



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Ceratocystis* sp. provenientes de cultivos de cacao en Colombia.

Martha Liliana Carrero Gutiérrez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía
Bogotá, Colombia

2023

Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Ceratocystis* sp. provenientes de cultivos de cacao en Colombia.

Martha Liliana Carrero Gutiérrez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

Ph.D. Adriana González Almario

Codirectora:

Ph.D. Carolina González Almario

Línea de Investigación:

Fitopatología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía

Bogotá, Colombia

2023

Dedicatoria

A mi Madre

Por haberme apoyado siempre en mi camino con su amor incondicional pese a las dificultades y ser la motivación para alcanzar mis metas. Por enseñarme que con compromiso y constancia se pueden cumplir los sueños.

“Mami, no te fuiste del todo porque elijo recordarte, porque fuiste, eres y serás el mejor regalo de Dios para mi vida”.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Martha Liliana Carrero Gutiérrez

Fecha 31/07/2023

Agradecimientos

A Dios por ser mi guía y fortaleza en los momentos de dificultad y tristeza.

A mi Mami y Nachito por confiar y creer en mí siempre, por su invaluable amor.

A mi familia y amigos por todo su cariño y aliento durante el desarrollo de este trabajo, pese a la distancia.

A las Doctoras Adriana González Almario y Carolina González Almario por la dirección y orientación de este trabajo, por su incondicional apoyo y maravillosa personalidad.

A las Doctoras Yeirme Jaimes y Sandra González por sus valiosos aportes y enseñanzas en el desarrollo de esta tesis.

A la Doctora Eleonora Rodríguez y su equipo de trabajo por su colaboración en la colecta del material vegetal y el establecimiento de la colección de aislamientos utilizados en este estudio.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia y cuerpo de docentes por el apoyo en mi formación académica.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria por el tiempo y la financiación de este proyecto.

A mis compañeros Paola Delgadillo, Lina Botero, Edwin Rodríguez, Lorena Dávila por sus consejos, compañía, regalitos, por estar y alentarme cuando lo necesité.

A todas las personas que de una u otra forma estuvieron involucradas con el desarrollo de esta investigación.

Resumen

Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Ceratocystis* sp. provenientes de cultivos de cacao en Colombia.

Durante los últimos años, los problemas fitosanitarios del cacao en Colombia han sido la principal causa de la reducción de la producción del cultivo, con pérdidas que pueden llegar al 100% de la producción por manejos inadecuados. El mal de machete es una de las enfermedades que afecta el cultivo de cacao en el país y actualmente se ha reportado a *Ceratocystis fimbriata* como el agente causal de la enfermedad. Sin embargo, aún existen incompatibilidades entre autores que contradicen la relación causal de este patógeno con la enfermedad. En Colombia, se conoce muy poco sobre la importancia de esta enfermedad, la identidad y aspectos taxonómicos del patógeno. Nuestro estudio tuvo como objetivo caracterizar morfológica y molecularmente aislamientos de *Ceratocystis* sp. obtenidos de material leñoso sintomático y muestras de suelo, provenientes de diferentes zonas productoras de cacao en Colombia. Para este propósito, se evaluaron diferentes caracteres morfológicos macro y microscópicos asociados al crecimiento de las colonias y a la medición de rasgos morfométricos. La identificación molecular a nivel de especie y la caracterización filogenética de los aislamientos se llevaron a cabo a través de un análisis multilocus, incluyendo como marcadores moleculares los genes β -Tubulina (β T-1), región del gen de la subunidad de proteína de unión a nucleótidos de guanina (MS204), segunda subunidad mayor de la RNA polimerasa (RPBII) y 60S proteína ribosomal L37 (FG1093). Nuestros resultados revelaron variaciones en el desarrollo de las colonias sin un patrón específico. A nivel microscópico, el aislamiento NCF16 mostró características morfológicas diferenciales a lo reportado previamente para la especie *C. fimbriata*. Los análisis moleculares y filogenéticos permitieron clasificar todos los aislamientos utilizados en este estudio como *Ceratocystis cacaofunesta*, confirmando que el agente causal del mal de machete en cacao en Colombia es la especie *C. cacaofunesta*; para la cual, no se tenía certeza sobre su identidad. Este estudio reveló la variabilidad morfológica y genética que presenta *Ceratocystis cacaofunesta* en este cultivo, y se confirma que dicha variabilidad,

no está relacionada con el lugar ni con el tejido o sustrato de origen. Sin embargo, destacamos la importancia de evaluar estos rasgos en una población mayor de aislamientos.

Palabras clave: *C. cacaofunesta*, *Theobroma cacao* L, mal de machete, caracterización, morfología, filogenia.

Abstract

Morphological and molecular characterization of *Ceratocystis* sp. isolates from cocoa crops in Colombia.

The main threat of cocoa crop production in Colombia are the phytosanitary problems. Nowadays, the production losses that can be up to the 100% due to the inadequate diseases management. The mal de machete is one of the limiting diseases that affect the cocoa crop in the country and currently, *Ceratocystis fimbriata* has been reported as the causal agent of disease; however, there are still discrepancies among authors that contradict the causal relationship with the disease. In Colombia, very little is known the importance of this disease, the identity, and taxonomic aspects of the pathogen. Our study aimed characterizing morphologically and molecularly isolates of *Ceratocystis* sp. obtained from symptomatic woody material and soil samples from different cocoa producing areas in Colombia. For this purpose, different macro, and microscopic morphological characters associated with colony growth and morphometric traits were evaluated. *Ceratocystis* species identification and phylogenetic characterization were performed through a multilocus analysis including β -tubulin gene (β T-1), guanine nucleotide-binding protein subunit gene region (MS204), second largest subunit of RNA polymerase II (RPBII), and 60S ribosomal protein L37 gene (FG1093) as taxonomic markers. Our results revealed variations in the colonies development without any specific pattern. At microscopic level, the NCF16 isolate showed morphological differences compared to with that previously reported for the species *C. fimbriata*. The phylogenetic analyses allowed classify isolations including in this study as *C. cacaofunesta*, confirming that the cause of the mal de machete disease of cacao in Colombia is the *C. cacaofunesta* species, of which there was uncertainty about its identity. This study revealed the morphological and genetic variability present in the *Ceratocystis* genus in Colombia, we did not find correlation between the variability and variables like location,

tissue, or substrate of origin. However, we highlight the importance of assessing these traits in a bigger population of *Ceratocystis* species.

Keywords: *C. cacaofunesta*, *Theobroma cacao* L, mal de machete, Characterizations, morphology, phylogeny.

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de Figuras	XVII
Lista de Tablas	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIX
Introducción	1
1. Capítulo 1.....	7
1.1 Introducción.....	7
1.2 Materiales y métodos	11
1.2.2 Colección de aislamientos	111
1.2.3 Caracterización de <i>Ceratocystis</i> sp.....	13
1.2.4 Análisis estadístico	14
1.2.5 Análisis de Componentes Principales	15
1.3 Resultados	16
1.3.1 Colección de aislamientos	16
1.3.2 Caracterización macroscópica de aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp.....	16
1.3.3 Caracterización microscópica de aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp.....	23
1.4 Discusión	28
2. Capítulo 2.....	35
2.1 Introducción	35
2.2 Materiales y métodos	41
2.2.1 Lugar de estudio.....	41
2.2.2 Procedencia de los aislamientos.....	42
2.2.3 Extracción de ADN	42
2.2.4 Regiones génicas y primers.....	44
2.2.5 PCR y secuenciación.....	44
2.2.6 Análisis filogenético	45
2.3 Resultados	48
2.3.1 Extracción de ADN	48
2.3.2 PCR y secuenciación.....	49
2.3.3 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	51
2.4 Discusión	54

3. Discusión general	63
4. Conclusiones y recomendaciones	66
4.1 Conclusiones	66
4.2 Recomendaciones	67
A. Anexo: Modelo de crecimiento polinómico (lineal) registrado en los medios a. PDA y b. MEA 2% para los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp.....	68
B. Anexo: Identificación molecular a nivel de especie de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp. mediante secuenciación Sanger.....	69
C. Anexo: Valores de los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de Inferencia Bayesiana (IB) para la construcción del árbol filogenético a partir de los loci βT-1, FG1093, MS204 y RPBII.....	71
Bibliografía	72

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Síntomas del mal de machete causados por <i>Ceratocystis</i> en plantas de cacao.....	3
Figura 1-1: Características morfológicas microscópicas de <i>C. papillata</i> , <i>C. colombiana</i> y <i>C. cacaofunesta</i>	10
Figura 1-2: Colonias de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp. crecidas en PDA y MEA 2%.....	18
Figura 1-3: Crecimiento de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp. al día 14 en los medios de cultivo PDA y MEA 2%.	222
Figura 1-4: Características microscópicas del aislamiento NCF16 procedente del Departamento del Huila.....	266
Figura 1-5: Análisis de Componentes Principales (PCA).	277
Figura 1-6: Dendrograma de conglomerados.	299
Figura 2-1: Representación filogenética de aislamientos colombianos de <i>Ceratocystis</i>	40
Figura 2-2: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN extraído de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp.	488
Figura 2-3: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de amplímeros de los genes β T-1, FG1093, MS204 y RPBII.	50
Figura 2-4: Árbol filogenético construido a partir de las secuencias concatenadas de los genes β T-1, MS204, RPBII y FG1093.....	52

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Origen de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> caracterizados morfológicamente.	122
Tabla 1-2: Características macroscópicas de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp. asociados al mal de machete.	211
Tabla 1-3: Tamaño de estructuras microscópicas de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp. caracterizados a nivel morfológico.	255
Tabla 2-1: Origen de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp. utilizados en el análisis filogenético.	422
Tabla 2-2: Cebadores utilizados en la caracterización molecular e inferencia filogenética de <i>Ceratocystis</i> sp.	444
Tabla 2-3: Detalles de los genomas de las distintas especies de <i>Ceratocystis</i> utilizadas en este estudio para el análisis filogenético.	455
Tabla 2-4: Información de acceso a las secuencias de las cuatro regiones génicas incluidas en el análisis multilocus.	466
Tabla 2-5: Información de acceso a las secuencias utilizadas para identificar los tres marcadores filogenéticos a través de la herramienta Blastn según la especie de <i>Ceratocystis</i>	477
Tabla 2-6: Parámetros de calidad de las extracciones de ADN de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> sp.	499

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
C	Centígrados
g	Gramos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mL	Mililitros
n	Cantidad de veces
ng	Nanogramos
s	Segundos
min	Minutos
Pb	Pares de bases
max	Máxima
min	Mínima
ha	Hectárea
ppm	Partes por millón
cm	Centímetro
U	Unidad

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
β	Beta
α	Alfa

Superíndices

Superíndice	Término
°	Grados

Abreviaturas

Abreviatura	Término
SD	Desviación estándar
LSD	Diferencia menos significativa
PDA	Agar Papa Dextrosa
PDAA	Agar Papa Dextrosa Acidificado
MEA	Agar Extracto de Malta
PCA	Análisis de Componentes principales
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
RFLPs	Restriction fragment length polymorphism
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
LAC	Clado Latinoamericano
NAC	Clado norteamericano
FAC	Clado africano
AAC	Clado asiático australiano
MCMC	Cadenas de Markov de MonteCarlo
IB	Inferencia Bayesiana
ML	Máxima Verosimilitud
SH-a	Shimodaira – Hasegawa
PP	Probabilidad Posterior
UFBoot	Ultrafast Bootstrap
s.l.	Sensu lato
s.s.	Sensu estricto

Introducción

Colombia ha logrado posicionarse dentro de los países productores de cacao de alta calidad a nivel mundial, obteniendo reconocimiento por su finura, sabor y excelente aroma (Proexport, 2012). Para el año 2021, el país registró la más alta producción de cacao en la historia, con 70.205 toneladas de grano seco y un incremento en la producción nacional del 9.2% (FEDECACAO, 2022). A pesar de esto, la presencia de enfermedades producidas por hongos y oomicetes, sigue siendo a nivel mundial y nacional uno de los principales factores que limitan su producción hasta en un 40% (Bailey & Meinhardt, 2016; Ten Hoopen et al., 2012). La moniliasis, la escoba de bruja y la mazorca negra, son las enfermedades que más daños ocasionan en este cultivo, siendo la moniliasis una de las más devastadoras (Reyes et al., 2023; Marelli et al., 2019; Jaimes & Aranzazu, 2010) sin embargo, la globalización y el cambio climático han favorecido que en los últimos años la aparición de enfermedades emergentes, como el mal de machete, entre otras, hayan aumentado considerablemente a nivel global.

El mal de machete o marchitamiento del cacao es la enfermedad producida por el hongo *Ceratocystis* descrita por primera vez en Ecuador en 1918 (Bailey & Meinhardt, 2016; Engelbrecht et al., 2007). Los hongos del género *Ceratocystis* afectan una amplia gama de cultivos de importancia económica en todo el mundo y se confirman 42 especies hospedantes de este patógeno incluyendo a *Theobroma cacao* L (Holland et al., 2019; Oliveira et al., 2015; Ferreira et al., 2010).

Durante los años 50's y 60's del siglo anterior, la enfermedad adquirió trascendencia epidémica, ocasionando la muerte a millones de plantas. En Brasil se observaron pérdidas del 24% de las plantaciones en la región de Bahía, mientras que en Colombia, Ecuador y Venezuela se reportaron daños totales de 5.000, 65.000 y 120.000 árboles de cacao, respectivamente (Paladines-Rezabala et al., 2022; Delgado & Suárez, 2003; Arbeláez Giraldo, 1957). Se considera al mal de machete como una de las enfermedades

emergentes, más importantes del cacao en América Central y del Sur (Engelbrecht et al., 2007) y se estima que son muchos los árboles de cacao que mueren a causa de esta enfermedad, sin embargo, no existen aún cifras cuantificables.

El hongo *Ceratocystis* es un habitante común del suelo, penetra en la planta en cualquier etapa de desarrollo únicamente por heridas en el tallo o raíz (Rojas, 2008) las cuales, son ocasionadas principalmente por herramientas de trabajo como el machete durante las prácticas culturales de podas y cosechas, o heridas originadas por daños ambientales como viento, granizo y rajaduras por crecimiento de los árboles (Reyna, 2015; Delgado & Suárez, 2003). Su dispersión puede darse también por acción del insecto taladrador *Xyleborus ferrugineus* (Fabricius, 1801), el cual, es atraído a la planta por una diversidad de aromas frutales que emite el hongo, estos compuestos suelen ser importantes dentro de la interacción patógeno e insectos vectores (Paladines-Rezabala et al., 2022; Cordero Vega, 2017; Santos et al., 2011; Firmino, 2011; C. J. B. Engelbrecht, 2004).

La sintomatología del marchitamiento por *Ceratocystis* se manifiesta primero con el amarillamiento y posterior necrosis de las hojas (Figura 1 a); esta etapa se caracteriza por el marchitamiento de toda la copa del árbol, manteniendo las hojas adheridas a las ramas durante varias semanas después que la planta ha muerto (Figura 1 b) (Reyna, 2015; Rojas, 2008; Barba, 1961). Sobre la corteza del tronco puede observarse un polvillo o aserrín fino que extrae el insecto vector al ingresar al tejido leñoso (Figura 1 c). Cuando se realizan cortes a los tallos, se pueden evidenciar lesiones longitudinales irregulares de color café oscuro desde el interior al exterior de la madera, en el sitio de la infección, producto del daño vascular (Figura 1 d) (Magalhães et al., 2016; Rojas, 2008). *Ceratocystis* es un hongo endovascular por lo que al ingresar a la planta provoca el marchitamiento irreversible de los árboles como resultado del bloqueo de los haces vasculares por el crecimiento del micelio (Figura 1 e). Los conidios se producen en las células parenquimatosas que rodean los vasos del xilema evitando que el agua y nutrientes absorbidos por las raíces lleguen a la parte aérea de la planta, ocasionando la muerte total de la misma de manera descendente (Paladines-Rezabala et al., 2022; Tamura et al., 2012).

El tiempo desde que ocurre la infección por el hongo y la muerte de la planta oscila entre los 8 y 24 meses, sin embargo, la planta puede morir súbitamente entre 10 y 30 días

después de los primeros síntomas según la agresividad de la cepa (Paladines-Rezabala et al., 2022), por lo que la caracterización del patógeno adquiere mucha importancia.



Figura 1: Síntomas del mal de machete causados por *Ceratocystis* en plantas de cacao.

Nota: (a). Marchitez y amarillamiento de las hojas en plántulas de cacao infectadas con *Ceratocystis*. (b). Marchitez de la copa de un árbol adulto, las hojas permanecen adheridas a las ramas. (c y d). Corteza del árbol de cacao con presencia de aserrín producido por el insecto *Xyleborus* (e). Corte transversal y longitudinal del tallo de un árbol adulto de cacao mostrando decoloración vascular y galerías producidas por el insecto *Xyleborus ferrugineus* (flechas rojas). (f). Necrosis de los haces vasculares. Adaptado de Advances in understanding of the interaction between *Ceratocystis cacaofunesta* and *Xyleborus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on cocoa trees, por Paladines-Rezabala et al. (2022). Tomado de Species of *Xyleborus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae) recorded in avocado trees in Colima, Mexico, por Castrejon et al. (2017) y el “Mal de machete”, una enfermedad del cacao que no se debe descuidar, por Ciencia y Tecnología al Servicio Del Sector Cacaotero (2016). Jaimes, Y. (2020). Marchitez árbol adulto. [fotografía].

En Colombia, la especie *C. fimbriata* ha sido comúnmente asociada con la enfermedad mal de machete en cacao y en los últimos años su presencia ha aumentado significativamente (Marín et al., 2003) en algunas de las regiones productoras como Tolima, Huila, Valle del Cauca y Santander. Una de las dificultades en el diagnóstico de la enfermedad a parte de la poca información que se tiene del patógeno, es que los síntomas iniciales se identifican visualmente en una etapa muy avanzada en la cual ningún método de control resulta eficaz (Ferreira et al., 2010; C. J. Engelbrecht et al., 2007), sumado al hecho de que el país no cuenta con un sistema de monitoreo del hongo ni con métodos comerciales de detección rápida.

Lo anterior ha llevado a considerar la necesidad de realizar la detección del patógeno y el diagnóstico de la enfermedad mal de machete en fases tempranas de la infección, por lo que resulta importante avanzar en estudios que permitan esclarecer y confirmar la identidad del agente causal de la enfermedad en Colombia, que contribuya al conocimiento para investigaciones futuras y a la generación de estrategias diagnósticas específicas y oportunas para la identificación de patógenos de enfermedades vasculares como *Ceratocystis*, que impactan negativamente la productividad de este cultivo y así, contribuir al fortalecimiento del sistema de producción de cacao en el país.

Teniendo en cuenta el contexto anterior, esta investigación tuvo como objetivo realizar la caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Ceratocystis* sp., provenientes de distintas regiones productoras de cacao en Colombia, con el fin de precisar la identidad del patógeno responsable de la enfermedad mal de machete en el país. Esta información será base y punto de partida para el desarrollo de pruebas diagnósticas sensibles y específicas que contribuyan con la detección temprana y oportuna de este patógeno.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar morfológica y molecularmente aislamientos de *Ceratocystis* sp. provenientes de cultivos de cacao en Colombia.

Objetivos específicos

- ✓ Establecer una colección de aislamientos de *Ceratocystis* sp. de cultivos de cacao de los departamentos de Santander, Tolima, Huila y Valle del Cauca.
- ✓ Caracterizar a nivel macroscópico y microscópico los aislamientos de *Ceratocystis* sp. de las regiones productoras de cacao en Colombia.
- ✓ Caracterizar filogenéticamente los aislamientos de *Ceratocystis* sp. mediante un análisis multilocus.

1. Capítulo 1

Caracterización morfológica de aislamientos de *Ceratocystis* sp. asociados al mal de machete en cacao (*Theobroma cacao* L.)

1.1 Introducción

El género *Ceratocystis* (*Sordariomycetes*, *Microascales*, *Ceratocystidaceae*) fue propuesto por Halsted en 1890 basado en *C. fimbriata*, al ser descrito por primera vez como el agente causal de la podredumbre negra de la batata (*Ipomoea batatas*) en los Estados Unidos, e incluye un alto número de hongos fitopatógenos de plantas angiospermas y gimnospermas en diversas regiones del mundo (de Beer et al., 2014; Marin & Wingfield, 2006). El género comprende 42 especies pero todavía no es clara su taxonomía ya que se ha observado la presencia de complejos de especies dentro del mismo (Holland et al., 2019; Bailey & Meinhardt, 2016).

Estudios taxonómicos basados en análisis morfológicos y moleculares soportaron la existencia de cinco grupos diferentes dentro del género *Ceratocystis*; complejo *C. fimbriata*, complejo *C. coerulescens*, complejo *C. miniliformis* y los complejos *Thielaviopsis* y *Ambrosiella*; cada uno de estos grupos incluyen especies morfológicamente similares (de Beer et al., 2014; C. J. B. Engelbrecht & Harrington, 2005).

Durante muchos años *C. fimbriata* ha sido la principal especie asociada a los daños y enfermedades ocasionados en muchas plantaciones de cultivos económicamente importantes (Liu et al., 2018; Valdetaro et al., 2015; Marin et al., 2003), incluyendo el cacao, en donde esta especie fue la primera reportada, asociada con la enfermedad mal de machete o marchitamiento del cacao en distintas regiones de América Latina (C. J. B. Engelbrecht & Harrington, 2005). Sin embargo, estudios de caracterización evidenciaron una alta diversidad morfológica y genética dentro de la especie (de Beer et al., 2014), lo que permitió reforzar la hipótesis de que las especies de *Ceratocystis* que han sido contempladas como una sola durante décadas, como en el caso de *C. fimbriata*, resultan

ser en realidad complejos de especies crípticas especializadas en hospedantes, muchas de ellas aún sin describir (Bailey & Meinhardt, 2016; Van Wyk et al., 2010).

Gracias al uso de herramientas moleculares, datos morfológicos y patogénicos, y a una mayor accesibilidad a aislamientos de diferentes regiones y hospederos ha sido posible reportar la identidad de nuevas especies dentro del complejo *C. fimbriata* y esclarecer la etiología de muchas enfermedades atribuidas a este hongo.

El complejo *C. fimbriata* se encuentra dividido en *C. fimbriata* sensu lato (s.l.) y *C. fimbriata* sensu stricto (s.s.). Las especies que conforman el primer complejo son *C. albifundus*, *C. manginecans*, *C. platani*, *C. lukuohia*, *C. colombiana* y *C. cacaofunesta*, aunque debido a su complejidad en el proceso de identificación, este número no está totalmente definido, ya que, cada vez son más las especies que son reconocidas (Bailey & Meinhardt, 2016). Este complejo, además, incluye especies que son crípticas a nivel morfológico y significa que sus variaciones son sutiles casi indistinguibles (C. J. B. Engelbrecht & Harrington, 2005), pero en algunos casos, muchas de estas especies han sido definidas en función de características morfológicas únicas (Firmino, 2011). Por otra parte, el patógeno de la pudrición negra de la batata se trata como el único miembro del complejo *C. fimbriata* (s.s.) (Van Wyk et al., 2010).

Morfológicamente *C. fimbriata* se caracteriza por producir peritecios de color negro con cuellos largos que terminan con hifas ostiolares divergentes y bases globosas, rodeadas por una red de hifas. En su interior producen ascas a partir de las cuales, se liberan las ascoporas dentro del peritecio y son exudadas a través del ápice de dichas estructuras. Las ascoporas se observan como masas pegajosas de color salmón y poseen forma de sombrero (Holland et al., 2019; Cordero Vega, 2017; Firmino, 2011; Rojas, 2008). El hongo también produce cadenas de conidios cilíndricos y aleuroconidias (clamidoporas) que juegan un papel importante en la supervivencia del hongo en el suelo (Marin & Wingfield, 2006).

Los aislamientos de *C. fimbriata* pueden mantener un alto grado de especialización tanto por hospederos como por el área geográfica donde se localizan (Cordero Vega, 2017; Valdetaro et al., 2015; Van Wyk et al., 2010), por esta razón, muchas especies residen dentro de cuatro grupos o clados en los que han sido clasificados; clado latinoamericano

(LAC), norteamericano (NAC), africano (AFC) y el asiático australiano (AAC) (Barnes et al., 2018; Liu et al., 2018). Las características morfológicas se han utilizado para distinguir los aislamientos de NAC y LAC mediante la ausencia o presencia de estructuras únicas que conllevan a la identificación y posterior clasificación de la especie (Holland et al., 2019). Sin embargo, se requiere investigación adicional y continua para definir claramente todas las especies dentro de este género.

Los principales hallazgos taxonómicos de *Ceratocystis* en Colombia se han desarrollado en el cultivo de café gracias a los aportes realizados por Van Wyk et al. (2010) y Marin et al. (2003), quienes evidenciaron mediante estudios morfológicos, moleculares y de patogenicidad, la nueva identidad del agente causal de la llaga macana. En su investigación ubicaron el hongo en dos grupos filogenéticamente bien establecidos, conformados por dos nuevas especies, *Ceratocystis colombiana* Van Wyk y Wingf. y *Ceratocystis papillata* Van Wyk y Wingf. (Figura 1-1 a-b), los cuales, residen dentro del complejo de especies de *C. fimbriata* sensu lato. De la misma manera, en Brasil, *C. cacaofunesta* (Figura 1-1 c) fue caracterizado e identificado dentro del mismo complejo de especies como el responsable de la enfermedad mal de machete en cacao que afecta el cultivo en ese país (Bailey & Meinhardt, 2016; C. J. B. Engelbrecht & Harrington, 2005).

En Colombia la enfermedad mal de machete en cacao es atribuida a *C. fimbriata* (ICA, 2012). A pesar de la incidencia del hongo en los últimos años en el país, se conoce muy poco sobre la biología, ecología, comportamiento y genética de este patógeno vascular, incluso a nivel de especie, no ha sido aún caracterizado. Teniendo en cuenta el contexto anterior, este capítulo tiene como objetivo realizar la caracterización morfológica de aislamientos de *Ceratocystis* sp., obtenidos de distintas regiones productoras de cacao en Colombia, con el fin de establecer si existen diferencias macro y microscópicas que contribuyan a la identificación a nivel de especie del hongo dentro del complejo de especies de *C. fimbriata*.

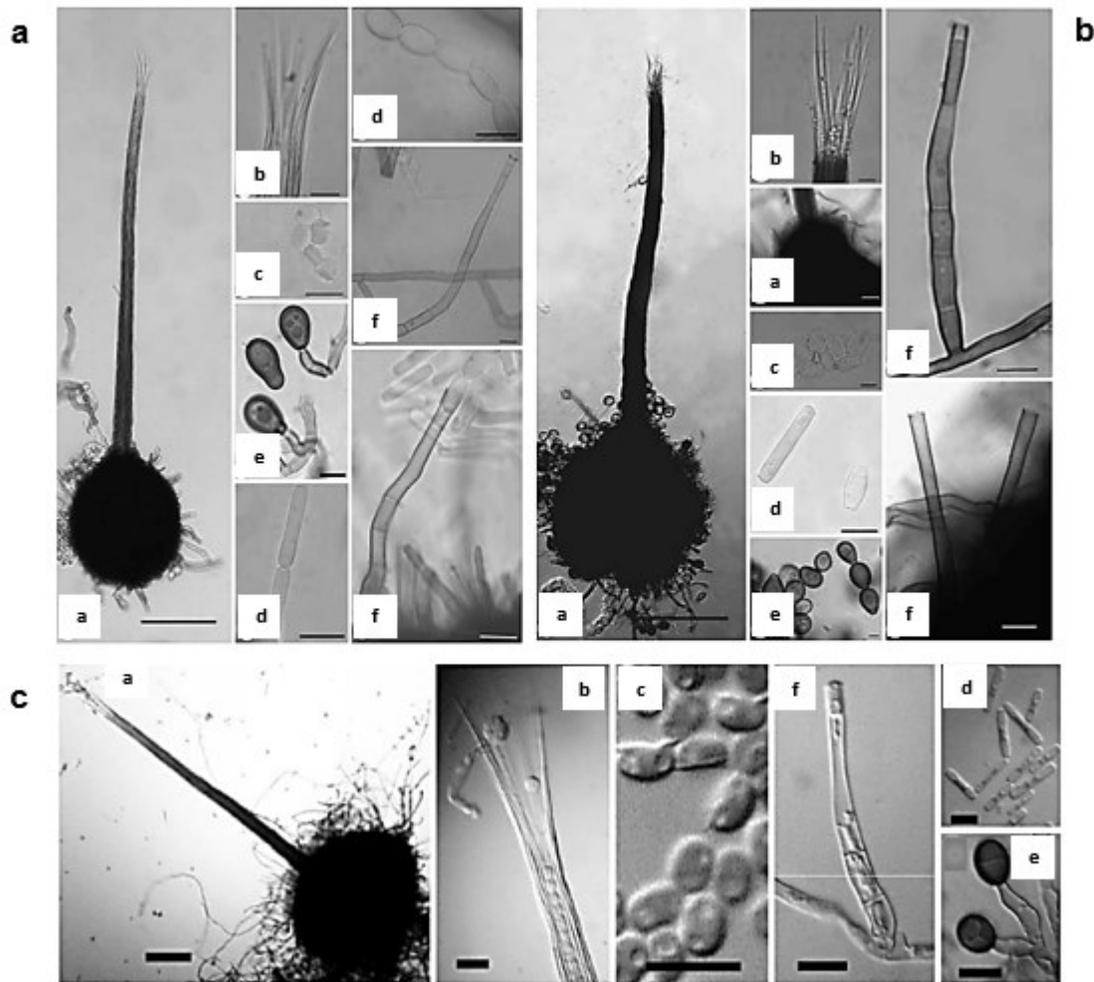


Figura 1-1: Características morfológicas microscópicas de *C. colombiana* (a), *C. papillata* (b), nuevas especies identificadas en cultivos de café en Colombia. Morfología de *C. cacaofunesta* (c) responsable de la enfermedad mal de machete en Brasil.

Nota: Estructuras microscópicas de las especies: Peritecios (a). hifas ostiolares (b). ascosporas (c). endoconidias (d). aleuroconidias (e). y endoconidióforos (f). Tomado de New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus, and native trees in Colombia por, Van Wyk et al. (2010) e Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao, and sycamore por, C. J. B. Engelbrecht & Harrington (2005).

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Lugar de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación Tibaitatá en Mosquera, Cundinamarca, en los laboratorios de Microbiología Agrícola y Entomología de La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia.

1.2.2 Colección de aislamientos

Los aislamientos de *Ceratocystis* sp., utilizados en este estudio, se recolectaron bajo el permiso marco recolección de especímenes, otorgado por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales-ANLA (Res. 1466 de 2014), en cuatro regiones de Colombia productoras de cacao, Tolima, Huila, Valle del Cauca y Santander (Tabla 1-1). De cada municipio se seleccionaron dos localidades, dentro de las cuales, se muestrearon cinco fincas productoras de cacao con presencia de la enfermedad mal de machete. Se realizó un muestreo en 1 ha de siembra, identificando árboles con marchitamiento de hojas y troncos con perforaciones que contenían aserrín en los sitios de entrada del insecto *Xyleborus ferrugineus* (Fabricius, 1801), (Paladines-Rezabala et al., 2022; Firmino, 2011; Santos et al., 2011), conocido como el trasmisor de la enfermedad. Los troncos se cortaron con herramienta eléctrica previamente desinfectada con alcohol al 70%, permitiendo obtener piezas de menor tamaño para su procesamiento. Una muestra de 50 g de suelo con presencia de aserrín fresco se colectó de estos mismos árboles y se depositó en bolsas de papel debidamente rotuladas, para su posterior traslado al laboratorio.

El aislamiento de *Ceratocystis* sp., a partir de material sintomático se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por el Comité Ejecutivo del Plan Cultivo de Cacao en

Brasil (CEPLAC, 2012). Se cortaron láminas finas de las muestras de tronco (zona del cambium), las cuales, se lavaron con detergente y agua destilada. En la cabina de flujo, los fragmentos de tallo se desinfectaron con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 5% por 2 minutos.

Tabla 1-1: Origen de los aislamientos de *Ceratocystis* sp. obtenidos de regiones productoras de cacao en Colombia, utilizados en este estudio.

Código	Departamento	Municipio	Localidad	Origen	Coordenadas	
NCF01	Tolima	Rioblanco	ND	Cambium	03°39'26.0"	75°35'45.4"
NCF05	Huila	Gigante	ND	Cambium	ND	ND
NCF07	Santander	Playón	Agua caliente	Cambium	07°37'0.53"	73°17'7.62"
NCF10	Valle	Palmira	Agrosavia	Cambium	03°30'45.9"	76°19'36.6"
NCF15	Huila	Gigante	Alto Magdalena	Cambium	02°24'02.7"	75°31'29.8"
NCF16	Huila	Rivera	El Caracolí	Suelo	ND	ND
NCF17	Huila	Rivera	Villa Alejandra	Suelo	02°45'19.9"	75°15'35.9"
NCF23	Tolima	Chaparral	Florián	Suelo	03°40'0.09"	75°35'45.4"
NCF24	Tolima	Chaparral	Florián	Suelo	03°40'0.09"	75°35'45.4"
NCF26	Tolima	Falan	La Unión	Suelo	05°6'57.5"	74°58'40.2"
NCF27	Tolima	Falan	El Oasis	Suelo	05°7'24.2"	74°58'30"
NCF28	Tolima	Falan	El Oasis	suelo	05°7'24.2"	74°58'30"
NCF29	Tolima	Falan	La Esperanza	suelo	05°8'27.2"	74°57'37"
NCF30	Tolima	Falan	La Esperanza	cambium	05°8'27.2"	74°57'37"
NCF35	Tolima	Falan	Alto Bonito	suelo	05°8'18.5"	74°58'10.7"
NCF36	Tolima	Falan	Alto Bonito	cambium	05°8'18.5"	74°58'10.7"
NCF42	Tolima	Palocabildo	La Fortuna	suelo	05°7'34.3"	74°59'49.1"
NCF45	Tolima	Palocabildo	La Esperanza	cambium	ND	ND
NCF47	Tolima	Palocabildo	El Fresnito	suelo	05°7'46.46"	74°59'59.9"

ND: No disponibles.

Finalmente, se lavaron con abundante agua destilada estéril y se secaron sobre toallas estériles. Con ayuda de una pinza estéril, las piezas de tronco se depositaron dentro de la trampa tipo sánduche (Barnes et al., 2018; Ayres, 2014) elaborada a partir de mazorca de cacao previamente lavada y secada. Para el aislamiento del hongo a partir del suelo, se colectó 1 g el cual se depositó dentro de la trampa tipo sánduche. El montaje se

incubó a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 días en oscuridad, en condiciones de cámara húmeda. Se realizaron observaciones diarias en el estereoscopio (marca Carl Zeiss, modelo stemi 508) hasta detectar estructuras características del hongo como peritecios y ascosporas (Firmino, 2011). Las masas de ascosporas se retiraron y se sembraron en agar papa dextrosa (PDA, OXOID) e incubaron a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 días. Los aislamientos recuperados se conservaron por los métodos de papel filtro y tubo de agar inclinado, almacenados a temperatura ambiente y refrigeración a 4°C , respectivamente (Vivas, 2011). Se mantuvo una segunda copia de cultivos en reactivación y verificación del crecimiento mensualmente.

Para corroborar el género de los aislamientos recuperados teniendo en cuenta la similitud morfológica de *Ceratocystis* con otros grupos fúngicos, se efectuó el test de sensibilidad a la cicloheximida descrito por Harrington (1981). Se realizó la reactivación del hongo sobre agar papa dextrosa acidificado (PDAA pH=4.0) y se incubó a una temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 10 días. Se preparó y suplementó el medio de cultivo extracto de malta (MEA, OXOID) con cicloheximida (Sigma-Aldrich) posterior a la esterilización del medio a una concentración final del antibiótico de 100 ppm. Posteriormente, el medio se colocó en las placas Petri hasta su solidificación. En el centro del medio de cultivo con el antibiótico, se dispuso un disco (5 mm) de micelio del hongo crecido anteriormente y se incubó a una temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 10 días. El experimento se realizó por triplicado y se observó la presencia o ausencia de crecimiento de *Ceratocystis* en las placas.

1.2.3 Caracterización de *Ceratocystis* sp.

Se realizaron cultivos monospóricos siguiendo los protocolos de Dos Santos Nunes (2015) y Rodas et al. (2008) con modificaciones. A partir de cultivos de 10 días de crecimiento en agar MEA 2% con ayuda de un pincel de cerdas suaves, se efectuó el raspado de la superficie de la colonia esporulada y se mezcló sobre una solución estéril (5 mL) de agua destilada y Tween 20 al 1%. La mezcla de esporas se llevó a agitación por tres minutos y 100 μL de la suspensión, se colocaron sobre el medio de cultivo MEA al 2%. Con un rastrillo estéril, la solución se homogenizó sobre la superficie de la placa Petri. Los cultivos se incubaron a una temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 18 horas. Tras la observación en el microscopio óptico (marca Carl Zeiss, modelo Primo star), en el

aumento 40X, una única espora germinada se retiró cuidadosamente y se transfirió sobre una nueva placa de MEA 2%.

Los aislamientos de *Ceratocystis* sp., se caracterizaron a nivel macroscópico teniendo en cuenta las siguientes variables: **(a)** Características de las colonias: se evaluó el crecimiento de los aislamientos durante 14 días en los medios de cultivo extracto de malta al 2% (MEA, OXOID) y agar papa dextrosa (PDA, OXOID), a pH 5.7; a una temperatura de incubación de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Firmino 2011; Heberth & Ortíz, 2011; Rodas et al., 2008; Rojas, 2008). La velocidad de crecimiento micelial se determinó con mediciones hechas cada tres días a los diámetros perpendiculares de las colonias (una medida por caja) (Firmino, 2011), haciendo uso de un calibrador Pie de Rey; se realizaron cuatro repeticiones por cada aislamiento y medio de cultivo. Al día 14, el color de la superficie y reverso de la colonia fue determinado mediante el uso del manual Pantone® (Heberth & Ortíz, 2011); **(b)** Producción y distribución de peritecios y ascosporas: se observó en cada medio de cultivo con ayuda del estereoscopio la presencia o ausencia de las estructuras y el patrón de distribución, con base en cuatro parámetros 1) grupo central, 2) grupo medio, 3) toda la superficie de la colonia, 4) formación de anillos concéntricos, descritos por Cordero Vega (2017) y Marin et al. (2003).

A nivel microscópico, las características morfológicas incluyeron la medición de estructuras sexuales y asexuales de *Ceratocystis* sp., como son el diámetro del peritecio, largo del cuello del peritecio, diámetro de la ascospora, aleuroconidia y endoconidia hialina (Liu et al., 2018; Valdetaro et al., 2015; Van Wyk et al., 2010; Marin et al., 2003), forma de la hifa ostiolar y conidióforo (Holland et al., 2019). Las imágenes se visualizaron usando una cámara digital AxioCam ERC5s 5mpx acoplada al microscopio óptico (marca Carl Zeiss, modelo Primo star). Las medidas se tomaron con el programa Zen Blue 3.4. Se efectuaron 50 mediciones ($n=50$) de cada estructura para cada aislamiento. Las estructuras se observaron a partir de un raspado del cultivo de 14 días de crecimiento en MEA 2% sobre agua destilada y Tween 20 al 1% (Dos Santos Nunes, 2015). Se vertieron 30 μL de la suspensión sobre una lámina portaobjetos estéril, la cual se cubrió con una lámina cubreobjetos para su visualización (Jabeen & Asad, 2017; Firmino, 2011; Marin & Wingfield, 2006).

1.2.4 Análisis estadístico

Los datos de crecimiento de los aislamientos de *Ceratocystis* en los medios de cultivos se ajustaron a un modelo lineal mixto utilizando el paquete nlme de R v 3.1-155 (Pinheiro et al., 2022), siguiendo un Diseño Completamente al Azar, usando como efectos fijos el aislamiento, el medio de cultivo y, además, como factor aleatorio la repetición. Los supuestos se comprobaron a nivel gráfico mediante *qq-plot* para normalidad y residuales versus predichos para homogeneidad de varianzas. Se utilizó la prueba LSD de Fisher al 5% de significancia utilizando el programa R v 4.1.3. (R Core Team, 2022) mediante el paquete nlme, agricolae y stats (Pinheiro et al., 2023; de Mendiburu F (2023). La relación entre el crecimiento de los aislamientos en los dos medios de cultivo se ajustó mediante regresiones lineales simples, donde la pendiente se identificó como la tasa de crecimiento promedio.

Los registros de mediciones microscópicas se usaron para establecer en cada aislamiento los promedios (medias), desviaciones estándar (SD), máximas (max) y mínimas (min) del ancho y largo de cada estructura evaluada, para identificar posibles diferencias morfológicas dentro de los aislamientos de *Ceratocystis* sp. (Liu et al., 2018; Oliveira et al., 2015; Heberth & Ortíz, 2011; Van Wyk et al., 2010; Rodas et al., 2008).

1.2.5 Análisis de Componentes Principales

El análisis se realizó con ayuda del software estadístico R v. 4.1.3, mediante los paquetes FactoMineR para el cálculo de los resultados y Factoextra R para la visualización de los gráficos (Kassambara and Mundt, 2020; Lê et al., 2008). Se utilizaron las funciones PCA con la cual se realizó el análisis de componentes principales, que permitió la reducción de la dimensionalidad del conjunto de datos estudiados (variables morfológicas), conservando la variación existente entre los mismos (Jolliffe & Cadima, 2016); y *dimdesc*, con el fin de señalar las variables morfológicas más representativas en cada dimensión obtenida a partir del PCA. Se evaluó la proporción de varianza explicada y el gráfico de sedimentación o *screeplot*, por medio de las funciones *get_eigenvalues* y *fviz_screeplot*, para obtener las combinaciones lineales (componentes), que mejor describieran las relaciones entre las variables morfológicas de los aislamientos de *Ceratocystis*. Se utilizó la regla de Kaiser (1961), la cual usó los valores propios

(*eigenvalues*), mayores a 1, para determinar el número óptimo de componentes a retener después del PCA. Con la determinación de la variabilidad, se obtuvo el círculo de correlación, que define el coeficiente de correlación de Pearson entre una variable y su componente principal (Abdi & Williams, 2010). Se determinó la relación entre las variables morfológicas, microscópicas y los aislamientos de *Ceratocystis* sp., usando la función `fviz_pca_biplot` a partir del mapa de factores o *biplot*.

Se realizó un análisis de conglomerados para categorizar los 19 aislamientos de *Ceratocystis* sp. probados. Este método agrupó los individuos según su similitud a partir de las características morfológicas, microscópicas, región de procedencia y tejido o sustrato de origen, usando la distancia Euclidiana y el método de Ward (Mota-Gutiérrez et al., 2018; Dos Santos Nunes, 2015; Ward, 1963). Cada uno de los grupos se describieron de acuerdo con los valores medios de las características morfológicas, microscópicas encontradas. Se utilizó el software estadístico R v. 4.1.3 mediante el paquete FactoMineR y la función HCPC (Hierarchical Clustering on Principal Components).

1.3 Resultados

1.3.1 Colección de aislamientos

Se conformó una colección de 19 aislamientos de *Ceratocystis* sp., a partir del crecimiento en el medio de cultivo PDA y prueba de sensibilidad a la cicloheximida, en la cual se observó la ausencia de crecimiento de todos los aislamientos durante los 10 días de evaluación, confirmando que los aislamientos recuperados corresponden al género *Ceratocystis* sp. y no a *Ceratocystopsis* y *Ophiostoma* que sí toleran este antibiótico.

1.3.2 Caracterización macroscópica de aislamientos de *Ceratocystis* sp.

A partir de los cultivos monospóricos de cada aislamiento, se identificaron tres grupos a nivel macroscópico en los medios de cultivo PDA y MEA 2% según el color, la textura y forma de la colonia (Figura 1-2). El primer grupo registró aislamientos con micelio aéreo hialino más o menos denso con borde irregular y producción de peritecios dispersos con menor presencia de ascosporas, al compararse con otros aislados. En este grupo se ubicaron los aislamientos NCF16 y NCF01. En el segundo grupo, se observaron colonias lanosas con elevación limitada y con bordes ondulados e irregulares de tonalidades claras y con producción abundante de peritecios y ascosporas de color salmón. En este grupo se encontraron los aislamientos NCF05, NCF07, NCF10, NCF15, NCF17, NCF23, NCF24 NCF26, NCF27, NCF28, NCF29, NCF30, NCF35, NCF36, NCF42 y NCF47. El tercer grupo lo formó el aislamiento NCF45 cuya colonia presentó una textura algodonosa en ambos medios de cultivo, con bordes irregulares y escasa producción de peritecios y ascosporas a diferencia del grupo anterior. El aislamiento NCF01 fue el único en presentar una diferencia notoria en la forma de la colonia en ambos medios de cultivo. En MEA 2%, su crecimiento se caracterizó por mostrar una textura lanosa con poca producción de peritecios y ascosporas, mientras que en PDA su crecimiento micelial fue más denso y con mayor producción de estas estructuras.

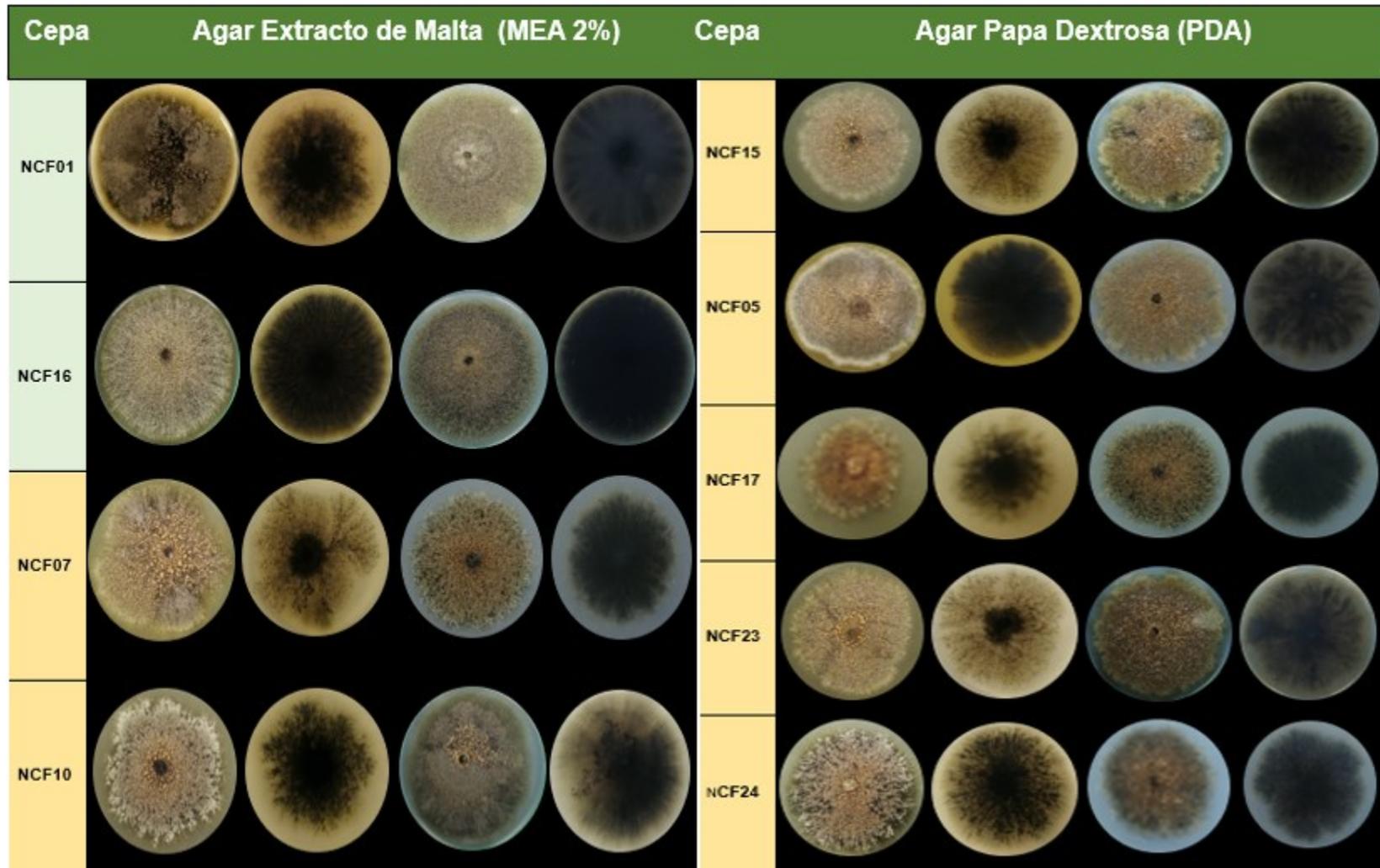


Figura 1-2: Crecimiento de cada aislamiento de *Ceratocystis* sp. en los medios de cultivo PDA y MEA 2% incubados a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, después de 14 días.

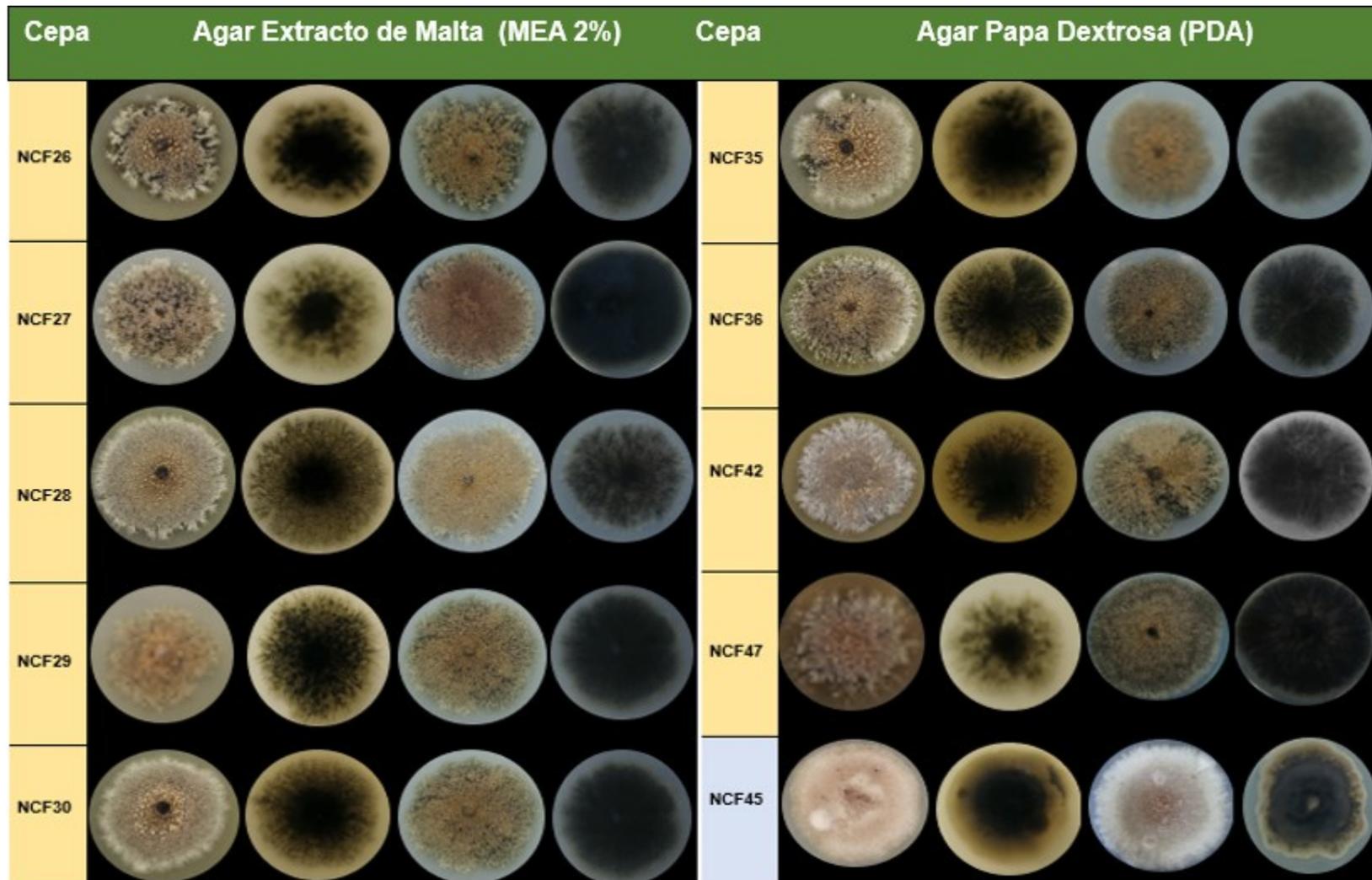


Figura 1-2: (Continuación).

Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Ceratocystis* sp.
provenientes de cultivos de cacao en Colombia

El color de la superficie de las colonias se diferenció en ambos medios de cultivo. Sin embargo, las colonias presentaron coloración grisácea con variaciones en la intensidad de un aislamiento a otro, algunos combinados con tonos café claro. Los colores grises claros predominaron en los bordes de los aislamientos de textura lanosa. A medida que creció el hongo, se observó una coloración verde oliva en la periferia de la colonia producto del micelio que se encuentra sumergido en el medio de cultivo. El reverso de las colonias en PDA y MEA 2% evidenció una coloración oscura (Figura 1-2). Todos los aislamientos emitieron un olor afrutado característico de *Ceratocystis*.

La presencia de peritecios y ascosporas fue evidente en las colonias en ambos medios de cultivo. Algunos aislamientos presentaron una mayor producción de estas estructuras en las condiciones evaluadas. La formación de los peritecios se observó a partir de los seis días de crecimiento, solos o en grupos dispersos en la superficie o sumergidos en el medio. Masas de ascosporas de color salmón se apreciaron sobre la parte apical del peritecio. Los patrones de distribución de los peritecios identificados fueron centrales y sobre toda la superficie de la colonia, siendo este último, el más predominante. (Tabla 1-2).

Tabla 1-2: Color de colonias de *Ceratocystis* de acuerdo con el manual de Pantone®. Producción y distribución de peritecios y ascosporas por cada aislamiento en los medios de cultivo PDA y MEA 2%.

Agar Papa Dextrosa (PDA)				Agar Extracto de Malta (MEA 2%)		
Aislamiento	Color	Peritecios y Ascosporas	Distribución de Peritecios	Color	Peritecios y Ascosporas	Distribución de Peritecios
NCF01	424-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2333-7761C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF05	423-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2332-7761C/Black 7C	presencia	toda la superficie
NCF07	424-423C-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2333-7761C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF10	423-7761C/Black 3C	presencia	centro	2332-7761C/Black 7C	presencia	toda la superficie
NCF15	423-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2332-7761C/Black 7C	presencia	toda la superficie
NCF16	423-422-5835C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2332-5835C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF17	424-423C-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2333-7761C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF23	424-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2332-7761C/Black 7C	presencia	toda la superficie
NCF24	424-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2328-2333-7761C/Black 7C	presencia	toda la superficie
NCF26	424-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2333-7761C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF27	424-423C-7761C/Black 3C	presencia	centro	2333-7761C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF28	424-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2333-7761C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF29	423-422-5835C/Black 3C	presencia	centro	2328-2333-7761C/Black 7C	presencia	toda la superficie
NCF30	424-423C-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2325-5835C/Black 7C	presencia	toda la superficie
NCF35	424-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2333-7761C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF36	424-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2333-2332-7761C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF42	424-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2333-7761C/Black C	presencia	toda la superficie
NCF45	404-7761C/Black 7C	presencia	centro	2325-7761C/Black 7C	presencia	centro
NCF47	424-7761C/Black 3C	presencia	toda la superficie	2333-7761C/Black C	presencia	toda la superficie

Para todos los aislamientos, los datos de crecimiento se ajustaron a una línea de tendencia polinómica (lineal) en los dos medios evaluados, con coeficientes de determinación (R^2) de 0.99 en PDA y 0.99 en MEA 2% (Anexo A).

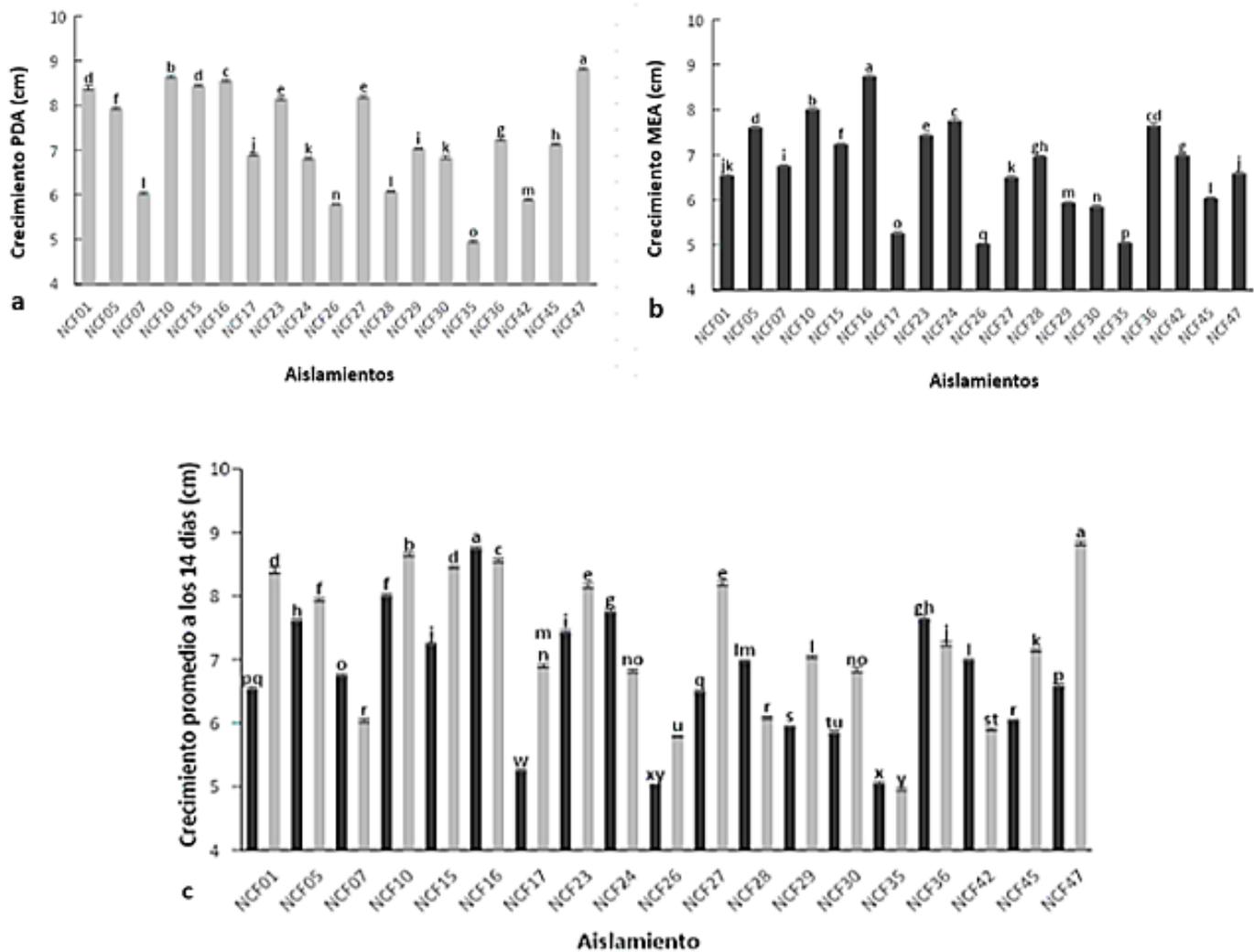


Figura 1-3: Crecimiento de los aislamientos de *Ceratocystis* sp. colectados de los departamentos de Huila, Tolima, Valle del Cauca y Santander en los medios de cultivo **a.** Agar Papa Dextrosa (PDA) y **b.** agar Extracto de Malta (MEA 2%) al día 14 incubados a $24\pm 2^\circ\text{C}$. **c.** Comparación de crecimiento en ambos medios de cultivo utilizados.

En el medio de cultivo PDA se registró el mayor crecimiento para la mayoría de los aislamientos con valores promedio de 7.26 cm a los 14 días y una tasa de crecimiento diaria de 0.53 cm por día, comparado con MEA con un promedio de 6.73 cm a los 14

días y una tasa de crecimiento de 0.47 cm por día respectivamente. El aislamiento NCF47 presentó el mayor crecimiento con valor promedio de 8.83 cm, mientras que NCF35 fue el de menor crecimiento con 4.96 cm en el medio de cultivo PDA (Figura 1-3a). En MEA, el aislamiento NCF16 presentó el mayor crecimiento con valor promedio de 8.75 cm y NCF26 evidenció el menor crecimiento con 5.03 cm (Figura 1-3b). En este medio de cultivo no presentaron diferencias significativas los aislamientos NCF01, NCF28 y NCF36. Según el análisis realizado en la comparación del crecimiento se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre aislamientos y medios de cultivos, algunos de ellos no presentaron diferencias significativas como NCF17, NCF30, NCF24 Y NCF42. (Figura 1-3c).

1.3.3 Caracterización microscópica de aislamientos de *Ceratocystis* sp.

A nivel microscópico se encontraron algunas variaciones en las dimensiones de las estructuras analizadas en cada uno de los aislamientos (Tabla 1-3). Los peritecios formados se caracterizaron por ser de color negro, con una base globosa de diámetros entre 97.0-412.6 x 99.6-449.4 μm y rodeado por una densa red de hifas. Los cuellos periteciales evidenciaron rangos entre 120.7-1020.6 μm de largo también de color oscuro. En la parte apical, se observaron las hifas ostiolares, hialinas y divergentes sin presencia de septos, en su mayoría rectas o en algunos casos flexibles, lo que dificultó su medición. *Ceratocystis* produce dos tipos de endoconidias, ya sea en forma de barril o cilíndricas, sin embargo, en este estudio, se encontró únicamente la producción de conidias cilíndricas, hialinas, de diversos tamaños, con diámetros entre 2.9-7.3 x 9.5-33.4 μm para todos los aislamientos. Las endoconidias se produjeron en endoconidióforos cortos, de color café claro, con presencia de septos, pared delgada y de forma tubular hacia la punta.

Las clamidosporas o aleuroconidias, se observaron de forma individual y muy rara vez formando cadenas. Su color se tornó café claro y oscuro con forma subglobosa y pared lisa con tamaños entre 6.8-15.0 x 8.3-16.3 μm . La producción fue abundante en la mayoría de los aislamientos a los 14 días de crecimiento bajo las condiciones evaluadas.

Las ascosporas hialinas se produjeron dentro del peritecio y se expulsaron por el ostiolo; presentaron forma de sombrero y diámetros entre 3.0-6.9 x 3.4-8.0 μm .

El aislamiento NCF16 sobresalió del resto del grupo debido al tamaño de la base (117.4-412.6 x 121.8-449.4 μm) y el cuello de los peritecios (702.4-1020.6 μm), ya que, evidenciaron ser los más anchos y largos (Figura 1-4 a). Presentó, además, las endoconidias más largas con un valor entre 3.2-7.0 x 17.3-33.4 μm (Figura 1-4 f). Con respecto a la forma de la hifa ostiolar, se diferenció de los otros aislamientos por sus hifas más largas y flexibles, otorgándole un aspecto de penacho o brocha larga sobresaliente de la parte apical del peritecio, que no se observó en ningún otro aislamiento (Figura 1-4 b)

Tabla 1-3: Características microscópicas de *Ceratocystis* sp. Mediciones (rango) de estructuras sexuales y asexuales de los aislamientos utilizados en este estudio.

Aislamiento	Peritecios (µm)		Endoconidias (µm)	Aleuroconidias (µm)	Ascosporas (µm)
	Base (diámetro)	Cuello (longitud)			
NCF01	97.0-274.5 x 99.6-249.5	289.0-792.3	3.0-5.9 x 9.5-24.6	8.3-12.0 x 10.2-14.0	3.7-6.3 x 4.4-6.8
NCF05	120.2-257.6 x 143.9-276.2	305.1-523.2	3.1-5.8 x 12.3-18.9	8.2-8.2 x 12.3-13.0	4.0-6.0 x 5.1-8.0
NCF07	167.7-232.8 x 184.1-291.1	356.7-536.9	3.0-5.9 x 16.1-23.8	8.1-10.8 x 10.0-13.8	4.0-5.0 x 4.9-6.8
NCF10	128.1-365.0 x 148.4-375.7	248.0-567.3	3.6-7.3 x 16.2-28.0	6.8-13.0 x 8.9-16.2	4.2-6.9 x 3.8-7.8
NCF15	157.0-347.2 x 193.0-344.6	323.6-592.9	3.5-6.2 x 15.1-27.6	8.3-13.0 x 8.3-14.0	4.2-6.7 x 5.1-8.0
NCF16	117.4-412.6 x 121.8-449.4	702.4-1020.6	3.2-7.0 x 17.3-33.4	7.2-11.8 x 9.3-15.0	3.7-5.8 x 4.4-6.5
NCF17	131.8-324.3 x 152.4-332.9	120.7-553.7	3.0-6.0 x 13.4-26.8	7.4-14.3 x 9.3-15.6	3.8-6.1 x 4.6-8.2
NCF23	121.4-268.6 x 171.9-318.8	354.1-548.8	3.3-5.9 x 16.2-25.4	9.1-12.9 x 10.1-13.8	4.0-6.5 x 4.3-7.4
NCF24	154.3-292.3 x 161.8-282.4	300.2-638.2	3.2-6.0 x 12.3-29.2	8.7-13.6 x 9.0-14.9	3.6-5.3 x 4.5-7.5
NCF26	128.0-262.8 x 142.0-297.1	209.8-431.4	3.0-5.5 x 15.1-29.6	9.0-13.1 x 10.8-16.1	4.0-5.3 x 4.0-6.7
NCF27	142.9-224.0 x 163.4-274.0	244.4-438.8	3.2-4.9 x 11.8-18.9	9.1-14.1 x 10.8-14.9	3.5-5.5 x 3.6-6.9
NCF28	130.5-259.7 x 148.9-251.7	161.7-376.8	3.2-6.1 x 16.0-26.8	9.1-13.4 x 10.8-15.8	3.0-5.5 x 4.2- 7.0
NCF29	107.4-223.3 x 105.0-240.1	190.5-522.4	2.9-6.0 x 13.7-24.3	9.6-13.9 x 10.1-15.1	3.8-6.0 x 4.1- 6.6
NCF30	162.0-310.3 x 140.8-304.7	302.0-695.6	3.3-5.6 x 16.4-27.6	10.0-15.0 x 10.8-14.9	4.0-5.5 x 4.7- 6.8
NCF35	124.5-254.2 x 143.8-247.1	179.8-498.4	3.2-5.8 x 15.2-27.6	9.1-12.7 x 10.5-15.2	4.0-5.7 x 3.7-7.0
NCF36	145.8-292.7 x 145.6-295.0	325.9-604.6	3.2-5.6 x 12.3-29.1	9.6-13.5 x 11.0-15.8	4.1-5.9 x 5.1-7.0
NCF42	140.7-235.1 x 149.5-290.1	305.0-528.3	3.4-5.9 x 15.1-24.5	8.8-13.8 x 10.7-14.8	3.0-6.9 x 4.4-7.0
NCF45	130.4-235.6 x 120.4-235.8	300.4-651.2	3.3-6.0 x 15.1-28.1	9.1-13.5 x 10.1-14.9	3.5-5.7 x 3.4-6.9
NCF47	129.8-239.5 x 142.0-264.3	285.2-546.7	3.3-5.8 x 15.1-26.9	9.2-13.3 x 10.2-16.3	3.5-5.0 x 4.5-6.6

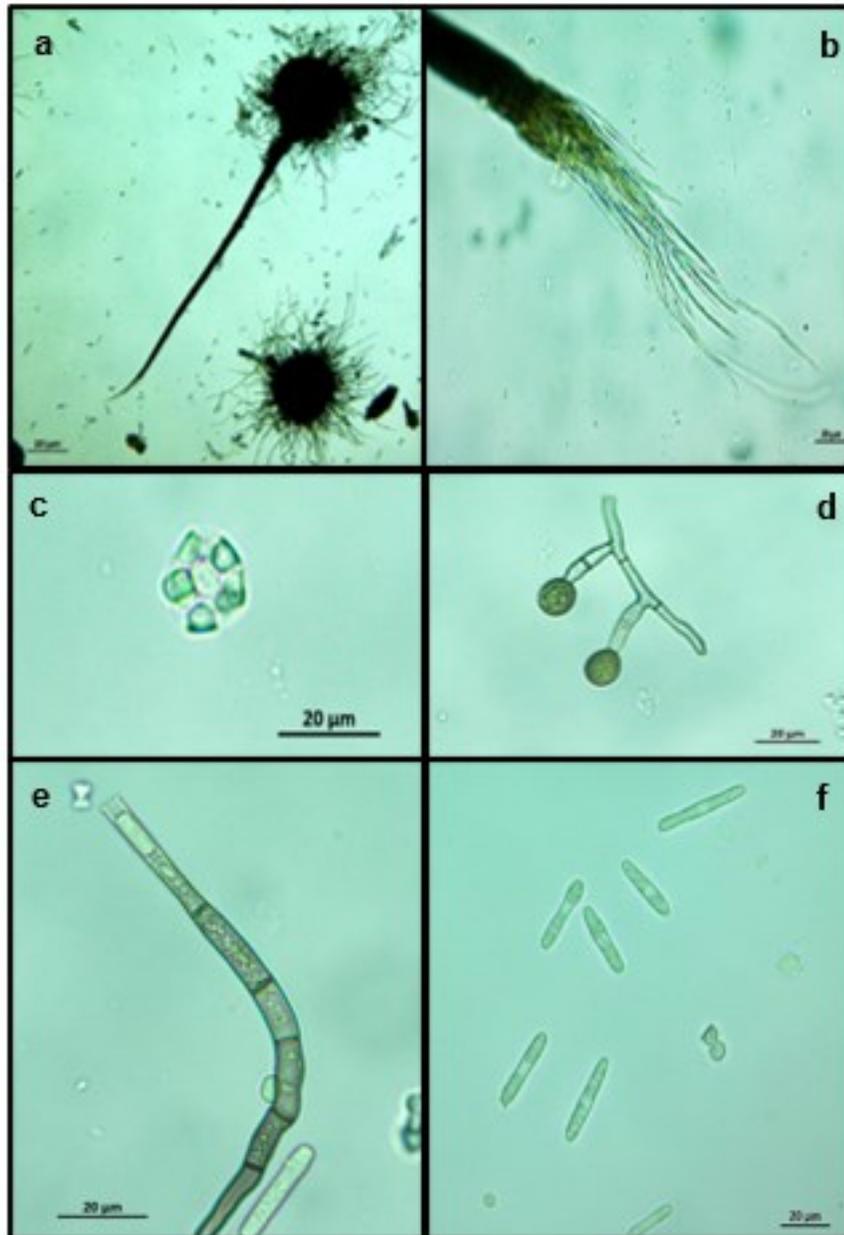


Figura 1-4: Aislamiento NCF16 procedente del Departamento del Huila. Características microscópicas observadas a partir de un cultivo de 14 días de crecimiento en el medio MEA 2% con temperatura de incubación de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. **a.** Base y cuello del peritecio. **b.** Hifa ostiolar en forma de brocha alargada. **c.** Ascosporas en forma de sombrero. **d.** Aleuroconidias individuales. **e.** Endoconidióforo. **f.** Endoconidias cilíndricas. Escala: a, c, d, e, f 20 μm y b 10 μm .

El Análisis de Componentes Principales (PCA) evidenció un valor de 83.1% de la variabilidad acumulada entre las características morfológicas, microscópicas de los aislamientos de *Ceratocystis* sp. evaluados. El gráfico de sedimentación permitió determinar un número de tres dimensiones óptimas que retuvieron dicho porcentaje de variabilidad.

La dimensión 1, explicó el 45.5 %, la dimensión 2, el 22.1% y la dimensión 3 el 15.5%. La dimensión 1 estuvo representada por todas las variables morfológicas microscópicas de los aislamientos, sin embargo, se evidenció una correlación directa a este componente el ancho (0.79) y largo (0.81) de las bases de los peritecios, el ancho (0.77) y largo (0.65) de las ascosporas, el largo del cuello de los peritecios (0.46), el ancho (0.69) y largo (0.55) de las endoconidias, el ancho (-0.52) y largo (-0.74) de las aleuroconidias. En la dimensión 2 se ubicaron el largo de las endoconidias (0.71) y el largo del cuello de los peritecios (0.70), que, a su vez, se contraponen a la característica morfológica del largo de las ascosporas (-0.67). Por último, encontramos la dimensión 3, que incorpora el ancho (0.75), el largo (0.47) de las aleuroconidias y el ancho (0.52) de la base de los peritecios (Figura 1-5).

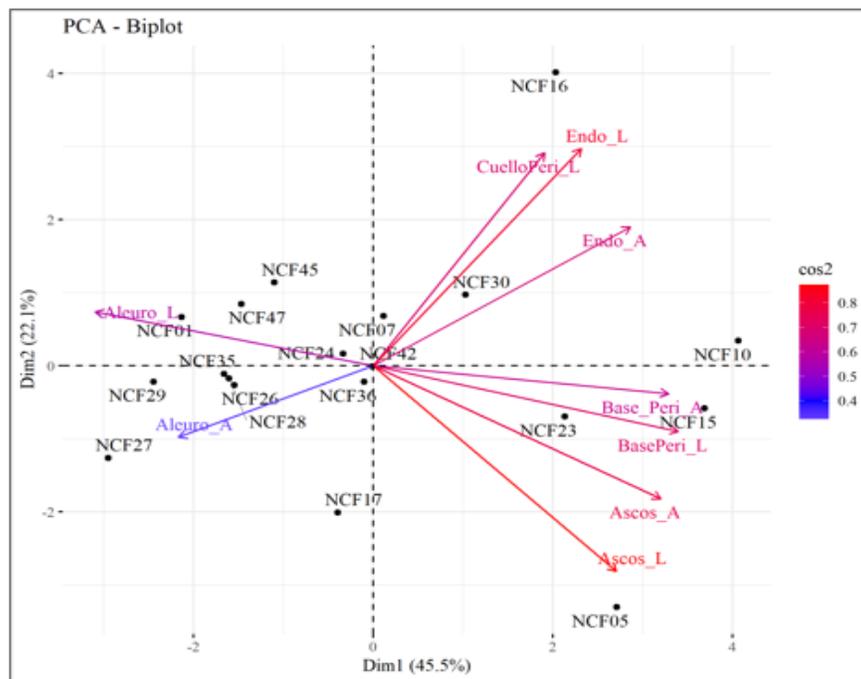


Figura 1-5: Análisis de Componentes Principales (PCA). Relación entre las características morfológicas microscópicas y los aislamientos de *Ceratocystis* sp. Representación de las distintas variables morfológicas. Dimensión 1 - Diámetro de peritecios, ascosporas, endo y aleuroconidias (NCF05, 10, 15 y 23). Dimensión 2 - Largo cuello de peritecios y endoconidias (NCF16 y 30). Dimensión 3 - Diámetro de las aleuroconidias (NCF01, 07, 17, 24, 26, 27, 28, 29, 35, 36, 42, 45, 47).

El análisis, además, identificó las características morfológicas, microscópicas que permitieron discriminar la relación entre los individuos dentro de los ejes. Los aislamientos NCF15, NCF23, NCF05 y NCF10, estuvieron influenciados por el tamaño de la base de los peritecios y las ascosporas, mientras que el aislamiento NCF16 y el NCF30, por el largo del cuello de los peritecios y el diámetro de las endoconidias. En la coordenada negativa se ubicaron los aislamientos NCF01, NCF07, NCF17, NCF24, NCF26, NCF27, NCF28, NCF29, NCF35, NCF36, NCF42, NCF45 y NCF47, asociados con el tamaño de las aleuroconidias (Figura 1-5).

El análisis de conglomerados categorizó los aislamientos de *Ceratocystis* sp. en tres grupos principales, basados en su similitud respecto a sus características morfológicas, microscópicas. El primer grupo (21%), incluyó los aislamientos NCF05, NCF15, NCF10 y NCF23 provenientes de los departamentos Huila (2), Valle del Cauca (1) y Tolima (1), a partir de tronco (3) y suelo (1). El segundo grupo (5.2%) se conformó con un único aislamiento el NCF16, recolectado de la región del Huila de una muestra de suelo. Los demás aislamientos, NCF01, NCF07, NCF17, NCF24, NCF26, NCF27, NCF28, NCF29, NCF30, NCF35, NCF36, NCF42, NCF45 y NCF47, de los departamentos de Santander (1), Huila (1) y Tolima (12), colectados a partir de tronco (4) y suelo (10), conformaron el tercer grupo (73.6 %) (Figura 1-6). El Análisis de Componentes Principales estuvo consistente con este hallazgo.

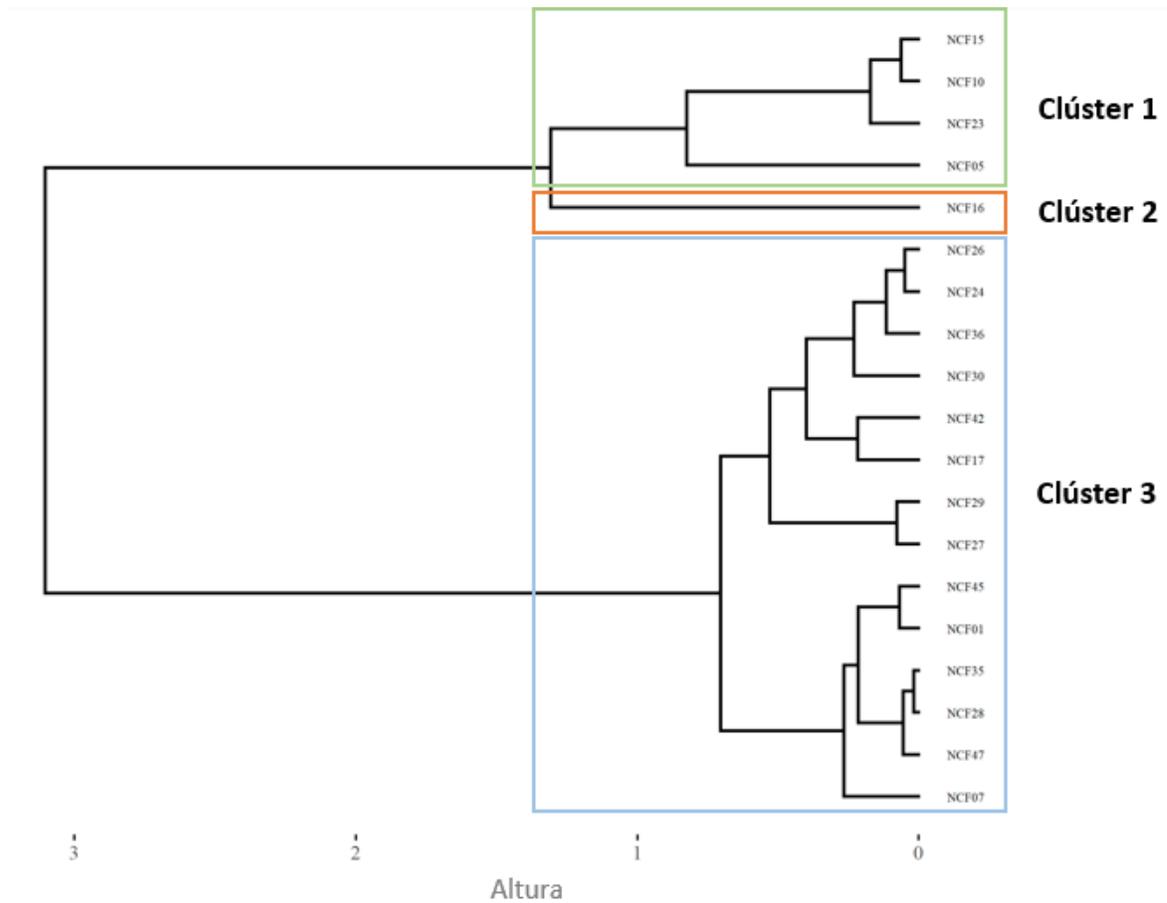


Figura 1-6: Dendrograma de conglomerados en función de las características morfológicas, microscópicas y del origen de los aislamientos de *Ceratocystis* sp., evaluados en este estudio. Clúster 1 (NCF15, NCF10, NCF23 y NCF05). Clúster 2 (NCF16). Clúster 3 (NCF26, NCF24, NCF36, NCF30, NCF42, NCF17, NCF29, NCF27, NCF45, NCF01, NCF35, NCF28, NCF47 y NCF07).

1.4 Discusión

El género *Ceratocystis* comprende un grupo muy heterogéneo de ascomicetos cuya diferenciación ha sido basada a partir de características morfológicas que han permitido realizar su clasificación. Para ello, el uso de medios de cultivos semi selectivos

suplementados con antibióticos han contribuido en muchos casos, con el diagnóstico e identificación taxonómica de este hongo (Fergus, 1956). En este estudio, el análisis de sensibilidad a la cicloheximida evidenció la incapacidad de los aislamientos de *Ceratocystis* sp. para crecer en presencia de este antibiótico; el cual, se encuentra involucrado en la inhibición de síntesis de proteínas en la mayoría de los eucariotas (Harrington, 1981). Esta prueba permitió corroborar la identidad del género del hongo objeto de estudio, ya que existen otros grupos fúngicos con características morfológicas similares, pero no sensibles a esta molécula. Lo anterior confirma lo descrito por Harrington (1981), quien ratificó que los hongos del género *Ceratocystis* del grupo Fimbriata, con anamorfo similar a *Charala*, no pueden tolerar la cicloheximida a una concentración de 100 ppm, y permite diferenciarlos de otros géneros similares como *Ceratocystopsis* y *Ophiostoma*.

La evaluación morfológica macroscópica de los aislamientos mostró que sí existe variabilidad entre ellos. Se observaron colonias con diferentes texturas, colores y cambios en los patrones de producción de peritecios y ascosporas, en los medios de cultivo evaluados. Las características de las colonias pueden ser usadas como complemento para la identificación de un microorganismo. En algunos casos, su fenotipo se mantiene sin importar las condiciones ni el medio de cultivo utilizado, lo que favorece su identificación y diagnóstico. Sin embargo, nuestros hallazgos evidenciaron que, aunque se identificaron grupos dentro de los aislamientos que compartían similitudes entre colonias, no existe una única forma de crecimiento, que pueda definirse para el hongo *Ceratocystis* sp., que afecta el cultivo de cacao. En 2004, C. J. B. Engelbrecht observó que cuando *C. fimbriata* crecía en diferentes medios de cultivo la morfología de las colonias podría ser variable. Firmino (2011), reportó que los aislamientos provenientes de cultivo de cacao en Colombia se tornaron de color café con alta producción de peritecios en el medio de cultivo agar extracto de malta (MEA) a 26°C. Por su parte Marín et al. (2003), encontró que las colonias de los aislamientos de *C. fimbriata* de cultivos de café en el país, evidenciaron gamas de colores entre grises, bronce y verde oliva, con diferente disposición de peritecios en el medio de cultivo jugo V8. (Oliveira, Guimarães, et al., 2015), demostró que en los medios extracto de malta (MEA), papa dextrosa (PDA), avena, coco y galactona-asparagina, el crecimiento del micelio

fúngico y la esporulación fue diferente para todos los aislamientos a una temperatura óptima de 24-26°C. Lo anterior sugiere, que la caracterización macroscópica de *Ceratocystis* no puede utilizarse como única fuente para su identificación y caracterización a nivel de laboratorio.

El uso de los medios de cultivo previamente reportados, agar extracto de malta 2% (MEA) y agar papa dextrosa (PDA), favorecieron el crecimiento de todos los aislamientos. Estos medios de cultivo según Santos et al. (2011) y Oliveira, Guimarães, et al. (2015) proporcionaron un crecimiento más homogéneo entre los aislamientos y permitieron un mayor crecimiento miceliar a diferencia de otros medios enriquecidos, siendo su uso adecuado para la caracterización macroscópica de *Ceratocystis*. En este trabajo fue notorio el desarrollo y la capacidad de producción de peritecios y ascosporas por parte de *Ceratocystis* en ambos medios de cultivo, lo cual corrobora que estos pueden ser utilizados para el aislamiento y conservación del patógeno. Los resultados obtenidos mostraron, además, que la producción de peritecios y ascosporas depende de cada aislamiento independiente de los medios utilizados.

A nivel microscópico, las características evaluadas han sido las utilizadas en muchos estudios para la identificación de especies de *Ceratocystis*. Nuestros hallazgos indican que la morfología de algunas de las estructuras fueron variables con lo reportado para esta especie en diferentes hospederos. Las mayores diferencias en el tamaño de las estructuras para todos los aislamientos de *Ceratocystis* sp., se presentaron entre los peritecios y las endoconidias. En cuanto a los peritecios, los rangos encontrados en este estudio para el tamaño de las bases y los cuellos difirieron a los reportados para *C. fimbriata* por Xu et al. (2020) en zanahoria, Oliveira, Harrington, et al. (2015) en eucalipto, Marin et al. (2003) en café y Barba (1961) en cacao; cuyos resultados en general oscilaron con tamaños entre 80-268 x 110-262 µm para las bases y entre 408-870 µm del largo de los peritecios. Con nuestros resultados observamos que los peritecios presentaron tamaños de las bases mucho más grandes al igual que la longitud de los cuellos de dichas estructuras. Johnson et al. (2005), recalcaron la importancia de los peritecios para diferenciar entre los aislamientos de los diferentes clados en los que se encuentra organizado el género *Ceratocystis*, ya que, la mayoría de los que pertenecen

al clado norteamericano poseen una estructura en forma de collar en el origen del cuello del peritecio, característica que se encuentra ausente en los aislamientos del clado latinoamericano al que pertenece *C. fimbriata*, al igual que en los aislamientos de este estudio.

Las endoconidias producidas por los aislamientos fueron únicamente de tipo cilíndrico y su tamaño fue muy variable, ajustándose a lo descrito por Firmino (2011), quien distinguió 12 tipos de esporas entre aislamientos. Sin embargo, las endoconidias cilíndricas que se observaron en este estudio, presentaron dimensiones dentro de los rangos reportados para *C. fimbriata* en cacao y eucalipto, pero diferentes en tamaño comparadas con lo mencionado por C. J. B. Engelbrecht (2004) y los hallazgos de Marín et al. (2003) en zonas cafeteras de Colombia, donde dichas estructuras presentaban diámetros entre 2.4-2.7 de ancho x 16.4-19.4 μm de largo, siendo estas, mucho más pequeñas que las evidenciadas en nuestros aislamientos. Por otra parte, las cepas de *C. fimbriata* recuperadas a partir de batata y cacao, se caracterizan por no producir conidias doliformes (forma de barril), únicamente de forma cilíndrica (Holland et al., 2019; Firmino, 2011; C. J. B. Engelbrecht, 2004). Encontramos, además, que las ascosporas, aleuroconidias, hifas ostiolares y endoconidióforos no mostraron diferencias distinguibles entre la mayoría de los aislamientos.

Uno de los principales resultados encontrados en este estudio a partir del análisis microscópico, fue la identificación de un único aislamiento (NCF16) con notorias diferencias a nivel morfológico en comparación con el resto del grupo. Este aislamiento se caracterizó por presentar los peritecios más grandes a nivel de base y longitud del cuello y las endoconidias más largas. Las dimensiones encontradas en estas estructuras son similares a las reportadas por C. J. B. Engelbrecht y Harrington (2005) para *Ceratocystis cacaofunesta* con peritecios de tamaño entre 100-275 x 95-305 μm para la base y 310-1010 μm para el largo del cuello. En el caso de las endoconidias, estos mismos autores reportan tamaños entre 2.5-5 x 5 μm de ancho y de 8-40 μm de largo. *C. cacaofunesta* a diferencia de *C. fimbriata* puede producir en algunos casos esporas doliformes, que están totalmente ausentes en la otra especie (Bailey & Meinhardt, 2016; Firmino, 2011). Cabe resaltar, que en este estudio solo se evidenció endoconidias de forma cilíndrica, lo que no nos permite diferenciar con claridad la identidad de especies

diferentes a *Ceratocystis fimbriata*. Otro de los aspectos importantes del aislamiento NCF16, fue la forma de la hifa ostiolar, la cual fue totalmente diferente al resto de los aislamientos y a lo reportado a la fecha para *C. fimbriata*, que por lo general presenta entre 8 a 15 hifas ostiolaras con un rango entre 30-125 μm de largo (Liu et al., 2018; Rojas, 2008) y de punta roma (Holland et al., 2019). Sin embargo, en este estudio, el aislamiento NCF16, presentó hifas ostiolaras en forma de brocha o penacho bastante largas que no lo presentó ningún otro aislamiento y a la fecha tampoco se encuentran reportes que mencionen este hallazgo.

Nuestros resultados muestran que debido a la variabilidad morfológica observada en los aislamientos de *Ceratocystis* sp. colectados de regiones productoras de cacao, no fue posible determinar alguna característica en particular que permitirá realizar la identificación precisa del patógeno para este sistema productivo. Marín et al. (2003), encontraron, que los aislamientos de *Ceratocystis* recuperados de cultivos de café en Colombia poseen una diversidad morfológica alta, pero no se evidenció nada diferente a lo reportado para *C. fimbriata*, como se observó en este trabajo. Según Rodríguez-Polanco et al. (2020), la morfometría puede verse influenciada no solo por la variación natural sino también por las condiciones ambientales, por lo que la identificación de especies basadas únicamente en caracteres morfológicos puede causar confusión. Sin embargo, teniendo en cuenta la aparición de enfermedades y nuevos patógenos, es necesario seguir en la búsqueda de caracteres que sean estables en las diferentes especies y que faciliten los procesos de identificación.

Es así como, a partir de la variabilidad morfológica encontrada en los aislamientos de *Ceratocystis* sp. de cacao, se sugiere que los estudios de caracterización de este patógeno estén complementados con el uso de herramientas moleculares que permitan a partir de la selección de regiones específicas, la identificación precisa de las especies, especialmente aquellas ubicadas dentro del complejo de *C. fimbriata* (Liu et al., 2018; Valdetaro et al., 2015; Fourie et al., 2014; Firmino, 2011), que permitan a futuro la generación de pruebas de diagnóstico específicas para la detección de este patógeno; teniendo en cuenta que la mayoría de las especies de *Ceratocystis* evidencian grandes similitudes y variabilidad a nivel morfológico lo que dificulta distinguir las entre sí (Ferreira et al., 2010; Webster A N & Butler, 1967).

El Análisis de Componentes Principales evidenció que las características morfológicas microscópicas, fueron las variables más importantes para discriminar entre los aislamientos. Estos caracteres permitieron establecer tres grupos bien definidos donde el grupo 1 se conformó por 4 aislamientos, 2 del Huila, 1 del Valle del Cauca y 1 del Tolima, los cuales se definieron por compartir los tamaños de las bases de los peritecios y de las ascosporas. El grupo 2, estuvo representado por 1 aislamiento proveniente del departamento del Huila, en donde la longitud del cuello del peritecio y las endoconidias fueron las variables morfológicas que permitieron separarlo del resto del grupo. El tercer y último grupo, fue integrado por 14 aislamientos principalmente de la región del Tolima, 1 del Huila y 1 de Santander, cuya característica microscópica diferencial fue el tamaño de las aleuroconidias. Estos resultados mostraron, además, que no existe relación entre la variabilidad observada con la procedencia, ni tampoco con el tipo de tejido o sustrato del cual fueron recuperados los aislamientos. Estos datos pueden estar asociados con la ocurrencia natural de la variación, generalizada entre los patógenos, la cual les permite adaptarse a las condiciones cambiantes del medio ambiente y evolucionar a nuevos patotipos (Bejarano et al., 2021). En contraste a nuestros resultados, en el estudio de Rodríguez-Polanco et al. (2020), para realizar la identificación de subgrupos de *Phytophthora palmivora* según la ubicación geográfica, utilizaron caracteres morfométricos que les permitió clasificar los aislamientos en grupos diferentes, identificando una característica consistente dentro de esta especie, la cual ha sido un factor determinante para el diagnóstico inicial de *P. palmivora* y *P. capsici*, patógenos de cacao (Bailey & Meinhardt, 2016).

Basados en los resultados de este capítulo, este estudio permitió confirmar la identidad de los aislamientos de *Ceratocystis* sp., obtenidos de cultivos de cacao en Colombia como *C. fimbriata* actual responsable de la enfermedad mal de machete en este sistema productivo. Las características macroscópicas observadas en los 19 aislamientos coincidieron con el patrón típico de crecimiento reportado para esta especie, de igual manera, el análisis morfométrico de las estructuras evidenció mediciones en su mayoría, acorde a los descritos para *C. fimbriata*. En este estudio se demuestra la importancia de la caracterización morfológica de este patógeno, como un insumo valioso para contribuir

en la determinación de la variabilidad macro y microscópica que presenta la especie *C. fimbriata* en cacao, nunca antes descrita.

2. Capítulo 2

Caracterización filogenética de aislamientos de *Ceratocystis* sp. mediante un análisis multilocus

2.1 Introducción

La clasificación taxonómica del género *Ceratocystis* ha sido objeto de estudio los últimos años, estando sujeta a varios cambios debido a su similitud a nivel morfológico y ecológico con otros géneros cercanos descritos (de Beer et al., 2014). Debido a su importancia agronómica, este género ha estado sujeto a múltiples estudios que han permitido esclarecer su ubicación taxonómica y definir las especies que lo conforman.

La caracterización de las especies del género *Ceratocystis* ha sido fundamentada en datos morfológicos, ecológicos y moleculares (Bailey & Meinhardt, 2016); sin embargo, estos últimos, especialmente a nivel del ADN, han adquirido relevancia debido a la estabilidad de la información contenida en los genes y genomas, así como en su especificidad que permitieron la identificación del complejo de especies que conforman este género.

Después de su primera descripción, *Ceratocystis fimbriata*, ha sido asociada a múltiples enfermedades a nivel global en diferentes hospederos (Van Wyk et al., 2010). Un total de

42 especies de plantas pertenecientes a 14 familias han sido confirmadas como hospedantes del patógeno, incluyendo árboles como sicómoro o platano (*Platanus* spp.), mango (*Mangifera indica* L.), melina o gmelina (*Gmelina arborea* Roxb), cacao (*Theobroma cacao* L.), copoazú (*Theobroma grandiflora*), cítricos (*Citrus* spp.), café (*Coffea arábica* L.), caucho [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell & Arg], almendras y otras frutas de hueso como durazno y cerezo (*Prunus* spp.), álamo (*Populus* spp.), acacia (*Acacia* spp.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) y cultivos de raíces como batata (*Ipomoea batatas*) y ñame (*Colocasia esculenta* L.) (Bailey & Meinhardt, 2016; Oliveira et al., 2015; Ferreira et al., 2010). La especie *C. fimbriata* es especialmente importante en América Latina, donde causa grandes pérdidas en tres de los cultivos con mayor importancia económica representados por el café, cacao y cítricos (Marin & Wingfield, 2006). Debido a su poder adaptativo a nuevas regiones geográficas y hospederos, las especies de *Ceratocystis* se catalogan como una de las mayores amenazas para la agricultura.

Las técnicas moleculares basadas en comparaciones de secuencias de ADN han llevado a dilucidar la historia taxonómica de especies crípticas que han sido tratadas como una única especie y cuyos taxones discretos residen entre aislamientos pocos estudiados (C. J. B. Engelbrecht & Harrington, 2005; Johnson et al., 2005). En la última década, nuevas especies del complejo *C. fimbriata* han sido identificadas gracias al poder de discriminación y precisión de la información molecular en la inferencia filogenética (Wyk et al., 2011).

La delimitación inicial de especies en el género *Ceratocystis* se basó en el concepto de especie filogenética soportado por análisis de secuencias de ADN ribosomal (DNAr), específicamente regiones intergénicas de tipo ITS. Estas regiones han sido ampliamente utilizadas en estudios filogenéticos y por sí solas, pueden delimitar y distinguir la mayoría de las especies descritas en este género (Fourie et al., 2014). Sin embargo, el uso de marcadores ITS en estudios taxonómicos es cuestionado debido al descubrimiento de variación intragenómica de esta región en un solo aislamiento de *Ceratocystis*, como se observó en *C. manginecans* (Kanzi et al., 2020; Liu et al., 2018; de Beer et al., 2014; Fourie et al., 2014). Para este caso particular, la secuencia ITS1 obtenida de un aislado de *Ceratocystis* sp. fue idéntica a la de *C. manginecans*, pero la del ITS2 difería en siete

nucleótidos y correspondió a *C. acaciivora*; estos datos justificaron porque la región ITS al utilizarse como único marcador se considera poco confiable (Kanzi et al., 2020; Fourie et al., 2014).

Por lo anterior, el análisis filogenético multilocus o de múltiples genes (multigenes), ha demostrado ser útil en la diferenciación de complejos de especies fúngicas incluyendo a *Ceratocystis* (Van Wyk et al., 2010), y ha sido preponderante para completar la historia taxonómica de este género. Este tipo de estudios han contribuido en la definición del complejo *C. fimbriata*, *C. coerulescens* y *C. moniliformis* en géneros discretos (Bailey & Meinhardt, 2016; de Beer et al., 2014), así como en la distinción de nuevos clados dentro de cada uno de estos complejos (Fourie et al., 2014; Van Wyk et al., 2010); además, de la reclasificación de nuevas especies que previamente habían sido asignadas como *C. fimbriata* (Valdetaro et al., 2015; Ferreira et al., 2010; Marin et al., 2003).

Dentro de los genes contemplados como alternativa para la identificación filogenética de especies de *Ceratocystis* se encuentran la subunidad pequeña ribosomal (SSU), primera y segunda subunidades de la ARN polimerasa II (RPBI y RPBII), ATP sintasa 6 (ATP6), β -Tubulina 2 (β T2) y regiones del gen calmodulina (CAL). Así mismo, genes de proteína de una sola copia conservados en la mayoría de los hongos han sido identificados a partir de comparaciones genómicas, muy útiles como marcadores filogenéticos a la hora de delinear especies estrechamente relacionadas, incluyendo especies de *Ceratocystis*. Dentro de estos genes se reportan los que codifican para la proteína de procesamiento de pre-ARNr (Tsr1), proteína de mantenimiento de minicromosomas (Mcm7), 60S proteína ribosomal L37 (FG1093) y proteína de unión a nucleótidos de guanina (MS204) (Liu et al., 2018; de Beer et al., 2014; Fourie et al., 2014; O'Donnell et al., 2000).

Actualmente, las especies de *Ceratocystis* residen en cuatro linajes filogenéticos vinculados a regiones geográficas y especialización de hospedero; el clado latinoamericano (LAC), norteamericano (NAC), africano (AFC) y el asiático australiano (AAC) (Kanzi et al., 2020; Holland et al., 2021). Esta clasificación se logró a través de la combinación de regiones génicas utilizadas en análisis filogenéticos basados en locus únicos. Estos estudios, ayudaron a esclarecer problemas de taxonomía dentro de este género. A nivel de clado, las especies de *Ceratocystis* pueden distinguirse unas de otras ya sea por pequeños aspectos morfológicos, rango de hospederos, alelos de isoenzimas

y estudios de filogenia (Holland et al., 2019; Liu et al., 2018); Sin embargo, debido a la emergencia de nuevas especies (*C. betulina*, *C. destructan*, *C. tilia* entre otras) así como su impacto en la ubicación taxonómica existente, una reclasificación de género se hace relevante.

La implementación de marcadores moleculares de tipo microsatélites han proporcionado información de los polimorfismos entre aislamientos de *Ceratocystis* y gracias a sus propiedades han sido ampliamente utilizados. Su naturaleza codominante, que permite la distinción de homocigotos y heterocigotos, su amplia distribución en el genoma, su reproducibilidad y su elevada variabilidad (multialélicos) los han convertido en uno de los sistemas de marcadores genéticos más informativos (Picó & Esteras s.f.). El uso de microsatélites ha permitido obtener información profunda a nivel de la población de *Ceratocystis*, estos marcadores pudieron esclarecer las relaciones entre diferentes aislamientos según el hospedante y el origen geográfico, sugiriendo que la especie vegetal susceptible a este patógeno representa un factor importante para la diferenciación de especies de *C. fimbriata*, y pueden usarse además, para determinar las relaciones evolutivas entre poblaciones de diferentes países (Liu et al., 2018; Oliveira et al., 2015; Valdetaro et al., 2015; Barnes et al., 2001). Sin embargo, según Barnes et al. (2001) y Fischer et al. (2017) estos marcadores pueden presentar una limitación sobre la estimación de la diversidad genética de la población ya que son regiones altamente mutables en el genoma debido a su estructura repetitiva. La variación en la amplificación de los cebadores y la homoplasia del tamaño del fragmento pueden reducir potencialmente la precisión de las estimaciones genéticas y no reflejar adecuadamente patrones de variación en todo el genoma.

Los análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) también pueden emplearse como marcadores útiles para estudios de genética de poblaciones. Este tipo de polimorfismo puede ocurrir a altas frecuencias en un genoma y son más conservados que otras variaciones estructurales. Este tipo de marcadores fueron utilizados en combinación con distintas regiones génicas para reconsiderar los límites de especies de *Ceratocystis* ubicados dentro del clado (LAC). Su uso proporcionó una herramienta de diagnóstico importante al permitir distinguir claramente entre especies de *Ceratocystis* y reveló la presencia de nuevas especies crípticas (Fourie et al., 2014).

Los marcadores de ADN polimórficos amplificados de manera aleatoria (RAPD) y fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) también han sido empleados para estimar las relaciones genéticas entre organismos incluyendo a *Ceratocystis*. Santini et al. (2000) y Witthuhn (1999), reportaron que estos marcadores podrían ser un medio eficaz para distinguir entre diferentes formas especiales de *Ceratocystis* y apoyaron la teoría que *C. fimbriata* abarca un grupo de especies especializadas en hospederos. Estos autores encontraron que los aislamientos procedentes del mismo hospedante se agruparon muy cerca en grupos bien resueltos. Sin embargo, las estimaciones de algunas relaciones intraespecíficas por medio de estos marcadores en ocasiones son poco confiables y sus resultados están sujetos a falsas interpretaciones.

En Colombia Van Wyk et al. (2010) y Marin et al. (2003), determinaron la variabilidad genética existente entre aislamientos de *Ceratocystis* que afectan distintos cultivos de interés. Marin et al. (2003), a partir de estudios de morfología y patogenicidad y mediante el uso de marcadores tipo RFLPs y RAPD, y de secuencias parciales del gen β -tubulina y de tipo de apareamiento MAT-2, identificaron que aislamientos de *C. fimbriata* colectados de regiones cafeteras del país se agruparon en dos nuevos linajes. Para confirmar estos resultados Van Wyk et al. (2010), compararon aislamientos de *Ceratocystis* provenientes de distintas regiones productoras de café, cacao y cítricos en Colombia, mediante estudios de morfología y de análisis de secuencias de ADN de tres regiones génicas. Los resultados permitieron concluir que los aislamientos de *Ceratocystis* utilizados, representaban dos grupos filogenéticos diferentes alejados de *C. fimbriata*, los cuales, representaban taxones discretos. Estos nuevos grupos fueron denominados *C. papillata* y *C. Colombiana* (Figura 2-1).

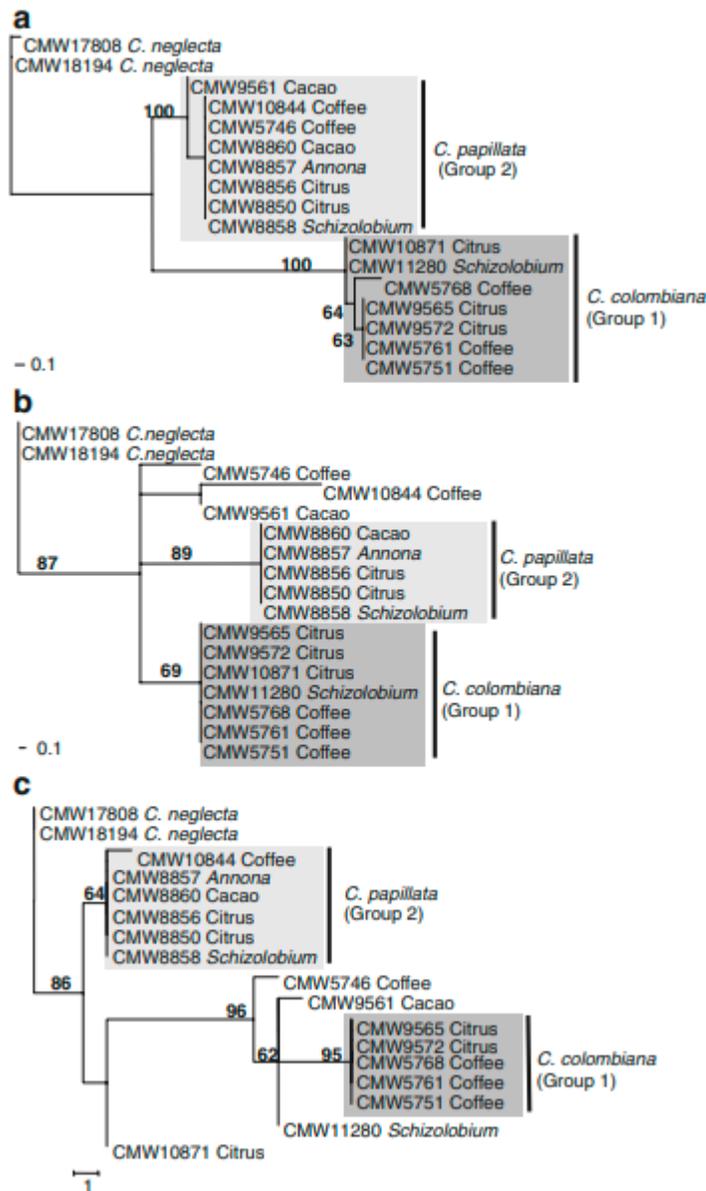


Figura 2-1: Representación filogenética de los distintos grupos (Grupo 1 y 2) conformados por aislamientos colombianos de *Ceratocystis* y las dos nuevas especies *C. papillata* y *C. colombiana*, identificadas dentro del complejo *C. fimbriata* (s.l.).

Nota: Árboles separados sin raíces para las tres regiones génicas. a. ITS. b. β T. c. EF1- α . Tomado de new *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia por, Van Wyk et al. (2010).

Por otra parte, Rodas y colaboradores compararon secuencias de ADN de aislamientos recuperados a partir de lesiones de árboles de eucalipto en Colombia, observando que estos aislamientos representaban una nueva especie del género *Ceratocystis* y podían ser ubicados en un único linaje, diferente a los ya reportados (Rodas et al., 2008).

Actualmente *Ceratocystis fimbriata* ha sido reportado como el responsable de la enfermedad mal de machete en cacao en Colombia (Arbeláez Giraldo, 1957; ICA, 2012), sin embargo, aún existen incompatibilidades entre autores que contradicen la relación causal de este patógeno con la enfermedad (Bailey & Meinhardt, 2016; C. J. B. Engelbrecht & Harrington, 2005). Así mismo, es necesario llevar a cabo un estudio que permita realizar una caracterización más robusta de las especies albergadas en este género a través de información genética. La identificación taxonómica de los hongos que integran el complejo de especies clasificadas por su similitud morfológica como *C. fimbriata*, continúa siendo preponderante en términos fitosanitarios y de producción de este cultivo de importancia económica. Este capítulo tiene como objetivo caracterizar filogenéticamente aislamientos de *Ceratocystis* sp., colectados de diferentes regiones productoras de cacao del país, a través del análisis de cuatro loci genéticos; gen parcial de β -Tubulina (β T-1), región del gen de la subunidad de proteína de unión a nucleótidos de guanina (MS204), segunda subunidad mayor de la RNA polimerasa (RPBII) y 60S proteína ribosomal L37 (FG1093). Estos marcadores fueron seleccionados por su alto poder para discriminar y diferenciar entre especies estrechamente relacionadas en el género *Ceratocystis*, con el fin de complementar la información de caracterización morfológica macro y microscópica que permitan en conjunto, esclarecer la identidad del agente causal del mal de machete del cacao en Colombia.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Lugar de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación Tibaitatá en Mosquera, Cundinamarca, en los laboratorios de Microbiología Agrícola y Genética Molecular de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia.

2.2.2 Procedencia de los aislamientos

De los aislamientos de *Ceratocystis* sp. previamente caracterizados a nivel morfológico, se seleccionaron aquellos aislamientos cuya información de procedencia es representativa de todas las localidades y los diferentes sustratos de donde fueron colectados (Tabla 2.1).

Tabla 2-1: Origen de los aislamientos de *Ceratocystis* sp. utilizados en el análisis filogenético.

Código	Departamento	Municipio	Localidad	Origen	Coordenadas	
NCF01	Tolima	Rioblanco	ND	cambium	03°39'26.0"	75°35'45.4"
NCF05	Huila	Gigante	ND	cambium	ND	ND
NCF07	Santander	Playón	Agua caliente	cambium	07°37'0.53"	73°17'7.62"
NCF10	Valle	Palmira	Agrosavia	cambium	03°30'45.9"	76°19'36.6"
NCF15	Huila	Gigante	Alto Magdalena	cambium	02°24'02.7"	75°31'29.8"
NCF16	Huila	Rivera	El Caracolí	suelo	ND	ND
NCF17	Huila	Rivera	Villa Alejandra	suelo	02°45'19.9"	75°15'35.9"
NCF24	Tolima	Chaparral	Florián	suelo	03°40'0.09"	75°35'45.4"
NCF26	Tolima	Falan	La Unión	suelo	05°6'57.5"	74°58'40.2"
NCF28	Tolima	Falan	El Oasis	suelo	05°7'24.2"	74°58'30"
NCF29	Tolima	Falan	La Esperanza	suelo	05°8'27.2"	74°57'37"
NCF30	Tolima	Falan	La Esperanza	cambium	05°8'27.2"	74°57'37"
NCF35	Tolima	Falan	Alto Bonito	suelo	05°8'18.5"	74°58'10.7"
NCF36	Tolima	Falan	Alto Bonito	cambium	05°8'18.5"	74°58'10.7"
NCF42	Tolima	Palocabildo	La Fortuna	suelo	05°7'34.3"	74°59'49.1"
NCF45	Tolima	Palocabildo	La Esperanza	cambium	ND	ND
NCF47	Tolima	Palocabildo	El Fresnito	suelo	05°7'46.46"	74°59'59.9"

ND: No disponibles

2.2.3 Extracción de ADN

El ADN de los 17 aislamientos de *Ceratocystis* sp. fue extraído a partir de cultivos monospóricos crecidos en agar extracto de malta al 2% durante 14 días a 24±2°C. Cuatro discos (5 mm) de micelio fueron dispuestos en cultivos líquidos de 250 mL de caldo MEA previamente esterilizado. Los inóculos se sometieron a agitación constante a 24±2°C durante 7 días. (Suwandi et al., 2021; de Beer et al., 2014). El micelio producido se filtró utilizando miracloth (Merck Millipore®) y se secó durante toda la noche en

cámara de flujo laminar, posteriormente, se colectó en tubos falcon de 50 mL. Las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido y se maceraron en un mortero estéril hasta su pulverización.

El ADN total se extrajo usando el buffer de extracción CTAB (Griffith & Shaw, 1998) y siguiendo el protocolo estandarizado por el Laboratorio de Cultivos Perennes Sostenibles de ARS (Agricultural Research Service) USDA (US Department of Agriculture) 0.1 g de masa de micelio fúngico en polvo fueron transferidos a un tubo de 1.5 mL. 900 μ L de buffer de extracción se adicionaron a cada tubo y se mantuvieron durante 60 min a 65°C invirtiendolo cada 10 min. Posteriormente se agregaron 900 μ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1 vol), con agitación suave (no usar vórtex) durante 10 s y se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4°C. Se transfirieron 750 μ L de la capa acuosa superior a un nuevo tubo de 1.5 mL al cual se le añadió 5 μ L de RNasa y fue incubado durante 30 min a 37°C. Pasado el tiempo se agregaron 750 μ L de cloroformo (agitar sin vortex) y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. 500 μ L de la fase acuosa superior fueron depositados en tubos de 2 mL con 250 μ L de acetato de amonio (7.5 M). En seguida fue agregado 1 mL de etanol absoluto frío a la mezcla. Cada tubo se agitó suavemente de 2 a 3 veces conservandolos en hielo por tiempo de 1 h. Finalmente fueron centrifugados a 12000 rpm durante 30 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet de ADN con 1 mL de etanol frío al 70% (vol/vol), se mezclaron en vórtex durante 2 minutos y se centrifugaron durante 1 minuto a 10000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el pellet resultante fue secado en SpeedVac por 3 min a 37°C. Por último, el pellet de ADN se resuspendió en 30-50 μ L de Buffer TE dependiendo del tamaño pellet y se almacenó a una temperatura de -20°C. La calidad del ADN obtenido se evaluó por índices de concentración y pureza por espectrofotometría usando el equipo Nanodrop® (Thermo Scientific) y el software NanoDrop 2000. La integridad del ADN fue evaluada por electroforesis visualizando las bandas en geles de agarosa al 1.5% teñidos con SYBR Safe (Invitrogen). Las concentraciones de ADN se estandarizaron a una dilución de trabajo de 50 ng/ μ L.

2.2.4 Regiones génicas y Cebadores

Cuatro loci fueron seleccionados para el análisis filogenético de los aislamientos de *Ceratocystis*. Estos comprendieron el gen parcial de β -Tubulina (β T-1), región del gen de la subunidad de proteína de unión a nucleótidos de guanina (MS204), segunda subunidad mayor de la RNA polimerasa (RPBII) y 60S proteína ribosomal L37 (FG1093) (Liu et al., 2018; Fourie et al., 2014; Glass & Donaldson, 1995). La información de los cebadores utilizados se describe en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2: Secuencia de cebadores para la identificación de aislamientos de *Ceratocystis* sp.

Región del gen	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)	Referencia
FG1093	FG1093.ceratoF FG1093.ceratoR	GCG CCA CAA CAA GTC GCA CGT TTC TCC GCT TGC CCT TGT CRS	600	Fourie et al. (2014)
MS204	MS204F.ceratoB MS204R.ceratoB	GGC TGA GCA GCT GAT CCT T ATG TCC GGG TAG TGT TAC CG	970	Liu et al. (2018); Fourie et al. (2014)
RPBII	RPB2 5Fb RPB2 7Rb	GAY GAY CGT GAT CAC TTY GG CCC ATR GCY TGY TTR CCC AT	1200	Liu et al. (2018)
β T-1	β t1a β t1b	TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC	600	Liu et al. (2018); Glass & Donaldson (1995)

2.2.5 PCR y secuenciación

Se realizó para cada gen un gradiente que permitió determinar la temperatura óptima de hibridación de cebadores para los cuatro marcadores, siendo de 57°C para β T-1, MS204 y RPBII y de 60°C para FG1093. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador T100 (Bio-Rad) en un volumen total de 25 μ L. Las mezclas de reacción consistieron en 1X buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μ M de cada cebador, 1 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 2 μ L de ADN a 50 ng/ μ L. El programa de PCR para el conjunto de cebadores consistió en una etapa de desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos durante 30 s a 94°C, 30 s a 57°C para β T1, RPBII, MS204 y 60°C para FG1093, 1 min de extensión a 72°C, seguido de una extensión final de 5 min a 72°C. La presencia y/o ausencia de amplímeros fue visualizada en geles de agarosa al 1.5% teñidos con SYBR Safe (Invitrogen). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en ambos sentidos mediante el método Sanger por el Instituto

de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Las secuencias obtenidas se editaron a través del software BioEdit v. 7.2.5.0 (Hall, 2004) y posteriormente, se alinearon contra la base de datos pública del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI con la herramienta BLASTn (Liu et al., 2018; Firmino, 2011).

2.2.6 Análisis filogenético

Para ubicar filogenéticamente los aislamientos obtenidos en este estudio dentro del género *Ceratocystis*, incluimos las secuencias de los loci seleccionados de las especies de *Ceratocystis* secuenciadas actualmente y disponibles en las bases de datos, los números de accesoión de las especies incluidas en nuestro análisis están descritos en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3: Detalles de los genomas de las distintas especies de *Ceratocystis* utilizadas en este estudio para el análisis filogenético.

Nombre de la especie	Número de la accesoión
<i>Ceratocystis albifundus</i>	ASM274225v2
<i>Ceratocystis cacaofunesta</i>	ASM277650v1
<i>Ceratocystis colombiana</i>	ASM2641980v1
<i>Ceratocystis eucalypticola</i>	ASM151381v1
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	ASM991473v1
<i>Ceratocystis harringtonii</i>	ASM201826v1
<i>Ceratocystis lukuohia</i>	ASM2350984v1
<i>Ceratocystis manginecans</i>	ASM640842v1
<i>Ceratocystis platani</i>	ASM97888v1
<i>Ceratocystis smalleyi</i>	ASM344917v1

En el análisis se emplearon las secuencias correspondientes a una única copia de cada marcador para las especies de *Ceratocystis* (Tabla 2-4).

Tabla 2-4: Información de acceso a las secuencias de las cuatro regiones génicas incluidas en el análisis multilocus.

Especies	Número de accesión GenBank			
	β T-1	FG1093	MS204	RPBII
<i>C. albifundus</i>	KC691477.1	-	-	-
<i>C. cacaofunesta</i>	KF302698.1	KJ601673.1	KJ601566.1	KJ601602.1
<i>C. colombiana</i>	AY177225.1	KJ601677.1	KJ601568.1	KJ601604.1
<i>C. eucalypticola</i>	FJ236785.1	KJ601690.1	KJ601575.1	KJ601612.1
<i>C. fimbriata</i>	MH844802.1	KJ601691.1 KJ601692.1	KJ601578.1	MW179502.1
<i>C. harringtonii</i>	MG980834.1	-	-	MF967170.1
<i>C. lukuohia</i>	KY809108.1	-	KY809133.1	KY809146.1
<i>C. manginecans</i>	MK652710.1	MN882733.1	MN882741.1	MN882749.1
<i>C. platani</i>	KF302690.1	KJ601704.1	KJ601593.1	KJ601629.1
<i>C. smalleyi</i>	EF070436.1	-	-	-
<i>C. pirilliformis</i>	KJ601514.1	KJ601706.1	KJ601594.1	KJ601630.1

(-) secuencias de marcadores no encontrados en las bases de datos.

La extracción de las secuencias de los marcadores moleculares cuya información no fue encontrada en la base de datos, se realizó a partir de los genomas de referencia, empleando secuencias de *C. fimbriata* para realizar la búsqueda (Tabla 2-5). La ubicación de los marcadores en los genomas fue determinada a través de alineamientos utilizando el programa Blastn v. 2.2.3 (<https://scicomp.ethz.ch/public/manual/BLAST/BLAST.pdf>). La extracción de las secuencias definidas por las coordenadas generadas en Blastn se realizó usando la herramienta getfasta de la suite BEDTools v. 2.30.0 (Quinlan, 2016; Quinlan, 2014), generando archivos en formato FASTA como archivos de salida para cada secuencia extraída. Las secuencias consenso fueron alineadas por separado con la herramienta MAFFT v. 7.515 (Kato et al., 2018) usando la opción de alineación automática. Posteriormente, las regiones con baja representatividad o pobremente alineadas fueron identificadas y excluidas usando la herramienta TrimAl v. 1.4.1 (Capella-Gutiérrez et al., 2009) e inspeccionadas visualmente con el software Jalview v. 2.11.2.6 (Procter et al., 2021).

Tabla 2-5: Información de acceso a las secuencias utilizadas para identificar los tres marcadores filogenéticos a través de la herramienta Blastn según la especie de *Ceratocystis*.

Especies	FG1093	MS204	RPBII
<i>C. albifundus</i>	KJ601691.1	KJ601578.1	MN957792.1
<i>C. harringtonii</i>	KJ601692.1	KJ601578.1	N/A
<i>C. lukuohia</i>	KJ601691.1	N/A	N/A
<i>C. smalleyi</i>	KJ601691.1	KJ601578.1	MN957792.1

N/A: información existente en las bases de datos.

Se realizó una inferencia filogenética particionada con el programa IQTree v. 2.2.0.3 (Quang Minh et al., 2022) utilizando una matriz de partición generada con FASconCAT-G v. 1.05.1 (Kück & Longo, 2014), a partir de la concatenación de los alineamientos obtenidos para cada gen. Los modelos de sustitución nucleotídica de mejor ajuste por cada alineamiento de acuerdo con el criterio de máxima verosimilitud (ML) utilizados en la inferencia filogenética fueron β T-1: K2P+R2, FG1093: HKY+F+G4, MS204: K2P+G4 y RPBII: TNe+I. El soporte estadístico para las ramas de los árboles de ML se obtuvo utilizando 1.000 réplicas de arranque y la prueba de Shimodaira – Hasegawa (SH-aLRT support) y Ultrafast Bootstrap support (UFBoot) en el programa IQTree v. 2.2.0.3 (Quang Minh et al., 2022).

Ceratocystis pirilliformis fue seleccionado en este estudio como grupo externo ya que, aunque reside en el género *Ceratocystis*, está lejanamente emparentado con las especies del clado latinoamericano (LAC).

El soporte de rama adicional se obtuvo mediante el análisis Bayesiano (IB), empleando el algoritmo de Monte Carlo basado en la Cadena de Markov (MCMC) con los programas Mesquite v. 3.80 y MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist et al., 2020). Para este fin, se utilizó el modelo de sustitución de nucleótidos con distribución gamma más invariantes GTR+G+I. La búsqueda de árboles se realizó mediante varias simulaciones con los siguientes parámetros: 1) 1.000.000 de generaciones, cuatro cadenas independientes y muestreo cada 100 árboles, 2) 100.000 generaciones, cuatro cadenas independientes y muestreo cada 1000 árboles, 3) 100.000 generaciones, cuatro cadenas independientes y muestreo cada 100 árboles, 4) 160.000 generaciones, cuatro cadenas independientes y muestreo

cada 100 árboles y 5) 20.000 generaciones, cuatro cadenas independientes y muestreo cada 100 árboles. En todos los casos se descartó el primer 25% de árboles. Se seleccionó el análisis cuya desviación estándar de las frecuencias de separación fue igual o menor a 0.01 con valores de convergencia iguales a 1.0. Los árboles fueron visualizados y editados en Figtree v. 1.4.4 (Rambaut, 2018).

Los valores de soporte obtenidos en los análisis de filogenia se organizaron en el árbol final de la siguiente manera “SH-aLRT(SH-a)/UFBoot e IB (PP)” y se definieron como: “fuertes”, únicamente cuando SH-a es igual o superior al 80% y UFBoot igual o superior al 90%; “bueno”, cuando SH-a esta entre 70% y 80% y UfBoot entre el 75% y 90% y “débil”, cuando SH-a es inferior al 70% y UfBoot inferior al 75%. Por otra parte, los valores de probabilidad posterior (PP) se definieron como: “débil”, entre 0.53 – 0.81, “bueno”, con valores entre 0.81 – 0.95 y “fuerte” con valores superior a 0.95 (Mayorga, 2020).

2.3 Resultados

2.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN fue positiva para todos los 17 aislamientos siguiendo el protocolo suministrado por ARS-USDA. El ADN obtenido fue de buena calidad (Figura 2-2) con concentraciones que variaron entre 236.1 ng/μL y 2771.0 ng/μL (Tabla 2-6).

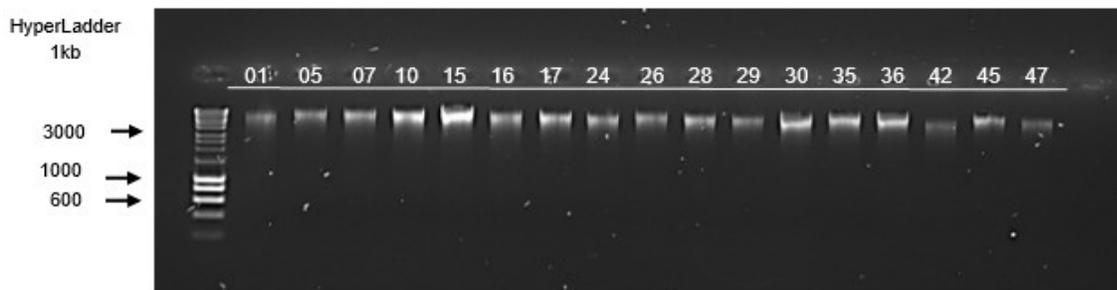


Figura 2-2: Visualización del ADN extraído a partir de aislamientos de *Ceratocystis* sp., colectados de cultivos de cacao. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El carril 1

corresponde al marcador de peso molecular HyperLadder 1kb (Bioline). Carriles 2-17 evidencian la integridad del ADN obtenido de los 17 aislamientos incluidos en este estudio (NCF01, NCF05, NCF07, NCF10, NCF15, NCF16, NCF17, NCF24, NCF26, NCF28, NCF29, NCF30, NCF35, NCF36, NCF42, NCF45 y NCF47).

Tabla 2-6: Parámetros de calidad de las extracciones de ADN de los aislamientos de *Ceratocystis* sp.

Aislamientos	[] ng/μL	Abs260/280	Abs230/260
NCF01	1695.0	2.04	1.64
NCF05	1472.6	2.02	1.51
NCF07	2684.4	2.05	1.91
NCF10	1424.2	2.04	1.85
NCF15	587.6	1.98	1.37
NCF16	2176.3	1.97	1.85
NCF17	2639.3	2.04	1.70
NCF24	2771.0	2.03	1.72
NCF26	2232.5	2.07	1.86
NCF28	370.8	2.00	1.90
NCF29	1016.2	2.01	1.87
NCF30	1130.6	2.05	1.86
NCF35	979.6	2.12	2.06
NCF36	777.3	2.13	2.09
NCF42	1039.9	1.96	1.15
NCF45	997.3	2.03	1.49
NCF47	236.1	1.78	1.51

2.3.2 PCR y secuenciación

Las amplificaciones de PCR fueron exitosas para todos los 17 aislamientos de *Ceratocystis* sp., en las condiciones evaluadas. Los resultados de las reacciones de PCR mostraron fragmentos de tamaños de 600 pb para βT-1, 600 pb para FG1093, 1200 pb para RPBII y aproximadamente 970 pb para MS204 acorde a lo esperado (Figura 2-3).

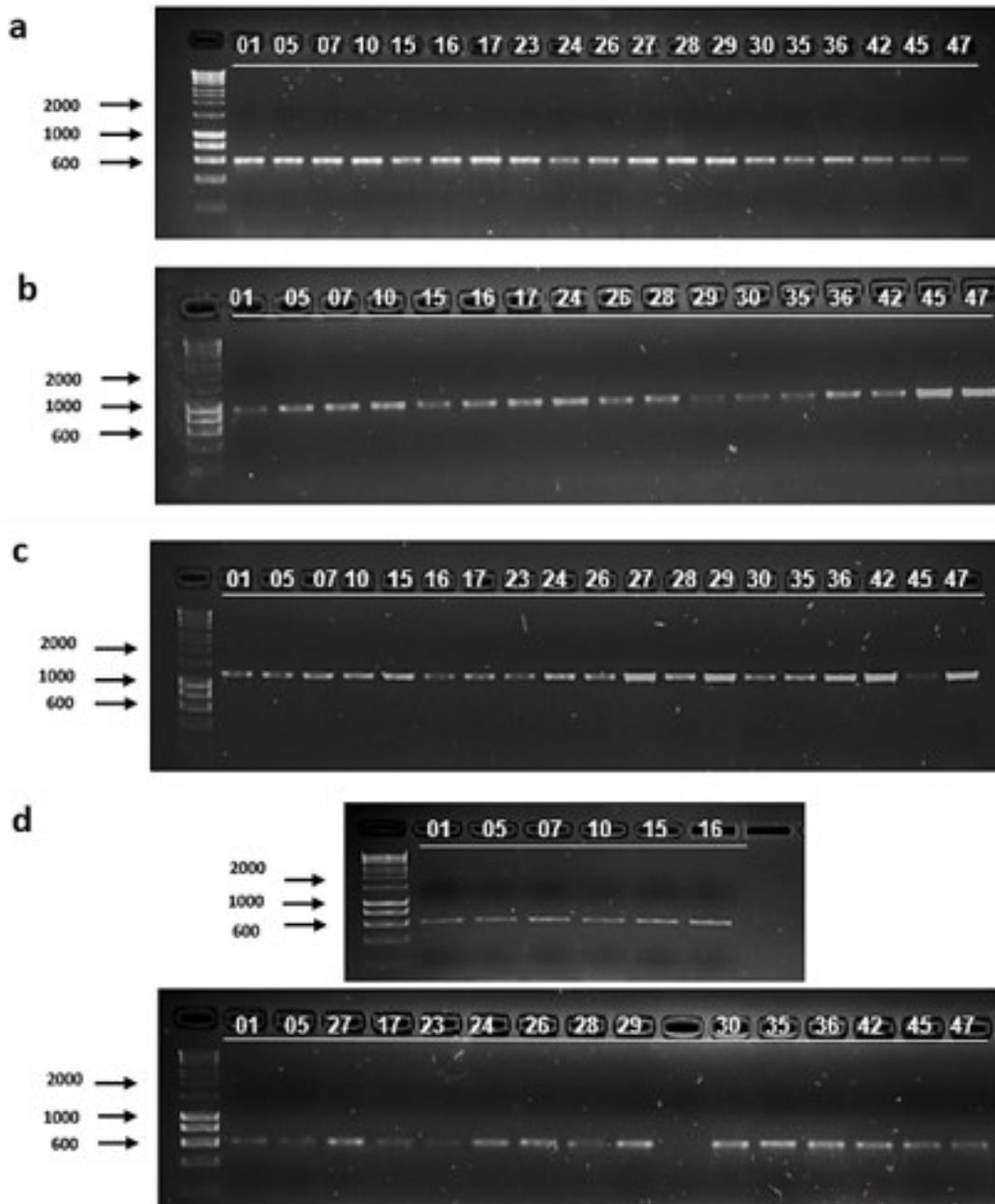


Figura 2-3: Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos amplificados por PCR de los genes β T-1, FG1093, MS204 y RPBII utilizados en este estudio para identificar los 17 aislamientos de *Ceratocystis* sp. **a.** Marcador β T-1 (600pb). **b.** Marcador MS204 (970pb). **c.** Marcador RPBII (1200 pb). **d.** Marcador FG1093 (600 pb). Primer carril corresponde al marcador de peso molecular HyperLadder 1kb. Bioline. Los números representan el código de identificación de los aislamientos de *Ceratocystis* sp. utilizados en el análisis (NCF01, NCF05, NCF07, NCF10, NCF15, NCF16, NCF17, NCF24, NCF26, NCF28, NCF29, NCF30, NCF35, NCF36, NCF42, NCF45 y NCF47).

El análisis BLAST de las secuencias de los aislamientos de *Ceratocystis* obtenidas en este trabajo, comparadas con la información depositada en el NCBI, demostró que la identidad de la mayoría de las cepas colectadas se asoció a *C. cacaofunesta*. De los 17 aislamientos, 12 de ellos mostraron esta identidad con el gen β T-1, 12 aislamientos con el gen MS204, 16 aislamientos con el gen RPBII y 17 aislamientos con el gen FG1093. Los valores de similitud a esta especie variaron de 90.19% a 99.65% para el gen β T-1, de 83.67% a 99.84% para el gen MS204, de 94.89% a 99.91% para el marcador RPBII y de 95.67% a 100% para el gen FG1093. El porcentaje de coincidencia exacta (100%) se observó en los aislamientos NCF30 y NCF36. Se observó, además, similitud de unos pocos aislamientos con las especies *C. fimbriata*, *C. papillata*, *C. polyconidia*, *C. acaciivora* y *C. adelpha*, con un rango de similitud entre 91.85% a 99.84% (Anexo A).

2.3.3 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

El compendio de la información de los marcadores seleccionados dio como resultado una matriz particionada compuesta por 3417 pares de bases. La información aportada por cada marcador empleado en la inferencia filogenética fue de: β T-1 (632pb), MS204 (944pb), FG1093 (635pb) y RPBII (1206pb).

El análisis de alineamiento empleando el programa IQTree sugirió un modelo evolutivo para cada gen. Estos modelos fueron utilizados para el análisis de máxima verosimilitud (ML), β T-1: K2P+R2, **FG1093**: HKY+F+G4, **MS204**: K2P+G4 y **RPBII**: TNe+I. Por otro lado, posterior al análisis de Inferencia Bayesiana (IB) se generó un árbol utilizando 1.000.000 de generaciones, cuatro cadenas independientes y muestreo cada 100 árboles; con una desviación estándar de 0.005 y convergencia de 1.0 (Anexo B).

El análisis filogenético realizado a partir de las secuencias concatenadas de los cuatro loci genómicos basados en los métodos de máxima verosimilitud (ML) e inferencia Bayesiana (IB), proporcionaron árboles con topologías consistentes (Fourie et al., 2014; Van Wyk et al., 2010). Se construyó el árbol filogenético consenso el cual, evidenció la agrupación de las especies en cuatro clados diferentes A, B, C y D muy bien respaldados (Figura 2-4).

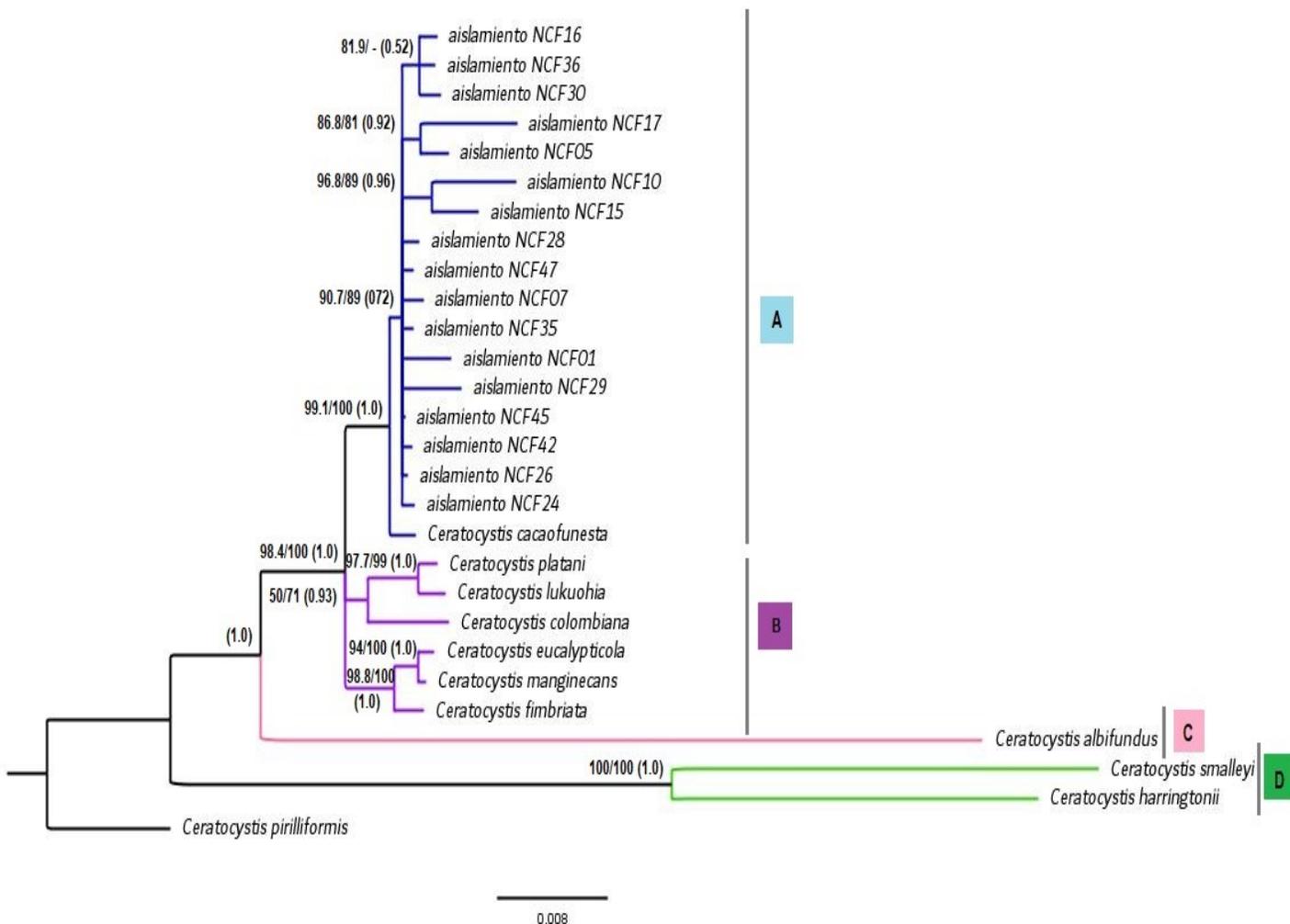


Figura 2-4: Árbol filogenético generado a partir de los métodos ML e IB de un conjunto de datos combinados de los genes β T-1, MS204, RPBII y FG1093, para 11 especies de *Ceratocystis* cuyas secuencias genómicas se encuentran disponibles (*C. albifundus*, *C. colombiana*, *C. cacaofunesta*, *C. fimbriata*, *C. platani*, *C. harringtonii*, *C. smalleyi*, *C. pirilliformis*, *C. manginecans*, *C. eucalypticola*, *C. lukuohia*) y 17 aislamientos del hongo (NCF01, 05, 07, 10, 15, 16, 17, 24, 26, 28, 29, 30, 35, 36, 42, 45, y 47) colectados de distintas regiones productoras de cacao en Colombia. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y PP arriba de las ramas. Valores de arranque <50% se marcan con (-).

La totalidad de los aislamientos de *Ceratocystis* sp., colectados de diferentes regiones productoras de cacao del país (Tolima, Huila, Valle del Cauca y Santander) se ubicaron dentro del clado A junto a *C. cacaofunesta*. El clado A estuvo fuertemente soportado con valores de SH-aLRT/UFBoot y PP de 99.1/100 y 1.0 respectivamente. Dentro de este mismo clado se pudieron observar algunas relaciones dentro de los aislamientos como la identificada entre NCF16 (Huila-suelo), NCF36 (Tolima-cambium) y NCF30 (Tolima-cambium), sin embargo, el soporte de rama fue débilmente respaldado (SH-aLRT/UFBoot y PP de 81.9/- y 0.51); mientras que entre los aislamientos NCF17 (Huila-suelo) y NCF05 (Huila-cambium), así como entre NCF10 (Valle-cambium) y NCF15 (Huila-cambium), los valores de soportes de SH-aLRT/UFBoot y PP presentaron valores favorables (bueno y fuerte), siendo 86.8/81 y 0.92 y 96.8/89 y 0.96 para cada grupo respectivamente.

El clado B estuvo constituido por 6 de las especies de *Ceratocystis* cuyas secuencias genómicas fueron usadas como referencia a partir de la información disponible en las bases de datos (ver tablas 2-4 y 2-5). Estas especies *C. platani*, *C. lukuohia*, *C. colombiana*, *C. eucalypticola*, *C. manginecans* y *C. fimbriata*, son originarias de diferentes regiones geográficas y de diferentes hospedantes. El clado estuvo fuertemente soportado con valores de SH-aLRT/UFBoot y PP de 98.4/100 y 1.0.

Los miembros ubicados dentro de los clados C y D correspondieron a las especies *C. albifundus* y *C. smalleyi* junto a *C. harringtonii* respectivamente. El clado C estuvo sustentado por un valor de probabilidad fuerte (1.0) y, al igual que los demás clados, el D evidenció valores fuertes de soporte de rama para SH-aLRT/UFBoot de 100/100 y 1.0.

Las 11 especies de *Ceratocystis* empleadas como referencia en este estudio (*C. albifundus*, *C. colombiana*, *C. cacaofunesta*, *C. fimbriata*, *C. platani*, *C. harringtonii*, *C. smalleyi*, *C. pirilliformis*, *C. manginecans*, *C. eucalypticola*, *C. lukuohia*), pudieron distinguirse y diferenciarse usando la combinación de los cuatro marcadores moleculares en el análisis filogenético.

2.4 Discusión

El género *Ceratocystis* comprende complejos de especies con un alto grado de similitud morfológica, lo que ha hecho difícil su discriminación. La caracterización molecular y los estudios filogenéticos han permitido esclarecer los procesos taxonómicos y evolutivos de muchos hongos incluyendo *Ceratocystis* y representan una importante alternativa para la adecuada identificación de las distintas especies que conforman el género (Bailey & Meinhardt, 2016). Estas herramientas junto con los métodos tradicionales de caracterización morfológica macro y microscópica han identificado muchas de las especies de *Ceratocystis* responsables de enfermedades en cultivos de interés mundial y han contribuido en su diagnóstico y control. Según Suárez Contreras & Peñaranda Figueredo, (2021) definir la identidad de las cepas es una fase insustituible en la investigación de cualquier agente biológico y la selección de las herramientas y mecanismos de identificación constituyen la confiabilidad de la información. Barnes et al. (2001), enfatizan en la necesidad y en las ventajas del uso de las herramientas moleculares basados en las huellas de ADN en estudios a nivel de población de hongos, ya que podrían facilitar la diferenciación entre cepas o formas crípticas dentro de una misma especie.

El objetivo de este capítulo fue caracterizar a nivel filogenético los aislamientos de *Ceratocystis* sp., provenientes de diferentes regiones productoras de cacao mediante un análisis multilocus. Para ello, la extracción del material genético se realizó siguiendo el protocolo suministrado por el Laboratorio de Cultivos Perennes Sostenibles de ARS (Agricultural Research Service) USDA (US Department of Agriculture). Este método nos permitió recuperar ADN de buena calidad y concentración a partir de todas las muestras. Lo anterior sugiere que, a partir de los resultados obtenidos, esta metodología es altamente eficiente y puede aplicarse en estudios posteriores que contemplen no solo este patógeno sino también otros de interés. Según Robles et al. (2013) y Lurá et al. (2003) este paso constituye una de las tareas más complejas e importantes de los métodos moleculares en el proceso de identificación de hongos, en los que se ve involucrada la composición de la pared celular (proteínas, glicoproteínas, lípidos, hidratos de carbono, quitina y iones inorgánicos: calcio, fosforo y magnesio); que en muchos casos dificulta la obtención de una adecuada integridad y concentración del ADN.

Las regiones génicas seleccionadas en este estudio para la identificación molecular a nivel de género y especie de los aislamientos de *Ceratocystis* sp., se encuentran altamente conservados en la mayoría de los hongos y representan una opción para la identificación de muchas especies de *Ceratocystis* aún sin describir. Por ejemplo, el gen RPBII codifica para la segunda subunidad mayor de la RNA polimerasa II y tiene como función transcribir el ARN mensajero; su importancia radica en que se encuentra en una sola copia dentro del genoma de los ascomicetos y posee una tasa evolutiva relativamente baja, pero útil para ser usada en taxonomía. RPBII ha demostrado tener alto nivel informativo como marcador taxonómico y filogenético, permitiendo diferenciar grupos fúngicos y discriminar especies dentro de complejos (Gaviria et al., 2013; Liu et al., 1999).

Por su parte, la región MS204 pertenece a un gran número de proteínas altamente conservadas de unión a nucleótidos de guanina que se encuentran en todos los eucariotas y están implicadas en una variedad de funciones que van desde la transducción de señales y la regulación de la transcripción, hasta el control del ciclo celular y la apoptosis. Según Walker et al. (2012) este marcador proporciona una señal altamente informativa en análisis multilocus en estudios de caracterización filogenética y se ha utilizado en la delimitación de especies fúngicas principalmente en ascomicetos. De igual manera, el gen FG1093 es homólogo en eucariotas y hace parte del grupo de proteínas (L37) que conforman la subunidad grande del ribosoma las cuales, sirven para organizar y estabilizar la estructura del ARNr y están involucradas en las síntesis de proteínas. Este marcador ha demostrado su potencial para discriminar especies estrechamente relacionadas que difícilmente pueden ser definidas por otras regiones génicas; está menos sujeto a homoplasia y ha demostrado alto nivel de informatividad, lo que lo hace atractivo para ser usado en estudios filogenéticos a nivel de especie (Fourie et al., 2014; Walker et al., 2012).

Los genes β -Tubulina son miembros de pequeñas familias multigénicas en muchos organismos y se encuentran dispersos a lo largo del genoma. Subunidades de estas proteínas de una sola copia, constituyen los microtúbulos los cuales, son esenciales para muchos procesos celulares como determinar la forma celular y el movimiento de muchos organelos y vesículas. A nivel molecular, la secuencia del gen β -Tubulina han sido

ampliamente utilizada como marcador filogenético en estudios uni o multilocus para la clasificación y discriminación de muchos complejos de especies como los identificados en el género *Ceratocystis*; además han demostrado tener 3.5 veces más información filogenética que otros marcadores como SSU ARNr comúnmente utilizado (Huang et al., 2009).

Todos los aislamientos de *Ceratocystis* sp.; utilizados en este estudio, pudieron ser identificados a nivel de género y especie a partir de los cuatro marcadores moleculares empleados. La mayoría de las secuencias coincidieron en identidad con *C. cacaofunesta*, agente causal de la enfermedad mal de machete del cacao, identificado por J. B. Engelbrecht & Harrington (2005). El gen FG1093 permitió relacionar un mayor número de aislamientos con esta especie seguido de RPBII, MS204 y β T-1, respectivamente. Este análisis permitió establecer similitudes a nivel de secuencias con otras especies como *C. fimbriata*, *C. papillata*, *C. polyconidia*, *C. acaciivora* y *C. adelpha*. Todas estas especies incluyendo a *C. cacaofunesta* pertenecen al complejo *C. fimbriata* sensu lato (s.l.) y en algunos casos, comparten características morfológicas (Bailey & Meinhardt, 2016; Brawner et al., 2015; Heath et al., 2009). Ejemplo de lo anterior, es lo reportado por Fourie et al. (2014), donde constata que la especie *C. adelpha* es la responsable de la marchitez observada en árboles de cacao en Ecuador y confirma además, que esta especie es considerada hermana de *C. cacaofunesta*, las cuales, pueden distinguirse mediante el uso de herramientas moleculares robustas (Crous et al., 2015).

La caracterización molecular y los estudios a nivel filogenético basados en comparaciones de secuencias de ADN ha permitido dar claridad los últimos años a la taxonomía del género *Ceratocystis* y ha contribuido en la delimitación y en la identificación de nuevas especies (de Beer et al., 2014; Marin & Wingfield, 2006). Inicialmente estos análisis se basaron en los datos de secuencias de la región ITS, conocido como el código de barras para la identificación de especies fúngicas. Sin embargo, según Kanzi et al. (2020), este marcador cuando se usa solo, no se considera confiable para la delimitación de especies de *Ceratocystis*. Aunque esta región ha sido utilizada en estudios filogenéticos de especies de *Ceratocystis*, Fourie et al. (2014), hallaron múltiples formas ITS en ciertas especies de *Ceratocystis* como *C. manginecans*, por lo que su uso ya no es tan constante. Harrington et al. (2014) reportaron que las

especies pertenecientes al complejo *C. fimbriata* pueden tener dos o más haplotipos ITS y que gran parte de la variación intragenómica e intraespecífica observada entre las secuencias de esa región, se debe a la presencia de inserciones y deleciones y a repeticiones de mononucleótidos. Los autores mencionan que alineaciones ambiguas y el alto grado de homoplasia, son particularmente problemas del uso de la región ITS para delimitar especies de *Ceratocystis* dentro de los complejos y, además, recomiendan utilizar otros marcadores para la identificación de nuevas especies. Lo anterior, también fue identificado por O'Donnell & Cigelnik (1997), en hongos del género *Fusarium*; por tal razón, el marcador no fue incluido en la investigación.

De la misma manera, los marcadores β T-1 y EF-1 α también comúnmente utilizados, según Wyk et al. (2011) al analizarse de manera individual, han mostrado poca o ninguna variación entre algunas especies de *Ceratocystis* como *C. mangicola* y *C. mangivora*. El valor filogenético de estas regiones generalmente utilizadas en combinación con ITS no permite separar entre especies crípticas. Lo anterior sugiere la necesidad de búsqueda de nuevas regiones genéticas mucho más conservadas, que puedan usarse como marcadores taxonómicos para identificar especies a partir de estudios de inferencia filogenética. El uso de secuencias moleculares con un relativo grado de conservación ha sido ampliamente utilizado para establecer relaciones filogenéticas entre microorganismos a niveles específicos, permitiendo incluso la identificación de nuevos taxones, de especies y/o subespecies de hongos de una manera más rápida y efectiva. Según Fourie et al. (2014), teniendo en cuenta el grado de similitud entre especies de *Ceratocystis* y su difícil diferenciación, se ha contemplado el uso de regiones génicas conservadas como alternativa para respaldar los límites de especies en este género.

El análisis multigenes representa una alternativa esencial para la distinción entre complejos de especies de hongos como *Colletotrichum*, *Diplodia* y *Lasiodiplodia*, *Fusarium*, *Mycosphaerella*, *Phomopsis* y *Ceratocystis* (Van Wyk et al., 2010), gracias a la especificidad y estabilidad de la información contenida en estos marcadores genéticos, la inferencia de filogenética y filogenómica ofrece resultados altamente confiables (Oliveira et al., 2015).

El análisis simultáneo de varios loci ha sido utilizado por distintos autores con el objeto de identificar y caracterizar nuevas especies de *Ceratocystis* y de esclarecer la identidad de

aquellas clasificadas como única especie *C. fimbriata*. Lo anterior ha sido evidenciado por diversos estudios; como el desarrollado por Barnes et al. (2003), quienes utilizando las regiones ITS1 e ITS2, y el gen 5.8S del operón de ARN ribosomal en la caracterización de aislamientos relacionados con *C. pirilliformis*, un patógeno de Eucalipto, lograron diferenciar los aislamientos de especies como *C. fimbriata* y *C. albifundus*.

Similarmente, estudios realizados por Obaid et al. (2007), utilizando secuencias de las regiones ITS, β T-1 y EF-1 α , encontraron una nueva especie que afecta cultivos de mango llamada *C. manginecans*, la cual se encontró alejada del complejo *C. fimbriata*. Por otra parte, de Beer et al. (2014), empleando múltiples marcadores genéticos tales como 60S, LSU, MCM7 y datos morfológicos y ecológicos, revelaron siete linajes bien sustentados en *Ceratocystis* (s.l.). Estos linajes fueron tratados como géneros distintos y los grupos de especies establecidos en cada uno de ellos, también fueron caracterizados a nivel morfológico para su diferenciación. El análisis también permitió identificar dos linajes y géneros nuevos descritos como *Davidsoniella* y *Huntiella* y excluir del género *Ceratocystis* varias especies antes allí ubicadas, al agruparse en distintos linajes.

En estudios locales, Marin et al. (2003), determinaron mediante la combinación de secuencias de los genes β T-1, ITS y Mat-2 HMG, que aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* provenientes de cultivos de café de Colombia se ubican en dos principales linajes filogenéticos. Van Wyk et al. (2010), confirmaron los hallazgos de Marín y colaboradores mediante el uso de los marcadores β T-1, ITS y EF-1 α , respaldando la conclusión de que aislamientos de *C. fimbriata* de Colombia colectados de cultivos de cítricos, cacao y café se clasifican en dos grupos, los cuales, representan los nuevos taxones que son *C. colombiana* y *C. papillata*; apoyados además, en datos morfológicos y de patogenicidad. Por último, Rodas et al. (2008), identificaron la especie *C. neglecta* asociándola a signos y síntomas observados en árboles de eucalipto en Colombia, la identificación fue lograda gracias a la comparación de secuencias de ADN de las regiones ITS1 e ITS2, y el gen 5.8S. En la actualidad *C. neglecta* representa una nueva especie del género *Ceratocystis* ubicada en un único linaje diferente a los reportados por previos autores.

En el presente estudio, el análisis filogenético se realizó incluyendo 11 especies de *Ceratocystis* anteriormente descritas y los marcadores utilizados fueron empleados por Liu et al. (2018) y Fourie et al. (2014). Sus reportes demostraron la utilidad y el poder de discriminación de estos genes en la identificación precisa de especies del género *Ceratocystis*. Fourie et al. (2014) evidenciaron la importancia del análisis simultáneo de dichos marcadores en la identidad de la mayoría de las especies de *Ceratocystis*; de 15 especies analizadas, 11 de ellas, fueron identificadas con buen soporte estadístico (>70 BS y >95 BI). El estudio, además, reveló que la mejor combinación para una delimitación efectiva entre especies consistió en el análisis de los genes MS204, RPBII y β T-1. La resolución de este conjunto de marcadores pudo incrementarse al anexar una región adicional representada por el gen FG1093, logrando la discriminación de *C. eucalypticola* y *C. curvata* como especies distintas, que no había sido posible en estudios anteriores. El análisis de los marcadores de manera individual también determinó que los tres loci MS204, FG1093 y RPBII contenían el mayor número de sitios variables y que MS204 y RPBII aportan más información que otras regiones utilizadas con mayor frecuencia como EF-1 α . Todas las especies de *Ceratocystis* utilizadas en esta investigación, también pudieron ser delimitadas con la combinación de las secuencias de los cuatro marcadores moleculares.

Mientras tanto, Liu et al. (2018), realizaron un análisis filogenético incluyendo los datos combinados de cinco genes entre los cuales se incluyeron MS204, RPBII y β T-1. En el estudio descubrieron la especie *C. changhui* que causa la pudrición negra en los cormos de *Colocasia esculenta* en dos provincias de China. Los resultados de este estudio también permitieron diferenciar esta especie de *C. fimbriata* (s.l.) y reorganizar su agrupación según su distribución geográfica ya que esta especie es morfológica y filogenéticamente diferente de las especies estrechamente relacionadas en el clado asiático australiano (AAC), al cual se vincularon inicialmente.

Los resultados de la caracterización filogenética en la presente investigación basados en los métodos de máxima verosimilitud (ML) e inferencia Bayesiana (IB), revelaron una clara agrupación y cercanía de todos los aislamientos de *Ceratocystis* provenientes de diferentes regiones productoras de cacao a la especie *C. cacaofunesta*, con valores de rama fuertemente soportados. Al momento de revisar las relaciones obtenidas dentro de

este clado se evidenciaron tres subgrupos de taxones hermanos, dos de los cuales, se agruparon con base a la región de origen (Huila) y al tejido de procedencia (cambium), sin embargo, el grupo restante, no evidenció coincidencia alguna y presentó bajo soporte estadístico por los dos métodos empleados. Lo anterior puede deberse al uso de fragmentos de ADN muy conservados o a la alta similitud de las secuencias entre sí, lo que impide su diferenciación. De Moraes Russo y Selvatti (2018), mencionan, además, que una prueba bootstrap baja, incluso menor de 50% no significa que la relación o el clado sea falso, solo que es débilmente apoyado por los datos analizados.

C. cacaofunesta fue descrito por primera vez por C. J. B. Engelbrecht y Harrington (2005), como el agente causal de la marchitez en cultivos de cacao, a partir de datos filogenéticos utilizando el factor de transcripción (ITS)-rDNA y pruebas de interesterilidad (incompatibilidad sexual), mediante las cuales, lograron diferenciar esta especie del complejo *C. fimbriata* (s.l.), observando mínimas diferencias morfológicas. *C. cacaofunesta* ha sido identificado únicamente en regiones del Caribe, América Central y del Sur, evidenciando una alta diversidad a nivel genético (Ferreira et al., 2010).

C. J. Engelbrecht et al. (2007), reportaron que la variación genética observada en aislamientos de *C. cacaofunesta* divide a la especie en dos poblaciones principales, Ecuador y la región del alto Amazonas de Brasil, donde todos son igualmente patógenos de cacao. En el estudio de Fourie et al. (2014), los aislamientos de *C. cacaofunesta* utilizados se diferenciaron y agruparon en dos distintos clados utilizando las secuencias combinadas de los genes MS204, RPBII, β T-1, y FG1093. Lo mismo fue evidenciado por C. J. B. Engelbrecht y Harrington (2005) y Ferreira et al. (2010), donde los datos de secuencias ITS y estudios de apareamiento sugirieron que existían dos linajes (Ecuador/Brasil-Costa Rica) para aislamientos suramericanos de *Ceratocystis*. Sin embargo, en este estudio, todos los aislamientos evaluados conformaron un único clado (A) con *C. cacaofunesta*.

Las especies *C. platani*, *C. lukuohia*, *C. colombiana*, *C. eucalypticola*, *C. manginecans* y *C. fimbriata* agrupadas en el clado B, hacen parte del complejo *C. fimbriata* (s.l.), uno de los más grandes que comprende el género *Ceratocystis* con muchas especies crípticas aún sin describir (Bailey & Meinhardt, 2016). Estas especies son morfológicamente similares, pero han podido diferenciarse a través de inferencias filogenéticas utilizando

secuencias de multigenes como se observó en este trabajo. Estas especies, además, incluyendo a *C. cacaofunesta* con quien son parientes cercanos (soporte estadístico fuerte), hacen parte del clado latinoamericano (LAC) donde fueron organizados según su distribución geográfica y especialización de hospedero, característica especial de *C. cacaofunesta* y *C. platani* (Oliveira et al., 2015; de Beer et al., 2014; Baker et al., 2003). Johnson et al. (2005), sugirieron que la cantidad de especies dentro de este complejo ubicadas en América Latina, pueden constituir un centro de diversidad para este grupo.

En el análisis realizado el clado C estuvo conformado por una única especie *C. albifundus* agente causal de la marchitez observada en árboles de *A. mearnsii* en las regiones de Tanzania, Kenia y Sudáfrica (Heath et al., 2009). Esta especie hace parte también del complejo *C. fimbriata* (s.l.) (Tarigan et al., 2011), sin embargo, teniendo en cuenta su origen, región de incidencia, y a su clara definición de otras especies de este grupo, por características morfológicas y análisis de secuencias de ADN (Wingfield & Wingfield, 2010), ha sido ubicada en el clado africano (AFC) y conforma un grupo filogenéticamente separado como se observó en nuestros resultados, sustentados por un valor de probabilidad fuerte (1.0). *C. albifundus* se reconoce por no presentar especialización en hospedante como otras especies de este complejo (Barnes et al., 2018; Van Wyk et al., 2010).

El último de los clados (D) incluyó las especies *C. smalleyi* y *C. harringtonii/ populicola*, responsables de ocasionar la muerte de árboles de *Populus* spp. y *Carya cordiformis*. Estas especies pertenecen al complejo *C. fimbriata* (s.l.) y al clado norteamericano (NAC), según su distribución geográfica (Harrington, 2013). Johnson et al. (2005), revelaron que pueden diferenciarse de las especies que integran los demás clados mediante datos morfológicos e inferencias filogenéticas, las cuales permitieron definir su ubicación en un clado diferente como lo evidenciaron nuestros resultados con valores de rama fuertemente soportados.

En este estudio, la reconstrucción filogenética permitió establecer que el pariente más cercano de los aislamientos de *Ceratocystis* sp. de las distintas regiones productoras de cacao en Colombia es *C. cacaofunesta*, agente causal de la enfermedad mal de machete en este cultivo, reportado en Latinoamérica. La topología basada en los cuatro loci mostraron claramente la identidad de los aislamientos de *Ceratocystis* evaluados,

diferenciándolos de las demás especies que conforman el complejo de *C. fimbriata* sensu lato (s.l.). Los resultados de esta investigación representan el primer reporte sólido de la Identidad del patógeno responsable de la enfermedad en el país, nunca antes descrita.

3. Discusión general

En el presente trabajo, se pudo establecer una colección de aislamientos de *Ceratocystis* sp. a partir de muestras de tejido y suelo colectados de cuatro departamentos y nueve municipios productores de cacao en Colombia. Las muestras de suelo evidenciaron la mayor tasa de recuperación del hongo lo que constituye una alternativa práctica para el aislamiento del patógeno, teniendo en cuenta que generalmente el muestreo realizado para tal fin es de carácter destructivo. Holland et al. (2019) y C. J. B. Engelbrecht y Harrington (2005), reportaron que en algunos casos la fuente de infección es el suelo infestado de aleuroconidias (clamidosporas) producidas por el hongo o liberadas en tierra en el excremento del insecto *Xyleborus*, las cuales, facilitan allí su supervivencia.

En la caracterización de los aislamientos de *Ceratocystis* sp., nuestros resultados mostraron diferencias a nivel macro y microscópicos que evidencian la existencia de variabilidad morfológica entre las cepas, incluso, aquellas procedentes de la misma región, evaluadas bajo iguales condiciones. No se pudo identificar ninguna característica específica dentro del grupo de aislados que defina morfológicamente al hongo *Ceratocystis* en el cultivo de cacao, diferente a lo ya descrito para *C. fimbriata* (Bailey & Meinhardt, 2016; Firmino, 2011). La variabilidad identificada en las especies de *Ceratocystis* ha llevado a que los estudios basados en sus características morfológicas sean utilizados como información complementaria debido a la similitud encontrada entre las especies que conforman los distintos complejos, lo que en muchos casos dificulta su identificación y delimitación. Los resultados de esta investigación representan el primer reporte de la diversidad morfológica que presenta *Ceratocystis* en este sistema productivo.

Dada la importancia del uso de herramientas moleculares en la búsqueda de nuevas especies de *Ceratocystis*, la identidad del agente causal del mal de machete en cacao fue verificada mediante la utilización de cuatro regiones génicas altamente conservadas reportadas por Liu et al. (2018) y Fourie et al. (2014), las cuales, permitieron identificar todos los aislamientos de *Ceratocystis* evaluados a nivel de género y especie con un alto

grado de fiabilidad. Secuencias de estos mismos loci genómicos, fueron empleadas de manera combinada en un análisis multilocus para la caracterización filogenética de los aislamientos utilizados en este estudio. Los resultados de este trabajo mostraron la similitud de todos los aislamientos estudiados con la especie *C. cacaofunesta*; información que fue consistente con el análisis filogenético el cual, evidenció resultados reproducibles por ambos métodos utilizados, donde los aislamientos de *Ceratocystis* procedentes de cultivos de cacao en Colombia residieron en un único grupo con dicha especie. Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron caracterizar y esclarecer con pruebas sólidas la identidad del patógeno dentro del complejo *C. fimbriata* (s.l.), asociando a *C. cacaofunesta* como la especie responsable de la enfermedad mal de machete o marchitez del cacao (C. J. Engelbrecht et al., 2007; C. J. B. Engelbrecht & Harrington, 2005); estos resultados constituyeron, además, el primer reporte confirmatorio de la identidad del patógeno, por primera vez en el país.

Los aislamientos que mostraron cercanía a nivel genético, no lo indicaron precisamente para variables morfológicas, lo que nos permite concluir que también existe diversidad genética entre la población de *Ceratocystis* proveniente de cacao, como lo identificaron Marin et al. (2003), en cepas colectadas de regiones cafeteras colombianas. Nuestras observaciones y los aportes de otros autores como Barnes et al. (2001); Marin et al. (2003) y Van Wyk et al. (2010), evidencian la existencia de diversidad entre la población de *Ceratocystis* presente en el país.

En Colombia, las enfermedades se consideran las principales limitantes bióticas del cultivo de cacao, entre las que se destacan la Moniliasis, Escoba de Bruja y Mazorca Negra. Sin embargo, han existido pocos esfuerzos para llevar a cabo investigaciones sobre otros patógenos como *Ceratocystis* sp., y *Rosellinia* spp., causantes de pudriciones radicales y marchitamiento vascular, así como de estrategias para su manejo, por ser considerados de difícil control, a pesar de su incidencia en los últimos años y al impacto negativo que ejercen sobre la productividad de este cultivo. Con base en esto, el aporte de nuestro trabajo representa el primer estudio profundo de caracterización e identificación del agente causal de la enfermedad mal de machete del cacao en Colombia que contribuye a la generación de nuevo conocimiento sobre aspectos morfológicos y

genéticos del patógeno *C. cacaofunesta*, nunca antes descrito en este sistema productivo.

La información proporcionada en este estudio servirá como base para el desarrollo y validación de nuevas técnicas de monitoreo y diagnóstico alternativos al control genético utilizado actualmente, que permitan la detección temprana del patógeno *C. cacaofunesta* con una mayor sensibilidad y especificidad. Estas tecnologías serán de gran ayuda para la toma de decisiones futuras y oportunas relacionadas con el control de este fitopatógeno y el manejo agronómico en el momento y lugar adecuado (vivero y campo).

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Los aislamientos de *Ceratocystis* sp. utilizados en este estudio fueron recuperados a partir de suelo y material leñoso, los dos sustratos, evidenciaron ser favorables para el aislamiento del patógeno mediante el método empleado.
- La caracterización morfológica permitió identificar alta variabilidad entre aislamientos de *Ceratocystis* sp. provenientes de cacao. Se observaron características morfológicas microscópicas diferenciales (tamaño de peritecios, endoconidias e hifa ostiolar) a lo reportado para la especie *C. fimbriata* considerada hasta ahora como el agente causal de la enfermedad.
- El uso de técnicas de caracterización molecular y el análisis multilocus permitió identificar a partir de todos los aislamientos colectados de las distintas regiones productoras de cacao del país, a *Ceratocystis cacaofunesta* como el agente causal de la enfermedad mal de machete en cacao en Colombia.
- Las regiones génicas β T-1, RPBII, MS204 y FG1093 mostraron gran utilidad en la identificación del hongo a nivel de género y especie, y reafirmaron su importancia como marcadores moleculares en estudios filogenéticos para este género fúngico;

además que, pueden ser candidatos como marcadores moleculares para ser utilizados en diagnóstico para la identificación del patógeno a nivel de especie.

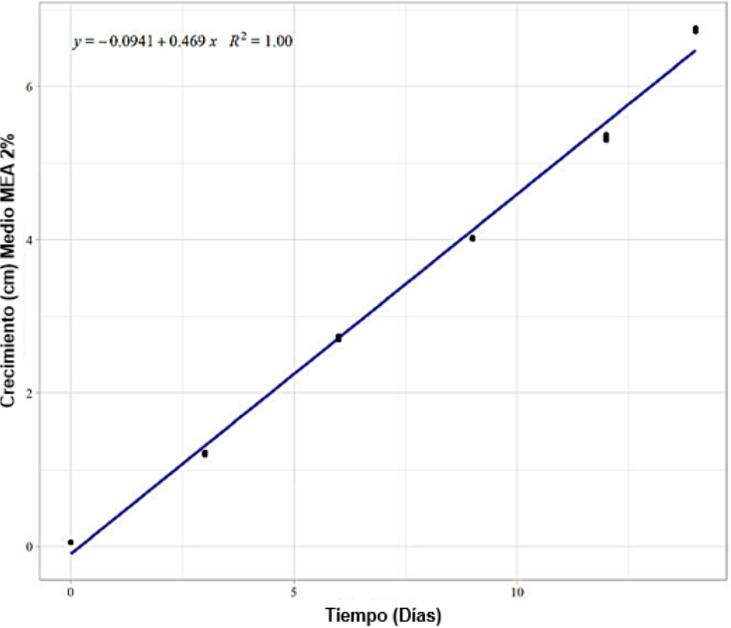
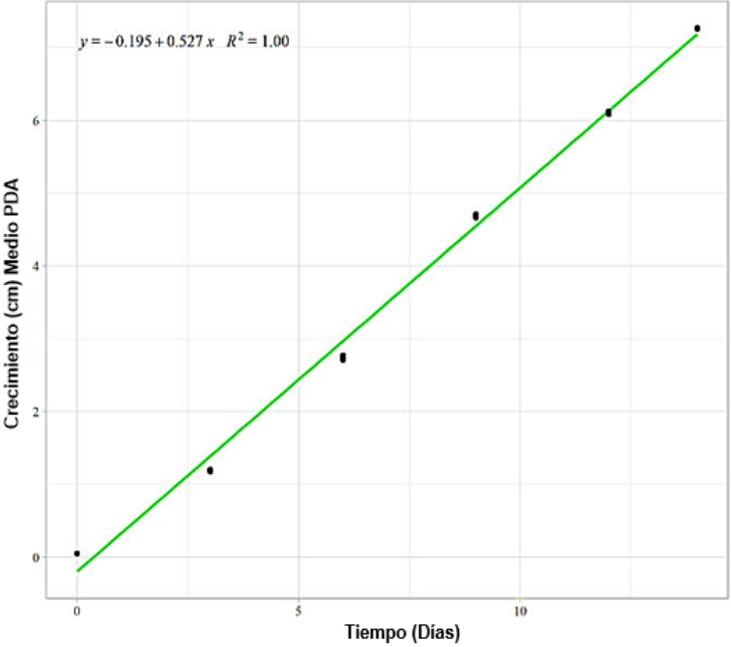
- Ninguno de los agrupamientos observados en este análisis relacionó los aislamientos de *Ceratocystis* con el origen geográfico ni el material de procedencia.
- Los resultados generados en este estudio serán utilizados como insumo en la validación e implementación de técnicas de diagnóstico sensibles y específicas para la detección temprana de *C. cacaofunesta*, con el fin de garantizar la sanidad de los cultivos desde etapas de invernadero hasta en campo y limitar la diseminación de la enfermedad.

4.2 Recomendaciones

Ampliar la colección de aislamientos incluyendo de otras zonas productoras y de otras regiones fuera del país que puedan asociarse con la enfermedad, con el fin de comprender la dinámica poblacional de este patógeno y sus posibles relaciones, que nos permitan generar herramientas para el control de la enfermedad.

A partir del conocimiento sobre el agente causal del mal de machete generado en este estudio, es necesario realizar pruebas de patogenicidad de los aislamientos de *C. cacaofunesta* en cultivares de cacao siguiendo los postulados de Koch, con el fin de establecer la especificidad sobre el hospedante y generar información valiosa para asistir programas de mejoramiento dirigidos a la selección de materiales resistentes a la enfermedad.

A. ANEXO: Modelo de crecimiento polinómico (lineal) registrado en los medios PDA y MEA 2% para los aislamientos de *Ceratocystis* sp. evaluados.



B.ANEXO: Identificación molecular a nivel de especie de los aislamientos de *Ceratocystis* utilizados en este estudio mediante secuenciación Sanger. Identificación molecular asignada y porcentaje de similitud según las regiones génicas β T-1, MS204, RPBI y FG1093.

Aislamiento	Región	Origen	Identidad molecular asignada β T-1	% de identificación BLAST	Valor E de β T-1	Identidad molecular asignada MS204	% de identificación BLAST	Valor E de MS204
NCF01	Tolima	Cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	95.16	0.0	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. adelpha</i>	99.29	0.0
NCF05	Huila	Cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	98.29	0.0	<i>C. adelpha</i>	99.15	0.0
NCF07	Santander	Cambium	<i>C. fimbriata</i>	97.40	0.0	<i>C. adelpha</i>	95.93	0.0
NCF10	Valle	cambium	<i>C. fimbriata</i>	99.00	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	89.68	0.0
NCF15	Huila	Cambium	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. papillata</i>	95.93	0.0	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. adelpha</i>	94.63	0.0
NCF16	Huila	suelo	<i>C. cacaofunesta</i>	90.19	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.84	0.0
NCF17	Huila	suelo	<i>C. fimbriata</i>	95.15	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	83.67	8E-157
NCF24	Tolima	suelo	<i>C. fimbriata</i>	96.96	0.0	<i>C. adelpha</i>	99.43	0.0
NCF26	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. fimbriata</i>	97.76	0.0	<i>C. adelpha</i>	99.41	0.0
NCF28	Tolima	suelo	<i>C. fimbriata</i>	96.13	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.17	0.0
NCF29	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. papillata</i>	92.13	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	98.07	0.0
NCF30	Tolima	cambium	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. papillata</i>	95.30	2,00E-166	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. adelpha</i>	99.53	0.0
NCF35	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i>	99.65	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	97.54	0.0
NCF36	Tolima	cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	93.57	0.0	<i>C. adelpha</i>	98.00	0.0
NCF42	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i>	98.25	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.65	0.0
NCF45	Tolima	cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	98.51	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.84	0.0
NCF47	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. fimbriata</i>	99.44	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.06	0.0

Aislamiento	Región	Origen	Identidad molecular asignada RPBII	% de identificación BLAST	Valor E RPBII	Identidad molecular asignada FG1093	% de identificación BLAST	Valor E de FG1093
NCF01	Tolima	Cambium	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. acaciivora</i>	94.89	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.62	0.0
NCF05	Huila	Cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	99.45	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	95.67	0.0
NCF07	Santander	Cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	99.29	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.24	0.0
NCF10	Valle	cambium	<i>C. polyconidia</i> <i>C. acaciivora</i>	91.85	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	98.19	0.0
NCF15	Huila	Cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	95.06	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	97.30	0.0
NCF16	Huila	suelo	<i>C. cacaofunesta</i>	98.98	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	98.65	0.0
NCF17	Huila	suelo	<i>C. cacaofunesta</i>	99.00	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.04	0.0
NCF24	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i>	98.94	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.23	0.0
NCF26	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. polyconidia</i>	99.56	0.0	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. adelpha</i>	99.81	0.0
NCF28	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i>	99.73	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.43	0.0
NCF29	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i>	95.18	0.0	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. adelpha</i>	99.23	0.0
NCF30	Tolima	cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	99.29	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	100	0.0
NCF35	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. polyconidia</i>	98.76	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.81	0.0
NCF36	Tolima	cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	98.41	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	100	0.0
NCF42	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i>	96.30	0.0	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. adelpha</i>	99.41	0.0
NCF45	Tolima	cambium	<i>C. cacaofunesta</i>	99.47	0.0	<i>C. cacaofunesta</i>	99.61	0.0
NCF47	Tolima	suelo	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. polyconidia</i>	99.91	0.0	<i>C. cacaofunesta</i> <i>C. adelpha</i>	95.67	0.0

C.ANEXO: Valores de los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de Inferencia Bayesiana (IB) para el árbol filogenético a partir de los cuatro loci genómicos. PSRF+ corresponde al valor de convergencia.

Parameter	Mean	Variance	95% HPD Interval		Median	min ESS*	avg ESS	PSRF+
			Lower	Upper				
TL	0.264096	0.000147	0.241278	0.288455	0.263806	5119.98	5366.61	1.000
r(A->C)	0.093596	0.000125	0.071949	0.115448	0.093246	1905.76	1946.27	1.000
r(A->G)	0.284778	0.000399	0.246015	0.324335	0.284369	1185.81	1304.92	1.000
r(A->T)	0.091159	0.000141	0.068398	0.115026	0.090888	1886.27	1896.20	1.000
r(C->G)	0.075434	0.000111	0.054725	0.095770	0.075168	1752.74	1821.01	1.000
r(C->T)	0.371855	0.000422	0.329125	0.409462	0.371758	1446.37	1459.40	1.000
r(G->T)	0.083179	0.000139	0.061769	0.107754	0.082441	1874.48	2017.38	1.000
pi(A)	0.254870	0.000052	0.240344	0.268449	0.254862	1433.63	1668.62	1.000
pi(C)	0.272221	0.000052	0.258191	0.286143	0.272188	1791.45	1917.23	1.000
pi(G)	0.222237	0.000045	0.209473	0.235573	0.222171	1650.20	1702.58	1.000
pi(T)	0.250672	0.000048	0.236705	0.264026	0.250531	1724.15	1725.73	1.000
alpha	1.090026	0.403795	0.348751	2.346199	0.923854	509.39	676.39	1.000
pinvar	0.281499	0.016300	0.024549	0.490277	0.292917	452.01	530.62	1.001

Bibliografía

- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. In Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics, Vol. 2, Issue 4, pp. 433–459. <https://doi.org/10.1002/wics.101>.
- Alvares Vivas, A. (2011). Identificación, conservación y conformación de un banco de hongos filamentosos aislados previamente de los páramos de cruz verde y guasca. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana-Sede Bogotá.
- Arbeláez Giraldo, E. (1957). La llaga macana del tronco del cacao. *Acta Agronómica*, 7(1).71-103. https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/49070.
- Ayres, L. V. (2014). Diversidade genética de *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. no Sul da Bahia. Tesis de Maestría, Universidad Federal de Viçosa (UFV).
- Bailey, B. A., & Meinhardt, L. W. (2016). Cacao diseases a history of old enemies and new encounters. Springer International Publishing Switzerland. doi 10.1007/978-3-319-24789-2_1.
- Barba Donoso, C. (1961). Estudio morfológico y pruebas de patogenicidad de varias cepas de *Ceratocystis fimbriata* ell. & halst. Tesis de Maestría, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA.
- Baker, C. J., Harrington, T. C., Krauss, U., & Alfenas, A. C. (2003). Ecology and population biology genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, 93:1274-1284.
- Barnes, I., Fourie, A., Wingfield, M. J., Harrington, T. C., McNew, D. L., Sugiyama, L. S., Luiz, B. C., Heller, W. P., & Keith, L. M. (2018). New *Ceratocystis* species associated with rapid death of *Metrosideros polymorpha* in Hawaii. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 154–181. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.07>.
- Barnes, I., Gaur, A., Burgess, T., Roux, J., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2001). Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Plant Pathology*, 2(6), 319–325. <https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00080.x>.
- Barnes, I., Roux, J., Wingfield, B. D., Dudzinski, M. J., Old, K. M., & Wingfield, M. J. (2003). *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. *Micología*, 95(5), 865–871. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833046>.

BLAST® Command Line Applications User Manual.
<https://scicomp.ethz.ch/public/manual/BLAST/BLAST.pdf>.

Bejarano, C. A. P., Kafuri, L. A., & García, J. M. P. (2021). Identification of *Phytophthora* spp. isolates obtained from cocoa crops in Antioquia, Colombia. *Acta agronómica*, 70(1). <https://doi.org/10.15446/acag.v70n1.70619>

Brawner, J., Japarudin, Y., Lapammu, M., Rauf, R., Boden, D., & Wingfield, M. J. (2015). Evaluating the inheritance of *Ceratocystis acaciivora* symptom expression in a diverse *Acacia mangium* breeding population. *Southern Forests*, 77(1), 83–90. <https://doi.org/10.2989/20702620.2015.1007412>

Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>

Castrejón-Antonio, J. E., Montesinos-Matías, R., Acevedo-Reyes, N., Tamez-Guerra, P., Ayala-Zermeño, M. Á., Berlanga-Padi-Illa, A. M. y Arredondo-Bernal, H. C. (2017). Especies de *Xyleborus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) asociados a huertos de aguacate en Colima, México. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 33(1), 146-150

Ciencia y tecnología al servicio del sector cacaotero. (2016). http://www.fhia.org.hn/descargas/proyecto_procacao/infocacao/InfoCacao_No11_Dic_2016.pdf.

Cordero Vega, M. J. (2017). Caracterización morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de *Ceratocystis* spp. provenientes de seis zonas cafetaleras de Costa Rica. Tesis para optar por el grado de profesional de Ingeniería Agronómica, Universidad de Costa Rica.

Crous, P. W., Wingfield, M. J., Guarro, J., Hernández-Restrepo, M., Sutton, D. A., Acharya, K., Barber, P. A., Boekhout, T., Dimitrov, R. A., Dueñas, M., Dutta, A. K., Gené, J., Gouliamova, D. E., Groenewald, M., Lombard, L., Morozova, O. V., Sarkar, J., Th Smith, M., Stchigel, A. M. Groenewald, J. Z. (2015). Fungal Planet description sheets: 320–370. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34, 167–266. <https://doi.org/10.3767/003158515X688433>.

de Beer, Z. W., Duong, T. A., Barnes, I., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2014). Redefining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies in Mycology*, 79(1), 187–219. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.001>. De Moraes Russo, C. A., & Selvatti, A. P. (2018). Bootstrap and rogue identification tests for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 35(9), 2327–2333. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy118>.

de Mendiburu F (2023). *_agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research_*. R. package version 1.3-6. <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html>.

- De Moraes Russo, C. A., & Selvatti, A. P. (2018). Bootstrap and rogue identification tests for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 35(9), 2327–2333. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy118>
- Delgado, R., & Suárez, C. (2003). Genetic dissection of late blight resistance in cultivated diploid *Solanum* species and modern potato varieties of Ecuador View project. <https://www.researchgate.net/publication/234058127>.
- Dos Santos Nunes, L. (2015). Resistência de Mangueira “ubá” (*Mangifera indica*) à murcha-de *Ceratocystis* (*Ceratocystis fimbriata*). Tesis de Maestría, Universidad Federal de Viçosa (UFV)
- Engelbrecht, C. J. B. (2004). Host specialization, intersterility, and taxonomy of populations of *Ceratocystis fimbriata* from sweet potato, sycamore, and cacao. <http://lib.dr.iastate.edu/rtd>
- Engelbrecht, C. J. B., & Harrington, T. C. (2005). Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao, and sycamore. *Mycologia*, 97(1), 57–69. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.57>
- Engelbrecht, C. J., Harrington, T. C., & Alfenas, A. (2007). *Ceratocystis* wilt of cacao - A disease of increasing importance. *Phytopathology*, 97(12), 1648–1649. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1648>
- FEDECACAO. (2022). Año cacaotero 2020-2021, el de mayor producción de cacao en la historia de Colombia. <https://www.fedecacao.com.co/post/a%C3%B1o-cacaotero-2020-2021-el-de-mayor-producci%C3%B3n-de-cacao-en-la-historia-de-colombia>.
- Fergus, C. L. (1956). The Influence of Actidione on Wood-Staining Fungi. *Mycologia*, 48(4), 468–472. <https://doi.org/10.1080/00275514.1956.12024558>.
- Ferreira, E. M., Harrington, T. C., Thorpe, D. J., & Alfenas, A. C. (2010). Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathology*, 59(4), 721–735. doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02275.x.
- Firmino, A. C. (2011). Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp., avaliação de resistência clonal de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas. Tesis Doctoral, Universidade Estadual Paulista, Julio de Mesquita Filho.
- Fischer, M. C., Rellstab, C., Leuzinger, M., Roumet, M., Gugerli, F., Shimizu, K. K., Holderegger, R., & Widmer, A. (2017). Estimating genomic diversity and population differentiation - an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3459-7>

- Fourie, A., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., & Barnes, I. (2014). Molecular markers delimit cryptic species in *Ceratocystis* sensu stricto. *Mycological Progress*, 14(1). <https://doi.org/10.1007/s11557-014-1020-0>
- Gaviria, M. A., & Cano, L. E., (2013). Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras clínicas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Griffith, G. W., & Shaw, D. S. (1998). Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR Amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 64, Issue 10). <https://journals.asm.org/journal/aem>.
- Harrington, T. C. (1981). Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. *Mycologia*, 73(6), 1123. <https://doi.org/10.2307/3759682>.
- Harrington, T. C. (2013). *Ceratocystis* Diseases. 11. Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Harrington, T. C., Kazmin, M. R., Al-Sadi, A. M., Ismail, S. I. (2014). Intraspecific and intragenomic variability of ITS rDNA sequences reveals taxonomic problems in *Ceratocystis fimbriata* sensu stricto. *Mycologia*, 106(2), 224–242. <https://doi.org/10.3852/13-189>.
- Hall, T. (2004). BioEdit Versión 7.0.0. Manual. <https://studylib.net/doc/14572292/bioedit-version-7.0.0>
- Heath, R. N., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., Meke, G., Roux, Heath R N, Wingfield M J, Wingfield B D, & Mbaga A. (2009). *Ceratocystis* species on *Acacia mearnsii* and *Eucalyptus* spp. in eastern and southern Africa including six new species.
- Heberth, D., & Ortíz, R. (2011). Caracterización etiológica de la Roña de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Cundinamarca). Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.
- Holland, L. A., Lawrence, D. P., Nouri, M. T., Travadon, R., Harrington, T. C., & Trouillas, F. P. (2019). Taxonomic revision and multi-locus phylogeny of the North American clade of *Ceratocystis*. *Fungal Systematics and Evolution*, 3, 135–156. <https://doi.org/10.3114/fuse.2019.03.07>.
- Holland, L. A., Trouillas, F. P., Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Crespo, M., Doll, D. A., Duncan, R. A., Holtz, B. A., Culumber, C. M., Yaghmour, M. A., Niederholzer, F. J. A., Lightle, D. M., Jarvis-Shean, K. S., Gordon, P. E., & Fichtner, E. J. (2021). Fungal pathogens associated with canker diseases of almond in California. *Plant Disease*, 105(2). <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2128-RE>

- Huang, C. H., Lee, F. L., & Tai, C. J. (2009). The β -tubulin gene as a molecular phylogenetic marker for classification and discrimination of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 95(2), 135–142. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9296-1>
- Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del cacao. Medidas para la temporada invernal. <https://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/->
- Jabeen, K., & Asad, S. (2017). Assessment of selected culture media for competent growth characteristics of *Ceratocystis manginecans* (Cause of Mango Sudden Death). *Jabeen and Asad*, 148(5), 148–154. <http://www.innspub.net>.
- Jaimes, Y., & Aranzazu, F. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia, con énfasis en *Monillia (Moniliophthora roreri)*. Corporación colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. <https://doi.org/10.21930/978-958-740-034-2>.
- Johnson, J. A., Harrington, T. C., & Engelbrecht, C. J. B. (2005). Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex.
- Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: A review and recent developments. *In Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* (Vol. 374, Issue 2065). Royal Society of London. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>.
- Kaiser, H. F. (1961). A note on guttman's lower bound for the number of common factors. *British Journal of Statistical Psychology*, 14(1), 1–2. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8317.1961.tb00061.x>.
- Kanzi, A. M., Trollip, C., Wingfield, M. J., Barnes, I., Van Der Nest, M. A., & Wingfield, B. D. (2020). Phylogenomic incongruence in *Ceratocystis*: A clue to speciation? *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6772-0>.
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2018). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kück, P., & Longo, G. C. (2014). FASconCAT-G: Extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies. *Frontiers in Zoology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12983-014-0081-x>
- Kassambara, A. and Mundt, F. (2020). Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R Package Version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>.

- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2018). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.
- Kück, P., & Longo, G. C. (2014). FASconCAT-G: Extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies. *Frontiers in Zoology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12983-014-0081-x>.
- Lê, S., Josse, J., Rennes, A., & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. In *JSS Journal of Statistical Software* (Vol. 25). <http://www.jstatsoft.org/>
- Liu, F. F., Barnes, I., Roux, J., Wingfield, M. J., & Chen, S. F. (2018). Molecular phylogenetics and microsatellite analysis reveal a new pathogenic *Ceratocystis* species in the Asian-Australian clade. *Plant Pathology*, 67(5), 1097–1113. <https://doi.org/10.1111/ppa.12820>
- Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1799–1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>
- Lurá, María C., Benitez, Joel D; Jáuregui, Soledad; Gonzáles, Ana M. Evaluación de diferentes técnicas de extracción del ADN de hongos filamentosos. *Revista FABICIB V 7*: 37-44.
- Magalhães, D. M. A., Luz, E. D. M. N., Lopes, U. V., Niella, A. R. R., & Damaceno, V. O. (2016). Leaf disc method for screening *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. *Tropical Plant Pathology*, 41(3), 155–161. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0081-9>
- Marelli, J. P., Guest, D. I., Bailey, B. A., Evans, H. C., Brown, J. K., Junaid, M., Barreto, R. W., Lisboa, D. O., & Puig, A. S. (2019). Chocolate under threat from old and new cacao diseases. In *Phytopathology* (Vol. 109, Issue 8, pp. 1331–1343). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0477-RVW>
- Marin, M., Castro, B., Gaitan, A., Preisig, O., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2003). Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian coffee-growing regions based on molecular data and pathogenicity. *Journal of Phytopathology*, 151(7–8), 395–405. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00738.x>.
- Marin, M., & Wingfield, M. J. (2006). A review of *Ceratocystis* sensu stricto with special reference to the species complexes *C. coerulescens* and *C. fimbriata* Article in *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. Biological control of Eucalypt pests (BiCEP) View project Global movement of eucalypts pathogens; implications for biodiversity and biosecurity View project. <https://www.researchgate.net/publication/235651222>.

Mayorga, S. (2020). Relaciones filogenéticas en el complejo de especies *Pedaliodes* Butler, 1867 (Lepidoptera: Nymphalidae) basadas en el marcador molecular COI. Tesis para optar el grado de Biólogo, Pontificia Universidad Javeriana.

Models_ R package version 3.1-162. <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>.

Mota-Gutierrez, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., Cannoni, M., & Cocolin, L. (2018). Dynamics and Biodiversity of Bacterial and Yeast Communities during Fermentation of Cocoa Beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>

O', K., 1~, D., Nirenberg, H. I., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. In *Mycoscience* (Vol. 41).

Obaid, A., Adawi, A., Deadman, M., & Wingfield, B. D. (2007). Phytopathology of horticultural crops of oman View project fungi associated with wood-boring insects: diversity, pathogenicity and risks related to timber trade and climate change View project Marelize van Wyk National Institute for Communicable Diseases. <https://www.researchgate.net/publication/215735977>.

O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. In *Mycoscience* (Vol. 41).

O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* are Nonorthologous. *Molecular phylogenetics and evolution*, Vol. 7, No. 1, pp. 103–116

Oliveira, L. S. S., Guimarães, L. M. S., Ferreira, M. A., Nunes, A. S., Pimenta, L. V. A., & Alfenas, A. C. (2015). Aggressiveness, cultural characteristics, and genetic variation of *Ceratocystis fimbriata* on *Eucalyptus* spp. *Forest Pathology*, 45(6), 505–514. <https://doi.org/10.1111/efp.12200>

Oliveira, L. S. S., Harrington, T. C., Ferreira, M. A., Damacena, M. B., Al-Sadi, A. M., Al-Mahmooli, I. H. S., & Alfenas, A. C. (2015). Species or genotypes? Reassessment of four recently described species of the *Ceratocystis* wilt pathogen, *Ceratocystis fimbriata*, on *Mangifera indica*. *Phytopathology*, 105(9), 1229–1244. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-15-0065-R>

Paladines-Rezabala, A., Moreira-Morrillo, A. A., Mielles, A. E., & Garcés-Fiallos, F. R. (2022). Advances in understanding of the interaction between *Ceratocystis cacaofunesta* and *Xyleborus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on cocoa trees. In *Scientia Agropecuaria* (Vol. 13, Issue 1, pp. 43–52). Universidad Nacional de Trujillo. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.004>

- Picó, M., & Esteras, C. (s.f.). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR. Microsatélites. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pinheiro, J; Bates D; DebRoy, S; Sarkar, D. R. C. T. (2022). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-155. <https://cran.rproject.org/package=nlme>.
- Procter, J. B., Carstairs, G. M., Soares, B., Mourão, K., Ofoegbu, T. C., Barton, D., Lui, L., Menard, A., Sherstnev, N., Roldan-Martinez, D., Duce, S., Martin, D. M. A., & Barton, G. J. (2021). Alignment of Biological Sequences with Jalview. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2231, pp. 203–224). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_13
- Promoción de Turismo, Inversión y Exportaciones – Proexport. (2012). Cacao colombiano fino y de aroma. <https://gestionparticipativa.pe.iica.int/getattachment/8010f039-fabc-465d-8c48-5a914c3da9da/Cacao-Colombiano-fino-y-de-aroma.aspx>
- Quang Minh, B., Lanfear, R., Ly-Trong Jana Trifinopoulos, N., Schrempf, D., & Schmidt, H. A. (2022). IQ-TREE version 2.2.0: Tutorials and Manual Phylogenomic software by maximum likelihood. <http://www.iqtree.org>
- Quinlan, A. R. (2014). BEDTools: The Swiss-Army tool for genome feature analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2014, 11.12.1-11.12.34. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1112s47>
- R Core Team. (2022). R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Version 4.1.3. <https://www.R-project.org/>.
- Rambaut, A. (2018). Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. FigTree v 1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Reyna Ávila, R. G. (2015). Estudios epidemiológicos del marchitamiento por *Ceratocystis* en Eucalypto. Tesis de Maestría, Universidad de la República.
- Robles, J., & Alméciga, J. (2013). Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de Guasca y Cruz Verde, Cundinamarca-Colombia. Tesis para optar el grado de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.
- Reyes, B. M. D., Fonseca, P. L. C., Heming, N. M., Conceição, L. B. de A., Nascimento, K. T. de S., Gramacho, K. P., Arevalo-Gardini, E., Pirovani, C. P., & Aguiar, E. R. G. R. (2023). Characterization of the microbiota dynamics associated with *Moniliophthora roreri*, causal agent of cocoa frosty pod rot disease, reveals new viral species. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1053562>

- Rodas, C. A., Van Wyk, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., Van Wyk, J., & Wingfield, M. (2008). *Ceratocystis neglecta* sp. nov., infecting Eucalyptus trees in Colombia.
- Rodríguez-Polanco, E., Morales, J. G., Muñoz-Agudelo, M., Segura, J. D., & Carrero, M. L. (2020). Morphological, molecular, and pathogenic characterization of *phytophthora palmivora* isolates causing black pod rot of cacao in colombia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 18(2), 1–15. <https://doi.org/10.5424/sjar/2020182-15147>
- Rojas, G. (2008). Estudio de aislamientos del hongo fitopatógeno del café *Ceratocystis fimbriata*. Tesis para optar el grado de Ingeniería en Biotecnología, Instituto tecnológico de Costa Rica.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., Teslenko, M., Zhang, C., & Nylander, J. A. A. (2020). MrBayes version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries.
- Santini, A., Capretti, P., & Santini, A. (2000). Analysis of the Italian population of *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* using RAPD and minisatellite markers. In *Plant Pathology* (Vol. 49). <https://www.researchgate.net/publication/30068960>
- Santos, P. L., Firmino, A. C., Tozze, H. J., de Barros, S. A., & Furtado, E. L. (2011). “In vitro” *Ceratocystis* sp. behavior under different temperatures, culture medium and pH. *Revista Eletrônica de Educação e Ciência – REEC*. 1(1), 07-17. ISSN 2237-3462.
- Suárez Contreras, L. Y., & Peñaranda Figueredo, F. A. (2021). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 20(1), 194–206. <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1914>
- Suwandi, S., Irsan, C., Hamidson, H., Umayah, A., & Asriyani, K. D. (2021). Identification and characterization of *Ceratocystis fimbriata* causing lethal wilt on the lansium tree in Indonesia. *Plant Pathology Journal*, 37(2). <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.08.2020.0147>
- Tarigan, M., Roux, J., Van Wyk, M., Tjahjono, B., & Wingfield, M. J. (2011). A new wilt and die-back disease of *Acacia mangium* associated with *Ceratocystis manginecans* and *C. acaciivora* sp. nov. in Indonesia. *South African Journal of Botany*, 77(2), 292–304. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.08.006>
- Ten Hoopen, G. M., Deberdt, P., Mbenoun, M., & Cilas, C. (2012). Modelling cacao pod growth: Implications for disease control. *Annals of Applied Biology*, 160(3), 260–272. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00539.x>

- Tumura¹, K. G., De, C., Edson, P. ;, & Furtado², L. (2012). Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. In *Summa Phytopathol* (Issue 1).
- Valdetaro, D. C. O. F., Oliveira, L. S. S., Guimarães, L. M. S., Harrington, T. C., Ferreira, M. A., Freitas, R. G., & Alfenas, A. C. (2015). Genetic variation, morphology, and pathogenicity of *Ceratocystis fimbriata* on *Hevea brasiliensis* in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 40(3), 184–192. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0036-6>
- Van Wyk, M., Wingfield, B. D., Marin, M., & Wingfield, M. J. (2010). New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus, and native trees in Colombia. *Fungal Diversity*, 40, 103–117. <https://doi.org/10.1007/s13225-009-0005-9>
- Walker, D. M., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., & White, J. F. (2012). New molecular markers for fungal phylogenetics: Two genes for species-level systematics in the Sordariomycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(3), 500–512. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.005>
- Ward, J. H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, 58(301), 236–244. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>
- Webster A N, R. K., & Butler, D. E. E. (1967). A morphological and biological concept of tile species *Ceratocystis fimbriata*. In *Canadian Journal of Botany* (Vol. 45). www.nrcresearchpress.com
- Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2010). *Ceratocystis* species on *Acacia mearnsii* and *Eucalyptus* spp. in eastern and southern Africa including six new species the fungal diversity associated with *Stipagrostis* species of fairy circles in the Namib desert View project Global movement of eucalypts pathogens: implications for biodiversity and biosecurity View project. <https://www.researchgate.net/publication/228440532>.
- Witthuhn, R. C., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., and Harrington, T. C. (1999). PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis* sensu stricto. *Mycol*, 103(6): 74.3- 74.9
- Wyk, M. Van, Wingfield, B. D., Al-Adawi, A. O., Rossetto, C. J., Ito, M. F., & Wingfield, M. J. (2011). Two new *Ceratocystis* species associated with mango disease in Brazil. *Mycotaxon*, 117, 381–404. <https://doi.org/10.5248/117.381>
- Xu, K., Li, J., Yang, X., Zhang, R., Li, X., Xie, M., & Huang, Q. (2020). Postharvest rot on carrot caused by *Ceratocystis fimbriata* and *Chalaropsis thielavioides* (≡ *Thielaviopsis thielavioides*) in China. In *Journal of General Plant Pathology* (Vol. 86, Issue 4, pp. 322–325). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00919-1>

