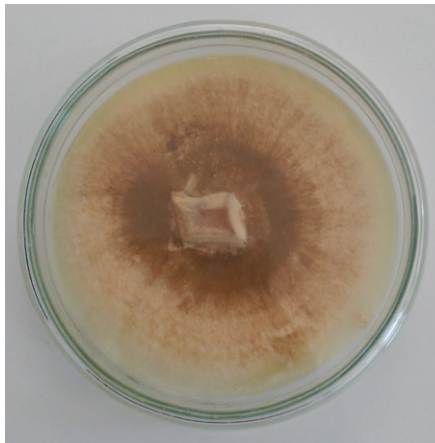


Diversidad genética de *Moniliophthora roreri* mediante Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs)

Genetic diversity of *Moniliophthora roreri* using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLPs)



LILIANA YANET SUÁREZ-CONTRERAS^{1, 2}

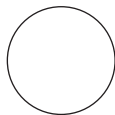
Moniliophthora roreri.

Foto: L. Quintero

RESUMEN

El cultivo de cacao, está afectado por el fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, que causa gran pérdida en la producción en Norte de Santander. Este estudio muestra los resultados obtenidos utilizando AFLPs de *M. roreri*. Con el kit para sistema de análisis II, estandarizado y aplicado a 56 muestras de *M. roreri*, aisladas de nueve municipios. La combinación que presentó mayor número de polimorfismos fue E-ACC/ M-CAA, con 100 bandas y un número menor de alelos (6), con la combinación E-ACG/ M-CAA se obtuvieron 90 bandas y un número de alelos mayor (23), y con la combinación E-AAC/ M-CAA se presentaron 94 bandas y alelos (12). El análisis de datos se realizó según el dendrograma de similitud o distancias genéticas de Nei, obteniéndose cinco grupos con una alta variabilidad entre las muestras, del 6,5 al 58%. Al combinar la información morfológica y molecular se determinó el nivel de diversidad genética de *Moniliophthora roreri*.

Palabras clave adicionales: marcador molecular, similaridad genética, moniliasis, fitopatógeno, caracterización molecular.



¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ciencias del Medio Ambiente, Grupo de Investigación Ambiente y Vida (GIAV), Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta (Colombia). ORCID Suárez-Contreras, L.Y.: 0000-0001-8020-502X

² Autor para correspondencia. lilianayanethsc@ufps.edu.co



ABSTRACT

Cacao cultivation is affected by the *Moniliophthora roreri* phytopathogen, which causes large production losses in Norte de Santander. This study shows the results obtained using the AFLPs of *M. roreri*. The kit for analysis system II was standardized and applied to 56 samples of *M. roreri*, isolated from nine municipalities. The combination with the highest number of polymorphisms was E-ACC/M-CAA. With 90 bands and a smaller number of alleles (6), the E-ACG/M-CAA combination yielded 90 bands and a larger number of alleles (23); the E-AAC/M-CAA combination had 94 bands and alleles (12). The data analysis was carried out according to the dendrogram of similarity or genetic distances of Nei, obtaining five groups with a high variability between samples, from 6.5 to 58%. By combining the morphological and molecular information, the level of genetic diversity in *Moniliophthora roreri* was determined.

Additional key words: molecular marker, genetic similarity, moniliasis, phytopathogen, molecular characterization.

Fecha de recepción: 24-05-2017 Aprobado para publicación: 30-09-2017

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Paredes (2016), *Theobroma cacao* crece bajo condiciones de piso térmico cálido, con humedad promedio de 2500 mm anuales y temperatura desde 25 hasta 28°C. La cosecha inicial se produce a los cinco años. El color de la mazorca cambia según su diversidad de amarillo a rojo, y puede llegar a pesar 1 kg.

Muchos fitopatógenos causan detrimento en la producción, afectando los frutos y mazorcas del cacao. La moniliasis es el principal problema fitosanitario y se caracteriza por la aparición de una mancha blanquecina, polvorienta que es altamente invasiva y endémica del cacao (Tuquerres, 2016; Tirado *et al.*, 2016). Esta enfermedad causada por *Moniliophthora roreri* ha afectado a México desde 2005, y para Phillips-Mora, durante el 2013, las altas temperaturas afectaron el 70% de la producción.

Colombia es el cuarto productor de cacao en América Latina, después de Brasil, Ecuador y República Dominicana. En 2012, el área cultivada con cacao en Colombia fue de 158.000 ha, con una productividad de 460 kg ha⁻¹, que es baja, en comparación con la de Costa de Marfil, el primer productor mundial, con 700 kg ha⁻¹ (Villamizar, 2016).

En Norte de Santander, monilia afecta las 11.655 ha cosechadas por los cacaoteros. Por tanto, el control de esta enfermedad depende en gran parte del conocimiento de la biología de este fitopatógeno, y son necesarios nuevos estudios genéticos; se deben conocer

las poblaciones del patógeno (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) con el fin de entender los mecanismos de resistencia y diseñar programas específicos para las regiones productoras en Colombia (Correa *et al.*, 2014).

Se han definido estos marcadores moleculares que son ventajosos para el estudio de cada sujeto y el de la población; de acuerdo con Rocha (2003), se han utilizado para encontrar en plagas, animales y vegetales, muchas formas alélicas de genes; en la producción agronómica han sido importantes en la mejora de plantas, ayudan en los estudios de los genes, que permiten obtener proyecciones de entrecruzamiento génico, para encontrar rasgos génicos, y así poder escoger marcadores para dar continuidad a proyectos sobre la relación génica. Son utilizados para determinar la variación de genes y estudiar filogenia (Shah *et al.*, 1994; Purba *et al.*, 2000; Rey *et al.*, 2003;) en la formación de mapas genéticos (Mayes *et al.*, 1997; Chua *et al.*, 2001; Billotte *et al.*, 2001). También como señal, para poder rastrear genes provechosos. Y para Powell *et al.*, 1996, permiten estudiar formas de similitud y así poder delimitar cruces, manutención de la diversidad genética vegetal y direccionar los recursos heredables (Karp y Edwards, 1997).

La manipulación de los Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados, ha permitido producir nuevas señales a nivel molecular (Vos *et al.*, 1995). Permiten la detección de variabilidad genética, pues ofrecen información sobre las relaciones

interespecíficas e intraespecíficas (Osorio, 2012). Empleados por su calidad y cantidad de información, fuerza y reproductibilidad. Tienen capacidad simultánea para screening de muchas regiones diferentes del ADN distribuidas al azar a través del genoma (Mueller and Wolferborger, 1999). El análisis puede ser aplicado al ADN de cualquier origen o complejidad, produciendo un gran número de bandas claras de las cuales más del 10% pueden ser polimórficas con patrones reproducibles. No son monomórficos, generan mucha información, mayor punto de diversificación. Atractivo para el estudio de la variación entre genomas de taxa relativamente cerrada (Innan *et al.*, 1999). Se basan en PCR selectiva de fragmentos de restricción de ADN, bajo estrictas condiciones de PCR (Kardolus *et al.*, 1998; Karp *et al.*, 1997) así los fragmentos amplificados son separados por un gel de secuenciación y visualizados por autorradiografía o fluorescencia (Hong and Chuah, 2003), apreciando de 50 a 100 fragmentos de restricción que son amplificados y detectados en geles denaturantes de poliacrilamida (Vos *et al.*, 1995).

Los AFLP, permiten investigar varios aspectos de la biología molecular y diversidad genética de hongos (Majer *et al.*, 1996). Provee un relativo y potencial análisis en una variedad de aplicaciones, incluyendo fingerprinting o identificación de aislamientos de hongos, y la estimación de la relación filogenética. (Mueller *et al.*, 1996). Son muy eficientes para detectar polimorfismos aun en especies con muy poca variación encontrada por RFLP. Existiendo estudios previos con este marcador en *M. roseri* en Antioquia, Colombia (Grisales y Afanador, 2007). Previamente varias combinaciones de cebadores PCR +3+3 fueron reportadas para AFLP en monilia (Phillips-Mora, 2003).

El objetivo de este proyecto de investigación fue determinar la diversidad genética de *Moniliophthora roseri* mediante Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados de 56 muestras de *Moniliophthora roseri*, obtenidas en nueve municipios de Norte de Santander.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras y aislamiento

Las mazorcas de cacao con los síntomas de *M. roseri*, fueron recolectadas y registradas con datos del

municipio, finca, altitud, temperatura, condiciones climáticas, información sobre el cultivo y daños (Suárez, 2006). El método de aislamiento se realizó según (Suárez y Rangel, 2013).

Conservación de las cepas

Los aislamientos de *M. roseri*, crecidos en PDA, según Suárez (2006), fueron conservados en tubos y cajas Petri, mantenidos en oscuridad a temperatura ambiente (28°C), y otros en refrigeración. El micelio obtenido, se dejó crecer de 11 a 15 d, y se cultivaron en PDB a 25°C.

Extracción del ADN genómico y cuantificación

La extracción del ADN de *M. roseri*, fue realizada según lo propuesto por (Suárez, 2005; 2016). La cantidad y la calidad del ADN fue observada en geles de agarosa al 0,9% (w/v) utilizando como intercalante bromuro de etidio (0,5 µg mL) y se detectó en un transiluminador con luz UV.

Técnica de AFLPs

Se estandarizó según el kit Analysis System II. Se evaluaron diez combinaciones de cebadores para AFLP, se utilizaron 10 muestras con el control positivo y negativo, y se escogieron las combinaciones de cebadores con más polimorfismo que se aplicaron a las 56 muestras.

Las combinaciones utilizadas fueron las propuestas por Phillips-Mora (2003), E-AGC/ M-CAG, E-ACA/ M-CAG, E-ACT/ M-CAG, E-ACG/ M-CAG, E-ACA/ M-CAA, E-ACT/ M-CAA, E-ACG/ M-CAA, E-ACC/ M-CAA, E-AAC/ M-CAA, E-AA/ M-CAA. Donde M es el cebador complementario a la secuencia adaptadora *MseI*; E el cebador complementario a *EcoRI*; A, C, G y T fueron los nucleótidos selectivos adaptados al final 3' de los cebadores.

Digestión, restricción del ADN y ligación

Se realizó en un volumen final de 25 µL, adicionando al ADN dos enzimas (2U de *MseI* y 2U de *EcoRI*). La mezcla de la reacción fue de 2,5 µL de ADN (50 ng µL⁻¹), 1,0 µL *EcoRI/MseI*, 2,5 µL de 5x de buffer de reacción (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, con 50 mM de acetato de magnesio, y con 250 mM de acetato de

potasio) en 6,5 μL de agua nanopura. Luego, la reacción se dejó a 37°C por 2 h, seguida por inactivación con calor a 70°C durante 15 min, y almacenadas a 4°C.

La ligación se realizó con 25 μL del ADN digerido, 12 μL de ligación de adaptadores (*EcoRI/MseI*; con 0,4 mM de ATP; Tris-HCL 10 mM y acetato de potasio 50 mM), se adicionó 0,5 μL de T4 DNA ligasa (1 U/ μL) 12 μL de solución de adaptador-ligador para el tubo de digestión a 20°C por 2 h y después se hizo la dilución 1:10 (10 mL y 90 μL buffer TE).

Reacciones de preamplificación

Para la reacción con los primers con una base selectiva (PCR+1) se hizo en microtubos de 0,2 mL, así: 2,5 μL de mezcla de dilución de ligación de 1:10, 20 μL de mezcla de cebadores para la preamplificación; Mix II: 2,5 μL de buffer 10X PCR (que contenía MgCl_2 15 mM), 0,5 μL de taq DNA polimerasa (5 U/ μL) y 0,5 μL de 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP. La mezcla se dejó en un termociclador, programado así: 94°C durante 30 s (denaturación), 56°C/1 min (anillamiento) y 72°C/1 min (extensión) durante 20 ciclos. Los productos de la amplificación se separaron en gel de agarosa 1% (w/v) utilizando el bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como intercalante y observados en luz UV. Sucesivamente los productos de la preamplificación PCR+1 fueron diluidos por 1:50 en buffer TE (3 y 147 μL).

Amplificaciones AFLP selectivas

La PCR+3 se realizó en un volumen de 20 μL . La reacción contenía 5 μL de ADN (PCR+1 diluido 1:10), 2 μL de tampón 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; MgCl_2 15 mM y KCl 500 mM), 0,2 μL de *EcoRI*-cebador y 4,5 μL de *MseI*-cebador; 7,9 μL de agua destilada y 0,3 μL de Taq DNA polimerasa (5U/ μL). Las combinaciones de primers utilizadas fueron las sugeridas por Phillip (2003).

Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en 20 μL con 5 μL de la preamplificación, y la PCR se realizó por 30 s a 94°C, 30 s a 65°C y 60 s a 72°C, para 1 ciclo. La temperatura de alineamiento se bajó 0,7°C en cada ciclo durante 12 ciclos (*touch down*) y se siguió con 30 s a 94°C, 30 s a 56°C, y 60 s a 72°C, por 25 ciclos. El producto se conservó a 4°C.

Preparación de muestra

Las amplificaciones selectivas (5 μL) se les adicionó 5 μL de buffer de carga (6,4 mL de formamida al 99%, 560 μL 10 \times TBE, 200 μL de 50 mM EDTA, 0,01 g 0,1% (w/v) Xilen-cianol, 0,1 g (w/v) azul de bromofenol y 2.840 μL de agua nanopura.

Preparación del vidrio y cámara de secuenciación

Con Alcanox, se lavaron los vidrios y luego se les adicionó agua, después se secaron y se frotaron con 95% de alcohol con kinwipes. Se aplicó una capa de solución de 1 mL de ácido acético al 5% y etanol al 95% con 3 μL de bind silane, al lado interno del vidrio. Se colocaron dos espaciadores a lo largo del vidrio y el peine. El vidrio fue fijado al sistema de ajuste de la cámara que se limpió con alcohol al 90% y luego con 1 mL de repel silane.

Preparación del gel de poliacrilamida

Las amplificaciones AFLP se separaron en gel de poliacrilamida denaturante 7%, para el gel de 80 mL se preparó una mezcla de 22,4 mL de solución concentrada (19:1 acrilamida: bisacrilamida) 49,6 mL de solución diluyente (urea 7M y TBE 1X), 32 μL de Temed y 500 μL de solución de persulfato de amonio fresca (0,1 mg mL^{-1}). Y el grosor fue de 0,4 mm. Se insertó el peine y se dejó polimerizar el gel por 2 h.

Electroforesis en gel de poliacrilamida a baja temperatura PAGE

El gel se montó en la cámara de secuenciación, que se llenó con buffer 1X TBE. Se pre corrió por una hora a 40 W para precalentar los vidrios. Las muestras fueron incubadas a 90°C durante 3 min y mantenidas en hielo. Se cargaron 5 μL de muestra en cada pozo. Y se corrió la electroforesis a 40 W por 2 h y 30 min.

Procesamiento del gel y Tinción con plata

El gel se conservó en solución fijadora por 20 min, y luego fue lavado con agua dos veces -cada lavado se dejó 3 min teñido con una solución de nitrato de plata, se lavó con agua por 4 s y se dejó en solución de revelado hasta observar bandas. Para la fijación se

adicionó 250 mL de ácido acético y se agitó por 30 min. Luego se lavó tres veces con agua destilada (por dos minutos cada lavado), y en la solución de nitrato de plata permaneció con agitación por 30 min. Se enjuagó en 250 mL de agua por 20 s y se dejó en una bandeja pre enfriada con solución de revelado y agitación lenta, se transfirió a una solución de parada por 10 min en agitación.

Los fragmentos de restricción se marcaron por observación y las bandas fueron registradas. Los datos de los resultados se almacenaron en Microsoft Excel para el análisis.

Análisis de datos

El polimorfismo se detectó con la luz blanca en el transiluminador, y de acuerdo con la definición de Nei y Li (1979), la matriz binaria de datos se convirtió en una matriz de similaridad. La distancia genética se refiere a cualquier medida cuantitativa de la diferencia genética, a nivel de frecuencias alélicas o de secuencias de ADN estimada entre individuos, poblaciones o especies. (Marquéz, 2003).

El dendrograma de similitud o distancias genéticas de Nei, se construyó con el algoritmo UPGMA, y se utilizó el paquete estadístico NTSYSpc Versión 2.01i. para el correspondiente análisis de coordenadas principales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El protocolo utiliza las características de las enzimas de restricción como su rapidez, y el poder de la reacción en cadena de la polimerasa para encontrar formas alternas de los genes (Vos *et al.*, 1995), también ha sido utilizada para conseguir señales moleculares en eucariotes como procariotes (Galeano, 2005; Barcelos, 2002). En el caso de plantas como la palma ha sido aprovechado para observar la variabilidad genética de *Elaeis*, ha sido importante para poder conocer entrecruzamiento génico y algunos rasgos como grueso del cuesco (Billotte *et al.*, 2001).

Para AFLP se emplearon las enzimas (*EcoRI*, *MseI*) y 10 composiciones de cebadores provenientes de la digestión de estas enzimas de los cuales nueve correspondían a cebadores PCR +3+3, y un cebador PCR +2+3. Las combinaciones ensayadas amplificaron el 100%.

Con las combinaciones de cebadores PCR +3+3, se obtuvo 44 bandas, y para la combinación +2+3 (EAA/MCAA) se encontraron 45 bandas, las que presentaron un menor número fueron EACA/MCAA con 10 bandas; y EACT/MCAA con 16 bandas, respectivamente.

Se probaron varias combinaciones de las reportadas por Phillips-Mora (2003), y se seleccionaron tres nuevas combinaciones que no habían sido probadas antes: E-ACC/ M-CAA, E-ACG/ M-CAA, y E-AAC/ M-CAA, se obtuvo 284 bandas polimórficas aplicadas a todas las muestras. La combinación que presentó mayor número de polimorfismos fue E-ACC/M-CAA. Con 100 bandas y un número menor de alelos (6), con la combinación E-ACG/M-CAA se consiguieron menos bandas 90 y el número de alelos fue mayor (23), la combinación E-AAC/ M-CAA presentó 94 bandas y alelos (12). Con estas combinaciones se observó mayor polimorfismo, que las logradas por Phillips-Mora.

Se elaboró un dendrograma (Fig. 1), donde se apreciaron cinco grupos, y los valores obtenidos de la distancia genética. Se observaron diferencias entre las muestras por los patrones de bandas generados, es decir, polimorfismos en la secuencia de ADN (Osorio *et al.*, 2012), que sugieren la existencia de variabilidad genética entre las muestras (Fig. 1 y 2).

Se observó el mínimo y máximo coeficiente de similitud (0,075 y 0,58), lo que demuestra la alta variabilidad entre las muestras, del 7,5 al 58%. La información arrojada por este marcador, indicó el gran polimorfismo que tiene *M. roreri*.

Grupo I (Ia y Ib), M9, El Zulia; M10, Bucasasica y M11, Sardinata indican su similitud, que no se esperaba por estar en tres municipios diferentes, pero que geográficamente están cerca y conservan su a servo genético (coeficiente de similitud de 0,065). **Grupo II**, M54 de Tibú (coeficiente de similitud de 0,075), no muestra semejanza con las demás muestras, está al nororiente del departamento y más alejado de los otros. **Grupo III**, M15, Agua Clara (coeficiente de similitud de 0,11), ubicado al nororiente de Cúcuta. **Grupo IV**, M55, El Tarra y M56, Bucarasica (coeficiente de similitud de 0,12), similares pero pertenecen a municipios retirados, El Tarra al norte de Bucarasica, indica que estas cepas se diseminaron de un municipio a otro.

Grupo V se subdivide en **Va** (coeficiente de similitud de 0.16), comprende M1, M4, M14 de El Zulia;

M2, M5, y M26, Cúcuta; M6, Sardinata; M8 y M13, Bucarasica, municipios cercanos; M3 y M7 pertenecen a Tibú, indicando que estas cepas se intercambiaron entre municipios, ubicado al nororiente del departamento. M12, Teorama, al noroccidente del departamento; y M25, Agua Clara.

Vb comprende el grupo **Vb1** (coeficiente de similitud de 0,14) están M17, M34, M44 y M49 de Teorama, cercanas de las aisladas en El Tarra: M22, M27, M32, M37, M42, M47, M52; y Tibú: M36, M51, municipios que están retirados de El Zulia, Cúcuta, Bucarasica y Sardinata, se encuentran al noroccidente y nororiente del departamento. Las siete cepas de El Tarra se asilaron de dos fincas diferentes: Lucero y La constancia (Suárez, 2016), indica similitud por su cercanía. También se encontraron en municipios cercanos: M18, M30, M35, M50 (Sardinata); M19, M24, M29, M39 (El Zulia); M21, M31, M41, M46 (Cúcuta); M33, M43, M48 y M53 (Bucarasica). M16, M20, M40 y M45 (Agua Clara), más distantes al nororiente de Cúcuta.

El grupo **Vb2** (coeficiente de similitud de 0,15), las muestras M23, M28 y M38, de diferentes fincas miraflores (2) y el porvenir (1) (Suárez, 2016), de Bucarasica, mostraron su cercanía y similitud genética.

En el dendograma (Fig. 1), la cepa M9 de El Zulia (grupo I), está más distante de la M5, Cúcuta y de M6, Sardinata (grupo V) (el coeficiente de similitud de 0,085 a 0,54), determinó que son similares.

Es difícil definir grupos y asociarlos a las diferentes localidades muestreadas (Fig. 2), las cepas más alejadas son M9 (El Zulia); M10 (Bucarasica) y M11 (Sardinata) (Fig. 1 y 2), el primer eje es importante permitiendo visualizarlas en el cluster I, que se divide a su vez en grupo Ia y Ib, y que se distanciaron genéticamente de las demás.

En el segundo eje se apreciaron parte de las cepas de los clusters III, IV y V. Se dificultó la visualización de la cepa del cluster II. Continuó en importancia el tercer eje, donde se observó M50 (Sardinata) como la más distante de todas y con menos similitud, se pudo apreciar parte de las cepas del cluster V (Fig. 1).

Según el análisis tridimensional de coordenadas, las cepas quedaron asociadas en cuatro grupos; las más alejadas fueron M9 (El Zulia) y M50 (Sardinata), a pesar de estar localizadas en municipios cercanos, son diversas genéticamente (Fig. 2).

Moniliophthora roreri, presentó una gran variabilidad genética, que puede estar relacionada con la variabilidad morfológica. Esto permite suponer que dicha diversidad fenotípica está asociada con la variabilidad genética reportada en esta investigación, y también corresponde con lo hallado previamente en Henequen, donde se encontró que la variabilidad genética está acompañada de la diversidad en los caracteres morfológicos (González, 2003).

Entre las ventajas de los AFLP están las relacionadas por Mueller y Wolfenborger (1999): taxonómicamente; tienen amplia aplicabilidad y se han utilizado eficientemente en la variedad de taxa, incluyendo bacterias, hongos, animales y plantas; los niveles de error generados son de por lo menos el 2%; son representativos bajo condiciones de alta selectividad; las repetidas amplificaciones muestran perfecta replicabilidad; la muestra de ADN que requieren es mínima y pueden ser utilizadas muestras extremadamente pequeñas, parcialmente degradadas y pueden ser generados con gran rapidez.

La definición de los grupos genéticos se basó en los AFLP (Tredway *et al.*, 1999) que revelaron diferentes formas de variación genética comparada con ITS. La gran variación de grupos, cinco en AFLP comparados con tres grupos revelados por ITS (Suárez, 2016) son muestra de que las barreras geográficas que separan las áreas y los aislamientos generan más grupos.

Morfológicamente se diferenciaron tres fenotipos de *Moniliophthora roreri* (Suárez, 2016) mientras que la técnica AFLP permitió encontrar más información acerca de la gran diversidad molecular.

Los grupos generados en el dendograma mostraron un nivel de diferenciación y podrían representar ecotipos que resultan del proceso de adaptación a condiciones desarrolladas específicamente, considerando que el Nororiente de Colombia representa el centro de diversidad más probable de monilia (Phillips-Mora, 2003).

Según el estudio realizado en *M. roreri* con haplotipos SSR de 40 aislados de países del sur y centroamérica, se determinaron dos tipos de genes. En centroamérica se encontraron aislados A1_B1, mientras que en suramérica se encontró este y el A2_B2, confirmando hipotéticamente que el centro de origen es Colombia y así pasó a Venezuela, Perú, Ecuador y Centroamérica. También se ha propuesto que la introducción de *M. roreri* en Centroamérica tuvo lugar en Panamá en 1956 cuando las vainas de cacao infectadas fueron traídas de Colombia. (Díaz-Valderrama y Aime, 2016).

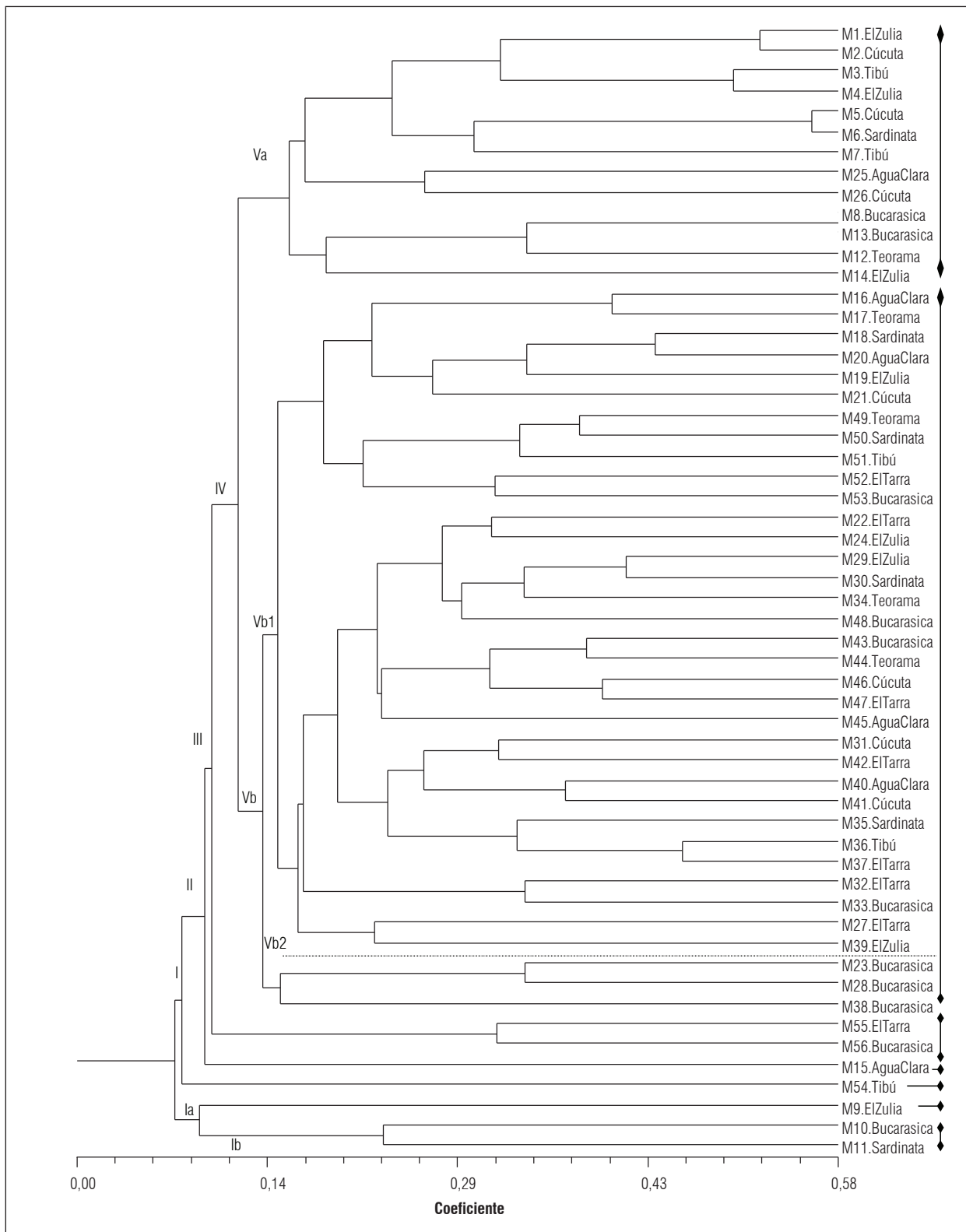


Figura 1. Dendrograma generado por la técnica AFLP con 56 aislamientos de *Moniliophthora roreri* y construido con el método de agrupamiento UPGMA (teniendo en cuenta el municipio e identificación de las muestras).

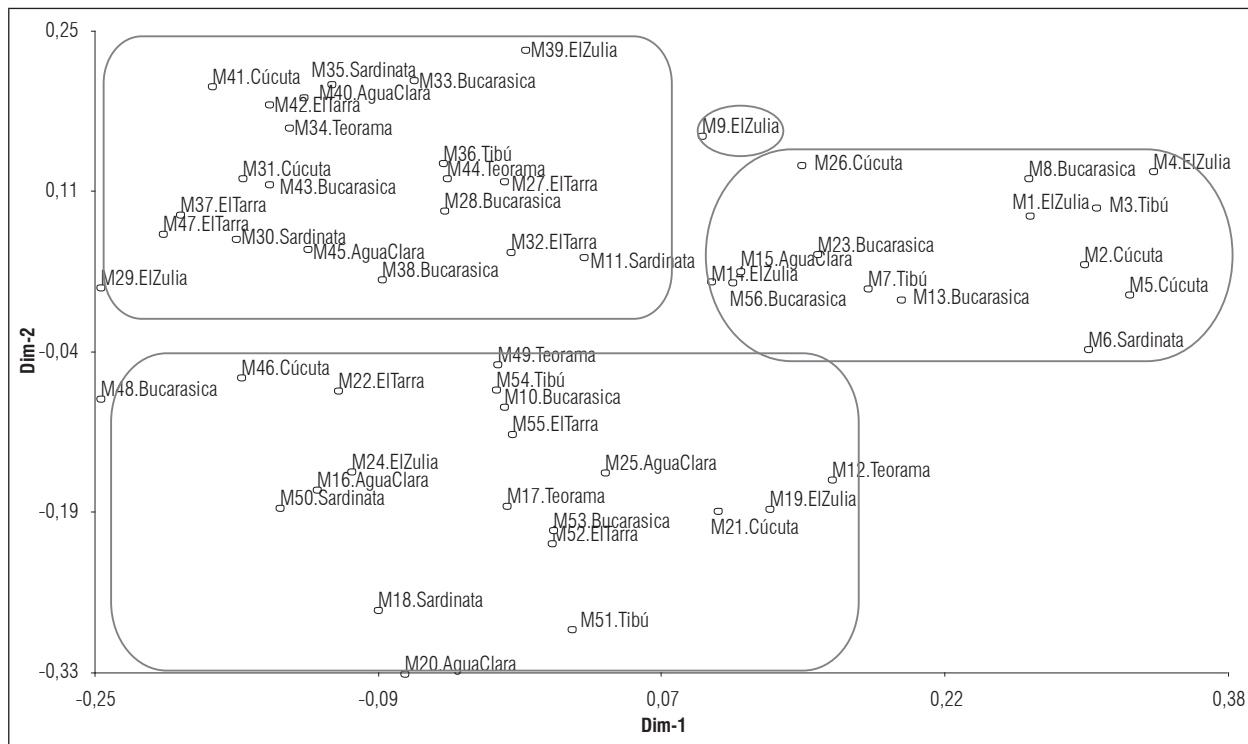


Figura 2. Análisis de coordenadas principales, donde se aprecian cuatro grupos.

El Valle Magdalena de Colombia mostró los niveles más bajos de diversidad genética con 20 genotipos distintos, de los cuales 13 se limitaron a esta región, e indica que esta región es el posible centro de origen de *M. royeri* (Shahin *et al.*, 2015).

En futuros proyectos es importante buscar una solución a esta enfermedad, hallar los factores que de alguna forma benefician a este fitopatógeno. Además, las investigaciones deben ir enfocadas hacia el estudio del hongo como a las diferentes variedades de plantas de cacao donde se hospeda (Correa *et al.*, 2014). Por tal razón es importante dar continuidad a estos estudios en el departamento.

CONCLUSIONES

La técnica AFLP permitió caracterizar a *M. royeri*, demostrando que es útil para determinar la diversidad genética de fitopatógenos en el Nororiente Colombiano.

Los altos niveles de variación genética de este fitopatógeno abren la posibilidad para continuar el estudio de los diferentes fenotipos de *M. royeri*, posiblemente la

moniliasis se dispersó a otros lugares donde por adaptación a nuevas condiciones ambientales y adquirió características moleculares particulares que finalmente originaron grupos genéticos diferentes; también podría aumentar la posibilidad genética de supervivencia de esta especie frente a cambios ambientales.

AGRADECIMIENTOS

A la UFPS (FINU) por financiar el proyecto. A Fedecacao, por facilitar las muestras de monilia.

Conflicto de intereses: el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barcelos, E. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular Markers. *Pesq. Agropec. Bras.* 37(8), 1105-1114. Doi: 10.1590/S0100-204X2002000800008
- Billotte, N., L. Frances, P. Amblard, T. Durandgasselin, J.L. Noyer y B. Courtois. 2001. Search for AFLP and

- microsatellite molecular markers of the SH gene in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by bulk segregan analysis (BSA) and by genetic mapping. pp. 442-445. En: PIPOC International Palm Oil Congress-Cutting-edge technologies for sustained competitiveness, Proceedings Agriculture. Malasia.
- Chua, K.L., R. Singh y S.C. Cheah. 2001. Construction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Linkage maps using AFLP markers. pp. 461-467. En: PIPOC International Palm Oil Congress-Cutting-edge technologies for sustained competitiveness, Proceedings Agriculture. Malasia.
- Correa, J., S. Castro y J. Coy. 2014. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. Acta Agron. 63(4), 388-399. Doi: 10.15446/acag.v63n4.42747
- Díaz-Valderrama, J.R. y M.C. Aime. 2016. The cacao pathogen *Moniliophthora roreri* (Marasmiaceae) possesses biallelic A and B mating loci but reproduces clonally. Heredity 116, 491-501. Doi: 10.1038/hdy.2016.5
- Galeano, C.H. 2005. Estandarización de la técnica molecular de AFLP en palma de aceite tipo Dura (*Elaeis guineensis* Jacq.) y estudio preliminar de caracterización. Agron. Colomb. 23(1), 42-49.
- González, G., S. Aleman y D. Infante. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. Plant Sci. 165(3), 595-601. Doi: 10.1016/S0168-9452(03)00227-9
- Grisales, S. y L. Afanador. 2007. Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia. Rev. Colomb. Biotecnol. 9(2), 15-32.
- Hong, Y. y A. Chuah. 2003. A format for databasing and comparison of AFLP fingerprint profiles. BMC Bioinformatics 4(7), 1-11.
- Innan, H., R. Terauchi, G. Kahl y F. Tajima. 1999. A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. Genet. 151, 1157-1164.
- Karp, A. y K. Edwards. 1997. DNA markers: a global overview. pp. 1-13. En: Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff (eds.). DNA markers: protocols, aplicaciones and overviews. Wiley, New York, USA.
- Majer, D., R. Mithen, B.G. Lewis, P. Vos y R.P. Oliver. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. Mycol Res. (110), 1107-1111. Doi: 10.1016/S0953-7562(96)80222-X
- Márquez, M. 2003. Caracterización molecular y morfológica de progenies de árboles *plus* seleccionadas dentro del ensayo de procedencias y progenies de *Cordia alliodora* de cenicafé-Colombia. Tesis de maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Mayes, S., P.L. Jack, D.F. Marshall y R.H.V. Corley. 1997. Construction of RFLP genetic link-age map for oil palm. (*Elaeis guineensis* Jacq.). Genome 40(1), 116-122. Doi: 10.1139/g97-016
- Mueller, U.G., S.E. Lipari y M.G. Milgroom. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmes minutus*. Mol. Ecol. (5), 119-122. Doi: 10.1111/j.1365-294X.1996.tb00297.x
- Mueller, U.G. y L.L. Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. Tree. (14), 389-394. Doi: 10.1016/S0169-5347(99)01659-6
- Nei, M. y W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proc. Nat. Acad. Sci. 76(10), 5269-5273. Doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Osorio, M., E. Gámez, S. Molina y D. Infante. 2012. Evaluation of cassava plants generated by somatic embryogenesis in different stages of development using molecular markers. Electron. J. Biotechnol. Doi: 10.2225/vol15-issue4-fulltext-3
- Paredes, M. 2016. El manejo fitosanitario del cultivo de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) y el rendimiento del mismo, en la asociación kallari. Tesis de maestría. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Powell, W., M. Morgantén, C. Andre, M. Hanafey, J. Voguel, S. Tingey y A. Rafaskyl. 1996. The Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2(3), 225-238. Doi: 10.1007/BF00564200
- Phillips-Mora, W. 2013. Un hongo mortal. En: CropLife Latinoamerica, <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/220-moniliasis-del-cacao>; consulta: agosto de 2017.
- Phillips-Mora, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Ph.D. thesis. Department of Agricultural Botany, University of Reading, Reading, UK.
- Purba, A.R., J.L. Noyer, L. Baudouin, X. Perrier, S. Hamon y P.J.L. Lagoda. 2000. A new aspect of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding. Theor. Appl. Genet. (101), 956-961. Doi: 10.1007/s001220051567
- Rey, L., P. Gómez, I. Ayala, W. Delgado y P. Rocha. 2004. Colecciones genéticas de palma de aceite *Elaeis guineensis* (Jacq.) y *Elaeis oleifera* (H.B.K.) de Cenipalma: Características de importancia para el sector palmicultor. Palmas 25(2), 39-48.
- Rocha, P. 2003. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. Palmas 24(2), 11-25.

- Shah, F., O. Rashid, A.J. Simons y A. Dundson. 1994. The utility of RAPD markers for determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Theor. Appl. Genet.* (89), 713-718. Doi: 10.1007/BF00223710
- Shahin S., A.J. Shao, M.D. Strem, W. Phillips-Mora, D. Zhang, L.W. Meinhardt y B.A. Bailey. Combination of RNA seq and SNP nano fluidi carry reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. 2015. *Frontiers Microbiol.* Doi: 10.3389/fmicb.2015.00850
- Suárez, L. 2005. Extracción y purificación del ADN de *Moniliophthora roreri* hongo que ataca el cacao, en Norte de Santander. *Respuestas* 10(2). Doi: 10.22463/0122820X.629
- Suárez, L. 2006. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en municipios del nororiente Colombiano. *Respuestas* 11(1). Doi: 10.22463/0122820X.623
- Suárez, L. 2016. Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta Agron.* 65(1), 51-57. Doi: 10.15446/acag.v65n1.47994
- Suárez, L. y A. Rangel. 2013. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agron.* 62(4), 370-378.
- Tirado-Gallego, P.A., A. Lopera-Alvarez y L.A. Rios-Osorio. 2016. Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Corpoica. Cienc. Tecnol. Agropec.* 17(3), 417-430. Doi: 10.21930/rcta.vol17_num3_art:517
- Tredway, L.P., J.F. White, B.S. Gaut, P.V. Reddy, M.D. Richardson y B.B. Clark. 1999. Phylogenetic relationships within and between *Epichloe* and *Neotyphodium* endophytes as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. *Mycological Res.* 103(12), 1593-1603. Doi: 10.1017/S0953756299008874
- Tuquerres, H.L. 2016. Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. en el control de monilla (*Moniliophthora roreri*), en cacao (*Theobroma cacao*) *in vitro* y en campo en la provincia de Napo-Ecuador. Trabajo de grado. Universidad de las Fuerzas Armada - ESPE, Sangolquí, Ecuador.
- Villamizar, R., J. Osma y O. Ortíz. 2016. Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. *Pesq. Agropec. Bras.* 51(12), 1929-1936. Doi: 10.1590/s0100-204x2016001200003
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP: A New technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21), 4407-4414. Doi: 10.1093/nar/23.21.4407