

Identificación morfológica y molecular de *Phytophthora* y su virulencia in vitro en brotes de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Morphological and molecular identification of *Phytophthora* and its virulence in vitro on cocoa shoots (*Theobroma cacao* L.)

Darlyn Amaya-Márquez ¹

<https://orcid.org/0000-0003-4961-0283>
damaya@uagraría.edu.ec

Mirian Elizabeth Villavicencio-Vasquez ²

<https://orcid.org/0000-0003-3237-0295>
mirvilla@espol.edu.ec

Danny Daniel Avilés Párraga ¹

<https://orcid.org/0000-0001-7829-3075>
daviles@uagraría.edu.ec

Yoansy García Ortega ³

<https://orcid.org/0000-0002-2839-3956>
yogarcia@uagraría.edu.ec

Fernando Espinoza-Lozano ^{* 2}

<https://orcid.org/0000-0002-2051-2682>
rofeespi@espol.edu.ec

*Corresponding author

1. Universidad Agraria del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrarias, Guayaquil, Ecuador.

2. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Campus Gustavo Galindo, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

3. Universidad Agraria del Ecuador, Instituto de Investigación Ing. Jacobo Bucaram Ortiz, Guayaquil, Ecuador.

Citación

Amaya-Márquez D, Villavicencio-Vasquez EV, Avilés Párraga DD, García Ortega Y, Espinoza-Lozano F. 2025. Identificación morfológica y molecular de *Phytophthora* y su virulencia in vitro en brotes de cacao (*Theobroma cacao* L.). Revista peruana de biología 32(1): e28901 001- 010 (marzo 2025). doi: <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v32i1.28901>

Presentado: 04/09/2024

Aceptado: 20/02/2024

Publicado online: 15/03/2025

Editor: Leonardo Romero

Resumen

En este estudio se analizaron dos cepas de *Phytophthora* (PP8 y PPAGR) aisladas de mazorcas de cacao (*Theobroma cacao*) con síntomas característicos de la enfermedad de la mazorca negra, recolectadas en la provincia de Los Ríos, Ecuador. Mediante análisis molecular, utilizando los cebadores de la región ITS1, 5.8S e ITS2 (ITS4 - ITS6) y la secuenciación del producto amplificado, se determinó que ambas cepas pertenecen a la especie *P. palmivora*. Adicionalmente, se evaluó la virulencia de las cepas mediante su inoculación en brotes de cacao Nacional Fino de Aroma y CCN-51, empleando un diseño completamente al azar factorial con siete repeticiones, donde cada brote de cacao se consideró como unidad experimental. Los resultados indicaron que la cepa PP8 presentó una incidencia y severidad del 100 % en brotes de cacao Nacional Fino de Aroma, evidenciando una alta susceptibilidad a *Phytophthora*. Asimismo, se determinó que la cepa PP8 infecta exclusivamente los brotes de cacao Nacional, mientras que los brotes de CCN-51 no fueron afectados por ninguna de las cepas evaluadas. En conclusión, el impacto de *Phytophthora* varía en función de la virulencia del aislado y de la variedad de cacao.

Abstract

This study analyzed two strains of *Phytophthora* (PP8 and PPAGR) isolated from cacao (*Theobroma cacao*) pods showing characteristic symptoms of black pod disease, collected in the province of Los Ríos, Ecuador. Molecular analysis using primers targeting the ITS1, 5.8S, and ITS2 regions (ITS4 - ITS6), along with sequencing of the amplified product, identified both strains as *P. palmivora*. Additionally, the virulence of the strains was assessed by inoculating them into shoots of Nacional Fino de Aroma and CCN-51 cacao varieties. A completely randomized factorial design with seven replicates was used, considering each cacao shoot as an experimental unit. The results showed that strain PP8 exhibited 100% incidence and severity in Nacional Fino de Aroma cacao shoots, demonstrating a high susceptibility to *Phytophthora*. Furthermore, strain PP8 was found to infect only Nacional cacao shoots, whereas CCN-51 cacao shoots remained unaffected by either strain. In conclusion, the impact of *Phytophthora* depends on both the virulence of the isolate and the cacao variety.

Palabras clave:

Brotes del cacao, ensayo de virulencia, *Phytophthora palmivora*, podredumbre negra de la mazorca, Ecuador.

Keywords:

Shoots of the cocoa, virulence test, *Phytophthora palmivora*, black pod rot, Ecuador.

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de gran importancia económica tanto para pequeños como para grandes productores (Abad et al. 2018), con exportaciones que alcanzaron las 362,494 TM en el año 2023 (Banco Central del Ecuador 2024). Sin embargo, su producción se ve amenazada por la incidencia de plagas y, principalmente, por enfermedades de origen fúngico, las cuales pueden causar pérdidas superiores al 70% (Ferrer-Sánchez et al. 2022). Entre las enfermedades más relevantes se encuentran la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) (Bailey et al. 2018) y la mazorca negra o pudrición parda, causada por el oomiceto *Phytophthora* (Decloquement et al. 2021).

La pudrición parda o mazorca negra es una enfermedad ocasionada por diversas especies de *Phytophthora*, siendo *Phytophthora palmivora* la más frecuentemente reportada. Bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad, este patógeno puede infectar frutos, brotes, tallos y cojinetes florales, provocando necrosis. Mediante el uso de marcadores moleculares, se han identificado múltiples especies de *Phytophthora* como agentes causales de esta enfermedad, entre ellas *Phytophthora megakarya*, la cual ha demostrado ser más virulenta que *P. palmivora* (Ali et al. 2016; Moreira et al. 2020). Esto sugiere que el daño ocasionado por *Phytophthora* puede variar según el aislado y el huésped. Si bien los efectos más notorios de este patógeno se manifiestan en los frutos de cacao, existe escasa información sobre su impacto en brotes jóvenes (Ali et al. 2016).

Por otro lado, se conoce poco sobre la respuesta de distintas variedades de cacao al ataque de *Phytophthora*, incluyendo cultivares de uso comercial como CCN-51 y el cacao Nacional fino de aroma. Considerando que cada variedad puede responder de manera diferenciada a la infección, esta información resulta fundamental para el desarrollo de estrategias de manejo integrado de la enfermedad (Ali et al. 2016).

Estudios recientes han evaluado la susceptibilidad de frutos y plantas de cacao de las variedades CCN-51, fino de aroma y trinitario bajo condiciones controladas durante seis días, encontrando que *Phytophthora* causó una mayor afectación en CCN-51, mientras que el cacao Nacional y el trinitario presentaron una menor infección, lo que evidencia la influencia del genotipo en la severidad del daño provocado por el patógeno (Arellano 2023).

En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivos identificar a nivel de especie los aislados de *Phytophthora* y evaluar in vitro su incidencia en brotes de dos variedades de cacao.

Material y métodos

Material de estudio. El aislamiento de *Phytophthora* se realizó de mazorcas con síntomas típicos de la enfermedad mazorca negra (Figura 1), recolectadas en dos fincas de la provincia de Los Ríos, Ecuador (el aislado PP8 en el cantón Babahoyo coordenadas 1°59'26.7"S,

79°21'36.6"W y una altitud de 24 m; y el aislado PPA-GR en el cantón Buena Fe coordenadas 1°59'26.7"S, 79°21'36.6"W y una altitud de 162 m) recolectadas en julio y agosto de 2023 respectivamente.

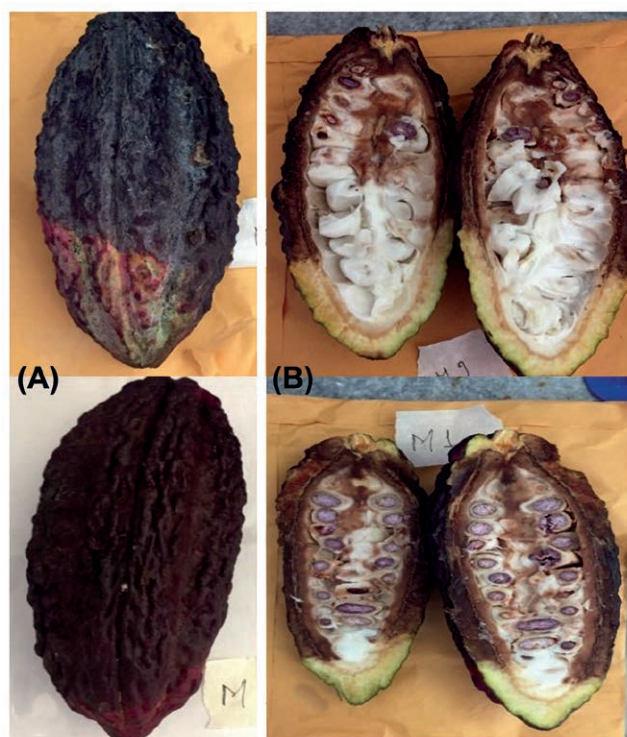


Figura 1. Mazorca de cacao con pudrición negra. (A) Síntomas externos. (B) Daño interno en la mazorca de cacao.

Aislamiento de *Phytophthora*. Las mazorcas fueron llevadas al laboratorio, donde se desinfectaron utilizando alcohol al 70 %, hipoclorito de sodio al 2 % y agua destilada estéril (Ramírez 2016). Posteriormente, se realizaron siembras en fragmentos de 0.5 cm² en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) enriquecido con 5% de jugo de zanahoria (Ivors 2015). Las cajas de Petri se incubaron a 28 ± 2 °C durante 3 o 4 días. Al observar el crecimiento blanquecino característico de *Phytophthora*, se procedió a transferir el cultivo a nuevas cajas de Petri con medio PDA y se incubaron entre 5 a 7 días para su posterior selección.

Después del período de incubación, se seleccionaron los aislados que mostraron el crecimiento característico de *Phytophthora*, es decir, un micelio ligeramente blanquecino, algodonoso y con una forma estrellada (Hernández Pérez et al. 2019). Los aislados fueron criopreservados en un ultracongelador -80°C Fisher Scientific Isotemp hasta su posterior procesamiento.

Identificación morfológica y molecular de *Phytophthora*. Las placas teñidas con azul de lactofenol y Lugol fueron observadas bajo un microscopio óptico con un aumento de 40x, observando las estructuras características de *Phytophthora* como el micelio no septado, la forma del esporangio y las clamidosporas (Palacios-Bejarano et al. 2021; Abad et al. 2023).

Con los cultivos puros, se realizó la extracción del ADN genómico siguiendo el protocolo descrito por Ceniz (1992). La identificación molecular se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) mediante dos metodologías:

La primera, utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los *primers* ITS6 5'-GAAGGTGA-AGTCGTAACAAGG-3' y ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. El master mix se preparó con los reactivos y condiciones descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación máster mix para PCR

Componentes	Cantidad
DNA	1-3 ng/μl
dNTP (2.0mM)	200 μM
ITS6 10uM stock	0.4 μM
ITS4 10uM stock	0.4 μM
10 x Taq búfer con 15mM MgCl ₂	1 x
Taq 5u/μL	0.05 u/μl
Agua	NA

Fuente: (Grünwald et al. 2011)

La amplificación del ADN genómico se llevó a cabo utilizando un termociclador BIO RAD, siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 2. Para la visualización del amplicon, se preparó un gel de agarosa al 1% (Agarose, LE Analytical) y se analizó en el equipo Molecular Imager® Gel Doc™ XR System. La comparación del peso molecular se realizó mediante un marcador de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen). Para este oomiceto, se esperaba obtener una banda en el rango de 862 – 941 pb (Grünwald et al. 2011)

Tabla 2. Condiciones de temperatura para la PCR

Pasos	Ciclos	Condiciones de temperatura
1	1	94C por 3min
2		94C por 1min
3	35 (repetir paso 2-4)	55C por 1min
4		72C por 1min
5	1	72C por 10min
-	-	Almacenar a -20°C hasta su uso

Fuente: (Grünwald et al. 2011)

La segunda, mediante la secuenciación SANGER de la región ITS1, 5.8S, ITS4, para esto se lo envió a la empresa MACROGEN en Corea. La calidad de estas secuencias se analizó con el programa FINCHTV, versión 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/finchtv>) y se compararon con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando la herramienta BLAST.

Para el análisis filogenético, se alinearon las secuencias obtenidas en este estudio con secuencias de referencia de *Phytophthora* disponibles en la base de datos de

NCBI y empleadas por Maizatul-Suriza et al. (2019), utilizando el programa MEGA X Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versión 10 (Kumar et al. 2018) (Tabla 3).

Inoculación de *Phytophthora* en brotes de cacao

Los brotes de cacao, recolectados de plantaciones establecidas, fueron llevados al laboratorio de fitopatología de la Universidad Agraria del Ecuador para el ensayo de virulencia de *Phytophthora*. Primero, se cortaron en segmentos de 6 – 8 cm de longitud se desinfectaron con hipoclorito al 5% durante dos minutos, se lavaron en agua destilada estéril y se secaron en papel toalla estéril.

Para la inoculación de *Phytophthora*, se realizó una herida en forma de equis con un bisturí estéril en la parte media de los brotes de cacao Nacional fino de aroma y CCN-51. Se tomaron fragmentos de micelio de una colonia esporulada y se colocaron en las heridas. Los brotes inoculados se colocaron en cajas Petri estériles de 90 mm, debajo de las cuales se colocaron dos láminas de papel filtro humedecidos con agua destilada estéril para crear una cámara húmeda que favoreciera la viabilidad del patógeno. Los brotes se incubaron en oscuridad. Las evaluaciones se realizaron diariamente durante 4 días (Nyassé et al. 1995).

A partir del segundo día posterior a la inoculación con *Phytophthora* se evaluó la afectación del patógeno. Para ello, se estimó el porcentaje de daño comparando la longitud del brote y la extensión de la necrosis causada por *Phytophthora*. El daño se midió visualmente utilizando una escala cualitativa ordinal de severidad 0) sin síntomas, 1) puntos pequeños de penetración, 2) fusión de manchas marrones, 3) lesiones grandes marrones y más oscuras, y 4) lesiones marrones grandes y extendidas. La resistencia del huésped se evaluó siguiendo la metodología de Nyassé et al. (1995).

Se estimó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad para comparar la agresividad externa de las cepas, utilizando la fórmula propuesta por Shaner y Finney (1977) que se describe a continuación:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{Y_{i+1} + Y_i}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

Y_i = severidad inicial;
 Y_{i+1} = Severidad actual;
 t_{i+1} = tiempo actual;
 t_i = tiempo inicial.

Diseño experimental y análisis de datos estadísticos. En este estudio se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial asimétrico 3 x 2. El factor A corresponde a dos cepas de *P. palmivora* y un tratamiento sin inóculo, mientras que el factor B incluyó dos variedades de cacao. El brote de cacao se consideró como la unidad experimental, con un total de siete repeticiones por tratamiento (Tabla 4).

Tabla 3. Acciones de referencia para aislados de *Phytophthora*.

Aislado	Identificación según base de datos	Origen	Hospedero	ITS Gen bank accession
P6948	<i>P. palmivora</i>	Malaysia	<i>H. brasiliensis</i> (rubber)	KY475615
PPC280574	<i>P. palmivora</i>	Colombia, Tumaco	<i>Elaeis guineensis</i> (palma Africana)	KY475616
P16828	<i>P. palmivora</i>	Colombia, Zona Central	<i>E. guineensis</i> (Palma africana)	KY475617
P16831	<i>P. palmivora</i>	Colombia, Tumaco	<i>E. guineensis</i> (Palma africana)	KY475618
P8513	<i>P. palmivora</i>	Colombia	<i>T. cacao</i> (cacao)	KY475619
P0497	<i>P. palmivora</i>	Colombia	<i>T. cacao</i> (cacao)	KY475620
IMI382544	<i>P. palmivora</i>	Indonesia	<i>C. nucifera</i> (coco)	KY475621
IMI382528	<i>P. palmivora</i>	Indonesia	<i>C. nucifera</i> (coco)	KY475622
P16385	<i>P. palmivora</i>	California, USA	<i>Howea forsteriana</i> (kentia palma)	KY475625
CBS179.26	<i>P. palmivora</i>	Sri Lanka	<i>T. cacao</i> (cacao)	KY475627
CBS298.29	<i>P. palmivora</i>	Trinidad & Tobago	<i>T. cacao</i> (cacao)	KY475628
PPG11	<i>P. palmivora</i>	Ghana	<i>T. cacao</i> (cacao)	KY475631
PPG13	<i>P. palmivora</i>	Ghana	<i>T. cacao</i> (cacao)	KY475632
CBS1113.46	<i>P. palmivora</i>	South Korea	<i>Cymbidium spp.</i> (orquidea)	KY475633
PPC2614P	<i>P. palmivora</i>	Colombia, Tumaco	<i>E. guineensis</i> (Palma africana)	MH401198
PPC3614L	<i>P. palmivora</i>	Colombia, Tumaco	<i>E. guineensis</i> (Palma africana)	MH401199
P19537	<i>P. nicotianae</i>	Colombia	<i>E. guineensis</i> (Palma africana)	MH401208
P19538	<i>P. nicotianae</i>	Colombia	<i>E. guineensis</i> (Palma africana)	MH401209
PPG3	<i>P. megakarya</i>	Ghana	<i>T. cacao</i> (cacao)	MH401202
PPG4	<i>P. megakarya</i>	Ghana	<i>T. cacao</i> (cacao)	MH401203
PPG12	<i>P. megakarya</i>	Ghana	<i>T. cacao</i> (cacao)	MH401204
PC01	<i>P. cryptogea</i>	Desconocido	Desconocido	MH401205
13-A2	<i>P. infestans</i>	Reino Unido	<i>Solanum tuberosum</i> (papa)	MH401206
2009-7654A	<i>P. infestans</i>	Reino Unido	<i>Solanum tuberosum</i> (papa)	MH401207
CBS581.69	<i>P. citrophthora</i>	Malaysia	<i>H. brasiliensis</i> (rubber)	MH401211
CBS358.30	<i>P. colocasiae</i>	Sri Lanka	<i>H. brasiliensis</i> (rubber)	MH401210
PYT01	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Desconocido	Desconocido	MH401212
PP8 (Este estudio)	<i>P. palmivora</i>	Ecuador	<i>T. cacao</i> (cacao)	PQ060229
PPAGR (Este estudio)	<i>P. palmivora</i>	Ecuador	<i>T. cacao</i> (cacao)	PQ060230

Fuente: (Maizatul-Suriza et al. 2019)

Tabla 4. Descripción de tratamientos. Abs: Absoluto. PPAGR y PP8 son aislados del género *Phytophthora*.

Nº Tratamientos	A*B combinaciones	Factor A (inoculación)	Factor B (Huésped)
1	A1B1	PPAGR	CCN-51
2	A2B1	PP8	CCN-51
3	A3B1	Testigo Abs	CCN-51
4	A1B2	PPAGR	Nacional Fino de Aroma
5	A2B2	PP8	Nacional Fino de Aroma
6	A3B2	Testigo Abs	Nacional Fino de Aroma

Resultados y Discusión

A partir de una matriz de datos en Excel con las variables dependientes evaluadas, fueron analizados para verificar los supuestos de normalidad e igualdad de varianza respectivos para el análisis paramétrico. Dado que los datos no cumplían con estos supuestos, se aplicaron pruebas no paramétricas y modelos lineales generalizados mixtos utilizando Infostat versión 2020 (Di Rienzo et al. 2020) y el software R (RStudio Team 2020).

Aislamiento, identificación morfológica y molecular de *Phytophthora*. La caracterización morfológica y molecular proporciona información fundamental para la identificación y clasificación del género *Phytophthora*. Este organismo es un oomiceto, un microorganismo eucariota que, aunque morfológicamente similar a los hongos, pertenece a un grupo filogenéticamente distinto. Según Mélida et al. (2013), *Phytophthora* se distingue por características propias de las plantas, como la

composición de su pared celular, la cual está constituida principalmente por celulosa, a diferencia de los hongos verdaderos, cuya pared celular está compuesta principalmente por quitina.

En este estudio, se observó que la colonia de *Phytophthora* presentó un crecimiento lento y algodonoso, de color blanco, cubriendo una caja Petri de 9 cm en un período de 15 a 18 días tras la siembra en medio de cultivo agar zanahoria al 5% (Fig. 2). El micelio es cenocítico, con bordes redondeados; los esporangios son piriformes,

mes, ovoides a elipsoides, con papilas pronunciadas; las zoosporas son circulares y las clamidosporas, de forma ovoide a redondeada (Erwin & Ribeiro, 1996), características propias del género *Phytophthora*. Estas observaciones coinciden con lo reportado por Eden et al. (2000) y Aguilar-Ancota et al. (2020), quienes también describieron estructuras macroscópicas y microscópicas similares. Además, se observó que los aislados no presentaron estructuras sexuales, como oosporas, lo cual se atribuye a la composición y condiciones del medio de crecimiento in vitro.

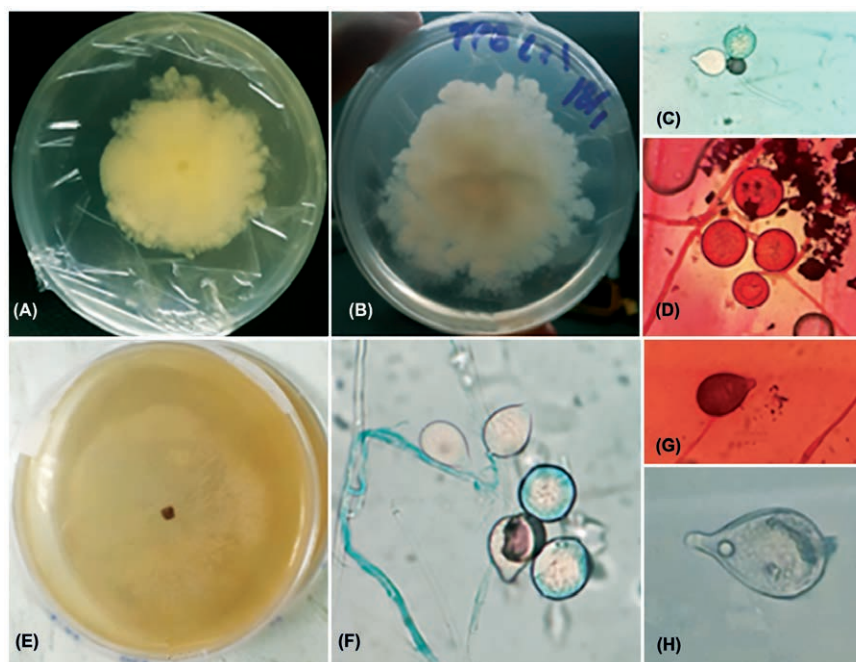


Figura 2. Morfología de colonias de *P. palmivora*. (a) Cepa PP8; (b) Cepa PP8 reverso; (c y d) Micelio no septado de PP8 y clamidospora circular; (e) Cepa PPAGR; (f) Micelio no septado de PPAGR y clamidospora circular; (g) esporangio de PPAGR; (h) esporangio y zoospora de PPAGR.

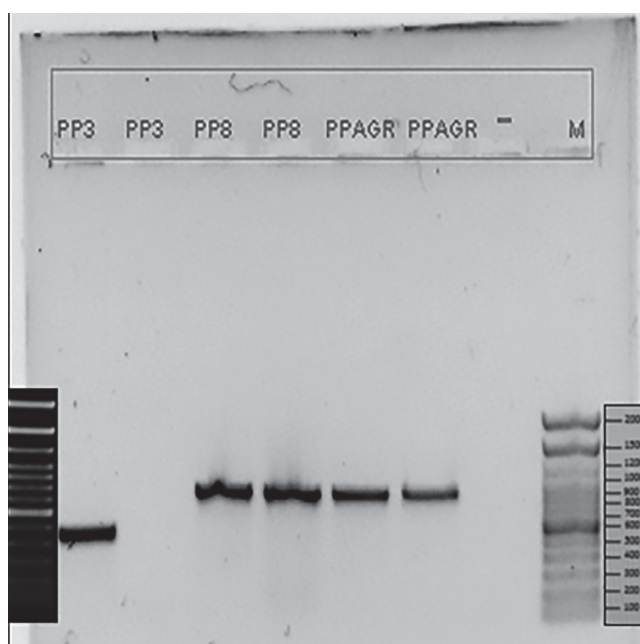


Figura 3. Producto PCR amplificado con *primers* ITS6 e ITS4 mostrando bandas de aproximadamente 862-941pb en un gel de agarosa al 1%. De derecha a izquierda **M**= marcador molecular - Control negativo, **PPAGR**, **PP8**, Control **PP3** (*Fusarium* sp.)

La caracterización molecular, realizada mediante la amplificación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) utilizando los cebadores ITS6 e ITS4, permitió la identificación de *P. palmivora*. Se obtuvieron fragmentos de ADN con un tamaño esperado de entre 862 y 941 pb (Fig. 3) (Grünwald et al, 2011). Estos resultados fueron consistentes con los reportados por Cooke et al. (2000) y Bowman et al. (2007) indicaron que la amplificación con estos cebadores produce un producto de PCR característico para *P. palmivora* y *P. nicotianae*, con un tamaño aproximado de 900 pb. Este hallazgo ha sido confirmado por Latifah et al. (2018).

Los resultados de la secuenciación fueron validados mediante análisis BLAST, evidenciando una identidad del 100% con *P. palmivora*. Para reforzar esta identificación, el análisis filogenético de máxima verosimilitud reveló que las cepas estudiadas se agrupan con cepas de referencia de *P. palmivora*. Resultados similares fueron obtenidos por Matos-Cueto et al. (2013) y Palacios-Bejarano et al. (2021) en estudios con cultivos de cacao, donde la mayoría de los aislados obtenidos de mazorcas con síntomas de mazorca negra correspondieron a este patógeno (Fig. 4).

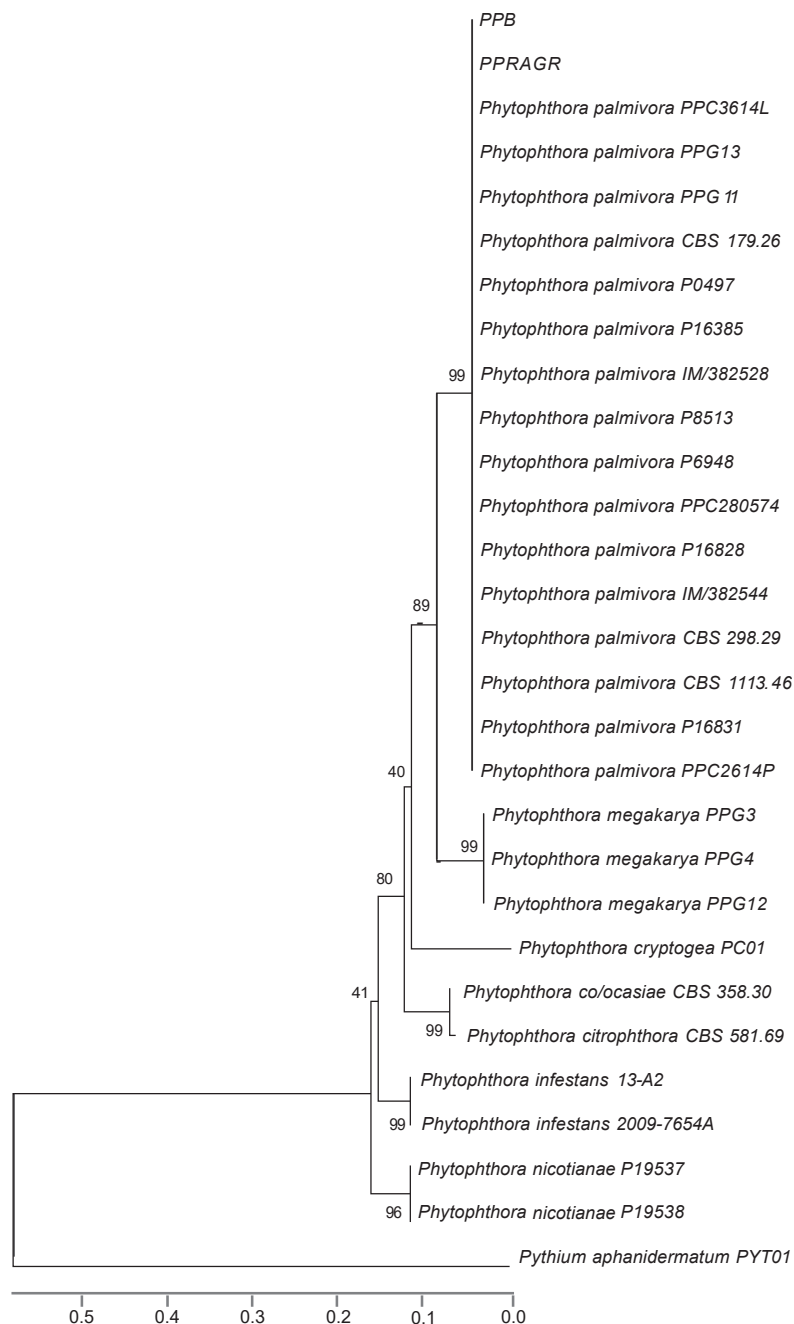


Figura 4. Árbol filogenético que muestra la relación entre aislados de *Phytophthora* provenientes de diferentes hospedadores y orígenes demográficos. Este árbol fue construido a partir de datos de ITS rDNA utilizando el método de Máxima Verosimilitud, basado en el modelo Hasegawa-Kishino-Yano. Se presenta el árbol con el LOG de verosimilitud más alto (-3216.33).

Inoculación de *Phytophthora* en brotes de cacao.

El análisis de la incidencia y severidad externa causada por *Phytophthora* sp. en brotes de cacao durante un período de cuatro días mostró una interacción estadísticamente significativa entre cepas y material de cacao ($p < 0.01$). Se observó que solo la cepa PP8 provocó un daño significativo en los brotes de cacao Nacional fino de aroma, mientras que la inoculación del patógeno no afectó el material CCN-51 (Fig. 5A). Además, se estimó el ABCPE a partir del tamaño diario de la necrosis causada por *Phytophthora* sp. en los brotes de cacao. Los valores más altos de ABCPE indicaron una mayor severidad del daño externo (Fig. 5B), lo que concuerda con las observaciones previas de incidencia y severidad externa.

El uso de brotes terminales de cacao para evaluar la virulencia de aislados mediante inoculación con micelio ha demostrado ser una técnica eficaz para determinar el daño potencial de *Phytophthora* en este cultivo. Latifah et al. (2018) utilizaron hojas desprendidas de cacao para evaluar la virulencia de 18 aislados de *Phytophthora*, observando que todas las cepas afectaron frutos inmaduros y hojas desprendidas, independientemente del huésped. En contraste, el presente estudio reveló que ninguna de las cepas inoculadas afectó al cacao CCN-51, mientras que el aislado PP8 sí afectó los brotes de cacao Nacional fino de aroma, según la incidencia y severidad externa observadas. La variabilidad en la virulencia reportada en este estudio podría atribuirse a que algunas cepas de *Phytophthora* pueden cambiar de huésped, mientras que otras muestran especificidad (Guest et al. 2004).

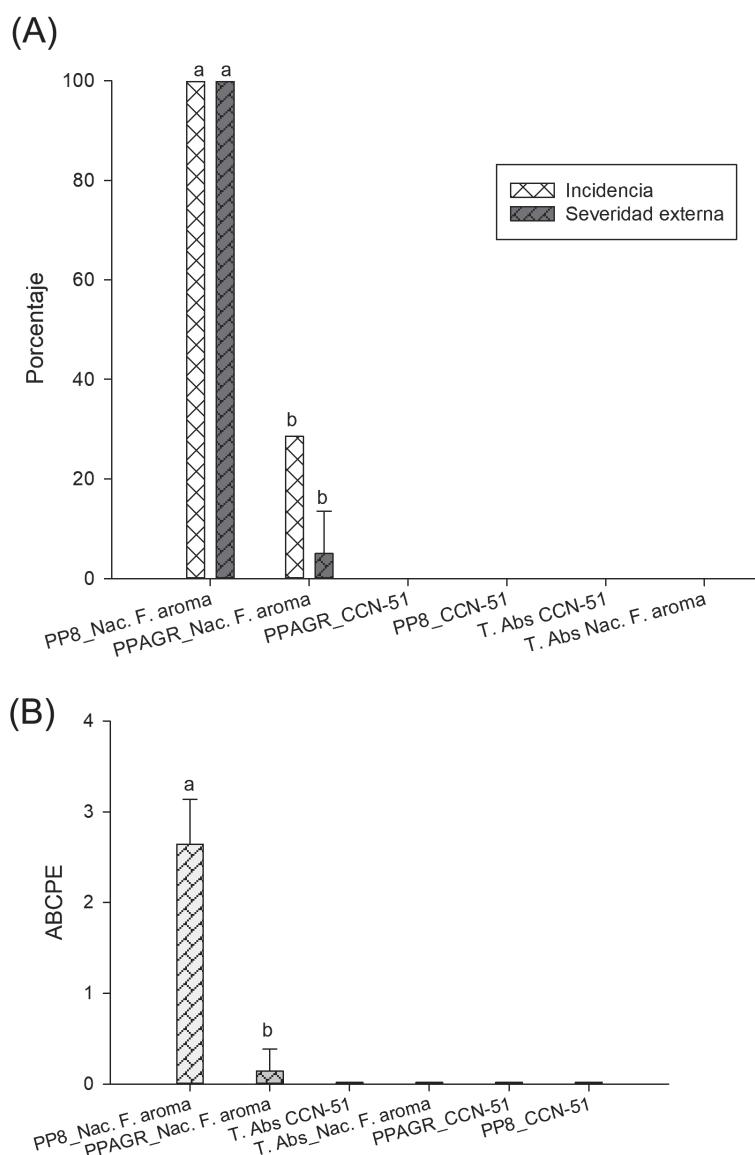


Figura 5. (A) Promedio de severidad interna e incidencia de *Phytophthora* sp. en brotes de cacao durante cuatro días de evaluación *in vitro*. Las letras diferentes indican diferencias significativas según los modelos lineales generalizados mixtos $p < 0.01$; **(B)** Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en brotes (ABCPE) de cacao durante los cuatro días de evaluación *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas según los Modelos lineales generalizados mixtos $p < 0.01$.

Un estudio reciente demostró que, tras la inoculación de frutos de cacao, el oomiceto identificado como *P. palmivora* mediante marcadores moleculares presentó 17 individuos altamente virulentos y cuatro con virulencia moderada (Kuswinanti et al. 2020). Este comportamiento variable ha sido observado en cultivos como jamaica, berenjena, tomate y melón, así como en huéspedes como coco, cacao y pimienta negra, evidenciando una variabilidad patogénica significativa (Drenth & Guest 2013). Se ha sugerido que esta variabilidad en la virulencia está relacionada con la función específica de ciertos genes, lo que genera una mayor diversidad genética en determinadas cepas (Ali et al. 2017).

La caracterización de la susceptibilidad al patógeno se ha evaluado mediante diferentes metodologías. Phillips Mora y Galindo (1989) utilizaron una solución de 1.5×10^4 zoosporas/mL en discos de papel inoculados en frutos para caracterizar variedades susceptibles, moderadamente resistentes y resistentes. Posteriormente, Nyassé et al. (1995) emplearon diferentes órganos del cacao, como hojas, ramitas no lignificadas y discos foliares, para estimar la resistencia a *P. palmivora* y *P. megakarya*, obteniendo resultados similares a los obtenidos con frutos. Esto sugiere que la búsqueda de variedades resistentes podría realizarse utilizando órganos vegetales, como los brotes empleados en el presente estudio.

En este sentido, los brotes de cacao Nacional fino de aroma presentaron un grado cuatro de severidad, indicando la presencia de "lesiones marrones grandes ampliadas" tras cuatro días de evaluación, lo que sugiere que esta variedad es susceptible a *Phytophthora* bajo condiciones controladas. En síntesis, la inoculación de *Phytophthora* mediante fragmentos de micelio permitió estimar que el nivel de daño varía en función de la cepa y del material de cacao utilizado en los ensayos de inoculación in vitro (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de cacao según el grado de afectación causado por *Phytophthora*. Promedio señala el promedio de severidad externa en grados de escala, seguido de la desviación estándar.

Tratamientos	Cacao	Promedio*	Clasificación
PP8	Fino de aroma	4.00±0.00 a	Susceptible
PPAGR	Fino de aroma	0.29±0.00 b	Resistencia
PP8	CCN-51	0.00±0.00 b	Resistencia
PPAGR	CCN-51	0.00±0.00 b	Resistencia

*Letras diferente señalan diferencia significativa ($p < 0.05$) según Modelos lineales generalizados mixtos.

Es importante considerar que los brotes utilizados no eran homogéneos en cuanto a tamaño, edad y grosor. Esta variabilidad podría explicar por qué algunos brotes no fueron afectados, lo que podría estar relacionado con la proporción de lignina y nitrógeno, factores que influyen en la descomposición del tejido vegetal (Sánchez et al. 2008).

La identificación morfológica y molecular permitió caracterizar de manera concluyente al agente causal de

la mazorca negra, confirmando que los dos aislados utilizados en el presente estudio pertenecen a la especie *P. palmivora*. La incidencia y severidad de *Phytophthora* se atribuyó a la cepa PP8 en brotes de cacao Nacional fino de aroma, mientras que los brotes de CCN-51 no fueron afectados, lo que evidencia la importancia del tipo de huésped en la virulencia del patógeno. En conclusión, los brotes de cacao pueden emplearse como un método rápido para estimar la susceptibilidad o resistencia de diferentes materiales bajo condiciones controladas. No obstante, es fundamental replicar estos ensayos utilizando brotes homogéneos y no lignificados. Además, debido a la variabilidad fenotípica observada, el manejo de *Phytophthora* debe basarse en la caracterización patogénica de las cepas locales para optimizar estrategias de control cultural, químico, biológico o genético.

Literatura citada

- Abad-Sánchez ML, Ivarado-Aguayo AA, Gallardo-Campoverde A. 2018. El Análisis comparativo sobre la incidencia de las tres principales enfermedades en el cacao CCN-51, en el cantón La Troncal, provincia del Cañar, Ecuador. Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales 12(1). <https://doi.org/10.53591/cna.v12i1.271>
- Abad ZG, Burgess TI, Redford AJ, Bienapfl JC, Srivastava S, Mathew R, Jennings K. 2023. IDphy: An International Online Resource for Molecular and Morphological Identification of Phytophthora. Plant Disease. 107(4):987–998. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-22-0448-FE>
- Aguilar-Ancota 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. <https://doi.org/10.17268/manglar.2020.028>
- Ali SS, Amoako-Attah I, Bailey RA, Strem MD, Schmidt M, Akrofi AY, Surujdeo-Maharaj S, Kolawole OO, Begoude B a. D, ten Hoopen GM, et al. 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>
- Ali SS, Shao J, Lary DJ, Strem MD, Meinhardt LW, Bailey BA. 2017. *Phytophthora megakarya* and *P. palmivora*, Causal Agents of Black Pod Rot, Induce Similar Plant Defense Responses Late during Infection of Susceptible Cacao Pods. Frontier Plants Science 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00169>
- Arellano Ibarra KV. 2023. Evaluación in vitro de la infección de *Phytophthora palmivora* en tres materiales de cacao (*Theobroma cacao* L.) del litoral ecuatoriano [Tesis de Pregrado - Ingeniería Agronómica]. Quevedo, Ecuador: Universidad Técnica Estatal de Quevedo. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/7000>
- Bailey BA, Evans HC, Phillips-Mora W, Ali SS, Meinhardt LW. 2018. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. Molecular Plant Pathology. 19(7):1580–1594. <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- Banco Central del Ecuador. 2024. Boletín de cifras, Comercio Exterior (marzo 2024). Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca. https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2024/03/VFBoletinComercioExterior_Marzo2024.pdf

- Bowman KD, Albrecht U, Graham JH, Bright DB. 2007. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora* in citrus roots using PCR-RFLP in comparison with other methods. *European Journal of Plant Pathology* 119(2):143–158. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9135-7>
- Moreira ÁVC, Meza RFR, Arcos JAA, León AFM, Pacheco FA, Martínez HFC. 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>
- Cenis JL. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. 20(9):2380. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2380>
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM. 2000. A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. 30(1):17–32. <https://doi.org/10.1006/fghi.2000.1202>
- Decloquement J, Ramos-Sobrinho R, Elias SG, Britto DS, Puig AS, Reis A, da Silva RAF, Honorato-Júnior J, Luz EDM, Pinho DB, Marelli J-P. 2021. *Phytophthora theobromicola* sp. nov.: A New Species Causing Black Pod Disease on Cacao in Brazil. *Frontiers in Microbiology* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399>
- Drenth A, Guest D. 2013. *Phytophthora*: The Plant Destroyer. *Palmas* 34:49–56. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/viewFile/10666/10651>
- Eden MA, Hill RA, Galpoththage M. 2000. An efficient baiting assay for quantification of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Plant Pathology*. 49(4):515–522. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00478.x>
- Erwin DC, Ribeiro OK. 1997. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society (APS Press).
- Ferrer-Sánchez Y, Mafaldo-Sajami AA, Plasencia-Vázquez AH, Urdánigo-Zambrano JP. 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. *Terrra Latinoamericana* 40. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1338>
- Grünwald NJ, Martin FN, Larsen MM, Sullivan CM, Press CM, Coffey MD, Hansen EM, Parke JL. 2011. *Phytophthora*-ID.org: A Sequence-Based *Phytophthora* Identification Tool. *Plant Disease*. 95(3):337–342. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-10-0609>
- Guest DI, Chau NM, Sangchote S, Vawdrey L, Diczbalis Y. 2004. Integrated Management of *Phytophthora* Diseases of Durian: Recommendations and Benefit–Cost Analysis. p. 222–227. In: Drenth A, Guest DI (eds). *Diversity and management of *Phytophthora* in Southeast Asia*, ACIAR Monograph No. 114. <https://www.aciar.gov.au/sites/default/files/legacy/node/598/mn114-part1.pdf>
- Hernández Pérez A, Ochoa Fuentes YM, Cerna Chávez E, Delgado Ortiz JC, Beltrán Beach M, Hernández Bautista O, Tapia-Vargas LM. 2019. Dinámica del crecimiento in vitro de *Phytophthora cinnamomi* en medios de cultivo alternativos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (23):331–338. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2032>
- Ivors KL (Ed.). 2015. *Laboratory Protocols for *Phytophthora* Species*. Minnesota: American Phytopathological Society.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuswinanti T, Junaid M, Baharuddin, Melina M. 2020. Virulence and genetic diversity of *Phytophthora* isolates associated with cocoa pod rot. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 486(1):012162. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/486/1/012162>
- Latifah M, Kamaruzaman S, Zainal Abidin MA, Nusaibah SA. 2018. Identification of *Phytophthora* spp. From perennial crops in Malaysia, its pathogenicity and cross-pathogenicity. *Sains Malays*. 47(5):909–921. <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2018-4705-06>
- Maizatul-Suriza M, Dickinson M, Idris AS. 2019. Molecular characterization of *Phytophthora palmivora* responsible for bud rot disease of oil palm in Colombia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35(3):44. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2618-9>
- Matos-Cueto Y, Matos-Alonso G, Hubeaux D, Decock C. 2013. Caracterización molecular de *Phytophthora*, agente causal de la pudrición parda del cacao en Cuba. *Café-Cacao*. 12:31–34.
- Mélida H, Sandoval-Sierra JV, Diéguez-Urbeondo J, Bulone V. 2013. Analyses of Extracellular Carbohydrates in Oomycetes Unveil the Existence of Three Different Cell Wall Types. *Eukaryotic Cell*. 12(2):194–203. <https://doi.org/10.1128/ec.00288-12>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(95\)00054-2](https://doi.org/10.1016/0261-2194(95)00054-2)
- Palacios-Bejarano CA, Afanador-Kafuri L, Pardo-García JM. 2021. Identificación de aislados de *Phytophthora* spp. obtenidos de cultivos de cacao en Antioquia, Colombia. *Acta Agronómica* 70(1):17–26. <https://doi.org/10.15446/acag.v70n1.70619>
- Phillips Mora W, Galindo JJ. 1989. Método de inoculación y evaluación de la resistencia a *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Turrialba* 39(4):488–496. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/10760>
- Ramirez JG. 2016. Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacaocausada por *Phytophthora* spp., y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al., en la hacienda *Theobroma*, Colombia. *Revista de Protección Vegetal* 31(1):42–49.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2020. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar/>
- RStudio Team. 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>
- 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):99–118.
- Shaner G, Finney RE. 1977. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology* 67:1051–1056. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-67-1051>

Agradecimientos / Acknowledgments:

Agradecemos al Tecnólogo Neslier España por su ayuda al momento de recolectar el material vegetal para el aislamiento de *P. palmivora* y el material utilizado en las pruebas de patogenicidad.

Conflicto de intereses / Competing interests:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Rol de los autores / Authors Roles:

DAM: investigación, metodología, curación de datos, escritura-preparación del borrador original, redacción: revisión y edición.

MVV: investigación, curación de datos, metodología, redacción: revisión y edición

DDA: investigación, curación de datos, visualización, redacción-revisión y edición

YGO: metodología, curación de datos, supervisión, redacción-revisión y edición.

FEL: conceptualización, investigación, curación de datos, metodología, supervisión, redacción-revisión y edición.

Fuentes de financiamiento / Funding:

Los autores declaran que este trabajo no recibió financiación específica.

Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:

Los autores declaran no haber violado u omitido normas éticas o legales al realizar la investigación y esta obra.