

Ciclo de conferencias de divulgación científica: **Cacao conCiencia**

Segundo momento:

*"Mejoramiento genético convencional y de última generación"*

## **Estudios a nivel de genoma de las enfermedades del cacao**

Javier Correa Álvarez, PhD

Profesor del Departamento de Ciencias Biológicas

Escuela de Ciencias

[jcorre38@eafit.edu.co](mailto:jcorre38@eafit.edu.co)

UNIVERSIDAD  
**EAFIT**<sup>®</sup>

Un poco de trayectoria en fitopatología...

UdeA

- Biólogo, MSc en Biología, Interacción Banano – *C. fijiensis*

Unicamp

- Doctorado en Genética y Biología Molecular – LGE – Interacción Cacao – *M. pernicioso*, Cerato

EAFIT

- Grupo CIBIOP, Dep. Ciencias Biológicas. Inter. Cacao – *M. rozeri*



2006

2021

## Introducción

El crecimiento poblacional del planeta (80 millones por año) demandará cada vez cultivos con más altos rendimientos productivos.

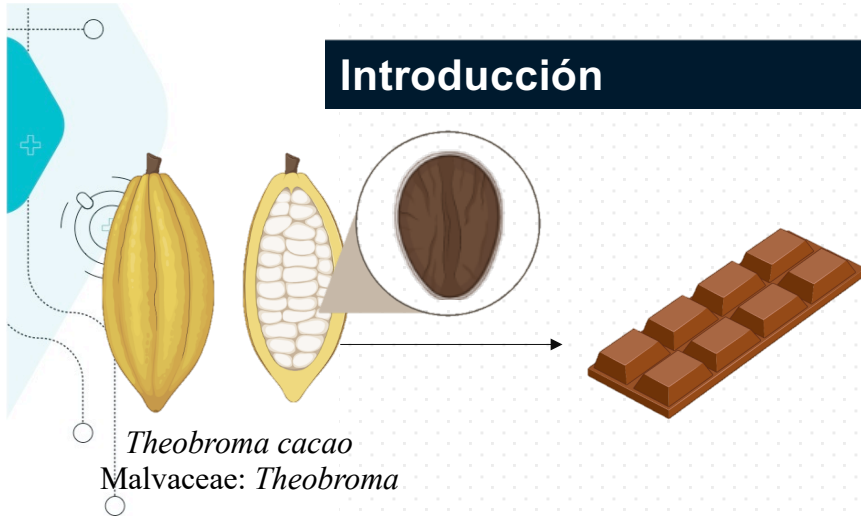
Problemas:

- Tierra limitada para un agricultura sostenible.
- Cada vez más áreas con el suelo deteriorado.
- **Perdida de la productividad debido a los patógenos**, incremento debido al cambio climático.
- Fuerte resiliencia a la aplicación de agroquímicos (pesticidas, fertilizantes, etc).



(Oerke *et al*, 2004; Kanchiswamy *et al*, 2015)

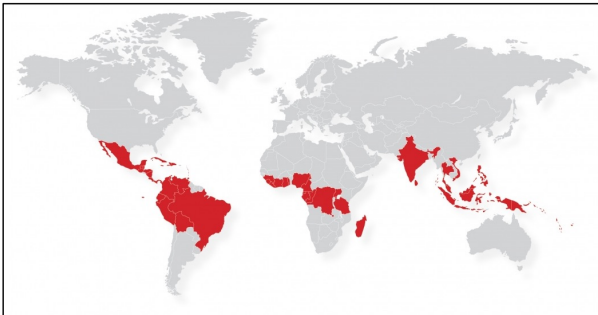
## Introducción



En Colombia:

52 mil toneladas anuales.

- ✓ El 75% satisface la demanda interna.



África, Asia y América Latina.



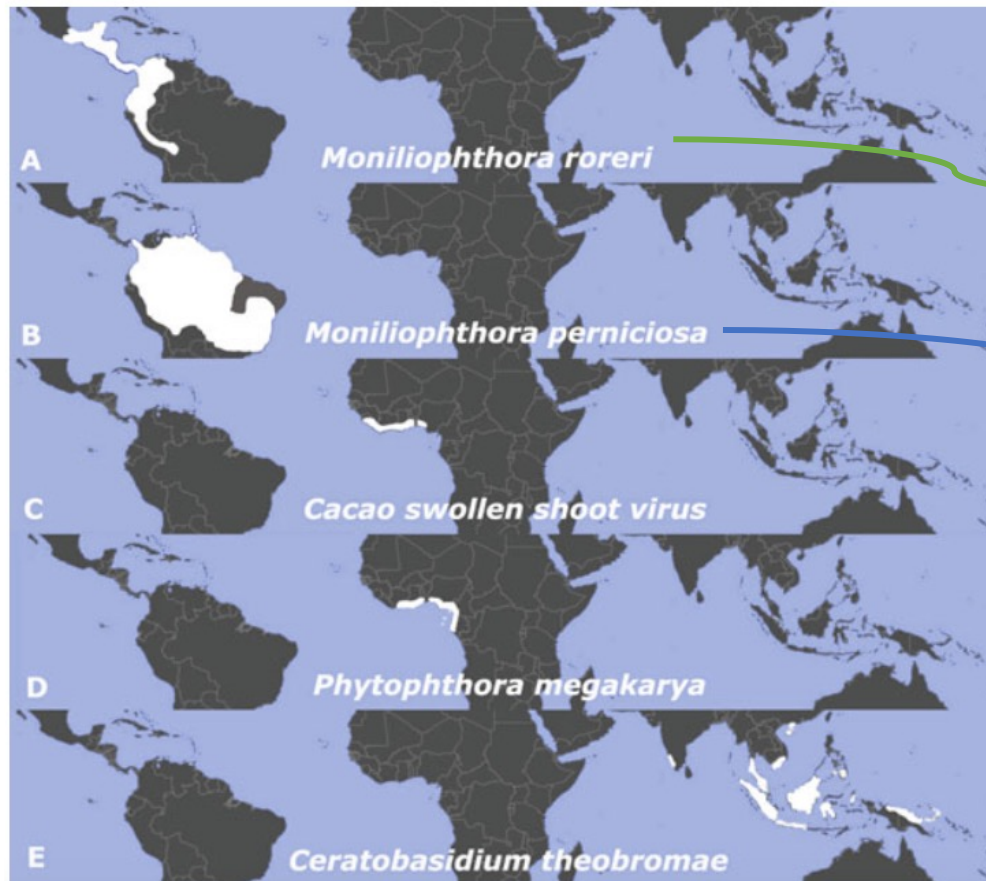
Cultivo de cacao:



- ✓ Temperatura: 18°C - 32°C
- ✓ Precipitación: 1.500 - 2.000 mm.
- ✓ HR : 70%-100%
- ✓ Presencia de sombra.

(Motamayor, 2002; Cuatrecasas, 1942; Kalvathev et al., 1998 ; Abbott. et al., 2018; Kongor et al., 2016; Leandro-Muñoz, 2011; Leandro-Muñoz, 2017)

R. Ploet

## Principales enfermedades del cacao a través del globo



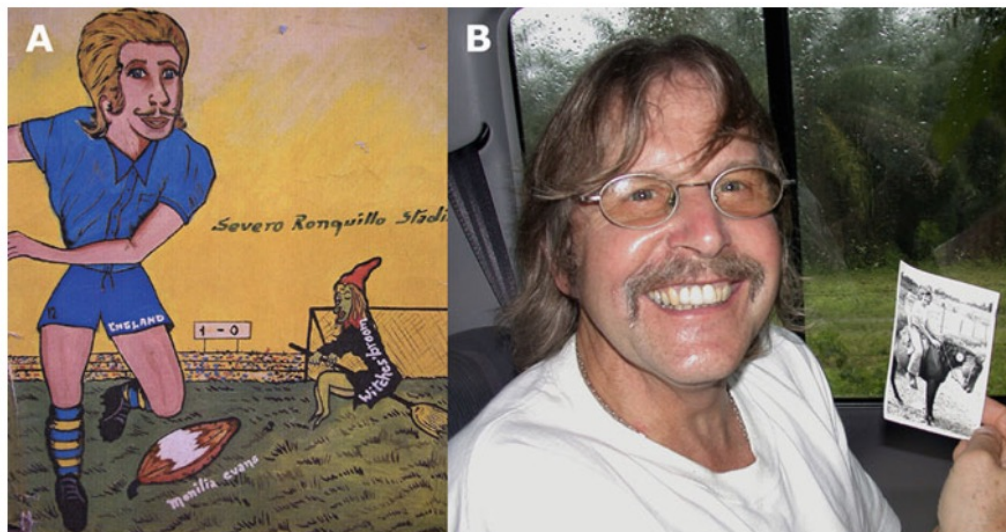
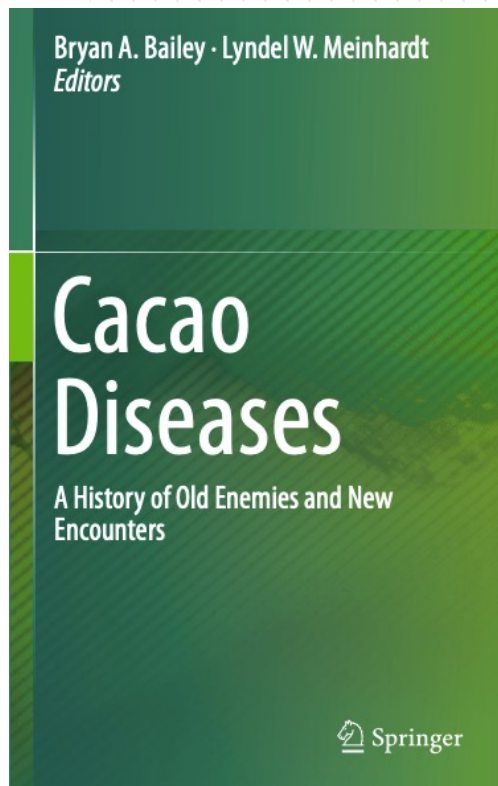
Fitopatógeno	Nombre Común	Órganos que afecta	Síntomas	Origen de la enfermedad	Distribución geográfica
 <i>Moniliophthora roreri</i>	Monilia, Moniliasis	Frutos	Varían con la edad del fruto y con la severidad del ataque del patógeno. En frutos jóvenes se observan protuberancias sobre la superficie. Maduración irregular o prematura del fruto. Aparición de lesiones irregulares de color chocolate o castaño oscuro, puntos aceitosos y áreas necrosadas	Colombia	Ecuador, Colombia, Venezuela, México, Perú, Costa Rica, Belice, Panamá, El Salvador, Honduras.
 <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Escoba de Bruja	Tejidos de crecimiento, hojas, ramas, cojines florales, yemas axilares y frutos	Sintomatología variada. Hinchazón en las partes afectadas, ramas y brotes vegetativos. La infección de los cojines florales se manifiesta con la formación de escobas. Frutos con deformaciones, manchas chocolate y áreas necróticas más oscuras que la ocasionada por la monilia.	Ríos Amazonas y Orinoco	Suramérica, Trinidad, Tobago, Granada.
<i>Ceratocystis</i> sp	Mal de machete o marchitez	Tronco y cuello de la raíz.	Marchitez y clorosis (amarillamiento) de las hojas. Copa entera del árbol seca.	Sudamérica	Ecuador, Colombia, Venezuela, Guayana, Perú, Costa Rica, México, Guatemala, República Dominicana, Trinidad, Jamaica, Haití, Filipinas

Elaborado de Jaimes & Aranzazu (2010) y Porras & Sánchez (1991).

## Harold Charles Evans: Un pionero en patología del cacao

### 2 The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview

35



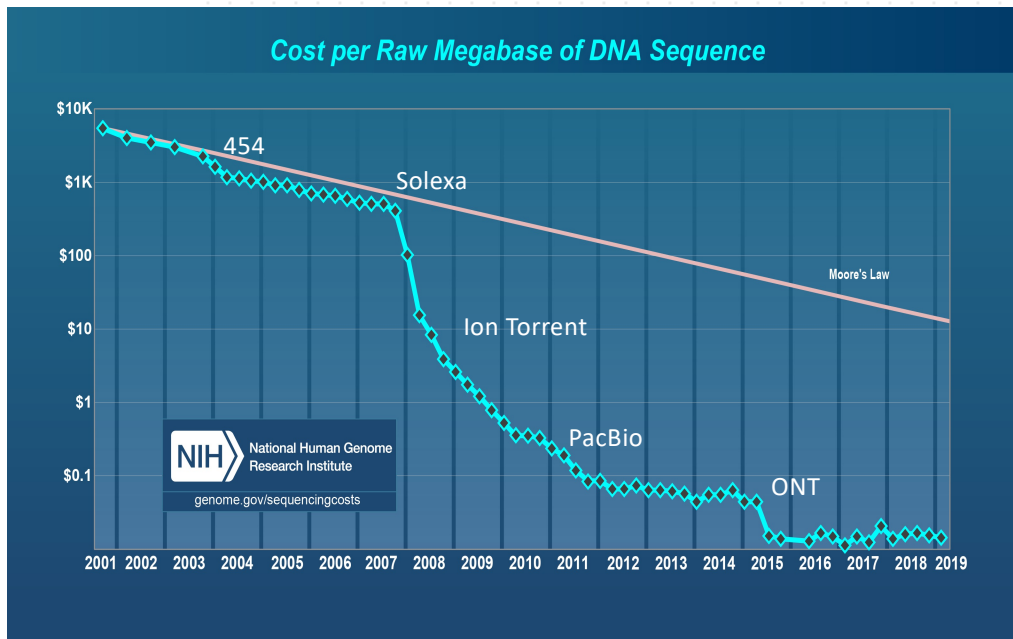
**Fig. 2.1** (a) Harry Evans as a footballer dealing with the two disease threats he confronted in Ecuador in the early 1970s, frosty pod (“Monilia Evans”) and witches’ broom (artist unknown). (b) Harry in 2004, showing a photo of himself in 1974 on the way to cacao research plots in Ecuador (Photo: R.C. Ploetz)

B.Sc. in Botany, University of London, 1965; M.Sc. in Plant Pathology, Exeter University, 1966; Ph.D. in Mycology, Keele University, 1969) and D.Sc. in Applied Mycology (University of London, 1999)

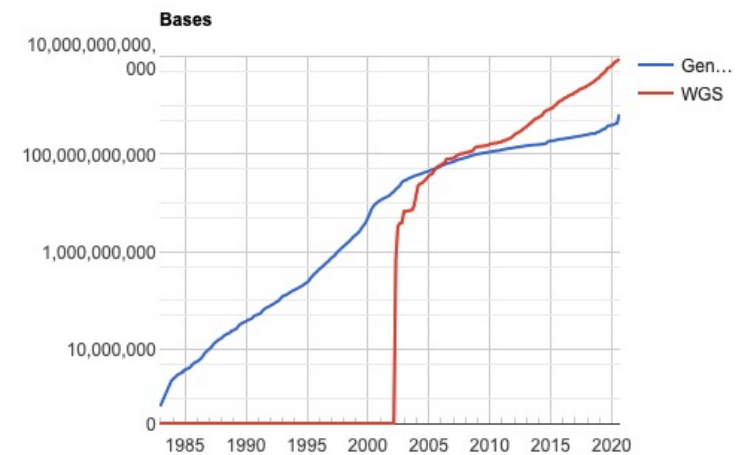
# Genomas de patógenos del cacao



El auge de la secuenciación masiva de genomas también ha repercutido en los patógenos de plantas



### GenBank and WGS Statistics





## La escoba de bruja, un patógeno ya desenmascarado



- En 1915 *Marasmius perniciosus*. (Stahel)
- 1942 *Crinipellis perniciosus*. (Singer)
- 2005 por Aime y Phillips-Mora: ***Moniliophthora perniciosus***



Fungj; Phylum: Basidiomycota; Subphylum: Agaromycotina; Clase: Agaricomycetes; Orden: Agaricales; Familia: Marasmiaceae (Meinhardt 2008)

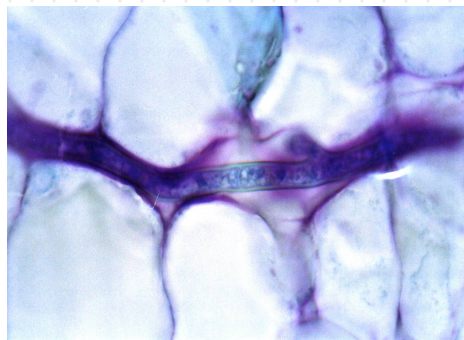


Prof. Gonçalo Pereira – IB-Unicamp

Foto: google

# Ciclo de vida de la escoba de bruja

Meristemas juveniles



Fase biotrófica

hemibiotrófico



Escoba Verde



Fase necrotrófica



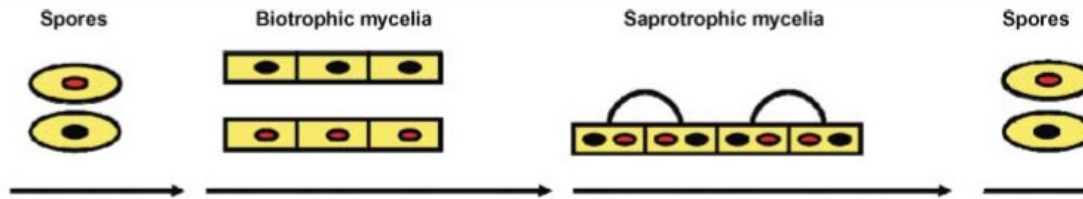
Escoba Seca

Pathogen profile

## ***Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe?**

LYNDEL W. MEINHARDT<sup>1,\*</sup>, JOHANA RINCONES<sup>2</sup>, BRYAN A. BAILEY<sup>1</sup>, M. CATHERINE AIME<sup>3</sup>, GARETH W. GRIFFITH<sup>4</sup>, DAPENG ZHANG<sup>1</sup> AND GONÇALO A. G. PEREIRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sustainable Perennial Crops Laboratory, USDA-ARS, 10300 Baltimore Ave., Bldg. 001, Beltsville MD 20705-2350, USA



3A Infection

3B Green broom

3C Necrosis

3D Dry broom

3E Spore formation





## Witches' broom project



Gene Projects
Partners
Cacao
Monilophthora perniciosa
Support

- Home
- Submission
- Gene Projects
- Gene Projects ESTs
- Annotation
- Microsatellites
- Download
- Blast
- Search
- EMBOSS
- Progress
- Reports
- Control
- Protocols
- Patent Suggestions
- Services
- suggestions
- Bugs report
- Software
- Support



*Monilophthora perniciosa* - Hemibiotrophic pathogenic fungus, causal agent of cacao Witches' broom disease (WBD). Contains 8-10 chromosomes and a total genome size of 30-40 Mb. Photograph of a basidiocarp.

### Witches' broom

*Theobroma cacao* (cacao tree) - Original from the Amazon basin. After WBD introduction into the cacao-producing region of Bahia, Brazil lost its position as one of the main exporters of cocoa beans and became a net importer of the product. Subproducts of cocoa beans are: chocolate, pulp, juice, jam, ice cream, cosmetics, etc.

Witches' broom disease - Parasitic disease that caused a 60% drop in cacao production in Southern Bahia. Current WBD control strategies have proved ineffective.

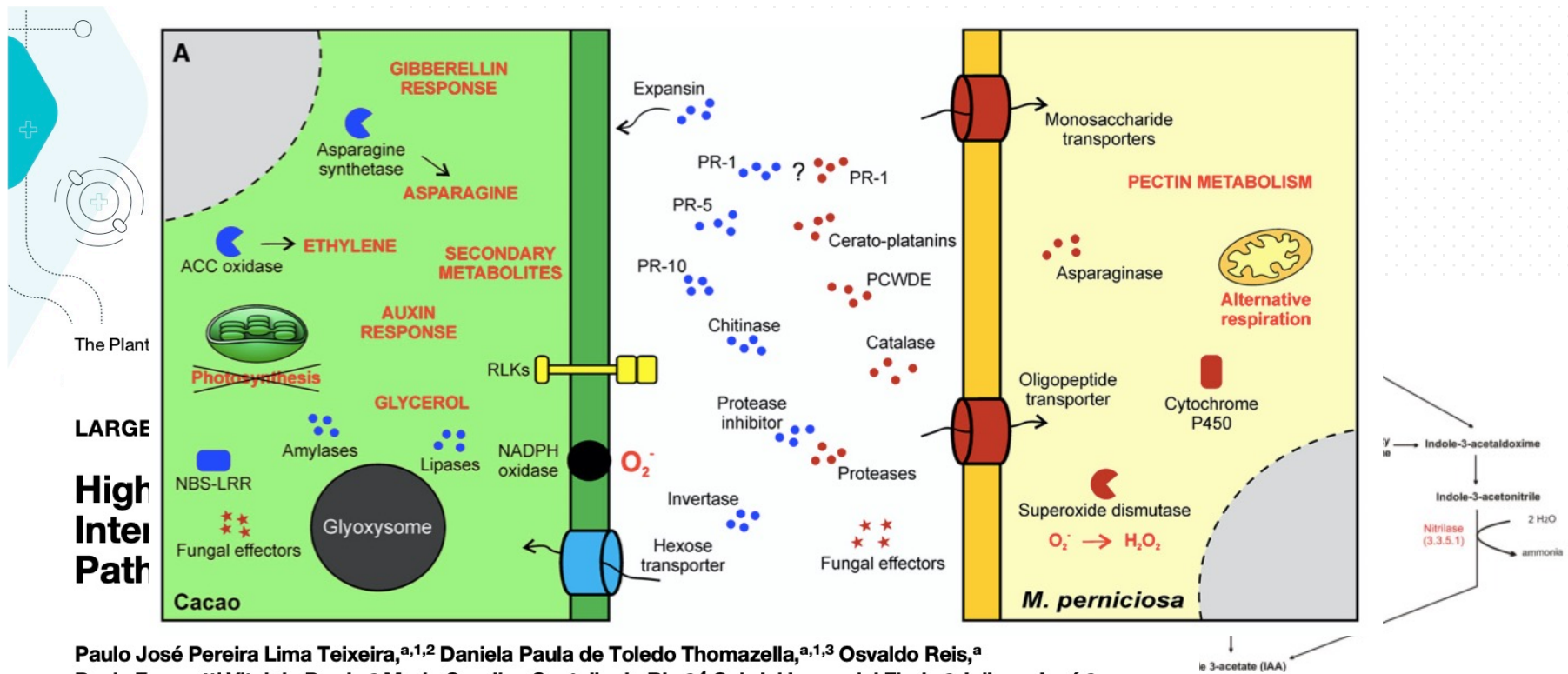












Paulo José Pereira Lima Teixeira,<sup>a,1,2</sup> Daniela Paula de Toledo Thomazella,<sup>a,1,3</sup> Osvaldo Reis,<sup>a</sup>  
 Paula Favoretti Vital do Prado,<sup>a</sup> Maria Carolina Scatolin do Rio,<sup>a,4</sup> Gabriel Lorencini Fiorin,<sup>a</sup> Juliana José,<sup>a</sup>  
 Gustavo Gilson Lacerda Costa,<sup>a</sup> Victor Augusti Negri,<sup>a</sup> Jorge Maurício Costa Mondego,<sup>b</sup> Piotr Mieczkowski,<sup>c</sup>  
 and Gonçalo Amarante Guimarães Pereira<sup>a,5</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP 13083-970, Brazil

<sup>b</sup>Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agronômico, Campinas SP 13001-970, Brazil

<sup>c</sup>Department of Genetics, School of Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina 27599

(IAA) biosynthesis pathways. *M. perniciosa* are annotated in red.



## The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development

Daniela P. T. Thomazella<sup>1\*</sup>, Paulo José P. L. Teixeira<sup>1\*</sup>, Halley C. Oliveira<sup>2</sup>, Elzira E. Saviani<sup>2</sup>, Johana Rincones<sup>1</sup>, Isabella M. Toni<sup>1</sup>, Osvaldo Reis<sup>1</sup>, Odalys Garcia<sup>1</sup>, Lyndel W. Meinhardt<sup>3</sup>, Ione Salgado<sup>2</sup> and Gonçalo A. G. Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil; <sup>2</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil; <sup>3</sup>Sustainable Perennial Crops Laboratory, USDA-ARS, 10300 Baltimore Ave., Bldg. 001, Beltsville, MD 20705-2350, USA

Author for correspondence:  
Gonçalo A. G. Pereira  
Tel: +55 19 35216237  
Email: goncalo@unicamp.br

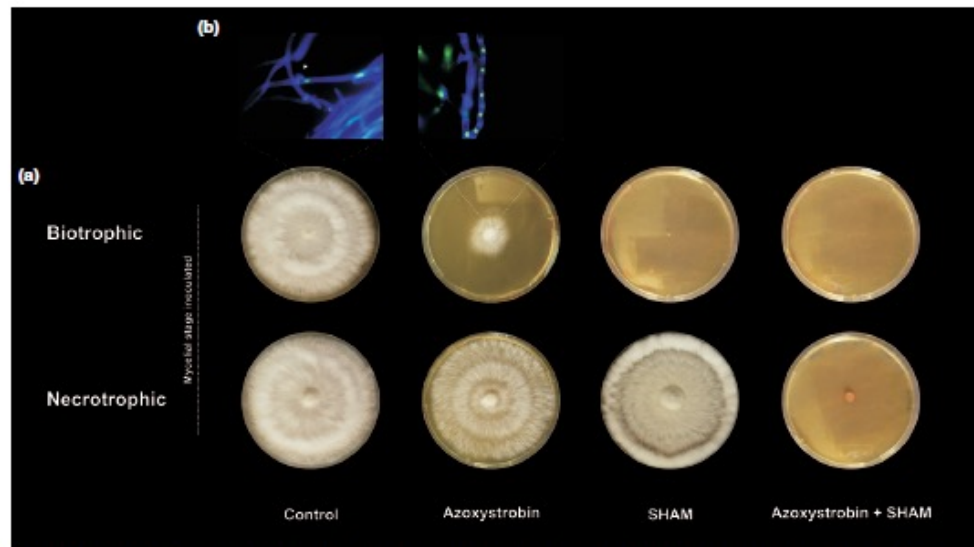
Received: 10 November 2011  
Accepted: 11 February 2012

### Summary

- The tropical pathogen *Moniliophthora perniciosa* causes witches' broom disease in cacao. As a hemibiotrophic fungus, it initially colonizes the living host tissues (biotrophic phase), and later grows over the dead plant (necrotrophic phase). Little is known about the mechanisms that promote these distinct fungal phases or mediate the transition between them.
- An alternative oxidase gene (*Mp-aox*) was identified in the *M. perniciosa* genome and its expression was analyzed throughout the fungal life cycle. In addition, the effects of inhibitors

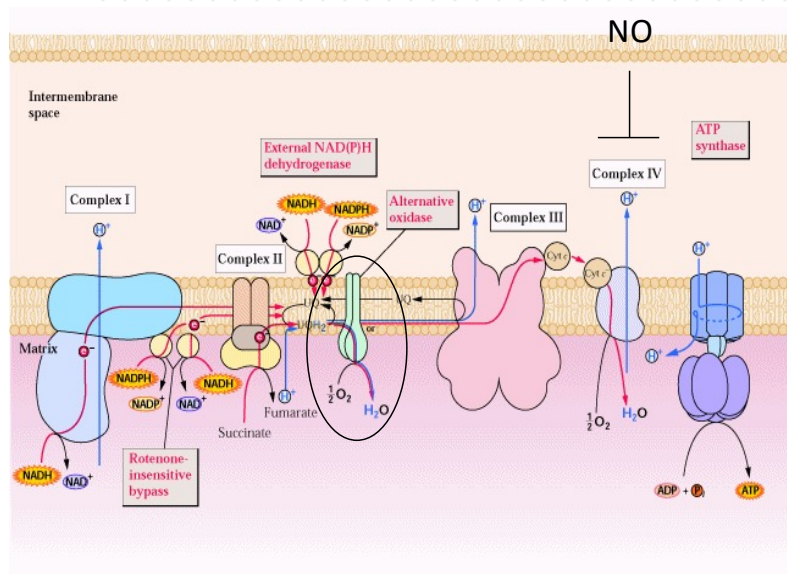


New  
Phytologist

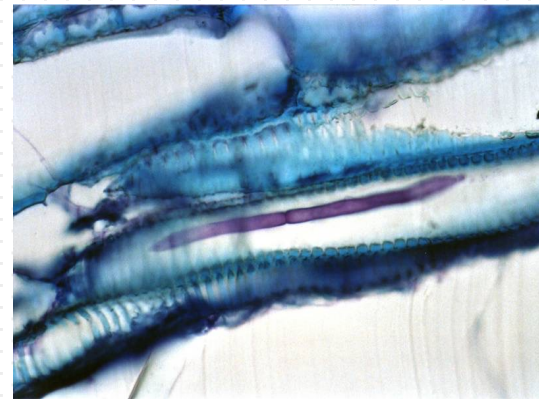


**Fig. 4** Growth of *Moniliophthora perniciosa* in the presence of the respiratory inhibitors azoxystrobin and salicylhydroxamic acid (SHAM). (a) Monokaryotic biotrophic-like phase (top panel) and dikaryotic necrotrophic phase (bottom panel) were inoculated in culture medium containing the cytochrome-dependent respiratory chain (CRC) inhibitor azoxystrobin (2.5  $\mu$ M), the alternative oxidase (AOX) inhibitor SHAM (5 mM) or both drugs. Control, no treatment. (b) Microscopy images show that, as expected, in the control, the biotrophic inoculum switched to the necrotrophic phase (the white arrow shows the presence of clamp connections, which are an exclusive feature of the necrotrophic hyphae). By contrast, in the presence of azoxystrobin, the transition was prevented, and the fungus maintained the biotrophic morphology, as indicated by the presence of a single nucleus per cell. All photographs were taken at 21 d post-inoculation.

## La Oxidasa Alternativa



Bajo ATP → Crecimiento Lento



Protección antioxidante

Conclusión: Estrategia química puede incluir inhibición de AOX





Article | [Open Access](#) | Published: 25 May 2020

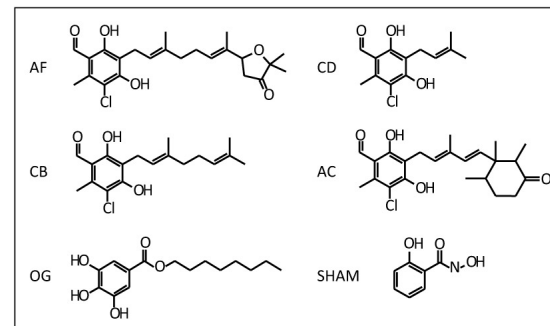
# Biochemical characterization and inhibition of the alternative oxidase enzyme from the fungal phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*

Mario R. O. Barsottini, Alice Copsey, Luke Young, Renata A. G. Pereira  & Anthony L. Moore 

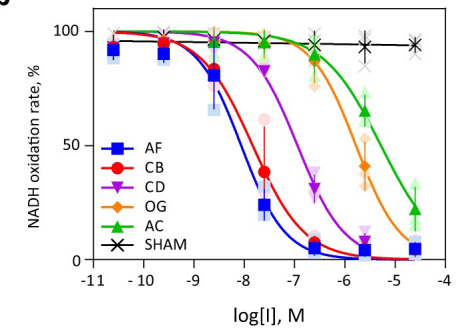
*Communications Biology* 3, Article number: 263 (2020)

1011 Accesses | 2 Citations | 3 Altmetric | [Metrics](#)

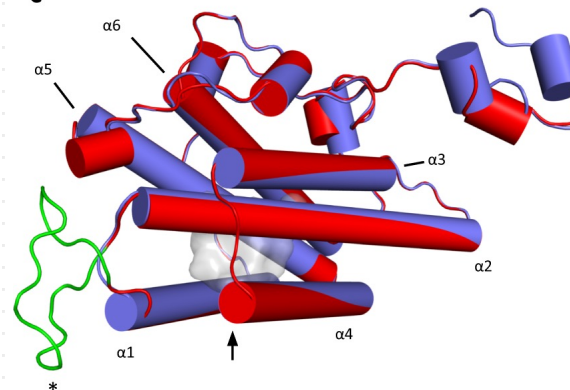
**a**



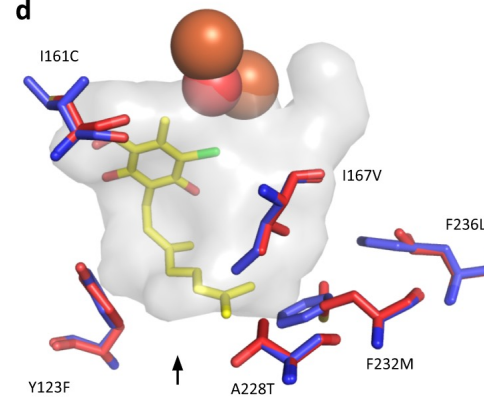
**b**



**c**



**d**



# Mal del machete; un patógeno con alta adaptabilidad

*Ceratocystis cacaofunesta* – Genómica

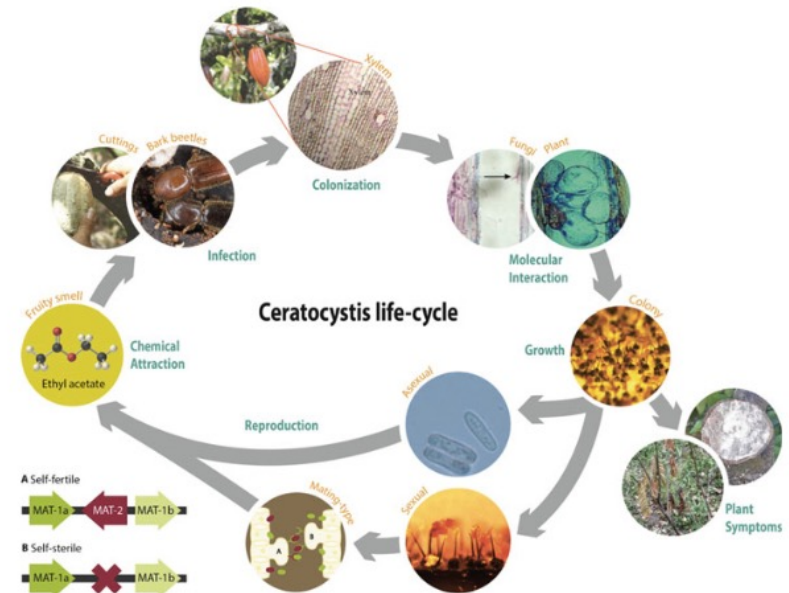


12 Ceratocystis Wilt Pathogens: History and Biology—Highlighting...

395



**Fig. 12.3** Symptomatology of *Ceratocystis* wilt of cacao and morphological features of the causal agent *C. cacaofunesta*. (a) A dying cacao tree showing the typical symptoms: wilt and necrotic



**Fig. 12.4** *Ceratocystis* life cycle represented by *C. cacaofunesta* cycle on cacao hosts. Each stage is discussed in detail in the text

**Ceratocystis wilt pathogens - History and Biology: highlighting *C. cacaofunesta*, the causal agent of wilt disease of cacao**, 2015, Cacao Diseases, ISBN: 978-3-319-24787-8, Vol. , págs:111 - 130, Ed. Springer Publishing Company, Inc.

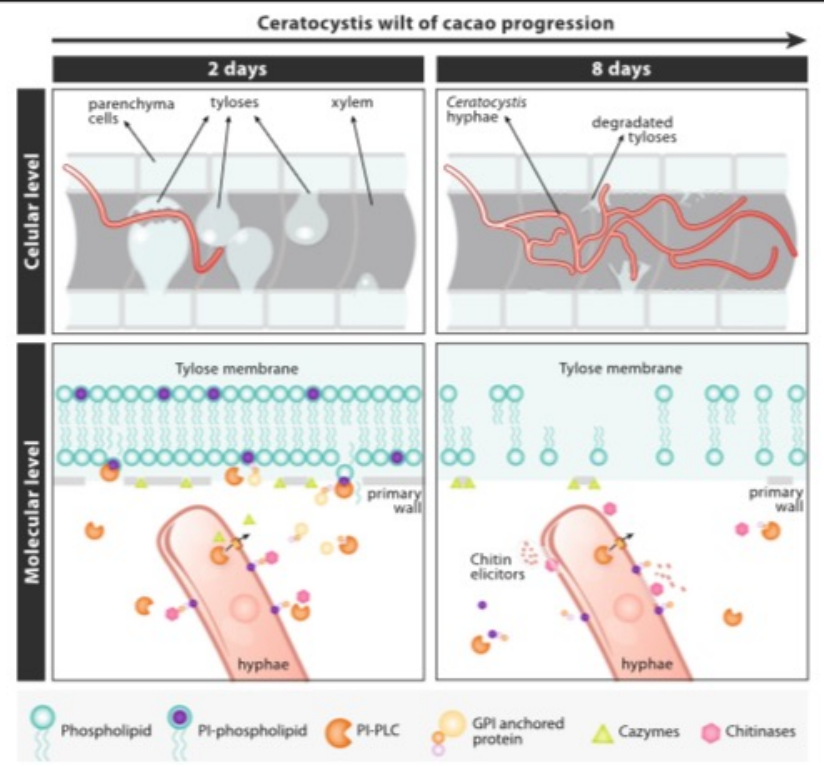
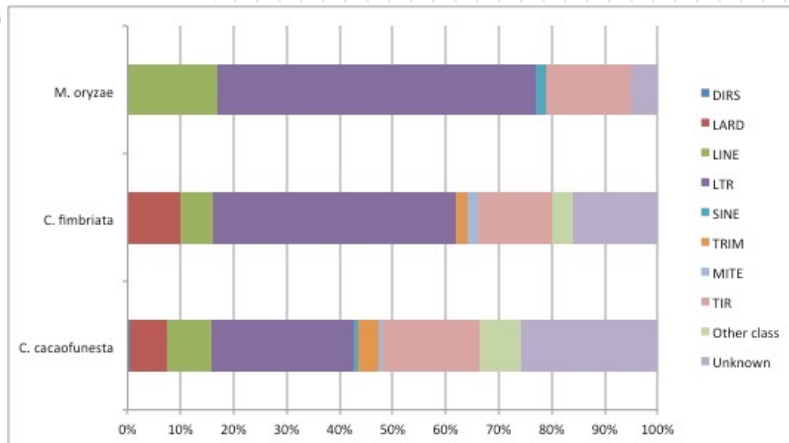
RESEARCH ARTICLE

Open Access

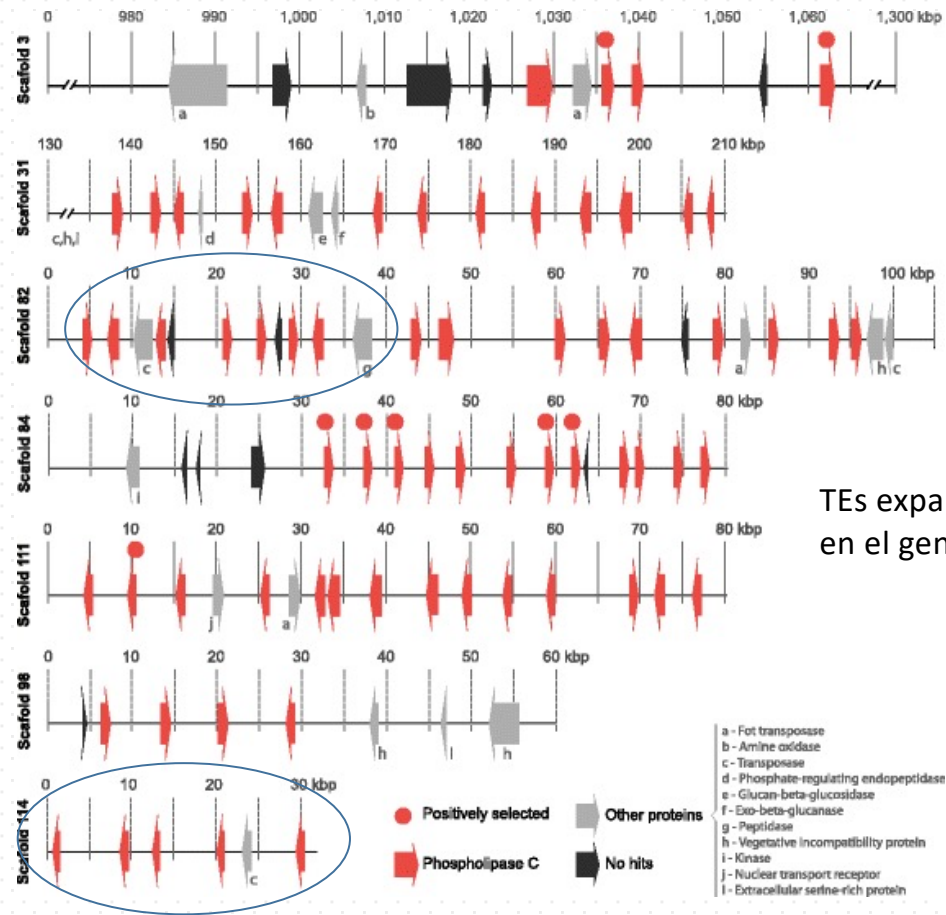


# *Ceratocystis cacaofunesta* genome analysis reveals a large expansion of extracellular phosphatidylinositol-specific phospholipase-C genes (PI-PLC)

Eddy Patricia Lopez Molano<sup>1†</sup>, Odalys García Cabrera<sup>1†</sup>, Juliana Jose<sup>1</sup>, Leandro Costa do Nascimento<sup>2</sup>, Marcelo Falsarella Carazzolle<sup>1,2</sup>, Paulo José Pereira Lima Teixeira<sup>1,7</sup>, Javier Correa Alvarez<sup>3</sup>, Ricardo Augusto Tiburcio<sup>3</sup>, Paulo Massanari Tokimatu Filho<sup>3</sup>, Gustavo Machado Alvares de Lima<sup>4</sup>, Rafael Victório Carvalho Guido<sup>4</sup>, Thamy Livia Ribeiro Corrêa<sup>1</sup>, Adriana Franco Paes Leme<sup>5</sup>, Piotr Mieczkowski<sup>6</sup> and Gonçalo Amarante Guimarães Pereira<sup>1†</sup>





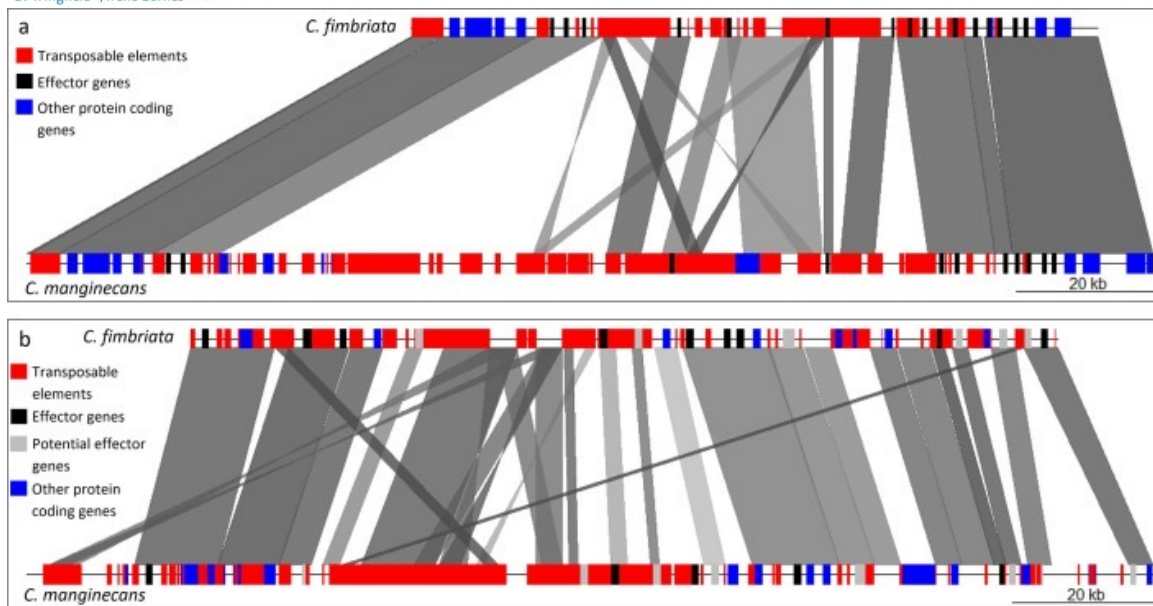


TEs expanding genes de patogenicidad en el genoma de *C. cacaofunesta*



## Genome comparisons suggest an association between *Ceratocystis* host adaptations and effector clusters in unique transposable element families

Arista Fourie<sup>a</sup>, Ronnie de Jonge<sup>b</sup>, Magriet A. van der Nest<sup>a, c</sup>, Tuan A. Duong<sup>a</sup>, Michael J. Wingfield<sup>a</sup>, Brenda D. Wingfield<sup>a</sup>, Irene Barnes<sup>a</sup> 



## La Monilia: un viejo enemigo del cacao

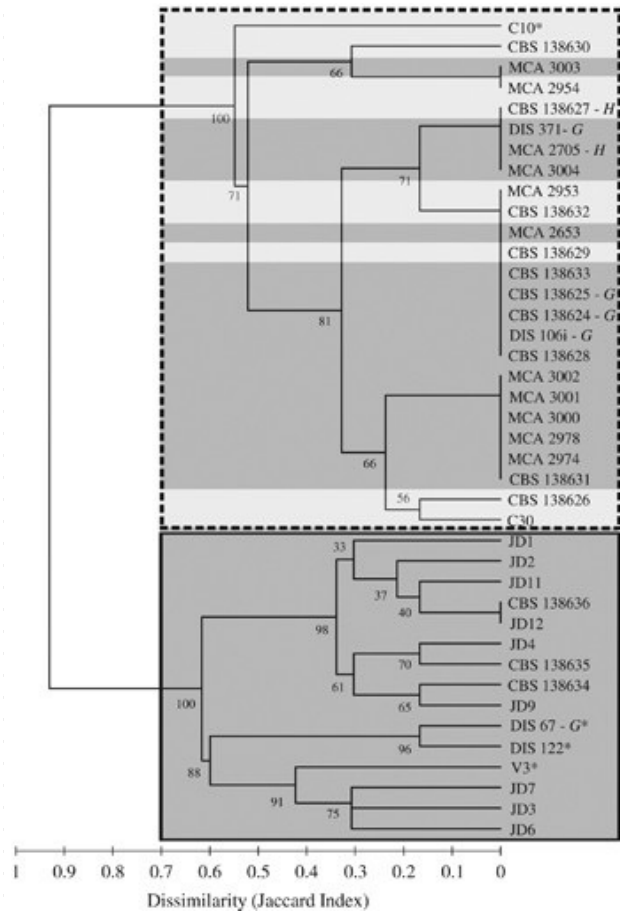


*Moniliophthora roreri* – Moniliasis.



**Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia**  
Correa Alvarez, Javier et al. *Acta Agronómica*(2014),63(4):388

Foto 1. Reportes de la moliniasis en Colombia y zonas de mayor producción de cacao.  
Adaptado de: Corpoica, 2004; Espinal *et al.*, 2005; Fondo Nacional del Cacao, 2011; Grisales y Afanador, 2007; Jaimes y Aranzazu, 2010; Phillips-Mora *et al.*, 2007; Proexport, 2012; Rodríguez, 2006; Suárez, 2006 Imagen realizada en DIVA-GIS 7.5.



*Heredity* 116, 491–501 (2016)

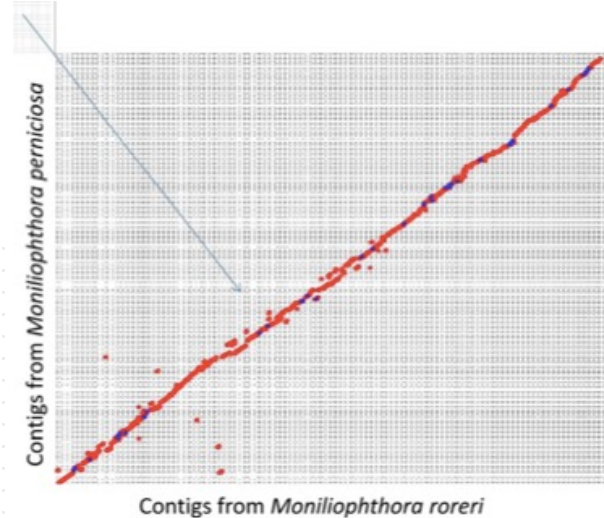


RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases

Lyndel W Meinhardt<sup>1\*</sup>, Gustavo Gilson Lacerda Costa<sup>2</sup>, Daniela PT Thomazella<sup>3</sup>, Paulo José PL Teixeira<sup>3</sup>, Marcelo Falsarella Carazzolle<sup>2</sup>, Stephan C Schuster<sup>4</sup>, John E Carlson<sup>5</sup>, Mark J Gultinan<sup>6</sup>, Piotr Mieczkowski<sup>7</sup>, Andrew Farmer<sup>8</sup>, Thiruvarangan Ramaraj<sup>8</sup>, Jayne Crozier<sup>9</sup>, Robert E Davis<sup>10</sup>, Jonathan Shao<sup>10</sup>, Rachel L Melnick<sup>1</sup>, Gonçalo AG Pereira<sup>3</sup> and Bryan A Bailey<sup>1</sup>



365 upreg 30 DPI (5X) - Nutrient acquisition from the intercellular space -Stealth  
204 hypothetical proteins

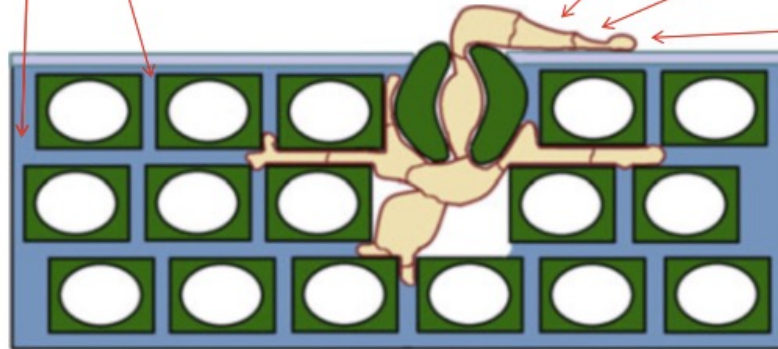
Hemicellulose modifying enzymes - acetylxyln esterase (1) , xylanaseA (2)

Pectin degradation - poly galacturonase(1),  
pectin methylesterase (1)

Hydrophobins (4), cerato-platanins (3)

PR1-like proteins (3)

Chitinases (4)

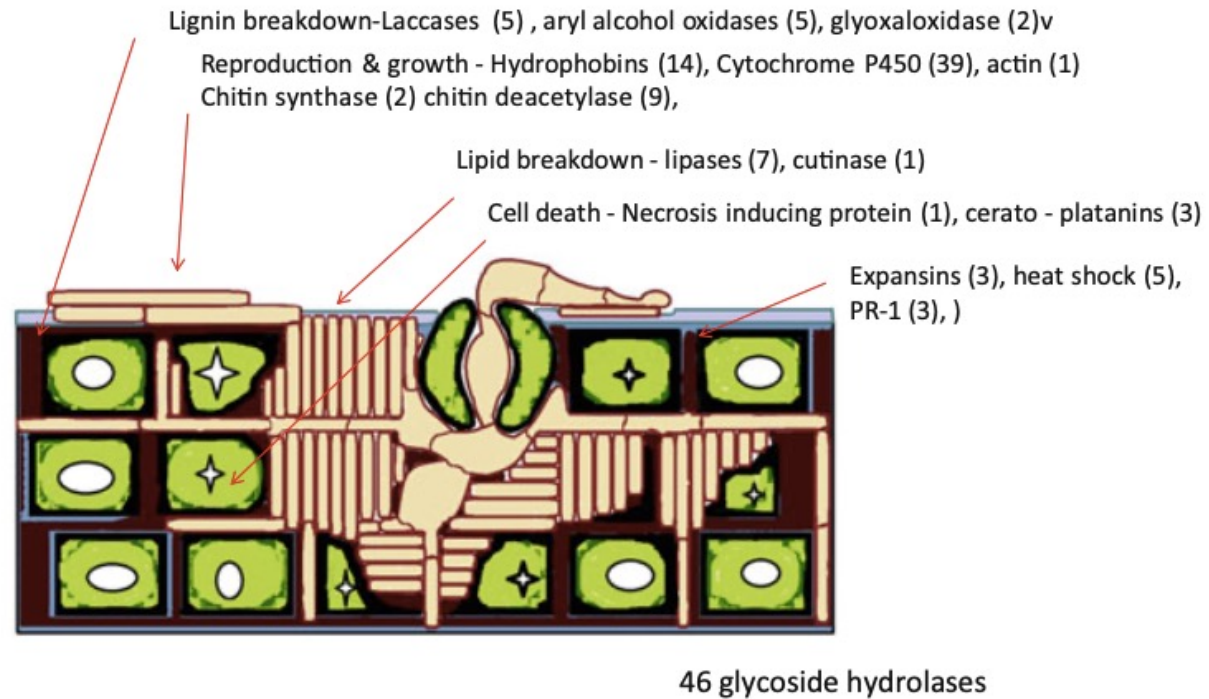


14 glycoside hydrolases

**Fig. 4.3** Genes upregulated during the biotrophic phase of *Moniliophthora roreri*



1480 up-reg at 60 DPI (5X) - Pathogen growth and plant cell death  
724 hypothetical proteins



**Fig. 4.4** Genes upregulated during the necrotrophic phase *Moniliophthora roreri*



## Conclusiones



- Las enfermedades del cacao, especialmente aquellas causadas por hongos fitopatógenos, presentan hoy en día alta relevancia por su incidencia en cultivos y adaptabilidad a las condiciones ambientales, además de incidir cada vez más en clones de cacao comúnmente cultivados en países latinoamericanos.
- Entender la genética de los patógenos de plantas desde la genómica, proporciona alta resolución y entendimiento de los procesos biológicos esenciales que conlleva a patogenicidad, este conocimiento podría derivar en nuevas soluciones biotecnológicas (nuevas variedades resistentes, estrategias de control química e integradas, modelos epidemiológico robustos, entre otras).
- Las herramientas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos permiten a un bajo costo y con alta precisión, realizar análisis a larga escala de poblaciones de patógenos y entender la biología de la interacción planta – patógeno.



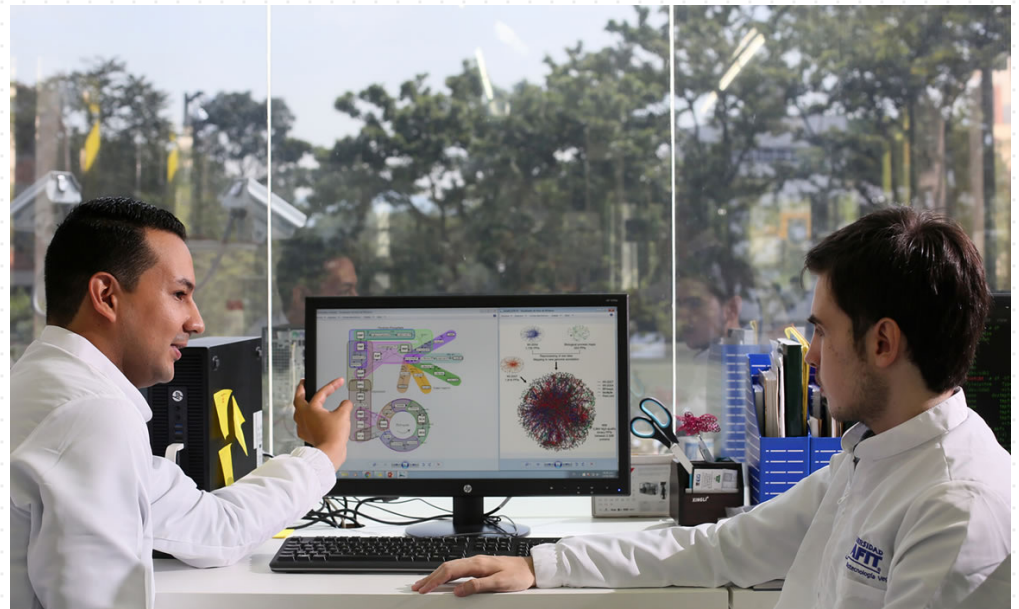
Muchas gracias



¿Preguntas?

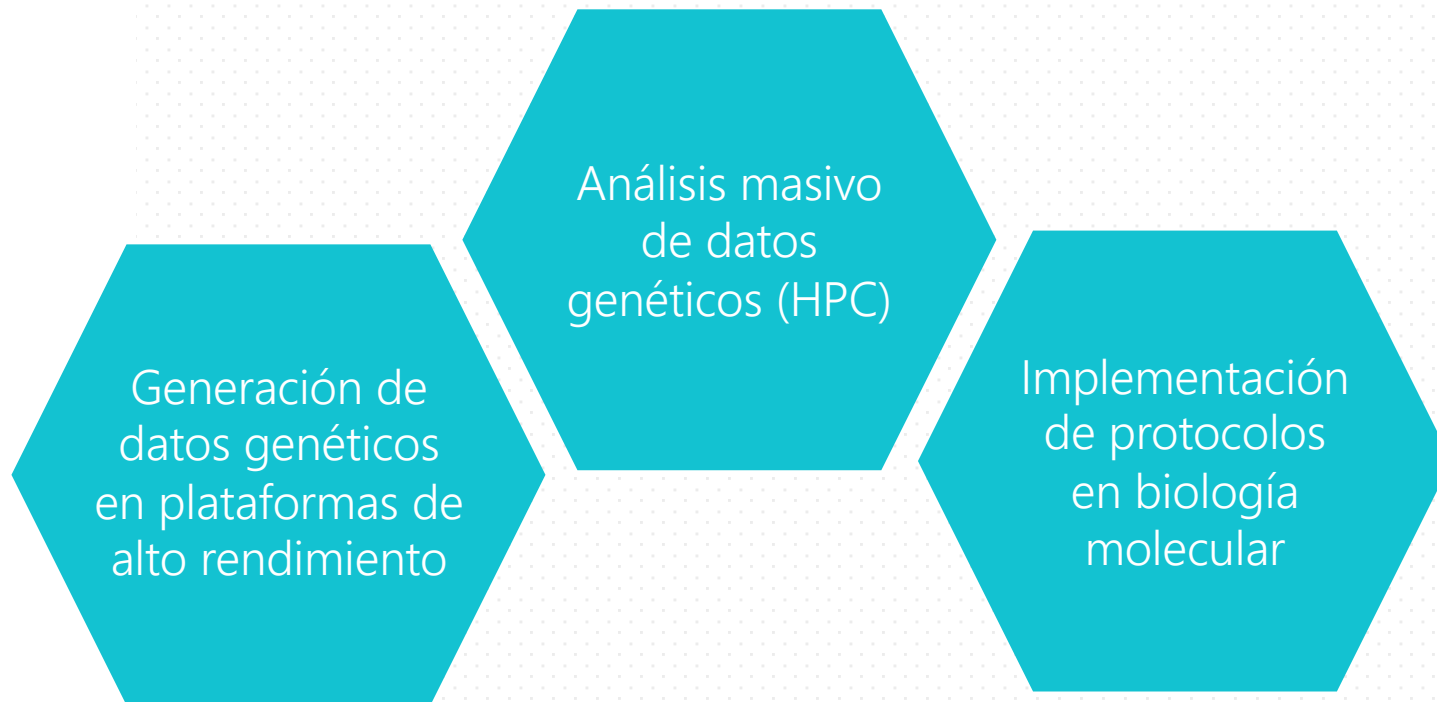
# Spin-off del departamento de Ciencias Biológicas

Axomics; servicios de biología computacional llevan a cabo **investigaciones** destinadas a ayudar a mejorar los cultivos tropicales, estudiar los procesos moleculares básicos en **microorganismos y plantas** y sus interacciones con el medio ambiente, así como caracterizar la **biodiversidad** de los **microbios**





# Biología Computacional Líneas Tecnológicas



# Servicios

Estudios y asesoría en genómica, metagenómica, transcriptómica y procedimientos con macromoléculas biológicas (DNA – RNA – Proteínas)

Ensayos de seguridad, autenticidad y calidad Alimentaria

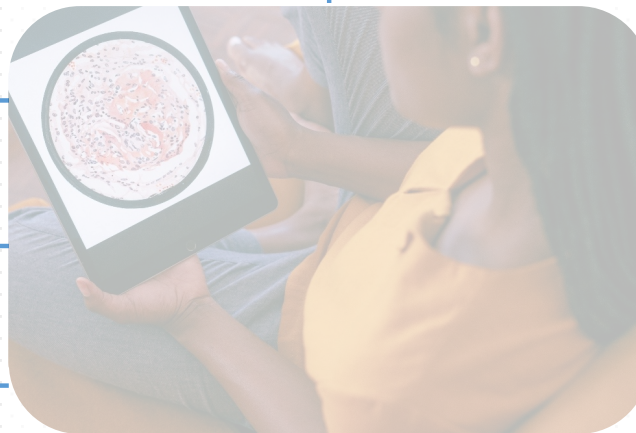
Tipificación del genoma de especies

Extracción de ADN

Procesamiento de Alto Rendimiento de Información – HTS

Análisis Bioinformático

Análisis del Microbioma





# Aplicaciones



## Sector Agrícola

- Identificación de enfermedades que limitan cultivos de importancia
- Estrategias para controlar esta enfermedad a base de modelos implementados.



## Sector Salud

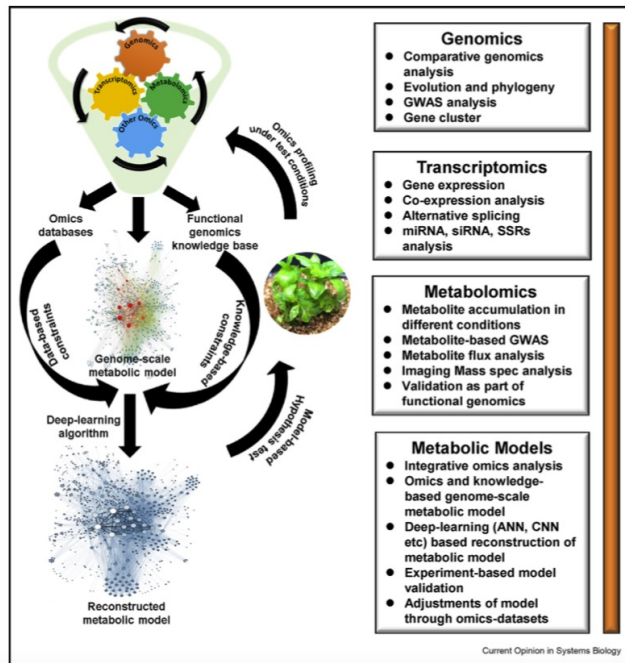
- Medicina personalizada.
- Simulación de posibles inhibidores de proteínas patógenas para bloquear enfermedades



## Sector Alimentos

- Caracterización de alimentos
- Caracterización genética de animales para el consumo humano.
- Estudio de microorganismos

# Tecnología: Biología Integrativa



Visualización/Modelos Predictivos

HTS  
→



↓  
Ethernet

HPC  
↔

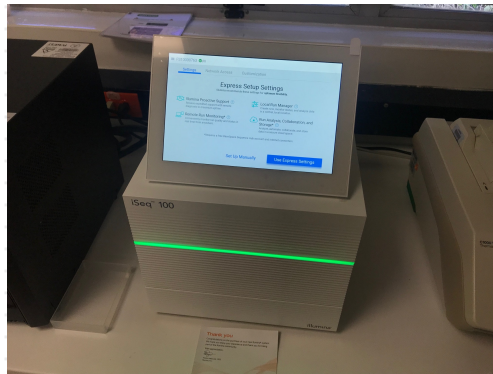


# Tecnología: Illumina

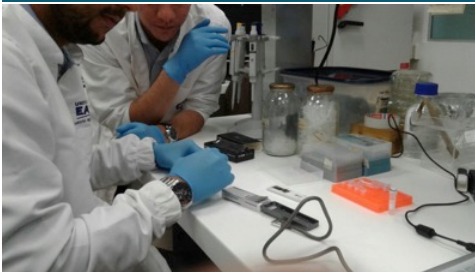
## Sistema Compacto Illumina iSeq100

- 1,2 Gb de datos por experimento en 17,5 horas
- Alta resolución y la sensibilidad analítica
- Detección de variantes y transcripciones infrecuentes

Innovación más reciente de Illumina con secuenciación de última generación (NGC).



# Tecnología: MinION



Secuenciamiento 1D-DNA en tiempo real

72 h. corrida - 10 Gb de información

Tamaño de reads de 2 – 80 Kb

Mas de 50 mil reads generados

Secuencia 2 bacterias, coberturas de 6X

<https://nanoporetech.com>



# AXOMICS

*"Soluciones bioinformáticas para las ciencias de la vida"*

Javier Correa Alvarez, PhD.  
Assistant professor  
Department of Biological Sciences  
jcorre38@eafit.edu.co

Juliana Ortiz Marín  
Coordinadora Transferencia de Tecnología  
Innovación EAFIT  
jortizm1@eafit.edu.co

<https://www.eafit.edu.co/innovacion/transferecia/Paginas/biologia-computacional.aspx>