

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA

TEMA:

Identificación Molecular del hongo *Lasiodiplodia theobromae* causante de la enfermedad de mazorca negra en cultivo de Cacao CCN-51

AUTOR:

JORGE GABRIEL PALACIOS REVELO

TUTOR:

M.V. JOSE HUMBERTO VERA RODRIGUEZ., Mg.

Milagro, 2024

Derechos de Autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Palacios Revelo Jorge Gabriel**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación **Medición y Control Ambiental** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, **22 de octubre del 2024**

Jorge Gabriel Palacios Revelo

C.I.: 1313885814

Aprobación del tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **José Humberto Vera Rodríguez** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **Palacios Revelo Jorge Gabriel**, cuyo tema es **DENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL HONGO LASIODIPLODIA THEOBROMAE CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD (MAZORCA NEGRA) EN CULTIVO DE CACAO CCN-51"**, que aporta a la Línea de Investigación **Medición y Control Ambiental**, previo a la obtención del Grado **Magister en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 22 de octubre de 2024



José Humberto Vera Rodríguez
C.I. 1312587569

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. PALACIOS REVELO JORGE GABRIEL**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL HONGO LASIODIPLODIA THEOBROMAE CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD (MAZORCA NEGRA) EN CULTIVO DE CACAO CCN-51", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.73
SUSTENTACIÓN	38.47
PROMEDIO	98.20
EQUIVALENTE	Excelente



Firmado digitalmente por
**MARIA FERNANDA
GARCÉS MONCAYO**

Msc GARCÉS MONCAYO MARÍA FERNANDA
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado digitalmente por
**RAFAEL SELEYMAN
LAZO SULCA**

Msc Bio V LAZO SULCA RAFAEL SELEYMAN
VOCAL



Firmado digitalmente por
**KEVIN XAVIER
HUILCAREMA ENRIQUEZ**

Mcimq HUILCAREMA ENRIQUEZ KEVIN XAVIER
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Dedicatoria

A Celina, mi esposa, por su incondicional amor, apoyo y paciencia a lo largo de este arduo camino. Tus palabras de aliento, comprensión y compañía en cada momento difícil han sido mi fortaleza. Gracias por caminar a mi lado y creer en mí cuando más lo necesitaba.

A Isaías, mi hijo, por ser mi mayor motivación. Tu sonrisa y energía han sido la luz que ha iluminado este proceso. Todo lo que hago es pensando en tu futuro, y este logro es también para ti.

A mis padres, por inculcarme el valor del esfuerzo, el estudio y la perseverancia. Sus consejos y enseñanzas han sido la base sobre la que he construido mis metas. Gracias por su amor y sacrificio, sin los cuales no habría llegado hasta aquí.

Agradecimientos

Al culminar este trabajo, me siento en la necesidad de expresar mi más sincero agradecimiento a quienes, de una u otra forma, contribuyeron a que este proyecto se hiciera realidad.

En primer lugar, agradezco profundamente al Mg. Humberto Vera, mi tutor, por su invaluable orientación, paciencia y dedicación durante todo este proceso. Sus comentarios certeros y su constante apoyo académico fueron esenciales para la finalización de esta tesis.

De igual manera, extiendo mi agradecimiento a Ángel Moreira, quien actuó como cotutor. Su visión y conocimiento aportaron una perspectiva crítica que enriqueció significativamente este trabajo. Su acompañamiento fue de gran ayuda para mantenerme enfocado y con claros objetivos.

A Elsa Fernández, le estaré eternamente agradecido por brindarme su hospitalidad y apoyo durante el tiempo que realicé mi experimento. Su generosidad y amabilidad hicieron de esta etapa un momento mucho más llevadero.

Finalmente, quiero agradecer a todos aquellos que, de manera directa o indirecta, han sido parte de este camino, ofreciendo palabras de aliento y contribuyendo con su presencia en los momentos más necesarios. A todos ustedes, mi eterna gratitud.

Resumen

El cacao (*Theobroma cacao*) es crucial para la economía de Ecuador, especialmente en la provincia de Los Ríos, donde el cantón Quevedo se destaca como una de las zonas más productivas. Sin embargo, las plantaciones enfrentan serios desafíos por enfermedades fitopatológicas causadas por el hongo *Lasiodiplodia theobromae*, responsable de la "escoba de bruja" y el "mal del machete". Estas enfermedades disminuyen tanto la producción como la calidad del cacao, impactando negativamente los ingresos de los productores y la competitividad del país en el mercado internacional. Para combatir este problema, se llevó a cabo un estudio para identificar molecularmente a *L. theobromae* en cultivos de cacao CCN-51. El proceso incluyó la extracción de ADN de las muestras, amplificación por PCR de regiones específicas del ADN y secuenciación de los productos obtenidos tras electroforesis en gel de agarosa. Los resultados confirmaron la presencia del patógeno y, mediante los postulados de Koch, se logró aislar y reinocular el hongo, comprobando su papel como agente causal. El análisis de su crecimiento mostró un avance significativo en 42 horas en las muestras evaluadas. Las mediciones en el pedúnculo y el ápice de las mazorcas revelaron que ciertas áreas de la planta son más vulnerables. Este estudio ofrece información valiosa para desarrollar estrategias de manejo focalizadas, ayudando a mitigar el impacto del hongo y reduciendo las pérdidas económicas en las plantaciones.

Palabras clave: Identificación Molecular, hongo, *Lasiodiplodia theobromae*, enfermedad de mazorca negra, Cacao CCN-51.

Abstract

Cacao (*Theobroma cacao*) is crucial for Ecuador's economy, particularly in the province of Los Ríos, where the Quevedo canton stands out as one of the most productive areas. However, plantations face serious challenges due to phytopathological diseases caused by the fungus *Lasiodiplodia theobromae*, responsible for "witch's broom" and "machete disease." These diseases reduce both the production and quality of cacao, negatively impacting producers' income and the country's competitiveness in the international market. To address this issue, a study was conducted to molecularly identify *L. theobromae* in CCN-51 cacao crops. The process included DNA extraction from samples, PCR amplification of specific DNA regions, and sequencing of the products obtained after agarose gel electrophoresis. The results confirmed the presence of the pathogen, and through Koch's postulates, the fungus was successfully isolated and reinoculated, proving its role as the causal agent. Growth analysis showed significant advancement within 42 hours in the evaluated samples. Measurements on the peduncle and apex of the pods revealed that certain areas of the plant are more vulnerable. This study provides valuable information for developing targeted management strategies, helping to mitigate the impact of the fungus and reduce economic losses in plantations.

Keywords: Molecular Identification, fungus, *Lasiodiplodia theobromae*, black pod disease, CCN-51 cacao.

Lista de Figuras

Figura 1 Crecimiento del hongo muestra 1	38
Figura 2 Crecimiento del hongo muestra 2.....	39
Figura 3 Crecimiento del hongo muestra 3.....	40
Figura 4 Medición de picnidios	45
Figura 5 Blast para Muestra JPH707.....	50
Figura 6 Blast para muestra JPH708.....	51
Figura 7 Blast para Muestra JPH709.....	52
Figura 8 Árbol filogenético de las 3 muestras.....	57
Figura 9 Mediciones del pedúnculo en mm lado A y B en 5 muestras	59
Figura 10 Mediciones del ápice lado A y B en mm en 5 muestras	60

Lista de Tablas

Tabla 1 Matriz de operacionalización de variables	7
Tabla 2 Resultados de la amplificación de la región ITS	46
Tabla 3 Porcentaje de identidad con secuencias depositadas en bases de datos públicas en tres muestras	49
Tabla 4 Análisis de los datos de ITS	53
Tabla 5 Crecimiento del hongo.....	74
Tabla 6 Medición de picnidios	74
Tabla 7 Mediciones del pedúnculo en mm Lado A	75
Tabla 8 Mediciones del pedúnculo en mm Lado B	76
Tabla 9 Mediciones del ápice en mm Lado A.....	76
Tabla 10 Mediciones del ápice en mm Lado B.....	76

Índice / Sumario

Derechos de Autor	ii
Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación	iii
Certificación de Defensa	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	ii
Lista de Tablas	iii
Índice / Sumario	iv
Introducción	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación	4
1.1. Planteamiento del problema	4
1.2. Delimitación del problema	4
1.3. Formulación del problema	5
1.4. Preguntas de investigación	5
1.5. Objetivos	5
4.1.1. Objetivo general	5
1.5.1 Objetivos específicos	5
1.6. Hipótesis de Investigación	6
1.7. Justificación	6
1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)	7
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial	9
2.1. Antecedentes Referenciales	9
2.2. Marco Conceptual	10

2.3. Marco Teórico	11
2.3.1. Generalidades del Cacao	11
2.3.2. Taxonomía.....	12
2.3.3. Historia del cacao	12
2.3.4. Características del cacao	13
2.3.5. Variedades	14
2.3.6. Cultivo de Cacao CCN-51 en Ecuador	15
2.3.7. Importancia Económica y Social.....	16
2.3.8. Enfermedad de la Mazorca Negra.....	17
2.3.9. <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	20
2.3.11. Identificación Molecular de Hongos.....	21
2.3.12. Árbol Filogenético.....	22
2.3.13. Herramientas bioinformáticas	25
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico.....	28
3.1. Tipo y diseño de investigación	28
3.2. Población y la muestra.....	29
3.3. Los métodos y las técnicas	29
3.3.1. Métodos.....	29
3.3.2. Técnicas	30
3.3.3. Pruebas de patogenicidad de <i>L. theobromae</i> en mazorcas de cacao CCn-51.....	35
3.4. Validez y confiabilidad de los métodos	35
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados.....	38
4.1. Crecimiento del hongo	38
4.2. Caracterización morfológica.....	40
4.2.1. Descripción de la morfología macroscópica	40
4.3. Características de las colonias.....	41

4.3.1. Microscópicas.....	41
4.3.2. Macroscópicas.....	43
4.4. Identificación molecular mediante secuenciación ITS.....	45
4.4.1. Extracción de ADN y amplificación.....	45
4.4.2. Pureza en la calidad de secuenciación	47
4.4.3. Identificación del organismo	48
4.4.4. Composición Nucleotídica	54
4.5. Análisis filogenético.....	55
4.6. Resultados de las pruebas de patogenicidad de <i>L. theobromae</i> en mazorcas de cacao CCn-51	58
4.7. Aislamiento del patógeno	64
4.8. Re-aislamiento del patógeno.....	65
CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones	67
5.1. Conclusiones.....	67
5.2. Recomendaciones	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS	74

Introducción

El cacao, *Theobroma cacao*, es una de las principales exportaciones agrícolas de Ecuador y juega un papel crucial en la economía local y nacional. Este cultivo no solo es una fuente importante de ingresos para los agricultores y sus familias, sino que también representa un componente esencial en la identidad cultural del país. De acuerdo con Mendoza Vargas et al. (2021), Ecuador es reconocido mundialmente por la calidad de su cacao, especialmente por las variedades finas de aroma y la variedad CCN-51, que es altamente valorada en el mercado internacional por su productividad y resistencia a varias enfermedades.

La provincia de Los Ríos, y particularmente la región de Quevedo, destaca como una de las áreas más productivas del país en términos de cultivo de cacao, según Avilés (2013), con aproximadamente 3,235 hectáreas dedicadas a este cultivo y alrededor de 626 productores, esta región se ha consolidado como un pilar fundamental en la producción cacaotera nacional. Mendoza Vargas et al. (2021) señalan que, la variedad CCN-51, desarrollada en Ecuador, se ha convertido en una preferida entre los productores debido a su alta productividad y resistencia a ciertas enfermedades, lo que la hace una opción viable y rentable.

Solís (2021) indica que, a pesar de estos beneficios, las plantaciones de cacao en Ecuador enfrentan desafíos significativos debido a diversas enfermedades fitopatológicas. Entre estas, una de las más devastadoras es causada por el hongo *Lasiodiplodia theobromae*. Este patógeno es conocido por inducir enfermedades como la "escoba de bruja" y el "mal del machete", que pueden tener efectos catastróficos en las plantaciones. Estas enfermedades no solo reducen la cantidad de cacao producido, sino que también afectan la calidad de los granos, disminuyendo su valor en el mercado.

Según, Marelli et al. (2019), el impacto de *Lasiodiplodia theobromae* en las plantaciones de cacao es especialmente preocupante debido a su capacidad de propagarse rápidamente y su persistencia en el ambiente. El hongo puede sobrevivir en el suelo y en restos de plantas, lo que hace que su control mediante métodos tradicionales sea complicado y a menudo ineficaz (Moreira-Morrillo et al., 2021). Este contexto subraya la necesidad urgente de desarrollar e implementar métodos de

identificación y control más efectivos y específicos para este patógeno, con el fin de proteger y sostener la producción de cacao en Ecuador.

Moreira – Morrillo et al. (2021) argumenta que *L. theobromae* se caracteriza por la formación de brotes anormales y la proliferación excesiva de ramificaciones en las plantas, mientras que el "mal del machete" produce lesiones necróticas y secado en los tejidos vegetales, especialmente en las mazorcas.

De acuerdo con Picos et al. (2024), la reducción en la producción y calidad del cacao afecta directamente a los ingresos de los productores locales, muchos de los cuales dependen exclusivamente de este cultivo para su sustento. Además, las pérdidas económicas no se limitan a los agricultores; toda la cadena de valor del cacao, incluyendo la industria de procesamiento y exportación, se ve afectada. La disminución en la oferta de cacao de alta calidad puede llevar a una menor competitividad en los mercados internacionales, afectando la reputación y posición de Ecuador como productor de cacao de excelencia.

Por su parte, Moreira – Morrillo et al. (2021) indican que la propagación de *L. theobromae* es rápida y eficaz, lo que agrava aún más el problema. El hongo puede dispersarse a través del aire, el agua y por contacto directo con plantas infectadas.

Su capacidad para sobrevivir en el suelo y en restos de plantas infectadas, incluso después de la cosecha, hace que sea extremadamente difícil de erradicar. Los métodos tradicionales de control, como la rotación de cultivos y el uso de fungicidas, suelen ser insuficientes para manejar la propagación de este patógeno debido a su resistencia y adaptabilidad.

Moreira – Morrillo et al. (2021) argumentan que, la persistencia del hongo en el ambiente y su capacidad de reinfectar las plantaciones año tras año subrayan la necesidad de desarrollar estrategias de manejo integradas y sostenibles. Esto incluye la investigación y aplicación de métodos de identificación molecular avanzados, que permiten una detección temprana y precisa de *L. theobromae*, facilitando la implementación de medidas de control más específicas y efectivas. Además, el desarrollo de variedades de cacao resistentes y la adopción de prácticas agrícolas mejoradas son esenciales para mitigar el impacto de este patógeno y proteger la economía agrícola del país.

La identificación precisa y rápida de *L. theobromae* es crucial para implementar estrategias de manejo efectivas y minimizar las pérdidas en la producción de cacao. Moreira – Morrillo et al. (2021) mencionan que, los métodos tradicionales de identificación, basados en características morfológicas y pruebas de patogenicidad, pueden ser lentos y menos precisos. En este contexto, las técnicas de biotecnología molecular han emergido como herramientas poderosas para la identificación de patógenos. La identificación molecular utilizando marcadores ITS (Internal Transcribed Spacer) permite una detección rápida y precisa, facilitando un análisis detallado de las características genéticas y moleculares del hongo.

El problema principal radica en la necesidad de realizar una identificación molecular avanzada para detectar de manera rápida y precisa la presencia de *L. theobromae* en las plantaciones de cacao de la Provincia de Los Ríos. Esta identificación molecular permitirá un análisis detallado y específico de los hongos filamentosos asociados con las enfermedades del cacao, facilitando así el trabajo para la implementación de futuras estrategias de control dirigidas y efectivas.

El objetivo de este trabajo fue identificar molecularmente el hongo *L. theobromae* en cultivos de cacao CCN-51 en la provincia de Los Ríos, mediante el aislamiento, caracterización, y análisis taxonómico y filogenético utilizando marcadores moleculares ITS y herramientas bioinformáticas.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1.1. Planteamiento del problema

La biotecnología vegetal ha sido fundamental para mejorar los programas de micropropagación y conservación de especies vegetales. Sin embargo, las plantaciones de cacao en la Provincia de Los Ríos y en Ecuador enfrentan desafíos significativos debido a la presencia del hongo fitopatógeno *L. theobromae*. Este hongo causa enfermedades devastadoras como la "mazorca negra", la "escoba de bruja" y el "mal del machete", afectando negativamente la producción y calidad del cacao en la región.

Dada la extensión de las plantaciones de cacao en Quevedo y sus zonas de influencia, que según Avilés (2013) abarcan aproximadamente 3,235 hectáreas y son atendidas por alrededor de 626 productores, es esencial contar con métodos de identificación más efectivos y eficientes.

El problema radica en la necesidad de realizar una identificación molecular avanzada para detectar de manera rápida y precisa la presencia de *L. theobromae* en las plantaciones de cacao de la Provincia de Los Ríos. Esta identificación molecular permitirá un análisis detallado y específico de los hongos filamentosos asociados con las enfermedades del cacao, facilitando la implementación de estrategias de control dirigidas y efectivas.

1.2. Delimitación del problema

Delimitación Temporal

El estudio se realizó en un periodo de 6 meses, desde el mes de febrero hasta agosto del 2024.

Delimitación Especial

La investigación se desarrolló en el cantón Quevedo, provincia de Los Ríos, Ecuador.

1.3. Formulación del problema

¿Cuáles son las características genéticas y moleculares específicas de *L. theobromae* presente en plantaciones de cacao *Theobroma cacao* del cantón Quevedo provincia de Los Ríos?

1.4. Preguntas de investigación

1. ¿Cuáles son las características morfológicas y fisiológicas específicas del hongo *L. theobromae* aislado de plantaciones de cacao CCN-51 en la Provincia de Los Ríos?
2. ¿Qué secuencias ITS (Internal Transcribed Spacer) específicas se pueden utilizar para identificar molecularmente el hongo *L. theobromae* en muestras de cacao infectadas?
3. ¿Cómo se clasifica taxonómica y filogenéticamente *L. theobromae* basado en datos morfo-moleculares y qué relaciones evolutivas se pueden establecer con otras especies de hongos fitopatógenos utilizando software bioinformático?

1.5. Objetivos

4.1.1. Objetivo general

Identificar molecularmente el hongo *L. theobromae* en cultivos de cacao CCN-51 en la provincia de Los Ríos, mediante el aislamiento, caracterización, y análisis taxonómico y filogenético utilizando marcadores moleculares ITS y herramientas bioinformáticas.

1.5.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar el hongo *L. theobromae* obtenido de plantaciones de cacao CCN-51.
2. Realizar identificación molecular del hongo *L. theobromae* mediante marcadores moleculares ITS.
3. Determinar la clasificación taxonómica y filogenética mediante software bioinformático usando datos morfo-moleculares.

1.6. Hipótesis de Investigación

Las características genéticas y moleculares de *L. theobromae* presentes en las plantaciones de cacao *Theobroma cacao* del cantón Quevedo, provincia de Los Ríos, se identifican de manera específica mediante el uso de marcadores moleculares ITS y herramientas bioinformáticas.

1.7. Justificación

La investigación sobre la identificación molecular del hongo *L. theobromae* en cultivos de cacao CCN-51 en la provincia de Los Ríos es de vital importancia debido a la relevancia económica y social del cacao en Ecuador. Este cultivo es una de las principales exportaciones agrícolas del país y constituye una fuente crucial de ingresos para miles de pequeños productores en la región.

La calidad y productividad del cacao ecuatoriano, especialmente de la variedad CCN-51, son reconocidas a nivel internacional, lo que refuerza la necesidad de proteger este cultivo de enfermedades devastadoras causadas por patógenos como *L. theobromae*.

La enfermedad de mazorca negra, junto con otras enfermedades como la "escoba de bruja" y el "mal del machete", causada por *L. theobromae*, representa una amenaza significativa para la producción de cacao. Estas enfermedades no solo reducen el rendimiento de las plantaciones, sino que también afectan la calidad de los granos, disminuyendo su valor en el mercado. Además, el impacto económico negativo se extiende a toda la cadena de valor del cacao, desde los productores hasta los exportadores, por lo tanto, identificar de manera precisa y rápida la presencia de este hongo es esencial para implementar estrategias de control efectivas y mitigar sus efectos adversos.

La aplicación de técnicas de identificación molecular avanzadas, como el uso de marcadores moleculares ITS y herramientas bioinformáticas, permite un análisis detallado y específico de los hongos fitopatógenos. Estas técnicas ofrecen una ventaja significativa sobre los métodos tradicionales de identificación, que a menudo son lentos e imprecisos. Al proporcionar una detección rápida y precisa de *L. theobromae*, la investigación facilitará la implementación de medidas de control

dirigidas, mejorando así la gestión de las enfermedades del cacao y contribuyendo a la sostenibilidad de la producción cacaotera en la región.

Además, el conocimiento detallado de las características genéticas y moleculares de *L. theobromae* ayudará a los investigadores y agricultores a comprender mejor la biología y el comportamiento de este patógeno. Esto puede conducir al desarrollo de variedades de cacao más resistentes y a la adopción de prácticas agrícolas más efectivas. En última instancia, la investigación contribuirá a la estabilidad económica de los productores de cacao en la provincia de Los Ríos y a la competitividad de Ecuador en el mercado internacional del cacao, fortaleciendo la posición del país como un líder en la producción de cacao de alta calidad.

1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)

Tabla 1

Matriz de operacionalización de variables

Variable	Conceptualización	Dimensión	Indicador	Técnica
Variable Independiente: Identificación Molecular	La identificación molecular es una técnica avanzada en biología y bioquímica que se utiliza para detectar y caracterizar organismos vivos, como bacterias, virus, hongos, y plantas, a nivel molecular.	Electroforesis	Separación de fragmentos de ADN por tamaño	Electroforesis horizontal en gel de agarosa

		Secuenciación	Obtención de secuencias de nucleótidos	Secuenciación, ensamblaje y búsqueda de Blast.
Variable Dependiente: Hongo <i>L. theobromae</i>	<i>L. theobromae</i> es un hongo fitopatógeno que afecta gravemente diversas plantas, incluyendo el cacao (<i>Theobroma cacao</i>). Este hongo es conocido por causar varias enfermedades devastadoras en las plantaciones de cacao, tales como la "mazorca negra", la "escoba de bruja" y el "mal del machete".	ADN Genómico	Pureza y cantidad de ADN extraído	Extracción de ADN Genómico de bacterias, hongos o plantas.
		Extracción de ADN	Amplificación de secuencias específicas de ADN	PCR convencional

Elaborado por: El Autor

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

2.1. Antecedentes Referenciales

Picos et al. (2024) en su trabajo titulado "*Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control" presentan una actualización integral sobre el impacto del hongo *L. theobromae* en cultivos mexicanos, ampliando y avanzando significativamente sobre el análisis realizado por Picos-Muñoz et al. (2015). Mientras que Picos-Muñoz et al. (2015) se centraron en describir la presencia del hongo y sus principales hospederos en México, Picos et al. (2024) abordaron una revisión detallada y actualizada, incorporando avances en taxonomía, diversidad de hospedantes y estrategias de control. Emplearon una metodología avanzada que incluye la caracterización de regiones espaciadoras intergénicas y el factor de elongación 1 alfa para una diferenciación precisa de especies crípticas y una mejor comprensión filogenética del hongo. Los resultados del estudio de 2024 revelan un aumento en los reportes de nuevos hospederos vegetales y presentan avances significativos en la identificación y clasificación del hongo, así como en la comprensión de su biología y epidemiología. La conclusión principal subraya la necesidad de continuar investigando la diversidad genética del hongo y desarrollando estrategias de control efectivas para mitigar los daños en cultivos agrícolas, destacando el progreso en el entendimiento del patógeno y su manejo en comparación con los hallazgos de 2015.

El estudio de Faustino Damián (2022), realizado en Uchiza, San Martín, tuvo como objetivo determinar el sistema de muestreo más eficiente para detectar enfermedades en una plantación comercial de cacao. La investigación descriptiva se llevó a cabo en la parcela B12b, con 25 hectáreas y una población aproximada de 9,000 plantas, evaluando ocho tratamientos con cuatro repeticiones cada uno: sistema cruz (9 y 15 plantas), sistema zona (9 y 15 plantas), sistema zigzag (9 y 15 plantas) y sistema lineal (9 y 15 plantas). Los resultados mostraron que el tratamiento T08 (método lineal con 15 plantas) tuvo el mayor porcentaje de incidencia para *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*, mientras que el tratamiento T02 mostró la mayor incidencia para *L. theobromae*, seguido por T08 con un 0.42% de incidencia. Se concluyó que el método lineal con 15 plantas es el más eficiente para detectar estas enfermedades, proporcionando resultados consistentes en la evaluación de la incidencia de

enfermedades en la plantación de cacao, lo que es crucial para mejorar la productividad y la salud de los cultivos en la región de Uchiza-Tocache.

El estudio "Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51", tiene como objetivo caracterizar la biodiversidad de *Phytophthora* spp. y evaluar rizobacterias con potencial de biocontrol para la enfermedad de la mazorca negra en la variedad CCN-51 de cacao. Los autores Cedeño et al. (2020), recolectaron nueve muestras vegetales con síntomas de la enfermedad de áreas productoras de cacao. Las características morfológicas y la identificación por PCR revelaron diversos morfotipos de colonias característicos de *Phytophthora* spp., y un amplicón de 159 pb confirmó la presencia de *P. palmivora* en todas las zonas muestreadas. Los ensayos de inhibición micelial in vitro mostraron altos niveles de antagonismo (78% y 60%) de las rizobacterias contra *P. palmivora*. La bioprotección en plantas CCN-51 mediante aplicaciones de *P. veronii* R4, *A. calcoaceticus* BMR2-12, *S. marcescens* PM3-8 y *P. protegens* CHA0 fue efectiva en el control de la cepa *P. palmivora* BL15, mientras que sin aplicación de bacterias, la enfermedad progresó significativamente. La aplicación edáfica de rizobacterias no solo promovió el crecimiento de las plantas, sino que también suprimió eficazmente la enfermedad causada por *P. palmivora*.

2.2. Marco Conceptual

Cacao CCN-51: Esta variedad de cacao es conocida por su alta productividad y resistencia a diversas enfermedades, lo que la hace popular entre los productores. Sin embargo, la mazorca negra sigue siendo un desafío significativo (Angulo Preciado, 2022).

Mazorca Negra: Enfermedad que afecta a las mazorcas de cacao, causada por varios patógenos, entre los cuales *L. theobromae* es uno de los más agresivos. La enfermedad se caracteriza por la aparición de manchas negras en las mazorcas, que eventualmente llevan a la podredumbre y pérdida de la cosecha (Moreira – Morrillo et al., 2021).

***L. theobromae*:** Hongo fitopatógeno que causa enfermedades en una amplia variedad de plantas. En el cacao, es responsable de la mazorca negra, una

enfermedad devastadora que afecta significativamente la producción y calidad del cacao (Picos Muñoz et al., 2015).

Marcadores Moleculares ITS: Las secuencias del Espaciador Interno Transcrito (ITS) son regiones del ADN ribosomal que son altamente variables entre especies cercanamente relacionadas. Se utilizan comúnmente en la identificación molecular de hongos debido a su alta tasa de evolución y facilidad de amplificación (Yang, 2018).

Aislamiento y caracterización: Este proceso implica la obtención de muestras del patógeno desde las plantas afectadas, cultivarlas en medios adecuados para observar sus características morfológicas y fisiológicas, y obtener material genético para análisis posteriores (Ormeño, 2023).

Análisis taxonómico y filogenético: El análisis taxonómico se refiere a la clasificación del organismo dentro de un sistema jerárquico, mientras que el análisis filogenético implica la determinación de las relaciones evolutivas entre diferentes organismos. Estas metodologías utilizan datos tanto morfológicos como moleculares y son esenciales para una identificación precisa y comprensión de la biodiversidad.

Herramientas bioinformáticas: Software y métodos computacionales que permiten el análisis de datos biológicos complejos. En este contexto, se utilizan para comparar secuencias de ADN, construir árboles filogenéticos y determinar la relación de *L. theobromae* con otros hongos.

2.3. Marco Teórico

2.3.1. Generalidades del Cacao

El cacao, cuyo nombre científico es *Theobroma cacao* L., es un árbol originario de América perteneciente a la familia de las Esterculiáceas. Este árbol tiene un tronco liso que puede alcanzar entre cinco y ocho metros de altura, con hojas alternas, brillantes, lisas, duras y ovaladas. Sus flores son pequeñas y de color amarillo y encarnado. El fruto del cacao surge directamente del tronco y de las ramas principales, y contiene entre 20 y 40 semillas, siendo el principal ingrediente del chocolate.

En el idioma maya yucateco, "Kaj" significa amargo y "Kab" significa jugo. Algunos lingüistas sugieren que, con el tiempo, estas palabras experimentaron varias transformaciones fonéticas, lo que llevó a la palabra "cacaoatl", que posteriormente evolucionó a "cacao" (Urtubes y Gallo, 1992). Este fruto es considerado de gran potencial por las industrias alimentaria y cosmética.

2.3.2. Taxonomía

En términos de taxonomía, el cacao se clasifica dentro del género *Theobroma*, que pertenece a la subfamilia *Sterculioidea* de la familia *Malvaceae*. León (2000) señala que, el cacao es una de las 22 especies dentro del género *Theobroma*. El nombre genérico proviene del griego y significa "alimento de los dioses", derivado de θεός (*theos*), que significa "dios", y βρῶμα (*broma*), que significa "comida".

Su nombre común es cacao, árbol del cacao o cacaotero. El nombre específico, cacao, proviene de la denominación nativa de la planta en las lenguas indígenas mesoamericanas. El cacao era conocido como kakaw en tzeltal, k'iche' y maya clásico; kagaw en Sayula Popoluca; y cacahuatl en náhuatl (Girón et al., 2012).

2.3.3. Historia del cacao

El árbol de cacao es originario de América, particularmente de América Central y partes de México. Hace más de 5,000 años, fue consumido por las culturas precolombinas en Yucatán, incluyendo a los mayas, y por la civilización olmeca en ceremonias espirituales. También se reporta su crecimiento en las estribaciones de los Andes en las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco en Colombia y Venezuela. CIDAMI (2016) indica que su distribución pudo haber sido más amplia en el pasado, pero la evidencia de su rango en estado silvestre podría estar oculta debido a su cultivo en estas áreas desde antes de la llegada de los españoles.

Los árboles de cacao crecen en una zona geográfica limitada, aproximadamente 20° al norte y sur del Ecuador. Actualmente, casi el 70% de la producción mundial se cultiva en África Occidental (Lira, 2016). El nombre botánico de la planta de cacao fue dado por el científico sueco Carl Linnaeus en su clasificación original del reino vegetal, denominándola *Theobroma* ("alimento de los dioses") cacao (Girón, et al., 2012).

El chocolate fue introducido en Europa por los españoles y se convirtió en una bebida popular a mediados del siglo XVII (Núñez, 2014). Los españoles también llevaron el árbol de cacao a las Indias Occidentales y las Filipinas (CIDAMI, 2016). Posteriormente, los europeos lo introdujeron en el resto de Asia y en el oeste de África. En la actualidad, la producción de cacao está muy concentrada, con alrededor de diez países representando el 90% de la producción mundial, destacando Ecuador, Brasil, Indonesia, Ghana, Costa de Marfil, Nigeria y otros países africanos cuya producción se detallará más adelante.

2.3.4. Características del cacao

En cuanto a sus características, el árbol de cacao tiene un tamaño mediano, oscilando entre 5 y 8 metros de altura, aunque puede alcanzar hasta 20 metros cuando crece libremente bajo sombra intensa (Álvarez & Mendoza, 2013). Su copa es densa y redondeada, con un diámetro de entre 7 y 9 metros, y su tronco es recto, desarrollándose en diversas formas según las condiciones climáticas y ambientales. El sistema radicular incluye una raíz principal pivotante y numerosas raíces secundarias, ubicadas principalmente en los primeros 30 cm de suelo (Álvarez & Mendoza, 2013).

Las hojas del cacao son simples, enteras y de color verde con tonalidades que varían desde el morado y verde pálido hasta el rojizo y café, y tienen un pecíolo corto. Las flores son pequeñas y se producen en racimos sobre el tejido maduro de más de un año del tronco y las ramas, cerca de los lugares donde anteriormente hubo hojas (Santana, 2012). Estas flores, que se abren por la tarde, pueden ser polinizadas durante todo el día siguiente. El cáliz es rosa con segmentos puntiagudos, y la corola puede ser blancuzca, amarilla o rosa, con pétalos largos.

Álvarez y Mendoza (2013) indican que los frutos del cacao varían en tamaño, color y forma, generalmente tienen forma de baya, alcanzando hasta 30 cm de largo y 10 cm de diámetro. Pueden ser lisos o acanalados, elípticos y de colores rojo, amarillo, morado o café. La pared del fruto es gruesa, dura o suave, con una consistencia similar al cuero.

Internamente, los frutos se dividen en cinco celdas y la pulpa puede ser blanca, rosada o café, con un sabor que varía de ácido a dulce y es aromática. Cada baya contiene

de 20 a 40 semillas, que pueden ser planas o redondeadas, de color blanco, café o morado, y con un sabor dulce o amargo. Santana (2012) indica que el árbol comienza a producir frutos entre los 3 y 4 años de plantado, y se estima que puede seguir produciendo buen cacao durante unos 30 años

2.3.5. Variedades

En términos generales, el cacao se puede clasificar en tres variedades: el cacao de consumo Forastero y los cacaos de lujo Trinitario y Criollo.

- **Forastero:** Considerado el antecesor de todas las variedades de cacao, es conocido por su robustez y buenas cosechas, representando alrededor del 95% de la producción mundial de cacao (Serrano, 2015). Las características típicas del Forastero incluyen un sabor fuerte y menos aromático, que puede ser amargo o ácido en algunos casos.
- **Trinitario:** Esta variedad es un híbrido que combina la resistencia del Forastero con los sabores agradables del Criollo. El cacao Trinitario posee un sabor potente y aromático a cacao, con una ligera acidez.
- **Criollo:** Reconocido como el mejor entre los cacaos de lujo, el Criollo es solo ligeramente ácido y casi no tiene amargor. Su sabor suave a cacao incluye aromas secundarios distintivos con toques de nueces, caramelo, frutas del bosque y tabaco. Sin embargo, debido a su susceptibilidad a enfermedades fúngicas y otras plagas, el Criollo tiene menores rendimientos, lo que hace que sus frutos sean más costosos.

En Ecuador, se cultivan principalmente dos tipos de cacao:

- **Cacao Fino de Aroma:** También conocido como Criollo o Nacional, se distingue por su color amarillo y su aroma y sabor únicos, esenciales para la producción de chocolate gourmet de alta calidad que es muy apreciado a nivel mundial (GORAYMI, 2017).
- **Cacao CCN-51:** Conocido como Colección Castro Naranjal, su color característico es el rojo. Esta variedad es reconocida por su alto rendimiento, siendo esencial para la producción a gran escala de productos semielaborados

utilizados en la fabricación de chocolates y otros productos (Revista Líderes, 2017).

El cultivo del cacao (*Theobroma cacao L.*) es vital para la economía de muchos países tropicales. En Ecuador, la variedad CCN-51 es una de las más cultivadas debido a su alta productividad. No obstante, las enfermedades fúngicas, como la mazorca negra, son una amenaza significativa para la producción. Esta enfermedad es causada principalmente por el hongo *L. theobromae*. Para su manejo y control efectivo, es crucial una identificación precisa y detallada del patógeno. Este marco teórico aborda los fundamentos científicos y metodológicos necesarios para la identificación molecular de *L. theobromae* utilizando marcadores ITS y herramientas bioinformáticas.

2.3.6. Cultivo de Cacao CCN-51 en Ecuador

Ecuador es uno de los principales productores de cacao a nivel mundial, y la variedad CCN-51 (Colección Castro Naranjal 51) ha jugado un papel significativo en esta industria. Desarrollada por el agrónomo ecuatoriano Homero Castro en 1965, esta variedad se destaca por su alto rendimiento y relativa resistencia a enfermedades comunes del cacao, como la escoba de bruja y la moniliasis. Esta resistencia ha permitido que el CCN-51 sea ampliamente cultivado en Ecuador, especialmente en las provincias de Los Ríos, Guayas y Manabí.

El desarrollo del CCN-51 ha sido crucial para la economía y el desarrollo social de Ecuador. En particular, ha beneficiado a los pequeños agricultores, permitiéndoles mejorar sus ingresos y calidad de vida. Además, ha fortalecido la posición de Ecuador en el mercado internacional del cacao, siendo una de las principales exportaciones agrícolas del país. Esta variedad representa alrededor del 95% del cultivo mundial de cacao, contribuyendo significativamente al sector agrícola y a la economía nacional.

El CCN-51 es conocido por sus características de alto rendimiento y su capacidad de producir cacao de buena calidad, aunque con un sabor menos refinado comparado con otras variedades más exclusivas como el Criollo. Sin embargo, su robustez y productividad lo han hecho popular tanto a nivel nacional como internacional, permitiendo a Ecuador competir efectivamente en el mercado global del cacao.

2.3.6.1. Características de CCN-51

La variedad CCN-51 se caracteriza por su alto rendimiento, con una capacidad de producción en condiciones óptimas, lo cual es significativamente mayor que otras variedades tradicionales. Además, CCN-51 presenta una resistencia moderada a diversas enfermedades que afectan al cacao, aunque no es completamente inmune a todas ellas. Esta variedad también es apreciada por su adaptación a diferentes condiciones climáticas y su capacidad para prosperar en diversas regiones de Ecuador.

2.3.7. Importancia Económica y Social

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Ganadería (2021), el cacao CCN-51 ha sido fundamental en el desarrollo económico y social de Ecuador, especialmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, y Manabí, donde se cultiva de manera intensiva. Esta variedad de cacao ha permitido a numerosos agricultores incrementar sus ingresos y mejorar su calidad de vida, jugando un papel significativo en el fortalecimiento de la economía local y nacional.

Cedeño Amador (2023) argumenta que, el cultivo de CCN-51, conocido por su alta productividad y resistencia a diversas enfermedades, ha ofrecido a los agricultores una fuente de ingresos más estable y rentable en comparación con otras variedades de cacao.

Cedeño Amador (2023) también manifiesta que, en las provincias de Los Ríos, Guayas, y Manabí, el cacao CCN-51 se ha convertido en un pilar económico, proporcionando empleo y sustento a miles de familias. La infraestructura y la tecnología agrícola en estas regiones han mejorado considerablemente, facilitando el aumento de la producción y la calidad del cacao. Las cooperativas y asociaciones de agricultores han jugado un papel crucial en la capacitación y asistencia técnica, asegurando prácticas agrícolas sostenibles y eficaces que maximicen el rendimiento y la calidad del cacao.

La contribución del CCN-51 no se limita solo al ámbito local. A nivel nacional, la producción de esta variedad de cacao ha impulsado significativamente la economía ecuatoriana. Ecuador ha logrado consolidar su posición en el mercado internacional

del cacao, en gran medida gracias a la exportación de CCN-51. Este cacao es altamente valorado en el mercado global por su calidad y rendimiento, lo que ha permitido a Ecuador aumentar sus exportaciones y generar divisas importantes para el país.

Las políticas gubernamentales y las iniciativas privadas han apoyado el desarrollo del sector cacaotero, promoviendo la investigación y la innovación en técnicas de cultivo y procesamiento del cacao. Programas de financiamiento y subsidios han facilitado la adopción de prácticas agrícolas modernas, aumentando la competitividad de los agricultores ecuatorianos en el mercado internacional.

2.3.8. Enfermedad de la Mazorca Negra

La mazorca negra es una enfermedad grave que afecta a las mazorcas de cacao, caracterizada por la aparición de manchas negras en las vainas que eventualmente progresan hasta la podredumbre completa de las mismas. Lezaun (2023) señala que, este proceso patológico no solo reduce la calidad del cacao sino también la cantidad de la producción, causando pérdidas económicas significativas para los agricultores y productores de cacao.

El impacto de la mazorca negra no se limita a la calidad del cacao; también afecta de manera significativa la cantidad de producción. Las mazorcas afectadas pueden caer prematuramente o producir granos que no cumplen con los estándares de calidad requeridos para la comercialización.

Lezaun (2023) destaca que este proceso patológico no solo reduce la calidad del cacao, sino que también disminuye el volumen de producción, lo que resulta en pérdidas económicas considerables para los agricultores y productores de cacao.

Según Schroth y Barbosa (2008) esta situación se traduce en menores ingresos y en una mayor carga financiera para los productores, quienes deben enfrentar costos adicionales asociados con el manejo y control de la enfermedad, así como con la posible reducción en el precio del cacao debido a la baja calidad del producto.

Villamil (2015) manifiesta que, la propagación de la enfermedad puede tener efectos en cadena que afectan a toda la cadena de suministro del cacao, desde los

agricultores hasta los exportadores y las economías locales que dependen de la producción de cacao como fuente vital de ingresos. Las pérdidas económicas se reflejan en una disminución del valor de las exportaciones y en una reducción de la estabilidad económica de las regiones productoras.

2.3.8.1. Sintomatología y efectos de la mazorca negra

Los primeros signos de la mazorca negra incluyen pequeñas manchas oscuras que aparecen en la superficie de las mazorcas. Lezaun (2023) indican que estas manchas se expanden gradualmente, y el tejido afectado se vuelve necrótico, desarrollando una textura dura y seca.

A medida que la infección progresa, la mazorca entera puede volverse negra y se descompone, perdiendo su valor comercial. Además de afectar la producción, esta enfermedad también puede tener efectos a largo plazo en la salud de los árboles, debilitando su estructura y reduciendo su capacidad para producir cacao en ciclos futuros.

2.3.8.2. Causas y patógenos

De acuerdo con Picos Muñoz et al. (2015), la mazorca negra es causada por varios patógenos fúngicos, siendo *L. theobromae* uno de los más prevalentes y destructivos. *L. theobromae* es un hongo fitopatógeno que infecta una amplia gama de plantas, pero es especialmente virulento en el cacao. Este hongo es conocido por su capacidad para producir esporas que se dispersan fácilmente por el viento y el agua, facilitando la rápida propagación de la enfermedad en plantaciones densas. *L. theobromae* infecta las mazorcas a través de heridas o aberturas naturales en la piel de la fruta.

Una vez dentro, el hongo coloniza rápidamente los tejidos internos, produciendo enzimas y toxinas que descomponen las células vegetales y facilitan la invasión del patógeno. Las condiciones climáticas cálidas y húmedas, comunes en las regiones productoras de cacao, son ideales para el crecimiento y la dispersión de *L. theobromae*.

2.3.8.3. Impacto económico y social

El impacto económico de las enfermedades del cacao puede ser devastador, reduciendo los rendimientos hasta en un 40%, dependiendo de la severidad de la infección y de las prácticas de manejo empleadas según Villamil (2015).

Este descenso en la producción no solo afecta a los productores individuales, sino que también tiene repercusiones significativas en las economías locales y nacionales que dependen de la exportación de cacao como fuente de ingresos. Las pérdidas en los rendimientos pueden traducirse en una disminución de las exportaciones y, en consecuencia, en una reducción de los ingresos nacionales provenientes de este cultivo vital.

Además, el costo asociado con los tratamientos y medidas de control de las enfermedades del cacao puede ser considerable. Los agricultores deben invertir en fungicidas, técnicas de manejo integrado de plagas y otras estrategias de control, lo que puede aumentar la carga financiera sobre ellos. Estos costos adicionales pueden disminuir los márgenes de ganancia y, en casos extremos, hacer que la producción de cacao sea inviable económicamente para algunos agricultores.

La combinación de rendimientos reducidos y costos elevados puede llevar a una espiral de deuda para los productores, afectando su capacidad para mantener sus explotaciones y sus medios de vida. A nivel macroeconómico, la disminución en la producción y exportación de cacao puede tener un impacto negativo en la balanza comercial de los países productores, afectando su estabilidad económica y desarrollo regional.

Manejo y Control

Según Adeniyi (2019), el manejo de la mazorca negra requiere un enfoque integrado que combine prácticas culturales, químicas y biológicas. Las prácticas culturales incluyen la poda regular para eliminar partes infectadas y mejorar la circulación del aire, lo que reduce la humedad y la incidencia de la enfermedad. Los fungicidas químicos pueden ser efectivos, pero su uso debe ser manejado cuidadosamente para evitar la resistencia del patógeno y el impacto negativo en el medio ambiente.

Por su parte, Blanco (2021) señala que el control biológico utilizando agentes como rizobacterias antagonistas y hongos beneficiosos, ha mostrado promesas en la supresión de *L. theobromae* y otros patógenos asociados con la mazorca negra. Investigaciones recientes han demostrado que ciertas rizobacterias pueden inhibir el crecimiento del hongo mediante la producción de compuestos antimicrobianos y la competencia por nutrientes y espacio.

2.3.9. Lasiodiplodia theobromae

Autores como Purdy y Schmidt (1996) o Ainsworth et al. (2008) manifiestan que, *L. theobromae* es un hongo fitopatógeno que infecta una amplia variedad de plantas hospedadoras, siendo particularmente destructivo en el cultivo de cacao. En las plantas de cacao, *L. theobromae* causa síntomas como necrosis de tejidos, manchas negras en las mazorcas y eventualmente la podredumbre de las mismas, lo que lleva a una pérdida significativa de la calidad y cantidad del cacao producido.

Morfológicamente, este hongo se caracteriza por producir conidios oscuros, de forma elíptica a fusiforme, y septados, es decir, con divisiones transversales internas. A nivel microscópico, estos conidios presentan paredes gruesas y suelen estar cubiertos por una capa mucilaginosa, lo cual facilita su adherencia a superficies vegetales. Sin embargo, la identificación precisa y específica de *L. theobromae* se logra a través de técnicas moleculares, como la amplificación de secuencias ITS (Internal Transcribed Spacer) y el análisis de ADN, que permiten diferenciar este hongo de otros patógenos similares.

2.3.10. Ciclo de Vida y Patogenicidad

El ciclo de vida de *L. theobromae* comienza con la producción de conidios, que son las estructuras reproductivas asexuales del hongo. Estos conidios se dispersan en el medio ambiente principalmente a través del viento y del agua, lo que facilita la propagación del hongo a nuevas plantas hospedadoras. Una vez que los conidios aterrizan en una superficie adecuada, como una herida o una apertura natural en la planta de cacao, germinan y forman tubos germinales que penetran en los tejidos vegetales.

La patogenicidad de *L. theobromae* se debe en gran medida a su capacidad para producir una variedad de enzimas y toxinas. Estas enzimas incluyen proteasas, celulasas y pectininas, que descomponen las paredes celulares y otros componentes estructurales de las plantas. Además, el hongo produce toxinas que pueden causar necrosis en las células vegetales, matando el tejido y facilitando la invasión y colonización del patógeno. Este proceso de descomposición enzimática y toxicidad celular resulta en los síntomas típicos de la infección por *L. theobromae*, como la necrosis de tejidos y las manchas negras en las mazorcas.

La propagación del hongo dentro de la planta es rápida, y bajo condiciones ambientales favorables (alta humedad y temperatura), puede provocar la muerte de grandes porciones de tejido en poco tiempo. La gestión de la enfermedad en el campo suele requerir una combinación de prácticas culturales, como la eliminación de tejido infectado, el uso de fungicidas, y la implementación de medidas preventivas para reducir la dispersión de los conidios.

2.3.11. Identificación Molecular de Hongos

La identificación molecular se ha convertido en una herramienta fundamental para la detección y caracterización precisa de patógenos vegetales. En el caso de los hongos, las secuencias del Espaciador Interno Transcrito (ITS) del ADN ribosomal son ampliamente utilizadas debido a su alta variabilidad entre especies y su conservación dentro de especies, lo que facilita una identificación rápida y precisa. Estas secuencias ITS son consideradas el marcador estándar en la sistemática de hongos, ya que proporcionan una discriminación eficaz a nivel de especie.

El uso de secuencias ITS en la identificación molecular de hongos involucra varios pasos clave: extracción de ADN, amplificación de las regiones ITS mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación de los productos de PCR, y análisis bioinformático de las secuencias obtenidas. Este enfoque permite no solo identificar el patógeno, sino también estudiar la diversidad genética y la filogenia de las especies involucradas.

2.3.12. Árbol Filogenético

McCullough et al. (2020) señalan que un árbol filogenético es un diagrama que muestra las relaciones evolutivas entre diferentes especies o secuencias de ADN basadas en similitudes y diferencias en sus características físicas o genéticas.

Según Rivera Martínez (2020) es utilizado principalmente para entender la historia evolutiva de un conjunto de secuencias, que puede incluir genes, especies o cualquier otro nivel de organización biológica.

2.3.12.1. Componentes del Árbol Filogenético

- **Nodos:** Representan los puntos de divergencia de una especie u organismo de su ancestro común.
- **Ramas:** Indican la línea evolutiva, mostrando la relación entre los nodos y el ancestro.
- **Raíz:** Es el nodo más ancestral del árbol, de donde parten todas las ramas y que representa al ancestro común de todos los organismos en el árbol.
- **Hojas o hojas terminales:** Son los organismos o secuencias actuales que se analizan.
- **Longitud de la rama:** A menudo refleja la cantidad de cambio evolutivo o el tiempo transcurrido.

2.3.12.2. Tipos de Árboles Filogenéticos

Los árboles filogenéticos son representaciones gráficas que ilustran las relaciones evolutivas entre diferentes organismos o secuencias de ADN. Son esenciales para comprender cómo se relacionan las especies y cómo han evolucionado a lo largo del tiempo. A continuación, se detallan los dos tipos principales de árboles filogenéticos: enraizados y no enraizados.

Raíz del árbol filogenético (árbol enraizado)

Un árbol filogenético enraizado es un tipo de diagrama que incluye un nodo raíz que representa el ancestro común más reciente de todos los organismos o secuencias presentes en el árbol. Lemey et al. (2009) manifiesta que este tipo de árbol es esencial para inferir la dirección de la evolución y para entender el orden en el que se han producido las divergencias evolutivas. Un árbol filogenético enraizado podría mostrar cómo las diferentes especies de mamíferos han divergido a partir de un ancestro común, identificando momentos clave en su evolución, como la aparición de características distintivas como el pelaje o la capacidad de dar a luz a crías vivas.

Características:

- **Nodo raíz:** Actúa como el punto de origen desde el cual todas las demás ramas y nodos se desarrollan. Yang y Rannala (2012) señalan que este nodo representa el ancestro común de todos los organismos incluidos en el árbol, lo que permite a los investigadores rastrear la evolución desde un punto de partida común
- **Ramas:** Según Felsenstein (2004), las ramas del árbol representan la evolución de las especies o secuencias desde el ancestro común hacia los taxones actuales. La longitud de las ramas puede reflejar la cantidad de cambios evolutivos o el tiempo transcurrido desde la divergencia
- **Hojas o taxones terminales:** Representan las especies, genes, o secuencias que se están comparando. Cada hoja está conectada al nodo raíz a través de una serie de ramas que indican la historia evolutiva del organismo o secuencia (Hedges & Kumar, 2009).

Uso y Aplicaciones:

- **Evolución temporal:** Tamura et al., (2013) manifiestan que los árboles enraizados son útiles para estudiar cómo las especies han evolucionado a lo largo del tiempo, ya que permiten establecer un cronograma evolutivo claro

- **Análisis de linajes:** De acuerdo con Maddison y Maddison (2021) facilitan la identificación de linajes evolutivos y la comprensión de cómo ciertos rasgos o características han evolucionado a lo largo del tiempo
- **Mapeo de adaptaciones:** Permiten identificar adaptaciones específicas y su evolución a lo largo del tiempo, lo cual es crucial para estudios de biología evolutiva.

Árbol filogenético no enraizado

Un árbol filogenético no enraizado muestra las relaciones entre las hojas o taxones terminales, pero no indica la dirección evolutiva. Según Lemey et al. (2009) en lugar de tener un nodo raíz que represente el ancestro común, simplemente ilustra las similitudes y diferencias entre las secuencias o especies sin suponer un origen común específico. Un árbol filogenético no enraizado podría utilizarse para comparar la variabilidad genética entre diferentes cepas de un virus, mostrando las relaciones de similitud entre ellas sin intentar deducir cuál es la cepa ancestral o el orden en el que evolucionaron).

Características:

- **Ausencia de nodo raíz:** No se asume un punto de origen o ancestro común, lo que significa que no se puede inferir la dirección evolutiva desde este tipo de árbol.
- **Ramas:** Al igual que en los árboles enraizados, las ramas muestran la similitud o diferencia entre taxones, pero sin la implicación de una línea temporal o ancestral.
- **Relaciones de parentesco:** Se centra en las relaciones de parentesco entre las especies o secuencias sin hacer inferencias sobre el tiempo o el orden de divergencia.

Uso y aplicaciones:

- **Análisis exploratorios:** Útil para realizar análisis exploratorios donde la dirección evolutiva no es necesaria o donde se desea explorar relaciones sin asumir un ancestro común específico (Yang, 2006).
- **Estudios de diversidad:** Los árboles no enraizados son útiles en estudios que buscan entender la diversidad genética o fenotípica sin centrarse en un origen evolutivo específico (Hillis et al., 1993).

2.3.12.3. Relaciones evolutivas

Las relaciones evolutivas entre secuencias son inferidas utilizando diferentes métodos bioinformáticos que analizan las similitudes y diferencias genéticas. Para obtener una representación precisa de las relaciones, es necesario que todas las secuencias sean evaluadas bajo el mismo contexto evolutivo, lo cual implica usar métodos de alineación y modelos de evolución apropiados.

2.3.13. Herramientas bioinformáticas

Las herramientas bioinformáticas son esenciales para el análisis y manejo de datos moleculares. Software como BLAST para comparación de secuencias, MEGA para alineación y construcción de árboles filogenéticos, y otros programas especializados, facilitan la interpretación de los datos y la visualización de relaciones taxonómicas y filogenéticas.

2.3.13.1. Software MEGA

El software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) es una herramienta bioinformática ampliamente utilizada en biología evolutiva, genética y genómica para la realización de análisis filogenéticos y evolutivos.

Desarrollado inicialmente por Sudhir Kumar y otros colegas en la década de 1990, MEGA ha evolucionado para incluir una variedad de herramientas analíticas que permiten a los investigadores analizar secuencias de ADN y proteínas, construir árboles filogenéticos, y realizar estudios de divergencia evolutiva y selección natural.

Funcionalidades de MEGA

MEGA es conocido por su capacidad para manejar diversas tareas relacionadas con la genética evolutiva, entre las cuales se destacan:

- **Análisis filogenético:** MEGA permite construir árboles filogenéticos utilizando varios métodos, como Neighbor-Joining, Maximum Likelihood, y Maximum Parsimony. Esto facilita el estudio de las relaciones evolutivas entre diferentes especies o secuencias de genes.
- **Estimación de distancias evolutivas:** El software proporciona herramientas para calcular distancias evolutivas entre secuencias, lo cual es fundamental para evaluar la similitud genética y las tasas de mutación.
- **Análisis de Secuencias de ADN y Proteínas:** Permite la alineación de secuencias de ADN y proteínas, lo cual es crucial para identificar regiones conservadas y detectar variaciones genéticas significativas.
- **Evaluación de la diversidad genética:** Ofrece herramientas para evaluar la diversidad genética dentro y entre poblaciones, proporcionando información sobre la variabilidad genética y los patrones de selección natural.

Metodología y algoritmos

MEGA utiliza una variedad de algoritmos para llevar a cabo sus análisis:

- **Neighbor - Joining (NJ):** Un método utilizado para construir árboles filogenéticos basados en distancias, que es eficiente y rápido para grandes conjuntos de datos.
- **Maximum Likelihood (ML):** Proporciona un enfoque estadístico para la construcción de árboles filogenéticos, maximizando la probabilidad de observar los datos dados los modelos evolutivos propuestos.
- **Maximum Parsimony (MP):** Busca el árbol que requiere el menor número de cambios evolutivos, siendo útil para evaluar la simplicidad de las relaciones evolutivas.

Interfaz de usuario y usabilidad

MEGA se distingue por su interfaz de usuario intuitiva que permite a los usuarios realizar análisis complejos sin necesidad de conocimientos avanzados en programación. El software está disponible para diferentes plataformas, incluidas Windows, Mac OS, y Linux, lo que lo hace accesible para una amplia gama de usuarios en la comunidad científica.

Aplicaciones de MEGA

El software MEGA tiene aplicaciones en diversas áreas de la biología y la genética, tales como:

- **Investigación en evolución molecular:** Permite a los investigadores estudiar la historia evolutiva de genes y especies, identificando patrones de divergencia genética y eventos de especiación.
- **Genómica comparativa:** Ayuda a comparar genomas de diferentes especies para identificar genes homólogos y analizar su función evolutiva.
- **Estudios de conservación genética:** Facilita la evaluación de la diversidad genética en especies en peligro, proporcionando información crítica para estrategias de conservación.

Importancia de MEGA en la Investigación Científica

MEGA ha sido fundamental para avanzar en la comprensión de la evolución molecular y las relaciones filogenéticas. Su capacidad para integrar datos de secuencias con modelos evolutivos ha permitido a los científicos explorar preguntas complejas sobre la evolución y la diversidad biológica. Además, MEGA es una herramienta educativa valiosa, utilizada en universidades y centros de investigación para enseñar conceptos clave de biología evolutiva y genética.

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

3.1. Tipo y diseño de investigación

El diseño metodológico para la identificación molecular del hongo *L. theobromae* en cultivos de cacao CCN-51 utiliza un enfoque mixto que integra métodos cualitativos y cuantitativos. La fase cualitativa incluye el aislamiento del hongo y la observación de sus características, proporcionando una identificación preliminar y un contexto para el estudio. Por otro lado, la fase cuantitativa emplea marcadores moleculares ITS y análisis bioinformáticos para confirmar la identidad del hongo con precisión, mediante la extracción de ADN, amplificación, secuenciación y comparación de secuencias con bases de datos de referencia.

Este enfoque mixto es esencial para una identificación completa del patógeno. La combinación de datos cualitativos y cuantitativos permite validar los resultados y proporciona una visión integral del hongo en cuestión. La metodología asegura que la identificación del hongo sea precisa y confiable, abordando tanto sus características morfológicas como sus datos genéticos para una clasificación taxonómica y filogenética detallada.

Además, esta investigación es de tipo experimental porque se centra en la manipulación y análisis sistemático de variables para determinar la identidad molecular del hongo *L. theobromae*. En un estudio experimental, se realizan procedimientos controlados y replicables para obtener datos precisos y confiables. En este caso, el experimento incluye el aislamiento del hongo de muestras de cacao, la aplicación de técnicas moleculares para la amplificación y secuenciación de ADN, y el uso de herramientas bioinformáticas para el análisis filogenético.

3.2. Población y la muestra

La investigación se llevó a cabo en plantaciones de cacao CCN-51 situadas en el cantón Quevedo, provincia de Los Ríos, enfocándose en la identificación del hongo *L. theobromae*, causante de la enfermedad de mazorca negra. Para obtener datos representativos y confiables, se siguió un proceso meticuloso en el muestreo de las parcelas afectadas.

Primero, se realizó un reconocimiento de las plantaciones para identificar aquellas parcelas que mostraban signos evidentes de infección por *L. theobromae*. La selección de las parcelas afectadas se basó en la observación de síntomas visibles en las plantas de cacao, como manchas necróticas en hojas, ramas y frutos. Se priorizaron las parcelas con alta incidencia de la enfermedad para asegurar una representación adecuada del patógeno en el estudio.

Dentro de las parcelas seleccionadas, se procedió a la recolección de muestras de tejidos vegetales que presentaban síntomas característicos de infección. Se recogieron hojas, ramas y frutos con evidentes signos de daño por el hongo. Para cada muestra, se seleccionaron áreas representativas que mostraban tanto síntomas avanzados como iniciales de infección, con el fin de capturar la variabilidad del patógeno en diferentes etapas de desarrollo.

Una vez recolectadas, las muestras fueron transportadas al laboratorio bajo condiciones estrictas para minimizar el riesgo de contaminación y deterioro. Se utilizaron envases estériles y se mantuvo una temperatura controlada durante el transporte para preservar la integridad de las muestras. El manejo cuidadoso durante esta fase es crucial para garantizar la precisión en los análisis posteriores, permitiendo así una identificación molecular y caracterización precisa del hongo.

3.3. Los métodos y las técnicas

3.3.1. Métodos

La investigación sobre la identificación molecular del hongo *L. theobromae* en cultivos de cacao CCN-51 empleó los métodos inductivo, deductivo y analítico para estructurar y profundizar el estudio.

Método Inductivo: Este enfoque permitió desarrollar un análisis desde lo específico hacia lo general. En este caso, se comenzó con la observación de síntomas y características particulares en las plantaciones de cacao afectadas, lo que facilitó la identificación de variables clave relacionadas con la presencia y características del hongo *L. theobromae*. Este método ayudó a construir una visión general sobre cómo el patógeno afecta a los cultivos de cacao.

Método Deductivo: La aplicación de este método fue fundamental para identificar los efectos específicos de las características moleculares del hongo. A partir de la información general sobre *L. theobromae*, se dedujo cómo las características genéticas y morfológicas observadas podrían influir en la patogenicidad y en la interacción con el cacao. Este enfoque permitió responder preguntas específicas sobre el impacto del hongo en los cultivos y su clasificación taxonómica.

Método Analítico: Se utilizó para el análisis exhaustivo de los datos obtenidos a través de la identificación molecular y la caracterización del hongo. Este método facilitó la evaluación detallada de las variables relacionadas con la presencia de *L. theobromae* y permitió la interpretación de los resultados obtenidos en el laboratorio. A partir del análisis de estos datos, se elaboraron conclusiones precisas sobre la identidad y la clasificación del patógeno, contribuyendo así a una comprensión completa del problema investigado.

3.3.2. Técnicas

3.3.2.1. Preparación de la muestra

Recolección de Muestra: Se obtuvo un cultivo del hongo *L. theobromae* en un medio líquido nutritivo, asegurándose de que se encontrara en fase de crecimiento activo. Se tomó un fragmento representativo del tejido fúngico para el procesamiento posterior.

Preparación de la muestra: El fragmento de tejido del hongo se colocó en un microtubo de 1.5 mL, añadiendo entre 50 y 100 mg de muestra junto con tres perlas de vidrio para facilitar la disrupción mecánica del tejido.

Adición de buffer: Se incorporaron 500 μL de un buffer de extracción compuesto por CTAB, NaCl, EDTA y Tris-HCl, junto con 2 μL de β -mercaptoetanol para asistir en la lisis celular.

Disrupción mecánica: La muestra se procesó en un Bead Beater a alta velocidad durante 20 a 30 segundos. El proceso se repitió una o dos veces hasta obtener una completa maceración del tejido.

Incubación: La mezcla se incubó en un baño María a 60°C durante 30 minutos, con agitación cada 10 minutos para asegurar la homogeneización de la solución.

Extracción con cloroformo (CHCl_3): Se añadió 500 μL de CHCl_3 frío y se homogenizó la mezcla durante 30 segundos. Se dejó reposar durante 2 minutos para permitir la separación de las fases.

Centrifugación: La muestra se centrifugó a 14,500 g durante 5 a 8 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo de 1.5 mL para el siguiente paso.

Precipitación del ADN: Se añadió un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 μL de acetato de sodio 3M y 300 μL de etanol al 70% para inducir la precipitación del ADN. La mezcla se dejó reposar a -20°C durante al menos 2 horas o toda la noche.

Centrifugación final: Se centrifugó la mezcla a 14,500 g durante 14 a 17 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con 200 μL de etanol al 70% para eliminar contaminantes.

Secado y resuspensión: El pellet se secó en una cámara de flujo laminar durante 15 a 30 minutos y se resuspendió en 50-100 μL de agua ultrapura. Para eliminar el ARN, se añadió 1 μL de RNAsa y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Almacenamiento: Finalmente, las muestras de ADN se almacenaron a -20°C para su uso posterior en análisis y estudios adicionales.

3.3.2.2. Aislamiento del hongo

Desinfección superficial: Las muestras vegetales se sometieron a un proceso de desinfección superficial utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1-2 minutos para eliminar contaminantes superficiales. Posteriormente, se

sumergieron en alcohol etílico al 70% durante 1 minuto para asegurar una desinfección adicional. Finalmente, se lavaron con agua estéril para eliminar los residuos de los agentes desinfectantes.

Corte de fragmentos: Se procedió al corte de pequeños fragmentos de tejido de las áreas afectadas de las muestras vegetales. Se seleccionaron zonas claramente impactadas por la enfermedad para asegurar que los fragmentos contendrán el hongo *L. theobromae*.

Cultivo en medios selectivos: Los fragmentos de tejido se inocularon en medios de cultivo selectivos, como PDA (Potato Dextrose Agar), para favorecer el crecimiento del hongo. Se incubaron a una temperatura adecuada para permitir la proliferación de colonias fúngicas. La aparición y el crecimiento de colonias fueron observados y registrados para identificar la presencia y características del hongo.

3.3.2.3. Purificación del hongo

Para asegurar la pureza y uniformidad en el cultivo del hongo *L. theobromae*, se tomaron los siguientes pasos:

Selección de fragmentos puros: Se seleccionaron fragmentos de tejido que mostraban signos visibles de pureza, asegurándose de que provinieran de colonias libres de contaminación. Estos fragmentos se tomaron de las áreas de cultivo donde el crecimiento del hongo parecía uniforme y sin presencia de otros microorganismos.

Subcultivo en medios selectivos: Los fragmentos seleccionados se inocularon en medios de cultivo selectivos como PDA (Potato Dextrose Agar) para replicar el hongo en condiciones óptimas. Se estableció una serie de cultivos utilizando estos fragmentos para confirmar la pureza del hongo.

Observación del crecimiento: Se incubaron los cultivos bajo condiciones controladas y se observaron periódicamente. Se verificó el crecimiento uniforme del hongo en los medios de cultivo y se aseguraron de que no hubiera signos de contaminación por otros organismos. Solo se mantuvieron los cultivos que mostraron un crecimiento uniforme y sin contaminantes, garantizando así la pureza del cultivo para futuras investigaciones.

3.3.2.4. Caracterización morfológica

Observación Macroscópica: Se registraron las características visibles de las colonias de *L. theobromae* en PDA, incluyendo el color, la textura, la velocidad de crecimiento y la formación de estructuras reproductivas como conidios y picnidios.

Observación Microscópica: Se realizaron análisis detallados utilizando un microscopio para examinar la morfología de conidios, picnidios y otras estructuras celulares. Se documentaron el tamaño, la forma y la disposición de estas estructuras para confirmar la identidad del hongo y comparar con descripciones estándar.

3.3.2.5. Identificación molecular

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN genómico de las cepas de *L. theobromae*, se emplearon kits comerciales específicos o protocolos estándar de extracción de ADN. Estos kits o métodos están diseñados para aislar el ADN de alta calidad a partir de tejidos fúngicos, garantizando la integridad del material genético para los análisis posteriores. La extracción se realizó siguiendo los procedimientos recomendados por los fabricantes o protocolos establecidos, que incluyen la ruptura celular, la eliminación de contaminantes y la recuperación del ADN en una solución adecuada. Este paso es crucial para obtener un ADN limpio y de buena calidad que permita una amplificación y análisis molecular precisos.

Amplificación de Regiones ITS

Para la amplificación de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN fúngico, se utilizaron primers universales ITS1 e ITS4. Estos primers están diseñados para reconocer y amplificar regiones específicas del ADN ribosómico que son conservadas entre diversas especies de hongos, facilitando así la identificación molecular. La amplificación se realizó mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), un proceso que permite la duplicación exponencial de las regiones objetivo del ADN. El ciclo de PCR incluye etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión, permitiendo obtener suficientes copias del ADN para su análisis posterior.

Secuenciación de ADN

Una vez obtenidos los productos de PCR, estos se purificaron para eliminar contaminantes y residuos de reactivos. La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas como la extracción con columnas de filtración o kits de purificación específicos. Los productos purificados fueron enviados a un servicio especializado en secuenciación de ADN, donde se determinó la secuencia exacta de las regiones amplificadas.

Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando la herramienta bioinformática MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Este análisis incluyó la comparación de las secuencias con bases de datos de referencia para la identificación taxonómica y la construcción de árboles filogenéticos para determinar la relación evolutiva del hongo. El uso de software en cuestión permitió interpretar los datos de manera precisa y proporcionar una identificación molecular detallada del hongo *L. theobromae*.

3.3.2.6. Análisis taxonómico y filogenético

Análisis Bioinformático

Ensamblaje y edición de secuencias ITS: Una vez obtenidas las secuencias de ADN, se realizó el ensamblaje y edición de las secuencias ITS utilizando el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Este software permite alinear y combinar secuencias fragmentadas para obtener una secuencia continua y de alta calidad. El proceso incluye la corrección de errores y la eliminación de secuencias de baja calidad, asegurando que los datos estén listos para el análisis comparativo y filogenético.

Comparación con bases de datos públicas: Las secuencias obtenidas fueron comparadas con bases de datos públicas de secuencias de ADN, como GenBank. Utilizando herramientas de alineamiento y búsqueda como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), se identificaron las coincidencias más cercanas y se verificó la identidad de las secuencias con especies previamente descritas. Esta comparación permitió la identificación taxonómica precisa y la validación de la presencia del hongo *L. theobromae* en las muestras analizadas.

Construcción de Árboles Filogenéticos

Alineación de secuencias: Para construir árboles filogenéticos, se alinearon las secuencias obtenidas utilizando herramientas de alineamiento como ClustalW o MAFFT. Estos programas permitieron comparar múltiples secuencias de ADN para identificar regiones conservadas y divergentes, proporcionando una base para el análisis filogenético.

Construcción de árboles filogenéticos: Con las secuencias alineadas, se construyeron árboles filogenéticos utilizando métodos de máxima verosimilitud o inferencia bayesiana, implementados en el software MEGA. Estos métodos estadísticos permiten estimar las relaciones evolutivas entre las secuencias y visualizar cómo el hongo *L. theobromae* se relaciona con otras especies dentro del mismo grupo taxonómico. La construcción de estos árboles proporcionó una representación gráfica de las relaciones evolutivas y ayudó a confirmar la clasificación del hongo en función de sus características genéticas.

3.3.3. Pruebas de patogenicidad de *L. theobromae* en mazorcas de cacao CCn-51

Se utilizaron 15 mazorcas en un estado de maduración incipiente, las cuales fueron inoculadas con el hongo.

Previamente a la inoculación, las mazorcas fueron lavadas y desinfectadas. Posteriormente, se realizaron dos raspados circulares, uno cerca del pedúnculo y otro cerca del ápice de cada mazorca, en cada raspado se colocó un trozo de cultivo puro de *L. theobromae*, dentro de la cabina de flujo laminar tratando de mantener un ambiente estéril. Luego fueron colocadas individualmente dentro una bolsa plástica sobre una toalla empapada de agua destilada para mantener la humedad y favorecer el desarrollo del hongo.

3.4. Validez y confiabilidad de los métodos

La validez del estudio radica en la adecuada elección y aplicación de los métodos, técnicas y herramientas, asegurando que los resultados obtenidos reflejan con precisión la realidad investigada.

- **Técnicas estandarizadas:** Las técnicas empleadas, como la extracción de ADN, PCR y secuenciación, son protocolos ampliamente reconocidos y utilizados en la comunidad científica. Esto garantiza que los resultados sean consistentes y comparables con otros estudios.
- **Pruebas de patogenicidad:** La inoculación controlada en mazorcas de cacao asegura que se confirme experimentalmente el papel de *L. theobromae* como agente causal, alineándose con los postulados de Koch.
- **Análisis bioinformático riguroso:** La comparación de secuencias con bases de datos públicas y la construcción de árboles filogenéticos mediante herramientas como MEGA valida la identificación molecular y asegura la precisión taxonómica.

La confiabilidad del estudio se garantiza mediante la replicabilidad de los métodos y la minimización de errores experimentales.

Recolección y manejo de muestras:

- Las muestras fueron seleccionadas y procesadas bajo condiciones estériles, asegurando que el ADN extraído sea representativo y libre de contaminación.
- Los pasos de aislamiento, purificación y preparación de muestras siguieron procedimientos estándar que pueden ser reproducidos.

Protocolos estandarizados:

Los métodos empleados, como la amplificación de regiones ITS y la secuenciación de ADN, están diseñados para minimizar la variabilidad experimental y permitir resultados consistentes en repeticiones.

Control de calidad en el análisis molecular:

- La utilización de controles positivos y negativos durante la PCR garantiza la detección de errores en la amplificación.
- Los datos de secuenciación fueron depurados y comparados con bases de datos confiables, reduciendo el margen de error en la identificación.

Condiciones experimentales controladas:

Las pruebas de patogenicidad y el cultivo del hongo se llevaron a cabo en ambientes controlados (cabina de flujo laminar y humedad controlada), asegurando que los resultados reflejen el comportamiento natural del patógeno bajo condiciones específicas.

La investigación presenta alta validez y confiabilidad gracias a la elección de métodos rigurosos, técnicas estandarizadas y controles estrictos en todas las etapas. Esto asegura que los resultados obtenidos sean precisos, reproducibles y aplicables en el contexto agrícola del cacao en Ecuador.

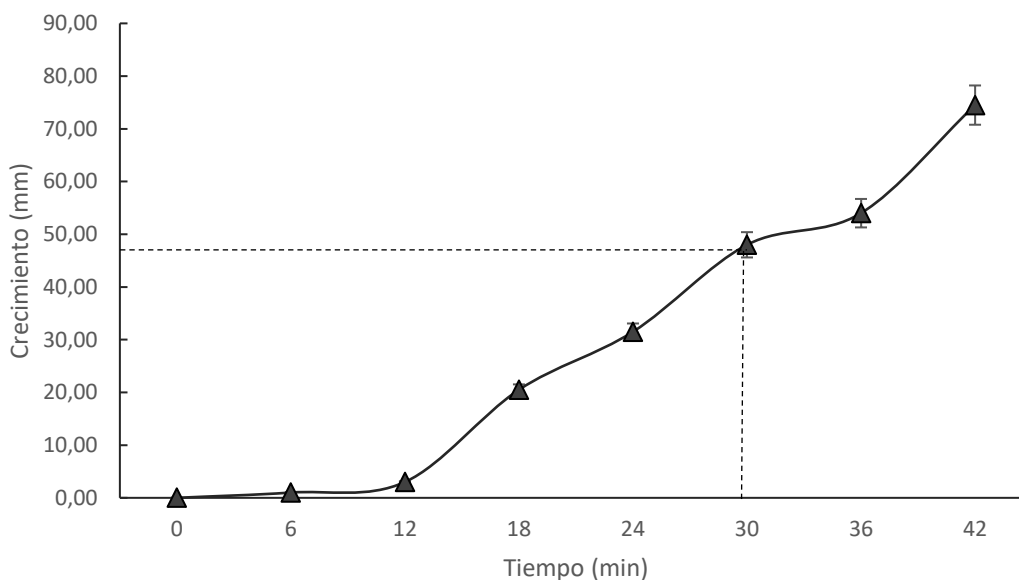
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados

4.1. Crecimiento del hongo

Se presenta el crecimiento del hongo *L. theobromae* en tres muestras diferentes, medido en milímetros, a lo largo de un periodo de 42 horas. Inicialmente, no se observa crecimiento a las 0 horas, pero en las primeras 6 horas, las muestras comienzan a desarrollar entre 1,00 y 2,00 mm. A las 12 horas, el crecimiento continúa con un promedio de entre 3,00 y 4,50 mm. El avance es significativo a las 18 horas, donde se registra un crecimiento cercano a los 20 mm en las tres muestras. A las 24 horas, el hongo muestra un crecimiento homogéneo de 31,50 mm en todas las muestras. En las siguientes horas, el crecimiento se acelera notablemente, alcanzando los 74,50 mm a las 42 horas. Este patrón sugiere un rápido desarrollo del hongo en las primeras 24 horas, con una aceleración marcada después de las 18 horas.

Figura 1

Crecimiento del hongo muestra 1

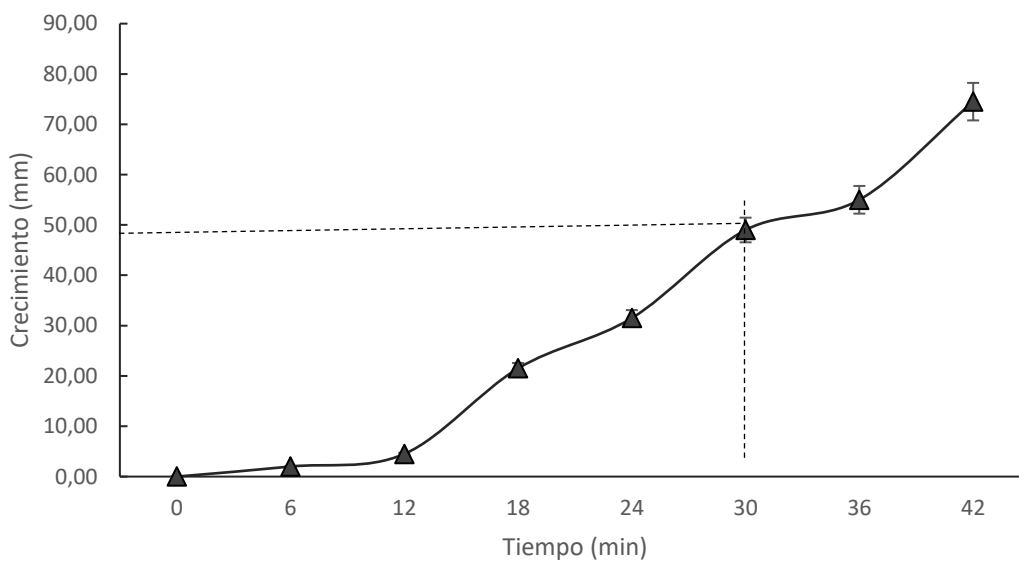


Nota. La tabla muestra el crecimiento de la muestra 1 del hongo durante 42 horas, elaborado por Palacios (2024)

La Muestra 1 exhibe un crecimiento lento durante las primeras 12 horas, seguido de una expansión rápida a partir de las 18 horas, donde el hongo entra en una fase de crecimiento acelerado y consistente. La muestra alcanza su mayor crecimiento en las últimas horas del experimento, con un comportamiento similar al de otras muestras en términos de velocidad de expansión a largo plazo.

Figura 2

Crecimiento del hongo muestra 2

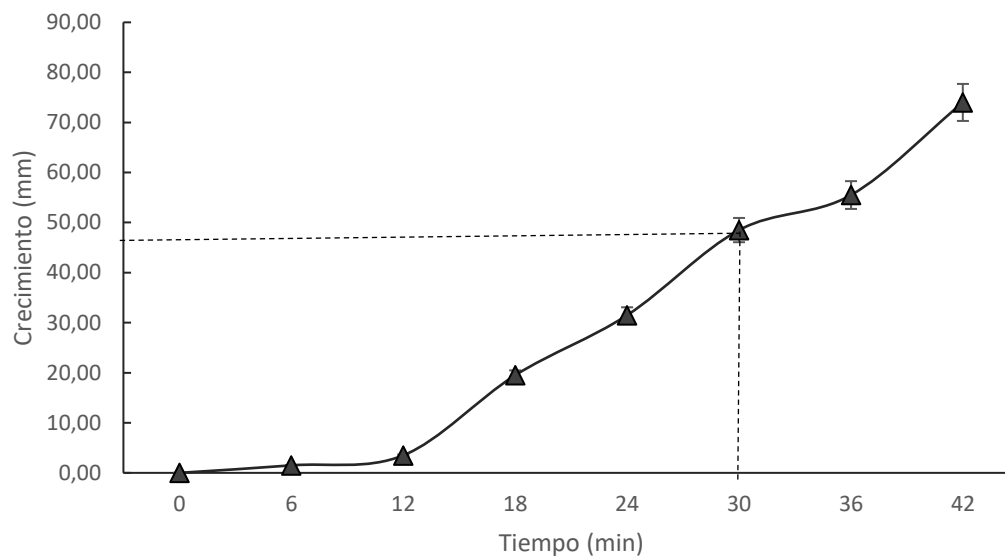


Nota. La tabla muestra el crecimiento de la muestra 2 del hongo durante 42 horas, elaborado por Palacios (2024)

La Muestra 2 muestra un crecimiento significativo, con un patrón de desarrollo rápido desde las 18 horas similar al de la muestra 1, lo que indica que el hongo se desarrolla con mayor velocidad una vez que ha superado las primeras fases de colonización del medio.

Figura 3

Crecimiento del hongo muestra 3



Nota. La tabla muestra el crecimiento de la muestra 3 del hongo durante 42 horas, elaborado por Palacios (2024)

La muestra 3 sigue un patrón de crecimiento rápido y consistente, particularmente a partir de las 18 horas, donde se aprecia una expansión más pronunciada que se mantiene hasta el final del experimento. Esto indica que el hongo muestra un comportamiento de crecimiento agresivo una vez que ha superado las primeras fases de colonización del medio.

4.2. Caracterización morfológica

4.2.1. Descripción de la morfología macroscópica

Se observó un crecimiento celular total de la placa en un tiempo de 42 horas en medio de cultivo PDA, presentando un color blanco en forma de algodón, a medida que aumenta su desarrollo micelial va tornándose color gris a partir de los siete días hasta volverse color negruzco. Los picnidios se empiezan a observar en la transición del gris al negruzco.

Ilustración 1

Vista macroscópica del hongo



Nota. Vista macroscópica del hongo, elaborado por Palacios (2024)

4.3. Características de las colonias

4.3.1. Microscópicas

Conidios: Mediante el microscopio se pudieron observar los conidios de *L. theobromae* en sus etapas iniciales, los conidios son unicelulares y hialinos. A medida que maduran, los conidios se vuelven bicelulares y adoptan una coloración marrón oscuro debido al engrosamiento de sus paredes celulares.

Ilustración 2

Conidio Lasidiplodia Theobromae



Nota. La ilustración muestra los conidios de *L. Theobromae*, elaborado por Palacios (2024)

Los conidios presentan una forma elíptica a ovoide, con extremos redondeados y paredes lisas, lo que les proporciona una estructura uniforme y resistente. A medida que el conidio madura, una de las características que permite diferenciarlo de su etapa inicial es la formación de un septo transversal. Este septo actúa como una pared divisoria interna, que separa el conidio en dos células distintas, señalando el paso de un estado unicelular a uno bicelular. Este proceso de maduración es crucial para su función reproductiva, ya que permite una mayor supervivencia y dispersión del hongo en su entorno.

Hifas: Se observaron también las hifas en su estructura micelial, tienen formas filamentosas de paredes gruesas y se encuentran ramificadas lo cual les ayuda a expandirse rápidamente en su hospedero, al igual que los conidios, las hifas son hialinas en etapa temprana y se volvieron color marrón después de los siete días de crecimiento.

Ilustración 3

Hifas de *L. Theobromae*



Nota. La ilustración muestra las hifas de *L. Theobromae*, elaborado por Palacios (2024)

Conidióforos: Se apreciaron estructuras filamentosas poco pigmentadas cortas que surgen de las hifas, son hialinos y se tornan más pigmentados con la madurez del hongo.

Ilustración 4

Conidióforo de *L. Theobromae*



Nota. La ilustración muestra los conidióforos de *L. Theobromae*, elaborado por Palacios (2024)

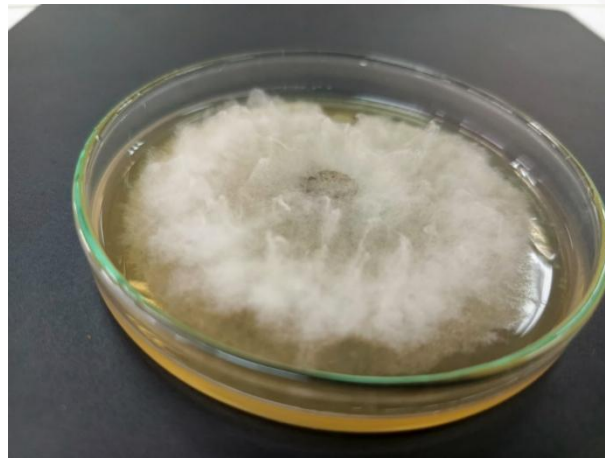
El proceso de maduración de los conidios, que comienza como unicelulares e hialinos para volverse bicelulares y marrones, es un rasgo distintivo de *L. theobromae*, ya reportado en estudios morfológicos previos (Alves et al., 2008). Además, las hifas gruesas y ramificadas observadas coinciden con estudios de Ismail et al. (2013), quienes también documentaron que esta estructura es crucial para la colonización agresiva de los tejidos vegetales, lo que refuerza la naturaleza invasiva del hongo.

4.3.2. Macroscópicas

Picnidios: Se apreciaron claramente ya que a nivel macroscópico forman pequeñas protuberancias de color negro que sobresale del negruzco que ya ha formado en el medio, esta coloración se debe a la melanina en sus paredes. Los picnidios se observaron dispersos y pocas veces agrupados, su textura es más dura al tacto y es donde se liberan en mayor cantidad los conidios.

Ilustración 5

Vista macroscópica de *L. Theobromae*

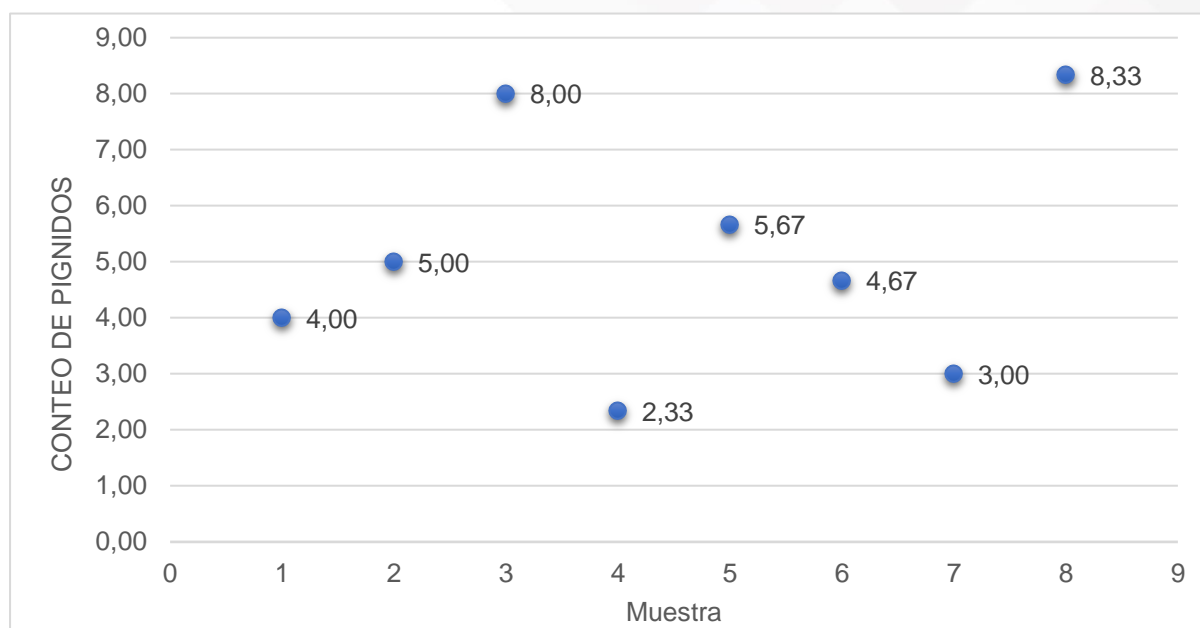


Nota. La ilustración muestra una vista macroscópica de *L. Theobromae*, elaborado por Palacios (2024)

Los picnidios son fundamentales para la reproducción del hongo, ya que son los lugares donde se liberan en mayor cantidad los conidios, las esporas asexuales que permiten la propagación del hongo. Este proceso de liberación puede ocurrir durante condiciones ambientales favorables, facilitando así la diseminación del hongo a nuevas áreas. La observación de estas estructuras no solo es crucial para identificar la presencia del patógeno, sino también para comprender su ciclo de vida y potencial impacto en el cultivo afectado.

Figura 4

Medición de picnidios



Nota. La figura evidencia la medición de picnidios de 8 muestras en 3 repeticiones, el promedio y varianza, elaborado por Palacios (2024)

La morfología macroscópica del hongo observada en las pruebas, desde el rápido crecimiento micelial blanco hasta su oscurecimiento, es consistente con estudios previos. Se ha reportado que *L. theobromae* desarrolla un micelio inicialmente blanco que se torna gris y finalmente negro debido a la producción de melanina (Burgess et al., 2006). La formación de picnidios observada a partir del séptimo día en este estudio coincide con lo descrito por Alves et al. (2008) y Batista et al. (2014), quienes identificaron esta característica como clave para la identificación del patógeno y su ciclo de vida.

4.4. Identificación molecular mediante secuenciación ITS

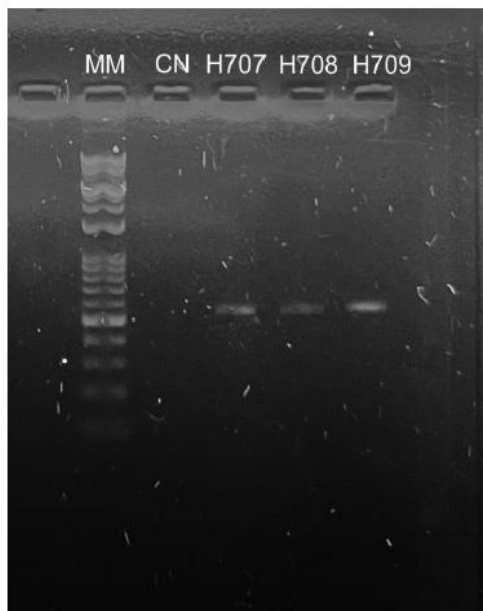
4.4.1. Extracción de ADN y amplificación

Al extraer ADN de las muestras obtuvimos una pureza del 98.8% para JPH707, 98.0% para JPH708 y 99.2% JPH709, considerándose así de alta calidad para el proceso de amplificación, visualizándose bandas de aproximadamente 300 pares de bases correspondientes al marcador ITS (Ilustración 3). Las lecturas obtenidas a partir de la

secuenciación SANGER permitieron identificar la cepa fúngica mediante el análisis de las secuencias resultantes.

Ilustración 6

Visualización en gel de agarosa 1% de amplificación



Nota. Visualización en gel de agarosa 1% de amplificación indicando fragmentos de aproximadamente 500 pb amplificados con primers ITS1/ITS4 para las muestras. L: Marcador de peso molecular de 100 pb, elaborado por Palacios (2024)

Tabla 2

Resultados de la amplificación de la región ITS

Código	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	N de accesoión
JPH707	1	511	98,8	<i>L. Theobromae</i>	ITS	99,72	KJ677239.1
JPH708	2	544	98,0	<i>L. Theobromae</i>	ITS	99,42	OQ132550.1
JPH709	3	475	99,2	<i>L. Theobromae</i>	ITS	99,79	MK813953.1

Nota. La tabla muestra Resultados de la amplificación de la región ITS, elaborado por Palacios (2024)

Los resultados presentados en la tabla muestran la amplificación y secuenciación de la región ITS de tres muestras del hongo *L. theobromae*, con variaciones en la longitud de los fragmentos y la calidad de las secuencias obtenidas.

- La muestra 1 (JPH707) tiene una longitud de secuencia de 511 pb y una calidad del 98,8%, con una identidad del 99,72% respecto a la secuencia de referencia registrada en el GenBank bajo el número de accesión KJ677239.1. Esto sugiere una alta confiabilidad en la secuencia obtenida y una correspondencia casi completa con el organismo identificado.
- La muestra 2 (JPH708) presenta una mayor longitud de secuencia, 544 pb, pero una calidad ligeramente inferior, con un 98,0%. El porcentaje de identidad es del 99,42% en comparación con la secuencia OQ132550.1, lo que indica una correspondencia sólida, aunque con una menor calidad que la muestra anterior.
- La muestra 3 (JPH709) tiene una longitud de 475 pb, la más corta de las tres, pero con una calidad superior del 99,2% y el porcentaje de identidad más alto, 99,79%, en referencia a la secuencia MK813953.1.

La calidad promedio de las secuencias es alta, situándose entre 98,0% y 99,2%, lo que asegura que los datos obtenidos son confiables para la identificación del organismo. Las diferencias en la longitud de los fragmentos podrían estar asociadas a ligeras variaciones en el proceso de amplificación o secuenciación, sin afectar significativamente la identificación del hongo. El alto porcentaje de identidad (todos superiores al 99,4%) confirma la presencia de *L. theobromae* en las tres muestras, consolidando su correcta identificación.

4.4.2. Pureza en la calidad de secuenciación

Los resultados de pureza superior al 98% indican que el ADN obtenido es prácticamente libre de contaminantes de otras especies o de material genético no deseado. Esto mejora significativamente la fiabilidad de las secuencias obtenidas de ITS1 e ITS4, ya que las secuencias deberían reflejar de manera precisa el genoma de *L. theobromae* sin interferencias de ADN extraño.

La alta pureza respalda la confianza en la identificación de la cepa fúngica. Si las secuencias ITS obtenidas se alinean bien con las secuencias de referencia para *L. theobromae* en bases de datos, podemos estar seguros de que la identificación es correcta y no está comprometida por contaminaciones.

La pureza elevada minimiza la posibilidad de errores en la secuenciación que podrían ser causados por ADN contaminante, como la aparición de picos adicionales o ruidos en los cromatogramas, lo que es crucial para garantizar que los resultados obtenidos sean específicos para *L. theobromae*.

4.4.2.1. Longitud de las secuencias

La longitud de las secuencias varía entre 475 y 544 pares de bases (pb), lo que indica que se logró obtener fragmentos de ADN de tamaño considerable en todas las muestras.

- Muestra 1 (JPH707): 511 pb
- Muestra 2 (JPH708): 544 pb
- Muestra 3 (JPH709): 475 pb

4.4.2.2. Calidad de las secuencias

La calidad de las secuencias es alta en todas las muestras, con valores que oscilan entre 98,0 y 99,2. Estos valores indican que las secuencias obtenidas son confiables y de alta calidad, lo cual es esencial para asegurar la precisión en la identificación del organismo.

- Muestra 1: 98,8
- Muestra 2: 98,0
- Muestra 3: 99,2

4.4.3. Identificación del organismo

Todas las secuencias corresponden al hongo *L. theobromae*, lo que confirma la presencia de este organismo en las muestras analizadas. El fragmento secuenciado

es la región ITS (Internal Transcribed Spacer), que es una región altamente utilizada para la identificación de hongos debido a su variabilidad entre especies.

La secuenciación de la región ITS fue un método confiable para la identificación de *L. theobromae*, confirmando su presencia en las muestras con identidades superiores al 99%. Este resultado es coherente con otros estudios que utilizaron ITS como marcador molecular para la identificación de especies del género *Lasiodiplodia* (Alves et al., 2008; Phillips et al., 2013). En particular, las longitudes de los fragmentos secuenciados (475-544 pb) son consistentes con estudios anteriores, que también reportaron fragmentos de ITS variables dentro del rango esperado (Slippers et al., 2013).

4.4.3.1. Porcentaje de identidad

El porcentaje de identidad con secuencias depositadas en bases de datos públicas es alto, lo que sugiere una correspondencia casi exacta con secuencias previamente identificadas de *L. theobromae* y *L. brasiliensis*. Para rectificar estos datos se usó la herramienta BLAST del NCBI obteniendo mayor similitud con *L. theobromae*.

Tabla 3

Porcentaje de identidad con secuencias depositadas en bases de datos públicas en tres muestras

MUESTRA	ESPECIE	Cepa	%similitud
JPH707	<i>L. theobromae</i>	HP1, B838, B961, LK3-2	99,61
JPH708	<i>L. theobromae</i>	C3346P, AF15,C3340P	99,45
JPH709	<i>L. theobromae</i>	YY12, YY5, G01, EN-5	100,00

Nota. La tabla muestra el porcentaje de identidad con secuencias depositadas en bases de datos públicas en tres muestras

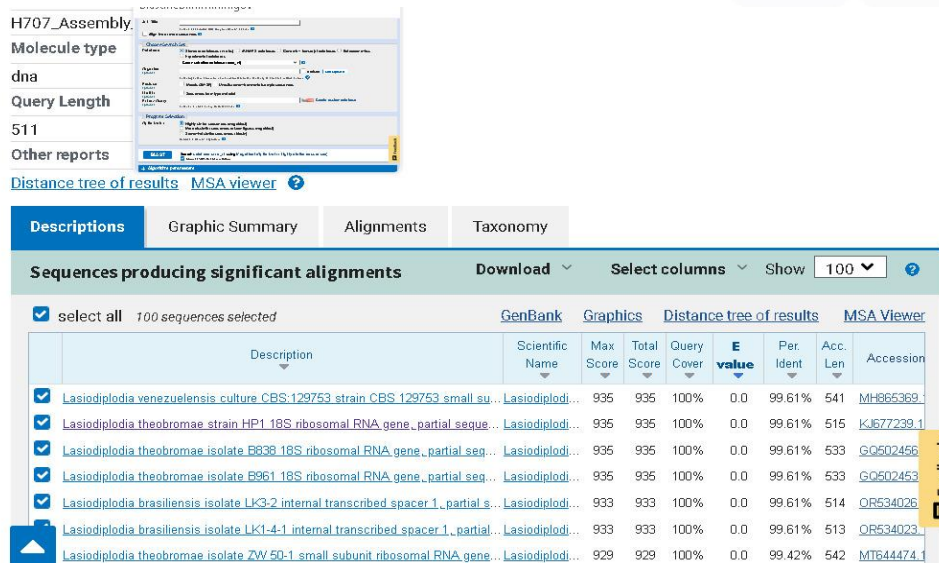
4.4.3.2. Similitud con Cepas Conocidas

En el estudio de la diversidad genética de *L. theobromae*, la comparación entre distintas cepas permite identificar las relaciones evolutivas y las variaciones genéticas que pueden influir en su comportamiento patogénico. Utilizando técnicas de secuenciación y análisis filogenéticos, es posible agrupar cepas de acuerdo con su

similitud genética, lo que proporciona información valiosa sobre su origen común y potencial patogénico. Este tipo de análisis es crucial para entender cómo un patógeno como *L. theobromae* se adapta a diferentes condiciones ambientales y hospederos, lo que a su vez influye en su capacidad de causar enfermedades en los cultivos.

Figura 5

Blast para Muestra JPH707



Nota. La figura muestra Blast para Muestra JPH707, elaborado por Palacios (2024)

En este contexto, la muestra JPH707 presenta una alta similitud genética con las cepas HP1, B838, B961 y LK3-2, mostrando un porcentaje de similitud del 99,61%. Este alto grado de homología indica que estas cepas comparten una gran parte de su material genético, lo que sugiere que podrían tener características patogénicas similares y desempeñar roles comparables en los procesos infecciosos en plantas hospedadoras. La similitud cercana al 100% subraya la estabilidad genética de estas cepas y refuerza la posibilidad de que compartan mecanismos comunes de virulencia y adaptación.

Figura 6

Blast para muestra JPH708

H708_Assembly_consensus_sequence 2 | ...
Molecule type
dna
Query Length
544
Other reports
[Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments | Download | Select columns | Show 100

select all 100 sequences selected | [GenBank](#) | [Graphics](#) | [Distance tree of results](#) | [MSA Viewer](#)

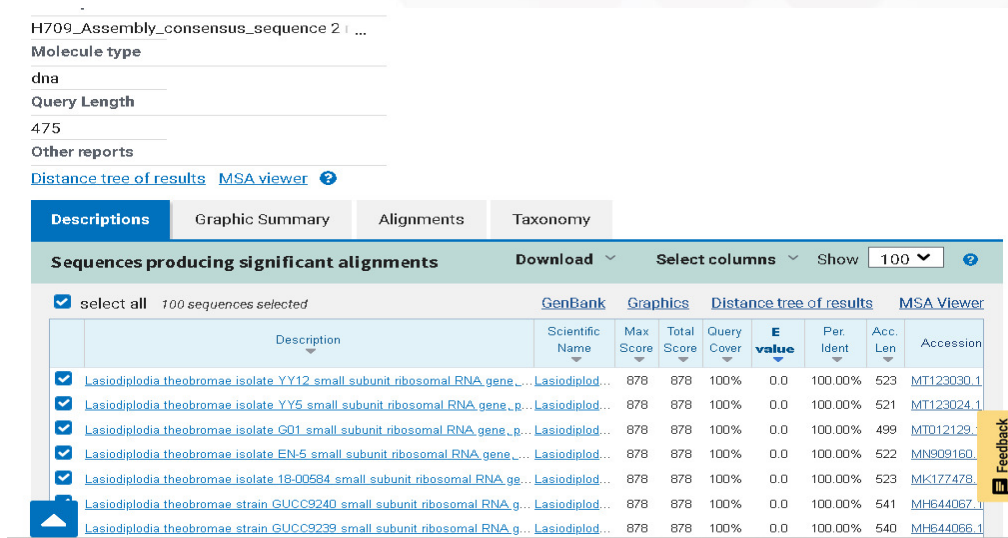
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Lasiodiplodia theobromae isolate C3346P small subunit ribosomal RNA gene...	Lasiodiplodi...	990	990	100%	0.0	99.45%	556	OQ132550.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lasiodiplodia theobromae strain AF15 small subunit ribosomal RNA gene, p...	Lasiodiplodi...	990	990	100%	0.0	99.45%	550	OP787500.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lasiodiplodia theobromae strain AF07 small subunit ribosomal RNA gene, p...	Lasiodiplodi...	990	990	100%	0.0	99.45%	548	OP787494.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lasiodiplodia theobromae strain AF04 small subunit ribosomal RNA gene, p...	Lasiodiplodi...	990	990	100%	0.0	99.45%	548	OP787493.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lasiodiplodia theobromae isolate C3340P small subunit ribosomal RNA gene...	Lasiodiplodi...	989	989	99%	0.0	99.45%	554	OQ132547.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lasiodiplodia theobromae strain DF257 small subunit ribosomal RNA gene...	Lasiodiplodi...	987	987	100%	0.0	99.27%	549	OQ657927.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lasiodiplodia theobromae strain AF39 small subunit ribosomal RNA gene, p...	Lasiodiplodi...	987	987	100%	0.0	99.27%	549	OP787518.1

Nota. La figura muestra Blast para Muestra JPH708, elaborado por Palacios (2024)

La muestra JPH708 (Figura 5) también muestra una alta similitud con las cepas C3346P, AF15, y C3340P en un 99.45%, aunque la similitud es ligeramente menor que la de JPH707, sigue siendo muy alta.

Figura 7

Blast para Muestra JPH709



Nota. La figura muestra Blast para Muestra JPH709, elaborado por Palacios (2024)

La muestra JPH709 (Figura 6) tiene un 100% de similitud con las cepas YY12, YY5, G01, y EN-5, lo que significa que esta muestra es idéntica a estas cepas en la región ITS. Este resultado es muy significativo, ya que indica una correspondencia exacta con las cepas de referencia.

La alta similitud (99,45%-100%) con las cepas conocidas de *L. theobromae* significa que las secuencias obtenidas son muy confiables y que la identificación del hongo cuestión son altamente fiables. Este tipo de análisis es crucial para establecer la relación filogenética entre las cepas y para confirmar la identidad de los microorganismos presentes en las muestras.

El uso de la técnica BLAST para comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en GenBank proporcionó un alto porcentaje de identidad, superando el 99.4%, lo que confirma la correcta identificación de las cepas de *L. theobromae*. Este resultado coincide con trabajos como el de Slippers et al. (2013), quienes utilizaron la misma metodología para identificar especies del complejo *Botryosphaeriaceae*, al que pertenece *L. theobromae*.

4.4.3.3. Número de Accesoión

Cada secuencia ha sido depositada en una base de datos pública y se le ha asignado un número de accesoión único:

- Muestra 1: KJ677239.1
- Muestra 2: OQ132550.1
- Muestra 3: MK813953.1

Tabla 4

Análisis de los datos de ITS

MUESTRA	INDICADOR	BASE SPACING	SCANS	NUCLEOTIDOS				
				BASES	GUANINA	ADENINA	CITOCINA	TIMINA
JPH707	ITS1	15,922697	18681	1514	2232	2571	4351	3165
	ITS4	16,034012	16965	1459	4174	5436	8024	5624
JPH708	ITS1	16,106907	17860	1468	824	1191	1772	1410
	ITS4	16,192324	14606	1043	1308	1094	2810	2014
JPH709	ITS1	16,045504	9130	761	81	113	162	141
	ITS4	15,946584	16613	1401	2997	3619	5243	3830

Nota. La tabla muestra el análisis de los datos de ITS, elaborado por Palacios (2024)

4.4.3.4. Calidad y cantidad de secuencias

Base Spacing: Este valor se refiere a la distancia promedio entre los picos en un cromatograma de secuenciación. El espaciado de bases es bastante estable entre las muestras y los marcadores, con un valor promedio de 16 indicando que los nucleótidos se incorporaron de manera uniforme durante la extensión de la cadena

Los valores de espaciado de bases entre 15,9 y 16,2 son valores consistentes entre todas las muestras y ambos marcadores ITS. Este parámetro indica el espaciado promedio de nucleótidos en la secuenciación, y su consistencia sugiere que no hubo problemas significativos de resolución en el proceso de secuenciación. Valores cercanos a 16 son típicos de secuencias SANGER de alta calidad.

Scans: El número de escaneos es una medida de la cobertura o profundidad de secuenciación. Un mayor número de escaneos puede indicar una mejor cobertura y, por lo tanto, una mayor confiabilidad en la secuencia obtenida. Los números de escaneos varían considerablemente entre las muestras y los marcadores. La muestra JPH707 tiene un número notablemente más alto de escaneos en comparación con JPH709, lo que podría indicar una mayor cobertura o calidad de secuencia en JPH707, especialmente para ITS1.

Se observa que la muestra JPH707 tiene el mayor número de escaneos para ambos marcadores (ITS1 e ITS4), lo que sugiere que esta muestra proporcionó las secuencias más completas y posiblemente más precisas. En contraste, JPH709 tiene un número significativamente menor de escaneos en ITS1, lo que podría indicar problemas en la amplificación o secuenciación de esta región, resultando en una cobertura insuficiente y, por ende, en secuencias potencialmente menos fiables a pesar de su alta pureza.

4.4.4. Composición Nucleotídica

Muestra JPH707

ITS1: 1514 bases con una alta cantidad de guanina (2232) y adenina (2571) en relación a la citocina y timina. La proporción más alta de nucleótidos purínicos (A y G) podría indicar regiones conservadas importantes en la secuencia. Esta estructura podría ser esencial para una correcta alineación en bases de datos, ya que estas regiones tienden a ser más estables.

ITS4: En ITS4, se observa un aumento notable de citocina y timina, con un total de 8024 citocinas, mucho mayor que en ITS1. Esto sugiere que ITS4 puede tener una estructura diferente con regiones más ricas en pirimidinas, lo cual podría reflejar diferencias en la variabilidad y evolución del marcador ITS4.

4.4.4.1. Muestra JPH708

ITS1: En esta muestra, ITS1 presenta una proporción más equilibrada de los cuatro nucleótidos, pero con una cantidad particularmente baja de guanina (824) en comparación con adenina (1191). Esta diferencia puede estar relacionada con un

fragmento más variable de la región ITS1, donde la proporción de GC es más baja, lo que podría reflejar una mayor variabilidad en esta secuencia.

ITS4: La composición de ITS4 muestra una mayor proporción de citocina (2810), lo que es consistente con las observaciones en otras muestras. Este marcador parece tener una tendencia hacia una mayor proporción de citocina en comparación con ITS1, lo que podría estar relacionado con diferencias estructurales entre las dos regiones del ADN ribosomal.

4.4.4.2. Muestra JPH709

ITS1: Presenta el menor número de bases secuenciadas (761) y una composición nucleotídica atípica, con solo 81 guaninas y una baja cantidad de adenina. Esto podría ser indicativo de una secuencia incompleta o de baja calidad, posiblemente debido a problemas en la amplificación o en la preparación del ADN. Es posible que ITS1 en esta muestra no haya sido suficientemente amplificada, lo que explicaría las bajas cantidades de nucleótidos detectados.

ITS4: En contraste, ITS4 de JPH709 muestra un rendimiento mucho mejor, con 5243 citocinas y 3830 timinas, sugiriendo que la región ITS4 se amplificó y secuenció de manera más efectiva. Esto podría implicar que ITS4 en esta muestra es más representativa de la identidad genética de la cepa.

4.5. Análisis filogenético

El análisis presenta un árbol filogenético construido con las secuencias obtenidas y de referencia, destacando la posición de *L. theobromae* en su clado correspondiente. Esto confirma su relación filogenética con especies cercanas y su correcta identificación. La inclusión de secuencias de referencia refuerza la comparación y permite entender su proximidad evolutiva con otros hongos del mismo género, mostrando claras divergencias con especies más distantes.

En el árbol filogenético, *L. theobromae* JPH707 y JPH708 se agrupan con otras cepas de la misma especie, como *L. theobromae* EA2, EB2, TP2 y DPI2, lo que indica una alta similitud genética y características patogénicas similares. La diferencia genética entre ellas es mínima, aunque algunas variaciones sutiles podrían reflejar

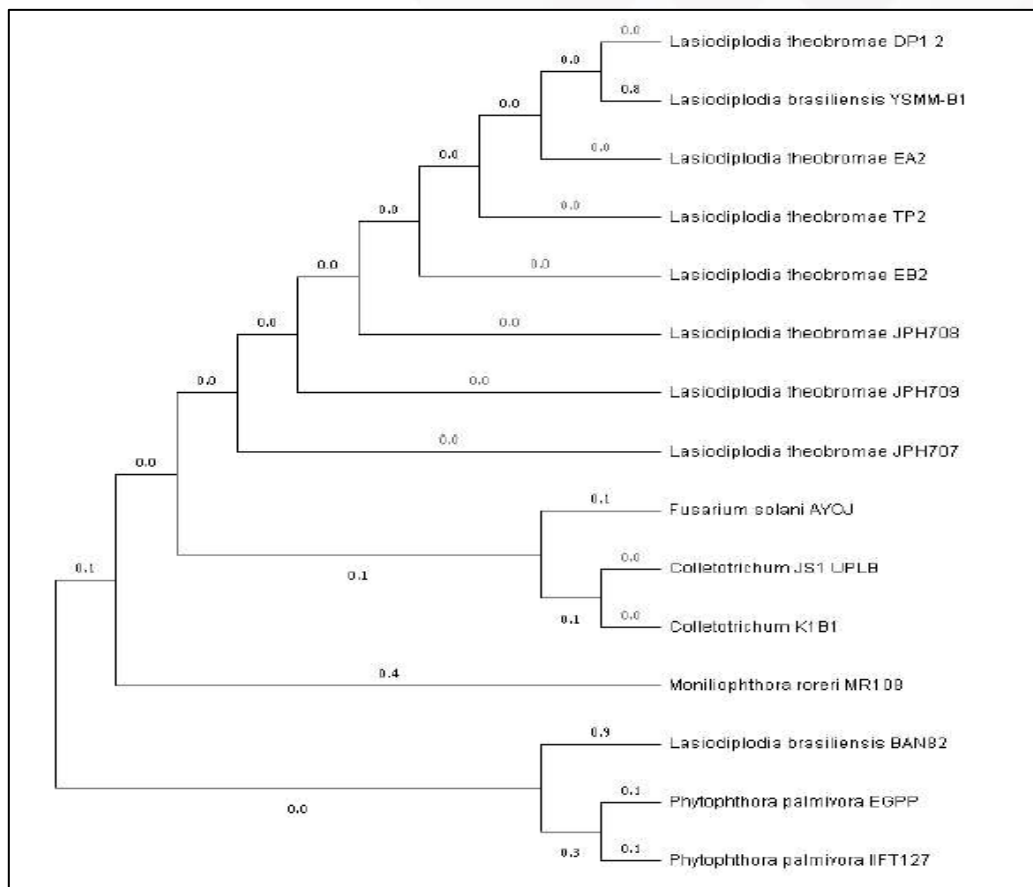
adaptaciones específicas o diferencias en la virulencia. A pesar de esta similitud, la separación clara de *L. theobromae* de otros patógenos como *Fusarium solani* y *Phytophthora palmivora* refuerza su identidad como un grupo taxonómico distinto.

Aunque el bajo valor de soporte filogenético (42%) sugiere cierta incertidumbre en la separación precisa de las cepas, su agrupación en el árbol evolutivo proporciona una base para estudiar cómo las variaciones genéticas influyen en su capacidad de causar enfermedades en distintos cultivos. La cepa JPH709 también se agrupa estrechamente con *L. theobromae* DPI2, lo que sugiere similitudes en su material genético y en su comportamiento biológico.

El valor de soporte filogenético de esta rama es moderado (77%), lo que brinda una confianza considerable en la agrupación de estas dos cepas. Al comparar *L. Theobromae* JPH709 con otros patógenos en el árbol, como *Colletotrichum*, *Fusarium solani* y *Moniliophthora roreri*, se observa una clara separación genética.

Figura 8

Árbol filogenético de las 3 muestras



Nota. La figura representa el árbol filogenético de las 3 muestras, elaborado por Palacios (2024)

En este árbol las cepas *L. Theobromae* JPH707, *L. Theobromae* JPH708 y *L. Theobromae* JPH709, se agrupan de manera coherente dentro del clado de *L. theobromae*. Su proximidad refleja una alta similitud genética, lo cual es esperable al tratarse de replicados de la misma muestra. Aunque no se encuentran siempre en ramas idénticas, las ligeras diferencias plasmadas pueden deberse a variaciones técnicas menores durante la secuenciación, y no representan diferencias biológicas significativas. Esto confirma que las tres cepas están correctamente asignadas al mismo grupo genético.

4.6. Resultados de las pruebas de patogenicidad de *L. theobromae* en mazorcas de cacao CCn-51

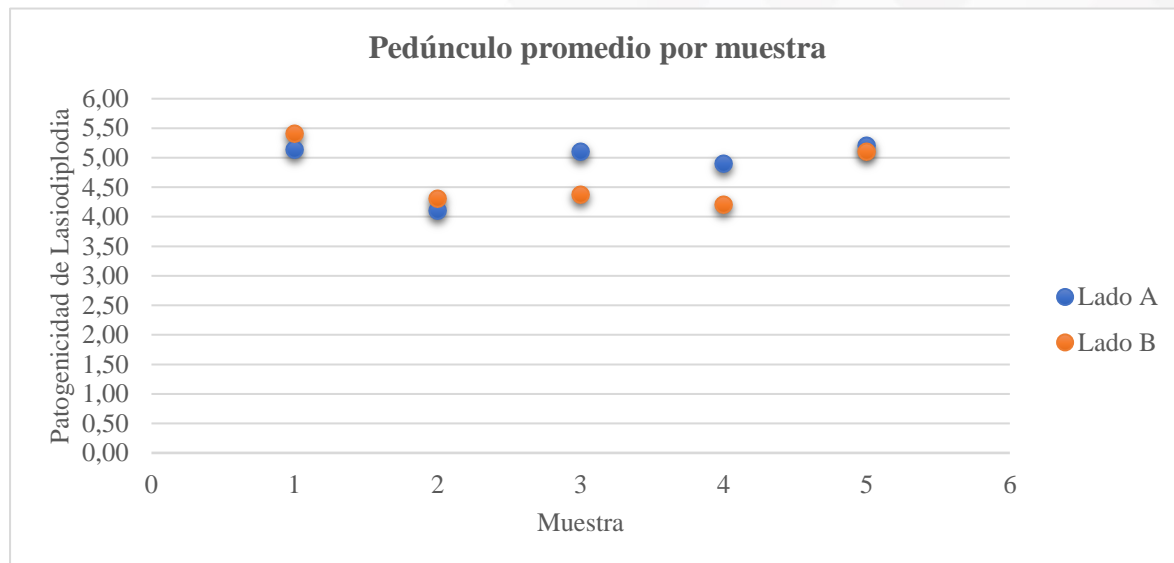
Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en las mediciones del pedúnculo y el ápice de las mazorcas infectadas, se realizaron 3 repeticiones de mediciones tomando 5 muestras:

El promedio de las mediciones varía ligeramente entre muestras, oscilando entre 4,10 mm y 5,20 mm, lo que indica que el tamaño del pedúnculo es relativamente consistente entre ellas, con diferencias mínimas. Las varianzas, que miden la dispersión de los datos, son muy bajas en todas las muestras (entre 0,00667 y 0,01556), lo que sugiere que las mediciones son bastante consistentes y presentan una variación insignificante entre los ensayos realizados para cada muestra.

La Tabla 7 presenta las mediciones del pedúnculo del lado B en cinco muestras de cacao, realizadas en tres ensayos para cada muestra, junto con los promedios y las varianzas calculadas. Los resultados muestran que los promedios de las mediciones oscilan entre 4,10 mm y 5,20 mm, similares a los del lado A, lo que indica una consistencia entre ambos lados del pedúnculo. La muestra 2 presenta el valor promedio más bajo (4,10 mm), mientras que la muestra 5 tiene el más alto (5,20 mm).

Figura 9

Mediciones del pedúnculo en mm lado A y B en 5 muestras



Nota. La figura muestra mediciones del pedúnculo en 5 muestras, lado A y B, elaborado por Palacios (2024)

Lado A: En particular, la Muestra 1 tiene la mayor varianza (0,01556), lo que indica una mayor variabilidad en sus mediciones en comparación con las otras muestras, aunque sigue siendo una variación pequeña. Este análisis refleja que las mediciones del pedúnculo en el lado A son homogéneas, lo que podría ser relevante al evaluar la afectación del hongo *L. theobromae* en esta parte de la planta.

Lado B: La varianza es baja en todas las muestras, con la mayor variabilidad en la muestra 1 (0,01556), al igual que en las mediciones del lado A, lo que indica que, aunque hay pequeñas variaciones entre los ensayos, estas son mínimas y no significativas. Las demás muestras tienen una varianza constante de 0,00667, lo que sugiere que las mediciones en el lado B también son homogéneas y estables. Estos datos refuerzan la uniformidad en las características del pedúnculo, lo cual es útil para evaluar el impacto del hongo y las posibles diferencias en la afectación entre diferentes áreas de la planta.

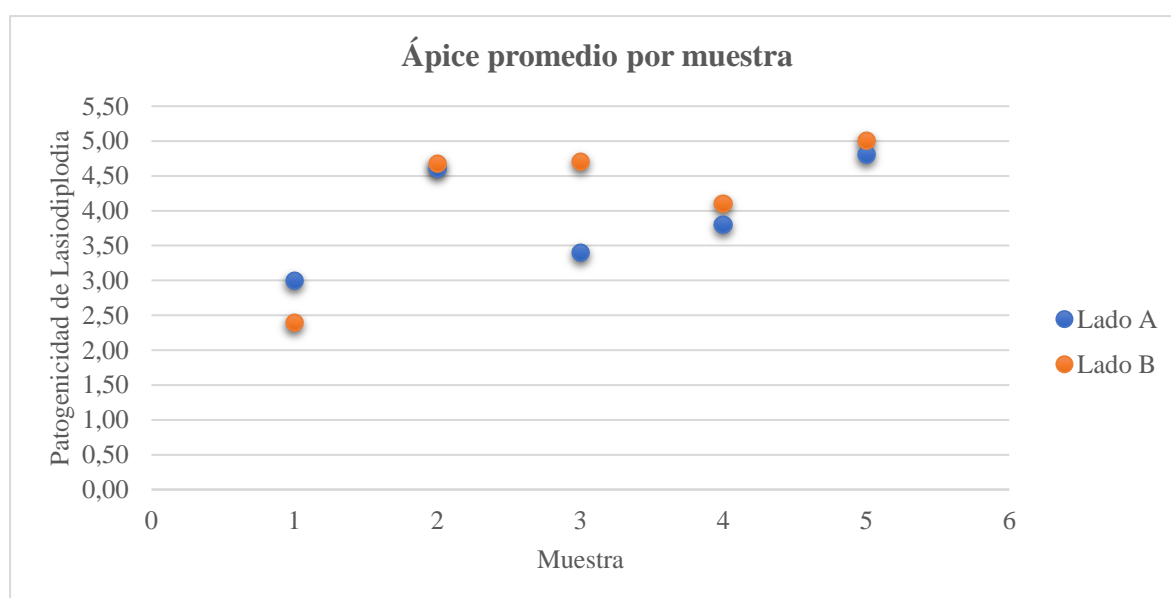
La tabla 8 presenta las mediciones del ápice del lado A en cinco muestras de cacao, registradas en tres ensayos por muestra, junto con los promedios y las varianzas respectivas. Los resultados muestran que los promedios de las mediciones varían

entre 4,10 mm y 5,20 mm, similares a los observados en las mediciones del pedúnculo.

La Tabla 9 muestra las mediciones del ápice en el lado B para cinco muestras de cacao, registradas en tres ensayos. Los promedios de las mediciones oscilan entre 4,10 mm y 5,20 mm, lo que refleja uniformidad en los resultados, al igual que en los lados anteriores. La muestra 2 es nuevamente la que presenta el menor promedio (4,10 mm), mientras que la muestra 5 alcanza el promedio más alto (5,20 mm).

Figura 10

Mediciones del ápice lado A y B en mm en 5 muestras



Nota. La figura muestra mediciones del ápice en 5 muestras, lado A y B, elaborado por Palacios (2024)

Lado A: La muestra 2 tiene el promedio más bajo (4,10 mm), mientras que la muestra 5 posee el promedio más alto (5,20 mm). Al igual que en las mediciones del pedúnculo, la varianza más alta se encuentra en la muestra 1 (0,01556), lo que indica mayor variabilidad en las mediciones de esta muestra. Las demás muestras tienen una varianza uniforme de 0,00667, lo que sugiere estabilidad y poca dispersión en los datos obtenidos. Estos resultados sugieren que las mediciones en el ápice del lado A son consistentes y homogéneas, lo que es relevante para la evaluación de la afectación en diferentes partes de la planta por el hongo *L. theobromae*.

Lado B: La mayor varianza se presenta en la muestra 1 con 0,01556, lo que indica una mayor variabilidad entre los ensayos en esta muestra, mientras que las demás mantienen una varianza constante de 0,00667, lo que indica consistencia en los resultados. Estos datos reflejan que, a pesar de pequeñas diferencias entre las muestras y ensayos, las mediciones en el ápice del lado B son bastante homogéneas, proporcionando una evaluación equilibrada del crecimiento del hongo y su impacto en diferentes partes del fruto.

Por su lado, las observaciones se realizaron en intervalos de 3, 6, 9, 12 y 15 días post-inoculación. A los tres días, se comenzaron a observar los primeros síntomas de infección, manifestados como áreas necróticas circulares adyacentes al inoculo. Con el paso del tiempo a los seis días se notó una progresión de la necrosis, extendiéndose desde los puntos de inoculación hasta cubrir en su totalidad toda el área de la mazorca.

A los nueve días, se notaba una capa de lama blanquecina fina característica del hongo, con un aumento en la severidad de la necrosis. Para el día 12, la infección había progresado significativamente, se observa una lama totalmente blanca y húmeda evidenciando la capacidad del hongo para colonizar y dañar el tejido de la mazorca de manera rápida y agresiva.

Ilustración 7

Deterioro de la mazorca hasta los 15 días



Nota. La ilustración muestra internamente el deterioro en la mazorca hasta los 15 días, elaborado por Palacios (2024)

Hasta los 15 días, se observó un deterioro interno en la mazorca con una significativa cobertura de micelio de hongo, de color blanquecino a grisáceo, que cubre gran parte

de la superficie externa. Este crecimiento fúngico es un indicativo claro del avance de la infección en la mazorca.

En la parte superior izquierda de la imagen, se distingue una zona de color oscuro, casi negro, señal de necrosis avanzada probablemente causada por la infección fúngica. Esta área necrosada se extiende desde el ápice de la mazorca, una región comúnmente afectada al inicio de las infecciones.

Ilustración 8

Corte longitudinal de la mazorca para su observación interna



Nota. En esta ilustración muestra la mazorca cortada longitudinalmente para revelar su interior, elaborado por Palacios (2024)

El tejido interno de la mazorca muestra una extensa necrosis de color marrón oscuro a negro, especialmente en las áreas cercanas a la corteza. Los granos de cacao están en mal estado, algunos presentan signos de colapso y descomposición, además de un cambio en su dureza y textura, pasando de duros a blandos, lo que indica un avance significativo de la infección hacia el interior.

La capa más externa del tejido, justo debajo de la cáscara, exhibe una decoloración marrón, lo cual es un signo característico de una infección que se propaga desde el exterior hacia el interior. Este deterioro progresivo refleja la gravedad del daño que ha afectado tanto a la mazorca como a los granos.

Mazorca de cacao sin infección

Una mazorca de cacao sana presenta una superficie externa cuyo color varía desde verde en su estado inmaduro hasta amarillo o rojo al madurar. Esta apariencia saludable no muestra signos de necrosis ni crecimiento de hongos, lo que indica su buena salud y calidad. Estos colores vibrantes son indicativos de una mazorca en óptimas condiciones, lista para ser cosechada y utilizada.

Al abrir una mazorca sana, el interior revela granos de cacao que oscilan entre el blanco y crema, rodeados de una pulpa fresca y jugosa, completamente libre de signos de descomposición. Además, el tejido interno se observa firme y de un color uniforme, sin la presencia de manchas oscuras que podrían indicar deterioro o infecciones. Esta característica es fundamental para asegurar la calidad del cacao y su viabilidad.

En contraste, una mazorca infectada muestra un estado avanzado de infección fúngica. Su superficie externa está cubierta de micelio y presenta áreas necróticas de color negro, lo que contrasta marcadamente con la apariencia saludable de una mazorca normal. Esta observación confirma la patogenicidad del hongo *L. theobromae* bajo las condiciones experimentales establecidas, evidenciando el impacto negativo que puede tener en la producción de cacao.

Los síntomas iniciales de necrosis, visibles tres días después de la inoculación, concuerdan con estudios como el de Rosado et al. (2016), quienes documentaron la rápida manifestación de *L. theobromae* en tejidos vegetales. En este estudio, se observó una progresión rápida de la necrosis a lo largo del tiempo, con la aparición de una capa blanquecina de micelio para el día 6 y 9, lo que también ha sido reportado por Batista et al. (2014). Esta característica es típica de la infección por *L. theobromae*, que afecta tanto el tejido externo como interno, promoviendo la descomposición de las mazorcas de cacao.

Hacia el día 12, el comportamiento agresivo del hongo, manifestado por una capa de lama blanca y la descomposición de los tejidos internos, fue corroborado por estudios como el de Barreto et al. (2020), quienes destacaron la capacidad del hongo para colonizar el tejido vascular de las mazorcas. La alta humedad y otras condiciones ambientales favorables aceleraron este proceso, lo que concuerda con los hallazgos del presente estudio.

Los cambios en la textura y color de los granos de cacao infectados, que pasaron de ser firmes a blandos y descompuestos, también fueron observados por Mehl et al. (2017), quienes reportaron que *L. theobromae* induce una necrosis sistémica que destruye tanto el pericarpio como los tejidos internos de los frutos. En este estudio, los granos colapsados y en mal estado refuerzan la idea de que este patógeno compromete gravemente la calidad y el rendimiento del cacao.

Diversos estudios han mostrado resultados concordantes con respecto a la patogenicidad de *L. theobromae*. Por ejemplo, Santana et al. (2018) encontraron que este hongo afecta severamente las mazorcas de cacao en diferentes estados de maduración, lo que coincide con la rápida expansión de las áreas necróticas y el colapso de los granos observados en este estudio. Además, Gómez et al. (2015) reportaron que *L. theobromae* tiende a atacar primero las zonas más vulnerables de las mazorcas, como el ápice, lo cual también fue observado en las mazorcas inoculadas en este trabajo.

A nivel molecular, estudios de Aroca et al. (2019) sugieren que la capacidad patogénica de *L. theobromae* está relacionada con la producción de toxinas fúngicas, como el ácido tánico y metabolitos secundarios que degradan las paredes celulares. Estas toxinas juegan un papel clave en el proceso de necrosis y muerte celular, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde la infección avanzó rápidamente, afectando tanto el tejido externo como el interno de las mazorcas.

4.7. Aislamiento del patógeno

Haciendo uso de los postulados de Koch se observó los resultados del aislamiento del patógeno y observamos su crecimiento con el fin de asegurar que la patogenicidad observada es causada solamente por *L. Theobromae*.

Ilustración 9

Aislamiento de *L. theobromae*



Nota. En esta ilustración se observa *L. theobromae* aislado, elaborado por Palacios (2024)

En este análisis, el crecimiento del hongo en la imagen refuerza la hipótesis de que *L. theobromae* es responsable de la infección en el hospedero inicial, ya que las características morfológicas del hongo son consistentes con lo descrito para este patógeno.

4.8. Re-aislamiento del patógeno

Ilustración 10

Re aislamiento según postulados de Koch



Nota. En esta ilustración se observa *L. theobromae* aislado según postulados de Koch, elaborado por Palacios (2024)

Ilustración 11

Cepa Re aislada a los 3 días



Nota. En esta ilustración se observa la cepa Re aislada a los 3 días, elaborado por Palacios (2024)

Al aislar nuevamente el hongo tras la reinfección, se ha cerrado el ciclo de investigación y se refuerza la evidencia de que el patógeno es el causante de la enfermedad, garantizando así que el agente ha sido correctamente identificado y caracterizado.

La confirmación de la patogenicidad mediante el aislamiento del hongo siguiendo los postulados de Koch proporciona una base sólida para afirmar que los síntomas observados fueron causados exclusivamente por *L. theobromae*. De manera similar, Patil et al. (2019) realizaron experimentos en los que, tras la inoculación de *L. theobromae* y el aislamiento del hongo de los tejidos afectados, se confirmó su capacidad para causar la misma enfermedad bajo condiciones controladas. Estos resultados validan el rol patogénico del hongo en la presente investigación.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

- El estudio permitió la caracterización detallada de *L. theobromae* en medios de cultivo PDA, destacándose su rápido crecimiento micelial y el cambio progresivo de color en el hongo. El desarrollo inicial de micelio blanco, que se oscurece con el tiempo hasta volverse negro debido a la producción de melanina, coincide con lo reportado en investigaciones previas. La formación de picnidios a partir del séptimo día es otro rasgo distintivo que confirma la correcta identificación del patógeno y su ciclo de vida, ya que es un evento clave en la morfología de *L. theobromae*. Estas características macroscópicas, combinadas con las observaciones microscópicas de conidios unicelulares que se vuelven bicelulares y marrones al madurar, refuerzan la consistencia de los resultados con la literatura existente.

La observación de hifas gruesas y ramificadas también confirmó el carácter invasivo del hongo, contribuyendo a la comprensión de su capacidad para colonizar rápidamente los tejidos vegetales. Este tipo de estructura permite una penetración profunda y eficiente en los tejidos del hospedero, lo que facilita el progreso de la enfermedad. La caracterización morfológica tanto macroscópica como microscópica de *L. theobromae* fue fundamental para la correcta identificación de este patógeno y proporciona una base sólida para investigaciones futuras sobre su control y manejo en cultivos afectados, especialmente el cacao.

- El análisis molecular realizado mediante la secuenciación de la región ITS permitió una identificación precisa y confiable de *L. theobromae* en las tres muestras analizadas, con identidades superiores al 99% comparadas con secuencias de referencia en bases de datos. Esta técnica, ampliamente utilizada para la identificación de especies fúngicas, ha demostrado ser eficaz y robusta en la determinación de especies dentro del género *Lasiodiplodia*. Las variaciones en la longitud de los fragmentos secuenciados (475-544 pb) no afectaron la calidad de los resultados, y la comparación con estudios similares sugiere que estas variaciones son normales y no comprometen la precisión del análisis.

El uso del algoritmo BLAST para comparar las secuencias obtenidas con aquellas depositadas en GenBank permitió confirmar la identidad de las cepas de *L. theobromae* con un porcentaje de identidad superior al 99.4%, lo que asegura la confiabilidad del método. Además, el análisis filogenético confirmó la correcta asignación taxonómica de *L. theobromae*, agrupándose con otras cepas del mismo género y diferenciándose claramente de otros patógenos como *Fusarium* y *Colletotrichum*. Estos resultados validan la utilidad de la secuenciación ITS como herramienta para la identificación molecular de patógenos fúngicos y proporcionan una sólida base para futuras investigaciones que busquen desarrollar estrategias de control basadas en una identificación precisa.

- El estudio de patogenicidad confirmó la alta virulencia de *L. theobromae* en las mazorcas de cacao CCn-51, con la aparición de síntomas necróticos visibles tan solo tres días después de la inoculación. Esta rápida manifestación de la enfermedad, que progresó con la formación de necrosis y micelio blanquecino en los días siguientes, concuerda con lo descrito en estudios anteriores sobre la agresividad de este patógeno. Hacia el día 12, la formación de una capa de lama blanca y la descomposición avanzada de los tejidos internos confirmaron el comportamiento altamente destructivo de *L. theobromae* bajo condiciones ambientales favorables, como la alta humedad.

Los cambios observados en la textura y coloración de los granos, que pasaron de estar firmes a blandos y colapsados, sugieren que este patógeno no solo compromete la calidad del fruto, sino también su viabilidad agrícola a largo plazo. La capacidad de este hongo para producir toxinas que degradan las paredes celulares vegetales, como lo reportaron, refuerza su papel como un patógeno agresivo y de difícil control. La confirmación de la patogenicidad siguiendo los postulados de Koch proporciona evidencia robusta de que *L. theobromae* es el causante de los síntomas observados, lo que subraya la necesidad de estrategias integradas de manejo para mitigar su impacto en los cultivos de cacao.

5.2. Recomendaciones

Dado que este estudio se enfocó en muestras específicas de una región, se sugiere expandir la investigación a diferentes zonas geográficas y climas. Esto permitirá

evaluar la existencia de una variabilidad genética significativa de las cepas de *L. theobromae* que afecte su patogenicidad o respuesta a tratamientos. Futuras investigaciones podrían enfocarse en la comparación entre cepas regionales y su resistencia a condiciones ambientales adversas o a diferentes técnicas de manejo agrícola.

Este estudio confirmó la alta virulencia de este patógeno, sin embargo, se recomienda abordar posibles estrategias de manejo. Se sugiere realizar estudios que exploren el uso de agentes biológicos, como bacterias antagonistas o hongos benéficos, y tratamientos químicos que puedan reducir la propagación de *L. theobromae* en las mazorcas de cacao. Además, investigar la viabilidad de fungicidas específicos y su impacto a largo plazo sobre el ecosistema del cultivo puede generar alternativas de control más sostenibles.

El presente estudio demostró que la alta humedad favorece el desarrollo de *L. theobromae*, se recomienda evaluar otros factores ambientales como la temperatura o la calidad del suelo. Futuras investigaciones deben centrarse en analizar cómo varían los niveles de virulencia bajo diferentes condiciones climáticas y cómo estos factores pueden ser manipulados para reducir la infección en campo.

Basado en los hallazgos, es evidente que *L. theobromae* es un patógeno de difícil control que afecta significativamente la producción de cacao. Se sugiere la implementación de estrategias de manejo integrado que incluyan prácticas culturales (como la poda y eliminación de partes infectadas), la aplicación de tratamientos biológicos, y el monitoreo constante de los cultivos para la detección temprana de la enfermedad.

La variedad de cacao CCn-51 mostró una alta susceptibilidad a la infección en este estudio. Es recomendable realizar investigaciones enfocadas en identificar si existen variedades de cacao con mayor resistencia genética a *L. theobromae*. Este enfoque ayudaría a desarrollar programas de mejoramiento genético que puedan incrementar la resistencia de las plantas a la enfermedad, lo cual representaría una solución a largo plazo para reducir las pérdidas en las plantaciones de cacao.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeniyi, D. (2019). Diversity of Cacao Pathogens and Impact on Yield and Global Production. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81993>

Ainsworth, G. C., Bisby, G. R., Sutton, B. C., & Simmonds, J. (2008). Dictionary of the fungi (10th ed.). CAB International.

Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., & Phillips, A. J. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia* species associated with human and animal infections. *Fungal Diversity*, 28, 1-13.

Alves, A., Phillips, A. J., Henriques, I., & Correia, A. (2008). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiology Letters*, 289(1), 109-115.

Angulo Preciado, D. J. (2022). Evaluación en el manejo postcosecha de cacao (*Theobroma cacao*) de la variedad CCN-51 en la parroquia Rocafuerte-Esmeraldas (Trabajo de titulación para optar al título de Ingeniera Agroindustrial, Universidad Nacional de Chimborazo). <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/10343/3/Angulo%20P.%20%2C%20Diana%20J.%20%282022%29%20EVALUACI%C3%93N%20DEL%20MANEJO%20POSCOSECHA%20DE%20%20CACAO%20DE%20LA%20VARIEDAD%20CCN-51%20EN%20LA%20PARROQUIA%20ROCAFUERTE-ESMERALDAS.pdf>

Avilés, R. (2013). Evaluación económica de la producción y comercialización del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la zona de Quevedo [Tesis de pregrado, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/bdea71e3-e23d-47b2-8cb6-c8357384829b/content>

Blanco, E. L., & Castro, Y. (2021). Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 6-16. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808>

Burgess, T. I., Barber, P. A., Mohali, S., Pegg, G., de Beer, Z. W., & Wingfield, M. J. (2006). *Lasiodiplodia theobromae* as a latent pathogen of woody plants. *Australasian Plant Pathology*, 35(2), 1-15.

Cedeño, A. V., et al. (2020). Characterization of *Phytophthora* spp. and application of rhizobacteria with biocontrol potential in black pod disease in *Theobroma cacao* variety CCN-51. *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 453-460.

Cedeño Amador, S. (2023, 7 de julio). Día Mundial del Cacao: conociendo el cacao CCN-51, la variedad que llevó a Ecuador al podio global. *El Costanero Cultura*.

Cedeño Moreira, Á. V., Romero Meza, R. F., Auhing Arcos, J. A., Mendoza León, A. F., Abasolo Pacheco, F., & Canchignia Martínez, H. F. (2020). Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51. *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 503-512. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.05>

Chen, S., Liu, X., Zhu, S., & Ding, W. (2020). Phylogenetic analysis of the genus *Lasiodiplodia* in China based on morphological and molecular data. *Mycological Progress*, 19(2), 157-165.

CIDAMI. (2016). Historia y expansión del cacao en el mundo. *Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola de Mesoamérica e Indias*, 18(1), 98-112. Recuperado de http://www.cidami.org/publicaciones/historia_expansion_cacao

Faustino Damián, E. (2022). Sistemas de muestreo para la detección de enfermedades en una plantación comercial de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el distrito de Uchiza-Tocache 2021 (Tesis de grado, Universidad Nacional Hermilio Valdizán de Huánuco, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica). Huánuco, Perú. Recuperado de <https://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13080/7818/TAG00956F28.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Felsenstein, J. (2004). *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates.

Fuertes Flores, B. G., & Mallitasig Quishpe, D. A. (2018). Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum*

(Orchidaceae). [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiano].
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15158>

Girón, J., García, R., Vázquez, M., Ceballos, G., & Méndez, E. (2012). Xocolatl: antes alimento de los dioses, y ahora. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*.
<http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num3/articulos/xocolatl/>

Hedges, S. B., & Kumar, S. (2009). *The Timetree of Life*. Oxford University Press.

Hillis, D. M., Moritz, C., & Mable, B. K. (1993). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates.

Ismail, A. M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., & Crous, P. W. (2013). Characterisation of Botryosphaeriaceae isolates associated with grapevine decline in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 42(1), 39-50.

Ismail, A. M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., & Crous, P. W. (2019). Lasiodiplodia theobromae causing dieback of grapevine and its phylogenetic relationship to other members of the genus. *Plant Pathology*, 68(3), 559-568.

Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A. M. (2009). *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press.

Lezaun, J. (2023). Mazorca negra del cacao - Pudrición parda o negra - Mancha negra - *Phytophthora* sp. *Agribusiness & Marketing Consultant*.
<https://croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/mazorca-negra-del-cacao-pudricion-parda-o-negra-mancha-negra-phytophthora-sp>

Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2021). *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 3.70.

Machado, A. R., et al. (2019). Phylogeny, identification, and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with mango decline in Brazil. *Fungal Biology*, 123(6), 437-451.

Marelli, J.-P., Guest, D. I., Bailey, B. A., Evans, H. C., Brown, J. K., Junaid, M., Barreto, R. W., Lisboa, D. O., & Puig, A. S. (2019). Chocolate under threat from old and new cacao diseases. *The American Phytopathological Society*, 109(9), 1331-1343. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0485-RVW>

Muñoz Orellana, S., & Rosero Escobar, J. C. (2020). Evaluación del control biológico con el uso de diferentes tipos de microorganismos para la enfermedad de la pudrición de la mazorca en cacao CCN-51 en Esmeraldas (Trabajo de titulación, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas). <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/23247>

Olmo, D., Nieto, A., & Santos, M. (2017). Antagonistic rhizobacteria with potential for the biocontrol of black pod disease caused by *Phytophthora palmivora* in cacao. *Biological Control*, 109, 59-67.

Phillips, A. J. L., et al. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76(1), 51-167.

Pizolotto, C. A., et al. (2022). Potential biocontrol agents of Botryosphaeriaceae and their effect on fungal volatile organic compounds during biocontrol activity. *Fungal Biology*, 126(5), 354-366.

Puig, A. S., & Evans, H. C. (2019). Monograph of *Lasiodiplodia*. *Studies in Mycology*, 79, 1-51.

Rannala, B., & Yang, Z. (2007). Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock. *Molecular Biology and Evolution*, 24(1), 23-34.

Valverde Jaramillo, P. S., & Gálvez Lino, L. A. (2021). Desarrollo de un plan de gestión de calidad en el proceso de postcosecha del cacao. *Revista Científica del Instituto Superior Técnico Agropecuario Calderón*, 5(10), 59-74. [https://doi.org/10.36996/j.ristac.2021.5\(10\).005](https://doi.org/10.36996/j.ristac.2021.5(10).005)

ANEXOS

Tabla 5

Crecimiento del hongo

Horas de crecimiento	CRECIMIENTO EN mm		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	-	-	-
6	1,00	2,00	1,50
12	3,00	4,50	3,50
18	20,50	21,50	19,50
24	31,50	31,50	31,50
30	48,00	49,00	48,50
36	54,00	55,00	55,50
42	74,50	74,50	74,00

Nota. La tabla muestra el crecimiento del hongo durante 42 horas tomando 3 muestras, elaborado por Palacios (2024)

Tabla 6

Medición de picnidios

Número de muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Varianza
1	4	3	5	4,00	0,6667
2	5	6	4	5,00	0,6667
3	9	8	7	8,00	0,6667
4	2	2	3	2,33	0,2222
5	5	6	6	5,67	0,2222
6	5	4	5	4,67	0,2222
7	3	4	2	3,00	0,6667
8	8	9	8	8,33	0,2222

Nota. La tabla evidencia la medición de picnidios de 8 muestras en 3 repeticiones, el promedio y varianza, elaborado por Palacios (2024)

Tabla 7

Mediciones del pedúnculo en mm Lado A

Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Varianza
1	5,10	5,30	5,00	5,13	0,01556
2	4,00	4,10	4,20	4,10	0,00667
3	5,10	5,00	5,20	5,10	0,00667
4	4,90	5,00	4,80	4,90	0,00667
5	5,20	5,10	5,30	5,20	0,00667

Nota. La tabla muestra las mediciones del pedúnculo lado A, elaborado por Palacios (2024)

Tabla 8

Mediciones del pedúnculo en mm Lado B

Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Varianza
1	5,10	5,30	5,00	5,13	0,01556
2	4,00	4,10	4,20	4,10	0,00667
3	5,10	5,00	5,20	5,10	0,00667
4	4,90	5,00	4,80	4,90	0,00667
5	5,20	5,10	5,30	5,20	0,00667

Nota. La tabla muestra las mediciones del pedúnculo lado B, elaborado por Palacios (2024)

Tabla 9

Mediciones del ápice en mm Lado A

Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Varianza
1	5,10	5,30	5,00	5,13	0,01556
2	4,00	4,10	4,20	4,10	0,00667
3	5,10	5,00	5,20	5,10	0,00667
4	4,90	5,00	4,80	4,90	0,00667
5	5,20	5,10	5,30	5,20	0,00667

Nota. La tabla muestra las mediciones del ápice lado A, elaborado por Palacios (2024)

Tabla 10

Mediciones del ápice en mm Lado B

Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Varianza
1	5,10	5,30	5,00	5,13	0,01556
2	4,00	4,10	4,20	4,10	0,00667
3	5,10	5,00	5,20	5,10	0,00667
4	4,90	5,00	4,80	4,90	0,00667
5	5,20	5,10	5,30	5,20	0,00667

Nota. La tabla muestra las mediciones del ápice lado B, elaborado por Palacios (2024)

UNEMI
UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

