



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**
Seréis mis testigos

**FACULTAD DE HÁBITAT, INFRAESTRUCTURA Y
CREATIVIDAD**

**TÍTULO DE MAGISTER EN BIOLOGÍA
COMPUTACIONAL**

Análisis genómico de *Lasiodiplodia laeliocattleyae* asociada a la muerte descendente de la planta y podredumbre de la mazorca del cacao en Ecuador

Autor: Alexander Javier Toaza Mora

Tutor: Francisco Flores, PhD

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Santísima Virgen de Fátima por sus bendiciones y la salud.

A mi padre, madre, hermanos, sobrino y sobrinas por su amor y apoyo.

Al Doctor Francisco Flores por guiarme en la elaboración de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Planteamiento del Problema.....	8
1.2. Justificación.....	9
1.3. Objetivos	10
Objetivo General	10
Objetivos Específicos.....	10
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	10
2.1. Cultivo de cacao en el Ecuador	10
2.2 Generalidades del cultivo de cacao	11
2.3. Principales variedades de cacao	12
2.3.1. Criollos.....	12
2.3.2. Forasteros Amazónicos	12
.....	13
2.3.3. Trinitario	13
2.3.4. Nacional del Ecuador.	13
2.3.5 Clones de cacao.....	14
2.4. Botryosphaeriaceae.	14
2.5. Etiología.	16
2.6. Sintomatología.	16
2.7. Ciclo de la enfermedad.....	17
2.8. Especificidad de hospederos por efectores de <i>Lasiodiplodia</i>	18
.....	19
2.9. Efectores fúngicos como elementos genéticos moduladores de la respuesta del hospedero.	20
2.10. Métodos generales para la identificación de hongos fitopatógenos.	21
2.10.1 Métodos clásicos.	22
2.10.2. Métodos modernos basados en ADN.	22

2.11. Herramientas bioinformáticas en fitopatología.	22
2.12. Recopilación de datos.	23
2.13. Ensamblaje de genomas.	23
2.14. Anotación.	24
2.15. Genómica comparativa.	24
3. METODOLOGÍA.	25
3.1. Obtención de la secuencia genómica.	25
3.2. Calidad de la secuencia.	26
3.3. Procesamiento de la secuencia cruda.	26
.....	27
3.4. Ensamblaje.	27
3.5. Comparación de ensamblajes.	27
3.6. Anotación.	27
3.7. SignalP.	27
3.8. TMHMM.	28
3.9. EffectorP.	29
3.10. BLASTP.	29
3.11. OrthoVenn3.	30
4. RESULTADOS.	31
4.1. Procesamiento de la secuencia cruda.	31
4.2. Ensamblaje y comparación de los métodos.	36
4.3. Anotación del genoma con Funannotate.	38
4.4. SignalP.	39
4.5. TMHMM.	40
4.6. EffectorP.	41
4.7. BLASTP.	42
4.8. OrthoVenn3.	44
.....	46
5. DISCUSIÓN.	47
5.1. Método de ensamblaje.	47
5.2. Anotación estructural.	48
5.3. Identificación de proteínas efectoras relacionadas con la patogenicidad.	48
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	50
7. REFERENCIAS.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mazorcas de la variedad Criollos.....	12
Figura 2. Mazorcas de la variedad Forasteros Amazónicos.....	13
Figura 3. Mazorcas de la variedad Trinitario.....	13
Figura 4. Mazorcas de la variedad Nacional del Ecuador.....	14
Figura 5. Mazorcas del Clon CCN -51.....	14
Figura 6. Características de la cepa LT1A.....	16
Figura 7. Ciclo de infección de <i>Lasiodiplodia</i> en plantas y mazorcas de cacao.....	18
Figura 8. Interacción patógeno – planta.....	19
Figura 9. Actividad de los efectores fúngicos.....	21
Figura 10. Etapas de secuenciación de nueva generación Illumina.....	23
Figura 11. Diagrama de la metodología.....	25
Figura 12. Pasos realizados en Trimmomatic v0.36.....	27
Figura 13. Tipos de péptidos señal (SP).....	28
Figura 14. Resultados de calidad por base antes de Trimmomatic.....	32
Figura 15. Antes de Trimmomatic los niveles de duplicación.....	33
Figura 16. Resultados de Trimmomatic. Generado en la plataforma KBase.....	34
Figura 17. Resultados de calidad por base después de Trimmomatic.....	35
Figura 18. Después de Trimmomatic los niveles de duplicación.....	36
Figura 19. Resultados de los ensamblajes utilizados SPAdes e IDBA.....	37
Figura 20. El gráfico muestra la curva acumulada de los contigs en Mbp.....	38
Figura 21. Proteínas clasificadas como SP (Péptido señal) y OTHER.....	40
Figura 22. Predicción de hélices transmembrana.....	41
Figura 23. Probabilidad de ser un efector apoplástico, citoplasmático o ambos.....	42
Figura 24. Resultados de alineamiento BLASTP.....	43
Figura 25. Comparación de proteínas de las obtenidas por EffectorP de <i>Lasiodiplodia laeliocattleyae</i>	45
Figura 26. Comparación de proteínas de las obtenidas en la anotación de <i>Lasiodiplodia laeliocattleya</i>	45
Figura 27. Análisis en EffectorP de los datos obtenidos en OrthoVenn3.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de modelos de genes por método de predicción.....	39
Tabla 2. Resultados de alineamiento BLASTP con la descripción y el E-value.....	43

RESUMEN

El cacao representa un componente esencial de la identidad agrícola ecuatoriana, siendo considerado un símbolo nacional. En Ecuador, destaca la variedad de cacao CCN-51 (Colección Castro Naranjal Cultivar 51), desarrollada mediante el cruzamiento genético entre los tipos Criollo y Forastero. La muerte descendente de la planta y podredumbre de la mazorca del cacao representa una amenaza creciente para la producción de cacao en Ecuador. Recientemente, *Lasiodiplodia laeliocattleyae* ha sido identificada como el agente etiológico responsable de esta patología en plantas de cacao CCN-51, razón por la cual, se abordó el análisis genómico de *Lasiodiplodia laeliocattleyae*. A partir de secuenciación de alto rendimiento, se ensambló y anotó el genoma de la cepa LT1A, obtenida de cultivos de cacao CCN-51. El ensamblaje con SPAdes permitió una anotación estructural robusta mediante Funannotate, identificando más de 13,419 modelos génicos válidos. Se caracterizó el secretoma fúngico con herramientas como SignalP, TMHMM y EffectorP, detectando 435 proteínas con potencial efector, de las cuales 12 mostraron alta similitud con proteínas de *L. theobromae*, lo que evidencia conservación funcional. El análisis ortológico con OrthoVenn3 identificó 15 efectores citoplasmáticos exclusivos en *L. laeliocattleyae*, no detectados por BLASTP, lo que sugiere adaptaciones específicas en su interacción con el hospedador. Estos hallazgos aportan evidencia sobre la evolución funcional dentro del género *Lasiodiplodia* y constituyen una base molecular para futuras estrategias de manejo fitosanitario y mejoramiento genético en cacao.

Palabras clave: *Lasiodiplodia laeliocattleyae*, cocoa, efectores, análisis genómico.

ABSTRACT

Cocoa is an essential component of Ecuador's agricultural identity and is considered a national symbol. In Ecuador, the CCN-51 (Colección Castro Naranjal Cultivar 51) cocoa variety stands out, developed through genetic crossbreeding between the Criollo and Forastero types. The downward death of the plant and rot of the cacao pod represent a growing threat to cacao production in Ecuador. Recently, *Lasiodiplodia laeliocattleyae* has been identified as the etiological agent responsible for this pathology in CCN-51 cacao plants, which is why the genomic analysis of *Lasiodiplodia laeliocattleyae* was undertaken. Using high-throughput sequencing, the genome of strain LT1A, obtained from CCN-51 cocoa crops, was assembled and annotated. Assembly with SPAdes allowed for robust structural annotation using Funannotate, identifying more than 13,419 valid gene models. The fungal secretome was characterized using tools such as SignalP, TMHMM, and EffectorP, detecting 435 proteins with effector potential, of which 12 showed high similarity to *L. theobromae* proteins, evidencing functional conservation. Orthological analysis with OrthoVenn3 identified 15 cytoplasmic effectors unique to *L. laeliocattleyae*, not detected by BLASTP, suggesting specific adaptations in its interaction with the host. These findings provide evidence of functional evolution within the genus *Lasiodiplodia* and constitute a molecular basis for future phytosanitary management strategies and genetic improvement of cocoa.

Keywords: *Lasiodiplodia laeliocattleyae*, cocoa, effectors, genomic analysis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del Problema

La muerte descendente de la planta y podredumbre de la mazorca del cacao representa una amenaza creciente para la producción de cacao en Ecuador. Recientemente, *Lasiodiplodia laeliocattleyae* ha sido identificada como el agente etiológico responsable de esta patología en plantas de cacao, lo que ha generado preocupación en el sector agrícola nacional debido a su impacto económico (Canchignia et al., 2025). Esta especie fúngica fue reportada por primera vez en 2025 como causante de la enfermedad y se distingue por su capacidad de persistir en el ambiente mediante estructuras de resistencia como clamidosporas, que le permiten sobrevivir en el suelo y en restos vegetales. El patógeno permanece en estado endófito hasta que el hospedero presenta condiciones de vulnerabilidad, como heridas mecánicas o deficiencias nutricionales, lo que desencadena síntomas como necrosis en ramas jóvenes, momificación de frutos y pudrición de mazorcas (Canchignia et al., 2025). Aunque estos síntomas han sido observados desde hace más de cinco años en cultivares de cacao CCN-51 (Moreira et al., 2021), su incidencia ha aumentado en zonas afectadas por estrés abiótico y prácticas agronómicas inadecuadas (Canchignia et al., 2025).

El género *Lasiodiplodia* agrupa hongos fitopatógenos de distribución cosmopolita, con alta prevalencia en regiones tropicales, y es responsable de enfermedades en diversos cultivos de interés comercial. Su persistencia en el ambiente y capacidad de colonizar tejidos vegetales dificultan su manejo fitosanitario (Canchignia et al., 2025). En este contexto, resulta prioritario comprender los determinantes genéticos que explican su comportamiento patogénico. Este estudio tiene como objetivo comparar los genomas de diferentes especies de *Lasiodiplodia* que infectan el cacao para identificar elementos genéticos específicos responsables de su comportamiento patogénico. Al dilucidar estos componentes genéticos, se puede obtener información sobre los mecanismos moleculares que subyacen al proceso de infección, lo que puede informar el desarrollo de intervenciones específicas y estrategias de mejoramiento para variedades de cacao resistentes a enfermedades. Una mejor comprensión de este hongo fitopatógeno proporcionará información sobre la futura gestión y prevención de esta enfermedad agrícola.

El incremento en la incidencia de especies del género *Lasiodiplodia* en cultivos de cacao en Ecuador y otras regiones de Sudamérica ha puesto en evidencia la necesidad urgente de profundizar en su estudio. A pesar de su creciente impacto, aún persisten vacíos en el conocimiento sobre los procesos de infección y progresión sintomática en las distintas fases del desarrollo de la enfermedad. Comprender estos mecanismos resulta esencial para orientar investigaciones centradas en la caracterización genética de *Lasiodiplodia*, el análisis genómico comparativo, la identificación de variantes asociadas a la resistencia del hospedero y el diseño de programas de mejoramiento genético. Asimismo, este conocimiento puede sustentar el desarrollo de estrategias de manejo fitosanitario más eficaces, con el fin de reducir las pérdidas en calidad y rendimiento del cacao (Moreira et al., 2021).

En este contexto, las proteínas secretadas por los hongos patógenos, en particular aquellas clasificadas como efectoras, han sido ampliamente reconocidas por su papel determinante

en la interacción hospedero-patógeno. Estas moléculas modulan procesos celulares del hospedero y facilitan la colonización de los tejidos, lo que las convierte en elementos clave para entender la virulencia y especificidad de las especies fúngicas (Canchignia et al., 2025). La identificación y caracterización funcional de estos efectores constituye una vía prometedora para el desarrollo de herramientas moleculares que permitan anticipar el comportamiento patogénico y diseñar cultivares con mayor capacidad de respuesta frente a infecciones.

En base a lo expuesto se formularon las siguientes preguntas:

¿Cuáles son las características estructurales y funcionales del genoma de *Lasiodiplodia laeliocattleyae* aislada de cacao?

¿Qué elementos genéticos presentes en el genoma de *L. laeliocattleyae* contribuyen a su capacidad patogénica?

¿Existen diferencias significativas entre los genomas de diferentes especies de *Lasiodiplodia* que infectan cacao?

1.2. Justificación

Durante el año 2024, el cacao ecuatoriano alcanzó un desempeño histórico en el comercio exterior, posicionándose como el tercer producto no petrolero de exportación, superado únicamente por el camarón y el banano. Este logro se reflejó en un valor total de exportaciones que ascendió a \$ 3.638 millones, cifra que prácticamente triplicó la registrada el año anterior y que incluso superó a las exportaciones mineras, las cuales experimentaron una caída del 7,5 % respecto a 2023 (El Oriente, 2025). Este crecimiento estuvo estrechamente vinculado al comportamiento del mercado internacional, donde los precios del cacao alcanzaron niveles récord, superando los \$10.000 por tonelada en los meses de abril y septiembre, lo que también repercutió en el incremento de precios de productos derivados como el chocolate (El Oriente, 2025).

En términos de volumen, Ecuador exportó 471.157 toneladas de cacao en 2024, lo que representó un aumento del 14,71 % en comparación con el año anterior, según datos de la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao (Anecacao) (El Oriente, 2025). Esta dinámica ha consolidado al país como uno de los principales exportadores de cacao en grano del continente americano, ocupando actualmente el cuarto lugar a nivel mundial en exportación de todas las variedades de cacao. El precio actual, situado en \$10.484 por tonelada, refleja tanto la elevada demanda como la volatilidad del mercado internacional (El Oriente, 2025).

El cacao representa un componente esencial de la identidad agrícola ecuatoriana, siendo considerado un símbolo nacional. En particular, el cacao fino y de aroma destaca como uno de los principales productos cultivados en el país, apreciado por sus propiedades organolépticas únicas, como el aroma floral y el sabor frutal, que lo convierten en materia prima ideal para la elaboración de chocolates de alta gama. Las provincias con mayor producción incluyen Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos, donde se concentra gran parte del cultivo nacional. No obstante, a pesar de su reconocimiento internacional, este tipo de cacao presenta una alta susceptibilidad a enfermedades fúngicas, lo que limita su productividad y plantea desafíos para su manejo agronómico (INIAP, 2023).

En Ecuador, destaca la variedad de cacao CCN-51 (Colección Castro Naranjal Cultivar 51), desarrollada mediante el cruzamiento genético entre los tipos Criollo y Forastero.

Este genotipo ha sido ampliamente adoptado en el país debido a su elevada productividad hasta cuatro veces superior a la variedad Nacional y a su tolerancia relativa frente a ciertas enfermedades. Tras un manejo poscosecha adecuado, el CCN-51 puede alcanzar estándares de calidad que lo hacen competitivo en mercados especializados. Actualmente, esta variedad representa aproximadamente el 90 % de las nuevas áreas de cultivo de cacao en Ecuador (Vargas et al., 2015).

En paralelo, se ha documentado la presencia de especies del complejo Botryosphaeriaceae en zonas cacaoteras del norte de la provincia de Los Ríos, entre ellas *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* y *Lasiodiplodia theobromae*, las cuales se asocian con síntomas de muerte regresiva en tallos, ramillas y ramas, afectando la sanidad de las plantas (Moreira et al., 2021). A esta problemática se suma *Lasiodiplodia laeliocattleyae*, agente fitopatógeno vinculado con la podredumbre de mazorcas y la muerte de plantas en cultivos de cacao, lo que representa una amenaza significativa para la sostenibilidad productiva del sector. Dado el rol socioeconómico del cacao en diversas comunidades rurales, la presencia de este hongo puede comprometer seriamente los rendimientos y los ingresos de los agricultores (Canchignia et al., 2025).

Este estudio, mediante la identificación de genes específicos responsables de la enfermedad, ofrecerá información detallada sobre los mecanismos genéticos que permiten la patogenicidad de este hongo, ampliando la comprensión de las interacciones planta-patógeno. Los resultados pueden servir como base para el desarrollo de estrategias innovadoras para el control de esta enfermedad en el cacao, como desarrollar estrategias de manejo basadas en el conocimiento genómico para contribuir a prácticas agrícolas más sostenibles y menos dependientes de productos químicos (Canchignia et al., 2025).

1.3. Objetivos

Objetivo General

- Analizar el genoma de *Lasiodiplodia laeliocattleyae* asociada a la muerte descendente de la planta y podredumbre de la mazorca del cacao en Ecuador.

Objetivos Específicos

- Ensamblar el genoma de la cepa de *Lasiodiplodia laeliocattleyae* aislada de cacao.
- Anotar estructural y funcionalmente el genoma ensamblado.
- Comparar los genomas de especies de *Lasiodiplodia* spp., que infectan cacao para identificar elementos genéticos que contribuyen a su patogenicidad.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Cultivo de cacao en el Ecuador

El cacao, perteneciente al género *Theobroma*, tiene su origen en Sudamérica y fue domesticado en la región mesoamericana (Aranzazu et al., 2009). En Ecuador, su cultivo se concentra principalmente en la región Costa y en zonas de la Amazonía, con presencia menor en las estribaciones andinas. Esta distribución geográfica le confiere al cacao un

papel relevante no solo en términos económicos, sino también sociales, ambientales y culturales, dada su adaptación a diversas zonas agroecológicas (Lanaud et al., 2016). A nivel internacional, el comercio de cacao en grano se clasifica en dos grandes categorías: el cacao convencional y el cacao fino y de aroma. El primero representa aproximadamente el 95 % de la producción global, con origen predominante en África, Asia y América Latina. El cacao fino y de aroma, que constituye el 5 % restante, se cultiva en países como Ecuador, Indonesia, Papúa Nueva Guinea, Colombia, Venezuela y Costa Rica, entre otros (Organización Internacional del Cacao [ICCO], 2010).

En el contexto ecuatoriano, el cacao ha sido históricamente uno de los pilares de la economía nacional, incluso antes del auge petrolero. Su relevancia se ha mantenido a lo largo del tiempo, como lo demuestra el incremento del 10,7 % en las exportaciones durante el primer cuatrimestre de 2021 respecto al mismo período de 2020, lo que generó un ingreso adicional de \$ 39,2 millones, alcanzando un total de \$ 223,3 millones (ANECACAO, 2021). Recientemente, en 2024, el país alcanzó un récord histórico al triplicar el valor de sus exportaciones cacaoteras, llegando a los \$ 3.638 millones. Este logro posicionó al cacao como el tercer producto de exportación no petrolero, superando incluso a los minerales y quedando solo detrás del camarón y el banano (El Oriente, 2025).

Según datos de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC), elaborada por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), en el año 2020 se registró una superficie total de 590,579 hectáreas destinadas al cultivo de cacao en el país. De esta extensión, aproximadamente el 77 % se localiza en la región Costa, destacándose las provincias de Los Ríos, Guayas y Manabí como principales zonas productoras. Por otro lado, la región Amazónica representa cerca del 10 % del área cultivada, con una concentración significativa en las provincias de Sucumbíos y Orellana, que abarcan 25.813 ha y 21.131 ha, respectivamente.

En cuanto al rendimiento, se observan diferencias notables entre estas dos provincias amazónicas: Sucumbíos presenta una productividad promedio de 0,31 toneladas métricas por hectárea de cacao seco al año, mientras que Orellana alcanza un rendimiento superior, con 0,61 toneladas métricas por hectárea (INEC, 2020). Estos datos reflejan no solo la expansión territorial del cultivo, sino también la variabilidad en eficiencia productiva según las condiciones agroecológicas locales.

2.2 Generalidades del cultivo de cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta nativa de América Tropical, se originó en el alto Amazonas en Sudamérica y luego fue introducido por humanos en América Central (Motamayor et al., 2002; Rodríguez, 2016).

Taxonomía del cacao (Paredes et al., 2022).

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Género: *Theobroma*

Especie: cacao

Nombre científico: *Theobroma cacao* L.

2.3. Principales variedades de cacao

El cacao tiene su centro de origen en la cuenca amazónica, abarcando territorios de Colombia, Ecuador, Perú y Brasil, donde se ha identificado la mayor diversidad genética de esta especie. A partir de sus características morfológicas y genéticas, se han definido cuatro grupos principales: Criollo, Forastero Amazónico, Trinitario y Nacional de Ecuador. A estos se suman los denominados clones, desarrollados mediante procesos de mejoramiento genético (Paredes, 2009; Paredes et al., 2022).

2.3.1. Criollos

Esta variedad se distingue por árboles de porte bajo y estructura menos vigorosa. Presentan copas redondeadas, hojas pequeñas de tonalidad verde clara y textura gruesa. Las mazorcas, alargadas y de colores verde o rojizo en su fase inmadura, adquieren tonalidades amarillas y anaranjadas al alcanzar la madurez (véase en la figura 1). Las semillas, de color blanco marfil, producen un chocolate de alta calidad sensorial, con sabor a nuez y fruta, por lo que se clasifican como cacaos finos (Paredes, 2009; Paredes et al., 2022).



Figura 1. Mazorcas de la variedad Criollos.

Nota. Tonalidades amarillas y anaranjadas al alcanzar la madurez (Paredes, 2009).

2.3.2. Forasteros Amazónicos

Constituyen cerca del 80 % de la producción mundial. Su distribución se extiende por la cuenca del río Amazonas y sus afluentes. Las mazorcas presentan forma de pequeño cuello de botella en la base, con colores verdes en estado inmaduro y amarillos al madurar (véase en la figura 2). Las almendras son pequeñas, aplanadas y de cotiledones morados. El chocolate derivado de esta variedad posee un perfil sensorial básico, representativo del sabor tradicional del cacao (Paredes, 2009; Paredes et al., 2022).



Figura 2. Mazorcas de la variedad Forasteros Amazónicos.

Nota. Amarillos al madurar (Paredes, 2009).

2.3.3. Trinitario

Resultado del cruzamiento entre Criollo de Trinidad y Forastero multiplicado en la cuenca del río Orinoco, esta variedad fue seleccionada originalmente en Trinidad. Representa entre el 10 % y el 15 % de la producción global y es ampliamente cultivada en América. Su calidad es intermedia, con perfiles de sabor que oscilan entre medio y alto, frecuentemente con matices frutales y de nuez y las mazorcas de los trinitarios tienen color rojizo en su inmadurez y luego se toman un color anaranjado (véase en la figura 3) (Paredes, 2009).



Figura 3. Mazorcas de la variedad Trinitario.

Nota. Anaranjado en la madurez (Paredes, 2009).

2.3.4. Nacional del Ecuador.

Aunque comparte similitudes con el Forastero Amelonado, el cacao Nacional presenta una estructura genética compleja debido a cruzamientos naturales con materiales provenientes de Venezuela y Trinidad, formando el denominado complejo Nacional-Trinitario. Las mazorcas muestran estrangulamientos en la base y el ápice, con surcos poco marcados, es de color verde en su fase inmadura y cuando madura su color es amarillo intenso (véase en la figura 4). Las almendras pueden ser de color violeta pálido o blanco, y el chocolate obtenido se distingue por su aroma floral y sabores frutales, considerado entre los más finos a nivel mundial (Paredes, 2009; Paredes et al., 2022).



Figura 4. Mazorcas de la variedad Nacional del Ecuador.

Nota. Amarillo intenso cuando madura por eso es llamado “la Pepa de Oro” (Paredes, 2009).

2.3.5 Clones de cacao.

Además de las variedades tradicionales, existen clones desarrollados mediante selección artificial. Un ejemplo representativo es el CCN-51, cuyas mazorcas presentan tonalidades rojizas-moradas en estado joven y rojizo-anaranjadas al madurar (véase en la figura 5). Aunque su perfil de sabor es considerado medio a bajo, destaca por su alto rendimiento y contenido de manteca de cacao, lo que lo hace atractivo para la industria (Paredes, 2009; Paredes et al., 2022).



Figura 5. Mazorcas del Clon CCN -51.

Nota. Rojizo-anaranjadas al madurar (Paredes, 2009).

2.4. Botryosphaeriaceae.

La familia Botryosphaeriaceae comprende un grupo diverso de hongos con distribución global, capaces de establecerse como endófitos, patógenos o saprófitos en una amplia variedad de ambientes y hospedadores vegetales (Phillips et al., 2006; El-Ganainy et al., 2022). Dentro de esta familia, el género *Lasiodiplodia* se encuentra predominantemente en regiones tropicales y subtropicales, donde ha sido asociado con enfermedades de alto

impacto en cultivos frutales y forestales, tales como canchales, muerte regresiva, pudrición de raíces y frutos, tizón de ramas y gomosis (Phillips et al., 2006; Freire et al., 2011; El-Ganainy et al., 2022).

Los hongos del género *Lasiodiplodia* presentan una notable versatilidad ecológica, adoptando estilos de vida que van desde la endófito asintomática, hasta la patogenicidad y el comportamiento saprofítico en tejidos vegetales senescentes (Phillips et al., 2006; Crous et al., 2006; El-Ganainy et al., 2022). Entre sus especies, *L. theobromae* destaca por su amplio rango de hospedadores, con registros en más de 500 especies vegetales, lo que la convierte en uno de los patógenos más relevantes dentro de su familia (El-Ganainy et al., 2022).

Desde su aislamiento inicial en mango en Egipto en 1971, bajo el nombre *Botryodiplodia theobromae*, esta especie ha sido implicada en diversas patologías vegetales, incluyendo la muerte regresiva del mango (Ismail et al., 2012; Abd-El Ghani et al., 2005), la pudrición de raíces en remolacha azucarera (Abd-El Ghani et al., 2005), el cancro o pudrición blanda en cultivos como vid (El-Ganainy et al., 2022), nogal (Haggag et al., 2007), maíz, cítricos y palma datilera (Diab et al., 1984), así como en especies ornamentales como *Ficus* (Rehab et al., 2014) y frutales como *Annona spp.* (Haggag et al., 2007; Leala et al., 2021).

La identificación de especies dentro del género *Lasiodiplodia* ha enfrentado dificultades debido a la similitud morfológica entre especies. Las técnicas tradicionales basadas en características culturales y conidiales han demostrado ser insuficientes para una diferenciación precisa (Ismail et al., 2012; Coutinho et al., 2017). Por ello, se ha recurrido a enfoques moleculares que emplean secuencias multilocus, como los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADN ribosómico (White et al., 1990), el gen del factor de elongación EF1 α y la β -tubulina (tub2), los cuales han permitido una delimitación más confiable entre especies, especialmente dentro del complejo *L. theobromae* (Phillips et al., 2006; Wang et al., 2021).

En Ecuador, Jiménez et al. (2022) reportaron la presencia de *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* y *L. theobromae* en cultivos de cacao afectados por muerte regresiva en la provincia de Los Ríos. La identificación se realizó mediante el análisis combinado de tres loci: ITS, EF1 α y tub2, lo que permitió una resolución adecuada a nivel de especie. Sin embargo, estudios más recientes han sugerido que podrían existir estructuras genéticas más profundas dentro del género, lo que ha motivado el uso de marcadores adicionales como RPB2, correspondiente a la segunda subunidad de la ARN polimerasa II, para mejorar la resolución filogenética (Y.-Z. Ko et al., 2023; Rathnayaka et al., 2023).

La creciente relevancia económica de las enfermedades causadas por *Lasiodiplodia*, junto con el descubrimiento de nuevas especies en ambientes tropicales, ha llevado a considerar la posibilidad de que múltiples especies estén involucradas en la etiología de enfermedades del cacao en Ecuador. Comprender con precisión la identidad del patógeno es fundamental para el desarrollo de estudios epidemiológicos, la elaboración de mapas de distribución y la implementación de estrategias de manejo fitosanitario específicas para cada especie involucrada (El-Ganainy et al., 2022).

2.5. Etiología.

El organismo en cuestión corresponde a un hongo necrótrofo clasificado taxonómicamente dentro del filo Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Botryosphaerales y familia Botryosphaeriaceae, grupo que incluye numerosos patógenos de importancia agrícola (Slippers et al., 2013; Sathya et al., 2017). Esta especie fúngica se caracteriza por su capacidad de inducir necrosis en tejidos vegetales, favoreciendo su colonización mediante la degradación activa de células hospedadoras. En condiciones de cultivo *in vitro*, el micelio del hongo presenta inicialmente una coloración blanca, que evoluciona progresivamente hacia tonalidades grisáceas y finalmente negruzcas conforme avanza el desarrollo (Barnett & Hunter, 1998; Alves, 2008). Durante su ciclo de vida, se forman estructuras reproductivas denominadas picnidios, de color negro, ostioladas y con presencia de paráfisis que alcanzan dimensiones aproximadas de 4 μm de ancho y hasta 55 μm de longitud (Barnett & Hunter, 1998; Alves, 2008). Estas estructuras cumplen funciones de resistencia y dispersión, siendo clave en la persistencia del patógeno en condiciones adversas.

Las hifas del hongo son completamente septadas y generan conidióforos simples y cortos, a partir de los cuales se desarrollan conidios de forma elipsoidal. Estos presentan dimensiones que oscilan entre 13,0 y 15,4 μm de ancho y entre 23,6 y 28,2 μm de largo (Alves, 2008). En estado inmaduro, las conidias son hialinas, unicelulares, de pared gruesa y con contenido granular. A medida que maduran, adquieren septos internos y estrías longitudinales, tornándose de color marrón oscuro, lo que facilita su identificación microscópica (Hendra et al., 2019), véase en la Figura 6.

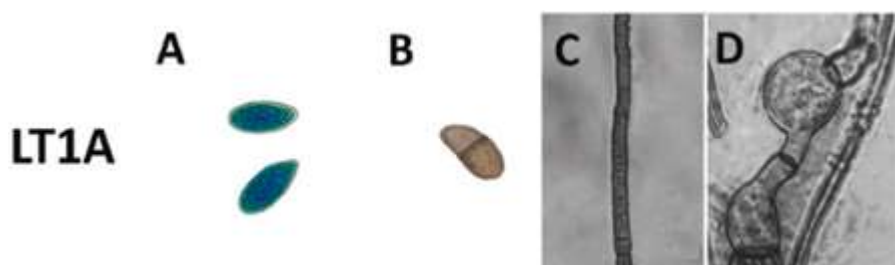


Figura 6. Características de la cepa LT1A.

Nota. (A-D): conidios inmaduros (A) y maduros (B), micelio (C) y clamidosporas (D). Barras: 10 μm (Canchignia et al., 2025).

2.6. Sintomatología.

Diversos estudios han demostrado que este hongo puede infectar tejidos vegetales sanos sin que presenten síntomas visibles en la planta hospedadora, adoptando un comportamiento endófito (Mohali et al., 2005). No obstante, cuando el organismo vegetal se ve sometido a condiciones de estrés ya sea hídrico, térmico o por daño mecánico los síntomas se pueden hacer visibles (Mullen, 1991).

En campo, uno de los primeros signos de infección suele observarse en ramillas jóvenes, las cuales pueden morir sin que se vean comprometidas las ramas principales (Burgess

et al., 2006). A medida que el hongo coloniza los tejidos internos, se presentan síntomas más generalizados como clorosis foliar (Alvindia & Gallema, 2017), pérdida de turgencia, marchitamiento progresivo y, finalmente, la muerte de la planta. Este proceso patológico es conocido como “muerte regresiva” y ha sido ampliamente documentado en cultivos tropicales (Kannan et al., 2010; Moreira et al., 2021).

Además de los síntomas foliares y estructurales, en campo también se ha reportado la presencia de pudrición y momificación de mazorcas (Valarmathi & Ladhakshmi, 2018). El hongo penetra con facilidad los tejidos de mazorcas aparentemente sanas, generando manchas marrones en la superficie externa que pueden extenderse hasta las almendras. En estados avanzados de infección, las mazorcas se tornan completamente necrosadas e inviábiles, y en su interior se observa una masa densa de micelio negrozco que envuelve las almendras, comprometiendo la calidad y viabilidad del fruto.

2.7. Ciclo de la enfermedad.

El agente fitopatógeno presenta estructuras como picnidios que actúan como órganos de fructificación asexual, facilitando la producción y dispersión de conidios durante la fase activa de infección y también tiene la capacidad de persistir en el ambiente a través de estructuras especializadas que le permiten sobrevivir en el suelo y en residuos vegetales, los cuales actúan como reservorios de inóculo (véase Figura 7). Estas estructuras son las clamidosporas, que se desarrollan en tejidos infectados o directamente en el suelo (Michereff et al., 2005; Kuswinanti, 2019; Ogundana, 1983). Durante esta etapa, el hongo puede adoptar un comportamiento saprofítico, caracterizado por la utilización de materia orgánica en descomposición como fuente de nutrientes, sin ejercer efectos patogénicos directos sobre tejidos vegetales vivos. Cuando las condiciones ambientales se tornan favorables, los conidios contenidos en los picnidios son liberadas al entorno, facilitando su dispersión por medio del viento, la lluvia o mediante herramientas agrícolas e insectos de la familia Miridae, entre los que se incluyen *Helopeltis thetvora*, *H. ammonli* y *H. theobromae* (Vásquez-López et al., 2009; Kranz et al., 1977; Ploetz, 2003). Esta fase de diseminación es clave para el inicio de nuevas infecciones en plantas susceptibles. Una vez que el hongo entra en contacto con el hospedador, puede provocar lesiones visibles en frutos, brotes y ramillas jóvenes, afectando de manera significativa el rendimiento de mazorcas, especialmente en variedades de cacao con menor resistencia genética (Kranz et al., 1977; Martoredjo et al., 1995; Adu-Acheampong et al., 2011). La invasión de los tejidos vegetales ocurre tanto a nivel intercelular como intracelular, comprometiendo la funcionalidad de los haces vasculares. Este proceso culmina en necrosis de las células parenquimatosas y del xilema, lo que ocasiona en un deterioro progresivo de la planta (Al-Saadoon et al., 2012; Moreira et al., 2021), como se ilustra en la Figura 7.

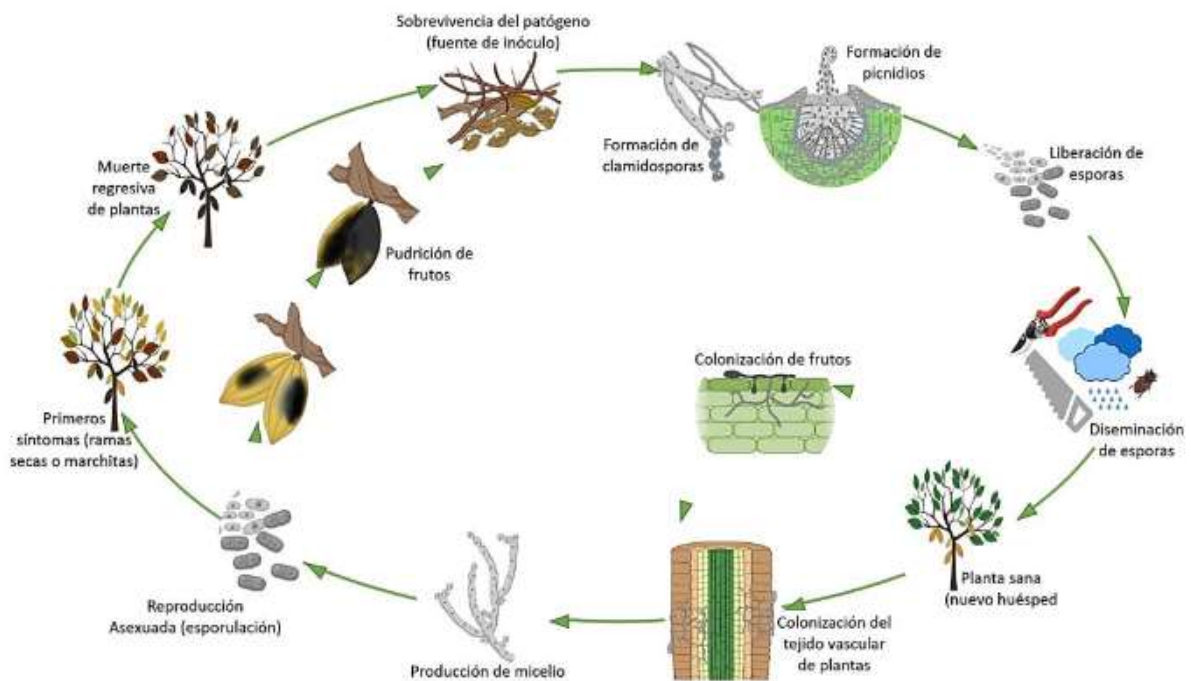


Figura 7. Ciclo de infección de *Lasiodiplodia* en plantas y mazorcas de cacao.

Nota. Etapas de infección, reproducción asexual, colonización de tejidos vegetales y diseminación de conidios. Se destacan procesos como la muerte regresiva de ramas, la putrefacción de frutos y la formación de estructuras de supervivencia como clamidosporas (Moreira et al., 2021).

2.8. Especificidad de hospederos por efectores de *Lasiodiplodia*.

Las proteínas efectoras secretadas por organismos patógenos desempeñan un papel dual en la interacción con las plantas: por un lado, facilitan la colonización y virulencia del patógeno; por otro, pueden activar mecanismos de defensa en el hospedero vegetal (Macho & Zipfel, 2014). En el caso de *Lasiodiplodia theobromae*, se ha identificado un repertorio diverso de efectores que manipulan procesos celulares de *Vitis vinifera*, alterando rutas metabólicas esenciales y modulando la inmunidad innata de la planta. Aunque aún no se han definido con precisión las interacciones moleculares entre estos efectores y las proteínas del hospedero, se reconoce su relevancia en el establecimiento de la enfermedad (Macho & Zipfel, 2014). A diferencia de los animales, las plantas no cuentan con células inmunitarias móviles ni con un sistema inmunológico adaptativo. No obstante, cada célula vegetal posee mecanismos de defensa que incluyen barreras físicas, como una epidermis reforzada, y respuestas inmunes basadas en el reconocimiento de señales moleculares (Boller & Felix, 2009). Este sistema inmunitario vegetal se organiza en dos niveles: la inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) y la inmunidad inducida por efectores (ETI) (Dodds & Rathjen, 2010). La enfermedad del cancro de la vid, provocada por *L. theobromae*, representa una amenaza creciente para la producción vitivinícola, debido a su impacto directo en la calidad y cantidad de los frutos. Estudios comparativos de genomas y transcriptomas de *L. theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Neofusicoccum parvum* han revelado una expansión de familias génicas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal, la adquisición de nutrientes y el transporte

transmembrana, lo que sugiere una evolución convergente hacia una mayor eficiencia en la colonización del hospedero (Yan et al., 2018).

Se han identificado cerca de 500 proteínas efectoras candidatas en *L. theobromae*. Entre ellas, la endopoligalacturonasa LtEPG1 ha sido caracterizada como un factor de virulencia clave (Thilini et al., 2020), mientras que el efector putativo LtCSEP1 ha demostrado capacidad para inhibir la muerte celular inducida por BAX y suprimir respuestas inmunes del hospedero (Xing et al., 2022). Estos hallazgos ofrecen nuevas perspectivas sobre la biología patogénica de este hongo y abren posibilidades para el desarrollo de estrategias de control más eficaces.

Los efectores constituyen herramientas moleculares utilizadas por diversos microorganismos tanto patógenos como simbióticos para interactuar con sus hospedadores vegetales o con otros organismos del entorno (Castillo-Sanmiguel et al., 2020; Todd et al., 2022). Se han encontrado en fitopatógenos fúngicos (Carreón-Anguiano et al., 2020; Sperschneider et al., 2018), bacterianos (Rufián et al., 2021), virales (Huang, 2021), insectos (Chen et al., 2019; Ray & Casteel, 2022) e incluso nematodos (Verhoeven et al., 2023; Vieira & Gleason, 2019), como se muestra en la Figura 8. El avance de las tecnologías ómicas genómica, transcriptómica y proteómica junto con herramientas bioinformáticas especializadas, han permitido ampliar significativamente el catálogo de efectores conocidos y comprender mejor sus funciones en la interacción patógeno-planta (Carreón-Anguiano et al., 2022; Chen et al., 2021; Huang et al., 2022).

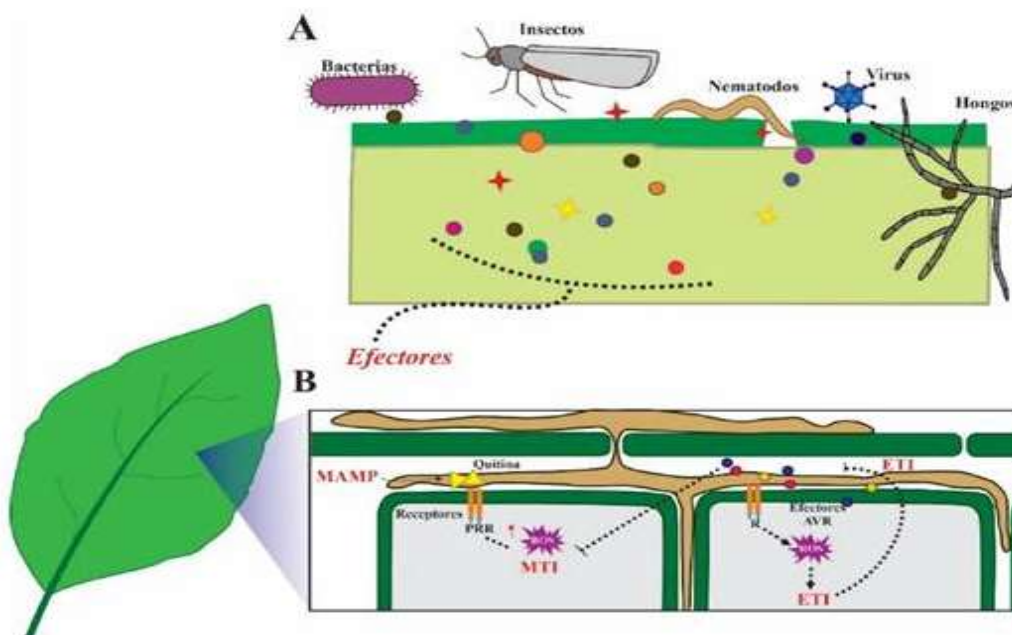


Figura 8. Interacción patógeno – planta.

Nota. Interacción patógeno - planta, A) destacando el papel de los efectores como herramientas clave utilizadas por bacterias, hongos, oomicetos, virus, insectos y nematodos para interferir con los mecanismos de defensa vegetal. Estos microorganismos secretan una variedad de proteínas que les permiten evitar el reconocimiento por parte del hospedero, suprimir respuestas inmunes y favorecer su

desarrollo. En contraposición, B) las plantas activan una primera línea de defensa basada en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), como la quitina fúngica, lo que desencadena la inmunidad por patrones moleculares asociados a microorganismos (MTI). Si el patógeno logra superar esta barrera, entra en juego una segunda estrategia defensiva: la inmunidad mediada por efectores (ETI), en la que proteínas de resistencia (R) detectan efectores específicos (Avr), provocando una respuesta de hipersensibilidad que limita la infección mediante la muerte celular localizada. Sin embargo, cuando los efectores no son reconocidos por las proteínas R, se establece una susceptibilidad inducida por el patógeno, permitiendo el avance de la enfermedad (Todd et al., 2023).

2.9. Efectores fúngicos como elementos genéticos moduladores de la respuesta del hospedero.

Los elementos genéticos que contribuyen a la patogenicidad fúngica incluyen proteínas efectoras, que manipulan las defensas y la fisiología del huésped para favorecer la infección, y que provocan la muerte del tejido del huésped (Sánchez et al., 2007). Otros factores genéticos son los metabolitos secundarios, los ARN pequeños no codificantes (sncRNA), las enzimas que degradan la pared celular y los inhibidores de proteasas. Algunas familias de efectores presentan dominios conservados entre múltiples especies, mientras que otras son específicas de ciertas especies, y sus genes a menudo muestran una rápida evolución y expansión, lo que da lugar a un repertorio diverso de factores de patogenicidad (Sánchez et al., 2007).

Los efectores son moléculas clave en las interacciones planta-microbio, presentes tanto en relaciones patogénicas como en asociaciones beneficiosas, como las establecidas entre las raíces de las plantas y hongos micorrízicos (Plett et al., 2020; Kang et al., 2020). Recientemente, también se ha evidenciado su participación en interacciones entre microorganismos, ampliando su relevancia funcional en los ecosistemas (Snelders et al., 2020; Snelders et al., 2021). En el contexto de los fitopatógenos, el tipo de efector producido está estrechamente vinculado al estilo de vida: los fitopatógenos biotróficos dependen de tejidos vivos para completar su ciclo y suelen secretar efectores que inhiben la inmunidad del hospedero; los fitopatógenos necrotróficos, en cambio, prosperan sobre tejido muerto y liberan efectores que activan respuestas defensivas intensas y descontroladas, conduciendo a la muerte celular (Snelders et al., 2020; Snelders et al., 2021). Los fitopatógenos hemibiotróficos combinan ambas estrategias, iniciando la infección con efectores que suprimen la defensa y la muerte celular, y posteriormente, en la fase necrotrófica, secretan moléculas que inducen la necrosis del hospedero (Castillo-Sanmiguel et al., 2022; Jones & Dangl, 2006; Thordal-Christensen, 2020; Todd et al., 2022). Esta dinámica se representa en la Figura 9, donde se esquematiza cómo los distintos tipos de efectores modulan la interacción patógeno-planta según el estilo de vida del microorganismo.

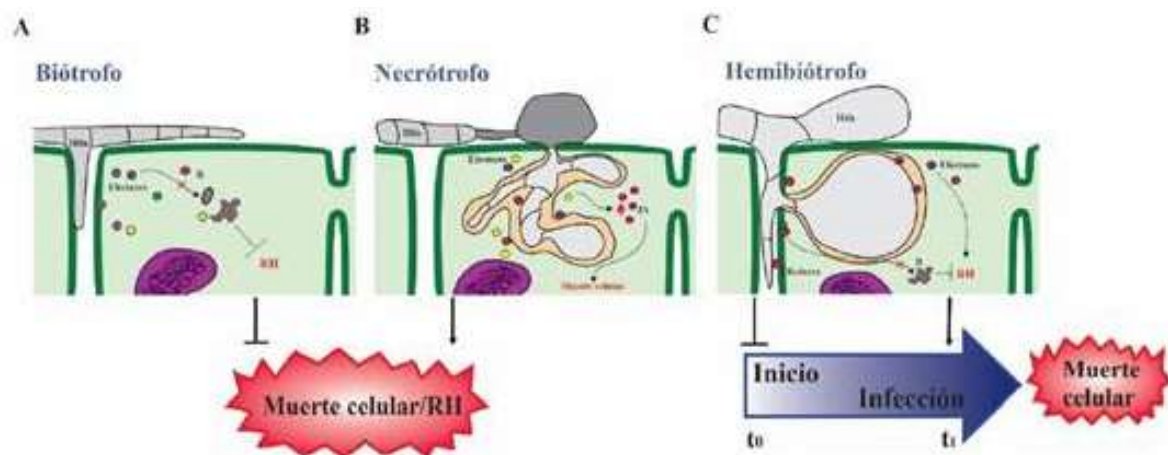


Figura 9. Actividad de los efectores fúngicos.

Nota. Funciones biológicas de los efectores según el modo de nutrición de los fitopatógenos. A) En los biotróficos, estos efectores desempeñan un papel crucial al inhibir la respuesta hipersensible (RH) y suprimir los mecanismos de defensa de la planta, lo que permite mantener la viabilidad de las células hospedadoras durante la colonización. B) Los necrótrofos liberan efectores que inducen la muerte celular mediante procesos como la necrosis o la fagocitosis, lo que favorece la descomposición del tejido vegetal y permite su colonización. C) Los hemibiotróficos combinan ambas estrategias: en la fase inicial, secretan efectores típicos de biotróficos que evitan la activación de la RH y promueven la compatibilidad con el hospedero; posteriormente, durante la transición a la fase necrotrófica, expresan efectores que desencadenan la muerte celular, completando así su ciclo de infección (Todd et al., 2023).

Durante años, el estudio de los efectores se centró principalmente en aquellos localizados en el espacio apoplástico, considerados tradicionalmente como extracelulares (Carreón-Anguiano et al., 2020). Esta concepción ha evolucionado con el descubrimiento de efectores intracelulares que actúan directamente en el citoplasma y en diversos organelos del hospedero, ampliando el alcance funcional de la efectorómica moderna (Sperschneider & Dodds, 2022). Los efectores apoplásticos suelen ser proteínas pequeñas con funciones enzimáticas que degradan o modifican la pared celular, o expansinas que la relajan, otros actúan como inhibidores de proteasas y del reconocimiento inmunológico vegetal (Fabro, 2022; He et al., 2020; Langin et al., 2020). En contraste, los efectores intracelulares presentan una diversidad funcional más amplia, con dianas específicas dentro de la célula hospedadora, muchas de ellas involucradas en procesos clave de defensa. Estas incluyen proteasas, componentes del sistema ubiquitina-proteasoma, factores de transcripción, receptores y proteínas reguladoras de rutas hormonales asociadas a la respuesta inmune (Thordal-Christensen, 2020; Fabro, 2022; Han & Kahmann, 2019). Este cambio de paradigma ha permitido una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que los fitopatógenos emplean para manipular la fisiología vegetal.

2.10. Métodos generales para la identificación de hongos fitopatógenos.

La correcta determinación taxonómica de los hongos constituye un componente fundamental para su documentación a nivel de género y especie. Para ello, se han

desarrollado diversos enfoques metodológicos que varían en precisión, profundidad y aplicabilidad. Tradicionalmente, se han empleado criterios morfológicos como la apariencia de las colonias, la velocidad de crecimiento en medios de cultivo y las estructuras observadas mediante microscopía, los cuales han sido pilares en la caracterización fúngica. No obstante, el progreso tecnológico ha permitido incorporar técnicas más avanzadas, ampliando significativamente las capacidades de identificación y reduciendo las limitaciones de los métodos convencionales (Gautam et al., 2022).

2.10.1 Métodos clásicos.

El proceso de aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos comienza con la desinfección de los explantes, que luego se siembran en placas de Petri con medios de cultivo específicos, bajo condiciones que estimulan tanto el desarrollo micelial como la esporulación. Para favorecer estos procesos, se suelen aplicar ciclos lumínicos controlados de 12 horas de luz seguidas por 12 horas de oscuridad, ajustados según las características del organismo en estudio (Agrios, 2025). La evaluación de las colonias obtenidas se realiza mediante montajes que permiten su análisis integral. A nivel macroscópico, se consideran atributos como la morfología, coloración, textura superficial y producción de pigmentos, todos ellos relevantes para la diferenciación taxonómica. En el plano microscópico, se examinan estructuras reproductivas, elementos de resistencia, tipos de esporas, así como el patrón de organización de las hifas. Estas observaciones se llevan a cabo mediante preparaciones en fresco, improntas directas o cultivos sobre portaobjetos, técnicas ampliamente reconocidas por su eficacia en la caracterización morfológica fúngica (Barnett & Hunter, 1972).

2.10.2. Métodos modernos basados en ADN.

Las metodologías moleculares han demostrado una ventaja significativa frente a los enfoques diagnósticos tradicionales, especialmente por su capacidad para discriminar entre especies fúngicas estrechamente emparentadas, lo que mejora la precisión taxonómica en contextos fitopatológicos (Gautam, 2022). Entre las herramientas más utilizadas se encuentran las variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la convencional, la cuantitativa en tiempo real, multiplex y la amplificación isotérmica, todas ellas aplicables a la detección específica de hongos patógenos. Estas técnicas suelen complementarse con la secuenciación de regiones genéticas altamente conservadas, como el espaciador transcrito interno (ITS), que permite una identificación robusta a nivel de especie. Además, se han incorporado tecnologías de última generación como la secuenciación masiva (NGS), los microarrays de ácidos nucleicos y la hibridación por captura magnética acoplada a PCR (MCH-PCR), las cuales ofrecen una sensibilidad elevada y permiten detectar patógenos tanto en tejidos vegetales con síntomas visibles como en estados latentes o asintomáticos (Hariharan et al., 2021).

2.11. Herramientas bioinformáticas en fitopatología.

En el ámbito de la fitopatología, las herramientas bioinformáticas se han consolidado como recursos fundamentales para el análisis de datos biológicos complejos, permitiendo una comprensión más profunda de los procesos patogénicos en plantas. Estas aplicaciones integran algoritmos computacionales y modelos estadísticos para examinar información genómica, transcriptómica y proteómica, con el objetivo de caracterizar las interacciones huésped-patógeno, identificar genes asociados a resistencia y generar marcadores moleculares útiles en el diagnóstico y mejoramiento genético de cultivos (Ek, 2019). El proceso de análisis bioinformático abarca diversas etapas, desde la recopilación y preprocesamiento de secuencias de ADN, ARN y

proteínas, hasta su alineación, ensamblaje y posterior interpretación funcional, lo que permite extraer conocimiento biológico relevante a partir de grandes volúmenes de datos (Aguilar et al., 2015).

2.12. Recopilación de datos.

Las plataformas de secuenciación de alto rendimiento, como Illumina y SOLiD, generan grandes volúmenes de datos genómicos que, si bien son fundamentales para el análisis molecular, pueden presentar errores sistemáticos o lecturas de baja calidad como resultado de las limitaciones propias del proceso de secuenciación (Aguilar & Falquet, 2015). Para evaluar la fidelidad de estas lecturas, se emplean archivos en formato FastQ, los cuales integran la secuencia de nucleótidos junto con valores de calidad que reflejan la probabilidad de asignación correcta de cada base (Aguilar & Falquet, 2015). La depuración inicial de estos datos se realiza mediante herramientas bioinformáticas como Trimmomatic, que permiten eliminar adaptadores, recortar extremos con baja calidad y filtrar lecturas no confiables antes de proceder al análisis genómico (Bolger et al., 2014; Aguilar & Falquet, 2015). Este control de calidad se fundamenta en parámetros como el contenido de bases GC, la detección de secuencias redundantes o contaminantes, la distribución de nucleótidos a lo largo de las lecturas y la evaluación estadística de cada base según su puntuación de calidad (Aguilar & Falquet, 2015). La Figura 10 ilustra el funcionamiento de la tecnología Illumina, una de las más utilizadas en estudios genómicos actuales (Wang, 2021).

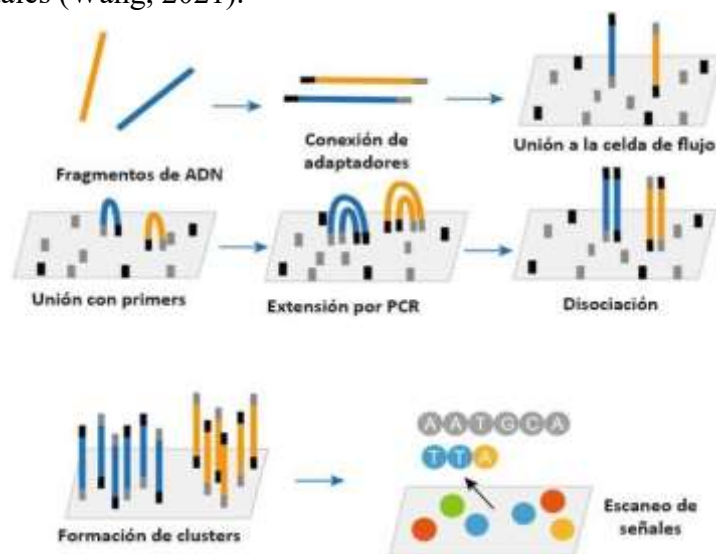


Figura 10. Etapas de secuenciación de nueva generación Illumina.

Nota. La secuenciación Illumina utiliza fragmentos de ADN con adaptadores que se fijan a una celda de flujo, donde se amplifican formando clusters; luego, mediante incorporación secuencial de nucleótidos marcados, se detectan señales fluorescentes que permiten leer la secuencia base por base (Wang, 2021).

2.13. Ensamblaje de genomas.

El ensamblaje genómico es el proceso mediante el cual se reconstruye la secuencia completa de un genoma a partir de fragmentos cortos de ADN generados por tecnologías de secuenciación, integrando cuando es posible información complementaria que facilite dicha reconstrucción. Este procedimiento puede abordarse mediante dos enfoques principales: el ensamblaje basado en referencia, que utiliza un genoma previamente caracterizado como guía, y el ensamblaje *de novo*, que se realiza exclusivamente con los datos obtenidos de la secuenciación, sin conocimiento previo de la estructura genómica

(Wajid & Serpedin, 2012). Aunque el enfoque *de novo* prescinde de una referencia directa, resulta útil considerar parámetros como el tamaño estimado del genoma, el contenido de bases GC y la proporción de regiones repetitivas, ya que estos factores influyen en la elección del algoritmo más adecuado. Los métodos de ensamblaje se clasifican según el modelo computacional que emplean (Nagarajan & Pop, 2013; Aguilar & Falquet, 2015). El algoritmo Greedy, por ejemplo, se basa en unir iterativamente los fragmentos que presentan el mayor solapamiento, aunque su aplicación es limitada debido a que no considera la estructura global del genoma y presenta dificultades para resolver regiones repetitivas extensas, siendo más apropiado para datos obtenidos mediante secuenciación Sanger (Aguilar & Falquet, 2015). Por otro lado, el modelo Overlap-Layout-Consensus (OLC) identifica pares de lecturas con solapamientos significativos y los representa en un grafo, donde cada nodo corresponde a una lectura y cada arista a un solapamiento, permitiendo algoritmos más complejos que consideran relaciones globales entre los fragmentos (Aguilar & Falquet, 2015). Finalmente, los gráficos de Bruijn constituyen una alternativa eficiente para grandes volúmenes de datos, modelando la relación entre subcadenas de longitud fija (k-mers) y representando los solapamientos mediante conexiones entre nodos, sin necesidad de representar directamente las lecturas originales (Compeau et al., 2011).

2.14. Anotación.

Una vez completado el ensamblaje genómico, el siguiente paso crítico consiste en descifrar la información biológica contenida en la secuencia reconstruida, tarea que se aborda mediante el proceso de anotación. Este procedimiento se divide en dos fases complementarias: la anotación estructural, que se enfoca en la identificación de regiones codificantes dentro del genoma, y la anotación funcional, orientada a asignar roles biológicos a los genes previamente detectados (Salzberg, 2019; Aguilar & Falquet, 2015). Para la etapa estructural, se emplean dos enfoques principales. El primero corresponde al método *de novo*, que analiza patrones de secuencia para inferir la presencia de elementos codificantes mediante la detección de motivos característicos. El segundo enfoque se basa en la comparación con genomas previamente anotados, permitiendo identificar regiones conservadas entre organismos relacionados y facilitar la predicción de funciones génicas (Aguilar & Falquet, 2015).

2.15. Genómica comparativa.

La genómica comparativa constituye una herramienta esencial en el análisis genético moderno, ya que permite examinar secuencias completas de ADN y conjuntos génicos entre múltiples organismos con el fin de identificar similitudes y diferencias estructurales y funcionales. Esta aproximación facilita la localización de genes clave responsables de la variabilidad fenotípica, lo que resulta fundamental para comprender los mecanismos que regulan rasgos específicos en organismos tanto unicelulares como multicelulares (Sivashankari et al., 2007). En el ámbito fitopatológico, esta disciplina ha cobrado especial relevancia al permitir la detección y caracterización de efectores, proteínas secretadas por patógenos que interfieren con las respuestas inmunes del hospedero. Mediante la comparación de genomas entre especies relacionadas, es posible identificar efectores conservados o exclusivos, analizar su evolución funcional y obtener información estratégica para el diseño de cultivos resistentes y métodos de control más eficaces frente a enfermedades agrícolas (Bates et al., 2024).

3. METODOLOGÍA.

La metodología empleada se inició con la obtención de la secuencia genómica reportada por Canchignia et al. (2025), seguida por un proceso de depuración de los datos crudos de secuenciación, con el objetivo de garantizar su calidad antes del análisis. Posteriormente, se procedió al ensamblaje del genoma utilizando dos procedimientos distintos. Una vez ensamblado, se realizó la etapa de anotación, que permitió analizar secuencias únicas y detectar genes efectores asociados con la patogenicidad, como se representa en la Figura 11.

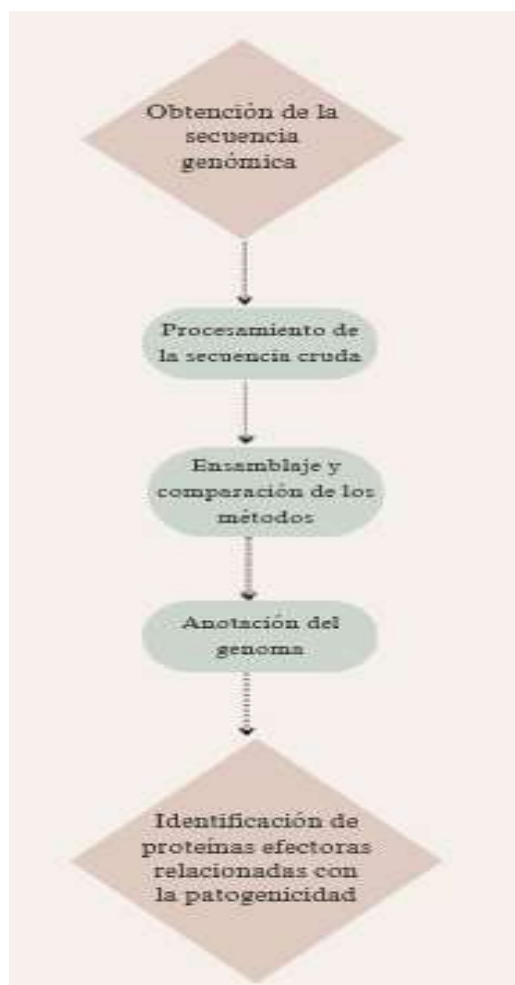


Figura 11. Diagrama de la metodología.

Nota. Representa las cinco etapas del estudio, desde la obtención y procesamiento de la secuencia cruda, pasando por el ensamblaje y anotación del genoma, hasta la identificación de proteínas efectoras asociadas a la patogenicidad.

3.1. Obtención de la secuencia genómica.

La secuencia genómica correspondiente a *Lasiodiplodia laeliocattleyae* (LT1A) utilizada en este estudio proviene del trabajo desarrollado por Canchignia et al. (2025) la cual fue donada y con permiso de los autores. El aislamiento de esta cepa se realizó en enero de 2021 en el Campus Experimental La María, perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en el cantón Mocache (coordenadas S 1° 4' 46,794", O 79°30' 9,68") (Canchignia et al, 2025). El material biológico fue obtenido a partir de mazorcas de cacao de la variedad CCN 51, cultivadas bajo condiciones tradicionales. La

selección de los explantes se basó en la presencia de síntomas característicos de infección por *Lasiodiplodia*, como lesiones necróticas de tonalidad marrón oscuro, lo que permitió garantizar la representatividad del patógeno.

3.2. Calidad de la secuencia.

El análisis inicial del flujo de trabajo comenzó con la evaluación de la calidad de las lecturas crudas mediante la herramienta FastQC v0.12.1, implementada en la plataforma KBase. Esta etapa permitió obtener una caracterización detallada del archivo FASTQ original, considerando parámetros como la distribución de puntuaciones de calidad por posición, el porcentaje de bases GC y N, la frecuencia de secuencias duplicadas y la presencia de adaptadores residuales. Estos indicadores ofrecieron una perspectiva integral sobre el estado de los datos antes de aplicar cualquier procedimiento de depuración. Posteriormente, se utilizó Trimmomatic como herramienta de filtrado, y FastQC fue nuevamente aplicado para verificar la mejora en la calidad de las lecturas tras el recorte, asegurando la confiabilidad de los datos para las etapas posteriores del análisis genómico.

3.3. Procesamiento de la secuencia cruda.

Para mejorar la calidad de las lecturas obtenidas por secuenciación, se aplicó un proceso de recorte utilizando Trimmomatic v0.39 dentro de la plataforma KBase, utilizando los parámetros predeterminados que permitieron preservar las regiones internas de alta calidad. El procedimiento comenzó con la identificación de adaptadores residuales, mediante la búsqueda de fragmentos cortos que fueron alineados contra las lecturas originales (Bolger et al., 2014). Aquellos alineamientos que alcanzaron una puntuación igual o superior a 15 fueron considerados suficientemente confiables y eliminados para evitar interferencias en los análisis posteriores. A lo largo de cada lectura, se aplicó una ventana deslizante que calculaba el promedio de calidad de las bases contenidas; si dicho valor descendía por debajo del umbral establecido de 15, se recortaba la lectura desde ese punto, eliminando las regiones de baja calidad sin comprometer la integridad de las secuencias restantes (Bolger et al., 2014). Además, se aplicó una ventana de 4 nucleótidos para depurar secuencias inconsistentes, y aquellas lecturas que, tras el recorte, no superaron la longitud mínima de 36 pares de bases fueron descartadas. Este conjunto de pasos aseguró la fiabilidad de los datos para las etapas posteriores del análisis genómico, como se representa en la Figura 12 (Bolger et al., 2014).

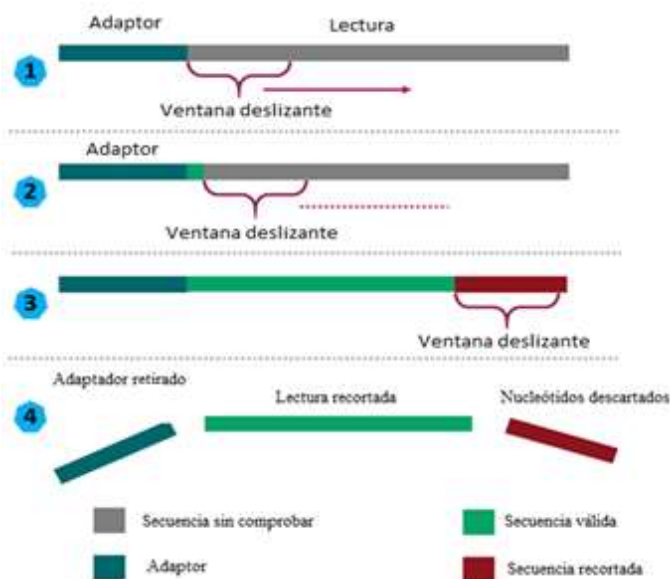


Figura 12. Pasos realizados en Trimmomatic v0.36.

Nota. Proceso para eliminar adaptadores y conservar secuencias válidas mediante una ventana deslizante, se identifican y recortan nucleótidos no deseados, asegurando la calidad de las lecturas para análisis posteriores (Bolger et al., 2014).

3.4. Ensamblaje.

Se llevaron a cabo dos ensamblajes del genoma de *Lasiodiplodia laeliocattleyae* en la plataforma KBase, utilizando las lecturas previamente depuradas. El primero fue en el ensamblador SPAdes v3.15.3, el cual se basa en la construcción de múltiples grafos de Bruijn con distintos tamaños de k-mers. Este método permite detectar y eliminar lecturas quiméricas, tras lo cual se realiza el mapeo de los bordes del grafo para generar secuencias contiguas (contigs) con alta fidelidad estructural (Prjibelski et al., 2020). El segundo, se aplicó IDBA-UD v1.1.3, un ensamblador que también utiliza grafos de Bruijn, pero mediante un enfoque iterativo. El proceso inicia con k-mers cortos que se incrementan progresivamente, refinando el grafo en cada iteración. Durante este refinamiento, se eliminan contigs con bajo soporte, lo que contribuye a reducir la complejidad del grafo y optimizar la precisión del ensamblaje final (Peng et al., 2012).

3.5. Comparación de ensamblajes.

Una vez completados los ensamblajes genómicos, se procedió a comparar su rendimiento con el objetivo de identificar el método más eficiente. Para ello, se analizaron métricas clave como N50, L50 y la longitud de los contigs generados por cada ensamblaje. Esta comparación se llevó a cabo mediante la herramienta Compare Assembled Contig Distributions (v1.1.2), integrada en la plataforma KBase, la cual permite calcular y visualizar dichos parámetros de forma estandarizada, facilitando la interpretación comparativa entre ensambladores (Barnes et al., 2023).

3.6. Anotación.

El archivo FASTA resultante con mejor ensamblaje fue utilizado como base para el proceso de anotación genómica. La anotación estructural se ejecutó mediante Funannotate v1.8.17, instalado en la supercomputadora de CEDIA, con transferencia de archivos gestionada a través de WinSCP. El procedimiento comenzó con el enmascaramiento de secuencias repetitivas, etapa esencial para evitar interferencias en la predicción génica, siguiendo las recomendaciones metodológicas descritas por Kirkland et al. (2023). Simultáneamente, se normalizaron los encabezados del archivo FASTA (.fa), garantizando compatibilidad en los pasos posteriores. La predicción ab initio de genes se realizó integrando algoritmos como Augustus, SNAP y GlimmerHMM, lo que permitió identificar regiones codificantes y definir con mayor precisión los límites entre exones e intrones. Finalmente, se incorporaron modelos estructurales específicos para mejorar la resolución de las anotaciones, conforme a los criterios establecidos por Kirkland et al. (2023).

3.7. SignalP.

Para detectar proteínas con potencial de secreción dentro del conjunto de modelos estructurales generados por Funannotate, se aplicó SignalP v6.0 disponible en su plataforma web oficial, herramienta especializada en la predicción de péptidos señal en secuencias proteicas (Nielsen et al., 1997; Teufel et al., 2022). El análisis se realizó sobre el archivo FASTA que contiene las proteínas anotadas, derivadas directamente del proceso de anotación estructural. Un parámetro clave en la ejecución de SignalP fue la

selección del dominio taxonómico “Eukarya”, dado que el organismo en estudio corresponde a un hongo filamentosos eucariota. Esta elección permite restringir la predicción al tipo Sec/SPI, asociado a la vía clásica de secreción y al procesamiento por peptidasa tipo I, excluyendo señales alternativas como Tat o LIPO, que no son relevantes en este contexto (Figura 13) (Nielsen et al., 1997; Teufel et al., 2022). Se optó por el formato extendido de salida, el cual proporciona detalles como la probabilidad de presencia de péptido señal, la localización del sitio de corte y las puntuaciones generadas por los modelos. Asimismo, se activó el modo de predicción lenta, recomendado para análisis estructurales complejos, ya que incrementa la precisión en la delimitación de los péptidos señal y sus sitios de procesamiento, aunque requiere mayor tiempo computacional (Nielsen et al., 2019; Teufel et al., 2022).

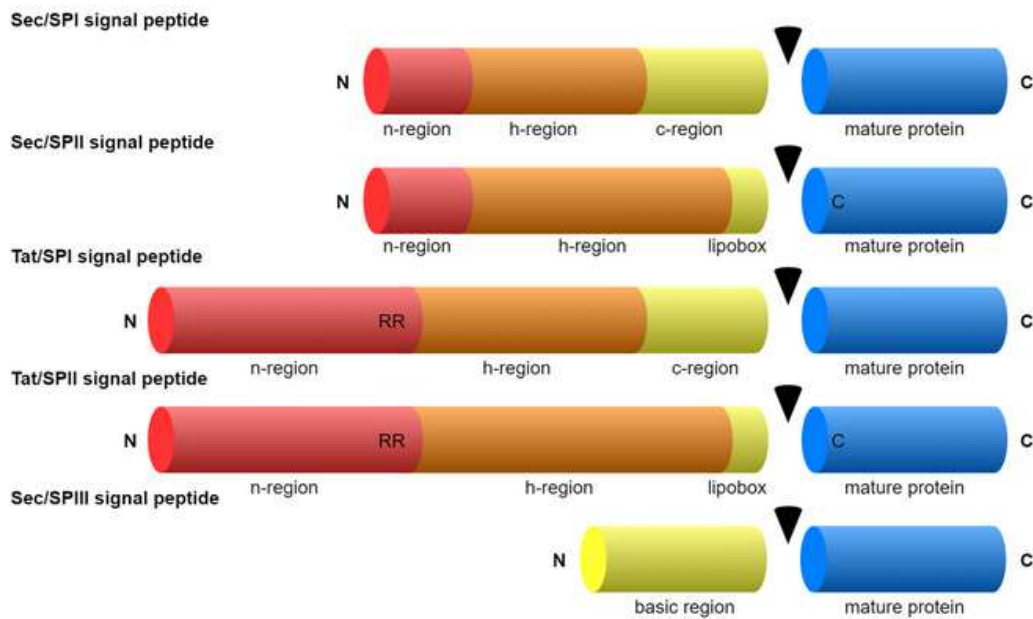


Figura 13. Tipos de péptidos señal (SP).

Nota. Rutas de secreción y procesamiento de proteínas en sistemas biológicos (Nielsen et al., 2019).

3.8. TMHMM.

Como parte del filtrado complementario de proteínas con potencial de secreción, se aplicó TMHMM v2.0 disponible en su plataforma web oficial, una herramienta basada en modelos ocultos de Markov que permite predecir la presencia y disposición de dominios transmembrana en secuencias proteicas (DTU Health Tech, 2001). Este análisis se realizó sobre el conjunto de proteínas previamente clasificadas por SignalP v6.0 como portadoras de péptido señal tipo Sec/SPI. TMHMM emplea modelos entrenados con proteínas de topología conocida para identificar regiones hidrofóbicas que atraviesan la membrana celular, así como para inferir la orientación de los extremos N- y C-terminales, ya sea hacia el interior o el exterior de la célula. La metodología consistió en ingresar las secuencias en formato FASTA y evaluar si alguna de ellas presentaba hélices transmembrana posteriores al sitio de corte del péptido señal. Este paso resulta esencial para discriminar entre proteínas verdaderamente secretadas y aquellas que, a pesar de

poseer péptido señal, permanecen ancladas en la membrana plasmática o en compartimentos internos (DTU Health Tech. (n.d.). TMHMM 2.0, 2001).

3.9. EffectorP.

Para detectar proteínas efectoras en el genoma de *Lasiodiplodia laeliocattleyae*, se empleó EffectorP v3.0 disponible en su plataforma web oficial, una herramienta especializada en la predicción de efectores en hongos y oomicetos a partir de sus secretomas (Sperschneider & Dodds, 2021). Este software se basa en algoritmos de aprendizaje automático entrenados con conjuntos de proteínas efectoras previamente caracterizadas, lo que permite evaluar el potencial funcional de las proteínas secretadas y estimar su localización dentro del hospedero. El análisis se aplicó sobre las secuencias proteicas que habían sido previamente filtradas mediante SignalP, es decir, aquellas que contienen péptido señal tipo Sec/SPI y, por tanto, presentan capacidad de secreción. EffectorP analiza propiedades como la composición de aminoácidos, la distribución de cargas, la hidrofobicidad y la presencia de motivos conservados, asignando una probabilidad de función efectora a cada proteína. El modelo de clasificación distingue dos tipos funcionales: efectores con localización citoplasmático y efectores con localización apoplástica (Sperschneider & Dodds, 2021). El porcentaje de efectores previstos refleja la proporción de proteínas secretadas que fueron clasificadas como candidatas a modular procesos del hospedero, ya sea interfiriendo con rutas celulares, activando respuestas inmunes o facilitando la colonización. Dentro de este conjunto, EffectorP realiza una segmentación adicional según la localización estimada: los efectores citoplasmáticos previstos corresponden a proteínas que, tras ser secretadas, se espera que ingresen al citoplasma de la célula hospedera, donde pueden interactuar con componentes intracelulares clave como factores de transcripción, proteínas de señalización o elementos del sistema de defensa y los efectores con localización apoplástica actúan fuera de las células del hospedero, específicamente en el apoplasto, que incluye la pared celular y el espacio extracelular y su función es inhibir enzimas de defensa vegetal, bloquean la detección del patógeno, modulan el pH o la composición química del apoplasto, favorecen la penetración del hongo e inducen necrosis localizada. (Sperschneider & Dodds, 2021).

3.10. BLASTP.

Con el objetivo de evaluar la homología funcional de las proteínas efectoras predichas mediante EffectorP 3.0, se realizó un análisis de similitud utilizando el algoritmo BLASTP, disponible en la plataforma web del NCBI. Esta herramienta permite comparar secuencias proteicas contra bases de datos de referencia, facilitando la identificación de ortólogos en organismos relacionados y la inferencia de funciones conservadas (National Center for Biotechnology Information, 2025; Lu et al., 2024).

El análisis se llevó a cabo a partir de un archivo en formato FASTA que contenía las secuencias aminoacídicas de los efectores seleccionados. Estas proteínas fueron previamente filtradas mediante SignalP, para confirmar la presencia de señales de secreción tipo SP(Sec/SPI), y TMHMM, para excluir aquellas con múltiples dominios transmembrana. Posteriormente, se aplicó EffectorP, lo que permitió clasificar las proteínas como efectores apoplásticos o citoplasmáticos, priorizando aquellas con mayor probabilidad de implicación en procesos patogénicos (Lu et al., 2024).

Para maximizar la sensibilidad del análisis, se utilizó como base de datos el repositorio secuencias proteicas no redundantes (nr), el cual agrupa secuencias proteicas de diversos

organismos, eliminando duplicaciones y optimizando la eficiencia de búsqueda (National Center for Biotechnology Information, 2025; Lu et al., 2024). Se estableció como parámetro de búsqueda un organismo filogenéticamente relacionado con *Lasiodiplodia laeliocattleyae*, lo que permitió restringir los resultados a un contexto taxonómico relevante y facilitar la interpretación funcional de las similitudes encontradas (Lu et al., 2024).

BLASTP genera alineamientos locales entre la secuencia de consulta y las secuencias de la base de datos, proporcionando métricas como el score de alineamiento, porcentaje de identidad, cobertura y valor E (E-value). Este último indica la probabilidad de que la similitud observada ocurra por azar, siendo valores inferiores a $1e-5$ considerados como evidencia significativa de homología. Este enfoque permitió identificar proteínas efectoras con similitud funcional en organismos relacionados, aportando información valiosa sobre su posible rol biológico, localización subcelular y participación en mecanismos de patogenicidad (National Center for Biotechnology Information, 2025; Lu et al., 2024).

3.11. OrthoVenn3.

Para el análisis comparativo del repertorio proteico entre *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia laeliocattleyae*, se empleó la plataforma web OrthoVenn3 versión 3, diseñada para la identificación y visualización de grupos ortólogos entre múltiples especies. Esta herramienta permite explorar relaciones evolutivas, distribución de clusters compartidos y específicos, así como acceder a la anotación funcional de las proteínas involucradas (Wang et al., 2015; Wang et al., 2023).

Los archivos FASTA con las secuencias proteicas predichas fueron cargadas en la plataforma, asegurando previamente su validación estructural. Para el agrupamiento ortológico se seleccionó el algoritmo OrthoMCL, que combina alineamientos BLASTP con el método de agrupamiento MCL (Markov Cluster Algorithm), permitiendo una detección sensible de ortólogos incluso en presencia de duplicaciones génicas o divergencias evolutivas (Li et al., 2003). El parámetro de significancia se estableció en un E-value de $1e-5$, con el fin de garantizar alta confianza en las relaciones de similitud. Durante el análisis, se activaron los módulos “Annotation” y “Cluster Relationship”. El primero permitió acceder a la anotación funcional de los clusters mediante términos Gene Ontology (GO) y dominios InterPro, facilitando la identificación de proteínas relacionadas con secreción, interacción hospedero-patógeno y funciones de efectores. El segundo módulo generó diagramas de Venn interactivos que evidenciaron la distribución de clusters compartidos y exclusivos entre las especies analizadas, lo cual fue fundamental para inferir la presencia de efectores núcleo conservados y efectores adaptativos específicos (Wang et al., 2023).

Esta metodología permitió establecer correlaciones entre la conservación de ciertos grupos proteicos y su posible implicación en la patogenicidad diferencial de las especies, aportando evidencia funcional para la caracterización de efectores candidatos en el contexto de la interacción fúngica con el hospedador vegetal (Wang et al., 2023).

4. RESULTADOS.

4.1. Procesamiento de la secuencia cruda.

Previo al proceso de filtrado, se realizó el análisis en FastQC que reveló que las secuencias obtenidas del archivo LT1A_RNI presentaban una calidad general adecuada. Se registraron más de 15,101,161 de lecturas, con longitudes comprendidas entre 100 y 150 pares de bases, y una composición GC del 52 %, consistente con lo esperado para genomas fúngicos. En la figura 14, los valores de calidad por posición mostraron puntuaciones Phred superiores a 30 en la mayoría de las posiciones, más del 90 % de las lecturas superan ese umbral, lo que indica una baja probabilidad de error por base. Además, no se detectaron secuencias marcadas como de baja calidad, y el nivel de duplicación fue aceptable, con un 84,97 % de secuencias únicas tras eliminar duplicados, lo que sugiere una buena diversidad en el conjunto de datos que se puede observar en la figura 15.

Posteriormente, se aplicó el programa Trimmomatic con el objetivo de eliminar adaptadores, recortar extremos de baja calidad y depurar las lecturas para mejorar la confiabilidad de los análisis posteriores. En la figura 16 el procesamiento incluyó un total de 15,101,161 pares de lecturas, de los cuales el 98,5 % se conservaron como pares completos (14,872,000). Un pequeño porcentaje fue retenido como lecturas individuales (Forward 1,3 % y Reverse 0,1 %) y prácticamente no hubo una eliminación significativa de lecturas, ya que únicamente 5,645 pares fueron descartados, lo que representa un porcentaje de 0,0 %, reflejando la baja incidencia de eliminación en el conjunto de lecturas. Estos resultados indican que el conjunto de datos tenía una calidad inicial elevada y que el tratamiento fue conservador, preservando la mayoría de las lecturas útiles para el análisis.

Una vez finalizado el filtrado, se realizó una segunda evaluación con FastQC sobre el archivo LT1A_Trim_paired. Se observó una ligera reducción en la longitud mínima de las secuencias, ahora entre 36 y 150 pares de bases, producto del recorte de extremos. Sin embargo, en la figura 17 la calidad por posición se mantuvo elevada, con valores Phred superiores a 30 en casi toda la longitud de las lecturas. La composición GC se mantuvo estable en 52 %, y no se detectaron secuencias de baja calidad. En la figura 18, el nivel de duplicación también se mantuvo prácticamente igual (84,90 %), lo que indica que el tratamiento no introdujo sesgos significativos en la diversidad de las lecturas.

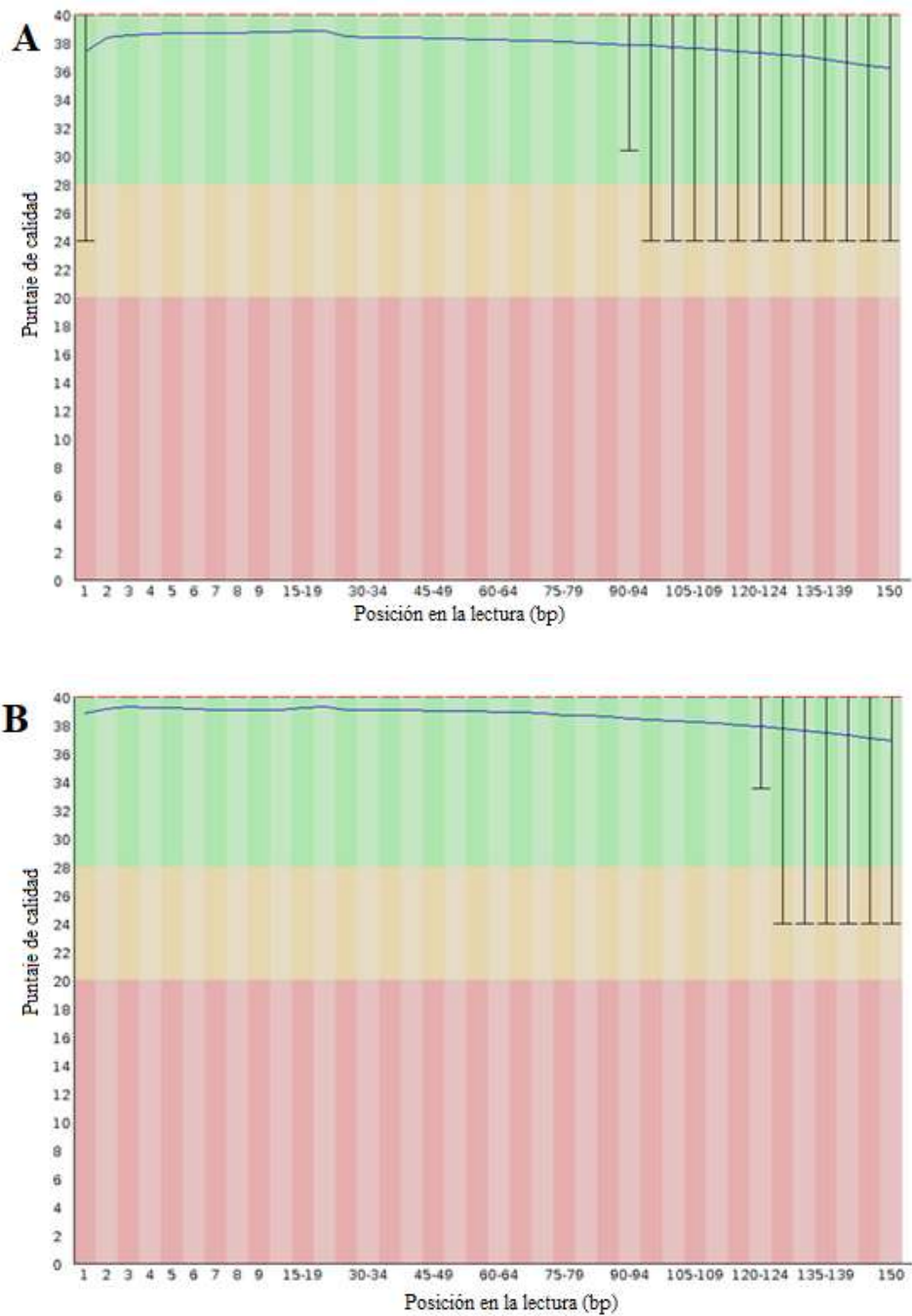


Figura 14. Resultados de calidad por base antes de Trimmomatic.

Nota. (A) Indica los resultados de calidad por base obtenidos para las lecturas forward. (B) Indica los resultados de calidad por base para las lecturas reverse. Las gráficas fueron generadas por el software FastQC de la plataforma KBase.

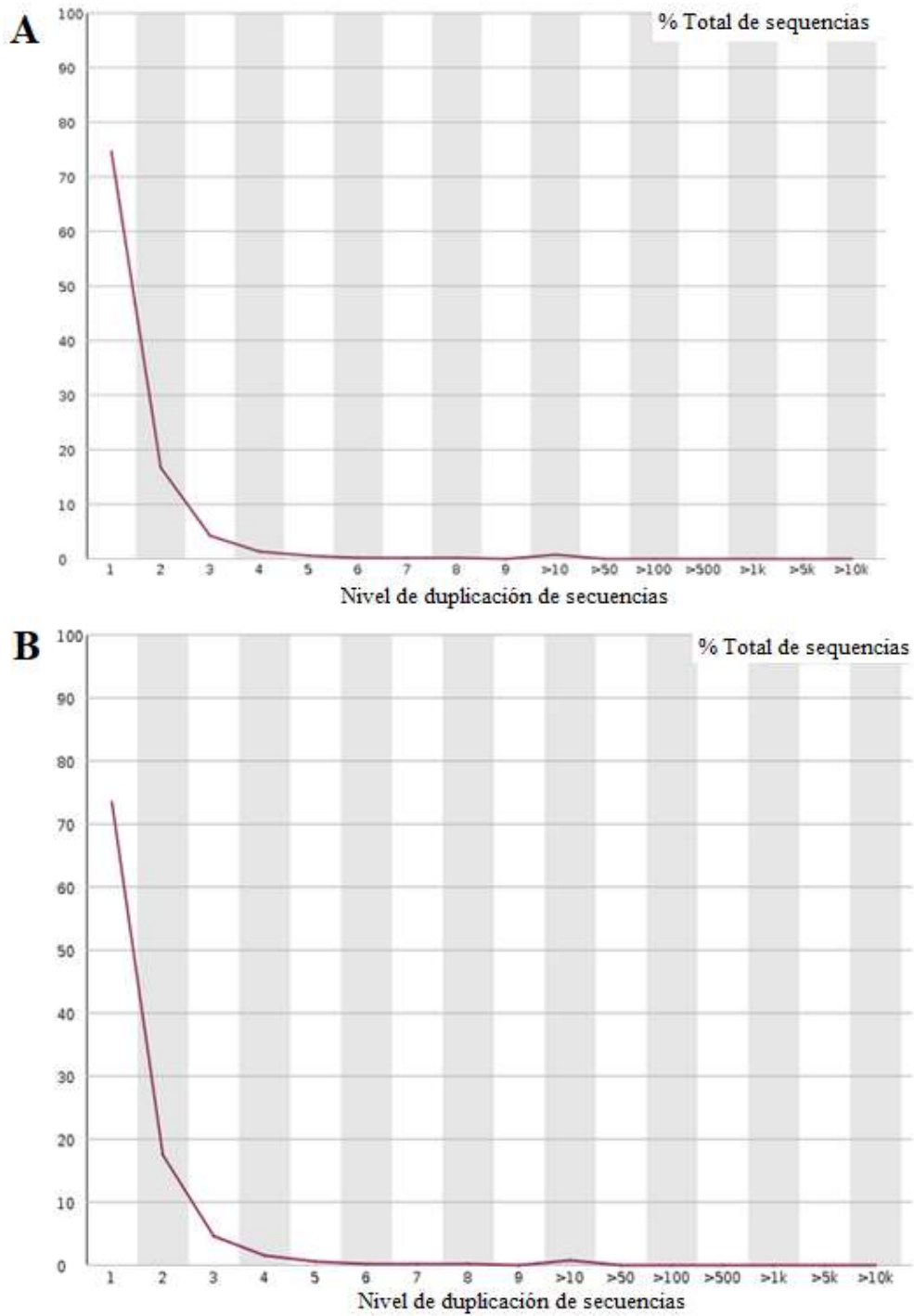
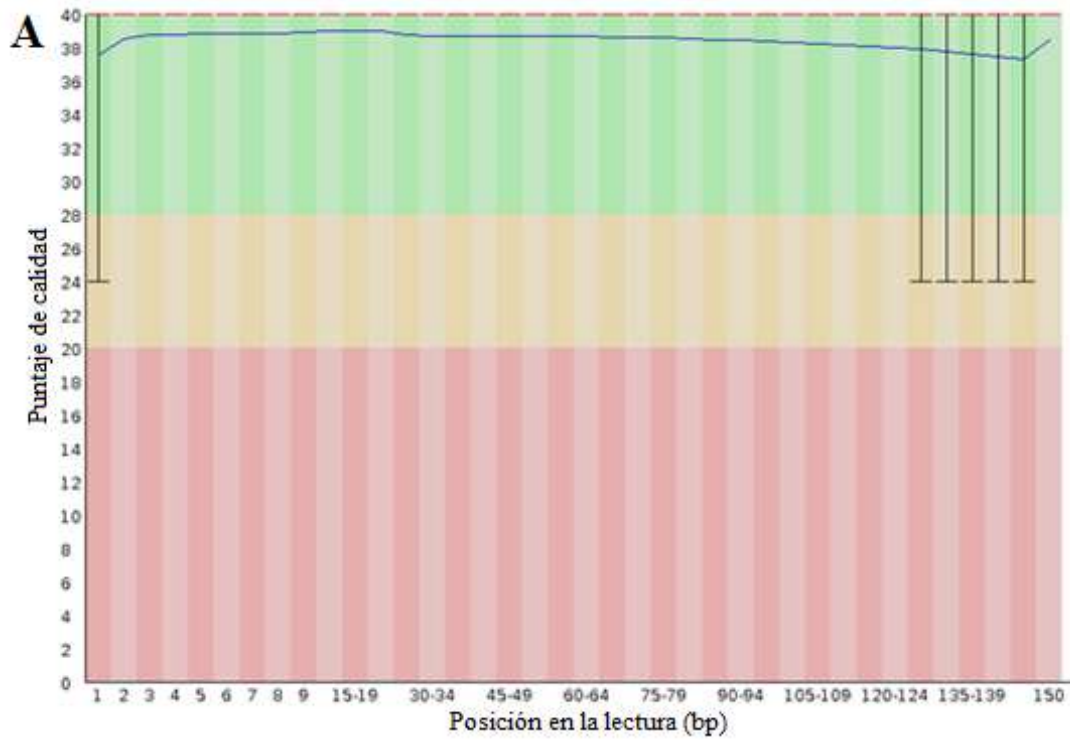


Figura 15. Antes de Trimmomatic los niveles de duplicación.

Nota. (A) Resultados de niveles de duplicación para lecturas forward. (B) Resultados de niveles de duplicación para lecturas reverse. Las gráficas fueron generadas por el software FastQC de la plataforma KBase.

Input Read Pairs	15101161	(100.0%)	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: #4682B4;"></div>
Both Surviving	14872000	(98.5%)	<div style="width: 98.5%; height: 10px; background-color: #4682B4;"></div>
Forward Only Surviving	201015	(1.3%)	<div style="width: 1.3%; height: 10px; background-color: #90EE90;"></div>
Reverse Only Surviving	22501	(0.1%)	<div style="width: 0.1%; height: 10px; background-color: #FFDAB9;"></div>
Dropped	5645	(0.0%)	<div style="width: 0.0%; height: 10px; background-color: #FF6347;"></div>

Figura 16. Resultados de Trimmomatic. Generado en la plataforma KBase.



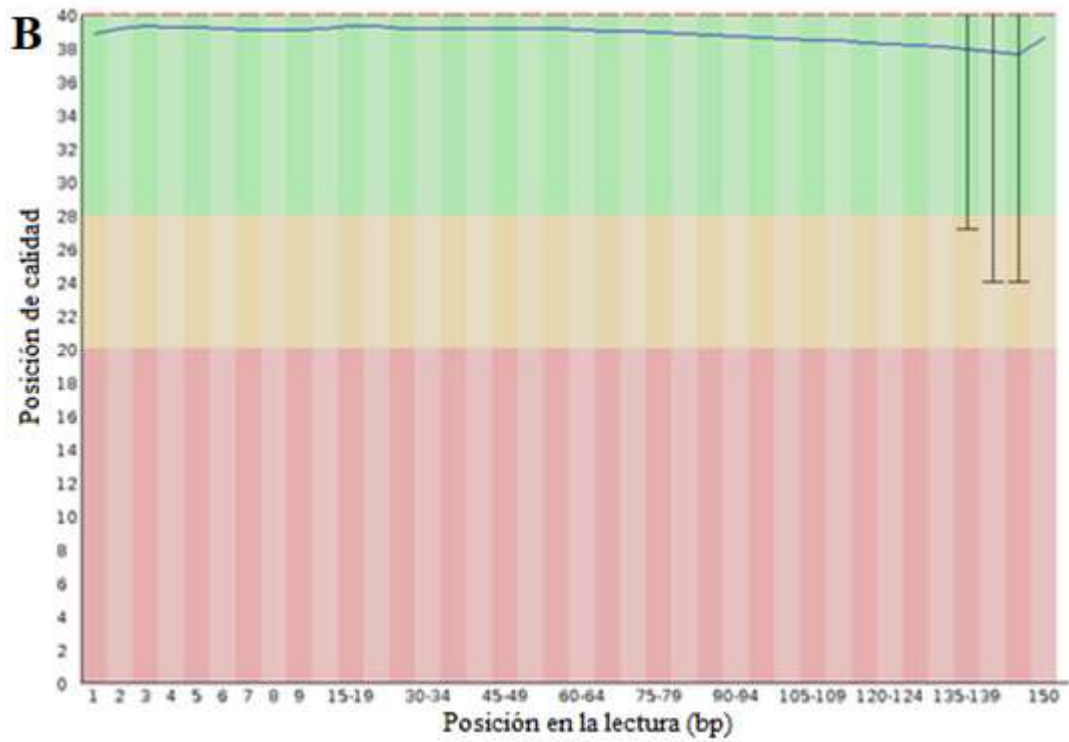
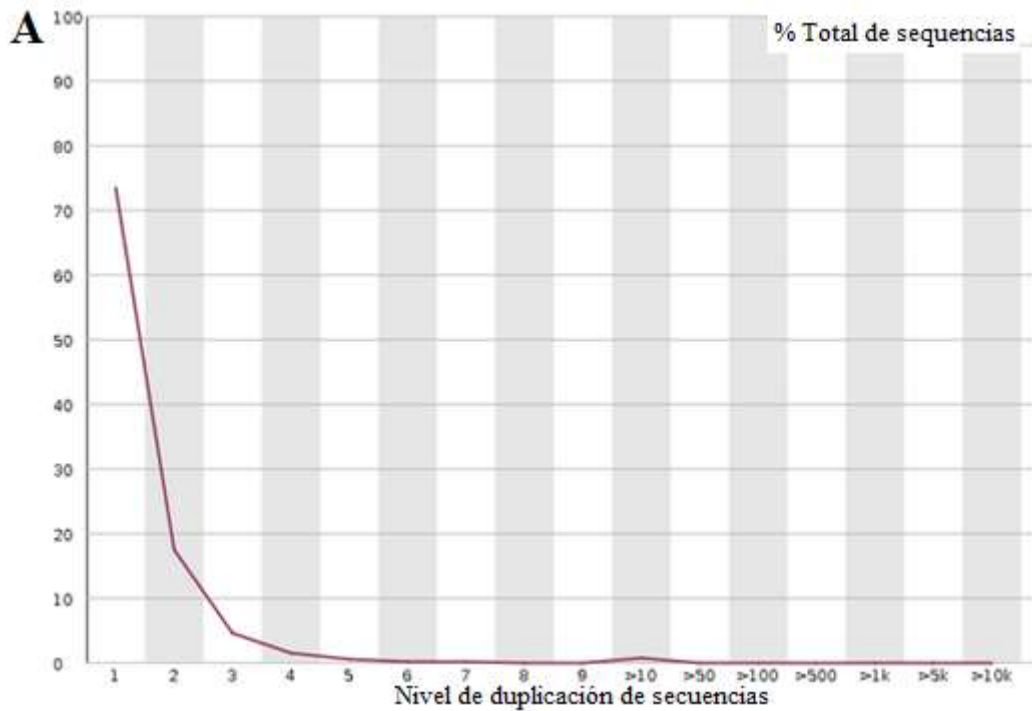


Figura 17. Resultados de calidad por base después de Trimmomatic.

Nota. (A) Indica los resultados de calidad por base obtenidos para las lecturas forward. (B) Indica los resultados de calidad por base para las lecturas reverse. Las gráficas fueron generadas por el software FastQC de la plataforma KBase



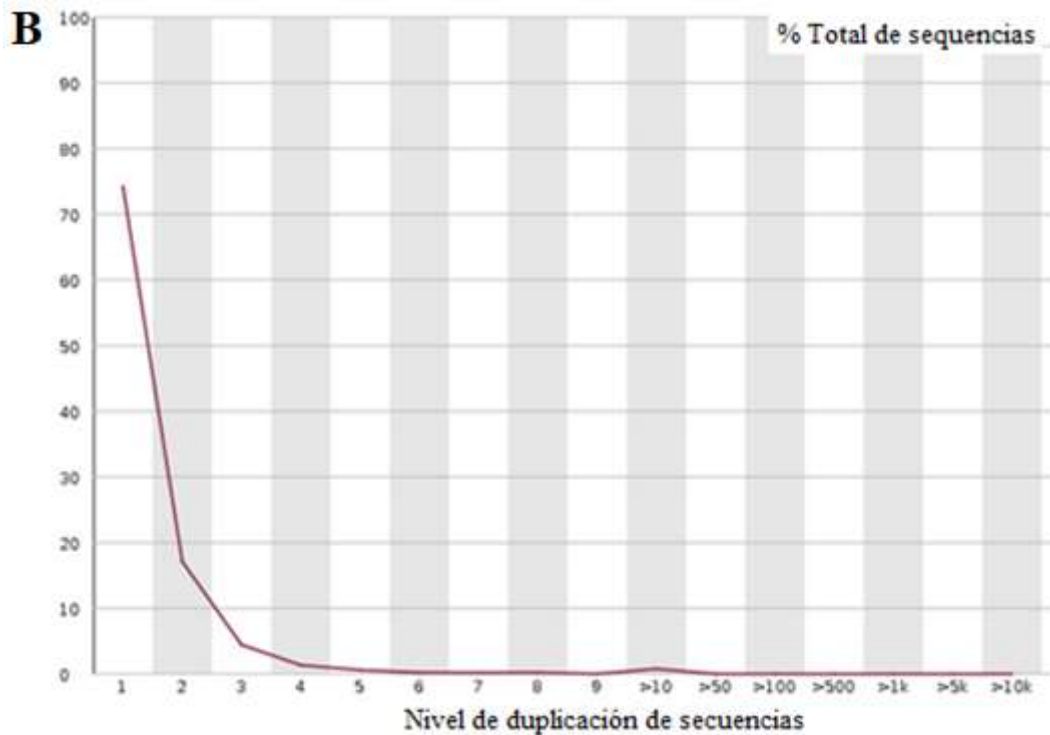


Figura 18. Después de Trimmomatic los niveles de duplicación.

Nota. (A) Resultados de niveles de duplicación para lecturas forward. (B) Resultados de niveles de duplicación para lecturas reverse. Las gráficas fueron generadas por el software FastQC de la plataforma KBase.

4.2. Ensamblaje y comparación de los métodos.

Para evaluar la calidad del ensamblaje genómico de la muestra LT1A, se realizó una comparación entre los contigs generados por los algoritmos SPAdes e IDBA, como se muestra en la figura 19. Se emplearon métricas estándar como N50, L50 y la longitud del contig más largo, las cuales permiten estimar la continuidad, fragmentación y cobertura del ensamblaje, aspectos fundamentales para su posterior uso en anotación estructural y análisis funcional.

El ensamblaje generado con SPAdes produjo un total de 2,145 contigs, lo que refleja una fragmentación moderada del genoma. La longitud total alcanzó los 45,476,222 pares de bases (pb), con un contenido GC de 54,56 %. El valor de N50 fue de 580,885 pb, lo que indica que al menos el 50 % del genoma ensamblado está contenido en contigs de esa longitud o superior. Este valor sugiere una buena continuidad, ya que las regiones más extensas del genoma fueron reconstruidas con alta fidelidad. El parámetro L50, correspondiente al número mínimo de contigs necesarios para cubrir el 50 % del ensamblaje, fue de 23 contigs, lo que evidencia una baja fragmentación y una alta concentración de información en contigs extensos. Además, el contig más largo ensamblado por SPAdes alcanzó los 2,365,384 pb, lo que demuestra la capacidad del algoritmo para reconstruir regiones genómicas de gran tamaño sin interrupciones.

Por otro lado, el ensamblaje realizado con IDBA generó 552 contigs, lo que representa una menor fragmentación. Sin embargo, la longitud total del ensamblaje fue ligeramente inferior, con 43,849,319 pb, y el contenido GC fue de 54,74 %, similar al obtenido con SPAdes. El valor de N50 fue de 180,065 pb, considerablemente menor que el obtenido con SPAdes, lo que indica que los contigs generados por IDBA son, en promedio, más cortos, lo que puede reflejar una mayor fragmentación del genoma ensamblado. El valor de L50 fue de 71 contigs, lo que implica que se requieren más fragmentos para cubrir el 50 % del genoma, reflejando una menor continuidad, en comparación con SPAdes. El contig más largo ensamblado por IDBA fue de 638,989 pb, es notablemente inferior al contig más largo obtenido con SPAdes.

En conjunto, estos resultados sugieren que el ensamblaje generado por SPAdes ofrece una mayor continuidad y menor fragmentación, lo que lo convierte en la opción más robusta para análisis que requieren reconstrucción precisa de regiones genómicas extensas, como la anotación de genes completos y predicción de efectores.

En la figura 20 se observa que la curva del ensamblaje con SPAdes sube más rápido que la de IDBA, lo que indica que SPAdes genera contigs más largos desde el inicio; la pendiente más pronunciada refleja una mayor continuidad en el ensamblaje, mientras que IDBA requiere más contigs para alcanzar la misma longitud acumulada.

		BEST				WORST	
ASSEMBLY	LONGEST CONTIG (bp)	Nx (Lx)	LENGTH (bp)	NUM CONTIGS	SUM LENGTH (bp)		
LT1A_SPAdes Assembly	2365384	N50: 580885	$\geq 10^6$	8	11659748		
		L50: (23)	$\geq 10^5$	84	41480907		
		N75: 321259	$\geq 10^4$	143	43660446		
		L75: (48)	$\geq 10^3$	384	44391195		
		N90: 125226	≥ 500	2145	45476222		
		L90: (79)	≥ 1	2145	45476222		
LT1A_IDBA contigs	638989	N50: 180065	$\geq 10^6$	0	0		
		L50: (71)	$\geq 10^5$	146	32650522		
		N75: 98998	$\geq 10^4$	380	43069810		
		L75: (149)	$\geq 10^3$	552	43849319		
		N90: 51759	≥ 500	552	43849319		
		L90: (240)	≥ 1	552	43849319		

Figura 19. Resultados de los ensamblajes utilizados SPAdes e IDBA.

Nota. Generado en la plataforma KBase.

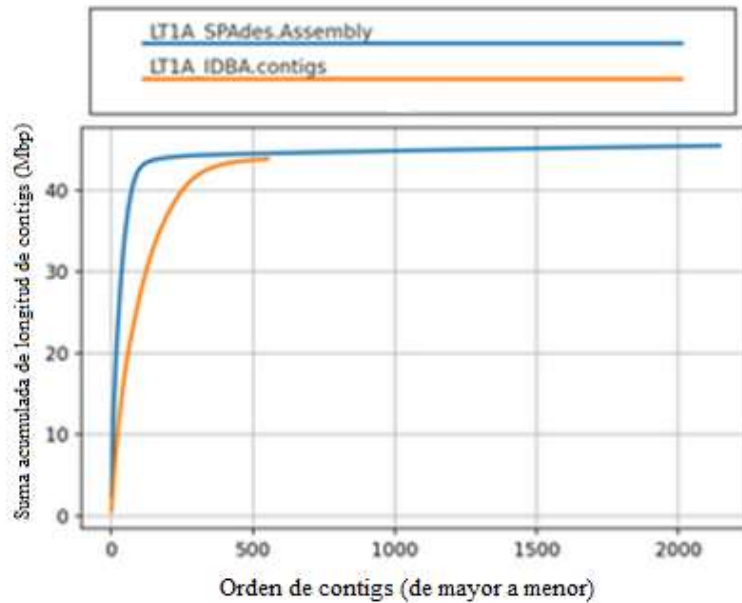


Figura 20. El gráfico muestra la curva acumulada de los contigs en Mbp.

Nota. La figura fue obtenida del software Compare Assembled Contig Distributions v1.1.2.

4.3. Anotación del genoma con Funannotate.

Antes de realizar la anotación del genoma con la herramienta Funannotate se realizó el enmascaramiento de las secuencias que se obtuvieron después del ensamblaje. Funannotate permitió identificar en LT1A un número de scaffolds de 2,145, un tamaño de ensamblaje de 45,476,222 pb y se hizo el enmascaramiento de 1.841.780 pb que representa el 4,05 % de la longitud del ensamblaje generado con SPAdes.

Durante el proceso de anotación estructural con Funannotate, se integraron múltiples fuentes de predicción génica para generar un conjunto robusto de modelos. Las herramientas utilizadas incluyeron Augustus, HiQ, GlimmerHMM y SNAP, cada una aportando una cantidad significativa de predicciones: GlimmerHMM generó 14,235 modelos, SNAP contribuyó con 13,850, Augustus con 10,944 y HiQ con 45, sumando un total de 39,074 modelos de genes como se observa en la tabla 1. Esta diversidad de fuentes permite capturar distintos tipos de evidencia y mejorar la cobertura del genoma. Como resultado, EVM generó 13,471 modelos génicos consolidados. A partir de estos, se construyeron archivos FASTA de proteínas, que luego fueron sometidos a un filtrado riguroso. Se eliminaron modelos menores a 50 aminoácidos, aquellos que se solapaban con elementos transponibles y los que cruzaban regiones de ensamblaje con gaps. En total, se descartaron 52 modelos: 47 por ser transposones, 5 por cruzar gaps y ninguno por longitud insuficiente, dejando un conjunto final de 13,419 modelos válidos. Como parte de los resultados con Funannotate se obtuvieron archivos en formato Genbank (extensión .gbk), gff3 y tbl.

Tabla 1. Número de modelos de genes por método de predicción.

Predictor	Nro. de modelos
Augustus	10,944
Augustus HiQ	45
GlimmerHMM	14,235
SNAP	13,850
Total	39,074

4.4. SignalP.

La clasificación de las secuencias proteicas según la presencia de péptido señal constituye un paso fundamental en la identificación de proteínas con potencial de secreción. En la figura 21 del archivo .txt generado por la plataforma, se observa la categorización de las proteínas anotadas en dos grupos principales: como SP (Signal Peptide) y aquellas clasificadas como OTHER. Las proteínas del grupo SP fueron consideradas como candidatas a ser secretadas al medio extracelular, dado que poseen péptido señal tipo Sec/SPI, lo que sugiere su tránsito a través de la vía clásica de secreción. Por el contrario, las secuencias etiquetadas como OTHER no presentan características compatibles con secreción convencional y, por tanto, fueron excluidas del análisis posterior.

A partir de esta clasificación, se generó un archivo FASTA filtrado que contiene exclusivamente las secuencias correspondientes al grupo SP. Este conjunto representa el secretoma potencial del organismo en estudio, y constituye la base para análisis posteriores orientados a la identificación de proteínas efectoras, predicción de dominios funcionales y evaluación de patrones evolutivos. La depuración de las secuencias no secretadas permite enfocar los esfuerzos analíticos en aquellas proteínas que tienen mayor probabilidad de participar en la interacción hospedero-patógeno, optimizando así la precisión de los modelos predictivos y la interpretación funcional de los resultados.

```
# SignalP-6.0 Organism: Eukarya Timestamp: 20250820172754
# ID Prediction OTHER SP(Sec/SPI) CS Position
FUN_000001-T1 FUN_000001 OTHER 0.833044 0.166964
FUN_000002-T1 FUN_000002 OTHER 0.999996 0.000000
FUN_000003-T1 FUN_000003 OTHER 0.999987 0.000000
FUN_000004-T1 FUN_000004 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000005-T1 FUN_000005 OTHER 0.999963 0.000001
FUN_000006-T1 FUN_000006 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000007-T1 FUN_000007 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000008-T1 FUN_000008 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000009-T1 FUN_000009 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000010-T1 FUN_000010 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000011-T1 FUN_000011 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000012-T1 FUN_000012 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000013-T1 FUN_000013 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000014-T1 FUN_000014 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000015-T1 FUN_000015 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000016-T1 FUN_000016 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000017-T1 FUN_000017 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000018-T1 FUN_000018 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000019-T1 FUN_000019 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000020-T1 FUN_000020 OTHER 0.970670 0.029346
FUN_000021-T1 FUN_000021 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000022-T1 FUN_000022 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000023-T1 FUN_000023 SP 0.000154 0.999841
FUN_000024-T1 FUN_000024 SP 0.000166 0.999828
FUN_000025-T1 FUN_000025 OTHER 1.000000 0.000000
FUN_000026-T1 FUN_000026 OTHER 1.000000 0.000000
CS pos: 29-30, Pr: 0.8278
CS pos: 18-19, Pr: 0.9821
```

FUN_013546-T1	FUN_013546	OTHER	0.999981	0.000000	
FUN_013547-T1	FUN_013547	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013548-T1	FUN_013548	OTHER	0.999990	0.000000	
FUN_013549-T1	FUN_013549	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013550-T1	FUN_013550	OTHER	0.944202	0.055790	
FUN_013551-T1	FUN_013551	OTHER	0.999989	0.000000	
FUN_013552-T1	FUN_013552	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013553-T1	FUN_013553	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013554-T1	FUN_013554	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013555-T1	FUN_013555	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013556-T1	FUN_013556	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013557-T1	FUN_013557	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013558-T1	FUN_013558	OTHER	0.999991	0.000002	
FUN_013559-T1	FUN_013559	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013560-T1	FUN_013560	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013561-T1	FUN_013561	OTHER	0.999999	0.000000	
FUN_013562-T1	FUN_013562	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013563-T1	FUN_013563	OTHER	0.999994	0.000000	
FUN_013564-T1	FUN_013564	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013565-T1	FUN_013565	OTHER	0.999988	0.000000	
FUN_013566-T1	FUN_013566	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013567-T1	FUN_013567	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013568-T1	FUN_013568	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013569-T1	FUN_013569	OTHER	0.999997	0.000000	
FUN_013570-T1	FUN_013570	OTHER	0.999995	0.000000	
FUN_013571-T1	FUN_013571	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013572-T1	FUN_013572	OTHER	0.999987	0.000000	
FUN_013575-T1	FUN_013575	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013576-T1	FUN_013576	SP	0.019608	0.980405	CS pos: 23-24. Pr: 0.9545
FUN_013577-T1	FUN_013577	OTHER	0.999999	0.000000	
FUN_013578-T1	FUN_013578	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013579-T1	FUN_013579	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013580-T1	FUN_013580	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013581-T1	FUN_013581	SP	0.000159	0.999839	CS pos: 16-17. Pr: 0.9806
FUN_013582-T1	FUN_013582	OTHER	1.000000	0.000000	
FUN_013583-T1	FUN_013583	OTHER	1.000000	0.000000	

Figura 21. Proteínas clasificadas como SP (Péptido señal) y OTHER.

Nota. La figura fue obtenida del software SignalP 6.0. Del documento generado para ejemplo se seleccionaron cuatro resultados.

SignalP generó archivos de salida que contienen las secuencias de proteínas con péptidos señal, clasificadas como candidatas a secreción. Para el genoma de *Lasiodiplodia laeliocattleyae* (LT1A), se determinó que el secretoma está conformado por un total de 1,185 proteínas. Esta cifra se obtuvo tras la consolidación de los archivos FASTA de salida, mediante un script personalizado en Bash.

4.5. TMHMM.

Con el objetivo de validar que las proteínas clasificadas como secretadas por SignalP versión 6.0 no presentaran dominios transmembrana, se utilizó la herramienta TMHMM versión 2.0, disponible en su plataforma web oficial. TMHMM permite predecir la presencia y ubicación de hélices transmembrana en proteínas, lo cual resulta esencial para diferenciar entre proteínas verdaderamente secretadas y aquellas que, aunque poseen péptido señal, podrían estar ancladas a la membrana plasmática.

Para este análisis se emplearon las mismas secuencias previamente segmentadas y procesadas en SignalP - 6.0, asegurando consistencia entre ambos enfoques. Cada bloque de secuencias fue ingresado individualmente en la plataforma TMHMM. La herramienta generó como salida un archivo tabular (véase en la figura 22) que indica, para cada proteína, el número de hélices transmembrana predichas y su localización dentro de la secuencia. Los resultados obtenidos corroboraron que las proteínas clasificadas como SP por SignalP no presentan hélices transmembrana, confirmando su naturaleza secretada. Mediante el análisis con TMHMM, se identificaron aproximadamente 12,234 proteínas

que presentan dominio transmembrana, lo que sugiere una concordancia funcional entre ambas herramientas en la predicción de proteínas potencialmente secretadas por la vía clásica. De este modo, se fortaleció la confiabilidad de los resultados obtenidos en SignalP – 6.0.

TMHMM result

```

# FUN_000023-T1 Length: 282
# FUN_000023-T1 Number of predicted TMHs: 1
# FUN_000023-T1 Exp number of AAs in TMHs: 22.99061
# FUN_000023-T1 Exp number, first 60 AAs: 0
# FUN_000023-T1 Total prob of N-in: 0.01611
FUN_000023-T1 TMHMM2.0 outside 1 188
FUN_000023-T1 TMHMM2.0 TMhelix 189 211
FUN_000023-T1 TMHMM2.0 inside 212 282

```

```

# FUN_000024-T1 Length: 351
# FUN_000024-T1 Number of predicted TMHs: 0
# FUN_000024-T1 Exp number of AAs in TMHs: 0.00174
# FUN_000024-T1 Exp number, first 60 AAs: 0
# FUN_000024-T1 Total prob of N-in: 0.00428
FUN_000024-T1 TMHMM2.0 outside 1 351

```

```

# FUN_013576-T1 Length: 87
# FUN_013576-T1 Number of predicted TMHs: 0
# FUN_013576-T1 Exp number of AAs in TMHs: 0.00018
# FUN_013576-T1 Exp number, first 60 AAs: 0.00018
# FUN_013576-T1 Total prob of N-in: 0.07191
FUN_013576-T1 TMHMM2.0 outside 1 87

```

```

# FUN_013581-T1 Length: 78
# FUN_013581-T1 Number of predicted TMHs: 0
# FUN_013581-T1 Exp number of AAs in TMHs: 1.14948
# FUN_013581-T1 Exp number, first 60 AAs: 0.61414
# FUN_013581-T1 Total prob of N-in: 0.11397
FUN_013581-T1 TMHMM2.0 outside 1 78

```

Figura 22. Predicción de hélices transmembrana.

Nota. La figura fue obtenida del software TMHMM versión 2.0. Del documento generado para ejemplo se seleccionaron cuatro resultados.

4.6. EffectorP.

Para la predicción de efectores en el secretoma de LT1A, se utilizó la herramienta EffectorP versión 3.0, disponible en su plataforma web oficial. Esta herramienta emplea modelos de aprendizaje automático entrenados específicamente para identificar proteínas secretadas que podrían actuar como efectores, ya sea en el espacio apoplástico o citoplasmático del hospedero. La predicción de efectores constituye un paso clave en la caracterización funcional del secretoma fúngico, especialmente en organismos fitopatógenos.

Como entrada para EffectorP 3.0 se utilizó el conjunto consolidado de secuencias secretadas por SignalP 6.0, y validadas mediante TMHMM versión 2.0. Generó como salida un archivo tabular en el que se indica, para cada proteína, la probabilidad de ser un efector apoplástico, citoplasmático o ambos (véase en la figura 23). En algunos casos, un mismo identificador fue clasificado simultáneamente como efector apoplástico y citoplasmático, reflejando una posible función compartida. Esta información fue utilizada para clasificar funcionalmente las proteínas del secretoma y priorizar aquellas con mayor

probabilidad de participar en la interacción patógeno-hospedero. Como resultado del análisis realizado con EffectorP versión 3.0, se obtuvo un conjunto final de 435 secuencias clasificadas como posibles efectores, todas con probabilidades superiores a 0.5. De estas, 236 fueron clasificadas como efectores apoplásticos, 105 como efectores citoplasmáticos, y 94 clasificadas como efectores apoplásticos y citoplasmáticos.

```
>FUN_000023-T1 FUN_000023 | Apoplactic effector probability: 0.703
HVPLCYYPDGTIATNDYACRLDTTESFCCTTNVSCLDNKICDVLSPQVRYNRGTCTDKTWTSDACPQFCQGEPEGSRLLTSRELTAPIAKSPDYGCGIIRCPDAGGKVC
>FUN_000024-T1 FUN_000024 | Apoplactic effector probability: 0.678 | Cytoplasmic effector probability: 0.585
HGVILAAEGDSGKSQGFVNVNVARNCTEINPCQQDSVVIIRDAEITQNIIVNGCGRTELNGNIDIGEQTENELAANRMTQVSKGSSVAVTIHQVNADGAGPYECDLDESSN
>FUN_013576-T1 FUN_013576 | Cytoplasmic effector probability: 0.91
VPGTAFHLYGRIGWARDNLLRIPDDQPAFDNQRLDSTTLEAGAVYDHTISRQRFHAHAKLSKVEFDHFRQLDYDGRDIQGTWYVQ
>FUN_013581-T1 FUN_013581 | Apoplactic effector probability: 0.861
LPNAGVVHPTFASADKYTLQQAQNKCGEHTTSCCNHVSQVGDTTAFNYGLLNGLLGNAISGPEGVGVILSGCQKIFVT
```

Figura 23. Probabilidad de ser un efector apoplástico, citoplasmático o ambos.

Nota. La figura fue obtenida del software EffectorP versión 3.0. Del documento generado para ejemplo se seleccionaron cuatro resultados.

4.7. BLASTP.

Para la búsqueda de homologías entre los efectores predichos en *Lasiodiplodia laeliocattleyae* y proteínas de especies relacionadas, se utilizó el programa Blastp versión 2.17.0, disponible en su plataforma web oficial. Como entrada se empleó el conjunto final de 435 secuencias obtenidas tras el análisis con EffectorP 3.0.

La búsqueda se realizó contra la base de datos no redundante (nr), utilizando un umbral de significancia de E-value $\leq 1e-5$. Los resultados fueron agrupados por especie y se consideraron únicamente aquellas proteínas que presentaron alineamientos dentro de este umbral. En total, se identificaron 12 proteínas con similitud significativa en *Lasiodiplodia theobromae* como se puede observar en la figura 24 y en tabla 2. Estos resultados reflejan una mayor conservación de efectores entre *L. laeliocattleyae* y *L. theobromae*, lo cual podría estar relacionado con una proximidad filogenética o con funciones compartidas en la interacción con el hospedero.

! Your search is limited to records include: *Lasiodiplodia mahajangana* (taxid:1108764)

Job Title: **Lasiodiplodia2_ortologos**

RID: **AF413WTR015** Search expires on 08-23 05:31 am [Download All](#) ▾

Results for: **1:icl|Query_481563 FUN_000023-T1 FUN_000023 | Apoplastic effector** ▾

Program: **BLASTP** [Citation](#) ▾

Database: **nr** [See details](#) ▾

Query ID: **icl|Query_481563**

Description: **FUN_000023-T1 FUN_000023 | Apoplastic effector probabl: ...**

Molecule type: **amino acid**

Query Length: **282**

Other reports: [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to

E value to

Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Compare these results against the new Clustered nr database [?](#) [BLAST](#)

select all 20 sequences selected

[GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein BFW01_g1108 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	579	579	100%	0.0	100.00%	311	KAF9630546.1
<input checked="" type="checkbox"/>	uncharacterized protein LTHEOB_4405 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	449	449	85%	6e-161	92.53%	310	XP_035375109.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein DBV05_g2346 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	449	449	85%	7e-161	92.53%	310	KAB2578904.1
<input checked="" type="checkbox"/>	uncharacterized protein LTHEOB_5823 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	60.5	60.5	94%	7e-11	26.30%	218	XP_035373515.1
<input checked="" type="checkbox"/>	uncharacterized protein LTHEOB_5629 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	58.2	58.2	25%	9e-11	42.25%	120	XP_035373919.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein BFW01_g2729 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	58.2	58.2	25%	1e-10	42.25%	117	KAF9631867.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein DBV05_g5565 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	58.5	58.5	45%	2e-10	32.56%	157	KAB2575852.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein DBV05_g3725 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	55.8	55.8	45%	6e-09	31.54%	316	KAB2577675.1
<input checked="" type="checkbox"/>	uncharacterized protein LTHEOB_2609 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	55.8	55.8	45%	6e-09	31.54%	316	XP_035364318.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative het domain-containing protein [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	53.9	53.9	45%	6e-08	34.75%	961	KAF9637202.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein DBV05_g7025 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	47.4	47.4	45%	4e-06	32.14%	346	KAB2574296.1
<input checked="" type="checkbox"/>	uncharacterized protein LTHEOB_11082 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	47.0	47.0	45%	6e-06	32.14%	353	XP_035366835.1
<input checked="" type="checkbox"/>	uncharacterized protein LTHEOB_588 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	40.0	40.0	25%	0.001	35.06%	296	XP_035369347.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein BFW01_g5754 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	40.0	40.0	25%	0.001	35.06%	291	KAF9634859.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein DBV05_g10677 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	39.7	39.7	25%	0.001	35.06%	287	KAB2570648.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein DBV05_g12338 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	38.9	38.9	25%	0.003	33.33%	632	KAB2568979.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Peptidase aspartic protein [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	38.5	38.5	25%	0.004	33.33%	632	XP_035369512.1
<input checked="" type="checkbox"/>	WSC domain containing protein [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	37.0	37.0	27%	0.015	35.44%	640	XP_035364836.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein BFW01_g5225 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	36.6	36.6	27%	0.017	35.44%	645	KAF9634330.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein DBV05_g9259 [Lasiodiplodia theobromae]	Lasiodiplodia theobromae	36.6	36.6	27%	0.018	35.44%	640	KAB2572122.1

Figura 24. Resultados de alineamiento BLASTP.

Nota. Entre los efectores de *Lasiodiplodia laeliocattleyae* y proteínas de *Lasiodiplodia theobromae*. La figura fue obtenida del software BLASTP versión 2.17.0.

Tabla 2. Resultados de alineamiento BLASTP con la descripción y el E-value.

Descripción	E value
hypothetical protein BFW01_g1108	0.0
uncharacterized protein LTHEOB_4405	6e-161

hypothetical protein DBV05_g2346	7e-161
uncharacterized protein LTHEOB_5823	7e-11
uncharacterized protein LTHEOB_5629	9e-11
hypothetical protein BFW01_g2729	1e-10
hypothetical protein DBV05_g5565	2e-10
hypothetical protein DBV05_g3725	6e-09
uncharacterized protein LTHEOB_2609	6e-09
putative het domain- containing protein	6e-08
hypothetical protein DBV05_g7025	4e-06
uncharacterized protein LTHEOB_11082	6e-06

Nota. Entre los efectores predichos de *Lasiodiplodia laeliocattleyae* y proteínas de *Lasiodiplodia theobromae* considerando los valores de (E-value) $\leq 1e-5$.

4.8. OrthoVenn3.

Para evaluar la conservación y especificidad de los efectores entre *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia laeliocattleyae*, se realizaron dos análisis comparativos mediante la plataforma OrthoVenn3, utilizando el algoritmo OrthoMCL con un valor de corte de E-value = $1e-5$. En el primer análisis, se compararon las proteínas anotadas en el NCBI para *L. theobromae* con las proteínas predichas como efectores mediante EffectorP de *L. laeliocattleyae*. Los resultados, representados en la figura 25, evidenciaron que todas las proteínas del conjunto de efectores de *L. laeliocattleyae* se agruparon dentro de los clusters ortólogos definidos por las proteínas de *L. theobromae*, sin generar clusters exclusivos. Esta observación sugiere una alta conservación funcional entre los efectores predichos y el repertorio proteico previamente anotado en *L. theobromae*.

Sin embargo, para identificar posibles efectores adaptativos o específicos de *L. laeliocattleyae*, se realizó un segundo análisis más amplio. En este caso, se compararon todas las proteínas anotadas de *L. theobromae* (descargadas del NCBI) con el conjunto completo de proteínas obtenidas mediante la anotación de *L. laeliocattleyae*. Este enfoque permitió detectar 11 clusters exclusivos correspondientes a proteínas presentes únicamente en *L. laeliocattleyae*, como se muestra en la figura 26. Estas 22 proteínas no tienen ortólogos en *L. theobromae*, 15 de 22 fueron clasificadas como efectores citoplasmáticos por EffectorP, con probabilidades superiores a 0.5, véase en la figura 27.



Figura 25. Comparación de proteínas de las obtenidas por EffectorP de *Lasiodiplodia laeliocattleyae*.

Nota. Proteínas del NCBI de *Lasiodiplodia theobromae* con las proteínas obtenidas en EffectorP de *Lasiodiplodia laeliocattleyae*.

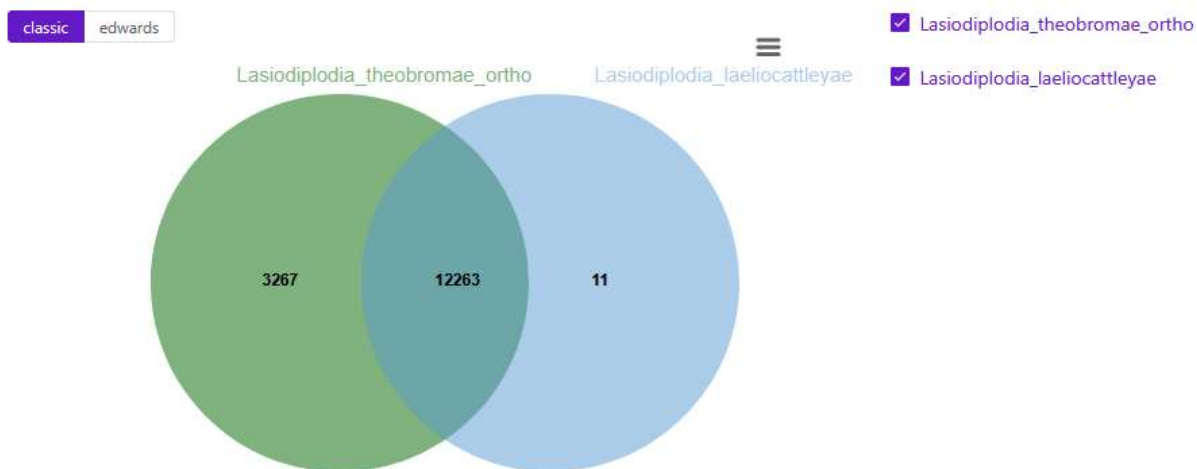


Figura 26. Comparación de proteínas de las obtenidas en la anotación de *Lasiodiplodia laeliocattleyae*.

Nota. Proteínas del NCBI de *Lasiodiplodia theobromae* con las proteínas obtenidas en la anotación de *Lasiodiplodia laeliocattleyae*.

22 proteins were provided as input.

Predicted effectors: 15 (68.2%)
 Predicted cytoplasmic effectors: 15 (68.2%)
 Predicted apoplastic effectors: 0 (0.0%)

0.0%% of the cytoplasmic effectors are predicted dual-localized (cytoplasmic/apoplastic).

Predicted effectors (download as FASTA file [here](#)):

Summary table

#Identifier	Cytoplasmic effector	Apoplastic effector	Non-effector	Prediction
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_004372-T1	-	-	Y (0.957)	Non-effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_004827-T1	Y (0.746)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_007808-T1	Y (0.658)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_008554-T1	Y (0.729)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_010137-T1	Y (0.717)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_010165-T1	Y (0.921)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_010386-T1	Y (0.752)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_011057-T1	-	-	Y (0.991)	Non-effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_012853-T1	-	-	Y (0.917)	Non-effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013026-T1	-	-	Y (0.866)	Non-effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013111-T1	Y (0.746)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013121-T1	-	-	Y (0.904)	Non-effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013128-T1	Y (0.719)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013129-T1	Y (0.762)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013135-T1	Y (0.55)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013137-T1	Y (0.738)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013152-T1	-	-	Y (0.594)	Non-effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013176-T1	Y (0.765)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013246-T1	Y (0.556)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013318-T1	Y (0.755)	-	-	Cytoplasmic effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013377-T1	-	-	Y (0.551)	Non-effector
Lasiodiplodia_laefiocattleyae FUN_013542-T1	Y (0.724)	-	-	Cytoplasmic effector

Figura 27. Análisis en EffectorP de los datos obtenidos en OrthoVenn3.

5. DISCUSIÓN.

5.1. Método de ensamblaje.

El desarrollo de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha facilitado la reconstrucción de genomas completos en una amplia diversidad de organismos, incluyendo mamíferos, hongos, bacterias, entre otros (Dida & Yi, 2021). En el ámbito de la investigación genómica, el ensamblaje *de novo* constituye una etapa clave, que requiere algoritmos cada vez más sofisticados para manejar eficientemente el volumen y la complejidad de los datos generados por tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (Goussarov et al., 2024). El ensamblaje genómico parte de la reconstrucción de secuencias cortas obtenidas por tecnologías de secuenciación, pero en organismos eucariotas este proceso enfrenta desafíos particulares, siendo la alta proporción de regiones repetitivas que puede alcanzar entre el 25 % y el 50 % del genoma uno de los principales obstáculos (Dida & Yi, 2021). El ensamblaje *de novo* puede abordarse mediante distintos enfoques metodológicos. Uno de los más tradicionales es el modelo Overlap-Layout-Consensus (OLC), que se basa en identificar regiones de superposición entre las lecturas, construir un diseño que refleje sus relaciones y, finalmente, generar una secuencia consenso. Por otro lado, el enfoque basado en gráficas de Bruijn fragmenta las lecturas en *k-mers* y establece conexiones entre aquellos que comparten $k-1$ nucleótidos, formando una red donde los nodos representan los *k-mers* y los conectores indican las superposiciones. Además, existen estrategias híbridas que combinan ambos métodos con el objetivo de mejorar la precisión y continuidad del ensamblaje, especialmente en genomas complejos (Dida & Yi, 2021).

En su estudio comparativo, (Dida & Yi, 2021) evaluaron diversos enfoques de ensamblaje aplicados a genomas de distintas especies, destacando que los métodos híbridos y aquellos basados exclusivamente en el modelo Overlap-Layout-Consensus (OLC) alcanzan métricas superiores como valores elevados de N50 y mayor longitud de contigs cuando se emplean lecturas largas, típicas de plataformas como Oxford Nanopore o PacBio. En contraste, para datos generados mediante tecnologías de secuenciación corta, como Illumina, los algoritmos basados en gráficas de Bruijn demostraron ser más eficaces, disminuyendo errores comunes como la construcción de ensamblajes incorrectos y mejorando la continuidad estructural del genoma ensamblado.

La evaluación comparativa entre los ensamblajes generados por los algoritmos SPAdes e IDBA para la muestra LTIA revela diferencias en términos de continuidad, fragmentación y capacidad de reconstrucción genómica. Las métricas utilizadas N50, L50 y el contig más largo son ampliamente reconocidas como indicadores clave para estimar la calidad de un ensamblaje *de novo*, ya que permiten inferir la extensión de las regiones reconstruidas, la concentración de información en contigs largos y el grado de fragmentación del genoma (Gurevich et al., 2013).

El ensamblaje realizado con SPAdes mostró un valor de N50 de 580,885 pb, lo que indica que al menos la mitad del genoma ensamblado está contenido en contigs de esa longitud o superior. Este valor, junto con un L50 de 23 contigs y un contig máximo de 2,365,384 pb, refleja una alta continuidad y baja fragmentación, características deseables para estudios que requieren precisión estructural, como la anotación de genes completos y la predicción de efectores. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado que SPAdes, al emplear una estrategia optimizada basada en gráficas de

Bruijn, ofrece ensamblajes más robustos cuando se trabaja con lecturas cortas de alta calidad (Bankevich et al., 2012).

En contraste, el ensamblaje generado por IDBA presentó un N50 de 180,065 pb, un L50 de 71 contigs y un contig máximo de 638,989 pb, lo que sugiere una mayor fragmentación y menor capacidad para reconstruir regiones genómicas extensas. Aunque IDBA ha sido utilizado con éxito en contextos metagenómicos y con datos de cobertura desigual (Peng et al., 2012), en este caso su rendimiento fue inferior al de SPAdes, posiblemente debido a las características específicas del genoma analizado y al tipo de datos de entrada.

La Figura 20 refuerza esta interpretación visualmente: la curva acumulativa del ensamblaje con SPAdes presenta una pendiente más pronunciada desde las primeras posiciones, lo que indica que genera contigs largos desde el inicio del proceso. En cambio, IDBA requiere un mayor número de contigs para alcanzar la misma longitud acumulada, lo que refleja una distribución más fragmentada. Este comportamiento ha sido reportado en estudios comparativos recientes, donde SPAdes supera a otros ensambladores en métricas como N50, número de contigs y cobertura efectiva del genoma (Gualdrón Niño, 2022).

5.2. Anotación estructural.

La anotación estructural del genoma de *Lasiodiplodia laeliocattleyae* se realizó mediante el pipeline Funannotate, que integra múltiples herramientas de predicción génica como Augustus, GlimmerHMM, SNAP y HiQ. Esta estrategia permitió generar un conjunto inicial de 39,074 modelos de genes, que fueron consolidados mediante Evidence Modeler (EVM) en 13,471 modelos génicos. Tras un filtrado riguroso, se descartaron 52 modelos por solapamiento con transposones o por cruzar regiones con gaps, obteniendo un conjunto final de 13,419 modelos válidos. En contraste, el estudio de *Lasiodiplodia theobromae* (aislamiento Bot-2018-LT45) reportado por Valdez-Tenezaca et al. (2025) utilizó el pipeline MAKER para la anotación estructural. Este enfoque permitió identificar 12,948 genes, de los cuales 11,634 codificaban proteínas. Aunque el estudio no detalla el número de modelos descartados ni los criterios de filtrado aplicados, la diferencia en el número final de genes entre ambas especies podría deberse a variaciones en la sensibilidad de los pipelines, en la calidad del ensamblaje o en la complejidad genómica específica de cada especie (Yandell et al., 2012).

Funannotate, al integrar predictores especializados y aplicar filtros explícitos contra elementos transponibles y regiones ambiguas, ofrece una anotación más controlada y reproducible (Palmer et al., 2020). Por su parte, MAKER es ampliamente utilizado por su capacidad de combinar evidencia extrínseca (como ESTs y proteínas homólogas), aunque su rendimiento puede variar según la configuración y los datos de entrada (Cantarel et al., 2008). En este contexto, el uso de Funannotate en *L. laeliocattleyae* permitió obtener un conjunto génico más amplio y depurado, lo que constituye una base sólida para estudios funcionales y comparativos dentro del género *Lasiodiplodia*.

5.3. Identificación de proteínas efectoras relacionadas con la patogenicidad.

En el análisis comparativo entre *Lasiodiplodia laeliocattleyae* y *Lasiodiplodia theobromae*, se identificaron 12 proteínas con similitud significativa mediante alineamientos BLASTP, utilizando el conjunto de proteínas como efectores de *L. laeliocattleyae*. Este conjunto fue previamente filtrado mediante SignalP para detectar señales de secreción y TMHMM para excluir proteínas con múltiples dominios

transmembrana, asegurando así un perfil compatible con efectores fúngicos secretados. Posteriormente, se aplicó EffectorP, lo que permitió seleccionar proteínas con alta probabilidad de efectores, centrando el análisis en aquellas con potencial implicación en la interacción hospedero-patógeno (Lu et al., 2024).

Los resultados de BLASTP revelaron que estas 12 proteínas efectores de *L. laeliocattleyae* presentan homología significativa con proteínas anotadas en *L. theobromae*, lo que sugiere una alta conservación funcional entre ambas especies. Esta conservación podría estar relacionada con una proximidad filogenética, dado que ambas pertenecen al mismo género y comparten características patogénicas similares, como la capacidad de inducir necrosis y colonizar tejidos vegetales (Lu et al., 2024).

Se identificaron un conjunto de proteínas hipotéticas con alto grado de similitud, entre ellas: BFW01_g1108, LTHEOB_4405, DBV05_g2346, LTHEOB_5823, LTHEOB_5629, BFW01_g2729, DBV05_g5565, DBV05_g3725, LTHEOB_2609, DBV05_g7025 y LTHEOB_11082. Adicionalmente, se identificó una proteína con dominio putativo HET, asociada a procesos de incompatibilidad vegetativa en hongos filamentosos (Paoletti & Saupe, 2009). La presencia de estas proteínas en ambos genomas, podrían estar implicados en procesos patogénicos similares como la muerte regresiva y la pudrición de frutos en cultivos de cacao y arándano. Sin embargo, al tratarse de proteínas hipotéticas o no caracterizadas, su rol como efectores debe ser considerado tentativo y sujeto a validación experimental. La proteína con dominio HET merece especial atención, ya que los dominios HET han sido implicados en procesos de reconocimiento entre cepas fúngicas y en mecanismos de defensa intracelular (Paoletti & Saupe, 2009). Su presencia en los efectores analizados sugiere una posible función en la interacción interespecífica o en la modulación de la respuesta del hospedador, aunque su rol específico en *Lasiodiplodia* aún no ha sido caracterizado (Yan et al., 2018; Stergiopoulos & de Wit 2009).

Sin embargo, al ampliar el análisis mediante OrthoVenn3, utilizando el algoritmo OrthoMCL con un E-value de $1e-5$, se observó una diferencia metodológica importante. En este caso, se compararon los proteomas completos de ambas especies: las proteínas anotadas en NCBI para *L. theobromae* y el conjunto total de proteínas obtenidas por anotación en *L. laeliocattleyae*. Este análisis permitió identificar once clusters (cluster11921 a cluster11931), cada uno compuesto por dos proteínas en total veinte y dos, quince proteínas fueron clasificadas como efectores citoplasmáticos por EffectorP, con probabilidades superiores a 0.5, lo que respalda su implicación funcional en la interacción hospedero-patógeno, son exclusivos en *L. laeliocattleyae*, que no tienen ortólogos en *L. theobromae* (Li et al., 2003). Estas proteínas no fueron detectadas en el análisis BLASTP porque no estaban incluidas en el conjunto de efectores filtrado, lo que evidencia que el uso de EffectorP, aunque útil para priorizar candidatos, puede limitar la detección de efectores divergentes o no caracterizados (Li et al., 2003).

En cuanto a funciones moleculares, destaca la presencia del cluster 11923 que mostró similitud con la proteína B8M9L2 de Swiss-Prot y fue anotado con el término GO:0016491, correspondiente a actividad oxidorreductasa (UniProt Consortium, 2025). Esta función está relacionada con reacciones de oxidación-reducción, fundamentales en el metabolismo celular. En el contexto de hongos patógenos, las oxidorreductasas pueden desempeñar un papel clave en la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el hospedero como mecanismo de defensa. Por tanto, este cluster es

esencial para la supervivencia del hongo durante la infección y posiblemente involucrado en la supresión de respuestas inmunes del hospedero (Apel, 2004).

Por otro lado, el cluster 11928 presentó similitud con la proteína Q9I310 de Swiss-Prot y fue anotado con el término GO:0071732, que indica una respuesta celular al óxido nítrico (NO) (UniProt Consortium, 2025). El NO es una molécula señal producida por las plantas como parte de su sistema inmunológico, con efectos citotóxicos y reguladores. La capacidad del hongo de responder a esta molécula sugiere una adaptación al ambiente hostil del hospedero, lo que podría estar asociado a efectores adaptativos específicos. Estos efectores permiten al patógeno modular su fisiología frente a señales inmunes, facilitando la colonización y persistencia en el tejido vegetal (Mur, 2013).

Los clusters restantes no presentaron anotaciones GO ni similitud con entradas de Swiss-Prot, lo que podría deberse a la presencia de proteínas hipotéticas o no caracterizadas. Esta ausencia de información funcional también puede reflejar la existencia de genes exclusivos o divergentes, potencialmente relacionados con funciones adaptativas específicas o con mecanismos de virulencia aún no descritos (Galperin, 2001). Y respecto al análisis de procesos biológicos las proteínas analizadas están mayoritariamente asociadas a procesos celulares y metabólicos generales, como la regulación biológica y la respuesta a estímulos (Flórez, 2022).

En conjunto, estos resultados reflejan una dualidad funcional: por un lado, existe un repertorio de efectores altamente conservados entre ambas especies, posiblemente relacionados con funciones esenciales en la patogenicidad; por otro lado, se identifican proteínas específicas en *L. laeliocattleyae* que podrían representar efectores adaptativos, con roles diferenciados en la interacción con el hospedador. Esta combinación de enfoques predictivo (EffectorP) y comparativo (OrthoVenn3) permite una caracterización más completa del conjunto de efectores y aporta evidencia sobre la evolución funcional dentro del género *Lasiodiplodia* (Wang et al., 2023).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Conclusiones.

- El análisis comparativo entre los ensamblajes generados por SPAdes e IDBA para la muestra LTIA evidencia diferencias significativas en términos de continuidad, fragmentación y capacidad de reconstrucción genómica. SPAdes, al emplear una estrategia basada en gráficas de Bruijn optimizadas para lecturas cortas, logró un ensamblaje más robusto, con un valor de N50 de 580,885 pb, un L50 de 23 contigs y un contig máximo de 2,365,384 pb. Estas métricas reflejan una alta continuidad y baja fragmentación, condiciones ideales para estudios posteriores de anotación estructural y funcional.
- La implementación de Funannotate como herramienta para la anotación estructural del genoma permitió consolidar un flujo de trabajo eficiente y reproducible. Su enfoque automatizado facilitó la integración de múltiples predictores ab initio sin necesidad de entrenamiento manual, lo que representa una ventaja significativa frente a herramientas tradicionales como MAKER. La generación directa de archivos en formato GenBank, GFF3 y TBL refuerza la trazabilidad de los resultados y su reutilización en análisis funcionales.

- El análisis comparativo entre *Lasiodiplodia laeliocattleyae* y *L. theobromae* permitió identificar un conjunto de 12 proteínas con alta similitud mediante alineamientos BLASTP, lo que sugiere una conservación funcional significativa entre ambas especies. Esta similitud podría estar vinculada a su cercanía filogenética y a la presencia de mecanismos patogénicos comunes, como la necrosis y la colonización de tejidos vegetales. La detección de proteínas hipotéticas y una proteína con dominio HET refuerza la hipótesis de que ciertos efectores podrían estar implicados en procesos de incompatibilidad vegetativa y modulación de la respuesta del hospedador, aunque su función específica aún requiere validación experimental.
- Por otro lado, el análisis ortológico mediante OrthoVenn3 reveló la existencia de 15 efectores citoplasmáticos exclusivos en *L. laeliocattleyae*, no detectados por BLASTP, lo que evidencia la limitación de los enfoques basados únicamente en similitud de secuencia. Estos efectores podrían representar adaptaciones funcionales específicas de *L. laeliocattleyae*, con potencial relevancia en su interacción diferencial con el hospedador. En conjunto, los resultados reflejan una dualidad funcional: la coexistencia de efectores conservados y específicos, lo que aporta evidencia sobre la evolución adaptativa dentro del género *Lasiodiplodia* y destaca la importancia de combinar enfoques predictivos y comparativos para una caracterización más completa del repertorio de efectores.

Recomendaciones.

- Se recomienda realizar validaciones experimentales de las proteínas hipotéticas identificadas como efectores, y la de dominio HET, mediante ensayos funcionales en modelos de interacción hospedero-patógeno. Esto permitirá confirmar su rol en la patogenicidad, aportando evidencia directa sobre su implicación biológica.
- Se sugiere complementar los análisis bioinformáticos con transcriptómica diferencial en condiciones de infección, para evaluar la expresión específica de los efectores exclusivos de *L. laeliocattleyae*. Esta estrategia permitiría priorizar candidatos funcionales y establecer correlaciones entre presencia genómica y actividad biológica.

7. REFERENCIAS.

Abd-El Ghani, H. S., & Fatouh, H. M. (2005). First record of sugar beet root rot disease caused by *Botryodiplodia theobromae* in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 33(1), 107–108.

Adu-Acheampong, R., Archer, S., & Leather, S. (2012). Resistance to dieback disease caused by *Fusarium* and *Lasiodiplodia* species in cacao (*Theobroma cacao* L.) genotypes. *Experimental Agriculture*, 48(1), 85–98. <https://doi.org/10.1017/S0014479711000883>

Adu-Acheampong, R., Archer, S., & Leather, S. (2012). Resistance to dieback disease caused by *Fusarium* and *Lasiodiplodia* species in cacao (*Theobroma cacao* L.) genotypes. *Experimental Agriculture*, 48(1), 85–98. <https://doi.org/10.1017/S0014479711000883>

Agrios, G. N. (2005). *Fitopatología* (5ª ed.). Elsevier Academic Press.

Aguilar, L., y Falquet, L. (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Rev Salud Anim.* vol.37 no.2 La Habana: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-

Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>

Bretaudeau, A., Cormier, A., Leroi, L., Corre, E., Robin, S., & Palmer, J. M. (2021). Genome annotation with Funannotate. *Galaxy Training Network*. <https://gxy.io/GTN:T00172>

Burgess, T. I., Barber, P. A., Mohali, S., Pegg, G., de Beer, W., & Wingfield, M. J. (2006). Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia*, 98(3), 423–435. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832677>

Canchignia-Martinez H., Cedeño-Moreira A., Flores F & Garcés-Fiallos, F. (2025). Morphological, molecular and pathogenetic characterization of *Lasiodiplodia laeliocattleyae* associated with dieback and pod rot on cacao in Ecuador. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 136, 102572, ISSN 0885- 5765. doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102572

Cantarel, B. L., Korf, I., Robb, S. M. C., Parra, G., Ross, E., Moore, B., Holt, C., Sánchez Alvarado, A., & Yandell, M. (2008). MAKER: An easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes. *Genome Research*, 18(1), 188–196. <https://doi.org/10.1101/gr.6743907>

Carreón-Anguiano, K. G., Islas-Flores, I., Vega-Arreguín, J., Sáenz-Carbonell, L., & Canto-Canché, B. (2020). EffHunter: A tool for prediction of effector protein candidates in fungal proteomic databases. *Biomolecules*, 10(5), 712.

Carreón-Anguiano, K. G., Todd, J. N. A., Chi-Manzanero, B. H., Couoh-Dzul, O. J., Islas-Flores, I., & Canto-Canché, B. (2022). WideEffHunter: An algorithm to predict canonical and non-canonical effectors in fungi and oomycetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13567. <https://doi.org/10.3390/ijms232113567>

Castillo-Sanmiguel, P. A., Cortés-Sánchez, L. R., & Acero-Godoy, J. (2022). Molecular aspects of tomato (*Solanum lycopersicum*) vascular wilt by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and antagonism by *Trichoderma* spp. *Mexican Journal of Phytopathology*, 40(1), 82–102. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-1>

Chen, C.-Y., Liu, Y.-Q., Song, W.-M., Chen, D.-Y., Chen, F.-Y., Chen, X.-Y., Chen, Z.-W., Ge, S.-X., Wang, C.-Z., Zhan, S., Chen, X.-Y., & Mao, Y.-B. (2019). An effector from cotton bollworm oral secretion impairs host plant defense signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(27), 14331–14338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905471116>

Compeau, P. E. C., Pevzner, P. A., & Tesler, G. (2011). How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. *Nature Biotechnology*, 29(11), 987–991. <https://doi.org/10.1038/nbt.2023>

Coutinho, I. B. L., Freire, F. C. O., Lima, C. S., Lima, J. S., Gonçalves, F. J. T., Machado, A. R., Silva, A. M. S., & Cardoso, J. E. (2017). Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathology*, 66(1), 90–104. <https://doi.org/10.1111/ppa.12565>

Diab, M., Khalil, I., Dawood, N., & El-Assiuty, E. (1984). Ear and grain rot of maize caused by *Botryodiplodia theobromae* pathogens in Egypt. *Minufiyya Journal of Agricultural Research*, 9, 129–138.

Dida, F., y Yi, G. (2021). PeerJ Comput Sci. 7: e636. Empirical evaluation of methods for de novo genome assembly: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8279138/>

Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Pathogen perception and responses in plant immunity. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>

DTU Health Tech. (n.d.). TMHMM 2.0 – Prediction of transmembrane helices in proteins. Recuperado el 24 de agosto de 2025, de <https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

Ek, M. (2019). Genome assembly and annotation of the fungal pathogen *Neonectria ditissima* (Master's thesis). Swedish University of Agricultural Sciences. Extraído de <https://pub.epsilon.slu.se/15045/>

El Oriente. (2025). El cacao fue el tercer producto no petrolero de exportación en 2024. <https://www.eloriente.com/articulo/el-cacao-fue-el-tercer-producto-no-petrolero-de-exportacion-en-2024/49225>

El-Ganainy, S. M., Ismail, A. M., Iqbal, Z., Elshewy, E. S., Alhudaib, K. A., Almaghasla, M. I., & Magistà, D. (2022). Diversity among *Lasiodiplodia* species causing dieback, root rot and leaf spot on fruit trees in Egypt, and a description of *Lasiodiplodia newvalleyensis* sp. nov. *Journal of Fungi*, 8(11), 1203. <https://doi.org/10.3390/jof8111203>

Fabro, G. (2022). Oomycete intracellular effectors: Specialised weapons targeting strategic plant processes. *New Phytologist*, 233(3), 1074–1082. <https://doi.org/10.1111/nph.17828>

Flórez, C. (2022). Proteínas en plantas: estructura y funciones esenciales. Universidad Francisco de Paula Santander. <https://www.studocu.com/co/document/universidad-francisco-de-paula-santander/biologia-general/proteina/97308767>

Freire, F., Cardoso, J., Viana, F., & Martins, M. (2011). Status of *Lasiodiplodia theobromae* as a plant pathogen in Brazil. *Essentia*, 12, 53–71.

Galperin, M. Y. (2001). Conserved hypothetical proteins: new clues and new puzzles. *Comparative and Functional Genomics*, 2(1), 14–18. <https://doi.org/10.1002/cfg.66>

Gautam, A. K., Verma, R. K., Avasthi, S., Sushma, Bohra, Y., Devadatha, B., Niranjana, M., & Suwannarach, N. (2022). Current insight into traditional and modern methods in

fungus diversity estimates. *Journal of Fungi*, 8(3), 226. <https://doi.org/10.3390/jof8030226>

Goussarov, G., Mysara, M., Cleenwerck, I., Claesen, J., Leys, N., Vandamme, P., y Van, R. (2024). *Microbiología (Lectura)*; 170(6): 001469. Evaluación comparativa de ensambladores de lectura corta, larga e híbrida para la secuenciación del metagenoma de comunidades microbianas complejas: doi: 10.1099/mic.0.001469

Gualdrón Niño, J. E. (2022). Ensamblaje y anotación del genoma de *Vibrio* spp. a partir de datos de secuenciación Nanopore (ONT) e Illumina. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://repositorio.puce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/b2ab0ce9-615d-44ee-b2aa-6bfc71824f1e/content>

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>

Haggag, W. M., Abou Rayya, M. S. M., & Kasim, N. E. (2007). First report of a canker disease of walnut caused by *Botryodiplodia theobromae* in Egypt. *Plant Disease*, 91(2), 226. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-2-0226B>

Han, X., & Kahmann, R. (2019). Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 10, 822. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00822>

Hariharan, G., & Prasannath, K. (2021). Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 600234.

He, Q., McLellan, H., Boevink, P. C., & Birch, P. (2020). All roads lead to susceptibility: The many modes of action of fungal and oomycete intracellular effectors. *Plant Communications*, 1(4), 100050. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100050>

Hendra, H., Wibowo, A., & Suryanti, S. (2019). Fungal pathogens associated with Vascular streak dieback (VSD) disease on cacao in Special Region of Yogyakarta Province. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 23(1), 133–141. <https://doi.org/10.22146/jpti.41512>

Huang C, Peng J, Zhang W, Chethana T, Wang X, Wang H, Yan J. LtGAPR1 Is a Novel Secreted Effector from *Lasioidiplodia theobromae* That Interacts with NbPsQ2 to Negatively Regulate Infection. *J Fungi (Basel)*. 2023 Jan 31;9(2):188. doi: 10.3390/jof9020188. PMID: 36836303; PMCID: PMC9967411.

Huang, C. (2021). From player to pawn: Viral avirulence factors involved in plant immunity. *Viruses*, 13(4), 688. <https://doi.org/10.3390/v13040688>

Ijaq, J., Malik, G., Kumar, A., Das, P. S., Meena, N., Bethi, N., Sundararajan, V. S., & Suravajhala, P. (2019). A model to predict the function of hypothetical proteins through a nine-point classification scoring schema. *BMC Bioinformatics*, 20(14). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2554-y>

INIAP. (2023). Programa Nacional de Cacao del INIAP desarrolla clones de cacao de alta productividad. <https://www.iniap.gob.ec/programa-nacional-de-cacao-del-iniap-desarrolla-clones-de-cacao-de-alta-productividad/>

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2020). Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC.

International Cocoa Organization (ICCO). (2010). Informes anuales del cacao. Londres, Inglaterra: ICCO. <https://www.icco.org/wp-content/uploads/COCOA-AGREEMENT-2010-AMEND-SPANISH.pdf>

International Cocoa Organization (ICCO). (2010). Informes anuales del cacao. Londres, Inglaterra: ICCO. <https://www.icco.org/wp-content/uploads/COCOA-AGREEMENT-2010-AMEND-SPANISH.pdf>

Intriago, J., Chancosa, C., Andrade, A., & Enríquez, G. (2022). Manual del cultivo de cacao sostenible para la Amazonía ecuatoriana (Manual No. 125). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). ISBN 978-9942-42-210-1.

Ismail, A. M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Lombard, L. (2012). *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology*, 41(6), 649–660. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0163-1>

Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

Kannan, C., Karthik, M., & Priya, K. (2010). *Lasiodiplodia theobromae* causes a damaging dieback of cocoa in India. *Plant Pathology*, 59(2), 410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02192.x>

Ko, Y.-Z., Liyanage, W. K., Shih, H.-C., Tseng, M.-N., Shiao, M.-S., & Chiang, Y.-C. (2023). Unveiling cryptic species diversity and genetic variation of *Lasiodiplodia* (Botryosphaeriaceae, Botryosphaerales) infecting fruit crops in Taiwan. *Journal of Fungi*, 9(9), 950. <https://doi.org/10.3390/jof9090950>

Kranz, J., Schmutterer, H., & Koch, W. (1978). Diseases, pests, and weeds in tropical crops. *Soil Science*, 125(4), 272. https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1978/04000/Diseases,_Pests,_and_Weeds_in_Tropical_Crops.20.aspx

Kuswinanti, T., Junaid, M., Melina, Surapati, U., & Ratnawaty. (2019). A promising microbial use on cocoa: Decomposing cocoa waste and controlling *Lasiodiplodia theobromae* in-vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 343, 012256. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/343/1/012256>

Lanaud, C., Loor, R., Zarrillo, S., & Valdez, F. (2016). Origen de la domesticación del cacao y su uso temprano en Ecuador. *Yaguarzongo*, 55, 12–14. https://www.academia.edu/73118935/Origen_de_la_Domesticac%C3%ADon_del_caca

o_y_su_uso_temprano_en_Ecuador_Origin_of_the_domestication_of_cacao_and_its_early_use_in_Ecuador_

Langin, G., Gouguet, P., & Üstün, S. (2020). Microbial effector proteins – A journey through the proteolytic landscape. *Trends in Microbiology*, 28(7), 523–535.

Langin, G., Gouguet, P., & Üstün, S. (2020). Microbial effector proteins – A journey through the proteolytic landscape. *Trends in Microbiology*, 28(7), 523–535. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.02.010>

Leala, M. I., El-Shahawy, I. E., & Tolba, I. H. (2021). Characterization of *Lasiodiplodia* isolates obtained from acid lime and Valencia orange in Egypt. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*, 46(2), 55–67.

Li, L., Stoeckert, C. J., & Roos, D. S. (2003). OrthoMCL: Identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Research*, 13(9), 2178–2189. <https://doi.org/10.1101/gr.1224503>

Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., ... & Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 513–545. <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>

Lu, Y. Y., Noble, W. S., & Keich, U. (2024). A BLAST from the past: revisiting blastp's E-value. *Bioinformatics*, 40(12), btac729. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac729>

Macho, A. P., & Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*, 54(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.028>

Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F., Nagel, J. H., Postma-Smidt, A., Naidoo, S., Wingfield, M. J., & Spatafora, J. W. (2017). *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology*, 18(4), 477–488. <https://doi.org/10.1111/mpp.12495>

Martoredjo, T., Ardy, D., Hermansyah, H., & Sunardi, T. (1995). Peran infeksi jamur dalam memperparah kerusakan buah kakao akibat serangan *Helopeltis* sp. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 1(1), 28–32. <https://doi.org/10.22146/jpti.9307>

Michereff, S. J., Silva, J. B., Silveira, N. S. S., Pedrosa, R. A., Mariano, R. L. R., Tavares, L. A., & Tavares, S. C. C. H. (1997). Biocontrole pós-colheita da podridão de *Lasiodiplodia* em frutos de manga por leveduras saprofíticas. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 40(1), 29–37.

Mohali, S., Burgess, T. I., & Wingfield, M. J. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*, 35(6), 385–396. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2005.00491.x>

Moreira, A., Cedeño, A., Canchignia, F & Gárces F. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop:

symptoms, biological cycle, and strategies management, vol.12 no.4.
<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>

Moreira, A., Cedeño, A., Canchignia, F & Gárces F. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: symptoms, biological cycle, and strategies management, vol.12 no.4.
<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>

Moreira-Morrillo, A. A., Cedeño-Moreira, Á. V., Canchignia-Martínez, F., & Garcés-Fiallos, F. R. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653–662.
<https://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v12n4/2077-9917-agro-12-04-653.pdf>

Mur, L. A. J., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S. M., Moshkov, I. E., Novikova, G. V & Harren, F. J. M. (2013). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants*, 5, plt052. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt052>

Nagarajan, N., & Pop, M. (2013). Sequence assembly demystified. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 157–167. <https://doi.org/10.1038/nrg3367>

National Center for Biotechnology Information. (2025). Protein BLAST: search protein databases using a protein query. NCBI. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Nielsen H, Tsirigos KD, Brunak S, von Heijne G (2019) A Brief History of Protein Sorting Prediction. *Protein J* 38:200–216. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09838-3>

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1093/protein/10.1.1>

Ogundana, S. K. (1983). Life cycle of *Botryodiplodia theobromae*, a soft rot pathogen of yam. *Journal of Phytopathology*, 106(3), 204–213. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1983.tb00761.x>

Palmer, J. M. (2017). Funannotate: Eukaryotic genome annotation pipeline. GitHub Repository. <https://github.com/nextgenusfs/funannotate>

Palmer, J. M., & Stajich, J. E. (2020). Funannotate: Eukaryotic genome annotation pipeline. GitHub repository. <https://github.com/nextgenusfs/funannotate>

Palmer, J. M., & Stajich, J. E. (2020). Funannotate: Fungal genome annotation pipeline. Funannotate Documentation. <https://funannotate.readthedocs.io/en/latest/>

Paoletti, M., & Saupe, S. J. (2009). Fungal incompatibility: ¿evolutionary origin in pathogen defense? *BioEssays*, 31(11), 1201–1210. <https://doi.org/10.1002/bies.200900085>

Paredes Andrade, N., Monteros-Altamirano, A., Lima Tandazo, L., Caicedo Vargas, C., Bastidas Muñoz, S., Tinoco Jaramillo, L., Fernández Anchundia, F., Vargas Tierras, Y., Pico Rosado, J., Subía García, C., Burbano Cachiguango, A., Chanaluiza Choloquina, A., Sotomayor Akopyan, D., Díaz Martínez, A., Intriago Intriago, J., Chancosa, C., Andrade, A., & Enríquez, G. (2022). Manual del cultivo de cacao sostenible para la Amazonía ecuatoriana (Manual No. 125). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). ISBN 978-9942-42-210-1.

Paredes, Nelly. (2009). Manual de cultivo de cacao para la Amazonía ecuatoriana. Manual, (76), consultado (20 de agosto de 2025), disponible en <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4786/7/iniapeecam76.pdf>

Peng, Y., Leung, H. C. M., Yiu, S. M., & Chin, F. Y. L. (2012). IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, 28(11), 1420–1428. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>

Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2006). The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 55, 53–63. <https://doi.org/10.3114/sim0021>

Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., & Martin, F. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8299–8304. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322671111>

Ploetz, R. C. (2003). *Diseases of tropical fruit crops*. CABI Publishing.

Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1), e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>

Rathnayaka, A. R., Chethana, K. W. T., Manawasinghe, I. S., Wijesinghe, S. N., de Silva, N. I., Tennakoon, D. S., Phillips, A. J. L., Liu, J. K., Jones, E. B. G., Wang, Y., & Hyde, K. D. (2023). *Lasiodiplodia*: Generic revision by providing molecular markers, geographical distribution and haplotype diversity. *Mycosphere*, 14(1), 1254–1339. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/14/1/14>

Ray, S., & Casteel, C. L. (2022). Effector-mediated plant–virus–vector interactions. *The Plant Cell*, 34(5), 1514–153. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac058>

Rehab, M. E. A., Rashed, M. F., Ammar, M. I., & El-Morsy, S. A. (2014). Dieback and sooty canker of ficus trees in Egypt and its control. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(6), 364–371. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.364.371>

Rufián, J. S., Rueda-Blanco, J., López-Márquez, D., Macho, A. P., Beuzón, C. R., & Ruiz-Albert, J. (2021). The bacterial effector HopZ1a acetylates MKK7 to suppress plant immunity. *New Phytologist*, 231. <https://doi.org/10.1111/nph.17442>

Ruiz-Albert, J. (2021). The bacterial effector HopZ1a acetylates MKK7 to suppress plant immunity. *New Phytologist*, 231. <https://doi.org/10.1111/nph.17442>

Salzberg, S. L. (2019). Next-generation genome annotation: we still struggle to get it right. *Genome Biology*, 20, Article 92. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1715-2>

Sánchez, E., Alcántara, R., & Torres, M. E. (2007). Participación de la subunidad α de proteínas G heterotriméricas en los procesos de virulencia y patogenicidad de los hongos. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(2), 58–66. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2007/reb072c.pdf>

Sivashankari, S., & Shanmughavel, P. (2007). Comparative genomics - a perspective. Slippers, B., Wingfield, M. J., & Coutinho, T. A. (2013). Diversity and host association of Botryosphaeriaceae species in native and non-native environments. *Fungal Biology Reviews*, 27(2), 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.04.002>

Snelders, N. C., Rovenich, H., & Thomma, B. P. H. J. (2022). Microbiota manipulation through the secretion of effector proteins is fundamental to the wealth of lifestyles in the fungal kingdom. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(5), fuac022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac022>

Snelders, N. C., Rovenich, H., Petti, G. C., Rocafort, M., van den Berg, G. C. M., Vorholt, J. A., Mesters, J. R., Seidl, M. F., Nijland, R., & Thomma, B. P. H. J. (2020). Microbiome manipulation by a soil-borne fungal plant pathogen using effector proteins. *Nature Plants*, 6(11), 1365–1374. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00799-5>

Sperschneider, J., & Dodds, P. N. (2022). EffectorP 3.0: Prediction of apoplastic and cytoplasmic effectors in fungi and oomycetes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(2), 146–156. <https://doi.org/10.1094/MPMI>

Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018). Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular Plant Pathology*, 19(9), 2094–2110. <https://doi.org/10.1111/mpp.12682>

Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 233–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>

Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, 40(7), 1023–1025. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>

Thilini, K., Peng, J., Li, X., Xing, Q., Liu, M., Zhang, W., Hyde, K. D., Zhao, W., & Yan, J. (2020). LtEPG1, a secretory endopolygalacturonase protein, regulates the virulence of *Lasiodiplodia theobromae* in *Vitis vinifera* and is recognized as a microbe-associated molecular pattern. *Phytopathology*, 110(10), 1727–1736.

Thordal-Christensen, H. (2020). A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(20), 3963–3976. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03515-w>

Todd, J. N. A., Carreón-Anguiano, K. G., Couoh-Dzul, O. J., de los Santos-Briones, C., & Canto-Canché, B. (2023). Effectors: key actors in phytopathology. *Mexican Journal of Phytopathology*, 41(2), 203–228. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-4>

Todd, J. N. A., Carreón-Anguiano, K. G., Islas-Flores, I., & Canto-Canché, B. (2022a). Microbial effectors: Key determinants in plant health and disease. *Microorganisms*, 10(10), 1980. Esto te llevará a <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101980>

Todd, J. N. A., Carreón-Anguiano, K. G., Islas-Flores, I., & Canto-Canché, B. (2022b). Fungal effectoromics: A world in constant evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13433. <https://doi.org/10.3390/ijms232113433>

UniProt Consortium. (2025). Protein B8M9L2 – Oxidoreductase [UniProtKB entry]. UniProt Knowledgebase. <https://www.uniprot.org/uniprot/B8M9L2>

UniProt Consortium. (2025). Protein Q9I310 – Nitric oxide response protein [UniProtKB entry]. UniProt Knowledgebase. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9I310>

Valarmathi, P., & Ladhalakshmi, D. (2018). Post-harvest diseases of cocoa. *Agrobios Newsletter*, 16(11), 95–96.

Valdez-Tenezaca, A. V., Hernández Covarrubias, S. A., Murillo Carrasco, A. G., Guerra Peñalosa, M. I., Castro Figueroa, J. F., Delgado Fernández, M. E., Corona-Gómez, J. A., & Díaz Ulloa, G. A. (2025). Genome de novo (WGS) sequence resource of the *Lasiodiplodia theobromae* Bot-2018-LT45 isolate causing dieback in apple. *International Journal of Plant Biology*, 16(1), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijpb16010010>

Vargas, J., Ciobota, P., Salinas, W., Kampe, B., Aponte, P., Rosch, P., Popp, J & Ramos, L. (2015). Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy. *Food Chem*, 211, 274-280. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.017

Vásquez-López, A., Mora-Aguilera, J. A., Cárdenas-Soriano, E., & Téliz-Ortiz, D. (2009). Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* [Jacq.] H. E. Moore y Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia*, 43(7), 717–728. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000700006

Verhoeven, A., Finkers-Tomczak, A., Prins, P., Valkenburg-van Raaij, D. R., van Schaik, C. C., Overmars, H., van Steenbrugge, J. J. M., Tacke, W., Varossieau, K., Slootweg, E. J., Kappers, I. F., Quentin, M., Goverse, A., Sterken, M. G., & Smant, G. (2023). The root-knot nematode effector MiMSP32 targets host 12-oxophytodienoate reductase 2 to regulate plant susceptibility. *New Phytologist*, 237(6), 2360–2374. <https://doi.org/10.1111/nph.18653>

Vieira, P., & Gleason, C. (2019). Plant-parasitic nematode effectors – Insights into their diversity and new tools for their identification. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.007>

Vignassa, M. (2021). Black spot disease in pineapple: determinism of the infectious process using molecular and biochemical approaches [Doctoral thesis, University of La Réunion]. <https://theses.hal.science/tel-03765217v1>

Wajid, B., & Serpedin, E. (2012). Review of general algorithmic features for genome assemblers for next-generation sequencers. *EURASIP Journal on Bioinformatics and Systems Biology*, 2012(1), Article 18. <https://doi.org/10.1186/1687-4153-2012-18>

Wang, Y., Coleman-Derr, D., Chen, G., & Gu, Y. Q. (2015). OrthoVenn: A web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W78–W84. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv487>

Wang, H., Huang, R., Ren, J., Tang, L., Huang, S., Chen, X., Li, Q. (2023). The evolution of mini-chromosomes in the fungal genus *Colletotrichum*. *mBio*, 14(4), e0062923. <https://doi.org/10.1128/mbio.00629-23>

Wang, Y., Sun, J., & Liu, H. (2023). *OrthoVenn3: An integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes*. BioinfoToolkits. Recuperado de <https://orthovenn3.bioinfotoolkits.net/document>

Wang, Y., Zhang, Y., Bhoyroo, V., Rampadarath, S., & Jeewon, R. (2021). Multigene phylogenetics and morphology reveal five novel *Lasiodiplodia* species associated with blueberries. *Life*, 11(7), 657. <https://doi.org/10.3390/life11070657>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

Xing, Q., Cao, Y., Peng, J., Zhang, W., Wu, J., Zhou, Y., Li, X., & Yan, J. (2022). A putative effector LtCSEP1 from *Lasiodiplodia theobromae* inhibits BAX-triggered cell death and suppresses immunity responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plants*, 11(11), 1462. <https://doi.org/10.3390/plants11111462>

Yan, J. Y., Zhao, W. S., Chen, Z., Xing, Q. K., Hang, Q. G., Chethana, K. W. T., Xue, M. F., Xu, J. P., Phillips, A. J. L., Wang, Y., & others. (2018). Comparative genome and transcriptome analyses reveal adaptations to opportunistic infections in woody plant degrading pathogens of *Botryosphaeriaceae*. *DNA Research*, 25(1), 87–102. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx040>

Yandell, M., & Ence, D. (2012). A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 329–342. <https://doi.org/10.1038/nrg3174>