

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Caracterización molecular de *Moniliophthora roreri* causante de la vaina helada (moniliasis) en el cacao en tres provincias del Ecuador: Los Ríos, Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas

Génesis Xamara Aguirre Cobos

María de Lourdes Torres, Ph. D

Directora de Trabajo de Titulación

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito
para la obtención del título de Magíster en Microbiología

Quito, 10 de enero del 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Caracterización molecular de *Moniliophthora roreri* causante de la vaina helada (moniliasis) en el cacao en tres provincias del Ecuador: Los Ríos, Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas

Génesis Xamara Aguirre Cobos

Firmas

María de Lourdes Torres, PhD

Director del Trabajo de Titulación

Antonio León, PhD

Comité de Tesis

Bernardo Gutiérrez, Msc

Comité de Tesis

Gabriel Trueba, PhD

Director del Programa de Posgrados del

Instituto de Microbiología

Hugo Burgos, PhD

Decano del Colegio de Posgrados

Quito, 10 de enero del 2019

© Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:	_____
Nombre	<u>Génesis Xamara Aguirre Cobos</u>
Código de estudiante:	<u>00133973</u>
C. I.:	<u>1105039067</u>
Lugar, Fecha	<u>Quito, 10 de enero del 2019</u>

DEDICATORIA

A mi madre y mi abuelito por apoyarme en todo momento

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a los agricultores que permitieron la recolección de muestras en sus terrenos. A: María de Lourdes Torres, Directora del presente trabajo; Bernardo Gutiérrez, miembro del Comité de tesis; investigadores del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ; Antonio León, Darío, Noelia y Karen del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ. por su apoyo incondicional para el desarrollo de esta investigación. A la Universidad San Francisco de Quito, por su apoyo financiero en este estudio y finalmente a mis amigos de maestría.

RESUMEN

ARTÍCULO 1

En la historia del Ecuador, el cacao ha sido de gran importancia en su cultura, así como en su economía. El cultivo de cacao en el país ha alcanzado gran reconocimiento a nivel internacional convirtiéndose en el principal exportador del cacao fino de aroma. Varias enfermedades han atacado a este cultivo siendo las más comunes: la escoba de bruja, vaina negra y vaina helada. La vaina helada causada por el hongo *Moniliophthora roreri* ha generado grandes pérdidas en la producción cacaotera ecuatoriana. La infección de *M. roreri* presenta dos fases: la fase biotrófica en la que se presenta la malformación del fruto y la fase necrótica que resulta en la muerte de éste. Como métodos de control para la enfermedad se han usado prácticas culturales como poda de las plantaciones y manejo de los riegos, entre otras. De igual manera, se han usado fumigaciones con pesticidas a base de cobre y el control biológico con *Trichoderma*. Los análisis de diversidad genética, distribución biogeográfica y comportamiento de *M. roreri* posibilitan el desarrollo de nuevas estrategias más eficientes para el control del patógeno y de esta manera mejorar la producción del cacao.

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, hongo basidiomiceto, patógeno hemibiotrófico, diversidad genética, control biológico,

ARTÍCULO 2

El cacao (*Theobroma cacao*) es un cultivo de importancia económica para el Ecuador que ha adquirido protagonismo en los últimos años al convertirse en un importante producto de exportación, particularmente la variedad premium Arriba (cacao fino de aroma). El cultivo de esta especie se ve afectado por varias enfermedades, siendo una de las más importantes la moniliasis, también conocida como la enfermedad de la vaina helada, causada por el hongo *Moniliophthora roreri* que ha generado grandes pérdidas en la producción cacaotera ecuatoriana. En el presente estudio se visitaron tres provincias: Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos. Se aislaron 75 muestras del hongo *M. roreri* provenientes de 15 fincas, 5 por cada provincia. Luego de la extracción del ADN, se amplificó la región ITS. Como resultado de la amplificación de la región ITS se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 710 pb y se confirmó la identidad de los aislados como *M. roreri* por medio de BLAST. En general, la diversidad nucleotídica en cada finca analizada fue baja. En la evaluación de distancias genéticas entre fincas de las diferentes provincias se observaron distancias genéticas mayores entre fincas de Manabí y los Ríos. La mayor parte de la variabilidad genética se encuentra entre los individuos de una misma finca (71.29 %) lo que sugiere que no existe una estructura poblacional definida. Finalmente, una comparación de las secuencias de este estudio con otras secuencias de América Latina sugiere que Ecuador podría ser el país de origen de *M. roreri* (Manabí o Santo Domingo).

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, regiones ITS, variabilidad nucleotídica, flujo génico, actividad humana, *Theobroma* y *Herrania*.

ABSTRACT

ARTICLE 1

In the history of Ecuador, cacao (*Theobroma cacao*) has been an important crop, culturally and economically. In this country, the cacao production has achieved great international recognition, becoming the main exporter of fine aroma cacao (Arriba variety). Several diseases affect this crop. The most common are: the witch's broom, the black pod and the frozen pod. The last one is caused by the fungus *Moniliophthora roreri* and has generated large losses in the Ecuadorian cacao production. *M. roreri* infection presents two phases. The biotrophic phase that produces the malformation of the pod, and the necrotic phase that results in the decay of it. As control methods, cultural practices have been implemented, such as plant pruning and irrigation management. Supplementary, fumigations with copper-based pesticides and biological control with *Trichoderma* have been used. The analysis of the genetic diversity, the biogeographical distribution and the behavior of *M. roreri* will allow developing more effective strategies for the control of this pathogen and to improve the production of cacao in Ecuador.

Key words: *Moniliophthora roreri*, Basidiomycete Fungus, hemibiotrophic pathogen, genetic diversity, biologic control.

ARTICLE 2

In Ecuador, cacao (*Theobroma cacao*) is an economically important crop. This crop has gained relevance in recent years and it has become a key export product, particularly, the premium Arriba variety. This species is affected by several diseases. In Ecuador, one of the most important is moniliasis, also known as the cold pod disease, that is caused by the fungus *Monilophthora roreri*. In the present study, cacao pods with moniliasis were sampled from three provinces: Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas and Los Ríos. Seventy-five isolates of *M. roreri* were obtained from 15 cacao farms, five farms per province. After DNA extraction, ITS regions were amplified and sequenced. As a result, sequences of approximately 710 bp long were obtained. The identity of isolates were confirmed as *M. roreri* using BLAST. In general terms, the nucleotide diversity in each farm analyzed was low. The greater genetic distances were observed between Manabí and Los Ríos farms. Most of the genetic variability were found among individuals on the same farm (71.29%), which suggests that there is no defined population structure. Finally, comparing the sequences of this study with other sequences from Latin America suggests that the origin of *M. roreri* is in Ecuador (Manabí or Santo Domingo).

Key words: *Moniliophthora roreri*, ITS regions, nucleotide variability, genetic flow, human activity, *Theobroma* and *Herrania*.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
ARTÍCULO 1	13
<i>Influencia de la vaina helada en la producción del cacao (Theobroma cacao L)</i>	13
Resumen	13
Introducción	14
Importancia del cacao en Ecuador	14
Variedades de cacao producidas en Ecuador	16
Las principales enfermedades del cacao	16
Origen y distribución de <i>M. royeri</i> en Latinoamérica	20
Taxonomía de <i>M. royeri</i>	21
Morfología de <i>M. royeri</i>	22
Ciclo de infección de <i>M. royeri</i>	22
Sintomatología de la infección por <i>M. royeri</i>	23
Diversidad genética de <i>M. royeri</i>	25
Conclusiones	28
Bibliografía	29
ARTÍCULO 2	36
Resumen	36
Introducción	37
Materiales y Métodos	40
Resultados	42
Discusión	45
Conclusión	50
Literatura Citada:	51

ÍNDICE DE TABLAS

ARTÍCULO 2

Tabla 1 Índice de diversidad de nucleótidos de *M. roreri*, número de sitios polimórficos y número de sitios privados para cada finca analizada. M: Manabí, ST: Santo Domingo, Q: Los Ríos..... 61

Tabla 2 Distancia genética de Weir & Cockerham (F_{st}) entre los asilados de *M. roreri* de las diferentes fincas de las 3 provincias analizadas. M: Manabí, ST: Santo Domingo, Q: Los Ríos. La mayor distancia se evidencia entre las fincas M5 y Q5, mientras que la menor distancia se observa entre las fincas ST5 y Q4..... 62

Tabla 3 Análisis de varianza molecular (AMOVA) de *M. roreri* entre las 3 provincias analizadas (entre grupos), entre fincas (entre poblaciones dentro de los grupos) y entre los individuos (dentro de grupos) 63

Tabla S1. Identificación molecular de *M. roreri* al comparar las secuencias con las secuencias registradas en el GenBank.....65

ÍNDICE DE FIGURAS

ARTÍCULO 1

Figura 1. Estructura morfológica de *M. roreri* en la que se observa el micelio septado con doliporos típicos (Evans, 1981) 34

Figura 2. Ciclo de infección de *M. roreri* en *Theobroma cacao*. Las esporas que infectan los frutos inician la fase biotrófica con una duración de 45-90 días, luego se inicia la fase necrotrófica que destruye al tejido y se propagan por el viento y la lluvia. (Bailey et al., 2017).35

ARTÍCULO 2

Figura 1 Sitios de recolección de muestras de cacao con sintomatología de moniliasis en tres provincias de la costa ecuatoriana: Santo Domingo, Manabí y Los Ríos. Mapa realizado por Daniela Arias..... 55

Figura 2 Cacaos recolectados con sintomatología de moniliasis, se evidencia la presencia de pseudostroma blanco, manchas marrones y deformidades del cacao que son característicos de la presencia de *M. roreri*. 56

Figura 3 Morfología macroscópica y microscópica de los aislados de *M. roreri*. a.) aislado de color marrón debido a la presencia de gran esporulación. b) aislado de color crema salmón c) micelio septado con esporas en maduración basipétala, lente 40 X..... 57

Figura 4 Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las secuencias analizadas de *M. roreri* provenientes de las 5 fincas de cada una de las tres provincias analizadas: Los Ríos (Q), Santo Domingo (ST) Manabí (M). Se observan tres grupos de muestras, en el primer grupo se encuentran agrupadas las fincas de Manabí con la finca 5 de la provincia de Santo Domingo. En los grupos restantes se encuentran agrupadas fincas de las provincias de Santo Domingo y Manabí. 57

Figura 5 Análisis Filogenético de las secuencias de *M. roreri* de este estudio (75 secuencias) Los Ríos (Q), Santo Domingo (ST) Manabí (M) y otras secuencias de América Latina obtenidas del GenBank. Como grupo externo se ubica *Crinipellis pernicioso*. Se observan diferentes agrupaciones de las secuencias analizadas, en el primer grupo basal (grupo A) se observan secuencias de Santo Domingo y Manabí agrupadas con probabilidades posteriores mayores a 0.9..... 60

ARTÍCULO 1

*Influencia de la vaina helada en la producción del cacao (*Theobroma cacao L*) en Ecuador: Historia, Causas y Efectos.*

Autor: Aguirre Xamara ¹

¹Universidad San Francisco de Quito USFQ. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. EC170157, Quito, Ecuador

Resumen

En la historia del Ecuador, el cacao ha sido de gran importancia en su cultura, así como en su economía. El cultivo de cacao en el país ha alcanzado gran reconocimiento a nivel internacional convirtiéndose en el principal exportador del cacao fino de aroma. Varias enfermedades han atacado a este cultivo siendo las más comunes: la escoba de bruja, vaina negra y vaina helada. La vaina helada causada por el hongo *Moniliophthora roreri* ha generado grandes pérdidas en la producción cacaotera ecuatoriana. La infección de *M. roreri* presenta dos fases: la fase biotrófica en la que se presenta la malformación del fruto y la fase necrótica que resulta en la muerte de éste. Como métodos de control para la enfermedad se han usado prácticas culturales como poda de las plantaciones y manejo de los riegos, entre otras. De igual manera, se han usado fumigaciones con pesticidas a base de cobre y el control biológico con *Trichoderma*. Los análisis de diversidad genética, distribución biogeográfica y comportamiento de *M. roreri* posibilitan el desarrollo de nuevas estrategias más eficientes para el control del patógeno y de esta manera mejorar la producción del cacao.

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, hongo basidiomiceto, patógeno hemibiotrófico, diversidad genética, control biológico.

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao L*) es uno de los principales productos agrícolas del Ecuador. A lo largo de la historia, nuestro país ha sido considerado el mayor productor y exportador de cacao fino de aroma en el mundo. Sin embargo, la producción de este cultivo se ha visto afectado debido a que es altamente susceptible a enfermedades y plagas, siendo las de origen fúngico las más comunes. Las enfermedades que aparecen con mayor frecuencia en las plantaciones ecuatorianas son: la vaina negra, la escoba de bruja y la vaina helada, siendo la última el causante de mayores problemas en la producción cacaotera ecuatoriana.

Para entender el comportamiento de la vaina helada en el país se analizará la taxonomía de su agente causal (*M. royeri*), así como su morfología, ciclos de vida, su sintomatología y la expresión diferencial de genes en sus fases de infección. Una vez analizado el comportamiento de la enfermedad se analizarán las prácticas que realizan los agricultores para prevenir su propagación y control en los cultivos.

Importancia del cacao en Ecuador

Theobroma cacao L es un importante árbol de selva tropical, se conoce comúnmente como cacao y ha sido cultivado durante mucho tiempo en América del Sur, Centroamérica y Mesoamérica, siendo considerado un alimento de origen divino muy significativo en las poblaciones ancestrales de los Olmecas, Mayas, Aztecas y Zapotecas por sus creencias espirituales y sistemas socioeconómicos (Badrie *et al.*, 2015)

El cacao es uno de los principales productos y de mayor importancia en la economía ecuatoriana. Alrededor del año 1911 este cultivo era conocido como “La Pepa de Oro”, representando más del 40% de las exportaciones del Ecuador (BCE, 2018). Entre los

años 1880-1915, Ecuador fue el mayor exportador mundial de cacao, pero el ataque de las enfermedades conocidas como escoba de bruja y moniliasis redujeron considerablemente su producción en aproximadamente un 63%, de 40 mil a 15 mil toneladas métricas, entre los años 1915-1930 (El Agro, 2016).

En las décadas de los 40 se renovaron y cultivaron nuevas huertas, iniciando la recuperación lenta de los cultivos de cacao, para el año 1960 la producción de cacao llegaba a 33 000 toneladas métricas (Barcos, 2014).

Durante el periodo 2007-2012 las exportaciones de cacao registraron un aumento constante con una Tasa de Crecimiento Promedio Anual (TCPA) de 13.80% (El Agro, 2016). Al finalizar el año 2008 se exportaron 110.000 toneladas métricas con un valor de 290 millones de dólares (El diario, 2008), para el 2010 las exportaciones generaron un ingreso de 420 millones de dólares. En el 2011 se registró el mayor aumento del volumen exportado a 181,838 toneladas métricas, siendo el 87% en grano y el 13% semielaborado (El Agro, 2016; Proecuador, 2013). En el 2016 se exportaron 177.551 toneladas métricas (INEC, 2018).

Actualmente, Ecuador ocupa el sexto lugar en la exportación del cacao a nivel mundial (Anecacao, 2015), a pesar de representar tan solo el 3.6% del total de exportaciones ecuatorianas. No obstante, en los últimos 5 años el cacao ha contribuido con el 0,15 % del PIB Ecuatoriano (BCE, 2018).

En Ecuador, la producción de cacao está distribuida entre las provincias de: Guayas, Los Ríos, Esmeraldas, Manabí, El Oro, Santo Domingo, Santa Elena, Bolívar, Cañar, Chimborazo, Azuay, Pichincha, Loja, Imbabura, Orellana, Napo, Pastaza, Zamora Chinchipe, Morona Santiago y Sucumbíos (Sepúlveda *et al.*, 2017). Entre los requerimientos climáticos y edáficos se encuentran: Altitud: 15 a 800 msnm,

precipitación: 1500 a 3000 mm, temperatura: 24 a 25°C, suelo: fértiles, profundos y francos, pH: 6.0 a 7.0. (Pico *et al.*, 2012).

Variedades de cacao producidas en Ecuador.

Dentro de las variedades más importantes de cacao cultivadas en Ecuador, se encuentra el cacao Nacional también denominado “Fino de Aroma” o “Sabor Arriba”, reconocido como producto tradicional y emblemático gracias a su aroma y sabores florales y frutales únicos que son utilizados para la producción de chocolatería fina (Anecacao, 2015). Esta variedad representa el 6.8 % de la producción mundial de cacao, de la cual Ecuador es el principal productor. (Loor *et al.*, 2013).

Otra variedad de cacao ecuatoriano es el CCN51 también conocido como “Colección Castro Naranjal”, obtenido del cruce de las variedades IMC-67 con la ICS-95. Fue desarrollado por el Agrónomo Homero Castro Zurita alrededor del año 1960. Presenta un rendimiento 4 veces mayor al de las producciones clásicas y posee un alto contenido de grasas (54%), que lo hace muy apetecido en la industria. Además, es un clon cosmopolita que se adapta casi a todas las zonas tropicales, hasta los 1000 metros sobre el nivel del mar (Villalta, 2014).

Las principales enfermedades del cacao.

El cultivo de cacao ha demostrado ser altamente susceptible a enfermedades y plagas, siendo las de origen fúngico las más comunes. Las enfermedades más peligrosas son: la vaina helada y la escoba de bruja. Estas dos enfermedades son causadas por basidiomicetos hemibiotróficos, *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* (Aime y Phillips-Mora, 2005; Evans, 2002a). Entre los patógenos menos comunes

incluyen: algas, bacterias, nematodos, plantas parásitas y virus (Aime y Phillips-Mora, 2005).

La vaina negra: es una enfermedad de origen fúngico, siete especies de *Phytophthora* están involucradas en esta enfermedad, pero *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. megakarya*, y *P. palmivora* son los más importantes (End *et al.*, 2014; Guest, 2007). La estimación de pérdidas debido a estos patógenos se aproxima a 450 mil toneladas métricas representando en promedio entre el 20% al 25% del total de la producción a nivel mundial (Evans, 2007).

P. megakarya es la especie más dañina, primero fue identificada en Camerún y Nigeria en 1979, donde originalmente se confundió con *P. palmivora*. Por su similitud, *P. megakarya* es endémico de Guinea Ecuatorial, Gabón, Camerún, Togo, Nigeria y Ghana, y todavía se encuentra en fase invasiva en Côte d'Ivoire (Akrofi *et al.*, 2015; End *et al.*, 2014). El patógeno se reproduce principalmente de manera clonal y los esporangios y las zoosporas son los principales propágulos infecciosos (Guest, 2007). En condiciones de humedad, una sola vaina puede producir hasta cuatro millones de esporangios que contienen zoosporas móviles, y son diseminadas por la lluvia, las hormigas, los insectos voladores, murciélagos y roedores. *P. megakaria* y *P. palmivora* infectan la corteza y los cojines florales causando canchales, estos pueden extenderse de la base del tronco a las raíces principales, las lesiones de las vainas comienzan como manchas pequeñas duras y oscuras, luego crecen y cubren rápidamente toda la superficie de la vaina y los tejidos internos (Guest, 2007).

Para el manejo de esta enfermedad se utiliza el control cultural, así como el manejo con pesticidas (cobre, metalaxil / mefenoxam y fosfonatos). (Bateman *et al.*, 2005).

En Ecuador esta enfermedad es una de las más comunes en los cultivos de cacao y se encuentra dentro del plan de manejo integrado del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) (Pico *et al.*, 2012). Un estudio importante es el de Simón *et al.*, (2017) donde reportaron la presencia de *Phytophthora* sp. en el 90% de los cultivos muestreados en la provincia de Esmeraldas, mostrando una infestación más severa en los meses de enero -abril, donde son más frecuentes las precipitaciones con temperaturas que oscilan entre 21-30 °C y humedad relativa entre 80 -90%.

Escoba de bruja: causada por *Moniliophthora perniciosa*, anteriormente conocida como *Crinipellis perniciosa* y *Marasmius perniciosus*. Este patógeno probablemente evolucionó en la cuenca del Amazonas, pero se mantuvo restringido a esa región hasta que el cacao se cultivó en otras áreas (Evans, 2002 b). En la actualidad esta enfermedad está presente en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guaya Francesa, Granada, Guyana, Panamá, Perú, Trinidad, Santa Lucía, San Vicente, Suriname y Venezuela (End *et al.*, 2014)

La escoba de bruja ha generado pérdidas anuales estimadas de 250,000 toneladas métricas en la producción del cacao en América Latina (Bowers *et al.*, 2001). Poco después de su aparición en Guyana y Suriname, la escoba de bruja causó la decadencia y el eventual abandono de la producción de cacao en estas zonas (Evans, 2002a; Evans *et al.*, 2013). En Brasil, la producción disminuyó de 400,000 a 150,000 toneladas anuales después de la entrada del patógeno (Evans, 2007). Según Solis *et al.*, (2005), esta enfermedad es la causante de pérdidas hasta del 60 % de la producción cacaotera ecuatoriana. El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) la considera dentro del manejo integral de plagas del cacao como una de las enfermedades más importantes que afecta la producción cacaotera ecuatoriana (Pico *et al.*, 2012)

La infección comienza con la producción de basidiosporas a partir de pequeños basidiomas (hongos) rosados que se forman en los tejidos de las plantas y su dispersión se produce principalmente durante los periodos nocturnos, bajo alta humedad las basidiosporas tienen la capacidad de infectar cualquier tejido meristemático del cacao, incluidos brotes, flores y frutos jóvenes en desarrollo (Frias *et al.*, 1991). El manejo integral de la escoba de bruja considera estrategias fitosanitarias, control químico y control biológico (Evans *et al.*, 2003). El saneamiento de los cultivos infectados es recomendable, el uso fungicidas de contacto como el cobre, clorotalonil y triazoles (Meinhardt *et al.*, 2008). Finalmente, como control biológico para esta enfermedad y la vaina helada, se está investigando el uso de cepas endofíticas de *Trichoderma*. Sin embargo, se necesita más información de cómo podrían manipularse las cepas de endófitos para reducir el impacto de estos agentes infecciosos en los cultivos de cacao (Krauss *et al.*, 2010; Meinhardt *et al.*, 2008).

En el Ecuador, el INIAP ha propuesto una guía de manejo integral de enfermedades del cacao donde se incluye a la escoba de bruja. Las prácticas consisten en prácticas culturales como abonamiento de los suelos, controles de malezas, canales de drenajes, encalado, podas de mantenimiento; control biológico con *Trichoderma* y control químico con fungicidas a base de cobre (Pico *et al.*, 2012).

La vaina helada: también conocida como moniliasis, enfermedad de Quevedo y podredumbre-acuosa causada por *Moniliophthora roreri* (Evans 2002a) afecta a todas las especies silvestres y cultivadas de *Herrania* y *Theobroma* (*T. cacao* y *T. grandiflorum*) (Phillips-Mora *et al.*, 2007).

El primer brote bien documentado fue reportado a inicios del siglo 20, la enfermedad invadió grandes áreas de producción de cacao en Ecuador y causó pérdidas devastadoras

en el rendimiento de este cultivo, de 46 000 toneladas en 1917 a alrededor de 20 000 toneladas en 1925 (Thorold, 1975).

El daño a la producción de cacao en Costa Rica también fue sustancial después de la primera detección de *M. royeri* en 1978, entre 1978 y 1983, la producción de cacao en Costa Rica disminuyó en un 72% y las exportaciones de granos de cacao seco disminuyeron en un 96% (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). En 1988, apareció en el área de Bagua Grande en Perú y en 2011 se confirmó en la región de Beni en Bolivia, actualmente se encuentra en Belice, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú y el noroeste Venezuela (Phillips-Mora *et al.*, 2007; Phillips-Mora *et al.*, 2007b).

Origen y distribución de *M. royeri* en Latinoamérica

La primera detección del hongo *M. royeri* en el cultivo de cacao fue en la región de Quevedo, Los Ríos, Ecuador (FHIA, 2003). El investigador Rorer envió especímenes de Ecuador a R. E. Smith en la Universidad de California quien consideró que se podría tratar de una especie parecida a *Monilia furticola* (Correa *et al.*, 2014). En el año 1918, Rorer reportó que había encontrado un nuevo patógeno fúngico que atacaba a las mazorcas de cacao en Ecuador originario de Quevedo. Debido al desconocimiento del patógeno se le atribuyeron varios nombres a la enfermedad como: enfermedad acuosa, enfermedad de Quevedo, vaina helada y mancha. (Phillips Mora, 2003).

En el año 1860, Jensen reportó sobre una mención en el diario acerca del apareamiento de una enfermedad fúngica parecida a la moniliasis en la Hacienda Maravilla en la ciudad de Guayaquil. En el año 1911 un funcionario consular de Estados solicitó información sobre una enfermedad que estaba atacando a los cacaos durante algunos años. Según Garcés, una carta escrita el 24 de mayo de 1912 indica que las

enfermedades “mancha” y “hielo” eran abundantes en las provincias de Carchi y Esmeraldas y estaban causando la destrucción de las plantaciones de cacao (Phillips Mora, 2003).

La enfermedad tuvo una amplia distribución en Latinoamérica, probablemente en la década de 1940 *M. roreri* se extendió al oeste de Venezuela (Evans, 2002). A Panamá en la década de 1950 y en Costa Rica en la década de 1970. La dispersión del patógeno en Mesoamérica ha sido lenta, hay informes de su llegada a Guatemala y Honduras en la década de 1990 (Evans, 2002). A Belice y México llegó una década después (Phillips-Mora *et al.*, 2006a, b). Evans (2002a) en su trabajo menciona el apareamiento de la enfermedad en el norte de Perú en 1988 y su posterior dispersión a los valles del sur en 1995. Recientemente el hongo ha sido reportado en Bolivia y Jamaica (Phillips-Mora *et al.*, 2015)

Taxonomía de *M. roreri*

La historia taxonómica de *M. roreri*, ha pasado por varios cambios desde la primera identificación de este patógeno (Evans, 2002). R. Ciferri y Parodi en 1933 lo clasificaron de la siguiente manera: Clase: Deuteromicetos, Orden: Hifales, Género: Monilia, especie: *roreri* (Phillips, Mora 2003). Evans *et al.*, (1978) examinaron los caracteres ultraestructurales de *M. roreri* y encontraron que la estructura interna del micelio del hongo es más típica de basidiomicetos que de los ascomicetos describiendo el nuevo género (*Moniliophthora*) debido a que fue identificado como un basidiomiceto en estado asexual, por lo tanto en el año 2005 (Aime y Phillips-Mora) presentaron la clasificación taxonómica para *M. roreri* dentro del Phylum Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Agaricales, Familia Marasmiaceae, Género *Moniliophthora*, especie *Moniliophthora roreri*.

Morfología de *M. roreri*

M. roreri es un hongo basidiomiceto que posee micelio hialino, ramificado, septado con doliporos típicos (Torres, 2010). Los conidios (esporas) provienen de un basidio modificado y se producen en cadenas con maduración basipétala, varían de 4 a 10 en una cadena y se encuentran encerradas o envueltas dentro de la pared celular (Figura. 1) (Evans *et al.*, 2002). Las esporas generalmente se redondean con la edad, volviéndose globosas a subglobosas, (6.5-) 8-15 μm , ocasionalmente elipsoidal, 8-20 x 5-14 μm , presentan una pared gruesa (hasta 2 μm) y pueden ser de color amarillo claro o cafés (Evans *et al.*, 2002)

Ciclo de infección de *M. roreri*

Las condiciones climáticas y la cantidad de esporas libres son determinantes en el ciclo de vida de *M. roreri*. Las esporas germinadas penetran en los frutos a través de la cutícula o el estoma y colonizan los tejidos internos (Bailey *et al.*, 2017). Al ser un patógeno hemibiotrófico presenta dos fases invasivas: la fase biotrófica (BTP) dura de 45 a 90 días y el fruto adquiere una forma hinchada con tabiques que da como resultado la malformación del fruto (Evans, 2016). Luego el hongo cambia a la fase necrotrófica (NTP), donde se da una alta producción de esporas y se produce la muerte del tejido del cacao en cuestión de días (Figura. 2) (Bailey *et al.*, 2013). La capacidad de los frutos para producir esporulación es considerable, se ha determinado que ocurren hasta 20 periodos de esporulación sucesiva en cuatro ciclos durante 80 días (Phillips Mora, 2003). La densidad de esporulación puede alcanzar 44 millones de esporas por cm^2 y una vaina puede producir más de 7 millones de esporas (Phillips Mora *et al.*, 2007b).

Las masas de esporas en forma de polvo se desprenden del pseudostroma de la vaina por el movimiento del aire o del árbol y tienen diferentes mecanismos de dispersión. Las esporas son liberadas y transportadas libremente por el viento, los seres humanos, animales y agua (Phillips Mora, 2003; Sánchez *et al.*, 2012). Debido a esto, el hongo está presente durante todo el año como componente de la capa de aire en las regiones de cultivo de cacao, con una frecuencia más alta durante la estación húmeda y un pico al comienzo de las fuertes lluvias. Las esporas sobreviven durante 9 meses en las vainas en el árbol, pero aproximadamente un mes en las vainas cosechadas que quedan en el suelo (Bailey *et al.*, 2017).

Sintomatología de la infección por *M. royeri*

La malformación de las vainas de cacao depende de la edad de infección, cuanto más joven es la vaina, mayor es el efecto sobre la expresión de los síntomas externa e internamente (Bailey *et al.*, 2013). El primer síntoma externo es la aparición de manchas oscuras y lesiones irregulares que se unen para cubrir toda la superficie de la vaina. Luego de 3-8 días de la presencia de estas lesiones, el pseudostroma (micelio blanco) envuelve la vaina convirtiéndola gradualmente de color crema, a rosado o marrón oscuro a medida que las esporas se desarrollan y maduran (Bailey *et al.*, 2013).

Algunos frutos pueden estar sin sintomatología externa incluso después de 60 días de infección, pero internamente están necrosados. Por el contrario, se puede dar la infección en vainas con más de tres meses de edad en las cuales el daño solo se presenta en la cáscara. De esta forma, se pueden aprovechar como parte de la cosecha ya que las almendras como tal, no presentan daño (Phillips- Mora, 2003; Sánchez *et al.*, 2012).

Los síntomas internos de los frutos también varían con la edad. En los frutos jóvenes se presentan problemas en el número y desarrollo de las semillas, los tejidos son desorganizados y gelatinosos, de ahí el nombre de pudrición acuosa de la vaina (González, 2014). En los frutos adultos infectados se observa una hiperplasia macroscópica de las células que produce una compactación tisular de los tejidos con semillas desordenadas pegadas entre sí e incluso malformadas. (Bailey *et al.*, 2017). Estos frutos enfermos normalmente son más pesados que los frutos sanos de edad similar, sin embargo, en algunos frutos infectados a edad avanzada se puede observar daño solo en el mesocarpo sin afectar las semillas, o solo algunas de ellas, por lo que pueden ser aprovechados en la cosecha (Torres, 2010).

Manejo integrado de la vaina helada

El manejo integrado de enfermedades del cacao representa el conjunto de prácticas que mantienen a las plantaciones libres de enfermedades y plagas (Bailey *et al.*, 2017). Mantienen las pérdidas en niveles aceptables y a costos razonables, contribuyen a que los niveles de impacto mínimos sobre el medio ambiente (Pico *et al.*, 2012). Dentro de las prácticas más utilizadas para el manejo de esta enfermedad se encuentran: el control cultural, control químico y control biológico.

El control cultural que se realiza a través del control de malezas, elaboración de canales de drenaje a fin de evitar encharcamientos que causen asfixia al sistema radicular del cultivo por falta de oxígeno. Encalado del suelo que facilite la disponibilidad y asimilación de nutrientes (Pico *et al.*, 2012). Cosecha adecuada de los frutos, remoción de frutos enfermos semanalmente (saneamiento) o eliminación total de los frutos en época de baja producción (purga) y poda de árboles de sombra (Torres, 2010). Todas

estas prácticas de control cultural del cacao van a favorecer el crecimiento adecuado del cultivo y combatir el crecimiento del patógeno.

El control químico para el manejo de la vaina helada consigue resultados significativos utilizando fungicidas a base de cobre (Suarez *et al.*, 2012). En la guía de manejo integrado del INIAP se recomienda iniciar el control químico cuando los frutos tengan un tamaño aproximado de 4-5 cm en el periodo de mayor fructificación. Se deben realizar en total 5 aplicaciones, en intervalos de 22 días de tal manera que se proteja al fruto en las etapas iniciales de su desarrollo. (Pico *et al.*, 2012).

En el control biológico se utilizan organismos vivos para controlar las infecciones de los patógenos. Kraus y Sobreanis (2001) reportaron resultados positivos contra *M. roreri* utilizando cepas de *Clonostachis rosea*, causando un incremento en la producción cacaotera. Evans *et al.*, (2003) demostraron que los aislados endofíticos de *Trichoderma* tiene la capacidad de colonizar plántulas de cacao sin desencadenar mecanismos de defensa del huésped y alcanzar los meristemos apicales. Finalmente concluyeron que estos podrían actuar como simbiontes mutualistas al aumentar la resistencia del huésped a patógenos como *M. roreri*.

Diversidad genética de *M. roreri*

La variación genética en los hongos permite que se adapten a las condiciones ambientales cambiantes a las que se encuentran expuestos. (Phillips – Mora *et al.*, 2007). Particularmente a una mayor resistencia o tolerancia al huésped, que se desarrolla por presiones selectivas naturales o introducidas por fitomejoradores. Por lo tanto, una mejor comprensión de la variación genética de *M. roreri* es fundamental para el control de la enfermedad (Ali *et al.*, 2015).

Phillips- Mora *et al.*, 2007 reportaron la mayor diversidad genética en Colombia, sugiriéndola como el centro de origen. Utilizaron marcadores: AFLP, ISSR e identificaron 5 grupos genéticos de *M. royeri*. Los dos principales fueron: el grupo Bolivar, donde se encuentran aislados de Colombia, Perú, Venezuela y Ecuador. El grupo Co- West, que comprenden aislados de Colombia Ecuador y América Central. Los tres grupos restantes son endémicos de Colombia y Noroeste de Ecuador.

A partir de este estudio donde se sugiere al noroeste de Colombia como origen de *M. royeri*, varios autores han realizado nuevos estudios de diversidad genética del patógeno en esta región.

Melo *et al.*, (2014) mediante el desarrollo y validación de 28 loci de microsatélites, demostraron que 10 loci son polimórficos en una población ecuatoriana de 27 aislamientos. Como resultado se obtuvo que el número promedio de alelos por locus fue de 3.2 y la heterocigosidad fue de 0.3 entre los aislamientos de *M. royeri* de Ecuador.

Ali *et al.*, (2015) en su estudio con SNP encontraron 10 genotipos en valle superior de Magdalena en Colombia con niveles más altos de diversidad genética. Donde predijeron que podría ubicarse el centro de origen de este patógeno. A diferencia de los cinco grupos genéticos informados anteriormente por Phillips Mora *et al.*, (2007), los 172 aislados de este estudio se separaron en dos grupos distintos (a y b). El grupo a se limitó a los aislados de Colombia y Ecuador, mientras que el grupo b tenía una amplia distribución geográfica en América del Sur y Central.

Jaimes *et al.*, (2016) utilizaron 23 marcadores de repetición de secuencia corta (SSR) y encontraron altos niveles de diversidad genética en los 120 aislados de su estudio.

Además, identificaron 3 grupos genéticos entre los aislamientos de *M. royeri* en el valle de Magdalena.

Los valores altos de diversidad genética encontrados en los diferentes estudios indican altas tasas de mutación o niveles de intercambio genético dentro y entre los diferentes lugares geográficos donde se encuentran. Otra fuente de variación podría ser el flujo de genes entre subpoblaciones y poblaciones que puede contribuir a los altos índices de variabilidad observada. (Jaimes *et al.*, 2016)

Interacción planta – Patógeno: expresión de genes en las diferentes etapas de infección de *M. royeri*

En la fase biotrófica de invasión el hongo rompe la pared celular de la planta y crece entre los tejidos de la vaina de cacao. El acceso a los nutrientes de la planta es vital para el crecimiento y desarrollo del hongo (Bailey *et al.*, 2013).

Dentro de los genes que se expresan en la fase biotrófica se encuentra la pleutrolisina B que es una citolisina formadora de poros que proporciona el acceso de los hongos a los nutrientes de la planta (Bailey *et al.*, 2017). Dos genes de xilanasas A y tres de la familia GH 43 se expresan cuando el hongo está utilizando hemicelulosas a través del xilano en la planta de cacao. Una endo-1,5-alfa-L-arabinasa actúa sobre otro componente de las hemicelulosas, los arabinanos y la metil estearasa pectina tiene acción sobre la pectina de las paredes celulares del huésped (Kim *et al.*, 2005).

Para evitar los mecanismos de defensa del huésped, las hidrofobinas actúan enmascarando al hongo de la detección del huésped mientras promueven su colonización (Kim *et al.*, 2005). McpC5 perteneciente a los genes de ceratoplaninas puede unir fragmentos de quitina y de esta forma puede actuar mitigando las respuestas

de defensa de las plantas protegiendo a los hongos durante la fase biotrófica de la enfermedad (Bailey *et al.*, 2017).

En la fase necrotrófica, se da un aumento en la biomasa del hongo acompañado de necrosis y muerte celular de la planta. En esta fase el hongo presenta varias condiciones: crecimiento rápido, adquisición y utilización de nutrientes, patogenicidad y prevención de los mecanismos de defensa de las plantas (Bailey *et al.*, 2013). En esta fase se expresan los genes asociados con la patogenicidad: las ceratoplataninas, las proteínas inductoras de necrosis (NEP), salicilato hidrolasas y sideróforos de hierro; las ceratoplataninas y los NEP son toxinas que causan la muerte celular de las plantas (García *et al.*, 2007). Las salicilato hidrolasas descomponen el ácido salicílico que es una hormona clave en la defensa de las plantas (Zelena *et al.*, 2013). En la fase necrotrófica el hongo parece estar bajo estrés y debe emplear algunos mecanismos para detoxificar y mitigar el estrés abiótico. Para esto, se expresan 39 genes de citocromo P450, una proteína resistente a múltiples fármacos, dos proteínas transportadoras de fármacos MFS, dos metalo-beta lactamasas y proteínas de choque térmico (Limura y Tatsumi, 1997).

Conclusiones

Las enfermedades más comunes que afectan la producción de cacao en Ecuador son: la vaina negra, la escoba de bruja y la vaina helada. Siendo la más importante la vaina helada cuyo agente causal es *M. royeri*. Esta afección es causante de la pérdida de más del 40% de la producción de cacao en Ecuador por año. Este patógeno presenta dos fases de infección: una fase biotrófica y posteriormente una fase necrotrófica. La primera se caracteriza por: una malformación del fruto (protuberancias, lesiones y manchas color marrón), y la segunda fase da como resultado la muerte del fruto en el

que se puede observar una gran producción de esporas (pseudostroma blanco en la corteza).

Desde la aparición de *M. roreri* se han efectuado varias estrategias de control y prevención para evitar la propagación del hongo dentro de las cuales se encuentran: prácticas culturales (poda, control de malezas, remoción de frutos infectados, entre otras.), controles químicos (compuestos a base de cobre) y biológicos (*Trichoderma*). Sin embargo, todas las estrategias descritas no han podido alcanzar el 100% de efectividad en el control de la enfermedad.

Finalmente, los estudios realizados en Colombia son relevantes para la identificación de centros de diversidad y posible origen de *M. roreri*. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales en Ecuador, a fin de hacer una comparación del comportamiento de *M. roreri* en las diferentes regiones donde se presenta. De esta forma se lograría obtener información que permita establecer nuevas estrategias de manejo integrado de *M. roreri* en los cultivos de cacao.

Bibliografía

- Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agent of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97, 1012–1022.
- Ali, S.S., Shao, J., Strem, M.D., Phillips-Mora, W., Zhang, D., Meinhardt, L.W. and Bailey, B.A. (2015) Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Front. Microbiol.* 6, 850.
- Akrofi, A. Y., Amoako-Atta, I., Assuah, M., & Asare, E. K. (2015). Black pod disease on cacao (*Theobroma cacao* L.) in Ghana: Spread of *Phytophthora megakarya*

- and role of economic plants in the disease epidemiology. *Crop Protection*, 72, 66–75.
- Aneccacao, 2015. Historia del Cacao. Obtenido de: <http://www.aneccacao.com/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>.
- Badrie, N. Bekele, F. Sikora, E. Sikora, M. 2015. Cocoa Agronomy. Quality, Nutritional and Health Aspects. *Clinical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55. 620-659.
- Bailey, B.A., Crozier, J., Sicher, R.C., Strem, M.D., Melnick, R., Carazzolle, M.F., Costa, G.G.L., Pereira, G.A.G., Zhang, D. and Maximova, S. (2013) Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 81, 84–96.
- Bailey, B. Evans, H. Phillips- Mora, W. Ali, Sh. Meinhardt, L. 2017. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao Frost. *Molecular Plant Pathology*
- Banco Central del Ecuador (2018). Información Estadística Mensual. Boletín No. 1991, 3.1.2. Obtenido de: <https://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/776>.
- Barcos, W. 2014. Medición del Impacto de la Industria Tecnológica Ecuatoriana en el Sector del Cacao durante el periodo 2009. (Tesis de Licenciatura). Universidad Católica Santiago de Guayaquil. Ecuador.
- Bateman, R. P., Hidalgo, E., Garcia, J., Arroyo, C., ten Hoopen, G. M., Adonijah, V., et al. (2005). Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology*, 147, 129–138.
- Bowers, J. H., Bailey, B. A., Hebbard, P. K., Sanogo, S., & Lumsden, R. D. (2001). The impact of plant diseases on world chocolate production. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV. Published online.
- Correa, J. Castro, S. Coy, J. 2014. Estado de la Moniliasis del Cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. Universidad EAFIT. Colombia.
- End, M. J., Daymond, A. J., & Hadley, P. (Eds.). (2014). Technical guidelines for the safe movement of cacao germplasm. Revised from the FAO/IPGRI Technical Guidelines No. 20 (Second Update, August 2014). Global Cacao Genetic Resources Network (CacaoNet), Bioversity International, Montpellier.
- El Agro, 2016. El Cacao en la Economía del Ecuador. Recuperado de: <http://www.revistaelagro.com/el-cacao-en-la-economia-del-ecuador/>.

- El diario, 2008. Las exportaciones de cacao marcan record. Obtenido de: <http://www.eldiario.ec/noticias-manabi-ecuador/102259-las-exportaciones-de-cacao-marcan-record/>.
- Evans, H. Samnson, J. Benny G. (1978). On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma* in South America. *Can J. Bot.* Vol 56, 1978
- Evans, H. C. (2002a). Invasive neotropical pathogens of tree crops. In R. Watling, J. C. Frankland, A. M. Ainsworth, S. Isaac, & C. H. Robinson (Eds.), *Tropical mycology. Micromycetes* (Vol. 2, pp. 83–112). Wallingford: CAB International.
- Evans, H. C. (2002b). Biological control of weeds. In F. Kempken (Ed.), *The Mycota XI* (pp. 135–152). Berlin: Springer.
- Evans, H. C., Holmes, K. A., and Reid, A. P. 2003. Phylogeny of the frosty pod pathogen of cocoa. *Plant. Pathol.* 52:476-485.
- Evans, H. C. (2007). Cacao diseases – the trilogy revisited. *Phytopathology*, 97, 1640–1643.
- Evans, H.C. (2016) Witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*), history and biology. In: *Cacao Diseases* (Bailey, B.A. and Meinhardt, L.W., eds), pp. 137–177. Dordrecht: Springer.
- FHIA. 2003. Identificación y control de Moniliasis del Cacao. Recuperado de: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A3979e/A3979e.pdf>.
- Frias, G. A., Purdy, L. H., & Schmidt, R. A. (1991). Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. *Plant Disease*, 75, 552–556.
- González, A. 2014. Aislamiento y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* (monilia) en frutos de *Theobroma cacao* L. (CACAO) del cultivar SAN JOSE DEL REAL DE LA CARRERA, USULUTAN (tesis de pregrado). Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Garcia, O., Macedo, J. A. N., Tiburcio, R., Zaparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L. M. C., Ceita, G. O., Micheli, F., Gesteira, A., Mariano, A. C., Schiavinato, M. A., Medrano, F. J., Meinhardt, L. W., Pereira, G. A. G., & Cascardo, J. C. M. (2007). Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycological Research*, 111, 443–455.
- Guest, D. (2007). Black pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology*, 97, 1650–1653.
- INEC, 2018. Estadísticas Agropecuarias- Cultivos permanentes. Obtenido de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/vdatos/>.

- Jaimes, Y.Y., Gonzalez, C., Rojas, J., Cornejo, O.E., Mideros, M.F., Restrepo, S., Cilas, C. and Furtado, E.L. (2016) Geographic differentiation and population genetic structure of *Moniliophthora roreri* in the principal cocoa production areas in Colombia. *Plant Dis.* 100, 1548–1558.
- Kim, S., Ahn, I. P., Rho, H. S., & Lee, Y. H. (2005). MHP1, a Magnaporthe grisea hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Molecular Microbiology*, 57(5), 1224–1237.
- Krauss, U. Hidalgo, E. Bateman, R. Adonijah, V., Arroyo, C. García, J. Crozier, J., Brown, N.A. Hoopen, G.M. and Holmes, K. (2010) Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biol Contrib.* 54, 230–240.
- Krauss, U., & Soberanis, W. (2001a). Rehabilitation of diseased cacao fields in Peru through shade regulation and timing of biocontrol measures. *Agroforestry Systems*, 53, 179–184.
- Limura, Y., & Tatsumi, K. (1997). Isolation of mRNAs induced by a hazardous chemical in whiterot fungus, *Coriolus versicolor*, by differential display. *FEBS Letters*, 412(2), 370–374.
- Loor Solorzano RG, Fouet O, Lemainque A, Pavek S, Boccara M, et al. (2013) Correction: Insight into the Wild Origin, Migration and Domestication History of the Fine Flavour Nacional *Theobroma cacao* L. Variety from Ecuador. *PLOS ONE* 8(2): 10.1371/annotation/2357f0f1-7dc3-4781-afb0-29a8ce56b3f0.
- Meinhardt, L. W., Rincones, J., Bailey, B. A., Aime, M. C., Griffith, G. W., Zhang, D., & Pereira, G. A. (2008). *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology*, 9(5), 577–588.
- Melo, B.L.B., de Souza, J.T., Santos, R.M.F., Rehner, S.A., Solis, K.H., Suarez, C., Hebbbar, P.K., Lemos, L.S.L. and Gramacho, K.P. (2014) Development of microsatellites for the cacao frosty pod rot pathogen, *Moniliophthora roreri*. *Forest Pathol.* 44, 320–324.
- Philips Mora, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. as determined using molecular, phytopathological and morphophysiological evidence. (tesis doctoral). University of Reading. Reino Unido.

- Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007b). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56, 911–922.
- Phillips-Mora, W., & Wilkinson, M. J. (2007). Frosty pod, a disease of limited geographic distribution but unlimited potential for damage. *Phytopathology*, 97, 1644–1647.
- Phillips-Mora, W., Baqueros, F., Melnick, R. and Bailey, B. (2015) First report of frosty pod rot caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Bolivia. *New Dis. Rep.* 31, 29.
- Pico, J., Calderón, D., Fernández, F., y Díaz, A. 2012. Guía del manejo integrado de enfermedades del cultivo de cacao. (*Theobroma cacao* L) en la Amazonía. INIAP. Ecuador
- Proecuador, 2013. Análisis Sector Cacao. Instituto de promoción de exportaciones e inversiones. Obtenido 13-10-2017 de: <http://www.proecuador.gob.ec/pubs/analisis-sector-cacao-2013/>.
- Sánchez, F., y Garcés. F. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. En el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 3(249), 249-258.
- Solís, K. Suarez, C. 2005. Uso de *Trichoderma* spp para el control del complejo Moniliasis – Escoba de bruja del Cacao en Ecuador. INIAP.
- Sepúlveda, W. Ureta, I. Mendoza, C. Checkma, L. 2017. Ecuadorian Farmers Facing Coffe and Cocoa Production Quality Labels. *Journal of International Food & Agribusiness Marketing*. 14:7.
- Simón, F. Bolaños, M. Guerrero, D. Pérez, L. Vargas, D. 2017. CHARACTERIZATION AND EPITOLOGY OF *Phytophthora* sp., IN COCAO (*Theobroma cacao* L.) PLANTATIONS FROM ESMERALDAS, ECUADOR. *Investigación y Saberes*. Vol 6. No. 2. Pp 47-66.
- Thorold CA, 1975. Disease of cocoa. Oxford, UK: Clarendon, pp 27-31.
- Torres, M. 2010. Progreso temporal y manejo integrado de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*,) del Cacao (*Teobroma Cacao*) en Tabasco. México (tesis doctoral). Institución de la Enseñanza e Investigación en ciencias Agrícolas. México.
- Villalta, J. 2014. Costos de producción de 2 hectáreas de cacao CCN-51 de la finca Mónica Narcisa, Recinto Cañalito, cantón Quevedo, año 2014. Facultad De

Ciencias Empresariales. (Tesis de licenciatura). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador.

Zelena, K., Takenberg, M., Lunkenbein, S., Woche, S.K., Nimtz, M. and Berger, R.G. (2013) PfaH2, a novel hydrophobin from the ascomycete *Paecilomyces farinosus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 60, 147–154.

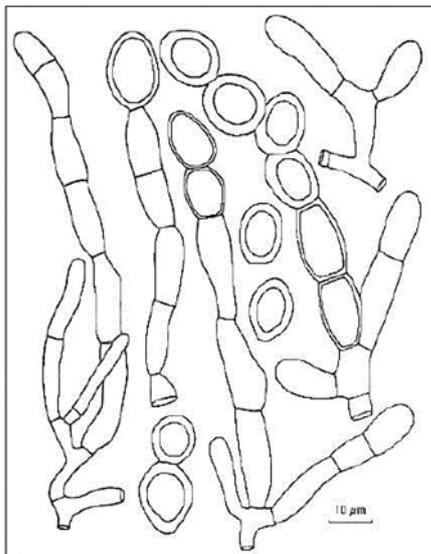


Figura 1. Estructura morfológica de *M. roreri* en la que se observa el micelio septado con doliporos típicos (Evans, 1981)

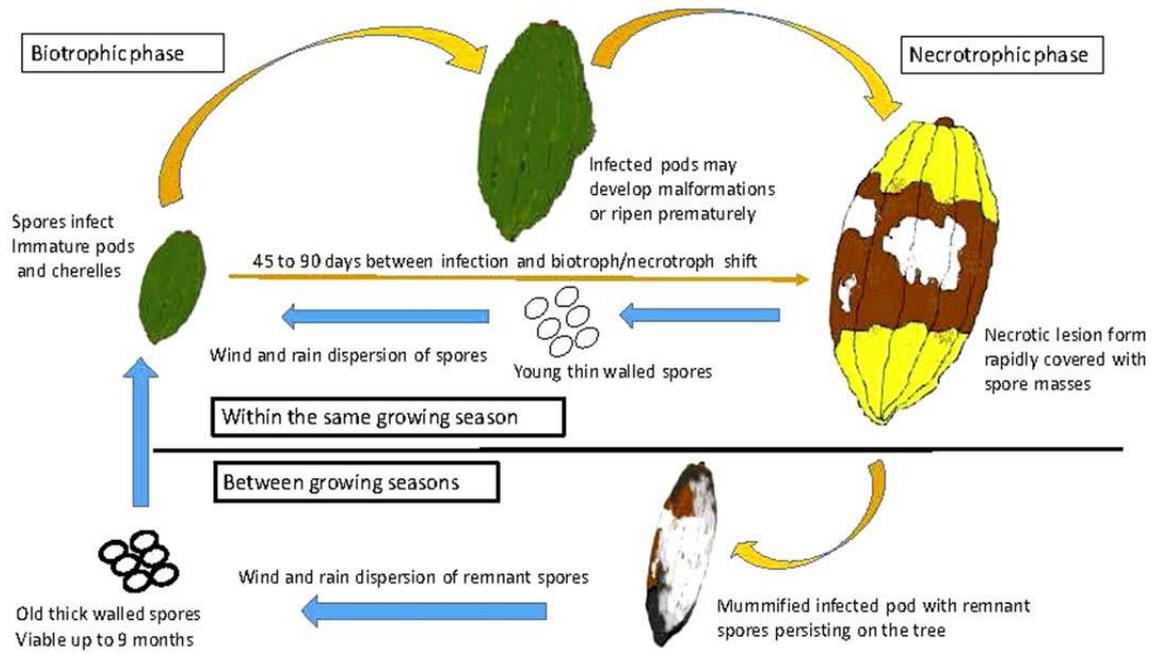


Figura 2 Ciclo de infección de *M. royeri* en *Theobroma cacao*. Las esporas que infectan los frutos inician la fase biotrófica con una duración de 45-90 días, luego se inicia la fase necrotrófica que destruye al tejido y se propagan por el viento y la lluvia. (Bailey et al., 2017)

ARTÍCULO 2

Caracterización molecular de *Moniliophthora roreri* causante de la vaina helada (moniliasis) en el cacao en tres provincias del Ecuador: Los Ríos, Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas

Autores: Xamara Aguirre¹

Afiliaciones:

¹Universidad San Francisco de Quito USFQ. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. EC170157, Quito, Ecuador.

Resumen

El cacao (*Theobroma cacao*) es un cultivo de importancia económica para el Ecuador que ha adquirido protagonismo en los últimos años al convertirse en un importante producto de exportación, particularmente la variedad premium Arriba (cacao fino de aroma). El cultivo de esta especie se ve afectado por varias enfermedades, siendo una de las más importantes la moniliasis, también conocida como la enfermedad de la vaina helada, causada por el hongo *Moniliophthora roreri* que ha generado grandes pérdidas en la producción cacaotera ecuatoriana. En el presente estudio se visitaron tres provincias: Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos. Se aislaron 75 muestras del hongo *M. roreri* provenientes de 15 fincas, 5 por cada provincia. Luego de la extracción del ADN, se amplificó la región ITS. Como resultado de la amplificación de la región ITS se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 710 pb y se confirmó la identidad de los aislados como *M. roreri* por medio de BLAST. En general, la diversidad nucleotídica en cada finca analizada fue baja. En la evaluación de distancias genéticas entre fincas de las diferentes provincias se observaron distancias genéticas mayores entre fincas de Manabí y los Ríos. La mayor parte de la variabilidad genética

se encuentra entre los individuos de una misma finca (71.29 %) lo que sugiere que no existe una estructura poblacional definida. Finalmente, una comparación de las secuencias de este estudio con otras secuencias de América Latina sugiere que Ecuador podría ser el país de origen de *M. roreri* (Manabí o Santo Domingo).

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, regiones ITS, variabilidad nucleotídica, flujo génico, actividad humana, Theobroma y Herrania.

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es un árbol de selva tropical originario de América del Sur, considerado como uno de los principales productos de exportación en Ecuador. Actualmente representa el 3.6 % de las exportaciones totales en el país y en los últimos 5 años la exportación del cacao ha contribuido con el 0.15% del PIB total (BCE, 2018).

El cacao es susceptible a enfermedades y plagas, siendo las de origen fúngico las más comunes, dentro de las cuales se encuentran: la vaina negra causada por *Phytophthora* sp, la escoba de bruja causada por *Moniliophthora perniciosa* y la vaina helada causada por *Moniliophthora roreri* (End *et al.*, 2014). La vaina helada es potencialmente la más destructiva de todas las enfermedades previamente mencionadas debido a que causa pérdidas hasta del 80% de la producción total de cacao (Phillips- Mora *et al.*, 2007). La primera detección del hongo se hizo en la provincia de los Ríos, cuando Rorer (1918) reportó un nuevo patógeno fúngico en Quevedo, durante su visita observó que el foco principal de la moniliasis se encontraba en el área de Quevedo (Phillips- Mora, 2003). Evans (2002) sugirió, casi con certeza que *M. roreri* invadió las florecientes plantaciones de cacao del Ecuador costero desde los bosques infectados, en las laderas occidentales más bajas de la cordillera andina, en algún momento durante el siglo XIX. Adicionalmente concluyó que parecería probable que *T. gileri* represente al huésped

coevolutivo de *M. roreri*, con su rango endémico que se extiende desde el oeste de Ecuador hasta el noroeste de Colombia.

No obstante, Phillips- Mora *et al.* (2006) sugieren que la primera detección del patógeno fue en el noreste de Colombia en el departamento de Santander. Esta enfermedad ha tenido una amplia distribución en Latinoamérica; extendiéndose al oeste de Venezuela alrededor del año 1940, a Panamá en 1950, Costa Rica en 1970, Perú 1988, Guatemala y Honduras en 1990 y a Belice en 2004 (Evans, 2002; Phillips-Mora *et al.*, 2006). Finalmente, la presencia de este patógeno fue reportada en Jamaica en el año 2016 (Bailey *et al.*, 2017).

M. roreri ha sido estudiada de manera extensa para establecer su taxonomía, desde su descubrimiento ha sido reclasificada varias veces. R. Ciferri y Parodi en 1933 lo clasificaron de la siguiente manera: Clase: Deuteromicetos, Orden: Hifales, Género: *Monilia*, especie: *roreri* (Phillips, Mora 2003). Evans *et al.*, (1978) examinaron los caracteres ultraestructurales de *M. roreri* y encontraron que la estructura interna del micelio del hongo es más típica de basidiomicetos que de los ascomicetos describiendo el nuevo género (*Moniliophthora*) debido a que fue identificado como un basidiomiceto en estado asexual, por lo tanto en el año 2005 (Aime y Phillips-Mora) presentaron la clasificación taxonómica para *M. roreri* dentro del Phylum Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Agaricales, Familia Marasmiaceae, Género *Moniliophthora*, especie *Moniliophthora roreri*.

M. roreri afecta únicamente al fruto de la planta. En las mazorcas infectadas se observa en la parte externa del fruto, la aparición de manchas oscuras y lesiones irregulares que luego son cubiertas por el micelio blanco (pseudostroma) característico de *M. roreri* (Bailey *et al.*, 2013). Los síntomas internos se caracterizan por presentar hiperplasia

celular que produce una compactación tisular de los tejidos, con semillas mal formadas. (Torres, 2010).

Las condiciones climáticas son determinantes en el ciclo de vida de este patógeno (González, 2014). Las masas de esporas se desprenden del pseudostroma y se mueven por diferentes mecanismos (viento, seres humanos, animales, agua, etc.) (Phillips - Mora, 2003). La densidad de esporulación puede alcanzar 44 millones de esporas por cm² y una vaina puede producir más de 7 millones de esporas (Phillips Mora et al., 2007b). Debido a esto, el hongo está presente durante todo el año como componente de la capa de aire en las regiones de cultivo de cacao, con una abundancia más alta durante la estación húmeda y al comienzo de las fuertes lluvias. Las esporas sobreviven durante 9 meses en las vainas en el árbol, pero aproximadamente un mes en las vainas cosechadas que quedan en el suelo (Bailey *et al.*, 2017).

El manejo integrado de esta enfermedad combina varias prácticas fitosanitarias, entre éstas: el control cultural que se realiza a través del control de malezas y remoción de frutos enfermos etc. (Leach *et al.*, 2002), el control químico que utiliza fungicidas a base de cobre (Sanchez *et al.*, 2012); y el control biológico, en el que se utilizan organismos vivos como *Trichoderma* sp, que ha demostrado ser efectivo por sus varios mecanismos de acción como antibiosis, competencia y micoparasitismo (Martinez *et al.*, 2013). De igual forma, se han hecho esfuerzos para encontrar variedades de cacao tolerantes o resistentes a moniliasis para lograr el control de esta enfermedad. (Phillips-Mora *et al.*, 2005).

El objetivo de esta investigación fue la identificación molecular de este hongo mediante el análisis de regiones ITS y de esta forma inferir patrones de diversidad genética y evolución de este hongo en tres provincias del Ecuador. Los análisis realizados permiten

discernir el posible origen de este patógeno en la región y su diseminación posterior hacia otros países de América Latina.

Materiales y Métodos

Recolección de muestras e identificación de *M. royeri*

El estudio se realizó en 3 provincias de la costa ecuatoriana: Los Ríos, Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas. En cada provincia se visitaron 5 fincas productoras de cacao donde fue posible la recolección de muestras. Se tomaron 5 muestras de cacao con sintomatología de infección de moniliasis (manchas oscuras, lesiones irregulares y esporas en forma de ceniza) de diferentes árboles en cada finca, tomando en cuenta una distancia aproximada de 1.5 metros entre cada árbol.

Para la identificación de *M. royeri*, se realizó el aislamiento del hongo con un proceso de desinfección previo de las mazorcas de cacao recolectadas, con hipoclorito de sodio al 3.5% por un minuto y 3 lavados con agua destilada estéril. A continuación, se cultivaron las semillas de cacao en medio de cultivo V8 y se incubaron de 8- 15 días a 28°C. (Phillips – Mora *et al.*, 2007; Salgado *et al.*, 2013).

Posterior a esto se realizó la identificación morfológica del hongo observando las características macroscópicas según (Phillips – Mora *et al.*, 2007) y microscópicas con tinción de azul de metileno, según la morfología descrita en el trabajo de Evans *et al.*, (1978).

Finalmente, para la obtención de cultivos monospóricos de *M. royeri* se colocaron 500 µl de agua estéril en la caja de cultivo del aislado de *M. royeri* en la que se presentaba abundante esporulación, se homogenizó la caja Petri con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de esporas y luego se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} en medio de cultivo V8 (Salgado, 2011). Se incubaron entre 15 y 30 días a 28°C hasta que

se observó crecimiento del hongo. A continuación, se realizó el subcultivo de las colonias aisladas en medio de cultivo V8 por 15 – 30 días a 28°C y se realizó nuevamente la identificación morfológica, para confirmar la presencia de *M. roreri*

Extracción de ADN

El ADN se extrajo del micelio del hongo usando DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante con las siguientes modificaciones: una hora de vortex en la fase de preparación celular (paso cuatro), centrifugación a 11,000 x g por 1 minuto (paso 5), centrifugación a 13, 000 x g en las fases de lisis celular, eliminación de inhibidores, unión de ADN, lavado y elución.

Amplificación de ADN y Secuenciación

Se amplificaron las regiones ribosomales ITS 1- ITS 2, incluida la región ribosomal 5.8S completa, utilizando los siguientes primers: ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') – ITS 5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (Phillips-Mora *et al.*, 2007). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl según las condiciones de Phillips-Mora *et al.*, (2007). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen California/Estados Unidos) al 1.5% (w/w) y tinción con SYBR Safe (Invitrogen California, Estados Unidos) y se secuenciaron en ambas direcciones usando un secuenciador ABI 3739XL (Applied Biosystems, Estados Unidos) en la empresa Macrogen (Corea del Sur)

Análisis de Datos

Las secuencias de *M. roreri* obtenidas de la amplificación de las regiones ITS se alinearon usando MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2008) con el algoritmo Clustal. El índice de diversidad de nucleótidos (π), distancia genética (fst) y un análisis de varianza

molecular (AMOVA) fueron estimados en el programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). El análisis de coordenadas principales (PcoA) se realizó con el programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Finalmente se hizo una reconstrucción filogenética sin calibrar para puntos temporales de las 75 secuencias de *M. roreri* de este estudio más 42 secuencias pertenecientes a América Latina (Colombia, México, El Salvador, Jamaica, Ecuador, Belize, Costa Rica y Bolivia) con una secuencia de *Crinipellis pernicioso*, como grupo externo, obtenidas de la base de datos Nucleotide (NCBI) utilizando el software BEAST v1.8.4 (Drummond y Rambaut, 2007). Se utilizó un modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yawa (1985) con un parámetro Gamma para modelar la heterogeneidad de tasas de substitución entre sitios, y un parámetro para incluir la presencia de sitios invariantes; este fue elegido mediante una comparación de modelos anidados, evaluados con Likelihood Ratio Tests (LRTs), $\alpha=0.05$. El árbol final fue estimado como un árbol de credibilidad máxima de clados (Maximum Clade Credibility, MCC) recopilando la información de 100 millones de estados muestreados durante el proceso de MCMC.

Resultados

Identificación morfológica de *M. roreri*

De las 3 provincias analizadas se recolectó un total de 75 muestras de cacao con sintomatología típica de *M. roreri* (Figura 1), los cacaos se caracterizaron por la presencia de manchas oscuras, lesiones irregulares y pseudostroma blanco (ceniza) (Figura 2) (Torres, 2010; Evans *et al.*, 2002).

Se obtuvieron 75 aislamientos en medio V8, cuyas colonias mostraron un crecimiento inicial blanquecino, luego crema- salmón (Figura 3a) y finalmente marrón oscuro

(Figura 3b) por la formación masiva de esporas características de *M. roreri* (Phillips-Mora, *et al.*, 2006). Microscópicamente se observó la presencia de micelio septado y esporas en cadenas con maduración basipétala (Figura 3c), que son típicas de *M. roreri* (Evans *et al.*, 1978).

Identificación molecular de *M. roreri*

Como resultado de la amplificación de las regiones ITS se obtuvieron amplicones de aproximadamente 710 pares de bases, que concuerdan con los obtenidos por Orozco *et al.*, (2011) y Phillips-Mora *et al.*, (2006). Se realizó la búsqueda de homología de las secuencias con BLAST (NCBI) para las 75 secuencias. Se obtuvieron porcentajes de identidad entre 92% y 100% con secuencias encontradas en la base de datos GenBank correspondientes a *M. roreri*, confirmando la identidad de la especie (Tabla S1).

Análisis de diversidad genética

En el análisis de sitios polimórficos se encontró que las secuencias de las fincas de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas presentaron un mayor número de sitios polimórficos (entre 66 y 230) en comparación con las fincas de los Ríos, donde se obtuvieron entre 42 y 70 sitios polimórficos (Tabla 1). Utilizando el índice de diversidad π , se encontró el menor valor en la finca 3 de los Ríos (0.032493 +/- 0.020245) y el mayor valor en la finca 4 de Santo Domingo de los Tsáchilas (0.126275 +/- 0.077001) (Tabla 1). El número de alelos privados más alto se encontró en la finca 3 de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (17 alelos), mientras que en 3 fincas de la provincia de los Ríos no se encontraron alelos privados (Q1, Q2 y Q3) (Tabla 1).

Para establecer las relaciones genéticas entre las provincias, se estimó la distancia genética de Weir & Cockerham (1984) (F_{st}). Se obtuvo una mayor distancia entre la

finca 5 de Manabí y la finca 5 de los Ríos (0.60672), mientras que la menor distancia se encontró entre la finca 5 de Santo Domingo de los Tsáchilas y la finca 4 de Los Ríos (0.01579) (Tabla 2). Dentro de cada provincia, en Manabí la mayor distancia genética se localizó entre la finca M2 y M5 (0.25249), en Santo Domingo de los Tsáchilas entre la finca ST1 y ST5 (0.36561) y en los Ríos entre la finca 2 y la 5 (0.25508).

Los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) revelaron que la mayor parte de la variabilidad genética se encuentra dentro de los individuos analizados (71.29 %) y un 23.23% entre individuos de una provincia versus otra. (Tabla 3). De igual forma, en el análisis de coordenadas principales PCoA realizado de las tres provincias se observa la formación de tres grupos. No obstante, solo en el primer grupo se encuentran todos los individuos de la provincia de los Ríos y uno de Santo Domingo de los Tsáchilas (Q 1, Q2, Q3, Q4, Q5, ST5) y en los dos grupos restantes se encuentran individuos de las provincias de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas indistintamente (Grupo 2: ST4, ST3, M1, M4, M5) y Grupo 3 (M2, M3, ST1, ST2) (Figura 4).

Análisis filogenético de *M. roleri*

Para estudiar las relaciones filogenéticas entre nuestras secuencias y las reportadas en bases de datos públicas, se elaboró un árbol MCC utilizando las secuencias de las regiones ITS procedentes de las tres provincias del Ecuador de este proyecto (75 muestras), junto con otras secuencias de Ecuador y América obtenidas del GenBank (42 muestras). El grupo basal A es un grupo monofilético donde se observan aislados de las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí de este estudio (probabilidad posterior 1). El grupo B (probabilidad posterior 0.002) está constituido por muestras ecuatorianas procedentes de Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos. El grupo C (probabilidad posterior 0.195) agrupa la mayoría de los individuos de este

estudio con los individuos de otros estudios en América Latina y Ecuador. Este grupo presenta ramas cortas que indica que estos individuos se encuentran estrechamente relacionados (Figura 5).

Discusión

Diversidad genética y estructura poblacional de *M. roreri* en Ecuador

En general se observa que tanto la diversidad nucleotídica, número de sitios polimórficos y alelos privados de *M. roreri* son mayores en las fincas de las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí en relación con las fincas de las provincias de los Ríos. De acuerdo con los datos obtenidos se sugiere que la mayor variabilidad genética encontrada en Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí puede ser dada por las introducciones de diferentes variedades de cacao (Loor *et al.*, 2012). Antes de 1890 únicamente se cultivaba la variedad conocida como “Cacao Nacional”; a excepción de Esmeraldas donde se cultivaba un tipo de cacao muy parecido al criollo venezolano. Luego de la introducción de nuevas variedades de cacao desde Europa (Trinidad), Colombia y Venezuela se dio la aparición de Moniliasis (Phillips- Mora, 2003). Debido a la creciente demanda de cacao en el siglo XIX hubo un mayor desarrollo de estas nuevas variedades en Manabí, especialmente en el cantón Chone (Ernelholm, 1948).

Otro posible factor que influiría en la variabilidad nucleotídica encontrada en las tres provincias sugiere la capacidad de reproducción sexual del patógeno. Evans *et al.*, (2002) documentaron la aparición de lo que parecía ser una meiosis durante la esporogénesis y germinación de los conidios en *M. roreri* con la probabilidad de que la reproducción sexual suceda solo en condiciones muy particulares. Aunque no se cuenta

con datos concluyentes que aseguren la reproducción sexual del patógeno, esta puede ser una fuente de variación importante del mismo.

Hasta la fecha no se ha encontrado análisis de diversidad nucleotídica en las regiones ITS, pero existe un estudio realizado por Phillips-Mora *et al.* (2007) con perfiles de AFLP e ISSR donde analizaron 94 aislamientos de *M. roreri* de América Central y América del Sur y encontraron los niveles más altos de diversidad genética usando Índice de diversidad de Shannon (0.20 ± 0.06), mientras que los aislados ecuatorianos exhibieron menor diversidad genética (0.15 ± 0.04), estos resultados fueron similares a los realizados con el análisis de las regiones ITS, donde encontraron mayor variabilidad genética en los aislados colombianos que en los ecuatorianos (datos no mostrados en el artículo) y en el árbol basado en distancias genéticas y al análisis de componentes PcoA se obtuvo la diferenciación de cinco grupos genéticos. En base a estos resultados se sugiere a Colombia como el centro de diversidad y de origen de *M. roreri* debido a que la propagación antigua del patógeno pudo haber comenzado entre los anfitriones salvajes de *Theobroma* y *Herrania*, sin embargo, también existe la posibilidad de la mediación por la actividad humana debido a las grandes distancias involucradas y las enormes barreras físicas que separan algunas áreas de Colombia, como la Cordillera de los Andes (Phillips – Mora *et al.*, 2007).

Jaimes *et al.*, 2016 utilizaron marcadores SSR para el análisis de trece localidades de Colombia, cuyos resultados obtenidos reflejaron un valor alto de diversidad genética de 0.488 usando el índice de diversidad de Shannon y en el análisis de componentes principales observaron separación geográfica acorde al sitio de recolección, en base a estos resultados concluyen que la gran diversidad obtenida en *M. roreri* se puede explicar por altas tasas de mutación o por intercambio genético dentro y entre las diferentes localidades

El grado de diferenciación genética entre las fincas de las diferentes provincias es considerable ya que se encuentran valores desde 0.01579 entre la finca ST4 y Q4 de Santo domingo y los Ríos hasta valores de 0.60672 entre las fincas ST1 y Q5 de los Ríos. Generalmente entre las fincas de Manabí y los Ríos se observa diferenciación genética alta, en las fincas de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas se observa únicamente diferenciación genética baja y moderada y en las fincas de Santo Domingo de los Tsáchilas y los Ríos se observa diferenciación genética alta y moderada (Wright, 1978). Al observar una diferenciación genética baja entre las diferentes fincas se puede sugerir que existe flujo génico entre estos individuos por lo tanto tienden a reducir las diferencias genéticas conformando una sola unidad evolutiva, sin embargo, también se observan valores moderados y altos entre algunas fincas, donde el flujo génico podría estar limitado por las variantes climáticas de cada provincia. Tanto Manabí como Los Ríos se encuentran a una altura de 17 msnm y 74 msnm respectivamente a diferencia de Santo Domingo de los Tsáchilas que se encuentra a una altura de 625 msnm. De igual forma las tres provincias poseen temperatura y humedad relativa que es similar, sin embargo, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas se encuentran mayores niveles de precipitación (128.27 mm) en relación con Manabí y los Ríos (INHAMI, 2014). Todos estos factores podrían afectar el comportamiento de *M. roveri* y causar un aislamiento de los individuos de la provincia de Los Ríos, versus Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas.

En los hongos, el flujo de genes puede ocurrir naturalmente a través de la dispersión de agentes reproductores, como las esporas a través del viento, medio humano en el comercio de productos agrícolas o la contaminación de las herramientas de transporte (Moller, 2017). Según Phillips – Mora, (2003) el principal dispersor es el medio humano en el comercio del cacao. Por lo cual existe la posibilidad que cualquier

infección de *M. royeri* en Santo Domingo de los Tsáchilas o Manabí pudo haber iniciado otro brote en Los Ríos o viceversa.

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de varianza molecular AMOVA el 71.29% de variabilidad se da entre individuos al azar entre las tres provincias. Jaimes *et al.*, (2016) encontraron que el 68,02 % de variación se obtuvo entre los individuos de las 13 localidades de Colombia analizadas, lo que es atribuido al flujo génico entre los diferentes individuos. Sin embargo, como observamos en el análisis de FST existe diferenciación genética alta entre algunas fincas, lo que es concordante con el 23,23 % de variabilidad obtenida entre fincas, que sugiere el posible aislamiento de los individuos de los Ríos de las demás provincias que podrían atribuirse a las variantes en el ecosistema ya mencionadas.

Posible origen de *M. royeri*

En este estudio, se encontró un grupo basal constituido por secuencias procedentes de la provincia de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas con un valor de probabilidad posterior notable (1). Sin información para calibración del árbol filogenético, puede confundirse el tiempo y la tasa de sustitución por lo tanto las ramas deben estimarse en unidades de sustitución por sitio (Lemey *et al.*, 2009), de acuerdo con esto, la mayor longitud de las ramas indica que se han dado una mayor cantidad de cambios en estas secuencias. Sin embargo, el grupo A que contiene secuencias únicamente de Ecuador de este estudio, al ubicarse en la parte basal del árbol sugiere que el origen podría encontrarse en este país, pero es necesario calibrarlo por fechas para corroborar esta hipótesis. Por otro lado, en el grupo C constan la mayoría de las secuencias de esta investigación junto con las de América Latina cuyas ramas cortas indican que se encuentran estrechamente relacionados (Yang *et al.*, 2012). Por lo tanto, en todo el árbol se puede notar que se han dado múltiples reintroducciones del patógeno en los

diferentes países de América Latina, debido a que los individuos se encuentran distribuidos independientemente del sitio de recolección.

Maridueña *et al.*, (2016) realizaron el análisis filogenético de aislados de cinco provincias ecuatorianas utilizando el método Neighbour-joining. En este estudio se encontró que los individuos ecuatorianos se agruparon con los de México, mientras que varios individuos de la región amazónica, uno de Esmeraldas, uno del Oro y uno de Los Ríos se agruparon con los colombianos en un clado separado. En general, los resultados son similares entre estas investigaciones en cuanto a las agrupaciones con los individuos de Colombia y México. De igual forma, estos resultados corroboran la probabilidad de múltiples reintroducciones del patógeno en América Latina debido a que no existe separación geográfica de los individuos dentro del árbol. Finalmente, en la parte basal del árbol se ubican dos individuos ecuatorianos (Amazonía y los Ríos), ambos estudios presentan secuencias ecuatorianas en la parte basal del árbol, lo que sugiere el posible origen del patógeno en este país.

Otro posible origen de *M. roreri* se puede encontrar en las especies silvestres de *Herrania* y *Theobroma* de Ecuador y Colombia como lo describe Evans, (1981). En este estudio se indica que la introducción de cacao forastero pudo haber aumentado la patogenicidad del hongo, debido a que se ha observado que tanto en variedades de cacao Nacional de Ecuador y criollos originarios de Colombia presentan cierta resistencia a la enfermedad. Evans, (2002) concluyó que parecía probable que *Theobroma gileri* represente el huésped coevolutivo de *M. roreri*, con su rango endémico desde el oeste de Ecuador hasta el noroeste de Colombia. Este autor también aseguró casi con certeza que *M. roreri* invadió las plantaciones de cacao del Ecuador, en algún momento durante el siglo XIX. Finalmente, se puede sugerir como posible origen

del patógeno en Ecuador, no necesariamente en las plantaciones de cacao, pero si en sus ancestros salvajes.

Conclusión

Esta investigación proporcionó información valiosa acerca de la diversidad y distribución geográfica de *M. royeri* en tres provincias del Ecuador. La mayor diversidad genética fue encontrada en las provincias de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas, en el análisis de estructura poblacional y diferenciación genética, se encontró un ligero aislamiento de los individuos de la provincia de los Ríos. Esto pudo haberse dado por algunos factores, entre estos, las introducciones de cacao en las diferentes provincias, la posibilidad de reproducción sexual en estos individuos o a su vez las variantes climáticas de cada lugar. Finalmente, en el árbol filogenético se observaron múltiples reintroducciones del patógeno en toda América Latina y se obtuvo un grupo basal constituido por individuos de Ecuador, donde se podría ubicar el posible origen de este patógeno.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los agricultores que permitieron la recolección de muestras en sus terrenos, A: María de Lourdes Torres Directora de esta investigación y Bernardo Gutiérrez, miembro del Comité de tesis, por toda la ayuda brindada en el desarrollo de este trabajo. los investigadores del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Antonio León y su equipo de trabajo que contribuyeron en el desarrollo de esta investigación y la USFQ por el apoyo financiero en este estudio. Para la recolección de las muestras en las tres provincias del estudio se obtuvieron 3 permisos de movilización N°MAE-DMB-CM-2016-0046 (Manabí), No. 2017-01-UPN/DPASDT/MA (Santo

Domingo) y No. MAE-DPLR-2017-004 (Los Ríos) de acuerdo con el contrato marco MAE-DNB-CM-2016-0046-M-0002.

Literatura Citada:

- Ali, S.S., Shao, J., Strem, M.D., Phillips-Mora, W., Zhang, D., Meinhardt, L.W. and Bailey, B.A. (2015) Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Front. Microbiol.* 6, 850.
- Bailey, B.A., Crozier, J., Sicher, R.C., Strem, M.D., Melnick, R., Carazzolle, M.F., Costa, G.G.L., Pereira, G.A.G., Zhang, D. and Maximova, S. (2013) Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 81, 84–96.
- Bailey, B. Evans, H. Phillips- Mora, W. Ali, Sh. Meinhardt, L. (2018). *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao Frost. *Molecular Plant Patology*. 2017
- Banco Central del Ecuador (2018). Información Estadística Mensual. Boletín No. 1991, 3.1.2. Obtenido de: <https://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/776>.
- Ciferri, R. and Parodi, E. (1933) Descrizione del fungo che causa la “Moniliasi” del cacao. *Phytopath. Z.* 6, 539–542.
- Drummond, A.J. and A. Rambaut. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7(1): 214.
- End, M. J., Daymond, A. J., & Hadley, P. (Eds.). (2014). Technical guidelines for the safe movement of cacao germplasm. Revised from the FAO/IPGRI Technical Guidelines No. 20 (Second Update, August 2014). Global Cacao Genetic Resources Network (CacaoNet), Bioversity International, Montpellier.
- Excoffier, L., Laval, G. and S. Schneider. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47 50.
- Evans, H. Samnson, J. Benny G. (1978). On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma* in South America. *Can J. Bot.* Vol 56, 1978.

- Evans, H. C. (2002). Invasive neotropical pathogens of tree crops. In R. Watling, J. C. Frankland, A. M. Ainsworth, S. Isaac, & C. H. Robinson (Eds.), *Tropical mycology. Micromycetes* (Vol. 2, pp. 83–112). Wallingford: CAB International.
- Evans, H. C., Holmes, K. A., and Reid, A. P. 2003. Phylogeny of the frosty pod pathogen of cocoa. *Plant. Pathol.* 52:476-485.
- Evans, H. C., Bezerra, J. L., & Barreto, R. W. (2013). Of mushrooms and chocolate trees: Aetiology and phenology of witches' broom and frosty pod diseases of cacao. *Plant Pathology*, 62, 728–740.
- Erneholm I, 1948. Cacao Production of South America. Historical development and present geographical distribution. Gothemburg, Sweden: Holmqvits Boktryckeri.
- González, A. 2014. Aislamiento y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* (monilia) en frutos de *Theobroma cacao* L. (CACAO) del cultivar SAN JOSE DEL REAL DE LA CARRERA, USULUTAN (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Inhami (2014). Anuario Meteorológico No. 51-2011. Obtenido de: <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/wp-content/uploads/anuarios/meteorologicos/Am%202011.pdf>
- Jaimes, Y.Y., Gonzalez, C., Rojas, J., Cornejo, O.E., Mideros, M.F., Restrepo, S., Cilas, C. and Furtado, E.L. (2016) Geographic differentiation and population genetic structure of *Moniliophthora roreri* in the principal cocoa production areas in Colombia. *Plant Dis.* 100, 1548–1558.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. and K. Tamura. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9(4): 299-306.
- Leach, A. W., Mumford, J. D., & Krauss, U. (2002). Modeling *Moniliophthora roreri* in Costa Rica. *Crop Protection*, 21, 317–326.
- Lemey, P. Salemi, M. Vandamme, A. (Ed 2). (2009). *The Phylogenetic Handbook*. Edimburg. UK. Cambridge University Press.

- Maridueña, M. Villavicencio, M. Cevallos, J. Peralta, E. (2016). Molecular and morphological characterization of *Moniliophthora roreri* isolates from cacao in Ecuador. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38:4, 460-469.
- Martinez, B. Infante, D. Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp and their role in the control of crop pests. *Rev. Protección Veg.* vol.28 no.1.
- McDonald, B. (1997). *The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques*. The American Phytopathological Society. Vol. 87, No. 4, 1997 449.
- Moller , M & Stukenbrock, H. (2017). Evolution and genome architecture in fugal plant pathogens. *Nature Reviews*. 2017.
- Orozco, C., Osorio, C., Botero, M., Rivera, F., y López, G. 2011. Evaluación Microbiológica y Molecular de *Moniliophthora perniciosa* (Agaricales: Marasmiaceae). *Bol. Cient. mutl. hist. nat*, 15 (1), 41-47.
- Peakall, R & Smouse, P. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research- an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537–2539.
- Philips Mora, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. (tesis doctoral). University of Reading. Reino Unido.
- Phillips-Mora, W., Castillo, J. Krauss, U. Rodriguez, E, Wilkinson, J. (2005). Evaluation of Cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolaes of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology* (2005). 54, 483–490.
- Phillips-Mora, W., Cawich, J., Garnett, W., & Aime, M. C. (2006). First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. *Plant Pathology*, 55, 584.
- Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56, 911–922.

- Rorer JB, 1918. Enfermedades y Plagas del Cacao en el Ecuador y Métodos Modernos Apropriados al Cultivo del Cacao. Guayaquil, Ecuador: Asociación de Agricultores.
- Salgado, C. 2011. Identificación molecular de especies de *Monilinia* spp. que afectan la producción de durazno, *Prunus persica*, en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua. (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito. Ecuador.
- Salgado, C., Arahana, V., Tobar, J., Gutierrez, B., y Torres, M. 2013. Employing molecular markers to identify *Monilinia fructicola* in Ecuadorian peach orchards. Australian Plant Pathology Society. Ecuador.
- Sánchez, F., y Garcés. F. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. En el cultivo de cacao. Scientia Agropecuaria, 3(249), 249-258.
- Torres, M. 2010. Progreso temporal y manejo integrado de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al.,) del Cacao (*Theobroma Cacao*) en Tabasco. México (tesis doctoral). Institución de la Enseñanza e Investigación en ciencias Agrícolas. México.
- Weir, B. & Cockerham, C. (1984) ESTIMATING F-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE I B. S. WEIR AND C. CLARK COCKERHAM. Evolution. 38(6). 1358-1370.
- Wright, J. (1994). Mutation at VNTRs: Are minisatellites the evolutionary progeny of microsatellites? Genome, 37, 345-347.
- Yang, Z & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. Nature Reviews. Vol 13.

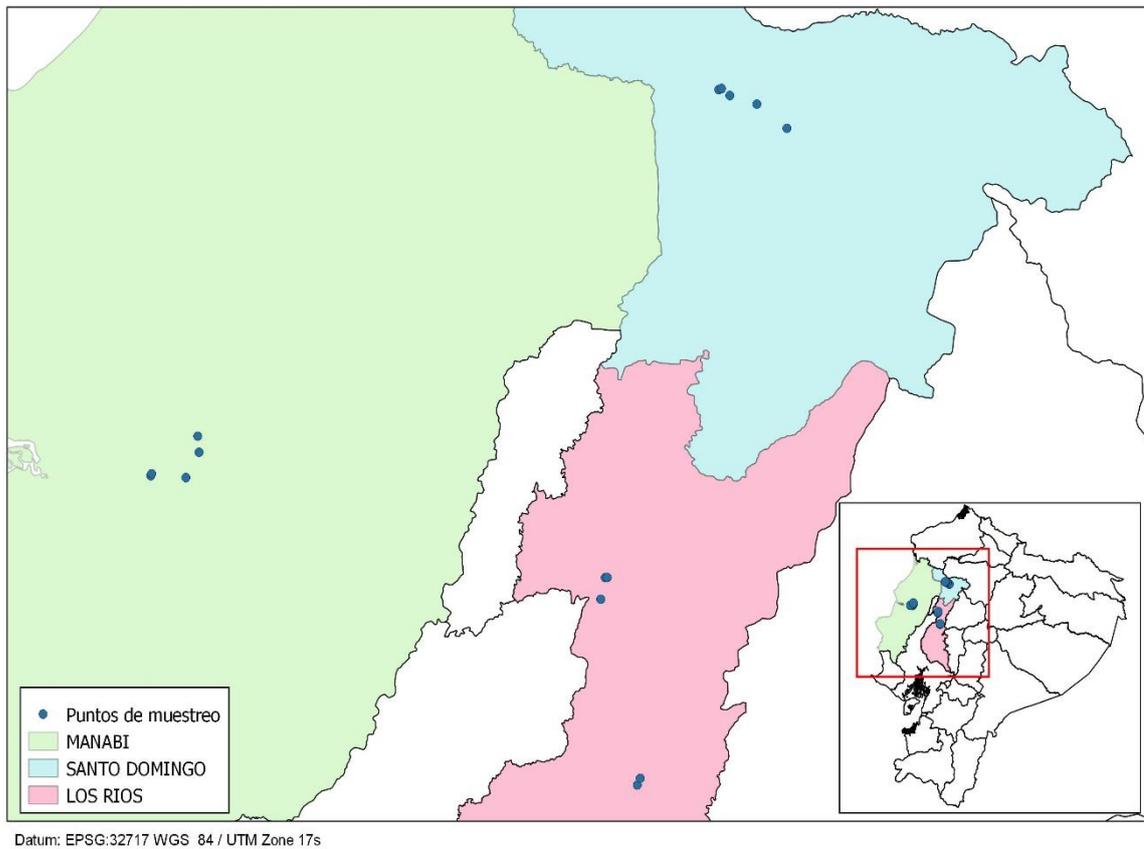


Figura 1 Sitios de recolección de muestras de cacao con sintomatología de moniliasis en tres provincias de la costa ecuatoriana: Santo Domingo, Manabí y Los Ríos. Mapa realizado por Daniela Arias



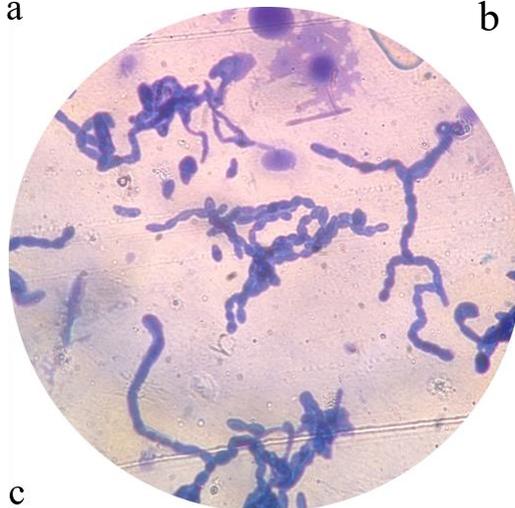
Figura 2 Cacaos recolectados con sintomatología de moniliasis, se evidencia la presencia de pseudostroma blanco, manchas marrones y deformidades del cacao que son característicos de la presencia de *M. rorensi*.



a



b



c

Figura 3 Morfología macroscópica y microscópica de los aislados de *M. roleri*. a) aislado de color marrón debido a la presencia de gran esporulación. b) aislado de color crema salmón c) micelio septado con esporas en maduración basipétala (lente 40 x)

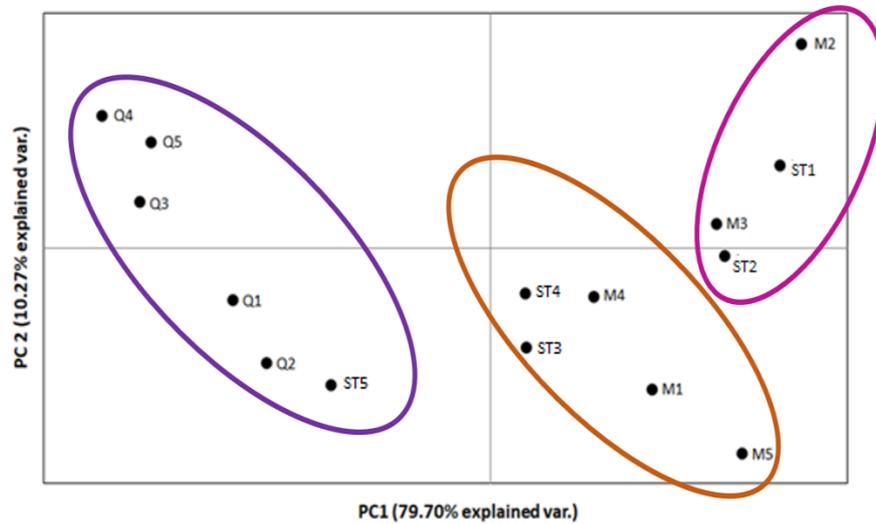
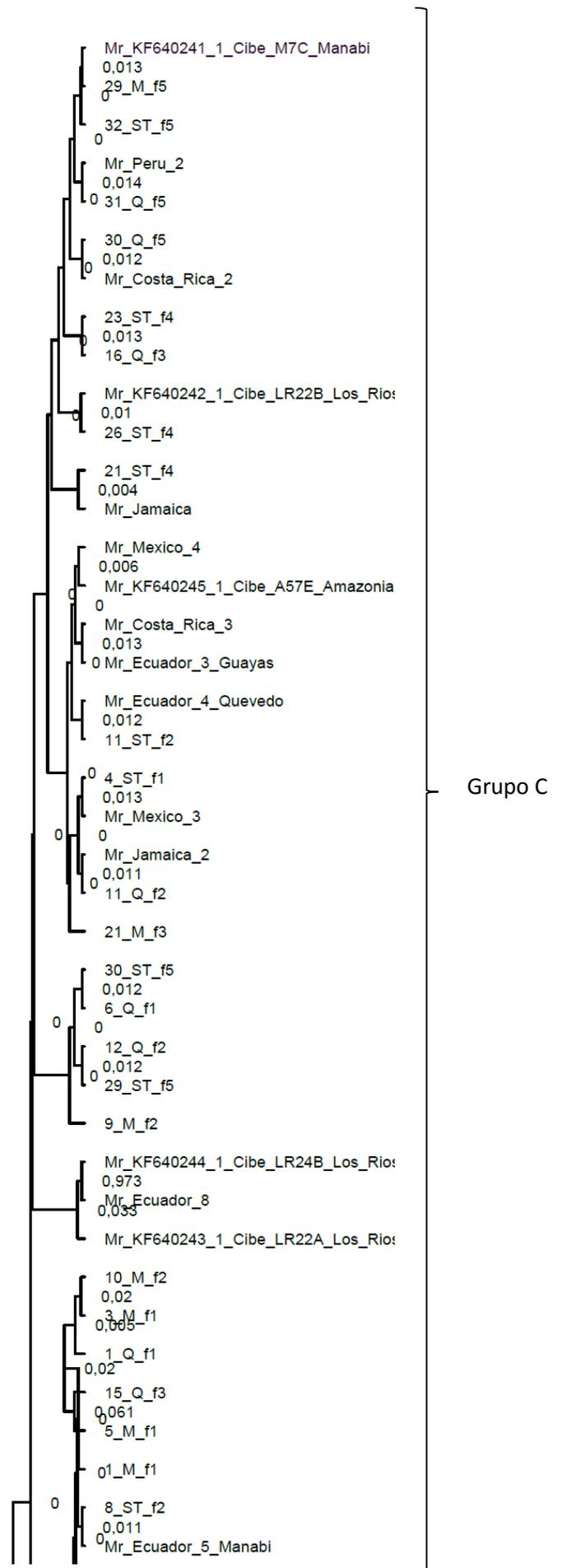
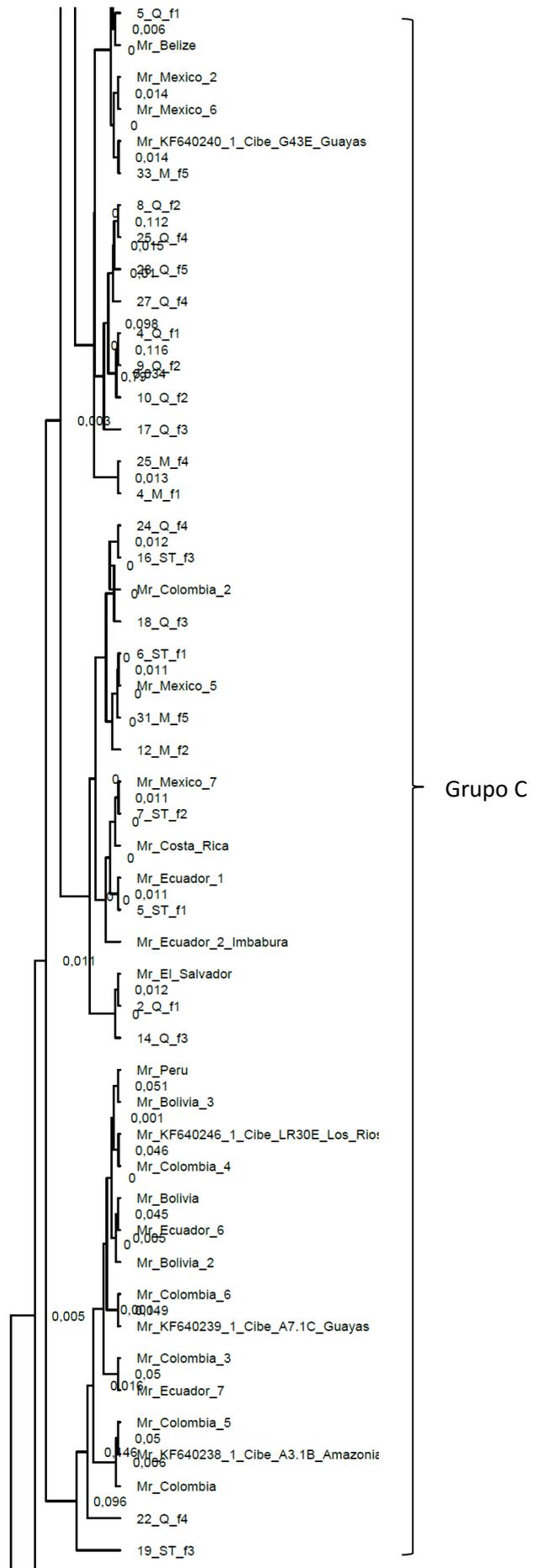


Figura 4 Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las secuencias analizadas de *M. roleri* provenientes de las 5 fincas de cada una de las tres provincias analizadas: Los Ríos (Q), Santo Domingo (ST) Manabí (M). Se observan tres grupos de muestras, en el primer grupo se encuentran agrupadas las fincas de Manabí con la finca 5 de la provincia de Santo Domingo. En los grupos restantes se encuentran agrupadas fincas de las provincias de Santo Domingo y Manabí.





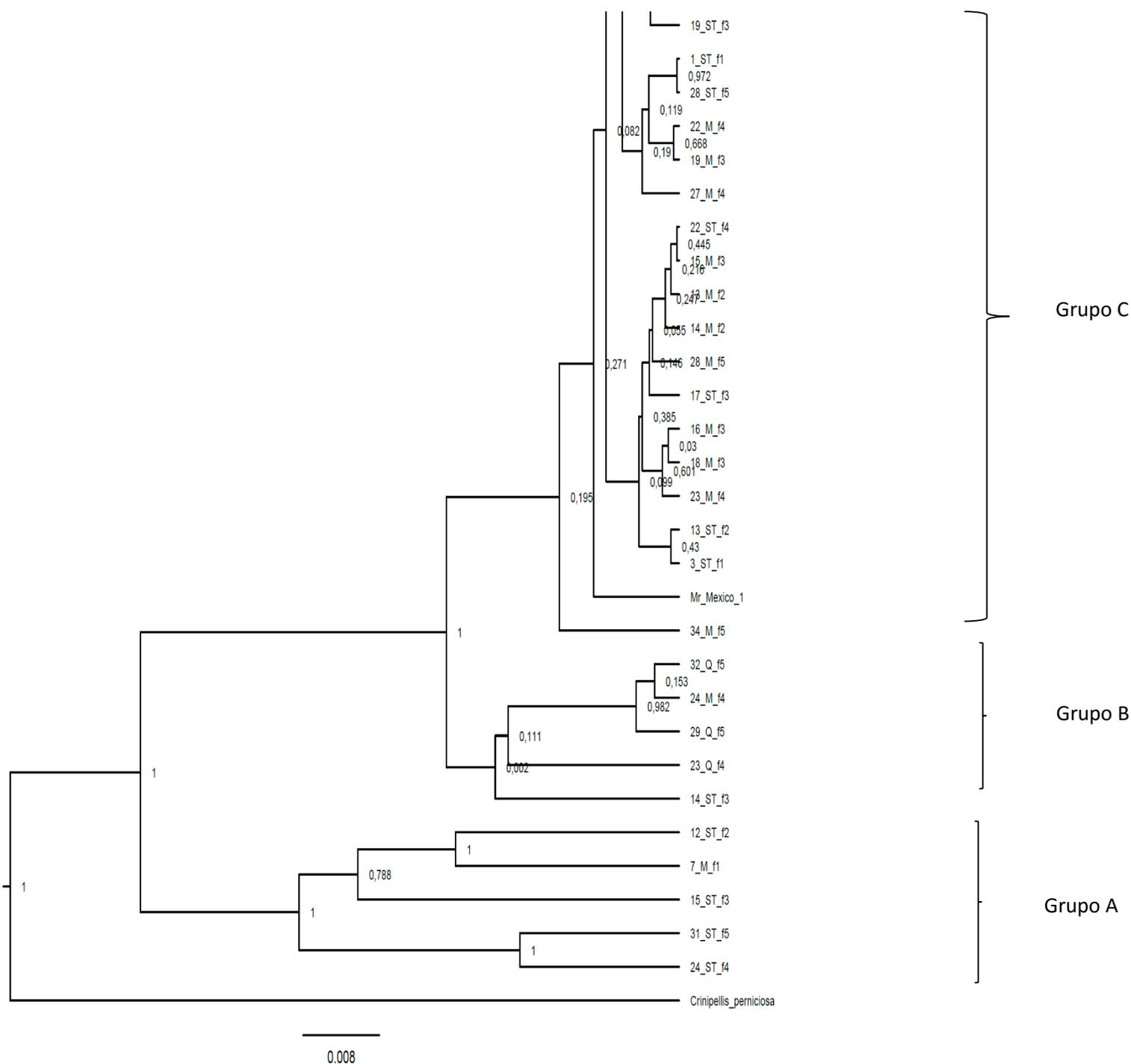


Figura 5 Análisis Filogenético de las secuencias de *M. roreri* de este estudio (75 secuencias) Los Ríos (Q), Santo Domingo (ST) Manabí (M) y otras secuencias de América Latina obtenidas del GenBank. Como grupo externo se ubica *Crinipellis perniciososa*. Se observan diferentes agrupaciones de las secuencias analizadas, en el primer grupo basal (grupo A) se observan secuencias de Santo Domingo y Manabí agrupadas con probabilidad posterior de 1.

	M1	M2	M3	M4	M5	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
Diversidad de nucleótidos	0.087216	0.109351	0.073393	0.095455	0.043485	0.076612	0.095455	0.118858	0.126275	0.083290	0.050548	0.037868	0.032493	0.047469	0.035784
π	+/- 0.053395	+/- 0.066835	+/- 0.045055	+/- 0.058367	+/- 0.026929	+/- 0.047006	+/- 0.058384	+/- 0.072518	+/- 0.077001	+/- 0.050971	+/- 0.031169	+/- 0.023502	+/- 0.020245	+/- 0.029303	+/- 0.022233
Número de sitios polimórficos	140	170	104	151	66	96	150	205	230	140	69	60	42	70	46
Número de sitios privados	6	0	1	2	9	1	8	17	7	6	0	0	0	10	12

Tabla 1 Índice de diversidad de nucleótidos de *M. royeri*, número de sitios polimórficos y número de sitios privados para cada finca analizada. M: Manabí, ST: Santo Domingo, Q: Los Ríos.

	M1	M2	M3	M4	M5	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
M1	0.00000														
M2	0.17386	0.00000													
M3	-0.02848	0.06057	0.00000												
M4	-0.01601	0.01198	-0.10119	0.00000											
M5	-0.02590	0.25249	-0.03684	0.01079	0.00000										
ST1	0.15692	-0.03344	-0.00280	0.01890	0.15763	0.00000									
ST2	0.06159	0.03575	0.04547	0.01600	0.09541	-0.03554	0.00000								
ST3	-0.11877	0.17212	-0.00903	-0.03872	-0.00949	0.15627	0.07997	0.00000							
ST4	-0.06641	0.07938	-0.06881	-0.08346	-0.05673	-0.03547	-0.07087	-0.08147	0.00000						
ST5	0.24651	0.41270	0.29963	0.19470	0.29593	0.36561	0.29540	0.07961	0.03929	0.00000					
Q1	0.34641	0.47785	0.38920	0.22909	0.41905	0.45165	0.40473	0.16930	0.14159	0.02195	0.00000				
Q2	0.30894	0.46643	0.35333	0.22238	0.37829	0.42843	0.37566	0.13163	0.10797	-0.01611	0.05808	0.00000			
Q3	0.42276	0.53526	0.46524	0.31825	0.50690	0.51221	0.45542	0.22681	0.19054	-0.06098	0.06908	-0.03207	0.00000		
Q4	0.46011	0.54699	0.49904	0.34443	0.54000	0.53248	0.48348	0.27181	0.24401	0.01579	0.05291	0.10632	-0.02805	0.00000	
Q5	0.51296	0.58628	0.55628	0.39319	0.60672	0.58333	0.53163	0.32399	0.29363	0.06355	0.11039	0.25508	0.09794	-0.02196	0.00000

Tabla 2 Distancia genética de Weir & Cockerham (F_{st}) entre los asilados de *M. roreri* de las diferentes fincas de las 3 provincias analizadas. M: Manabí, ST: Santo Domingo, Q: Los Ríos. La mayor distancia se evidencia entre las fincas M5 y Q5, mientras que la menor distancia se observa entre las fincas ST5 y Q4

Fuente de Variacion	d.f	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	506.827	8.66387 Va	23.23
Entre poblaciones dentro de los grupos	12	441.800	2.04467 Vb	5.48
Dentro de grupos	60	1595.600	26.59333 Vc	71.29
Total	74	2544.227	37.30187	

Tabla 3 Análisis de varianza molecular (AMOVA) de *M. roleri* entre las 3 provincias analizadas (entre grupos), entre fincas (entre poblaciones dentro de los grupos) y entre los individuos (dentro de grupos)

Muestra	Tamaño de secuencia	Identificación Molecular	Max score	Total score	Query cover (%)	E value	Identificación	Accesion
1_M_f1	626	<i>Moniliophthora roreri</i>	1204	1204	100%	0.0	100 %	gi 560939599 KF640242
3_M_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1202	1202	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
4_M_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100 %	gi 560939599 KF640242
5_M_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1196	1196	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
7_M_f1	681	<i>Moniliophthora roreri</i>	690	690	89%	0.0	92%	gi 560939599 KF640242
9_M_f2	529	<i>Moniliophthora roreri</i>	1017	1017	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
10_M_f2	600	<i>Moniliophthora roreri</i>	1154	1154	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242

12_M_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
13_M_f2	574	<i>Moniliophthora roreri</i>	1071	1071	100%	0.0	100%	gi 498763069 JX315288
14_M_f2	604	<i>Moniliophthora roreri</i>	1138	1138	99%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
15_M_f2	617	<i>Moniliophthora roreri</i>	1175	1175	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
16_M_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1138	1138	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
18_M_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1191	1191	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
19_M_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1196	1196	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
21_M_f3	580	<i>Moniliophthora roreri</i>	1098	1098	99%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242.1

22_M_f4	590	<i>Moniliophthora roreri</i>	1123	1123	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
23_M_f4	628	<i>Moniliophthora roreri</i>	1135	1135	99%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
24_M_f4	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1196	1196	100%	0.0	99%	gi 1003366169 KU674835
25_M_f4	616	<i>Moniliophthora roreri</i>	1185	1185	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
27_M_f4	625	<i>Moniliophthora roreri</i>	1179	1179	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
28_M_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1067	1067	99%	0.0	98%	gi 560939599 KF640242.1
29_M_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
31_M_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242

33_M_f5	618	<i>Moniliophthora roreri</i>	1188	1188	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
34_M_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1052	1052	98%	0.0	98%	5gi 560939599 KF640242
1_ST_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1190	1190	100%	0.0	99%	5gi 560939599 KF640242
3_ST_f1	575	<i>Moniliophthora roreri</i>	1079	1070	98%	0.0	99%	5gi 560939599 KF640242
4_ST_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
5_ST_f1	600	<i>Moniliophthora roreri</i>	1154	1154	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
6_ST_f1	578	<i>Moniliophthora roreri</i>	1096	1096	100%	0.0	100%	gi 498763069 JX315288
7_ST_f1	600	<i>Moniliophthora roreri</i>	1154	1154	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242

8_ST_f1	600	<i>Moniliophthora roreri</i>	1154	1154	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
11_ST_f2	600	<i>Moniliophthora roreri</i>	1154	1154	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
12_ST_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	662	662	78%	0.0	93%	gi 560939599 KF640242
13_ST_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1202	1202	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
14_ST_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	819	819	88%	0.0	94%	gi 560939599 KF640242
15_ST_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	819	819	88%	0.0	94%	gi 560939599 KF640242
16_ST_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
17_ST_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1144	1148	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242

19_ST_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1196	1196	100%	0.0	99%	gi 1003366169 KU674835
21_ST_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1208	1208	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
22_ST_f4	584	<i>Moniliophthora roreri</i>	1112	1112	100%	0.0	99%	gi 498763069 JX315288
23_ST_f4	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
24_ST_f4	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	667	667	71%	0.0	95%	gi 560939599 KF640242
26_ST_f4	624	<i>Moniliophthora roreri</i>	1194	1194	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
28_ST_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1190	1190	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
29_ST_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242

30_ST_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
31_ST_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	675	675	75%	0.0	96%	gi 560939599 KF640242
32_ST_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
1_Q_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1208	1208	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
2_Q_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
4_Q_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1192	1192	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
5_Q_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1208	1208	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
6_Q_f1	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242

8_Q_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1192	1192	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
9_Q_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1192	1192	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
10_Q_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1208	1208	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
11_Q_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
12_Q_f2	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
14_Q_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
15_Q_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1208	1208	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
16_Q_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242

17_Q_f3	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1186	1186	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
22_Q_f4	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1198	1198	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
23_Q_f4	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1202	1202	100%	0.0	99%	gi 1003366169 KU674835
24_Q_f4	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1198	1198	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
25_Q_f4	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1192	1192	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
27_Q_f4	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1192	1192	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
28_Q_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1202	1202	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
29_Q_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1150	1150	100%	0.0	98%	gi 1003366169 KU674835

30_Q_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1213	1213	100%	0.0	100%	gi 560939599 KF640242
31_Q_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1198	1198	100%	0.0	99%	gi 560939599 KF640242
32_Q_f5	631	<i>Moniliophthora roreri</i>	1173	1173	100%	0.0	99%	gi 1003366169 KU674835

Tabla S1: Identificación molecular de *M. roreri* al comparar las secuencias con las secuencias registradas en el GenBank.