple comparisons of means

Variedad

	diff	lwr.ci	upr.ci	pval
PP-ICS_1	-1.9535341	-4.290553	0.3834849	0.1015
P7-ICS_1	-1.2394374	-3.383449	0.9045740	0.2529
P7-PP	0.7140967	-1.379290	2.8074835	0.4986

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Log2_doble_delta	groups
ICS_1	1.11239394	a
P7	-0.09567708	a
PP	-0.77394042	a

GEN PLIP2

analysis of variance

	Df	Sum	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Variedad	2	380.9	190.44	61.78	8.4e-11***
Residuals	27	83.2	3.08		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

posthoc multiple comparisons of means

Statistics

MSerror	Df	Mean	CV
3.082503	27	1.363258	128.7875

Parameters

test	alpha
Duncan	0.05

Variedad

	diff	lwr.ci	upr.ci	pval
PP-ICS_1	5.224842	3.804516	6.645169	3.1e-10 ***
P7-ICS_1	-3.437222	-4.816907	-2.057538	4.8e-06 ***
P7-PP	-8.662064	-10.096422	-7.227707	< 2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Log2_doble_delta	groups
PP	5.9908145	a
ICS_1	0.7659722	b
P7	-2.6712500	c

GEN PLIP3

analysis of variance

	Df	Sum Sq	Mean	F	Pr(>F)	
Variedad	2	49.43	24.715	6.434	0.00519	***
Residuals	27	103.71	3.841			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

posthoc multiple comparisons of means

Statistics

MSerror	Df	Mean	CV
3.84111	27	-0.04850938	-4040.198

Parameters

test	alpha
Duncan	0.05

Variedad

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval	
PP-ICS_1	0.3568929	-1.066946	1.780732	0.61877	
P7-ICS_1	-2.5575940	-4.006779	-1.108409	0.00076	***
P7-PP	-2.9144869	-4.362171	-1.466803	0.00010	***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groups

	Log2_doble_delta	groups
PP	0.9297501	a
ICS_1	0.7866429	a
P7	-1.8619211	b