

## Virulencia de *Phytophthora* sp en brotes de cacao (*Theobroma cacao* L.) a nivel *in vitro*

## Virulence of *Phytophthora* sp in cocoa (*Theobroma cacao* L.) shoots at *in vitro* level

Darlyn José Amaya-Márquez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4961-0283>,  
Angie Lisseth Peñaherrera-Morales<sup>2</sup> <https://orcid.org/0009-0004-8631-914X>, Simón Ezequiel  
Farah Asang<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3245-2936>

<sup>1</sup>Faculta de Ciencias Agrarias, Universidad Agraria del Ecuador, Guayaquil,  
Ecuador  
[damaya@uagraria.edu.ec](mailto:damaya@uagraria.edu.ec), [sfarah@uagraria.edu.ec](mailto:sfarah@uagraria.edu.ec)

<sup>2</sup>Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador  
[angie-morales1298@hotmail.com](mailto:angie-morales1298@hotmail.com)



Esta obra está bajo una licencia internacional  
Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0.

Enviado: 2024/07/15  
Aceptado: 2025/04/29  
Publicado: 2025/06/30

### Resumen

*Phytophthora* sp. es un fitopatógeno significativo que afecta frutos, tallos, hojas, brotes de cacao (*Theobroma cacao* L.) causando considerables pérdidas en la producción. La caracterización de cepas patógenas es de gran utilidad para optimizar el manejo de la enfermedad. Por esta razón, este estudio tuvo como objetivo evaluar la virulencia de *Phytophthora* sp. en brotes de cacao bajo condiciones controladas de cultivo *in vitro*. Inicialmente se llevó a cabo una caracterización morfológica de los aislados de *Phytophthora*. Posteriormente se inoculó este fitopatógeno en brotes desinfectados de dos variedades de cacao: Nacional fino de aroma y CCN-51, siguiendo un diseño completamente al azar factorial con siete repeticiones, utilizando los brotes como unidades experimentales. Las variables evaluadas incluyeron incidencia, severidad, resistencia y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, las cuales fueron evaluadas diariamente durante cuatro días. La identificación del género *Phytophthora* sp fue realizado mediante la prueba molecular con *primers Internal transcribed spacer* ITS4-ITS6. Los resultados mostraron que la incidencia y severidad en los brotes de cacao Nacional Fino de aroma alcanzaron el 100% cuando fueron infectados con la cepa PP8, evidenciando una alta susceptibilidad a la enfermedad conocida como como mazorca

**Sumario:** Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones.

**Como citar:** Amaya-Márquez, D., Peñaherrera-Morales, A. & Farah, S. (2025). Virulencia de *Phytophthora* sp en brotes de cacao (*Theobroma cacao* L.) a nivel *in vitro*. *Revista Tecnológica - Espol*, 37(1), 310-320. <https://rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/1218>

negra. En contraste, los brotes de cacao CCN-51 no presentaron ninguna infección por las cepas evaluadas. Se concluye que la virulencia de *Phytophthora* sp. muestra dependencia específica tanto de la cepa del patógeno como del hospedero. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar la variabilidad fenotípica del patógeno y la resistencia del hospedero para gestionar el manejo fúngico en cultivos de cacao.

**Palabras clave:** Brotes, inoculación, molecular, susceptible, resistencia.

### Abstract

*Phytophthora* sp. is a significant phytopathogen that affects fruits, stems, leaves, and shoots of cocoa (*Theobroma cacao* L.), causing considerable yield losses. The characterization of pathogenic strains is very useful to optimize disease management. For this reason, the objective of this study was to evaluate the virulence of *Phytophthora* sp. in cocoa shoots under controlled in vitro culture conditions. Initially, a morphological characterization of *Phytophthora* isolates was carried out. Subsequently, this phytopathogen was inoculated into disinfected shoots of two cocoa varieties: Nacional fino de aroma and CCN-51, following a completely randomized factorial design with seven replications, using the shoots as experimental units. *Phytophthora* sp. is a significant phytopathogen that affects fruits, stems, leaves, and shoots of cocoa, causing considerable yield losses. The variables evaluated included incidence, severity, resistance, and the area under the disease progress curve, which were evaluated daily for four days. Identification of the genus *Phytophthora* sp was performed through molecular testing using internal transcribed spacer primers ITS4-ITS6. The results showed that the incidence and severity in National Fine aroma cocoa shoots reached 100% when infected with strain PP8, evidencing a high susceptibility to the disease known as black pod. In contrast, CCN-51 cocoa shoots did not show any infection by the strains evaluated. It is concluded that the virulence of *Phytophthora* sp. depends specifically on both the pathogen strain and the host. These findings highlight the importance of considering the phenotypic variability of the pathogen and host resistance to effectively manage fungal diseases in cocoa crops.

**Keywords:** outbreaks, inoculation, molecular, susceptible, resistance.

### Introducción

El género *Phytophthora* es uno de los patógenos fúngicos que afecta gravemente las plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) a nivel mundial (Ferrer et al., 2022). En el país, las plantaciones de cacao están expuestas a pérdidas económicas debido a la incidencia de enfermedades que afectan la producción del mismo (Abad et al., 2018); en este sentido, es agravante la situación debido a que se ha reportado recientemente especies más agresivas (*Phytophthora megakarya*) que *P. palmivora* utilizando marcadores moleculares en la caracterización (Ali et al., 2016; Cedeño et al., 2020). La variación poblacional que experimentan los patógenos en la búsqueda adaptativa contra el hospedante, perjudica el manejo de enfermedades en el cacao.

Esta variabilidad patogénica resalta la influencia del patógeno y hospedero en la magnitud del daño, lo que subraya la necesidad de obtener nuevas estrategias para el manejo eficaz de la enfermedad, una de ellas es conocer el comportamiento de *Phytophthora*.

En consecuencia, es importante que los estudios de virulencia no solo se realicen en órganos como frutos, hojas o plantas, se debe explorar el efecto en brotes de cacao (Ali et al., 2016). A pesar de que estudios en variedades de cacao comercial existen, es necesario

profundizar el efecto del tipo patógeno y hospedante para entender el comportamiento del patógeno a nivel local (Ali et al., 2016).

Según Arellano (2023), evaluó la infección de *P. palmivora* en tres variedades de cacao, el cual señaló que la variedad CCN-51 es más susceptible a la afectación por mazorca negra, y entre los menos afectados se encuentra el cacao trinitario. La hipótesis de este estudio plantea que el nivel de afectación inducido por *Phytophthora* sp. puede diferir a nivel fenotípico entre distintos materiales de cacao sometidos a inoculación artificial. En este contexto, se ha demostrado con eficacia que los métodos de patogenicidad permiten evaluar la tolerancia, susceptibilidad o resistencia de los materiales de cacao (Cedeño et al., 2020). Como parte de la investigación, se llevó a cabo una evaluación de la virulencia de la mazorca negra provocada por *Phytophthora* sp. en brotes de cacao bajo condiciones controladas, proporcionando información relevante para el manejo fitosanitario de la enfermedad.

### Materiales y Métodos

El muestreo se realizó en plantaciones de cacao en la provincia de Los Ríos, Ecuador, donde se detectaron síntomas de mazorca negra. A partir de frutos afectados, se aislaron dos cepas pertenecientes al género *Phytophthora* sp. La selección de muestras incluyó tanto mazorcas con necrosis como frutos sanos, los cuales fueron posteriormente trasladados al laboratorio de biotecnología agrícola para su análisis y procesamiento, con el objetivo de caracterizar la patogenicidad del agente causal.

La desinfección de los frutos fue hecha mediante una inmersión inicial en alcohol al 70%, seguida de un tratamiento con hipoclorito de sodio al 2%. Posteriormente, los frutos fueron enjuagados con agua destilada estéril, garantizando la eliminación de posibles contaminantes superficiales y optimizando las condiciones para su análisis microbiológico. Se extrajeron fragmentos de 0.5 cm de la región media tanto de frutos afectados como sanos. Estos fragmentos fueron cultivados en placas Petri que contenían medio PDA (Potato Dextrose Agar), enriquecido con jugo de zanahoria al 5%, con el objetivo de favorecer el desarrollo del patógeno y facilitar su aislamiento para su posterior análisis (Ivors, 2015).

Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente 22-28°C durante 3-4 días. Cuando se observaron colonias con características de *Phytophthora* sp. se realizaron subcultivos de puntas de hifas para obtener aislados puros en nuevas placas con el mismo medio de cultivo; Las cepas purificadas fueron conservadas para siguientes análisis. Posterior a cinco y diez días de crecimiento, se evaluó la morfología de las colonias de *Phytophthora* sp., es decir, se observó la forma de las colonias (estrella y color blanco algodonoso) y el tiempo requerido para que el patógeno cubriera toda la superficie de las placas Petri. La identificación del tipo de micelio, esporangios y clamidosporas se realizó mediante tinción de azul de metileno y Lugol, y observación bajo un microscopio óptico a 40x.

La identificación molecular del género *Phytophthora* sp. se hizo utilizando la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) con primers ITS4, mediante el uso de primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3'). Para ello, se extrajo ADN de un fragmento de micelio, raspando la superficie de la colonia con un palillo estéril, y se realizó pre-tratamiento de ebullición a 95.9 C. La reacción de PCR se desarrolló con el siguiente máster mix: la mezcla de reacción para la amplificación de ADN incluyó componentes clave en concentraciones específicas. Se empleó ADN en un rango de 1 a 3 ng/μl, acompañado de nucleótidos trifosfatados (dNTP) a una concentración de 200 μM. Los cebadores ITS6 e ITS4, con una concentración inicial de 10 μM, se añadieron en una proporción final de 0.4 μM cada uno. El

búfer de Taq, en una concentración de 10x con 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, aseguró un entorno óptimo para la actividad enzimática, mientras que la polimerasa Taq se incorporó a razón de 0.05 u/μl.

Finalmente, se utilizó agua libre de contaminantes para completar el volumen total de reacción, garantizando la eficiencia del proceso de amplificación de regiones ITS del ADN ribosomal (Grünwald, 2011), y se amplió en un termociclador (Bio- Rad) siguiendo el protocolo descrito a continuación: la amplificación en el termociclador siguió una serie de pasos clave para la amplificación eficiente del ADN. Inicialmente, se realizó la fase de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguida por ciclos de desnaturalización de 1 minuto a la misma temperatura. Posteriormente, se llevó a cabo 35 ciclos en los que se alternaron la fase de alineamiento a 55°C por 1 minuto y la fase de extensión a 72°C por 1 minuto.

Para concluir, se aplicó una extensión final a 72°C durante 10 minutos, garantizando la completa amplificación del material genético. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso, asegurando su estabilidad para análisis posteriores (Grünwald, 2011). La presencia y tamaño de los amplicones se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con tinción de SYBR Safe DNA (Invitrogen), y se compararon con un marcador de peso molecular (Mixed DNA Ladder, Bionner).

Los brotes de cacao de las variedades Nacional Fino de Aroma y CCN-51 fueron cortados a una longitud de 6.8 cm y desinfectados con hipoclorito al 5% durante dos minutos, seguido de lavados en agua destilada estéril y secado en papel toalla estéril. Se realizó una herida en forma de equis en la parte media de los brotes usando un bisturí estéril y en las heridas fueron colocados fragmentos de micelio de una colonia esporulada de *Phytophthora sp.* Los brotes inoculados se colocaron en cajas Petri estériles de 90 mm con dos láminas de papel filtro humedecidas para crear una cámara húmeda y se incubaron en oscuridad. La evaluación de la virulencia se realizó diariamente durante cuatro días (Nyassé et al., 1995). A partir del segundo día, posterior a la inoculación, se estimó el porcentaje de daño midiendo la longitud de la necrosis en los brotes. La severidad del daño se evaluó visualmente utilizando una escala cualitativa ordinal: 0) sin síntomas, 1) puntos pequeños de penetración, 2) fusión de las manchas marrones, 3) lesiones grandes con puntos coloreadas marrones oscuros, menora 4 lesiones marrones grandes y extendidas (Nyassé et al., 1998). La resistencia del huésped se midió siguiendo la metodología de Nyassé et al., (1995); además, se estimó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) usando la fórmula de Shaner & Finney (1977).

El experimento utilizó un diseño completo al azar de tipo factorial. El factor A constó de dos aislados del patógeno más un testigo absoluto y el factor B correspondió a variedades de cacao, la unidad experimental fue un brote de cacao, en total siete repeticiones corresponden a tres tratamientos de *Phytophthora sp.* (dos cepas y uno sin inóculo) y el factor B a dos variedades de cacao. Las variables calificaron los supuestos para realizar un análisis estadístico paramétrico, por ello, se emplearon modelos lineales generalizados mixtos y una prueba no paramétrica, utilizando el software libre Infostat versión 2020 y el software R (Di Rienzo et al., 2010).

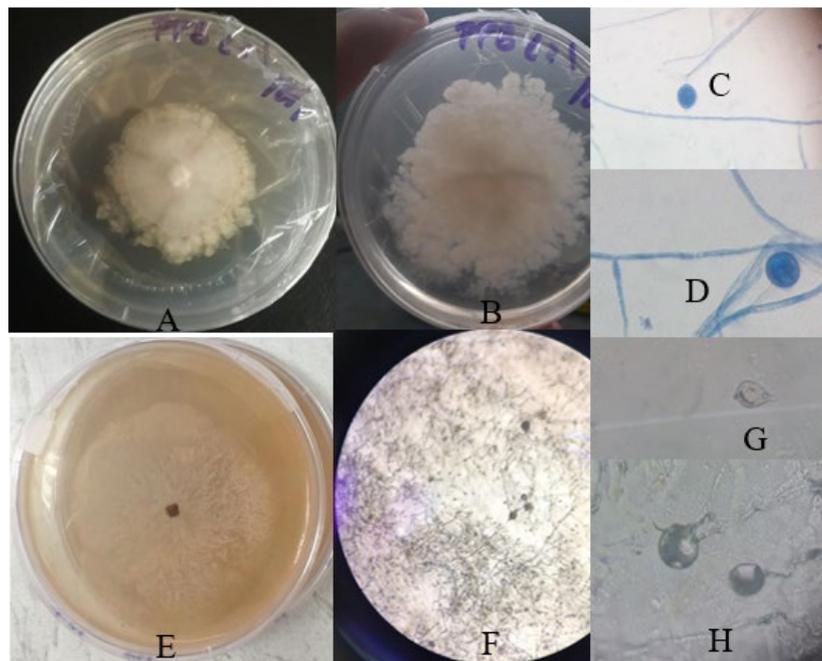
## Resultados y Discusión

Las características morfológicas coincidieron con las esperadas para el género *Phytophthora*, entre las que se menciona micelio algodonoso con apariencia blanca que cubre la superficie de la caja Petri 90 mm en un intervalo de 15 a 18 días. El micelio observado fue de tipo cenocítico con hifas ramificadas. Las papilas se mostraron pronunciadas y el esporangio ovoide y periforme, estos rasgos se atribuyen al género en estudio (Figura 1), esto coincidió

con lo reportado por Erwin & Ribeiro (1996). Además, se identificó clamidosporas de tipo esférica de pared gruesa (Figura 1). Las propiedades mencionadas del patógeno coincidieron con Eden et al. (2020) para especies de *Phytophthora*.

**Figura 1**

*Características morfológicas de aislados de Phytophthora sp*



*Nota:* Colonia de *Phytophthora sp* *in vitro*. La primera fila corresponde a la cepa PP8, segunda fila cepa PPAGR. A, B y D: crecimiento de colonia. C, E y F: Micelio y clamidospora circular. G: Esporangio. H: esporangio y zoospora.

### Caracterización molecular

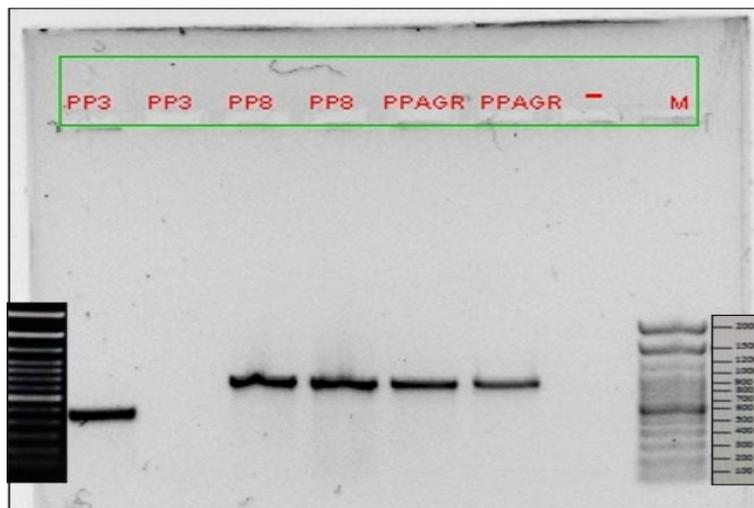
La caracterización molecular mediante la amplificación de la región ITS (*Internal transcribed spacer*) usando *primers* ITS6 e ITS4 permitió obtener fragmentos de ADN de aproximadamente 862 a 941 pares de bases en todas las muestras de *Phytophthora*, excepto en el control negativo (Figura 2). El tamaño de estos fragmentos fue consistente con los reportados previamente para *Phytophthora palmivora* y *P. nicotinae* por Grünwald et al., (2011). También son semejantes a los establecidos por estudios previos realizados por Bowman et al. (2007), así como por Cooke et al. (2000), es decir, se demostró que la amplificación mediante los cebadores ITS6 e ITS4 en la región ITS del ADN ribosomal nuclear de *Phytophthora* permite una identificación precisa del género en muestras analizadas; no obstante, fue fundamental resaltar que la determinación a nivel de especie puede requerir estudios filogenéticos adicionales basados en secuenciación y comparación con bases de datos de referencia; además, se logró producir un producto de PCR característico de *P. palmivora* y *P. nicotinae*, con tamaños aproximados de 900 pb, resultado que fue corroborado recientemente por Latifah et al. (2018), reforzando la validez de esta metodología en la identificación del patógeno.

En el primer gráfico de la Figura 3 se muestra los resultados de la inoculación de patógeno en los brotes de cacao según la incidencia y severidad. En este sentido, la cepa PP8 causó una mayor incidencia y necrosis en el cacao Nacional Fino de aroma en comparación con el CCN-51. El análisis de la severidad externa provocada por *Phytophthora* en brotes de cacao durante un periodo de cuatro días reveló que la interacción entre las cepas (A) y los materiales de cacao (B) tuvo un impacto significativo en la magnitud del daño ( $p < 0.001$ ). En

particular, la cepa PP8 generó una afectación severa en los brotes de cacao a partir del segundo día de evaluación. Asimismo, los brotes de la variedad Cacao Nacional Fino de Aroma fueron los más perjudicados, mostrando una diferencia estadística significativa ( $p < 0.01$ ) en comparación con el testigo absoluto, mientras que la variedad CCN-51 no presentó afectación por ninguna de las cepas evaluadas.

**Figura 2**

*Identificación molecular de Phytophthora palmivora*

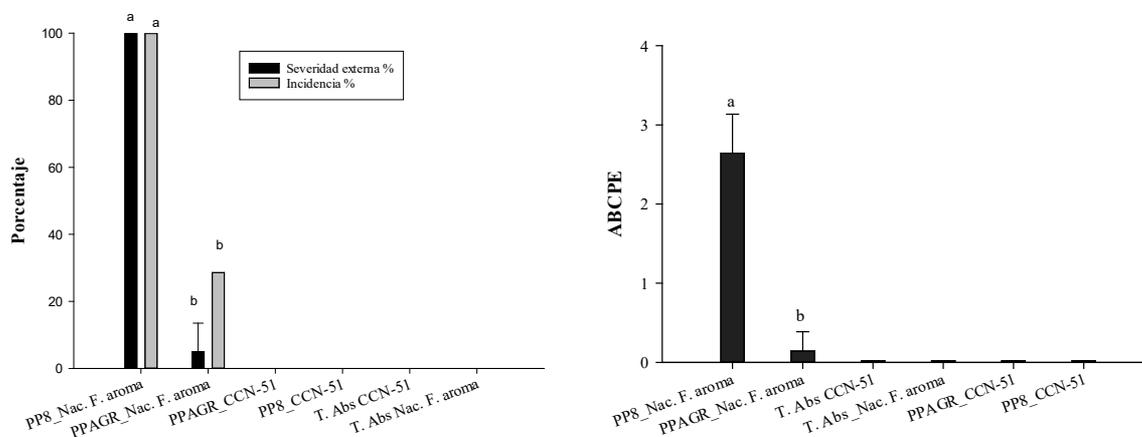


*Nota:* Amplificación por PCR primers ITS6/ITS4 fragmentos 862-941pb en 1% de gel de agarosa. Control negativo (-) PPAGR y PP8= *Phytophthora* PP3= *Fusarium*. M= marcador molecular

En el segundo gráfico de la Figura 3, se observa el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con base en el tamaño diario de la necrosis provocada por *Phytophthora* en los brotes de cacao. Esta ecuación establece que valores más elevados en el eje de las ordenadas (Y) corresponden a una mayor superficie afectada en los brotes de cacao, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la evaluación de severidad externa. En consecuencia, el aislado PP8 ocasionó el mayor impacto en los brotes de Cacao Nacional Fino de Aroma, con una interacción A×B que mostró una diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) altamente significativa.

**Figura 3**

*Evaluación de Phytophthora palmivora en brotes de cacao*



*Nota:* a la izquierda se muestra la severidad externa e incidencia de *Phytophthora* sp. en brotes de cacao, a la derecha el área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Letras diferentes señalan diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

El uso de brotes de cacao permitió estimar el grado de afectación que ejerce *Phytophthora*, esto fue similar a lo señalado por Latifah (2018), quien explicó que las hojas desprendidas de cacao ofrecieron información importante en estudios de patogenicidad. Este estudio sostuvo que el tipo de aislado influyó en los alcances de daño en cacao, aunque CCN-51 no mostró perjuicios significativos respecto del cacao Nacional. La no correspondencia estuvo relacionada al nivel de virulencia de los aislados, según estudios, algunas cepas patogénicas expresaron mayor agresividad en ciertos huéspedes de cacao (McMahon y Purwantara, 2004). Estas aseveraciones obedecieron a la variabilidad patogénica también reportada en otros cultivos (Boccas, 1973), así como en huéspedes como coco, cacao y pimienta negra (Slamet, 1991); de tal forma, esta investigación sustentó que debe ser continuo el estudio de fitopatógeno en cacao con el fin de estimar interacciones que aporten al desarrollo de nuevas alternativas de manejo.

La estimación del efecto de patógenos como *Phytophthora* en cacao ha sido evaluado ya por un tiempo (Phillips-Mora y Galindo, 1989), los frutos han sido incluidos como unidad experimental y asperjados con solución de zoosporas. Nyassé et al. (1995) también señalan un estudio mediante la inoculación artificial de *P. palmivora* y *P. megakarya* hojas, ramas no lignificadas con el fin de mediar el nivel de tolerancia a la enfermedad.

En este sentido, los brotes empleados en el presente estudio fueron clave para identificar cultivares de cacao con resistencia a *Phytophthora* sp., al tiempo que permitieron evaluar la virulencia de cepas locales del patógeno, proporcionando información relevante para el manejo fitosanitario de la enfermedad. De acuerdo con estos antecedentes, las plantas, y órganos del cacao pueden responder al efecto de patógenos, este trabajo señaló que al menos uno de los aislados de *Phytophthora* sp fue virulento en brotes de cacao Nacional, mostrando alta susceptibilidad ante el patógeno; por tanto, se aceptó la hipótesis de que existe interacción entre el tipo de aislado y hospedante. Sin bien es cierto este estudio fue llevado a cabo bajo condiciones controladas en laboratorio; sin embargo, dos aislados, dos materiales de cacao y una época de evaluación no fueron suficientes para sostener estos hallazgos, por tanto, se sugiere utilizar brotes similares en tamaño, edad, grosor e incorporar un mayor número de cepas del patógeno y, finalmente, llevar el experimento en condiciones de campo (Latifah, 2018), donde el ambiente natural puede influir en estas aseveraciones (Nyassé et al., 1995).

### Conclusiones

Este estudio determinó que el tipo de aislado de *Phytophthora* sp puede influir en los daños que ejerce el patógeno en brotes no lignificados, los brotes de cacao Nacional fueron muy susceptible a la inoculación según la incidencia y severidad de la infección causado por el patógeno conocido como mazorca negra. Los brotes pueden ser usados para explorar el alcance de la enfermedad a través de la técnica de inoculación dirigida con micelio y determinar de forma rápida la tolerancia de genotipos de cacao.

### Reconocimientos

Se agradece a la Universidad Agraria del Ecuador por las instalaciones facilitadas para hacer posible la investigación.

Los autores declaran que autor D.A. gestionó el financiamiento y todos los autores tuvieron una contribución y participación equitativa de los demás roles de autoría para esta publicación.

## Referencias

- Acurio Briones, O. K., y Montes Villavicencio, D. J. (2020). Aplicación de los biofungicidas orgánicos en el control de la mazorca negra (*Phytophthora* spp.) en cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en el cantón valencia [Universidad de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/6929>
- Aguilar-Ancocota, R., Carrasco-Espinoza, C., Morales-Pizarro, A., Yovera-Espinoza, F., & Maldonado-Duque, E. (2020). Etiología de la muerte regresiva por *Phytophthora palmivora* en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Manglar*, 17(3), 187-192.
- Aguilar, R., Carrasco, C., Morales, D., y Yovera, F. (2020). Etiología de la muerte regresiva por *Phytophthora palmivora* en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Manglar*. [https://www.researchgate.net/publication/345102241\\_Etiologia\\_de\\_la\\_muerte\\_regresiva\\_por\\_Phytophthora\\_palmivora\\_en\\_el\\_cultivo\\_de\\_cacao\\_Theobroma\\_cacao\\_L](https://www.researchgate.net/publication/345102241_Etiologia_de_la_muerte_regresiva_por_Phytophthora_palmivora_en_el_cultivo_de_cacao_Theobroma_cacao_L)
- Abad, M., Alvarado, A., y Gallardo, A. (2018). Análisis comparativo sobre la incidencia de las tres principales enfermedades en el cacao CCN-51, en el cantón La Troncal, provincia del Cañar, Ecuador. *Dia Inet*, 12(1), 20–30. <https://dia.inet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8278040>
- Agrosavia. (2023). Opciones tecnológicas para el manejo de *Phytophthora* en cacao. <https://www.agrosavia.co/productos-y-servicios/oferta-tecnologica/linea-agricola/cacao/recomendaciones-protocolos-y-metodologias/579-opciones-tecnologicas-para-el-manejo-de-phytophthora-en-cacao>
- Al Tamimi, K., Hidayat, C., y Utami, T. (2023). Flavor precursor formation of non-fermented forastero cocoa beans after flavourzyme® and glucose treatment. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114910>
- Ali, S. S., Amoako-Attah, I., Bailey, R. A., Strem, M. D., Schmidt, M., Akrofi, A. Y., Surujdeo-Maharaj, S., Kolawole, O. O., Begoude, B. A. D., ten Hoopen, G. M., Goss, E., Phillips-Mora, W., Meinhardt, L. W., y Bailey, B. A. (2016). PCR-based identification of cacao black pod causal agents and identification of biological factors possibly contributing to *Phytophthora megakarya*'s field dominance in West Africa. *Plant Pathology*, 65(7), 1095–1108. <https://doi.org/10.1111/ppa.12496>
- Amador, C., Alvarado, A., Farah, S., y Martillo, J. (2022). Caracterización morfológica del cacao nacional “*Theobroma cacao* L.” del cantón Naranjal, Ecuador. *Revista Tecnológica ESPOL*, 34 Núm. 4. <https://doi.org/https://doi.org/10.37815/rte.v34n4.978>
- Antolínez, E., Almanza, P., Baraona, A., Díaz, E., y Serrano, P. (2020). Estado actual de la cacaocultura: una revisión de sus principales limitantes. *Ciencia y Agricultura*. <https://doi.org/https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n2.2020.10729>
- Anzules-Toala, V., Pazmiño-Bonilla, E., Alvarado-Huamán, L., y Borjas-Ventura, R. (2022). Control of cacao (*Theobroma cacao*) diseases in Santo Domingo de los Tsachilas, Ecuador. *Agronomía MEsoamericana*. <https://www.revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/45939>
- Arellano Ibarra, K. V. (2023). Evaluación *in vitro* de la infección de *Phytophthora palmivora* en tres materiales de cacao (*Theobroma cacao* L.) del litoral ecuatoriano. <https://repositorio.uteq.edu.ec/items/183bfc66-667a-4c55-8616-c8d26c824689>
- Avilés, D. (2020). Evaluación del potencial de un microencapsulado en masa de *Trichoderma* spp., para el biocontrol de *Moniliophthora roreri* a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* [Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/55227>
- Bowman, K.D., Albrecht, U., Graham, J.H. & Bright, D.B. 2007. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora* in citrus roots using PCR-RFLP in comparison with other methods. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 143-158. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-007-9135-7>
- Boccas, B.R. 1973. Observations préliminaires sur l'héritité du pouvoir pathogène chez le *P. palmivora* (Butl.) Butl. *Cah. ORSTOM sér. Bio.* 20: 51-56.

- Butler, E. J. (2022). Ficha técnica de *Phytophthora palmivora*. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas tecnicas/Ficha Técnica de Pudricion del cogollo.pdf>
- Calmon, R., Droguett, R., Da Silva, A., y Moura, M. (2020). Especialización y competitividad: análisis de las exportaciones brasileñas de cacao en grano y productos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2348>.
- Cedeño, A., Romero, R., Auhing, J., Mendoza, A., Abasolo, F., y Cancgignia, H. (2020). Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51. *Scientia Agropecuaria*, 11. Núm 4. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.05>
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. & Brasier, C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet. Bio.* 30: 17-32.
- Chávez-Salazar, A., Cueva-Benavides, A., Muñoz-Delgado, V., Documet-Petrik, K., y Vidaurre-Rojas, P. (2022). Beneficio del cacao clones CCN-51, ICS-39 y cacao Nativo (*Theobroma cacao* L.). *Revista Agrotecnologica Amazonica*. <https://doi.org/https://doi.org/10.51252/raa.v2i1.255>
- David, W. P., Aguayo, A. A., Vaca, D. P., y Sánchez, S. T. (2021). Manejo agroecológico de la Moniliasis en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) mediante la utilización de biofungicidas y podas fitosanitarias en el cantón La Troncal. *Revista Alfa*, 5(15), 453–468–453–468. <https://doi.org/10.33996/REVISTAALFA.V5I15.129>
- De Souza, V. R., Luz, E. D. M. N., Pires, J. L., dos Santos, M. V. O., dos Santos, E., de Souza Rodrigues, G., Tocaundo, F., y Neto, A. A. P. (2021). Selection of cocoa clones for resistance to *Phytophthora palmivora* by artificial inoculation and natural infection in the field. *Tropical Plant Pathology*, 46(4), 455–464. <https://doi.org/10.1007/S40858-021-00427-3/METRICS>
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., Gonzalez, L., Casanoves, F., Tablada, M., & Walter Robledo, C. (2010). Infostat: software para análisis estadístico.
- Eden, M.A.; Hill, R.A.; Galpoththage, M. 2000. An efficient baiting assay for quantification of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Plant Pathology* 49: 515-522.
- EPPO Global Database. (2023). *Theobroma cacao*. <https://gd.eppo.int/taxon/THOCA>
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). Morphology and identification of *Phytophthora* species. *Phytophthora Diseases Worldwide*, 96-144.
- Fernández, Y., y Lachenaud, P. (2018). Caracterización de *Phytophthora*, agente etiológico de la pudrición negra de la mazorca del cacao en Cuba y Guyana Francesa. *Centro Agrícola*. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0253-57852018000300017&lng=es&nr=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-57852018000300017&lng=es&nr=iso)
- Ferrer-Sanchez, Y., Mafaldo-Sajami, A. A., Plasencia-Vázquez, A. H., y Urdánigo-Zambrano, J. P. (2022). Riesgo para el cultivo de cacao por los cambios en la distribución potencial del fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* bajo escenarios de cambio climático en Ecuador continental. *Revista Terra Latinoamericana*, 40, 1–10. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1338>
- Gabriel, J., Fernández, S., Plata, G., & Siles, M. (2011). Niveles de resistencia al tizón tardío en clones de papa del Centro Internacional de la Papa (CIP) evaluados en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 16(1), 127-141.
- Guamán, M., Jaramillo, E., y Bernal, J. (2022). Control biológico de la mazorca negra (*Phytophthora Palmivora* L.) En el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Metropolitana*. <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/539>
- Grünwald, N. J., Martin, F. N., Larsen, M. M., Sullivan, Press, C. M., Coffey, M. D., Hansen, E. M., and Parke, J. L. 2011. *Phytophthora-ID.org*: A sequence-based *Phytophthora* identification tool. *Plant Disease* 95: 337-342.

- INIAP [Instituto Nacional de Investigaciones Agrpecuarias]. (2020). Informe Técnico Anual Café y Cacao. [https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5755/1/Informe Anual cacao y cafe 2020.pdf](https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5755/1/Informe%20Anual%20cacao%20y%20cafe%202020.pdf)
- Ivors, K. L. (Ed.). (2015). Laboratory protocols for *Phytophthora* species. The American Phytopathological Society.
- Larbi, S., Tuyee, R., y Kanan, F. (2020). Control biológico de la enfermedad de la mazorca negra del cacao (*Theobroma cacao* L.) con *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. in vitro y en el campo. Academic Journals. <https://doi.org/10.5897/JMA2020.0434>
- Latifah, M., Kamaruzaman, S., ABIDIN, M. Z., & Nusaibah, S. A. (2018). Identification of *Phytophthora* spp. from perennial crops in Malaysia, its pathogenicity and cross-pathogenicity. *Sains Malaysiana*, 47(5), 909-921.
- López-Guerrero, A. (2018). Producción y Comercialización de Cacao Fino de Aroma en el Ecuador- Año 2012-2014. <https://www.scpm.gob.ec/sitio/wp-content/uploads/2019/03/ESTUDIO-DEL-CACAO-IZ7-version-publica-ultima.pdf>
- Martínez, E., y Pérez, L. (2018). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. 30 Núm 2. [https://www.researchgate.net/publication/281640130\\_Incidencia\\_de\\_enfermedades\\_fungicas\\_en\\_plantaciones\\_de\\_cacao\\_de\\_las\\_provincias\\_orientales\\_de\\_Cuba](https://www.researchgate.net/publication/281640130_Incidencia_de_enfermedades_fungicas_en_plantaciones_de_cacao_de_las_provincias_orientales_de_Cuba)
- McMahon, P. & Purwantara, A. 2004. *Phytophthora* on cocoa. In Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia, edited by Drenth, A. & Guest, D.I. ACIAR Monograph 114: 104-115.
- Moreira, Á. V. C., Meza, R. F. R., Arcos, J. A. A., León, A. F. M., Pacheco, F. A., y Martínez, H. F. C. (2020). Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51. *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 503–512. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2020.04.05>
- Nyassé, S., Cilas, C., Herail, C., & Blaha, G. (1995). Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. *Crop protection*, 14(8), 657-663.
- Ortega, R., y Jumbo, A. (2020). Caracterización morfológica del cacao (*Theobroma cacao* L.) en la cuenca del río Nangaritza provincia de Zamora Chinchipe [Universidad Nacional de Loja]. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/18444>
- Palacios Bejarano, C., Afanador Kafuri, L., y Pardo García, J. M. (2021). Identification of *Phytophthora* spp. isolates obtained from cocoa crops in Antioquia, Colombia. *Acta Agronómica*. <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v70n1/0120-2812-acag-70-01-17.pdf>
- Perrine-Walker, F. (2020). *Phytophthora palmivora*-Cocoa Interaction. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 6(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/JOF6030167>
- Pilay, M., y Galo, S. (2023). Métodos de fermentación en el cacao (*Theobroma cacao*) CCN 51 con la norma INEN 176 en la parroquia Guasaganda, La Maná” [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/10094>
- Phillips Mora, W., & Galindo, J. J. (1989). Método de inoculación y evaluación de la resistencia a *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Turrialba Volumen 39*, número 4 (octubre-diciembre 1989), páginas 488-496.
- Ramírez-Guillermo, M. , Lagunes-Espinoza, L., Ortiz-García, C. F., Gutiérrez, O., y Rosa-Santamaría, R. (2020). Variación morfológica de frutos y semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) de plantaciones en tabasco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.117-125>
- Rodríguez Polanco, E., Parra Alferes, E. B., Bermeo Fuquene, P. A., Segura Amaya, J. D., y Rodríguez Polanco, L. A. (2021). Manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora palmivora*) en cacao

- por aplicación conjunta de prácticas culturales y químicas. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 16(1), 79–94. <https://doi.org/10.18359/RFCB.4887>
- Sánchez, S., Crespo, G., Hernández, M., & García, Y. (2008). Factores bióticos y abióticos que influyen en la descomposición de la hojarasca en pastizales. *Pastos y Forrajes*, 31(2), 1-1.
- Shaner, G. and Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*. 67:1051-1056.
- Simamora, A. V., Hahuly, M. V., y Henuk, J. B. (2021). Endophytic fungi as potential biocontrol agents of *Phytophthora palmivora* in the cocoa plant. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(5), 2601–2609. <https://doi.org/10.13057/BIODIV/D220519>
- Sinavimo. (2023). *Phytophthora palmivora*. <https://www.sinavimo.gob.ar/plaga/phytophthora-palmivora>
- Soto, E., Mendoza, P., y Aguilar, J. (2022). Manual de buenas prácticas agrícolas para el cultivo del cacao. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/21346>
- Terrero Yépez, P. I., Peñaherrera Villa fuerte, S. L., Solís Hidalgo, Z. K., Vera Coello, D. I., Navarrete Cedeño, J. B., y Herrera Defaz, M. A. (2018). *In vitro* compatibility of *Trichoderma* spp. with fungicides commonly used in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Investigación Agraria*, 20(2), 146–151. <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2018.diciembre.146-151>
- Tollenaar, D. (2023). *Phytophthora Palmivora* del Cacao y su Control. *Journal of Agricultural Science*. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/16022?locale-attribute=es>
- Vera, J., y Vallejo, C. (2020). Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador. [file:///C:/Users/Tecnoservice/Downloads/rcyt,+Gestor\\_a+de+la+revista,+main+\(1\).pdf](file:///C:/Users/Tecnoservice/Downloads/rcyt,+Gestor_a+de+la+revista,+main+(1).pdf)
- Victorino, L., Argüello, B., Ramírez, J., Restrepo, S., y Cárdenas, M. (2020). Caracterización morfológica de aislamientos de oomicetes obtenidos de *Theobroma cacao* en el departamento del Tolima. *Instname:Universidad de Los Andes*. <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/44793>
- Villamil C., J. E., Sierra A., L. J., Olarte L., Y., Mosquera E., A. T., Fajardo C., J. D., Pinzón, E. H., y Martínez O., J. W. (2018). Integración de prácticas culturales y control biológico para el manejo de *Moniliophthora roreri* Cif y Par. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 32(2), 13–25. <https://doi.org/10.22267/RCIA.153202.9>