

**Caracterización Molecular Del Fitopatógeno *Moniliophthora Roreri*,
Utilizando Marcadores Issr, En Norte De Santander, Colombia.**

**Molecular Characterization Of The Phytopathogen *Moniliophthora Roreri*,
Using Issr Markers, In Norte De Santander, Colombia.**

*Jessica Blanco Manzano*¹, *Liliana Yanet Suárez Contreras*²

¹Ingeniero Biotecnológico, Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia

²Magister en biología, énfasis Genética, Laboratorio de Biotecnología Molecular, Departamento del Ciencias del Medio Ambiente, Universidad francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia

E mail: lilianayanethsc@ufps.edu.co

Recibido: 17/02/2020

Aceptado: 23/10/2020

Cite this article as: J. Blanco Manzano, L. Y. Suarez Contreras
"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL FITOPATÓGENO
Moniliophthora roreri, UTILIZANDO MARCADORES ISSR, EN
NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.", *Prospectiva*, Vol 19,
N° 1, 2021.

<http://doi.org/10.15665/rp.v19i1.2234>

RESUMEN

Las regiones del departamento de Norte de Santander, Colombia, cultivadores de cacao presentan la enfermedad más grave que es la moniliasis causada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*. Inicialmente se llevó a cabo el protocolo de desinfección en la mazorca enferma, se sembró en agar PDA (papa dextrosa), agar PDA modificado (gentamicina y pulpa de cacao) y agar extracto de malta, incubándolo por 10 días a una temperatura de 15°C, mostrando mejor crecimiento en agar PDA. Después se continuó con la extracción de ADN, posteriormente se ratificó la efectividad de muestras conservadas de monilia aisladas en los municipios de El Zulia, Cúcuta, Tibú, Puerto Santander, Bucarasica, El Tarra, Teorama y Sardinata de Norte de Santander, una vez comprobada la presencia de ADN por electroforesis en gel de agarosa, se seleccionaron 24 muestras, luego se estandarizó la técnica de ISSR (inter secuencias repetidas); para el cual se obtuvieron patrones de bandas en la mayoría de las 27 muestras con los cebadores 823, 880, 890 y 891, mientras que con el cebador 816, 874 y 885 generaron muy pocas bandas. Con el empleo de ITS4 y ITS5 se realizó la PCR, los amplicones fueron secuenciados para 2 muestras aisladas del hongo y arrojó: para el hongo HFa007 un porcentaje de identidad del 97,08%, *Diaporthe pseudomangiferaem* y para el hongo HFa009 un porcentaje de 99,29% de identidad para *Diaporthe melonis*. Se ejecutó el análisis estadístico, donde se obtuvo un dendograma basado en el coeficiente de Dice, el cual mostro las relaciones existentes para las 28 muestras estudiadas. La muestra 6d-17 proveniente de Sardinata se agrupó de forma independiente.

Palabras Clave: Moniliasis, PCR, hongo, *Diaporthe pseudomangiferaem*, *Diaporthe melonis*

ABSTRACT

The regions of the department of Norte de Santander, Colombia, cocoa cultivators have the most serious disease that is the moniliasis caused by the phytopathogenic fungus *Moniliophthora roreri*. Initially the protocol of disinfection was carried out in the diseased ear, then it is sown in PDA agar (potato dextrose), modified PDA agar (gentamicin and cocoa pulp) and malt extract agar, incubating them for 10 days at a temperature of 15 ° C, showing better growth in PDA agar. After DNA extraction was continued, the effectiveness of conserved samples of isolated monilia in the municipalities of El Zulia, Cúcuta, Tibú, Puerto Santander, Bucarasica, El Tarra, Teorama and Sardinata de Norte de Santander, was later confirmed. the presence of DNA by agarose gel electrophoresis, 24 samples were selected, then standardized the ISSR technique (repeated inter sequences); for which they obtained band patterns in most of the 27 samples with the primers 823, 880, 890 and 891, while with primer 816, 874 and 885 they generated very few bands. With the use of ITS4 and ITS5 the PCR was performed, sequencing was carried out on 2 isolated samples of the fungus and yield: for the HFa007 fungus with an identity percentage of 97.08% for *Diaporthe pseudomangiferaem* and for the HFa009 fungus a percentage of 99.29% *Diaporthe melonis*. The statistical analysis was executed, where a dendrogram based on the Dice coefficient was obtained, which showed the existing relationships for the 28 samples studied. The 6d-17 sample from Sardinata was grouped independently.

Keywords: Moniliasis, PCR, fungus, *Diaporthe pseudomangiferaem*, *Diaporthe melonis*

1. INTRODUCCIÓN

Colombia ha posicionado gran cantidad de productos de la canasta familiar a nivel mundial, ahora tiene como acompañante en la canasta exportadora al cacao, que en la última década conquistó varios mercados internacionales, dobló su producción y pasó de tener más exportaciones que importaciones [1]. El grano de cacao se ha convertido en producto fundamental de la economía de Colombia. A través de procesos industriales se realiza la transformación de las almendras del cacao obteniendo como productos finales maquillajes, licores, grasa natural comestible, chocolates y demás artículos elaborados con base de este. Por otra parte, el cacao al igual que los diversos cultivos desarrolla enfermedades que alteran las funciones normales de la planta debido a acciones de agentes patógenos o de factores ambientales.

La moniliasis es un problema actualmente común en Colombia, produciendo grandes pérdidas cercanas a un 50% de la cosecha anual, lo anterior significa que, si la producción para el año 2016 fue del orden de 56 mil 785 toneladas, la monilia destruyó 28 mil 292 toneladas [2]. Esta problemática causa enfermedades en vainas y en semillas comercialmente importantes que contienen algunas de estas especies, es una podredumbre del cacao extremadamente destructiva, daños internos y externos a las vainas que resultan en la pérdida total de este. En el departamento se observó la infección de este hongo en plantas forestales, al occidente de la cordillera andina de Colombia zona rica en especies de *Herrania* y *Theobroma* [3].

Norte de Santander presenta problemas importantes en el cultivo de cacao como: baja producción por problemas fitosanitarios, escasez de masa crítica, baja mano de obra, baja adopción y transferencia de tecnología. Razón por la que se ha producido interés por el desarrollo tecnológico en cuanto a variedades, semillas, manejo integrado de plagas y enfermedades [4,5]. En Colombia se han realizado estudios sobre la biología molecular del hongo *Moniliophthora roreri*, con marcadores moleculares como ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), que permite caracterizar este tipo de hongo, con el rápido aislamiento de ADN genómico puro de alto peso molecular [6]. En este trabajo se estandarizó la técnica molecular de ISSR para evaluar y caracterizar la diversidad genética del hongo *Moniliophthora roreri* en Norte de Santander, Colombia. Al mismo tiempo se planteó revelar las fuentes de variación genética, lo cual servirá de ayuda

para obtener más información sobre este hongo, facilitando el conocimiento para investigaciones futuras, para implementar manejos que contrarresten esta enfermedad. En Norte de Santander, monilia afecta las 11.655 hectáreas cosechadas por los cacaoteros [7].

2. METODOLOGÍA

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se recolectaron muestras de frutos de cacao en la finca la Esmeralda, en la cual algunas mazorcas mostraron presencia de manchas color café y crecimiento de esporas, síntomas de la enfermedad. Características muy similares a la presencia del Fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, obtenidos en municipio de El Zulia (corregimiento de Astilleros). Se emplearon los siguientes pasos en campo: Se clasificaron los árboles que contenían el fruto enfermo, con papel periódico estéril se tomó el fruto por el lado que no presentaba la enfermedad y con un cuchillo estéril se cortó el pedúnculo, procediendo a envolver en papel periódico estéril y luego se guardó en bolsas plásticas [8], rotulando cada bolsa. Después de la recolección se conservaron en nevera por 3 o 4 días antes de la siembra.

Método de desinfección: Se lavó la mazorca con solución jabonosa y agua estéril, luego se cortó parte de la epidermis del fruto en trozos de tejido de 0,5 cm en los límites del área enferma con la zona donde no hay crecimiento fúngico, agregando 3 trozos de tejido por frasco de compota estériles y se procedió a realizar el protocolo de desinfección empleado por [9], agregando hipoclorito de sodio 2.5% por 2 min, se enjuagó con agua destilada estéril por 3 min, se agregó alcohol al 60% por 3min, se lavó con agua destilada por 3 min y por último se secó cada trozo en servilletas. En seguida se procedió a la siembra en los siguientes medios: 800 µl de gentamicina: agar PDA, agar PDA modificado y agar extracto de malta, incubándolos por 10 días a temperatura de 25°C.

Replicas empleadas para obtener el hongo puro: Se seleccionaron 4 cepas en crecimiento, y se realizaron una serie de réplicas en agar PDA.

Extracción y verificación de ADN Fúngico: Las 4 cepas HFa007, HFa009, HFa010a y HFa010e seleccionadas que se encontraban por duplicado en agar PDA (Agar Papa Destroxa), se sembraron en caldo Dextrosa Saboraud y se incubaron por 10 días a temperatura de 25°C.

Posteriormente con ayuda de baja lenguas estériles se extrajo el hongo, dejándolo en una caja de Petri estéril, con ayuda de una hojilla estéril se cortó el micelio en pedazos pequeños y se agregó 0.5 g en un microtubo de 2 ml. Se adicionó 1 volumen (500 µl) de Buffer de Extracción el cual contenía (50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 50 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 2% SDS, 1% Na₂SO₃), se maceró con un pistilo por 1 min, se llevó agitación en el Vórtex por 1 min y se centrifugó a 6000 rpm por 10 min. Después de centrifugar, a cada microtubo se le extrajo el sobrenadante y se agregó a un nuevo tubo de 1.5 ml y se incubó a 70°C por 15 min. Se le adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. La parte acuosa se transfirió a otro nuevo tubo de 1.5 ml, agregando 1 volumen de isopropanol y se llevó a 0°C por 10 min, seguido a esto se llevó a centrifugar a 10000 rpm por 10 min; luego se procedió a descartar por inmersión el isopropanol, se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, en seguida se retiró el etanol por inmersión y se dejó secar el precipitado a 37°C. Estando completamente seco, se re-suspendió en 50 µl Buffer TBE (tris, borato, EDTA) 1x y se guardó en nevera [6].

Para la verificación de la calidad del ADN extraído, se utilizó el gel de agarosa al 0,7% y Gel Red como intercalante. La electroforesis fue corrida inicialmente a 120 V por 3 min y la corriente final de 110 V por 40 min. Posteriormente, se visualizó el gel en el ChemiDoc™ Imaging System de BIO-RAD.

Chequeo de ADN de muestras de Monilia: Se realizó la comprobación de la calidad y cantidad del ADN de 56 muestras del fitopatógeno conservadas en el laboratorio de Biotecnología Molecular para aplicar el

marcador ISSR. Chequeando las muestras con electroforesis en gel de agarosa, utilizando 9 geles de agarosa al 0.8%, con una corrida electroforética de 120 V por 30 min y observadas en el ChemiDoc. Escogiendo las mejores para la continuidad de este trabajo. Y también los ADN fueron cuantificados en el Nanodrop Thermo Scientific.

Ensayo con el Marcador Molecular ISSR 880: Se realizó la mezcla de PCR Nova Taq® polimerasa, cantidad para 11 muestras (tabla 1), a cada microtubo se agregaron 18 µl del Mix, y 2 µl del ADN de cada muestra.

Visualización de los productos de PCR: Se empleó gel de agarosa a una concentración de 1,5% [10]. El marcador de peso molecular empleado fue de 1Kb, y para la electroforesis la corriente inicial fue de 100 V por 30 min y la final de 80 V por 10 min [11]. Posteriormente se visualizó el gel en el ChemiDoc.

Tabla 1. Mezcla de reacción utilizada para la PCR, con los cebadores ITS4 e ITS5 [3]. Componentes, concentración y cantidad para 5 muestras de monilia.

Componentes	Concentración Final	Cantidad (µl)	Volumen para 5 muestras
Agua desionizada estéril		14.8	74.4µl
Buffer	1X	2.5	12.5µl
MgCl	1.5 mM	1.5	7.5µl
Cebador ITS 4	0.5 µM	1.25	6.25µl
Cebador ITS 5	0.5 µM	1.25	6.25 µl
DNTPs	0.2mM	0.50	2.5µl
Suero Fetal Bovino		1	5µl
Taq Polimerasa	0.02 U/µl	2	0.5µl
ADN			1
Total		23.8µl	116µl

Estandarización de la técnica molecular, ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) Se escogieron 24 muestras de ADN de las conservadas, más 3 muestras aisladas, ajustando el cebador correspondiente a cada mezcla. Luego se llevó al Termociclador MultiGene™ OptiMax (Labnet) acordando la temperatura de hibridación adecuada para cada cebador (tabla 2). Posteriormente se realizaron las electroforesis, con gel de agarosa a una concentración del 2% y una corrida de 80 V por 2 h. Las bandas obtenidas se observaron en el ChemiDoc™ Imaging System de BIO-RAD.

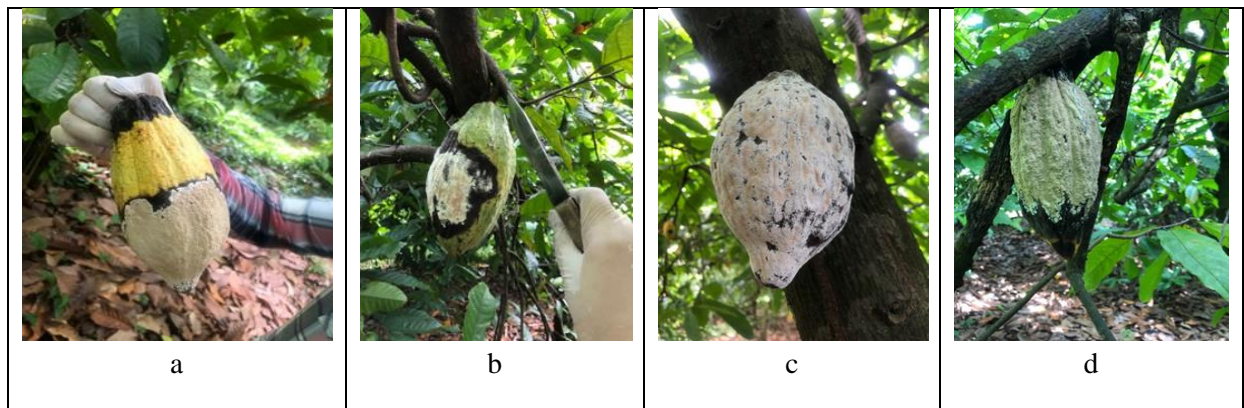
Tabla 2. Temperaturas de alineamiento óptimas de los 7 Cebadores estandarizadas para ISSR.

Cebador	Secuencia	Tm Estandarizada	Referencia
816	(CA) ₈ T	55	Phillips-Mora, 2003 [11]
823	(TC) ₇ TCC	55	[11]
874	(C) ₃ TCC CTC CCT CCCT	55	[11]
880	G(GA) ₂ CGACA G(GA) ₂	50	Aragón y Sánchez [12]
885	BHB (GA) ₈	55	[11]
890	ACGACTACG(GT) ₇	64.7	[12]
891	HVH (TG) ₇	55	[11]

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

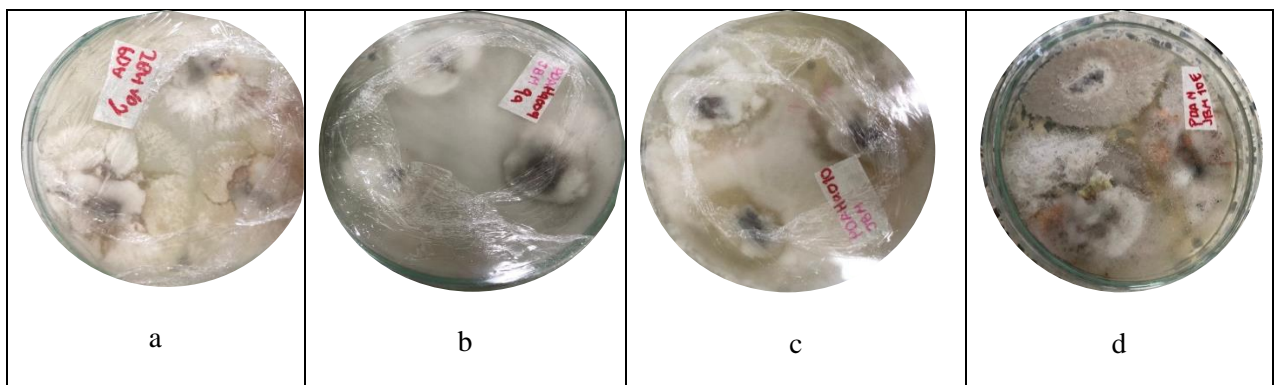
Recolección de fruto de cacao enfermo: Las 4 Muestras recolectadas en la finca la Esmeralda presentaron características de la enfermedad de cacao similares a la moniliasis (figura 1) [13].

Figura 1. Frutos de cacao enfermos aparentemente de monilia. Muestras recolectadas: a) HFa007, b) HFa009a, c) HFa010a y d) HFa010e.



Siembra del hongo en medio de cultivo: Después de sembrar los microorganismos en agar PDA, se pudo apreciar el crecimiento de las cepas como lo muestra la figura 2. Se seleccionaron las cepas HFa007, HFa009a, HFa010a y HFa010e, las cuales obtuvieron el mejor crecimiento sin presentar contaminación (figura 2).

Figura 2. Siembra de cortes realizados al fruto de Cacao enfermo para cada muestra en medio PDA. Muestras: a) HFa007, b) HFa009a, c) HFa010a y d) HFa010e.



A partir de las cepas madres se procedió a realizar la purificación mediante repiques sucesivos (figura 3) en agar PDA, pH 5.6 y se incubaron a 25°C, hasta obtener cepas puras del fitopatógeno. Características Morfológicas en medio PDA, Aa, Ab y Bb: presentan contaminación; Ac, Ad, Da y Db: borde irregular, textura suave, tonalidad cremosa, esporulación con anillos centrales; Ba borde irregular, textura polvorienta,

tonalidad blanca, esporulación con anillos centrales; Bc: borde irregular, textura suave, tonalidad cremosa, esporulación uniforme; Bd: borde irregular, textura suave, tonalidad amarillo cremoso, esporulación con anillos centrales; Ca y Cb: borde irregular, textura suave, tonalidad café claro, esporulación con anillos terminales; Cc y Cd: borde irregular, textura suave, tonalidad amarillo cremoso, esporulación con anillos terminales; Dc y Dd: borde irregular, textura suave, tonalidad amarillo cremoso, esporulación con anillos centrales.

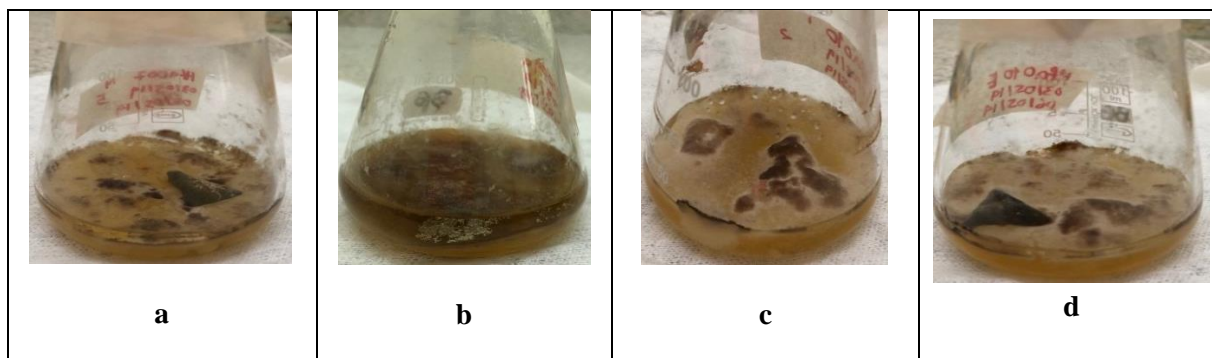
Figura 3. Replicas sucesivas de las cepas en PDA, para las muestras: HFa007, HFa009a, HFa010a y HFa010e.



Estas características de textura suave con anillos centrales o terminales de las cepas aisladas (figura 3), de cacao infectado, son similares al hongo fitopatogénico *Moniliophthora roreri*, e iguales a las reportadas por Villamizar y Afanador. [14, 15].

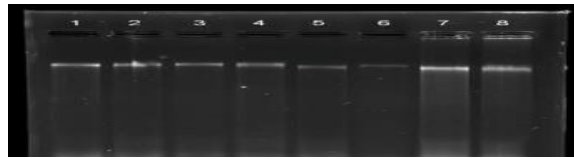
Extracción y visualización del ADN: Se utilizó el protocolo estandarizado por Suárez L. [6] realizando la extracción de ADN por duplicado a partir de cultivos en PDB (figura 4).

Figura 4. Crecimiento de las cepas en Caldo Papa Dextrosa. Muestras: a) HFa007, b) HFa009a, c) HFa010a y d) HFa010e.



Extracciones de ADN: A las 8 cepas seleccionadas se les realizó la extracción del ADN y la electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (figura 5), en el gel se puede observar que todas las muestras analizadas presentaban una buena cantidad de ADN, y se escogieron las muestras con mejor calidad y cantidad de ADN (1): HFa007 R1, (4): HFa010e R2 y (7): HFa009 R1.

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% w/v, de las extracciones de ADN para 8 muestras de monilia. (1): HFa007 R1, (2): HFa007 R2, (3): HFa010e R1, (4): HFa010e R2, (5): HFa010a R1, (6) HFa010a R2, (7): HFa009 R1, (8): HFa009 R2.



Luego se estableció un orden para cada muestra en la electroforesis teniendo en cuenta el aislamiento con su nomenclatura y municipio correspondiente (tabla 3). En este mismo orden se mantuvieron las muestras en la corrida de cada electroforesis. Obteniendo en cada electroforesis los resultados reportados en las figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, y 14. (figura 6 a la 14). En la figura 6, se aprecia el ADN en el gel de agarosa al 0.8%. La cantidad y calidad del ADN fue verificada en el Nanodrop, mostrando rangos de ADN desde 5,3 ng/μl hasta 2.754,2 ng/μl, de las que se eligieron 28 ADN de diversos municipios, relacionados en la tabla 3. La banda de cada muestra presento una cantidad de ADN y nivel de pureza aceptable.

Figura 6. Extracciones de ADN seleccionadas de monilia, gel de agarosa al 0.8% w/v.

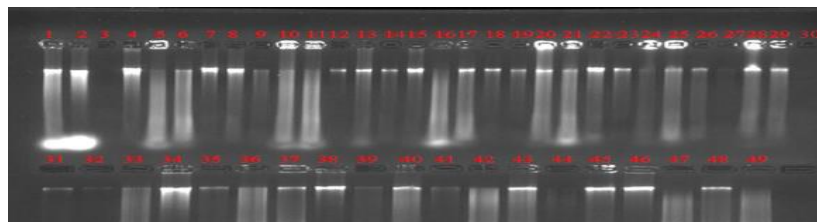


Tabla 3. Municipios y corregimientos del departamento Norte de Santander, donde fueron aisladas las 28 muestras de monilia [16].

Carril	Muestra	Municipios	Carril	Muestra	Municipios
1	1a-16	El Zulia	15	12(4)-45	Teorama
2	Ac-1	Agua Clara	16	17-14	Teorama
3	Ac-9	Agua Clara	17	19d-8	El Zulia
4	26d+/- - 39	Cúcuta	18	13+ -2	Bucarasica
5	5-8	Cúcuta	19	15c-14	Agua Clara
6	23-20	Bucarasica	20	16.-15	Agua Clara
7	HFa007	Astilleros	21	17.-20	Teorama
8	HFa010e	Astilleros	22	18d-3	Sardinata
9	HFa009a	Astilleros	23	22c-18	El Tarra
10	TI-35	Tibú	24	22d-19	El Tarra
11	46-4	Cúcuta	25	25-27	Agua clara
12	6a-15	Sardinata	26	36d-13	Tibú
13	6d-17	Sardinata	27	38.-16	Bucarasica
14	8-22	Bucarasica	28	Control + (1a-16)	El Zulia

PCR. Ensayo con el cebador 880: Las condiciones para la mezcla de PCR fueron las enunciadas en la tabla 4. Y Los pasos empleados: una Pre-desnaturalización 94°C por 5 min; luego una desnaturalización 94°C por 1 minuto, para el alineamiento del cebador (50°C) por 2 min; después una elongación a 72°C por 30 s y una Extensión final 72°C por 5 min. Se realizó una electroforesis empleando el marcador molecular ISSR 880, se utilizó el gel de agarosa al 1.5%, seleccionando 6 muestras más de ADN positivos para Monilia que se encontraban conservados en el laboratorio, más las 3 muestras escogidas inicialmente (figura 5); el control positivo es la muestra (1): 1a-16. Para las demás electroforesis se cambiaron las muestras 4 y 6 debido a que contenían muy poco ADN (figura 7). En el ensayo con este cebador 880 no amplificaron las muestras 4, 9 y 10.

Tabla 4. Condiciones de mezcla para la PCR-ISSR [7], para 28 muestras de monilia.

Componentes	Concentración final	Cantidad (µl)	Volumen para 11 muestras	Volumen para 28 muestras
Agua desionizada estéril		13,5	148,5 µl	405 µl
Buffer PCR (10X)	1X	2	22 µl	60 µl
MgCl (50mM)	3,5 mM	1,4	15,4 µl	42 µl
cebadores (10µM)	0,25 µM	0,5	5,5 µl	15 µl
Dntp's (10mM)	0,2 mM	0,4	4,4 µl	12 µl
Taq Polimerasa (5µ/µl)	1µ	0,2	2,2 µl	6 µl

ADN (25ng/μl)	2,5 ng/μl	2	2 μl	2 μl
Total		20 μl	200 μl	540 μl

Estandarización de la técnica molecular ISSR: Se realizaron electroforesis empleando el gel de agarosa a una concentración del 2% y una corriente de 80 V por 2 h; seleccionando las 3 muestras iniciales escogidas (figura 5) mas 24 muestras que se encontraban conservadas en nevera las cuales se comprobó que tenían gran cantidad de ADN. En la figura 8, se puede observar que con el cebador 880 no amplificaron las muestras 9, 13, 17, 21, 22, 26, 27 y 28. En la figura 9, se aprecia como con el cebador 890 amplificaron todas las muestras excepto la 17; igualmente con el cebador 891 (figura 14) amplificaron la mayoría de las muestras. En la tabla 3, se encuentra la relación de las muestras empleadas en las electroforesis para la estandarización de la técnica molecular ISSR de cada cebador, con el municipio y corregimiento en donde fueron recolectados para su posterior aislamiento. En la electroforesis No.5 para el cebador 816 (figura 10) se observó que con este cebador no amplificaron la mayoría de las muestras y aquellas que lograron amplificar contenían muy pocas bandas, igualmente con el empleo de los cebadores 823, 874 (amplifico una sola banda para las muestras 5, 11, 12, 16) y 885.

Figura 7. Electroforesis con el cebador 880, para 9 muestras de monilia en gel de agarosa al 2% w/v. (1): 1a-16, (2): Ac-1, (3): Ac-9, (4): TI3-41, (5): 5-8, (6): 6+-13, (7): HFa007, (8): HFa010e, (9): HFa009, (10): Control -, (11): Control +, (12): HyperLadder 1Kb.

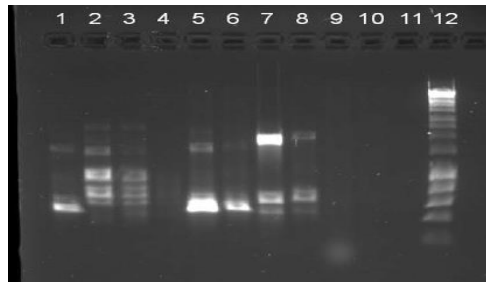


Figura 8. Electroforesis con el cebador 880, para 27 muestras de monilia en gel de agarosa al 2% w/v. (1): 1a-16, (2): Ac-1, (3): Ac-9, (4): 26d+/- - 39, (5): 5-8, (6): 23-20, (7): HFa007, (8): HFa010e, (9): HFa009, (10): TI-35, (11): 46-4, (12): 6a-15, (13): 6d-17, (14): 8-22, (15): 12(4)-45, (16): 17-19, (17): 19d-8, (18): 13+-2, (19): 15c-14, (20): 16.-15, (21): 17.-20, (22): 18d-3, (23): 22c-18, (24): 22d-19, (25): 25-27, (26): 36d-13, (27): 38.-16, (28): Control +, (29): Control -, (30): HyperLadder 1Kb.



Figura 9. Electroforesis con el cebador 890, para 27 muestras de monilia en gel de agarosa al 2% w/v. (1): 1a-16, (2): Ac-1, (3): Ac-9, (4): 26d+/- - 39, (5): 5-8, (6): 23-20, (7): HFa007, (8): HFa010e, (9):

HFa009, (10): TI-35, (11): 46-4, (12): 6a-15, (13): 6d-17, (14): 8-22, (15): 12(4)-45, (16): 17-19, (17): 19d-8, (18): 13+-2, (19): 15c-14, (20): 16.-15, (21): 17.-20, (22): 18d-3, (23): 22c-18, (24): 22d-19, (25): 25-27, (26): 36d-13, (27): 38.-16, (28): Control +, (29): Control -, (30): HyperLadder 1Kb.

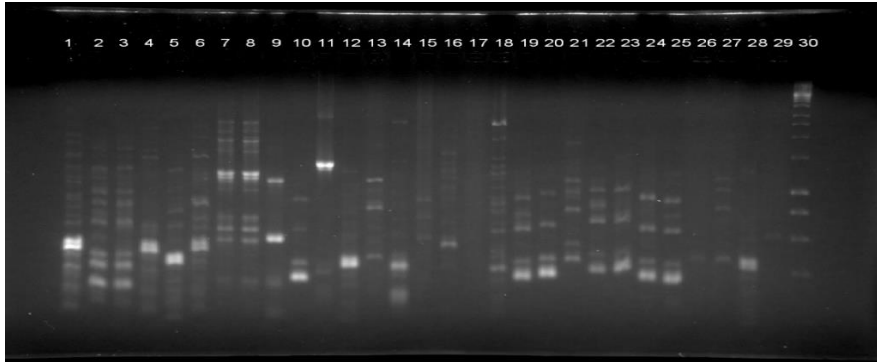


Figura 10. Electroforesis con el cebador 816, para 27 muestras de monilia en gel de agarosa al 2% w/v. (1): 1a-16, (2): Ac-1, (3): Ac-9, (4): 26d+/- - 39, (5): 5-8, (6): 23-20, (7): HFa007, (8): HFa010e, (9): HFa009, (10): TI-35, (11): 46-4, (12): 6a-15, (13): 6d-17, (14): 8-22, (15): 12(4)-45, (16): 17-19, (17): 19d-8, (18): 13+-2, (19): 15c-14, (20): 16.-15, (21): 17.-20, (22): 18d-3, (23): 22c-18, (24): 22d-19, (25): 25-27, (26): 36d-13, (27): 38.-16, (28): Control +, (29): Control -, (30): HyperLadder 1Kb.

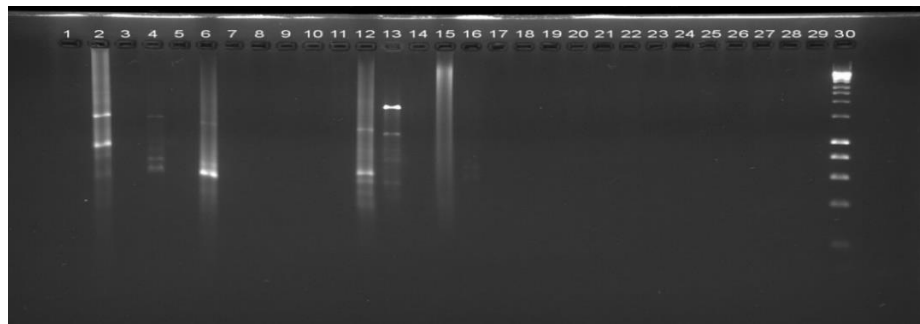


Figura 11. Electroforesis con el cebador 823, para 27 muestras de monilia en gel de agarosa al 2% w/v. (1): 1a-16, (2): Ac-1, (3): Ac-9, (4): 26d+/- - 39, (5): 5-8, (6): 23-20, (7): HFa007, (8): HFa010e, (9): HFa009, (10): TI-35, (11): 46-4, (12): 6a-15, (13): 6d-17, (14): 8-22, (15): 12(4)-45, (16): 17-19, (17): 19d-8, (18): 13+-2, (19): 15c-14, (20): 16.-15, (21): 17.-20, (22): 18d-3, (23): 22c-18, (24): 22d-19, (25): 25-27, (26): 36d-13, (27): 38.-16, (28): Control +, (29): Control -, (30): HyperLadder 1Kb.

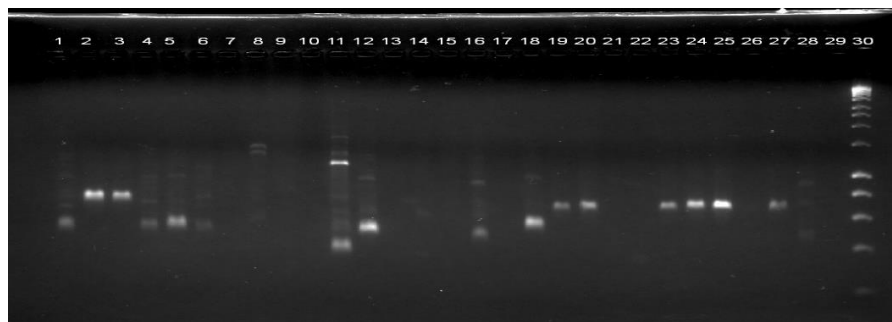


Figura 12. Electroforesis con el cebador 874, para 27 muestras de monilia en gel de agarosa al 2% w/v. (1): 1a-16, (2): Ac-1, (3): Ac-9, (4): 26d+/- - 39, (5): 5-8, (6): 23-20, (7): HFa007, (8): HFa010e, (9):

HFa009, (10): TI-35, (11): 46-4, (12): 6a-15, (13): 6d-17, (14): 8-22, (15): 12(4)-45, (16): 17-19, (17): 19d-8, (18): 13+-2, (19): 15c-14, (20): 16.-15, (21): 17.-20, (22): 18d-3, (23): 22c-18, (24): 22d-19, (25): 25-27, (26): 36d-13, (27): 38.-16, (28): Control +, (29): Control -, (30): HyperLadder 1Kb.

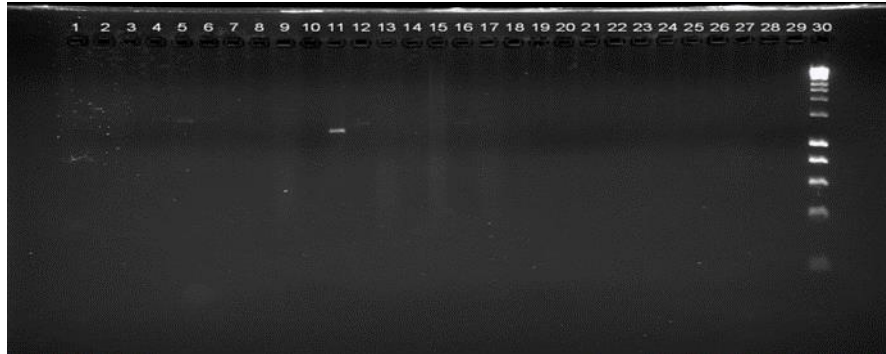
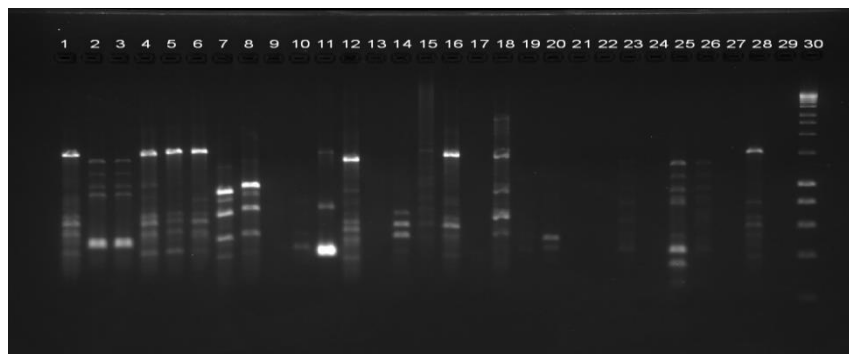


Figura 13. Electroforesis con el cebador 885, para 27 muestras de monilia en gel de agarosa al 2% w/v. (1): 1a-16, (2): Ac-1, (3): Ac-9, (4): 26d+/- - 39, (5): 5-8, (6): 23-20, (7): HFa007, (8): HFa010e, (9): HFa009, (10): TI-35, (11): 46-4, (12): 6a-15, (13): 6d-17, (14): 8-22, (15): 12(4)-45, (16): 17-19, (17): 19d-8, (18): 13+-2, (19): 15c-14, (20): 16.-15, (21): 17.-20, (22): 18d-3, (23): 22c-18, (24): 22d-19, (25): 25-27, (26): 36d-13, (27): 38.-16, (28): Control +, (29): Control -, (30): HyperLadder 1Kb.



Figura 14. Electroforesis con el cebador 891, para 27 muestras de monilia en gel de agarosa al 2% w/v. (1): 1a-16, (2): Ac-1, (3): Ac-9, (4): 26d+/- - 39, (5): 5-8, (6): 23-20, (7): HFa007, (8): HFa010e, (9): HFa009, (10): TI-35, (11): 46-4, (12): 6a-15, (13): 6d-17, (14): 8-22, (15): 12(4)-45, (16): 17-19, (17): 19d-8, (18): 13+-2, (19): 15c-14, (20): 16.-15, (21): 17.-20, (22): 18d-3, (23): 22c-18, (24): 22d-19, (25): 25-27, (26): 36d-13, (27): 38.-16, (28): Control +, (29): Control -, (30): HyperLadder 1Kb.



El contenido de información polimórfica (PCI por sus siglas en inglés, Polymorphism Content Value) se calculó con la fórmula: $PIC = 2Pi (1-Pi)$ donde Pi es la frecuencia de ocurrencia de bandas polimórficas en diferentes cebadores [17]. El valor PIC provee una medida influenciada por el número y frecuencia de alelos, el valor máximo de PIC para un marcador ISSR es 0.5, se asume la presencia de dos alelos por locus en un análisis de ISSR [18]. Los valores de PIC fueron altos a pesar de la existencia de bajos porcentajes de polimorfismo, debido al rango de cantidad de bandas amplificadas por cada cebador (tabla 5). Para el cebador 880 se obtuvo un número de bandas de 45 y para el 874 se logró un número menor de bandas de 8, ver tabla 5.

Tabla 5. Número de bandas amplificadas, porcentaje de polimorfismo y valor PIC de cada cebador utilizado. (El PIC hace referencia al contenido de información del polimorfismo).

Cebador	Número de bandas amplificadas	Porcentaje de polimorfismo	Valor PIC	Rango de amplificación
880	45	12	0,21	400-2577 pb
816	23	4,8	0,09	335-1681 pb
874	8	4,6	0,09	208-2386 pb
885	14	5	0,1	333-3388 pb
823	28	7	0,13	471-1980 pb
890	40	16	0,27	211-3960 pb
891	32	14,4	0,25	268-2699 pb
Media	27	9	0,15	

Análisis de secuenciación para el hongo aislado: Además, se realizó la mezcla de reacción utilizada para la PCR-ITS 4 y 5 para un volumen de 5 muestras (tabla 1) y así se seleccionaron las dos muestras HFa007 y HFa009 para la secuenciación. Dado los resultados obtenidos de la secuenciación para las muestras HFa007 y HFa009 arrojo: con el empleo del ITS 5 para el hongo HFa007 se observó un porcentaje de identidad del 97.08% para *Diaporthe pseudomangiferae*, con el ITS 4 para el hongo HFa009 se observó un porcentaje de 99.29% de identidad para *Diaporthe melonis*.

Tabla 6. Resultados de secuenciación de 2 cepas: identificación, valores E-value, porcentaje de identidad de las secuencias analizadas utilizando la base de datos NCBI con accesoión.

Código	Género y especie	Valor E	% de identidad	Accesión
HFa007	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	0.0	97.08%	MG576129.1
HFa009	<i>Diaporthe melonis</i>	0.0	99.29%	MG661731.1

Las especies de *Diaporthe* y sus estados asexuales Phomopsis tienen amplios rangos de hospedadores y están ampliamente distribuidos, y se presentan como patógenos de plantas, endófitos o saprobios, pero también como patógenos de humanos y otros mamíferos. *Diaporthe* sp. son responsables de enfermedades en una amplia gama de plantas hospederas, algunas de las cuales son económicamente importantes en todo el mundo, causando pudriciones de raíces y frutos, muerte regresiva, chancros, manchas en las hojas, tizones, pudrición y marchitez [19].

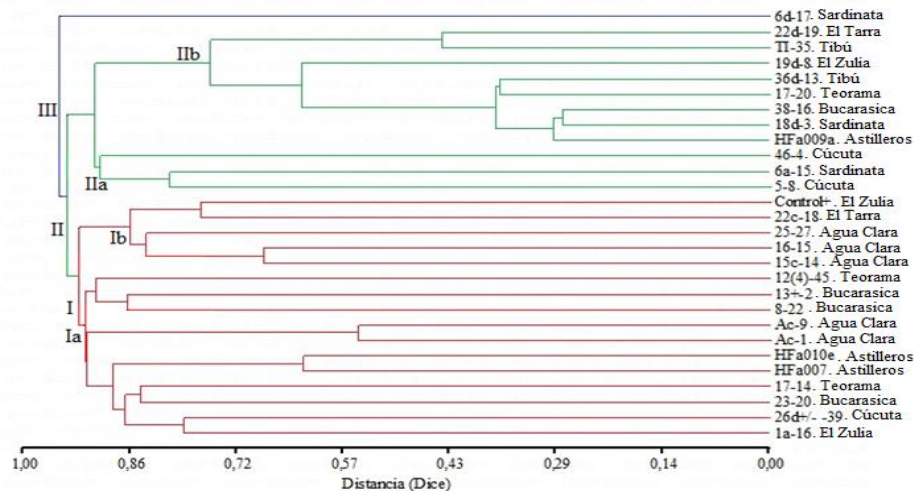
Análisis estadístico de los resultados de ISSR: La presencia o ausencia de cada banda observada en el perfil de cada primer del análisis ISSR se plasmó en una matriz de uno (1) y cero (0), todas las bandas monomórficas y polimórficas fueron consideradas para el análisis, incluyendo la muestra +control. Se realizó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Dice. Promedio (Average linkage): Correlación cofenética= 0,962. Variables estandarizadas: Casos leídos 190, casos omitidos 0.

Además, para establecer las distancias genéticas en el dendrograma se usó el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y la distancia de Dice [20,21], y se halló el coeficiente de correlación cofenético a fin de determinar la confiabilidad del análisis de agrupamiento. También, la información binaria fue sujeta a un análisis de coordenadas principales o escalamiento multidimensional (EMD). Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa estadístico Info-Gen 2013 [22].

Figura 15. Matriz de similitud de Dice para 28 muestras del hongo *Moniliophthora roreri*, de Norte de Santander. Donde un valor de 1.0 indica que el cebador es capaz de discriminar entre todas las muestras y un valor de 0.0 indica que todas las muestras son idénticas.

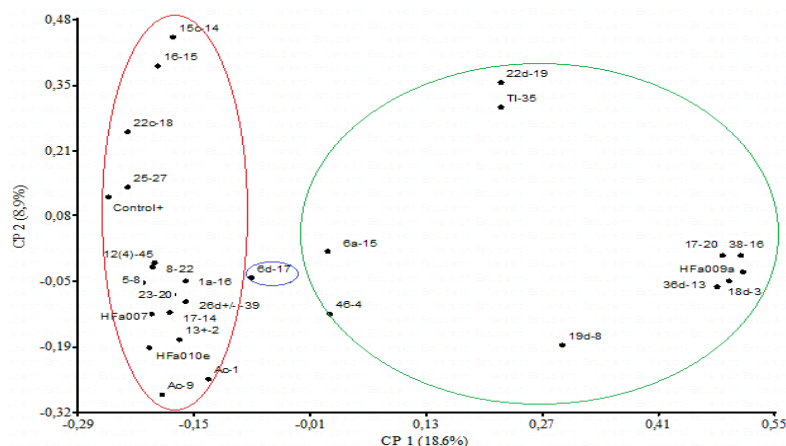
	1a-16	Ac-1	Ac-9	26d+/-39	05-ago	23-20	HFa007	HFa010e	HFa009a	TI-35	46-4	6a-15	6d-17	ago-22	12(4)-45	17-14	19d-8	13--2	15c-14	16-15	17-20	18d-3	22c-18	25-27	36d-13	38-16	Control+	
1a-16	0																											
Ac-1	0.89	0																										
Ac-9	0.86	0.55	0																									
26d+/-39	0.79	0.93	0.92	0																								
05-ago	0.93	0.92	0.93	0.9	0																							
23-20	0.83	0.94	0.9	0.92	0.83	0																						
HFa007	0.88	0.96	0.95	0.86	0.88	0.89	0																					
HFa010e	0.88	0.93	0.91	0.88	0.9	0.88	0.63	0																				
HFa009a	0.94	0.94	0.96	0.95	0.98	0.96	0.96	0.97	0																			
TI-35	0.9	0.94	0.98	0.97	0.93	0.93	0.95	0.93	0.72	0																		
46-4	0.93	0.93	0.93	0.95	0.89	0.95	1	0.96	0.88	0.98	0																	
6a-15	0.89	0.91	0.93	0.96	0.81	0.89	0.94	0.96	0.88	0.82	0.91	0																
6d-17	0.95	0.92	0.96	0.98	1	0.98	0.95	0.95	0.93	0.98	1	0.96	0															
ago-22	0.97	0.95	0.91	0.91	0.9	0.96	0.93	0.96	0.96	0.95	0.95	0.96	0															
12(4)-45	0.9	0.95	0.96	0.94	0.95	0.91	0.88	0.93	0.97	0.96	0.95	0.96	0.93	0.9	0													
17-14	0.83	0.9	0.92	0.89	0.85	0.85	0.91	0.87	0.95	0.97	0.98	0.9	0.98	0.93	0.91	0												
19d-8	0.88	0.87	0.91	0.87	0.95	0.9	0.93	0.93	0.6	0.85	0.86	0.83	0.94	0.96	0.97	0.93	0											
13--2	0.83	0.89	0.89	0.9	0.89	0.94	0.91	0.91	0.97	0.98	0.91	0.93	0.91	0.86	0.91	0.95	0.9	0										
15c-14	0.91	0.98	0.98	0.93	0.92	0.93	0.95	0.97	0.99	0.85	0.95	0.94	0.96	0.96	0.96	0.98	0.99	0.95	0									
16-15	0.89	0.96	0.96	0.91	0.95	0.93	0.95	1	0.97	0.91	0.95	0.94	0.96	0.93	0.93	0.98	0.99	0.98	0.68	0								
17-20	0.92	0.94	0.98	0.93	0.97	0.94	0.93	0.94	0.36	0.71	0.87	0.86	0.94	0.99	0.99	0.94	0.66	0.93	0.94	0.96	0							
18d-3	0.92	0.93	0.96	0.95	0.98	0.95	0.96	0.98	0.3	0.75	0.88	0.89	0.92	0.95	0.95	0.95	0.61	0.94	0.99	0.99	0.4	0						
22c-18	0.91	0.94	0.95	0.93	0.92	0.95	0.92	0.97	0.99	0.93	0.98	0.96	0.92	0.88	0.89	0.88	0.99	0.95	0.76	0.88	0.97	0.96	0					
22d-19	0.86	0.94	1	0.95	0.96	0.95	0.97	0.97	0.74	0.44	0.98	0.82	0.98	0.98	0.98	0.97	0.86	0.97	0.79	0.86	0.71	0.75	0.93	0				
25-27	0.92	0.88	0.88	0.94	0.91	0.92	0.94	0.91	0.98	0.9	0.98	0.97	1	0.91	0.92	0.9	0.96	0.9	0.9	0.77	0.99	0.98	0.87	0.92	0			
36d-13	0.92	0.9	0.92	0.92	0.98	0.97	0.98	0.95	0.38	0.74	0.87	0.88	0.97	0.99	0.95	0.91	0.65	0.96	0.99	0.99	0.36	0.36	0.99	0.74	0.96	0		
38-16	0.93	0.95	0.99	0.95	0.97	0.96	0.96	0.98	0.28	0.72	0.88	0.88	0.92	0.96	0.97	0.95	0.61	0.95	0.96	0.96	0.33	0.28	0.95	0.74	0.99	0.38	0	
Control+	0.88	0.95	0.96	0.9	0.88	0.91	0.91	0.88	0.98	0.91	0.96	0.95	0.97	0.87	0.87	0.84	0.96	0.91	0.89	0.9	0.99	0.98	0.77	0.94	0.86	0.97	0.98	0

Figura 16. Dendrograma para 28 muestras del hongo *Moniliophthora roreri*, basado el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de similitud de Dice.



Con base en el análisis de ISSR se construyó un dendograma de similitud (figura 16), en el cual se apreciaron 3 grupos genéticos I, II, III con un nivel de similitud de 0,962. **El grupo I** con una distancia genética de 0,93, con un total de 16 muestras, de las cuales se generaron dos subgrupos (Ia y Ib), el primero (Ia) agrupo los aislamientos 1a-16 (El Zulia), 26d+/-39 (Cúcuta), 23-20 (Bucarasica), 17-14 (Teorama), HFa007 (Astilleros), HFa0010e (Astilleros), Ac-1 (Agua clara), Ac-9 (Agua clara), 8-22 (Bucarasica), 13+-2 (Bucarasica), 12(4)-45 (Teorama); el segundo (Ib) los aislamientos 15c-14 (Agua clara), 16-15 (Agua clara), 25-27 (Agua clara), 22c-18 (El Tarra). **El grupo II** con una distancia genética de 0,95, está conformado por los subgrupos (IIa y IIb), el grupo IIa contiene los aislamientos 5-8 (Cúcuta), 6a-15 (Sardinata), 46-4 (Cúcuta); el grupo IIb los aislamientos HFa009a (Astilleros), 18d-3 (Sardinata), 38-16 (Bucarasica), 17-20 (Teorama), 36d-13 (Tibú), 19d-8 (El Zulia), TI-35 (Tibú), 22d-19 (El Tarra). **El grupo III** con una distancia genética de 0,97, contiene el aislamiento 6d-17 (Sardinata).

Figura 17. Análisis de escalamiento multidimensional (EMD) para 28 muestras del hongo *Moniliophthora roreri*, de Norte de Santander.



4. CONCLUSIONES

- Las características morfológicas presentes en el hongo aislado de cacao enfermo como sus anillos centrales o terminales, su textura suave, son características similares al género *Moniliophthora roreri*. Sin embargo, al realizar la secuenciación arrojó que el hongo HFa007 con el empleo de ITS es *Diaporthe pseudomangiferae* con un 97,08% de identidad y el hongo HFa009 con un porcentaje de 99,29% de identidad para *Diaporthe melonis*.
- Los cebadores ISSR, mostraron ser una herramienta eficaz para manejar especies estrechamente relacionadas. Los cebadores 823, 880, 890 y 891 presentaron mayor número de bandas; los 816, 874 y 885 no proporcionaron un patrón claro de amplificación. En el análisis estadístico la muestra 6d-17 recolectada en el municipio de Sardinata en Norte de Santander se agrupó de forma independiente en el dendograma, indicando que esta muestra del fitopatógeno no es similar a las otras muestras aisladas en otros municipios y pertenece a grupos genéticos separados.

AGRADECIMIENTOS

AL FINU, por parte de la financiación de este proyecto. A FEDECACAO. A los ingenieros: Leidy Jhoana Moreno y Ricardo Alarcón, por su colaboración.

REFERENCIAS

- [1] Portafolio. (2017). Colombia, con unos de los cultivos de cacao más productivos a nivel mundial [Internet], | Economía | Portafolio. Disponible desde <<http://www.portafolio.co/economia/record-en-produccion-de-cacao-en-primer-semester-508495>> [Acceso 10 de noviembre de 2019].
- [2] El nuevo día. (2017). Enfermedades en agro, una pérdida de alto costo [Internet], | El Nuevo Día. Disponible desde <<http://www.elnuevodia.com.co/nuevodia/ciudadania/contacto-agropecuario/401042-enfermedades-en-agro-una-perdida-de-alto-costo>> [Acceso 10 de noviembre de 2019].
- [3] Suárez, L. (2015). Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. Retrieved from https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/rt/printerFriendly/47994/55245
- [4] Suárez, L. (2006). Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en municipios del Nororiente Colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. *Revista Respuestas*, 11(1), 3–9. <https://doi.org/10.22463/0122820X.623>
- [5] Suárez, L., & Cabrales, C. (2008). Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Respuestas*, 13(1), 45–56. <https://doi.org/10.22463/R.V13I1.553>
- [6] Suárez Contreras, L. Y. (2005). Extracción y purificación del ADN de *Moniliophthora roreri* hongo que ataca el cacao, en Norte de Santander. *Respuestas*, ISSN 0122-820X, ISSN-E 2422-5053, Vol. 10, No. 2, 2005, Págs. 4-8, 10(2), 4–8. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5529265>
- [7] Suárez, L. (2017). Diversidad genética de *Moniliophthora roreri* mediante Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(2), 425–434. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i2.7342>
- [8] Gonzales Figueroa Adriana Beatriz, R. O. (2014). Aislamiento y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* (monilia) en frutos de *Theobroma cacao* l. (cacao) del cultivar San Jose del Real de la carrera, Usulután. *Univarsidad de el Salvador*, 61-193.
- [9] Riaño, A. L. (2012). Aislamiento de microorganismos con potencial antagonista al hongo *Moniliophthora roreri* para control biológico en Norte de Santander. Tesis de pregrado Universidad Francisco de Paula Santander.
- [10] Peñaranda, F. y Suárez L. 2018. Identificación molecular de hongos filamentosos. IX Congreso Internacional de Genética Humana y XV Congreso Colombiano de Genética. Barranquilla. 25-27 de septiembre. Colombia [En línea] <http://ojsinvestigacion.unilibreaq.edu.co/ojsinvestigacion/index.php/biociencias/article/view/901/868>.
- [11] 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. Retrieved from <http://opac.bibliotecaorton.catie.ac.cr/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=420729>

[12] Arango, M., & Sánchez, I. (2018). Caracterización molecular mediante ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas) de mandarina (*Citrus reticulata*) pertenecientes al corregimiento de Villa Sucre - Norte de Santander (Universidad Francisco de Paula Santander). Retrieved from <http://alejandria.ufps.edu.co/descargas/tesis/1610871 - 1610896.pdf>

[13] Arguello A., Mantilla J., Palencia C., Calle Hoyos, L., Mujica Jaimes J., Aranzazu., Hernández, L., Agudelo A., Peñaloza R., Manejo integral de la moniliasis del cacao: una propuesta técnica y educativa. Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA, 2008, pp. 30 – 50.

[14] Villamizar-Gallardo, R., Cruz, J. F. O., & Ortíz, O. O. (2016). Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 51(12), 1929–1936. <https://doi.org/10.1590/S0100-2>

[15] Grisales Ortega, S., & Afanador Kafuri, L. (2007). Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 15-32. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/712>

[16] Suárez Contreras, L., & Rangel Riaño, A. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica*, 62(4), 370 - 378. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/36211/45150

[17] Bhat, K. V. 2002. Molecular data analysis. In: Proceedings of the short –term training course on molecular marker applicaton in plant breeding. sept. 26-oct. 5, ICAR, New Delhi.

[18] Henry, R. J. 1997. Practical applications of plant molecular biology. Chapman & Hall. London. 59-98 p.

[19] Gomes, R & Glienke, Chirlei & Rodrigues Videira, Sandra Isabel & Lombard, Lorenzo & Groenewald, J.Z. & Crous, Pedro. (2013). *Diaporthe*: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*. 31. 1-41. 10.3767/003158513X666844.

[20] Dice, L. R. (1945). Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology*, 26(3), 297–302. <https://doi.org/10.2307/1932409>

[21] Schlee, D., Sneath, P. H. A., Sokal, R. R., & Freeman, W. H. (1975). Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. *Systematic Zoology*, 24(2), 263. <https://doi.org/10.2307/2412767>.

[22] Balzarini, M. G., & Di Rienzo, J. A. (2013). Info-Gen. Universidad Nacional de Cordoba. Argentina. Retrieved from <http://www.info-gen.com/>