

# Estructura poblacional y dinámica espacial y temporal de la monilia en diferentes ambientes

Y. Jaimes<sup>1,2</sup>, C. González<sup>3</sup>, J. Rojas<sup>1</sup>, F. Ribeyre<sup>4</sup>, C. Cilas<sup>4</sup>, E.L. Furtado<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica. Centro de Investigación La Suiza-Rionegro-Santander, Colombia;

<sup>2</sup> Becario del programa CAPES PEC – PG;

<sup>3</sup> Corpoica, Centro de Investigación Tibaitata, Mosquera, Colombia;

<sup>4</sup> CIRAD, UR Bioagresseurs, Campus de Baillarguet, TA A-106/D, 34398 Montpellier Cedex 5, Francia;

<sup>5</sup> Departamento Protección de Plantas, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Estatal de São Paulo, Botucatu, SP, Brasil;

<sup>6</sup> Becario del CNPq

## Resumen

La monilia (*Moniliophthora roreri*) es la principal enfermedad biótica de *T. cacao* en Colombia. Se requiere conocer aspectos básicos de la biología del patógeno para generar estrategias de manejo. Se analizó la diversidad genética y estructura poblacional de 186 aislamientos de *M. roreri* procedentes de siete departamentos de Colombia utilizando 13 microsatélites. Se encontraron 152 genotipos multilocus (MLG) y poblaciones clonales de acuerdo al índice de asociación estandarizado (IA). Esto sugiere que monilia presenta recombinación asexual o parcial debido a la parasexualidad. Se reconocieron dos grupos genéticos entre los aislamientos mediante el método de agrupamiento bayesiano, diferenciándose por origen geográfico y altitud. En cuatro localidades se monitoreó la incidencia de la enfermedad a clones con diferentes grados de susceptibilidad en el tiempo y la parte espacial en el CI La Suiza de Corpoica, entre julio de 2013 a mayo de 2015. Para el análisis temporal y espacial se empleó el modelo lineal generalizado con distribución de quasi-Poisson con función de ligación logarítmica. Se encontró relación significativa entre clones y localidades. El clon SSC61 presentó la mayor intensidad de la enfermedad y en San Vicente los menores niveles de la enfermedad en todos los materiales. De acuerdo al test *I* de Moran se evidenció una autocorrelación espacial de la enfermedad. La epidemia de monilia varía de acuerdo con la localidad, variedad y localización en el campo. Por ello, las prácticas de manejo se deben ajustar según los microambientes y la distribución de los materiales en el lote.

**Palabras clave:** Epidemiología, diversidad genética, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora roreri*

## Introducción

El hongo altamente especializado *Moniliophthora roreri* destruye frutos de las especies pertenecientes a los géneros *Theobroma* y *Herrania*. Éste tiene un alto nivel de adaptación y el gran número de esporas de larga vida, haciendo de éste un fitopatógeno altamente eficaz y un formidable invasor de nuevas áreas geográficas (Phillips-Mora et al. 2007). Para el manejo de esta enfermedad se debe considerar la epidemiología del patógeno, que permita establecer las bases teóricas para comprender las epidemias en el tiempo y en el espacio. De la monilia se conoce que la dispersión de las esporas depende de la

International Symposium on Cocoa Research (ISCR), Lima, Peru, 13-17 November 2017

temperatura y la humedad, y ésta se da por medio del agua, material vegetal infectado, animales, herramientas y el hombre (Leandro 2011).

En cacao no se cuenta con materiales con resistencia vertical a la monilia (Ali et al. 2015), y en condiciones desfavorables al hospedero, este patógeno consigue infectar clones con alto grado de resistencia, alterar el metabolismo e inducir respuestas a estrés, engañando los mecanismos de defensa de la planta de *T. cacao* (Bailey et al. 2014). Parte de la adaptación de *M. royeri* se podría explicar por la genética de sus poblaciones. Por tanto, generar conocimiento de la variación genética de las poblaciones de este patógeno es fundamental para un programa de mejoramiento genético basado en la generación de materiales con resistencia eficaz y sustentable (Ali et al. 2015). En este trabajo se estudió la variabilidad genética de aislamientos de *M. royeri* en las principales zonas cacaoteras de Colombia, principalmente en municipios de Santander, centro de diversidad, y la dinámica espacio-temporal de la enfermedad en diferentes ambientes de esta región.

## **Materiales y Métodos**

### **Material fungico, extracción de DNA y amplificación de SSR**

Los aislamientos *M. royeri* se obtuvieron de frutos enfermos de *T. cacao* colectados en siete departamentos productores de cacao en Colombia de materiales susceptibles (ICS60, ICS39 e ICS40) y material con resistencia parcial (ICS95). Por localidad se seleccionaron cinco fincas, teniendo como criterio de selección el material vegetal y la distancia entre las fincas (> 5 km). Para la obtención de los aislamientos se siguió la metodología descrita por Jaimes et al, 2016.

El DNA genómico se extrajo y purificó de aislamientos de *M. royeri* usando el kit ZR Fungal/Bacterial MiniPrep (Zymo Research), se usaron los 13 marcadores SSR con mayor polimorfismo para el análisis y las condiciones de PCR de acuerdo con la metodología descrita por Jaimes et al. (2016). Los SSR se arreglaron en 3 paneles multiplex de acuerdo con el tamaño de los productos, su polimorfismo y el fluoróforo. Los productos de la amplificación fluoromarcados se visualizaron en el analizador genético automatizado de DNA 310 ABI PRISM (Applied Biosystems). Los fragmentos de PCR se detectaron con el software de análisis GeneMapper™ versión 3.0 (Applied Biosystems).

### **Análisis de genética y estructura poblacional**

Los genotipos multilocus (MLG) se determinaron usando el grupo de 13 SSR. El análisis se realizó sobre 186 aislamientos de *M. royeri*. Para el análisis de la genética poblacional, los MLG se asignaron para cada aislamiento con el paquete *poppr* implementado en el software R v. 3.3.1. Para la estructura genética de la población de todos los aislamientos se estimó cuatro niveles de estratificación: I) Clon, II) Localidad, III) Estado y IV) Altitud. Para cada estrato, se probaron para el equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) en el paquete. Se determinó la diversidad genotípica, la uniformidad y el índice de Shannon-Wiener. Con el fin de determinar el grado de clonalidad y el potencial de recombinación en la población se calculó el desequilibrio de ligación (LD) para todos los marcadores SSR usando el índice estandarizado de asociación  $I_A$  y  $r_d$ . Para estimar el nivel de mezcla e inferir en el número de clusters se realizó un análisis de agrupamiento bayesiano en el software STRUCTURE v. 2.3.4, se comparó la probabilidad estimada de cada valor K para determinar el número de poblaciones presente con base en el máximo  $ln$  de K.

## **Sitio experimental y diseño para estudio espacio-temporal**

El estudio se realizó en cuatro localidades de Santander en cultivos comerciales, entre ellas el CI La Suiza de Corpoica. Se tuvo como criterios de selección: I) La disponibilidad variedades de cacao (ICS 95 – clon resistente, CCN51 – moderadamente resistente y el SCC 61 – clon susceptible); II) manejo agronómico similar, especialmente: remoción semanal de frutos, control de malezas y cosecha oportuna; y III) diferentes condiciones ambientales. Cinco plantas al azar se marcaron por clon por sitio de muestreo. En el caso del C.I. La Suiza, se seleccionaron cinco plantas por material por bloque en una parcela experimental con cuatro bloques completos al azar.

## **Análisis espacio-temporal**

Para el análisis temporal, se registró el número de frutos totales y removidos con síntomas avanzados de la enfermedad a intervalos de 15 días entre julio de 2013 y mayo de 2015. El número de frutos cosechados se registró solo en el centro de investigación La Suiza. Para el análisis espacial, se consideró la distribución de cada planta en la parcela experimental del C.I. La Suiza.

Para analizar el efecto de las localidades sobre la incidencia de la enfermedad se sumaron los conteos realizados por árbol. Para el análisis, se seleccionaron las fechas con datos completos y se empleó un modelo lineal generalizado (glm) con distribución de quasi-Poisson con función de enlace logarítmica, debido a la sobredispersión. Los frutos enfermos removidos se consideraron como la variable dependiente. En todos los análisis, los efectos se consideraron como significantes con el valor de  $p \leq 0,05$ . Todo el análisis estadístico se realizó usando el paquete *spdep* del software R v. 3.2.3.

## **Resultados y Discusión**

### ***Diversidad genética y estructura poblacional de *M. royeri****

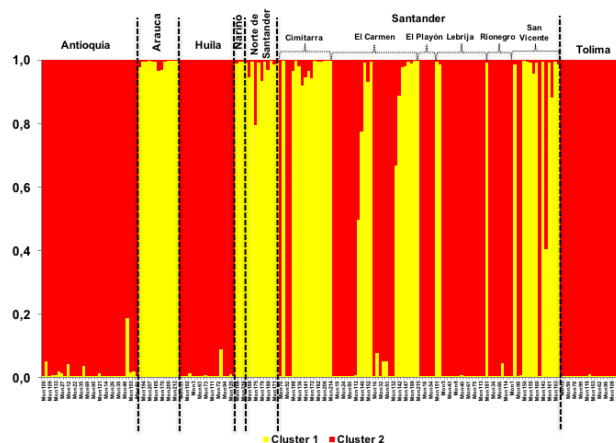
En total, se detectaron 152 MLG para todas las poblaciones de *M. royeri*, mostrando alta diversidad genética. La mayoría de MLGs estuvieron representados por un solo aislamiento. Phillips-Mora et al. (2007) reportaron resultados similares con alto nivel de polimorfismo estimado con perfiles de AFLP e ISSR en poblaciones de este patógeno. En todas las poblaciones se obtuvo una heterocigosidad esperada ( $H_{exp}$ ) promedio de 0,69, indicando un alto grado de variabilidad. Aunque, Ali et al. (2015) reportan ausencia de heterocigosis entre los aislamientos de *M. royeri* para cinco grupos genéticos previamente reportados, también encontraron que los aislamientos del nororiente de Colombia muestran altos niveles de diversidad genética, posible centro de origen de *M. royeri*. Pero, se debe estudiar aislamiento de otras regiones, como las del suroccidente de Colombia, que también mostraron alta diversidad. Esta diversidad se puede deber a una alta tasa de mutación o algún nivel de intercambio genético entre y dentro de las poblaciones de las diferentes localidades geográficas.

Por otra parte, se refuta la hipótesis de no vínculo entre los marcadores, ya que tanto para para la población corregida y sin corrección, se obtuvieron valores  $r_d$  0,184 y 0,183 respectivamente, indicando una población clonal, siendo el desequilibrio de vinculación de los multilocus significativamente mayor a cero para cada población ( $P \leq 0,001$ ). Los valores

de IA y  $\hat{r}_d$  estimados sugieren que las poblaciones de *M. royeri* son poblaciones clonales. Esto evidencia la ausencia de recombinación sexual en *M. royeri* (Díaz-Valderrama y Aime, 2016), soportando la hipótesis que éste es probablemente un hongo un hongo exclusivamente con fase anamórfica. Si *M. royeri* tiene una reproducción estrictamente clonal, se evidencia un alto flujo genético junto con grandes tamaños efectivos de las poblaciones que podrían explicar la diversidad genotípica encontrada.

La estadística Bayesiana asignó los 186 aislamientos en dos grupos distintivos, tanto para un modelo con o sin mezcla. Para los dos análisis, la distribución de los grupos genéticos exhibe una alta correlación con la localización geográfica del sitio de colecta de los aislamientos. En el cluster 1 se agruparon los aislamientos de Arauca, Norte de Santander y Nariño con un 98,97%, 96,23% y 99,24% de ancestría, respectivamente. En el cluster 2 se agruparon los aislamientos de Antioquia, Tolima y Huila con un 98,41%, 99,46% y 98,98% de ancestría, respectivamente. Sin embargo, los aislamientos de Santander aunque con mayor contribución del cluster 2 (55,65%), sus poblaciones evidenciaron un 44,35% de ancestría del cluster 1 (Figura 1). Esto se podría explicar por estar localizado en el Magdalena Medio, considerado el centro de diversidad de esta especie (Ali et al., 2015).

La comparación de la variación genética entre y dentro de dos niveles jerárquicos de la población, considerando el departamento como población y los otros estratos como subpoblaciones, revelaron una diferenciación significativa en las tres subpoblaciones estimadas para el análisis ( $P = 0,01$ ). La mayor diversidad de haplotipos (85,83% - 89,53%) se encontró dentro de las subpoblaciones (clon, municipio o altitud), pero una cantidad apreciable (7,78% - 10,91%) separa las poblaciones (departamento), dependiendo del estrato seleccionado como subpoblaciones para el análisis. Cuando los clones, municipios y altitud se consideraron como subpoblaciones, se obtuvo valores de  $\phi$  de 0,109, 0,078 y 0,099 entre las poblaciones, respectivamente. Esto refleja una moderada diferenciación entre las poblaciones de los departamentos y generalmente es el resultado de un moderado flujo genético.

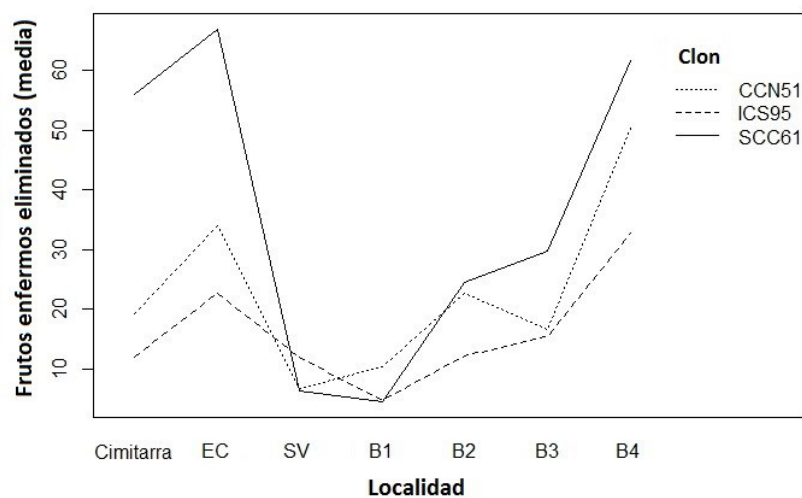


**Figura 1.** Análisis de la estructura genética de *M. royeri* con 13 SSR. Gráfico generado con las salidas de Structure y organizados por el valor K. Cada color representa un cluster definido en el software Structure v- 2.3.4. Las barras verticales representan los aislamientos, y la longitud de cada segmento coloreado de cada barra vertical representa la contribución en proporción de poblaciones ancestrales.

Ali et al. (2015) sugieren que la diferenciación de las poblaciones de *M. royeri* se dio por su dispersión desde el Valle Alto del Magdalena en el tiempo y por deriva genética localizada asociada a los aislamientos. Sin embargo, dado la alta diversidad de haplotipos encontrada en este estudio, se sugiere que adicional a una tasa de mutación y a un flujo genético, en estas poblaciones se puede dar una posible recombinación esporádica o parcial por parasexualidad. Pese a la carencia de fase sexual, este patógeno evoluciona rápidamente y se refleja en su virulencia, eso explica que los aislamientos altamente virulentos de *M. royeri* unido a las limitadas fuentes de resistencia provoquen la pérdida de resistencia o tolerancias de los materiales con el tiempo (Ali et al., 2015). Es así, que usar variantes del patógeno puede ser de utilidad para el “screening” de materiales por resistencia.

### **Epidemiología de *M. royeri***

Entre frutos de cacao enfermos, clon y localidad se identificó una interacción. Los valores más altos de frutos removidos enfermos se encontraron en el clon SCC61 en la mayoría de localidades estudiadas, excepto en San Vicente de Chucuri y en el B1 de la parcela experimental en el C.I. La Suiza en Rionegro. Igualmente, el clon ICS 95 obtuvo los menores valores de frutos enfermos removidos en la mayoría de localidades, excepto en San Vicente de Chucuri (Figura 2). Este primer análisis sugiere que se presenta poca incidencia de monilia en San Vicente y el B1 en Rionegro, así como las diferencia entre los clones y los niveles de enfermedad entre localidades. Esta interacción se evidencio con el análisis del GLM, identificando una interacción significativa entre frutos enfermos removidos y localidad ( $P < 2,2 e^{-16}$ ), frutos enfermos removidos y clon ( $P < 2,2 e^{-16}$ ) y entre frutos removidos y clon por localidad ( $P = 3,768 e^{-05}$ ). Los bajos niveles de la enfermedad se identificaron en San Vicente y B1. Los altos niveles de la enfermedad se identificaron en el B4. En lo que respecta con las variedades de cacao, el mayor número de frutos removidos se obtuvo con el SCC 61 y el número con el ICS 95.



**Figura 2.** Interacción de frutos enfermos removidos para los clones de cacao ICS 95, CCN 51 y SCC 61 en Cimitarra, El Carmen de Chucurí, San Vicente de Chucurí y los bloques B1, B2, B3 y B4 en Rionegro (Santander – Colombia).

Con respecto al análisis espacial, se evidencio una autocorrelación (Desviación estándar de la estadística de la I de Moran = 7,6644;  $P = 8,986 \times 10^{-15}$ ) al considerar los datos de los bloques en Rionegro. Cuando el análisis se realizó considerando cada bloque, no se encontró una autocorrelación espacial (Desviación estándar de la estadística de la I de Moran = 0,28195;  $P = 0,389$ ). Esto se debe a los bajos niveles de enfermedad que se presentaron en el B1. Entre las localidades analizadas, así como entre los bloques en una misma localidad, los niveles de monilia difieren para cada clon. Los bajos niveles de enfermedad se observaron en el B1, en donde se registró los más altos niveles de monilia en los clones CCN 51 e ICS 60. En B2 y B3 se observó niveles de enfermedad intermedia, con un comportamiento variable del clon CCN 51. Los altos niveles de la enfermedad se observaron en el B4, en los clones susceptibles SCC61 y ICS 60. Sin embargo, el comportamiento de los materiales de cacao varía de acuerdo con su localización en la parcela experimental, así como con la localidad (Jaimes et al., 2011).

En Colombia el ciclo de la monilia puede iniciar en cualquier momento. Sin embargo, los periodos críticos se asociaron con los periodos de mayor formación de frutos. Los niveles de resistencia de los clones variaron entre localidades, lo cual puede relacionarse más con una tolerancia dada por el ambiente y no por el genotipo. Además, la estructura de los forestales y de los cacaos afecta estos niveles de resistencia. Gidoin et al. (2013) encontraron que con una distribución regular de los sombríos se reduce la intensidad de la enfermedad. Se requiere zonificar los materiales de cacao por su comportamiento productivo y por resistencia a la monilia, así como la estructura de las especias asociadas. Adicionalmente, se debe comprender los mecanismos de resistencia en las variedades de cacao y como se ven afectados por los diferentes factores ambientales para definir la acción de genes aditivos o no aditivos y la interacción genotipo – ambiente.

## Conclusiones

La alta variabilidad genética y la naturaleza clonal de las poblaciones de *M. royeri* en los principales departamentos productores en Colombia sugieren una recombinación rara o parcial debida a la parasexualidad.

Las poblaciones de *M. royeri* en los principales departamentos productores de Colombia se agruparon en dos grupos genéticos asociados a su origen, observándose un alto flujo génico entre las poblaciones.

Las epidemias de monilia están influenciadas por las localidades, el material vegetal y su localización en el campo.

## Bibliografía citada

Ali, S.S., Shao, J., Strem, M.D., Phillips-Mora, W., Zhang, D., Meinhardt, L.W., and Bailey, B.A. 2015. Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora royeri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Frontiers in Microbiology*, 6:850.

- Bailey, B.A., Melnick, R.L., Strem, M.D., Crozier, J., Shao, J., Sicher, R., Phillips-Mora, W., Ali, S.S., Zhang, D., and Meinhardt, L. 2014. Differential gene expression by *Moniliophthora roreri* while overcoming cacao tolerance in the field. *Molecular Plant Pathology*, 15(7): 711–729.
- Díaz-Valderrama, J.R., and Aime, M.C. 2016. The cacao pathogen *Moniliophthora roreri* (Marasmiaceae) produces rhexolytic thallic conidia and their size is influenced by nuclear condition. *Mycoscience*, 57(3): 208-216.
- Gidoín, C., Avelino, J., Deheuvels, O., Cilas, C., Ngo Bieng, M.A. 2013. Shade tree spatial structure and pod production explain frosty pod rot intensity in cacao agroforest, Costa Rica. *Phytopathology*, 104, 275-281.
- Jaimes, Y., Aranzazu, F., Rodríguez, E., Martínez, N. 2011. Behavior of introduced clones of *Theobroma cacao* towards the infection *Monilophthora roreri* in three different regions of Colombia. *Agronomía Colombiana*, 29(2): 361-371.
- Jaimes, Y.Y., Gonzalez, C., Rojas, J., Cornejo, O.E., Mideros, M.F., Restrepo, S., Cilas, C., and Furtado, E.L. 2016. Geographic Differentiation and Population Genetic Structure of *Moniliophthora roreri* in the Principal Cocoa Production Areas in Colombia. *Plant Disease*, 100(8): 1548-1558.
- Leandro, M.E. 2011. Efectos de los factores macro y microclimáticas y las características productivas del cacao sobre la epidemiología de la moniliasis. Master Thesis in Ecological Agriculture, Escuela de posgrado, Centro Agronómico de Agricultura Tropical, Turrialba, Costa Rica. 97 p.
- Phillips-Mora, W., Aime, M.C., and Wilkinson, M.J. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56: 911-922.