



Análisis filogenético de aislamientos patogénicos de la familia Botryosphaeriaceae en cacao (*Theobroma cacao* L.) en la zona de Los Ríos

Phylogenetic analysis of pathogenic isolates of the Botryosphaeriaceae family in cacao (*Theobroma cacao* L.) in the Los Ríos area

Wendy Jiménez¹, Andrés Ramírez², Jonathan López^{1,2}, Andry Alvarez³

¹Instituto Superior Tecnológico Ciudad de Valencia, Quevedo, Los Ríos, Ecuador, wendyjimenez@itscv.edu.ec. ²Universidad Técnica de Cotopaxi-(UTC), La Maná, Cotopaxi, Ecuador, andrefer67@hotmail.com, jonth.lopz@gmail.com. ³Egresada de la Universidad de Córdoba, Córdoba, España, andryalvarezaspiaz@gmail.com.

Correspondencia para autor: wendyjimenez@itscv.edu.ec.

Recibido: 6/09/2022. Aceptado: 30/11/2022
Publicado el 27 de diciembre de 2022

Resumen

Los problemas fitosanitarios causados por hongos vasculares que afectan a las plantaciones de cacao CCN-51, han tomado gran importancia en las últimas décadas, por los daños que le producen. Especies de la familia Botryosphaeriaceae están asociadas a canchros y secamiento de yemas, muerte descendente, pudrición de frutos y pudrición del cuello, síntomas que se han observado en diferentes zonas y que merman la producción de la planta. Con el objetivo de caracterizar e identificar a nivel molecular aislamientos patogénicos de este hongo, se muestrearon cinco árboles sintomáticos seleccionados de fincas localizadas los cantones: Buena Fe, Mocache, Quevedo, Quinsaloma y Valencia de la provincia de Los Ríos, obteniendo 15 aislamientos de los cuales se extrajo ADN y utilizaron secuencias de las regiones de ITS (Internal transcribed spacer) y EF1- α (Factor de elongación de α). Los tamaños de secuencia se verificaron mediante electroforesis y se establecieron las identidades putativas de 3 especies utilizando la herramienta de Basic local alignment (BLAST). Los árboles filogenéticos construidos mediante los algoritmos de máxima verosimilitud y vecinos cercanos, con los aislamientos en cinco cantones, confirmaron la presencia de *Lasiodiplodia theobromae* en Quevedo, *Diplodia seriata* en Quinsaloma y *Botryosphaeria dothidea* en Valencia, Mocache y Buena Fe, resaltando una politomía entre estos últimos.

Palabras claves: Cancro, cacao, Región ITS, EF1-a, filogenia

Abstract

Phytopathological problems caused by vascular fungi affecting CCN-51 cocoa plantations have become very important in recent decades, due to the damage they cause. Species of the Botryosphaeriaceae family are associated with cankers and drying of buds, downward death, fruit rot and neck rot, symptoms that have been observed in different areas and that reduce plant production. In order to characterize and identify pathogenic isolates of this fungus at the molecular level, five symptomatic trees were sampled from farms located in the cantons of: Buena Fe, Mocache, Quevedo, Quinsaloma and Valencia of the province of Los Ríos, obtaining 15 isolates from which DNA was extracted and sequences from the ITS (Internal transcribed spacer) and EF1- α (Elongation factor of α) regions were used. Sequence sizes were verified by electrophoresis and putative identities of 3 species were established using the Basic local alignment tool (BLAST). Phylogenetic trees constructed using maximum likelihood and nearest neighbor algorithms, with isolates in five cantons, confirmed the presence of *Lasiodiplodia theobromae* in Quevedo, *Diplodia seriata* in Quinsaloma and *Botryosphaeria dothidea* in Valencia, Mocache and Buena Fe, highlighting a polytomy among the latter.

Key words: Cancro, cacao, ITS Region, EF1-a, phylogene.

Introducción

Dentro de los cultivos de mayor importancia en Ecuador, se encuentra el cacao (*Theobroma cacao* L.), una fruta tropical mayormente producida en las provincias de Manabí, Sucumbios, Guayas y Los Ríos (Guerrero, 2015). La producción de cacao fino o de aroma es de 173000 t aproximadamente, los cuales provienen de 17 países de los que destaca el Ecuador con una producción del 61% (Pino, 2010), el cual además se posiciona como el primero en cuanto a calidad.

No obstante, en los últimos años, una de las limitantes que han puesto en riesgo su producción es la presencia de enfermedades originadas por hongos de la familia Botryosphaeriaceae, siendo el más representativo *Lasiodiplodia theobromae*, el cual provoca la muerte descendente de ramas y pudrición de frutos (Picos *et al.*, 2015), causando pérdidas severas después de la cosecha y aún más importantes durante el almacenamiento prolongado, reduciendo la calidad de los frutos y limitando su comercialización (Sandoval *et al.*, 2013).

En cacao se han reportado síntomas asociados a *Lasiodiplodia* en Filipinas en el año 2014 (Alvinda & Gallema, 2017). A pesar de existir investigaciones que indicarían la presencia de *Lasiodiplodia* en plantaciones de cacao desde 1890 en Ecuador (Crous *et al.*, 2006), no se han realizado estudios que permitan confirmar el agente causal a nivel molecular. En relación a aquello, se han determinado correlaciones filogenéticas de esta especie y género crípticas a través del análisis de ADN en fragmentos de las regiones espaciadoras intergénicas (ITS), la beta-tubulina BT2a y BT2b y el factor de elongación 1 alfa (EF-1 α), accediendo ubicaciones más precisas en concordancia a especímenes análogos o contiguamente relacionados, de la misma manera, Picos *et al.* (2015), reportan la especie *L. theobromae*, como la causante de canchales y la separan de *Dothidea Theobromae*, pese a su similar sintomatología.

En ese contexto, esta investigación tuvo como objeto analizar la diversidad genética de la familia Botryosphaeriaceae presente en cacao en la zona de Los Ríos mediante un árbol filogenético de las secuencias de ITS y EF1- α .

Materiales y métodos

Esta investigación contó con una fase en campo y otra en laboratorio. Considerando los sitios de origen de las muestras recolectadas, la fase de campo consistió en coleccionar material vegetal de la variedad CCN 51 en fincas de los cantones: Buena Fe, Mocache, Quevedo, Quinsaloma y Valencia de la provincia de Los Ríos. Se muestrearon tallos con síntomas de enfermedades fitopatológicas y en la fase de laboratorio se realizaron los aislamientos, identificación, extracción de ADN, secuenciación y análisis.

Recolección de muestras en campo

El muestreo se realizó en fincas cacaoteras previamente identificadas con plantas con síntomas. Usando el método por conglomerados con georreferenciación de las zonas muestreadas, se procedió a seleccionar por cada cantón de la provincia de Los Ríos, Ecuador (Figura 1), tres zonas, y por cada zona tres plantas de cacao con síntomas de muerte regresiva en el tallo, de los cuales se extrajo una porción en el sitio de intersección entre el desarrollo del hongo y la porción sana. Cada muestra obtenida fue debidamente etiquetada y conservada en refrigeración hasta su ingreso al laboratorio.

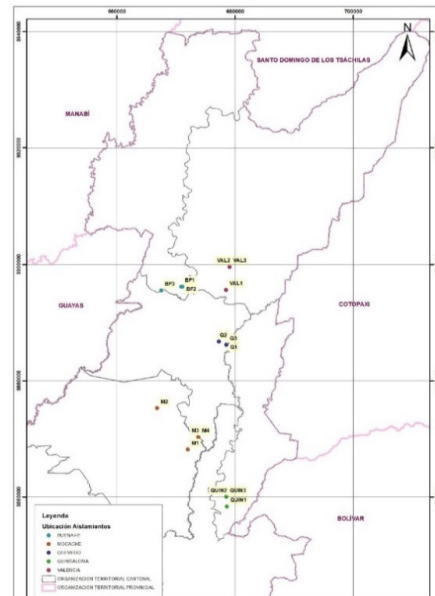


Figura 1. Zonas muestreadas en los cantones de la provincia de Los Ríos, Ecuador

Siembra de aislamientos en laboratorio

Cada muestra fue tratada mediante el método descrito por Wright y Harmon (2010) para obtener los aislamientos de Botryosphaeriaceae, a los cuales se les esterilizó la superficie exterior del tejido y se procedieron con la interfase de infección en medio de cultivo de la siguiente manera: Se realizaron cortes a partir de trozos de ramas de 10 x 10 mm obtenidos desde las zonas de avance de infección, los cuales se desinfectaron etanol al 70% durante 30 segundos, seguido por hipoclorito de sodio al 5% durante 3 minutos y varios lavados. Para secarlos se usó papel absorbente y después fueron dispuestos en placas de Petri conteniendo medio papa dextrosa agar PDA. Todas las placas se mantuvieron a una temperatura de 24°C por tres semanas (Suarez, 2016). Los hongos con la morfología y características de los conidios consistentes con Botryosphaeriaceae (Mehl *et al.*, 2017) fueron aislados a partir de una punta de hifa en cajas Petri con medio papa dextrosa agar PDA.

Identificación morfológica

Con la finalidad de comprobar que los aislamientos correspondan a la familia Botryosphaeriaceae, se procedió a la identificación morfológica en su estado asexual, considerando que una definición completa de la familia en la que consideraban que las ascosporas eran hialinas y aseptadas, y que podrían pigmentarse y tabicarse con la edad. Es más, una circunscripción basada únicamente en el estado sexual no es adecuada especialmente porque algunas especies se conocen sólo por su estado asexual, mientras que en otros el estado sexual es extremadamente infrecuente. Dado estas condiciones se proporciona una circunscripción modificada de la familia, dicha información fue corroborada por Slippers y Wingfield (2007) citado por Phillips *et al.* (2013), quienes se basaron en la morfología asexual, dado que la sexual no se conoce para algunos géneros, es muy poco común para otros y no se ha inducido en cultivo. Además, las conidias producidas fueron examinadas en microscopio óptico y se utilizaron las claves de Barnett y Hunter (2010) y Walker (1980), para la identificación a nivel de género.

Caracterización molecular

Extracción de ADN

Los aislamientos fúngicos fueron caracterizados molecularmente de acuerdo con los pasos de la Figura 2. A las quince cepas seleccionadas se les extrajo el ADN utilizando un kit de extracción DNA easy Plant mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Usando los buffers presentes en el kit, en el siguiente orden: 1. Buffer de lisis junto con el micelio del hongo. 2. Buffer AW1 y AW2 que permitieron lavar y filtrar por medio de la membrana de sílice el ADN puro sin la presencia de proteínas u otros elementos. 3. Buffer AE, para asegurar la obtención del ADN puro.

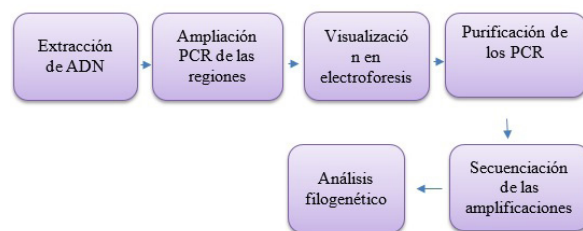


Figura 2. Diagrama sobre la metodología empleada para la caracterización molecular de aislamientos patogénicos de la familia botryosphaeriaceae en cacao (*Theobroma cacao L.*) en la zona de Los Ríos

La concentración y calidad de ADN se verificó visualizándolo en un gel de agarosa 2% luego de la electroforesis. El ADN ribosomal con las secuencias de los espaciadores transcritos internos (ITS) y el factor de elongación 1-alpha se amplificaron usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la combinación de los

iniciadores universales ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) y EF1-728F y EF1-986R (Carbone & Kohn, 2014) como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de las secuencias de los cebadores para los genes ITS y EF-a

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia de publicación
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
EF-a	EF1-728F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	White <i>et al.</i> (1990)
	EF1-986R	TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC	

Los pasos a seguir en la PCR fueron los siguientes:

1. Por 30 segundos, se realizó una desnaturalización inicial a 98°C.
2. Durante 10 segundos una desnaturalización de 98°C.
3. Durante 10 segundos una hibridación de los cebadores a temperatura de 52°C, y durante 23 segundos una temperatura de extensión de 72°C.

Los últimos tres pasos se repitieron 35 ciclos, para culminar con una temperatura de extensión final de 72°C durante 5 minutos (Guamán, 2018)

El producto de la PCR fue visualizado en un gel de agarosa siguiendo la metodología usada por Silva (2018) y purificado usando el kit (QUIAGEN) de purificación. Para concluir, el producto final fue enviado para su secuenciación a PROMEGA. Con las secuencias obtenidas se creó un árbol filogenético de las cepas aisladas en Ecuador.

Diseño de la investigación

Análisis estadístico

La estadística usada para el análisis de las secuencias genéticas fue inferencial, usando los programas informáticos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (versión 6.0), para el método de unión de vecinos (neighbor joining) y máxima verosimilitud (maximum-likelihood). Este último, emplea modelos probabilísticos para seleccionar el mejor árbol, es decir aquel que tenga la probabilidad más alta (verosimilitud) de reflejar el proceso real evolutivo (Rodríguez, 2013).

Análisis filogenético

Teniendo como base la metodología usada por Caicedo *et al.* (2017) se realizó el análisis filogenético, así, los resultados de las secuencias obtenidas de las muestras de ADN que se encontraban en forward y reverse, fueron unidas y alineadas con el programa MEGA-X, cada secuencia final fue comparada con la herramienta BLASTn de la plataforma del

NCBI (National Center for Biotechnology Information), para encontrar la secuencia con mayor similitud de una especie ya reportada en la base de datos.

Para los genes ITS y EF- α , en un bloc de notas se ingresaron las secuencias de la investigación junto con secuencias de referencia, basadas en el estudio de Phillips *et al.* (2013) mismas que fueron obtenidas del Gen Bank con programa BLAST. Se utilizó la función MUSCLE del Programa MEGA-X, para la alineación múltiple de las secuencias, y para su análisis comparativo se empleó el algoritmo ML y N, generando así árboles filogenéticos. Para la comparación con especies reportadas en la familia se utilizaron secuencias de referencia identificadas en investigaciones previas, descartando los taxones más antiguos y enfocándose en los géneros que pueden ser reconocidos filogenéticamente y las especies de Botryosphaeriaceae, que se conocen actualmente por cultivo. A continuación, En el Cuadro 2 se presentan los números de accesiones que se consideraron para la elaboración de los mapas.

Se evaluó la variación genética de las regiones espaciadoras intergénicas (ITS), y la variación genética del Factor de elongación 1 alfa (EF-1 α) de los diferentes aislamientos de la provincia

Resultados y discusión

Caracterización morfológica de los aislamientos.

Los quince aislamientos, correspondientes al 100%, desarrollaron un crecimiento circular de coloración blanquecina al inicio, que con el paso de los días se tornó oscura, en medio PDA, independiente de su especie y localidad, como lo muestra la Figura 3.

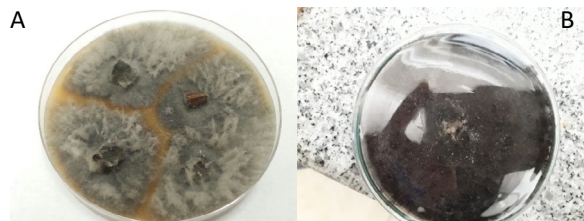


Figura 3. Vista frontal (A)- Crecimiento del patógeno a los 15 días, colonia cultivada en medio PDA a partir de una porción de tallo. Vista Posterior (B)-La coloración oscura que se observa a los 15 días está relacionada a los compuestos secretados por el hongo al medio PDA.

Los análisis morfológicos realizados a los aislamientos antes mencionados, corroboraron que son hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, de acuerdo a imágenes de referencia. Las figuras a continuación, muestran sus estructuras observadas a través del microscopio:

Descripción de conidias.

Las conidias de los aislamientos de todos los cantones, demostraron ser de pared estrecha, delgada, estriados y con un tabique, pudiendo ser ahusado o no en sus extremos. Los resultados morfológicos expuestos, concuerdan con los obtenidos por Phillips *et al.* (2013), quienes manifiestan que dentro de la familia Botryosphaeriaceae, se pueden encontrar conidios con extremos ahusados en uno o varios extremos, con paredes delgadas o gruesas. Pudiendo ingresar directamente mediante aberturas en las plantas sanas sean estas lenticelas u estomas (E. A & F. F, 1981) (KiWoo *et al.*, 1999). Estudios moleculares realizados por Santiago *et al.* (2015), al género Botryosphaeria, mostraron poca variabilidad genética entre sí, agrupando a todos como los causantes de secamiento de plantas de diversas especies.

Cuadro 2. Especies tipo de la familia Botryosphaeriaceae, con sus respectivos códigos de genbank (Phillips *et al.*, 2013)

ESPECIES	Número de acceso a Genbank	
	ITS	EF1a
<i>Barriopsis fusca</i>	EU673330	EU673296
<i>Botryobambusa fusicoccum</i>	JX646792	JX646857
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	AY236949	AY236898
<i>Cophinforma atrovirens</i>	JX646800	JX646865
<i>Diplodia mutila</i>	AY259093	AY573219
<i>Diplodia seriata</i>	AY259094	AY573220
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	AY573212	AY573235
<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	EU683656	EU683637
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	AY640255	AY640258

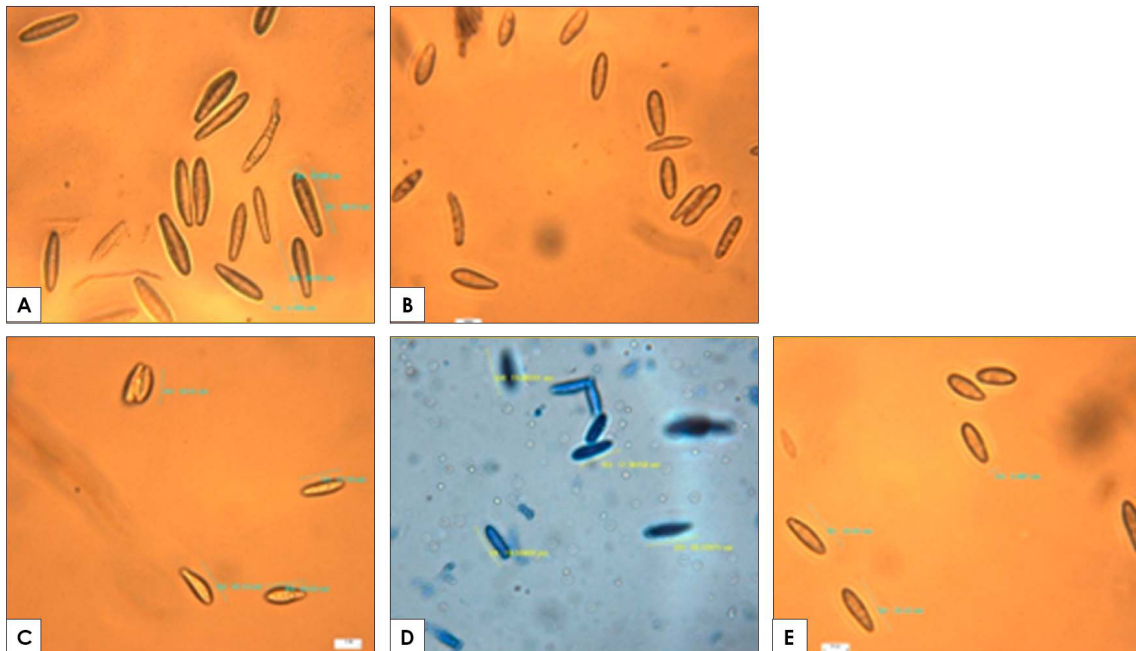


Figura 4. Conidiosporas de aislamientos de fincas del cantón Quevedo (A), Quinsaloma (B), Valencia (C), Buena Fe (D), Mocache (E).

Caracterización molecular

El tamaño de los amplicones en todos los aislamientos de Botryosphaeriaceae, para cada gen taxonómico, fue igual, siendo estos de 520 pb para ITS (figura 5) y 450 pb para EF1-a (Figura 6), el producto de la PCR fue observado en el gel de agarosa. La intensidad del color que muestra el gel, se debe a la cantidad de ADN existente, de aquí la colorimetría de la Figura 6. Es importante mencionar que el kit de extracción presenta una medida estándar de extracción, es decir que la cantidad analizada en cada muestra es la misma.

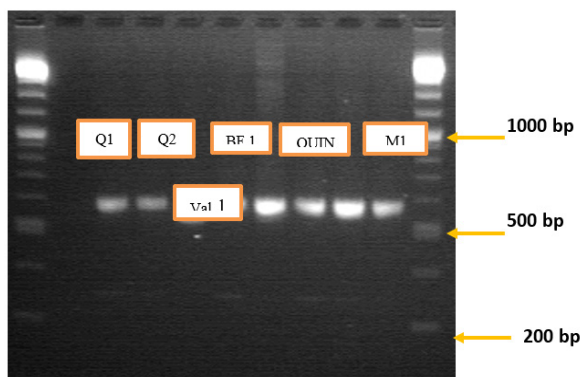


Figura 5. Visualización en gel de agarosa al 2% de productos de PCR con los marcadores ITS1 e ITS 4 para amplificar parte de las regiones ITS

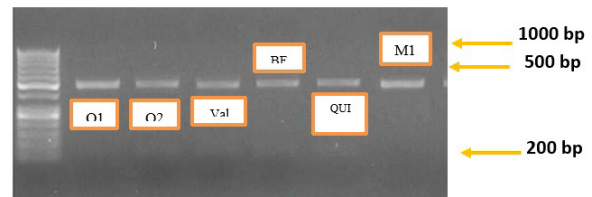


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del producto PCR para el factor de elongación Alpha de los distintos aislados

Continuando con la caracterización molecular, el número de pares de bases obtenidos para el gen ITS y EF1-a, son semejantes a los reportados en Marques *et al.* (2013) quienes encontraron 600 pb para la región ITS y 650 para EF1-a. Los resultados brindados por el BLAST, permitieron corroborar el parecido existente entre los aislamientos de la provincia de Los Ríos y las especies reportadas en otros países, como la causante de muerte y canchales en diferentes plantas forestales y frutales pese a la escasa investigación. Tal es el caso de Chile, donde existe mayor cantidad de información reportada de daños en especies frutales, ocasionada por Botryosphaeriaceae. Así por ejemplo, se han identificado *Diplodia seriata*, *B. dothidea* (encontrados también en esta investigación), *D. mutila*, y *Spencermartinsia viticola* como los responsables de muerte regresiva, en viñedos (Chou, 1988). Otro estudio en mango realizado por Sandoval *et al.* (2013) demostró que la sintomatología se presentaba en ramas con secamiento descendente que mostraban haces vasculares

necrosados y exudados gomosos rojizos, los cuales exhibían secamiento con defoliación parcial y ramas con hojas secas y verdes, fueron atribuidos a *Lasioidiplodia theobromae*.

Análisis Blast (Basic Local Alignment Search Tool)

Con las secuencias obtenidas forward y reverse, previamente alineadas, se procedió a la identificación

mediante la herramienta básica de búsqueda de alineación local. La Cuadro 3 se muestra la identificación realizada en el BLAST de acuerdo con los aislamientos, en la columna especie se muestra la que más se asemejó con su respectivo porcentaje de identidad. Además, en la última columna se encuentra el código GenBank correspondiente a cada especie.

Cuadro 3. Especies del genbank más parecidas a los aislamientos de la investigación

Gen	Aislamiento	Especie	Cubierta de consulta (%)	Identidad (%)	Código GenBank
ITS	Q1	<i>Lasioidiplodia theobromae</i>	100	100	MT644474
	QUIN1	<i>Diplodia seriata</i>	100	100	MN634025
	VAL 1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	100	100	MK178545
	BF1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	100	100	MN634016
	M1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	100	100	MT252674
EF-a	Q1	<i>Diplodia seriata</i>	100	99.77	FJ904868
	QUIN1	<i>Diplodia seriata</i>	100	99.64	MK759849
	VAL 1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	100	100	MT454342
	BF1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	100	100	KP721654
	M1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	100	100	KP721653

Análisis filogenético

El árbol filogenético para los genes ITS y EF1-a, construido con los algoritmos de máxima verosimilitud y vecinos cercanos se muestran en las figuras 7, 8, 9 y 10.

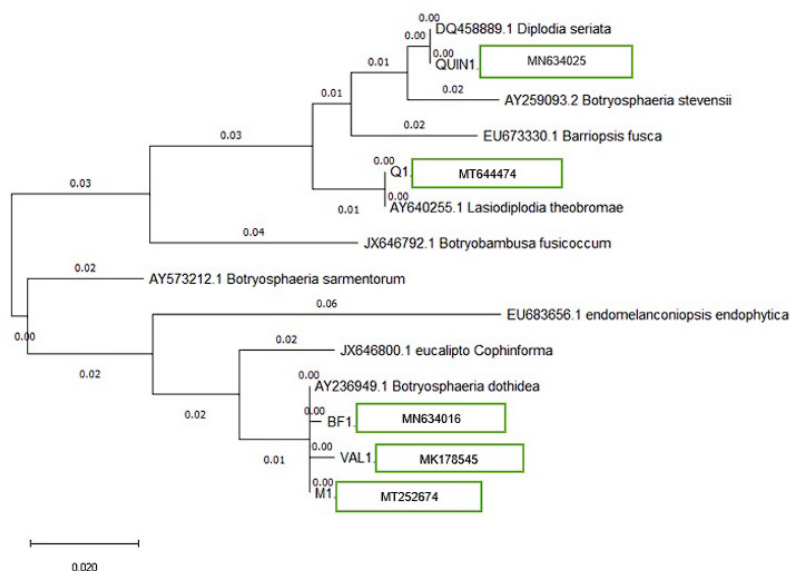


Figura 7. Modelo de máxima verosimilitud con las regiones ITS construido mediante Inferencia Bayesiana de 15 aislamientos del complejo Botryosphaeraeae. Los recuadros muestran el código genbank de la accesión tipo a la que más se asemejan. La cantidad de cambios esperados por sitio es indicada por la barra de escala.

El modelo de Tamura-Nei junto con el método de máxima verosimilitud, permitieron inferir la historia evolutiva y el árbol mostrado posee la mayor probabilidad logarítmica. Después de aplicar los algoritmos NJ y BioNJ a la matriz de distancias por pares. El árbol dibujado a escala, muestra las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Involucrando 14 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + Sin codificación. Con un

total de 599 posiciones en la database final.

Para el caso del aislamiento BF1, M1 y VAL1 se establece una politomía, que no permite establecer un orden de ramificación, pero relacionándolos con *Botryosphaeria dothidea*. Por otro lado, los árboles filogenéticos observados, muestran la misma topología para cada región, y se diferencian claramente tres especies.

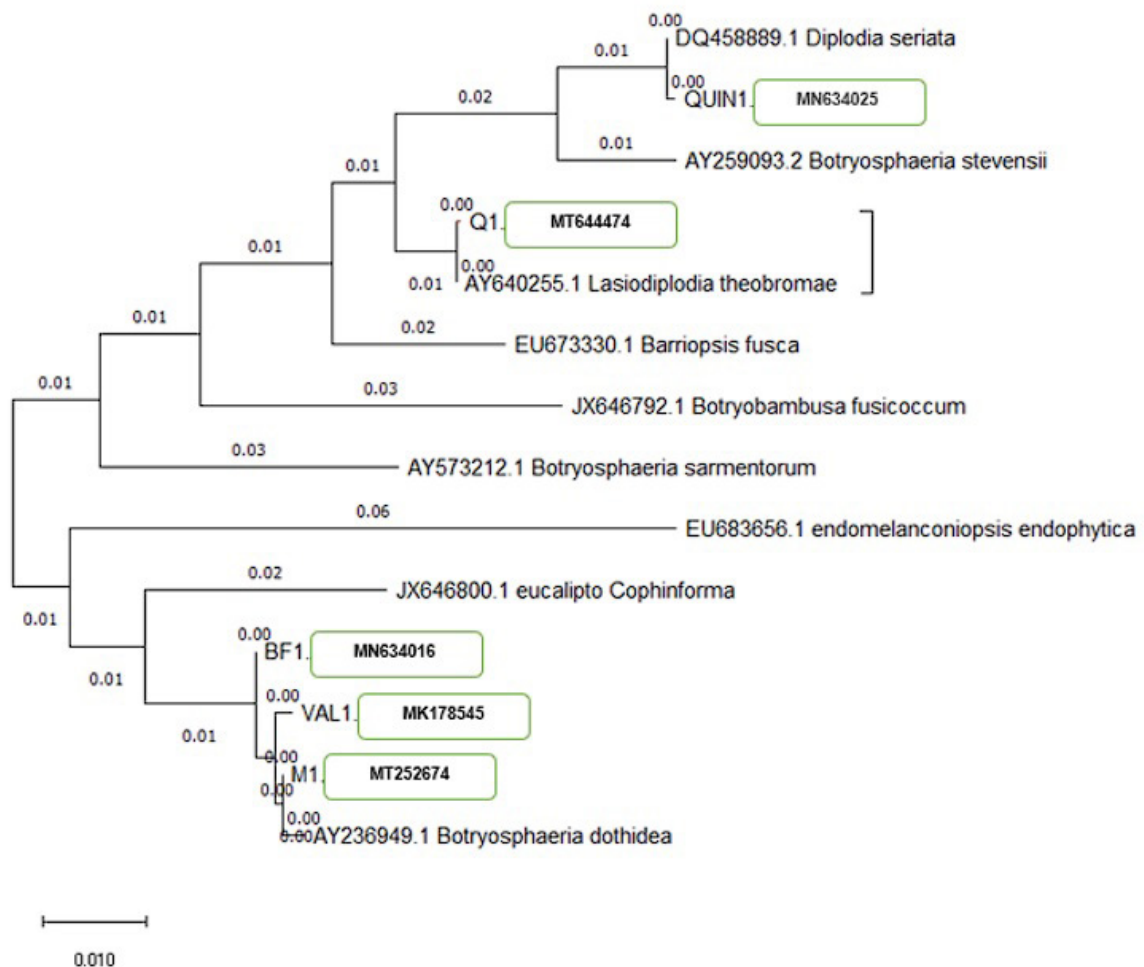


Figura 8. Árbol filogenético derivado de la secuencia de las regiones ITS con el modelo de vecinos cercanos. Los recuadros muestran el código Genbank de la accesión tipo a la cual más se parecen.

La historia evolutiva se infirió mediante el método de unión de vecinos. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.27387260, dibujado a escala, considerando las mismas unidades tanto para las distancias evolutivas como para la longitud de las ramas, siendo estas el número de sustituciones de bases por sitio, calculadas por el

método de máxima probabilidad compuesta e involucrando 14 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + Sin codificación. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron con la opción de eliminación por pares, obteniéndose un total de 599 posiciones en el conjunto de datos final.

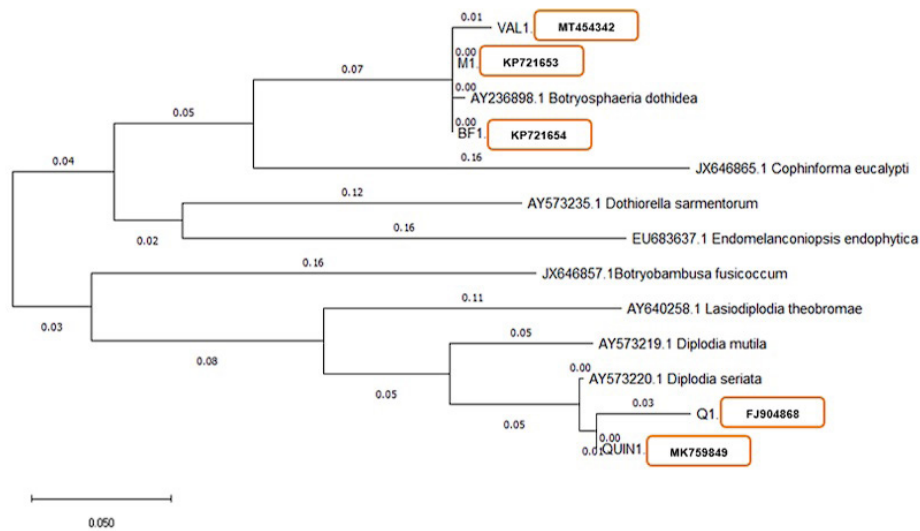


Figura 9. Árbol filogenético derivado de la secuencia de la región EF1, usando el algoritmo “Máxima verosimilitud”. Los recuadros muestran el código Genbank de la accesión tipo a la que más se parecen

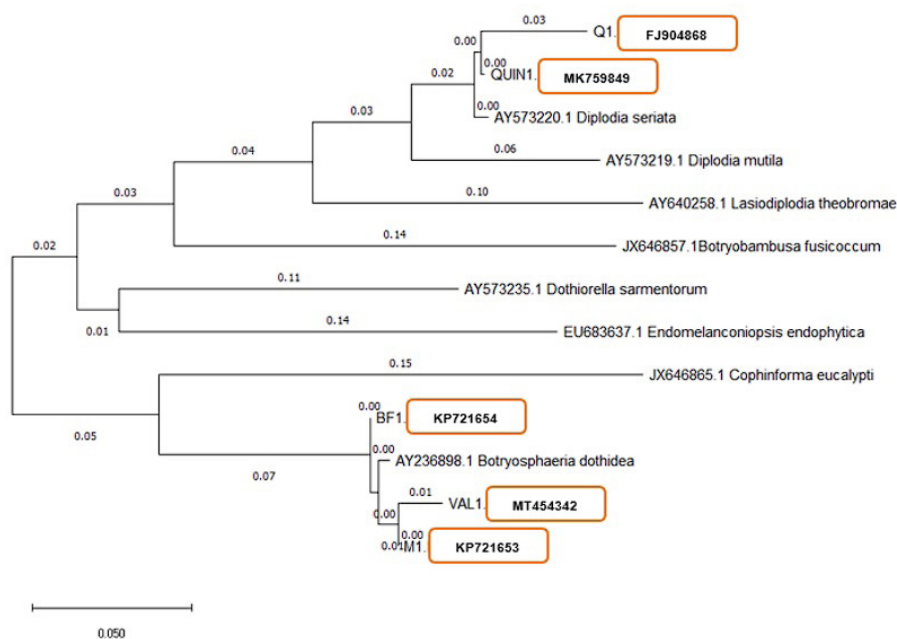


Figura 10. Árbol filogenético derivado de la secuencia de la región EF1. La construcción del árbol filogenético se utilizó el algoritmo “Vecinos cercanos”. Los recuadros muestran el código genbank de la accesión tipo a la que más se parecen

Sobre el análisis de secuencias y el porcentaje de identidad, este pudo variar entre las especies debido a posibles modificaciones o cambios en su ADN, sean estas transversiones (polimorfismos de un único nucleótido “SNP”) mutaciones y transiciones; pudiendo ocurrir de manera espontánea por un posible error en la replicación, depurinización, daños oxidativos en el ADN, o por la exposición de radiación ultravioleta, radiaciones ionizantes o fungicidas con capacidad mutagénica (Palero & Crandall,

2009) citado en (Guamán, 2018).

Son estas mismas diferencias las que ubicaron a los aislamientos en ramales de diferentes especies dentro del árbol filogenético, pero que, tanto en el algoritmo de máxima verosimilitud como el de vecinos cercanos, se ubicaron en el mismo orden. Esto asegura los resultados obtenidos ya que según Saitou y Nei (1987), la unión de vecinos o neighbor joining es un método de agrupación de abajo hacia arriba para la creación de árboles fenéticos, que produce un árbol final

único bajo el principio de mínima evolución, mientras que el método de máxima verosimilitud determina valores para los parámetros de un modelo. Éstos, se encuentran de tal manera que maximizan la probabilidad de que el proceso descrito por el modelo produzca los datos que realmente se observaron (Brooks, 2018).

Lo expuesto anteriormente, así como la abundancia de relatos de estudios sobre Botryosphaeriaceae, permite concluir que las especies pertenecientes a esta familia son particularmente exitosas como colono endofítico oportunista como lo menciona Slippers y Wingfield (2007). Schoch *et al.* (2012) añaden además que, en el orden de los Botryosphaeriales, son la única familia que integra patógenos causantes de canchales en tallos. Características que se presentaron en las fincas de donde se obtuvieron los diferentes aislamientos y, que justificaría el porqué de la presencia de las diferentes especies encontradas en el presente estudio, todas relacionadas con muerte descendente en plantas de cacao.

Conclusiones

En los diferentes cantones de la provincia de Los Ríos, Ecuador, se encontraron agentes patogénicos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, en plantaciones de cacao con sintomatología de muerte regresiva, lo cual fue corroborado de acuerdo con las características morfológicas de sus conidias. Para el gen ITS, la similitud fue del 100% de identidad en relación a las secuencias encontradas en la base de datos GenBank. Mientras que para EF1, las similitudes fluctuaron entre un 99% para Q1 y QUIN1 y 100% para BF1, VAL1 y M1. Las regiones ITS (Espaciador transcrito Interno) y EF1-a (factor de elongación α), secuenciadas, alineadas y usadas para la construcción del árbol filogenético, identificaron la especie de los aislamientos de Botryosphaeriaceae, como Lasiodiplodia theobromae en Quevedo, Diplodia seriata en Quinsaloma y Botryosphaeria dothidea en Valencia, Buena Fe y Mocache. Mostrando la ausencia de cualquier diferencia entre aislados del mismo taxón, al encontrarse dos clados con notoria politomía entre los aislados.

Bibliografía

- Alvindia, D., & Gallema, F. (2017). Lasiodiplodia theobromae causes vascular streak dieback (VSD)-like symptoms of cacao in Davao Region, Philippines. Australasian Plant Disease Notes, 12, 54. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0279-9>
- Barnett, H., & Hunter, B. (2010). Illustrated genera of imperfect fungi (1972 Burgess Publishing Company (ed.)).
- Brooks, J. (2018). Probability concepts explained: Maximum likelihood estimation. Towards Data Science.
- Caicedo, J. D., Lalangui, K. P., Pozo, A. N., Cevallos, P. A., Arahana, V. S., & Méndez, K. S. (2017). Multilocus molecular identification and phylogenetic analysis of Colletotrichum tamarilloi as the causal agent of Tamarillo (Solanum betaceum) anthracnose in the Ecuadorian highlands. European Journal of Plant Pathology, 148(4), 983–996. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1155-3>
- Carbone, I., & Kohn, L. (2014). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycological Society of America, 91(3), 553–556.
- Chou, C. (1988). Crown wilt of pinus radiata associated with diplodia pinea infection of woody stems. European Journal of Forest Pathology, 17(7), 398–411.
- Crous, P., Slippers, B., Wingfield, M., Rheeder, J., Marasas, W., Philips, A., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., & Groenewald, J. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeria ... Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae Phylogenetic lineages in the Botryosphaeria Mycology, 55, 235–253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001> <http://dx.doi.org/10.3114/sim0020> <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.011> http://www.mycosphere.org/pdf/Mycosphere_7_7_13.pdf http://www.mycosphere.org/pdf/Mycosphere_7_7_13.pdf
- E. A. B., & F. F. H. (1981). Pathogenicity and histopathology of Botryosphaeria dothidea on apple stems. Phytopathology, 71(4), 375–379. <https://doi.org/10.1094/phyto-71-375>
- Glass, N., & Donaldson, G. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 61(4), 1323–1330. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- Guamán, M. (2018). Caracterización morfológica, molecular y de resistencia a fungicidas de Colletotrichum sp., aislado de tomate de árbol (Solanum betaceum) [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.fao.org/3/I8739EN/i8739en.pdf> <http://dx.doi.org/10.1016/j.adolescence.2017.01.003> <http://dx.doi.org/10.1016/j.childyouth.2011.10.007> <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23288604.2016.1224023> <http://px.sagepub.com/lookup/doi/10>
- Guerrero, G. (2015). El cacao ecuatoriano su historia empezó antes del siglo XV. Revista Líderes. <https://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano-historia-empezo-siglo.html>
- KiWoo, K., EunWoo, P., & KyungKu, A. (1999). Penetration behavior of Botryosphaeria dothidea on apple fruits. Plant Pathology Journal, 15(4), 223–227.
- Marques, M., Lima, N., De Moraes, M., Michereff, S., Phillips, A., & Câmara, M. (2013). Botryosphaeria, Neofusicoccum, Neoscytalidium and Pseudofusicoccum species associated with mango in Brazil. Fungal Diversity, 61, 195–208. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0258-1>
- Mehl, J., Wingfield, M., Roux, J., & Slippers, B. (2017). Invasive everywhere? Phylogeographic analysis of

- the globally distributed tree pathogen *Lasioidiplodia theobromae*. *Forests*, 8(145), 1–22. <https://doi.org/10.3390/f8050145>
- Palero, F., & Crandall, K. (2009). Phylogenetic inference using molecular data. 9–32. <https://doi.org/10.1201/9781420092592-c5>
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Picos, P., García, R., León, J., Sañudo, A., & Allende, R. (2015). *Lasioidiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(1), 54–74.
- Pino, S. (2010). Ecuador the land of fine cocoa ‘Arriba’ (Vol. 7, Issue 1). https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civil_wars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625
- Rodríguez, E. (2013). Construcción de árboles filogenéticos (pp. 1–97). <https://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion13.pdf>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sandoval-Sánchez, M., Nieto-Ángel, D., Sandoval-Islas, J. S., Téliz-Ortiz, D., Orozco-Santos, M., & Silva-Rojas, H. V. (2013). Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera Indica* L.). *Agrociencia*, 47, 61–73.
- Santiago, D., Valadez, E., & Cibrián, D. (2015). Identificación molecular del complejo *Botryosphaeria* sp. asociado a canchros y secamiento de yemas en *Eucalyptus* sp. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(32), 93–106.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Silva, P. (2018). Caracterización genotípica y de virulencia de *Colletotrichum tamarilloi* y *Colletotrichum* sp. causantes de la antracnosis en tomate de árbol. Universidad Central del Ecuador.
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21, 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Suarez, G. (2016). Botryosphaeriaceae asociadas a la muerte de ramas en plantaciones de *Eucalyptus globulus* Labill. en la región del Biobío y de La Araucanía (Chile) [Universidad de Concepción]. In Universidad de Concepción. http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/2000/3/Tesis_Botryosphaeriaceae_Asociadas_a_la_muerte_de_ramas.Image.Marked.pdf
- Walker, J. (1980). The coelomycetes. Fungi imperfecto with Pycnidia, Acervuli and Stromata. *Australasian Plant Pathology*, 9(1), 120–121.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wright, A. F., & Harmon, P. F. (2010). Identification of species in the Botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida. *Plant Disease*, 94(8), 966–971. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0966>