



**REPÚBLICA DEL ECUADOR**  
**UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO**

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**FACULTAD DE POSGRADOS**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

**MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:**

Identificación morfológica y molecular de especies fúngicas asociadas a enfermedades en los cultivos de cacao Nacional y CCN-51 en el subtropical húmedo ecuatoriano.

**Autor:**

Angel Virgilio Cedeño Moreira

**Tutor:**

Dr. Guevara Viejo Jorge Fabricio

*Milagro, 2026*

## Derechos de Autor

Sr. Dr.

**Fabricio Guevara Viejó**

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Angel Virgilio Cedeño Moreira**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación **Medio ambiente, gestión del riesgo climático y ciencias de la vida**, de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, **6 de noviembre del 2025**



---

**Angel Virgilio Cedeño Moreira**

**C.I.: 1206301333**

## Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **GUEVARA VIEJO JORGE FABRICIO**, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Angel Virgilio Cedeño Moreira**, cuyo tema es **Identificación morfológica y molecular de especies fúngicas asociadas a enfermedades en los cultivos de cacao Nacional y CCN-51 en el subtropical húmedo ecuatoriano**, que aporta a la Línea de Investigación **Medio ambiente, gestión del riesgo climático y ciencias de la vida**, previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

**Milagro, 05 de noviembre del 2025**



---

**Guevara Viejo Jorge Fabricio**

**C.I.: 0917882961**

# CERTIFICACIÓN DE DEFENSA



## VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO FACULTAD DE POSGRADO ACTA DE SUSTENTACIÓN MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los nueve días del mes de marzo del dos mil veintiseis, siendo las 10:00 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, ING. CEDEÑO MOREIRA ANGEL VIRGILIO, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE ESPECIES FÚNGICAS ASOCIADAS A ENFERMEDADES EN LOS CULTIVOS DE CACAO NACIONAL Y CCN-51 EN EL SUBTROPICAL HÚMEDO ECUATORIANO.**", ante el Tribunal de Calificación integrado por: Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO, Presidente(a), Mgs. BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY en calidad de Vocal; y, SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo las siguientes calificaciones:

TRABAJO DE TITULACION	60.00
DEFENSA ORAL	38.67
<b>PROMEDIO</b>	<b>98.67</b>
<b>EQUIVALENTE</b>	<b>EXCELENTE</b>

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 11:00 horas.



JUAN DIEGO  
VALENZUELA COBOS  
Presidente del Tribunal

Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO  
**PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL**



DIEGO GEOVANNY  
BARZALLO GRANIZO  
Vocal

Mgs. BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY  
**VOCAL**



JAIME DAVID SEVILLA  
CARRASCO  
Secretario del Tribunal

SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID  
**SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**



ANGEL VIRGILIO  
CEDENO MOREIRA  
Magíster

ING. CEDEÑO MOREIRA ANGEL VIRGILIO  
**MAGÍSTER**

## Dedicatoria

A mi familia, con profundo amor y gratitud, por ser la base sólida sobre la que he construido cada uno de mis sueños. Gracias por su apoyo incondicional, por creer en mí incluso cuando las circunstancias parecían adversas, y por acompañarme con palabras, gestos y silencios que siempre transmitieron fuerza y esperanza. Cada logro alcanzado es también suyo, pues sin su comprensión, paciencia y aliento, este camino no habría sido posible.

A mi esposa Ketty Vanessa Arellano Ibarra, mi compañera de vida y de sueños, gracias por ser mi apoyo constante, mi paz en los momentos de incertidumbre y mi fuerza cuando el camino se volvió difícil. Has sido un pilar fundamental en los buenos y malos momentos, recordándome con tu amor y ternura que siempre hay una luz al final del túnel. Este logro es también tuyo, porque en cada paso que he dado ha estado presente tu aliento, tu fe y tu amor incondicional.

A mi madre, cuyo amor inmenso y sacrificio silencioso han sido la raíz de todo lo que soy. Gracias por enseñarme con tu ejemplo el valor del esfuerzo, la humildad y la perseverancia. Tus palabras, tus abrazos y tu fortaleza han sido mi guía en los momentos de duda y mi refugio en las adversidades. Todo lo que he alcanzado es reflejo de tu entrega y del amor infinito que solo una madre puede dar.

## **Agradecimientos**

Hoy quiero dejar constancia de un recordatorio que va más allá de un simple agradecimiento: es una forma de reconocer todo lo que he sido capaz de lograr hasta este momento. Cada paso, cada esfuerzo y cada noche de dedicación han sido parte de una historia que he construido con determinación y coraje. Me recuerdo a mí mismo que detrás de cada logro alcanzado hay un esfuerzo silencioso que no siempre se ve, pero que ha sido el verdadero motor de mi crecimiento. Agradezco mi fortaleza, mi constancia y la capacidad de mantenerme firme ante las dificultades, incluso cuando las circunstancias parecían imposibles. Cada obstáculo se transformó en una enseñanza, cada caída en una oportunidad para levantarme más sabio, y cada reto superado reafirmó mi convicción de que la perseverancia y la fe en uno mismo son las claves para convertir los sueños en realidades.

También quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis amistades, quienes han sido una parte fundamental de este proceso de formación. Cada conversación, cada palabra de aliento y cada momento compartido me han permitido fortalecer no solo mis conocimientos, sino también mi espíritu y mi vocación. Su apoyo incondicional y su confianza en mí han sido un motor constante que me impulsó a seguir adelante, incluso en los momentos más exigentes.

## Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar morfológica y molecularmente las especies fúngicas asociadas a enfermedades en los cultivos de *Theobroma cacao* L. de las variedades Nacional y CCN-51 en el subtropical húmedo ecuatoriano. Se empleó un enfoque mixto, combinando observaciones morfológicas con análisis moleculares mediante amplificación del gen ITS-rADN por PCR y secuenciación. Las muestras se recolectaron en cinco provincias productoras (Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo, Los Ríos y Bolívar), representativas de las principales zonas de incidencia fitosanitaria del país. Los resultados evidenciaron diferencias significativas en los porcentajes de incidencia y severidad de las enfermedades fúngicas entre regiones, con valores más elevados en Cotopaxi y Los Ríos. Se aislaron y describieron morfológicamente los principales géneros patógenos asociados al cacao, incluyendo *Phytophthora*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* y *Moniliophthora*. La caracterización macroscópica y microscópica permitió establecer patrones coloniales y estructurales distintivos, confirmando la presencia de cepas con variabilidad morfológica intraespecífica. El análisis molecular mediante BLASTn confirmó la identidad de los aislamientos con similitudes superiores al 98 % respecto a secuencias depositadas en GenBank. Entre las especies identificadas, *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri*, *M. perniciosa* y *Lasiodiplodia theobromae* fueron las de mayor frecuencia e impacto. Asimismo, se evidenció variación genética entre aislamientos de diferentes provincias, lo que sugiere procesos adaptativos asociados a las condiciones ambientales locales. En conjunto, la integración de métodos morfológicos y moleculares permitió una identificación precisa y confiable de los patógenos fúngicos del cacao en el subtropical ecuatoriano. Estos hallazgos constituyen una base científica fundamental para el desarrollo de estrategias de manejo fitosanitario sostenible y programas de mejoramiento genético orientados a la resistencia de cultivares frente a enfermedades de alta incidencia.

**Palabras clave:** Subtropical, fitosanitaria, patógenos, secuencias, estrategias, manejo fitosanitario.

## Abstract

The present study aimed to identify and characterize morphologically and molecularly the fungal species associated with diseases in *Theobroma cacao* L. crops of the Nacional and CCN-51 varieties in the Ecuadorian humid subtropics. A mixed approach was employed, combining morphological observations with molecular analyses through amplification of the ITS-rDNA region by PCR and sequencing. Samples were collected from five producing provinces (Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo, Los Ríos, and Bolívar), which represent the main phytosanitary incidence zones of the country.

The results revealed significant differences in the incidence and severity percentages of fungal diseases among regions, with higher values observed in Cotopaxi and Los Ríos. The main pathogenic genera associated with cacao, including *Phytophthora*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, and *Moniliophthora*, were isolated and morphologically described. Macroscopic and microscopic characterization allowed the establishment of distinctive colonial and structural patterns, confirming the presence of strains with intraspecific morphological variability. Molecular analysis using BLASTn confirmed the identity of the isolates, showing similarities above 98% with sequences deposited in GenBank. Among the identified species, *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri*, *M. perniciosa*, and *Lasiodiplodia theobromae* were the most frequent and impactful. In addition, genetic variation among isolates from different provinces suggested adaptive processes related to local environmental conditions.

Overall, the integration of morphological and molecular methods enabled accurate and reliable identification of cacao fungal pathogens in the Ecuadorian humid subtropics. These findings provide a fundamental scientific basis for developing sustainable phytosanitary management strategies and breeding programs aimed at enhancing cultivar resistance to high-incidence diseases.

**Keywords:** subtropical; phytosanitary; pathogens; sequences; strategies; management.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Porcentaje de incidencia y severidad de enfermedades fúngicas asociadas al cultivo de *Theobroma cacao* L. en cinco provincias subtropicales del Ecuador.....31
- Figura 2.** Porcentaje de mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.) enfermas por *Phytophthora* sp. en cinco provincias subtropicales del Ecuador. ....31
- Figura 3.** Porcentaje de mazorcas de *Theobroma cacao* L. afectadas por *Fusarium* sp. en cinco provincias subtropicales del Ecuador.....32
- Figura 4.** Porcentaje de mazorcas de *Theobroma cacao* L. afectadas por *Moniliophthora perniciosa* en cinco provincias subtropicales del Ecuador.:33
- Figura 5.** Porcentaje de mazorcas de *Theobroma cacao* L. afectadas por *Lasiodiplodia theobromae* en cinco provincias subtropicales del Ecuador. ....35
- Figura 6.** Porcentaje de mazorcas de *Theobroma cacao* L. afectadas por *Moniliophthora roreri* en cinco provincias subtropicales del Ecuador.....36
- Figura 7.** Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos asociados al cultivo de *Theobroma cacao* L.....39
- Figura 8.** Amplificación por PCR (~1.0 kb) en aislamientos de *Moniliophthora roreri* (MR), *Moniliophthora perniciosa* (MP), *Phytophthora* sp. (PH), *Lasiodiplodia* sp. (LT) y *Fusarium* sp. (FS).. ....39
- Figura 9.** Crecimiento radial (diámetro de colonia, cm) de *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo PDA durante 120 horas de incubación.. ....41
- Figura 10.** Porcentaje de colonización de la placa por *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* a las 120 h de incubación en PDA.....42
- Figura 11.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora* sp. en PDA en respuesta a la aplicación de mefenoxam, azoxistrobin, difenoconazol, tiabendazol y sulfato de cobre. ....43
- Figura 12.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* en PDA bajo la acción de cinco fungicidas: mefenoxam, azoxistrobin, difenoconazol, tiabendazol y sulfato de cobre. ....44
- Figura 13.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp. en PDA bajo la aplicación de diferentes fungicidas.....45

<b>Figura 14.</b> Inhibición del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora perniciosa</i> en PDA bajo la aplicación de distintos fungicidas. ....	46
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> en PDA bajo la aplicación de diferentes fungicidas. ....	47

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Identificación molecular de los aislamientos mediante análisis BLAST de la región ITS-rADN.....	40
---	----

## Índice / Sumario

Portada.....	1
Derechos de Autor.....	I
Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación.....	II
CERTIFICACIÓN DE DEFENSA.....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimientos.....	V
Resumen.....	VI
Abstract.....	VII
Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Tablas.....	X
Índice / Sumario.....	XI
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación.....	4
1.1.    Planteamiento del problema.....	4
1.2.    Delimitación del problema.....	4
1.3.    Formulación del problema.....	4
1.4.    Preguntas de investigación.....	5
1.5.    Objetivos.....	5
1.5.1.  Objetivo general.....	5
1.5.2.  Objetivos específicos.....	5
1.6.    Hipótesis.....	5
1.7.    Justificación.....	6
1.8.    Declaración de las variables (Operacionalización).....	6
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial.....	8
2.1.    Antecedentes Referenciales.....	8
2.1.1.  Panorama global de las principales enfermedades fúngicas del cacao.....	8
2.1.2.  Evidencia nacional: estudios desarrollados en Ecuador.....	9
2.1.3.  Evidencia internacional: avances en epidemiología, genética y manejo...10	
2.1.4.  Relevancia de los estudios para el contexto ecuatoriano.....	11
2.2.    Marco Conceptual.....	11
2.2.1.  El cultivo de cacao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ).....	11

2.2.2.	Enfermedades fúngicas del cacao.....	12
2.2.3.	Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos .....	12
2.2.4.	Diagnóstico fitopatológico.....	13
2.2.5.	Condiciones agroecológicas y susceptibilidad del cultivo .....	14
2.2.6.	Importancia de la caracterización fitopatológica .....	14
2.2.7.	Enfermedades fúngicas del cacao en ambientes subtropicales .....	15
2.3.	Marco Teórico .....	16
2.3.1.	El cultivo de cacao en Ecuador .....	16
2.3.2.	Fundamentos de la fitopatología del cacao .....	16
2.3.3.	Principales enfermedades fúngicas del cacao.....	17
2.3.4.	Evolución de las enfermedades fúngicas .....	17
2.3.5.	Modelos conceptuales de incidencia y severidad.....	18
2.3.6.	Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos .....	18
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico.....		20
3.1.	Tipo y diseño de investigación .....	20
3.2.	La población y la muestra .....	20
3.3.	Los métodos y las técnicas.....	21
3.3.1.	Área de muestreo y recolección de material vegetal .....	21
3.3.2.	Evaluación de incidencia de enfermedades fúngicas.....	22
3.3.3.	Evaluación de severidad de enfermedades fúngicas .....	22
3.3.4.	Evaluación del porcentaje de mazorcas enfermas .....	23
3.3.5.	Aislamiento y purificación de los patógenos.....	23
3.3.6.	Caracterización morfológica macroscópica .....	23
3.3.7.	Caracterización microscópica .....	24
3.3.8.	Identificación taxonómica .....	24
3.3.9.	Registro fotográfico y documentación de resultados.....	24
3.3.10.	Identificación molecular.....	24
3.3.10.1.	Recolección y preservación del material biológico .....	24
3.3.10.2.	Aislamiento y obtención de micelio puro .....	25
3.3.10.3.	Extracción del ADN genómico .....	25
3.3.10.4.	Amplificación por PCR del ADN fúngico .....	25
3.3.10.5.	Purificación y secuenciación de los amplicones.....	26
3.3.10.6.	Análisis bioinformático de secuencias .....	26

3.3.11.	Crecimiento radial de especies fúngicas aisladas .....	26
3.3.11.1.	Preparación de las placas para el ensayo de crecimiento .....	26
3.3.11.2.	Condiciones de incubación y monitoreo del crecimiento .....	26
3.3.11.3.	Registro fotográfico y documentación de crecimiento.....	27
3.3.11.4.	Análisis estadístico .....	27
3.3.12.	Preparación de inóculo.....	27
3.3.13.	Fungicidas evaluados y soluciones madre .....	27
3.3.14.	Ensayo de crecimiento micelial en medio envenenado .....	28
3.4.	Procesamiento estadístico de la información.....	28
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados .....		30
4.1.	Incidencia y severidad .....	30
4.2.	Incidencia de mazorcas de cacao afectadas por <i>Phytophthora</i> sp.....	31
4.3.	Incidencia de mazorcas de cacao afectadas por <i>Fusarium</i> sp. ....	32
4.4.	Incidencia <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	33
4.5.	Incidencia <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . ....	34
4.6.	Incidencia de mazorcas de cacao afectadas por <i>Moniliophthora roreri</i> . .	35
4.7.	Caracterización morfológica de patógenos.....	36
4.8.	Amplificación del fragmento ITS .....	39
4.9.	Identificación molecular mediante análisis BLAST .....	40
4.10.	Crecimiento radial.....	40
4.11.	Porcentaje de colonización de la placa .....	41
4.12.	Actividad antifúngica sobre <i>Phytophthora</i> .....	42
4.13.	Actividad antifúngica sobre <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	43
4.14.	Actividad antifúngica sobre <i>Fusarium</i> .....	44
4.15.	Actividad antifúngica sobre <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	45
4.16.	Actividad antifúngica sobre <i>Moniliophthora roreri</i> .....	46
CAPÍTULO V: Discusión, Conclusiones y Recomendaciones.....		48
5.1.	Discusión .....	48
5.2.	Conclusiones .....	52
5.3.	Recomendaciones.....	53
Referencias bibliográficas.....		54
Anexos.....		76

## Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial debido a su relevancia económica, social y cultural. En países tropicales, constituye la base de la industria chocolatera, así como una fuente esencial de ingresos para pequeños y medianos productores (Carmona et al., 2022). Ecuador, reconocido como el mayor exportador de cacao fino de aroma, se posiciona como un referente global en la producción de este grano, siendo el “Cacao Nacional” símbolo de calidad organoléptica y prestigio histórico (Villacis et al., 2022). Paralelamente, la variedad híbrida CCN-51 se ha consolidado en las últimas décadas por su alta productividad, tolerancia relativa a enfermedades y adaptación a diferentes condiciones agroecológicas (Villacis et al., 2022). No obstante, la sanidad de estos cultivos continúa siendo uno de los mayores desafíos para mantener su sostenibilidad y competitividad en los mercados internacionales (Nascimento et al., 2024).

La incidencia de enfermedades fúngicas en cacao representa un obstáculo crítico que limita los rendimientos y compromete la calidad del grano (Anega & Berihane, 2024). Patógenos como *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri* y *Lasiodiplodia theobromae*, entre otros, generan pérdidas anuales significativas que pueden oscilar entre el 20% y el 40% de la producción en regiones altamente susceptibles (Zakaria, 2022). Estas enfermedades no solo afectan la productividad, sino que también incrementan los costos de manejo fitosanitario, reducen los ingresos de los agricultores y, en casos extremos, conducen al abandono de plantaciones. La problemática se intensifica en zonas del trópico húmedo, donde las condiciones de temperatura y humedad favorecen la diseminación de esporas y el establecimiento de infecciones en tejidos vegetales (Huda-Shakirah et al., 2022).

En el contexto ecuatoriano, el cacao Nacional y CCN-51 presentan escenarios contrastantes frente a la presión de patógenos. Mientras que el primero, altamente valorado por su aroma floral y su historia genética única, es más susceptible a diversas enfermedades, el segundo ha demostrado mayor resistencia relativa y productividad constante (Jaimez et al., 2022). Sin embargo, ambos materiales son vulnerables en diferentes grados a la acción de hongos fitopatógenos, lo que plantea la necesidad urgente de estrategias integrales de identificación, monitoreo y control. Estas estrategias deben partir de un conocimiento profundo de la diversidad fúngica presente en los ecosistemas cacaoteros del país, tanto a nivel morfológico como

molecular (Oliveira Santos et al., 2025).

La identificación morfológica de hongos ha sido históricamente el pilar fundamental para la taxonomía y diagnóstico de patógenos en campo (Lin et al., 2023). El análisis de estructuras reproductivas, tipos de esporas, morfología de colonias y características de crecimiento *in vitro* han permitido clasificar especies y establecer relaciones filogenéticas preliminares (Aquino, 2024). Sin embargo, este enfoque presenta limitaciones derivadas de la plasticidad fenotípica de los hongos, que puede variar en función de factores ambientales y condiciones de cultivo (Alster et al., 2021). Asimismo, algunas especies presentan similitudes morfológicas que dificultan una diferenciación precisa, lo que puede conducir a diagnósticos erróneos y, en consecuencia, a medidas de control ineficaces (Bradbury et al., 2022).

En este marco, las herramientas moleculares han revolucionado el estudio de la diversidad fúngica al ofrecer un nivel de resolución taxonómica superior (Lofgren & Stajich, 2021). El uso de marcadores de ADN, como la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal, así como genes específicos como  $\beta$ -*tubulina* y *TEF1- $\alpha$* , ha permitido discriminar especies cercanamente relacionadas y confirmar identidades previamente establecidas por métodos morfológicos (Tripathi et al., 2021). Estas técnicas no solo posibilitan la identificación precisa de los patógenos, sino que también contribuyen a la construcción de bases de datos genéticas que fortalecen los sistemas de alerta temprana y el diseño de estrategias de manejo integrado (Zhou et al., 2024). En el subtropical húmedo ecuatoriano, región caracterizada por su elevada biodiversidad y condiciones ambientales propicias para la agricultura, la interacción entre cultivares de cacao y hongos patógenos es particularmente compleja (Delgado-Ospina et al., 2021). La alta humedad relativa, las precipitaciones abundantes y la temperatura constante crean un escenario favorable para la proliferación de enfermedades (Zhang et al., 2024). En este contexto, resulta fundamental generar información local que permita identificar las especies fúngicas prevalentes y comprender sus dinámicas poblacionales (Chethana et al., 2021). Dicho conocimiento es clave no solo para diseñar programas de control fitosanitario efectivos, sino también para orientar futuros programas de mejoramiento genético que busquen incrementar la resistencia del cacao a nivel regional (Menezes et al., 2022).

La integración de enfoques morfológicos y moleculares se plantea, por tanto, como una estrategia complementaria que maximiza la confiabilidad en la identificación de especies fúngicas (Maharachchikumbura et al., 2021). Este enfoque dual permite

superar las limitaciones inherentes a cada método de manera aislada y ofrece una visión integral de la diversidad fúngica asociada a los cultivos de cacao ((De Oliveira Santos et al., 2025). Además, fortalece la capacidad de los investigadores para diferenciar patógenos de especies saprófitas o endófitas, que pueden coexistir en los tejidos vegetales sin generar síntomas evidentes, pero cuya identificación resulta relevante en el contexto de la sanidad agrícola (Grabka et al., 2022).

A nivel global, la investigación sobre la diversidad fúngica en cacao ha evidenciado la presencia de especies emergentes con potencial fitopatógeno, cuya identificación temprana resulta crucial para evitar epidemias en nuevas áreas de cultivo (Adeniyi & Asogwa, 2022). En Ecuador, donde la economía agrícola depende en gran medida del cacao, el impacto de estas enfermedades tiene implicaciones que trascienden lo agronómico, afectando también la seguridad alimentaria, el comercio internacional y la estabilidad socioeconómica de las comunidades productoras (Castañeda-Ccori et al., 2020). En este sentido, la generación de información científica rigurosa sobre los hongos asociados al cacao en el trópico húmedo constituye un aporte fundamental para la toma de decisiones en políticas públicas, programas de extensión agrícola y proyectos de investigación aplicada (Esan et al., 2025).

Por otra parte, la caracterización molecular de hongos asociados a cacao no solo contribuye al diagnóstico y manejo de enfermedades, sino que también abre nuevas perspectivas en biotecnología agrícola (Santos et al., 2023). El conocimiento de la variabilidad genética de estos organismos permite explorar potenciales aplicaciones en áreas como la resistencia inducida en plantas, el desarrollo de biofungicidas y la identificación de genes asociados a la virulencia o a la tolerancia ambiental (Islam et al., 2024).

## **CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación**

### **1.1. Planteamiento del problema**

El cacao Nacional y CCN-51 son pilares de la economía ecuatoriana, pero enfrentan graves pérdidas por enfermedades fúngicas como moniliasis, escoba de bruja y podredumbres. La identificación basada solo en morfología resulta limitada, ya que muchas especies presentan síntomas y estructuras similares. Aunque las herramientas moleculares ofrecen mayor precisión, en el subtropical húmedo ecuatoriano existe un vacío de estudios integrales que combinen ambas aproximaciones. Esta falta de información dificulta un manejo fitosanitario eficaz y sostenible, lo que hace imprescindible caracterizar de manera morfológica y molecular los hongos asociados a los cultivos de cacao de la región.

### **1.2. Delimitación del problema**

El presente estudio se circunscribe a la identificación morfológica y molecular de especies fúngicas asociadas a enfermedades en los cultivos de cacao Nacional y CCN-51, cultivados en el subtropical húmedo ecuatoriano, particularmente en zonas productoras con alta incidencia fitosanitaria. La investigación se enfoca únicamente en aislamientos fúngicos obtenidos a partir de tejidos vegetales con síntomas visibles de enfermedad (frutos, hojas y tallos), descartando otros posibles agentes bióticos como bacterias o virus. Asimismo, el análisis se limita a la caracterización taxonómica y filogenética de los hongos presentes, sin incluir en esta fase estudios experimentales de control biológico, evaluación agronómica de pérdidas ni validación de estrategias de manejo en campo.

### **1.3. Formulación del problema**

A pesar de la relevancia económica y cultural del cacao en Ecuador, los cultivos de Nacional y CCN-51 en la región subtropical húmeda continúan siendo afectados por un conjunto diverso de enfermedades fúngicas que reducen la productividad y calidad del grano. Sin embargo, la identificación precisa de los agentes causales se ve limitada por la similitud morfológica entre especies y la falta de estudios moleculares complementarios en la zona.

## **1.4. Preguntas de investigación**

¿Qué especies fúngicas asociadas a enfermedades pueden ser identificadas morfológicamente en los cultivos de cacao Nacional y CCN-51 bajo condiciones subtropicales húmedas del Ecuador?

¿En qué medida la identificación molecular mediante PCR y secuenciación genética confirma la identidad taxonómica y la diversidad genética de las especies fúngicas detectadas en estos cultivos de cacao?

¿Cómo influyen las condiciones ambientales del subtropical húmedo en el crecimiento, la patogenicidad y la resistencia de las especies fúngicas en su interacción con las variedades de cacao Nacional y CCN-51?

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

Identificar y caracterizar morfológica y molecularmente las especies fúngicas asociadas a enfermedades en los cultivos de cacao Nacional y CCN-51 en el en el subtrópico húmedo ecuatoriano.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Identificar y caracterizar morfológicamente las especies fúngicas asociadas a enfermedades en los cultivos de cacao Nacional y CCN-51.
- Realizar la identificación molecular de las especies fúngicas presentes en los cultivos de cacao, utilizando técnicas de PCR y secuenciación genética para confirmar su identidad y diversidad genética.
- Evaluar las variaciones en el crecimiento, patogenicidad y resistencia de las especies fúngicas en función de las condiciones ambientales del subtropical húmedo y su interacción con las variedades de cacao Nacional y CCN-51.

## **1.6. Hipótesis**

Las especies fúngicas asociadas a enfermedades en los cultivos de cacao Nacional y CCN-51 en el subtropical húmedo ecuatoriano presentan una diversidad mayor a la reconocida actualmente, y que la combinación de herramientas morfológicas y moleculares permitirá no solo confirmar su identidad taxonómica, sino también revelar

variaciones genéticas vinculadas con su capacidad de crecimiento.

### **1.7. Justificación**

La producción de cacao, particularmente de las variedades Nacional y CCN-51, constituye un pilar económico y social en el Ecuador; sin embargo, su sostenibilidad se ve amenazada por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora* spp., entre otros. La identificación basada únicamente en caracteres morfológicos resulta limitada debido a la plasticidad fenotípica y a la similitud de estructuras entre especies, lo que puede conducir a diagnósticos imprecisos. En este contexto, la integración de herramientas moleculares, como PCR y secuenciación genética, ofrece una resolución más precisa para confirmar identidades taxonómicas, explorar diversidad genética y comprender la variabilidad adaptativa de estos patógenos bajo condiciones subtropicales húmedas. Por ello, este estudio se justifica en la necesidad de generar un conocimiento integral morfológico y molecular de las especies fúngicas asociadas al cacao en Ecuador, con el fin de aportar bases científicas para estrategias de manejo fitosanitario más sostenibles y adaptadas a la realidad local.

### **1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)**

La variable independiente corresponde a la identificación de las especies fúngicas asociadas a enfermedades en los cultivos de cacao Nacional y CCN-51. Esta variable se manifiesta a través de dos dimensiones: la caracterización morfológica, que incluye la observación de estructuras reproductivas, pigmentación y forma de colonias en medios de cultivo; y la caracterización molecular, mediante el uso de técnicas de PCR y secuenciación de regiones génicas específicas como ITS. Sus indicadores permiten establecer la clasificación taxonómica y la diversidad genética de los aislamientos obtenidos, con una escala de medición cualitativa y nominal para la identificación de especies, y cuantitativa discreta para el número de especies registradas.

La variable dependiente se relaciona con el comportamiento biológico y fitopatológico de las especies fúngicas identificadas. Incluye dimensiones como el crecimiento micelial, la capacidad de patogenicidad y la resistencia frente a factores ambientales. Los indicadores de esta variable se expresan en el diámetro de crecimiento en medios de cultivo, la severidad de los síntomas inducidos en los tejidos de cacao y la tolerancia

a condiciones de estrés como variaciones de pH y temperatura. Esta variable se mide principalmente en escalas cuantitativas continuas, como milímetros de crecimiento o grados de severidad, y en escalas ordinales, como niveles de resistencia.

Finalmente, la variable interviniente está representada por las condiciones ambientales del subtropical húmedo ecuatoriano, las cuales influyen en la expresión de la interacción entre los hongos y las variedades de cacao. Sus dimensiones abarcan la temperatura, la humedad relativa, el pH del suelo y las características propias de cada variedad (Nacional y CCN-51). Los indicadores incluyen los registros climáticos locales, análisis de suelo y parámetros ambientales del área de estudio. Esta variable se mide en una escala cuantitativa continua, expresada en °C, porcentaje de humedad relativa y valores de pH.

## CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

### 2.1. Antecedentes Referenciales

#### 2.1.1. Panorama global de las principales enfermedades fúngicas del cacao

A nivel mundial, las enfermedades fúngicas representan uno de los principales factores limitantes en la producción de cacao (Kongor et al., 2024). Entre ellas destacan la escoba de bruja, la moniliasis o “frosty pod rot” y la mazorca negra causada por especies de *Phytophthora* (Garcés-Fiallos et al., 2024). Estas patologías se encuentran ampliamente distribuidas en regiones tropicales de América y África, y han provocado pérdidas considerables en la producción y calidad del grano (Benjamin et al., 2024). La escoba de bruja, ocasionada por *Moniliophthora perniciosa*, ha sido históricamente responsable de la caída de la industria cacaotera en Brasil y continúa afectando de manera significativa a los países productores del continente (Sousa Filho et al., 2021). La moniliasis, causada por *Moniliophthora roreri*, es considerada una de las enfermedades más destructivas de América Latina, debido a su alta capacidad de diseminación y a su impacto directo sobre los frutos en desarrollo (Da Silva et al., 2023).

Por su parte, las especies de *Phytophthora* son responsables de la pudrición de mazorca y del cancro del tallo en numerosos países productores (Chaithra et al., 2025). Estos hongos presentan una amplia variabilidad genética y una gran capacidad de adaptación a distintas condiciones ambientales, lo que dificulta su control (Cilas y Bastide, 2020). A estas especies se suma la creciente importancia de patógenos como *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal de podredumbres y marchitamientos, y *Fusarium spp.*, que puede comportarse tanto como patógeno oportunista como endófito en diversos tejidos del cacao (Salvatore et al., 2020). Estas especies emergentes amplían el espectro de hongos que deben considerarse en estudios epidemiológicos y de manejo integrado, ya que contribuyen de manera importante a las pérdidas productivas, especialmente en zonas de alta humedad y estrés ambiental (Imran et al., 2025).

La literatura científica actual resalta que las variaciones ambientales, la susceptibilidad genética de las variedades de cacao y las prácticas de manejo agrícola influyen de manera determinante en la incidencia y severidad de las enfermedades fúngicas (Khan et al., 2020). En este contexto, la investigación sobre la epidemiología, diversidad y

comportamiento de los patógenos resulta esencial para el desarrollo de estrategias sostenibles de control y prevención.

### **2.1.2. Evidencia nacional: estudios desarrollados en Ecuador**

En Ecuador, país reconocido por su alta diversidad genética de cacao, se han realizado múltiples estudios enfocados en la identificación, distribución y manejo de las enfermedades fúngicas (Alvarez-Romero et al., 2025). Las investigaciones nacionales han evidenciado que *Moniliophthora roreri* presenta una elevada variabilidad genética en las regiones productoras, lo que sugiere que el territorio ecuatoriano constituye uno de los centros de origen y diversificación del patógeno (Espinoza-Lozano et al., 2022). Esta variabilidad podría explicar las diferencias observadas en la incidencia y severidad de la enfermedad entre provincias y zonas de cultivo.

Asimismo, se ha demostrado que *Phytophthora spp.* continúa siendo una de las amenazas más significativas en plantaciones de cacao tipo CCN-51, debido a su capacidad de causar pudrición de mazorcas y lesiones en tallos (Cedeño Moreira et al., 2020). Los estudios técnicos realizados en el país indican que factores como el drenaje deficiente, el exceso de sombra y la densidad de siembra influyen directamente en la aparición y severidad de los síntomas (López-García, 2024).

Otras investigaciones recientes han documentado la presencia de *Lasiodiplodia spp.* en plantaciones de cacao ecuatorianas, identificándose incluso nuevas especies asociadas a la pudrición y al “dieback” de ramas (Huaman-Pilco et al., 2024). Estos reportes confirman que la diversidad de patógenos asociados al cultivo es mayor de lo que tradicionalmente se reconocía. En paralelo, se han desarrollado trabajos sobre hongos endófitos asociados a frutos de cacao, los cuales revelan la existencia de comunidades microbianas con potencial para ejercer control biológico sobre patógenos fitosanitarios (Wemheuer et al., 2020). Este tipo de estudios contribuye a entender la dinámica ecológica del cultivo y abre oportunidades para el uso de microorganismos benéficos en programas de manejo integrado.

En síntesis, las investigaciones realizadas en Ecuador coinciden en que las enfermedades fúngicas presentan una distribución heterogénea entre provincias y que los factores ambientales, edáficos y de manejo inciden directamente en los niveles de infección. Esta evidencia respalda la necesidad de estudios comparativos que

determinen la incidencia y severidad en diferentes regiones, así como la caracterización de los principales agentes causales mediante observaciones morfológicas y moleculares.

### **2.1.3. Evidencia internacional: avances en epidemiología, genética y manejo**

A nivel internacional, las investigaciones sobre *Moniliophthora perniciosa* han profundizado en el conocimiento de su biología y en los mecanismos de infección (De Novais et al., 2023). Los estudios genómicos han demostrado que este hongo presenta una estrategia de infección compleja, con una fase biotrófica inicial y una fase necrotrófica posterior, lo que explica su alta persistencia en campo y la dificultad para erradicarlo (Alcântara et al., 2025). En Brasil, los programas de manejo integrado combinan la utilización de materiales tolerantes, la poda sanitaria, la regulación de sombra y la eliminación de residuos infectados como principales medidas para reducir el inóculo (Furtado et al., 2020).

De manera similar, los estudios sobre *Moniliophthora roreri* han permitido comprender su origen, diversidad genética y mecanismos de disseminación (Díaz-Valderrama et al., 2022). La investigación reciente destaca la importancia del microclima y la estructura del dosel en la incidencia de la moniliasis, ya que los ambientes húmedos y poco ventilados favorecen la germinación de las esporas (Jaimes-Suárez et al., 2022). Además, se ha comprobado que la enfermedad afecta principalmente a los frutos jóvenes, lo que enfatiza la necesidad de establecer estrategias de monitoreo durante las fases tempranas del desarrollo del fruto (Casals et al., 2022).

En el caso de *Phytophthora spp.*, la investigación internacional se ha enfocado en la identificación de genes de resistencia y en el mapeo de regiones genómicas asociadas a la tolerancia (Fister et al., 2020). Estos avances genómicos han permitido la selección de clones y variedades con resistencia parcial, aunque la expresión de dicha resistencia depende de las condiciones ambientales y del genotipo del patógeno (Kumar et al., 2024). Por ello, el manejo integrado que combina prácticas culturales, biocontroladores y mejoramiento genético continúa siendo la estrategia más efectiva.

Respecto a *Lasiodiplodia theobromae*, los estudios recientes la describen como un patógeno latente capaz de colonizar los tejidos de la planta sin manifestar síntomas hasta que ocurren condiciones de estrés (Jiang et al., 2025). Se ha comprobado que

este hongo puede afectar distintos órganos del cacao, causando marchitez, necrosis y pudrición de mazorcas, lo cual refuerza la necesidad de diagnósticos precisos que incluyan observaciones morfológicas y análisis moleculares multilocus (Ferreira et al., 2025).

En conjunto, la evidencia internacional coincide en que las enfermedades del cacao son el resultado de interacciones complejas entre el patógeno, el hospedero y el ambiente, y que la adopción de enfoques multidisciplinarios es esencial para reducir su impacto.

#### **2.1.4. Relevancia de los estudios para el contexto ecuatoriano**

La revisión de las investigaciones nacionales e internacionales permite concluir que Ecuador constituye una zona clave para el estudio de las enfermedades fúngicas del cacao debido a su diversidad genética y a su relevancia productiva a nivel mundial (Nieves-Orduña et al., 2023). La combinación de factores climáticos, la coexistencia de variedades tradicionales y comerciales, y la variabilidad de las prácticas agrícolas hacen del país un escenario ideal para la investigación epidemiológica (Suh & Molua, 2022).

El conocimiento generado por estas investigaciones respalda la necesidad de realizar diagnósticos precisos y comparativos entre regiones, considerando tanto la incidencia como la severidad de las enfermedades (Ameyaw et al., 2023). Asimismo, evidencia la importancia de complementar los estudios de campo con análisis morfológicos y moleculares en laboratorio, lo cual permite establecer bases científicas sólidas para el manejo integral del cultivo (Nair, 2021).

## **2.2. Marco Conceptual**

### **2.2.1. El cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*)**

El cacao es un cultivo de gran importancia económica, social y cultural en las regiones tropicales del mundo (Hernández-Núñez et al., 2022). *Theobroma cacao L.* pertenece a la familia Malvaceae y es originario de las cuencas amazónicas de Sudamérica, donde se desarrolló una alta diversidad genética que ha permitido su domesticación y expansión global (Díaz-Valderrama et al., 2020). En Ecuador, el cacao representa un cultivo estratégico, reconocido por la calidad de sus variedades tipo Nacional y CCN-51, las cuales constituyen pilares fundamentales de la economía agrícola y de exportación del país (Saravia-Matus et al., 2020).

El desarrollo del cacao depende de condiciones ambientales específicas, caracterizadas por temperaturas entre 22 y 30 °C, alta humedad relativa y precipitaciones superiores a 1.500 mm anuales (Bomdzele y Molua, 2023). Estas condiciones, aunque favorables para la productividad, también propician el desarrollo de numerosos patógenos, principalmente hongos, que afectan el rendimiento y la calidad del grano (Schmidt et al., 2022). Por ello, el conocimiento sobre la epidemiología, distribución y comportamiento de las enfermedades fúngicas es esencial para garantizar la sostenibilidad del cultivo (Wang, 2023).

### **2.2.2. Enfermedades fúngicas del cacao**

Las enfermedades fúngicas constituyen una de las principales limitantes en la producción de cacao, al afectar hojas, tallos, flores y frutos (Sari et al., 2024). Entre los agentes más importantes se encuentran *Moniliophthora roreri* (moniliasis), *Moniliophthora perniciosa* (escoba de bruja), *Phytophthora spp.* (mazorca negra y cancro del tallo), *Lasiodiplodia theobromae* (podredumbre seca y dieback) y *Fusarium spp.* (marchitamientos y pudriciones) (Reyes et al., 2022). Estos patógenos ocasionan pérdidas que pueden superar el 70 % en condiciones favorables, afectando tanto a variedades comerciales como nativas (Jiménez et al., 2022).

Cada patógeno presenta características morfológicas y biológicas particulares. *Moniliophthora roreri* produce una capa blanca pulverulenta sobre las mazorcas y ataca principalmente los frutos jóvenes (Bonilla et al., 2021); *Moniliophthora perniciosa* induce el crecimiento anómalo de brotes y flores conocido como “escoba de bruja” (Carvajal-Rivera et al., 2022); *Phytophthora spp.* genera lesiones oscuras y húmedas en las mazorcas que progresan rápidamente hacia la pudrición (Abbas et al., 2022); *Lasiodiplodia theobromae* se asocia con necrosis de ramas y frutos secos (Çiftçi et al., 2023); mientras que *Fusarium spp.* puede actuar como un patógeno oportunista, afectando raíces y tallos bajo condiciones de estrés. El conocimiento de estos agentes y su dinámica permite establecer estrategias de monitoreo y manejo ajustadas a cada zona productiva (Rosmana et al., 2022).

### **2.2.3. Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos**

La caracterización morfológica es un procedimiento básico en la identificación de hongos fitopatógenos. Consiste en el estudio de las características visibles de las colonias desarrolladas en medios de cultivo y de las estructuras microscópicas como

hifas, conidios, esporangios y basidios (Jones et al., 2022). Estas observaciones se realizan con ayuda de microscopía óptica, permitiendo reconocer patrones específicos de crecimiento, textura, coloración y forma (Pérez et al., 2022).

A nivel macroscópico, las colonias pueden presentar características distintivas según la especie: algunas son algodonosas y de color blanco o rosado, mientras que otras son compactas, pigmentadas o de textura rugosa. A nivel microscópico, la forma, tamaño y disposición de las esporas o conidios constituyen rasgos diagnósticos de gran valor (Stratigaki et al., 2024). Por ejemplo, *Phytophthora* presenta esporangios papilados y hifas cenocíticas, *Fusarium* produce macroconidios alargados y septados, *Lasiodiplodia* forma conidios elipsoidales de pared gruesa, y *Moniliophthora* exhibe estructuras típicas de basidiomicetos (Bag et al., 2023).

La caracterización morfológica, aunque esencial, suele complementarse con análisis moleculares para confirmar la identidad del patógeno, especialmente en especies morfológicamente similares. Sin embargo, en el diagnóstico rutinario, las descripciones morfológicas continúan siendo una herramienta accesible, rápida y confiable para el reconocimiento preliminar de los agentes causales (Lendahl et al., 2022).

#### **2.2.4. Diagnóstico fitopatológico**

El diagnóstico fitopatológico es el conjunto de procedimientos destinados a identificar y confirmar la causa de una enfermedad vegetal. Este proceso implica la observación de síntomas en campo, el aislamiento del patógeno en laboratorio, la caracterización morfológica y, cuando es necesario, la confirmación mediante técnicas moleculares o bioquímicas (Kaur y Sharma, 2021).

El diagnóstico correcto permite establecer la relación entre el agente causal y los daños observados, cumpliendo con los postulados de Koch. En estudios de campo, la evaluación visual de síntomas y la cuantificación de incidencia y severidad constituyen la base del diagnóstico preliminar (Buja et al., 2021). Posteriormente, los aislamientos en medios de cultivo como PDA (Papa Dextrosa Agar) y las observaciones microscópicas permiten describir las estructuras fúngicas características de cada especie (Cedeño et al., 2025).

Un diagnóstico preciso no solo contribuye al manejo eficiente de las enfermedades, sino que también proporciona información fundamental para la elaboración de programas de prevención y control biológico (George et al., 2025).

### **2.2.5. Condiciones agroecológicas y susceptibilidad del cultivo**

El desarrollo de las enfermedades fúngicas del cacao está estrechamente relacionado con las condiciones agroecológicas (Arévalo-Gardini et al., 2020). Factores como la temperatura, la humedad relativa, la precipitación y la ventilación inciden directamente en la germinación de esporas y en la diseminación de los patógenos. Los sistemas de cultivo con exceso de sombra y alta densidad de siembra generan microclimas favorables para el desarrollo de infecciones, mientras que la presencia de material vegetal susceptible o mal manejo de residuos aumenta la carga de inóculo en el campo (Akoutou Mvondo et al., 2024).

El nivel de susceptibilidad del cultivo también depende del material genético. Las variedades locales o tradicionales suelen presentar tolerancia parcial frente a ciertas enfermedades, mientras que los híbridos comerciales, aunque más productivos, pueden ser más vulnerables en determinadas condiciones ambientales (Ofori et al., 2023). Comprender estas interacciones entre genotipo y ambiente es fundamental para interpretar los patrones de incidencia y severidad observados en campo (Sankar et al., 2021).

### **2.2.6. Importancia de la caracterización fitopatológica en la gestión del cultivo**

La evaluación de la incidencia y severidad de enfermedades, junto con la caracterización de los agentes causales, constituye una herramienta indispensable para el manejo sanitario del cacao (Ofori et al., 2022). Estos estudios permiten identificar las zonas de mayor riesgo, diseñar estrategias de control específicas y orientar programas de mejoramiento genético hacia la obtención de materiales más resistentes (Sadenova et al., 2023).

Asimismo, los resultados derivados de la caracterización morfológica y epidemiológica aportan información relevante para la planificación de acciones de monitoreo, la capacitación de productores y la implementación de prácticas sostenibles que reduzcan el impacto ambiental del uso de agroquímicos (Mahlein et al., 2024).

En conjunto, el marco conceptual que sustenta esta investigación integra los aspectos biológicos, ecológicos y metodológicos necesarios para comprender la dinámica de las enfermedades fúngicas en el cultivo de cacao. Su aplicación permite establecer una base científica sólida para la formulación de estrategias de manejo integral que

garanticen la productividad, calidad y sostenibilidad del sistema cacaotero ecuatoriano (Nikitin et al., 2023).

### **2.2.7. Evolución de las enfermedades fúngicas del cacao en ambientes subtropicales**

Las enfermedades fúngicas del cacao han experimentado una evolución significativa en los ambientes subtropicales, influenciada por factores climáticos, ecológicos y de manejo agrícola (Nelson et al., 2021). Estos ecosistemas, caracterizados por temperaturas cálidas moderadas, alta humedad relativa y estaciones lluviosas bien definidas, constituyen escenarios ideales para el desarrollo, disseminación y diversificación de patógenos. A diferencia de los ambientes tropicales húmedos, los subtropicales presentan mayor variabilidad térmica y períodos de sequía que ejercen presión selectiva sobre los hongos, favoreciendo la aparición de cepas más adaptadas y resistentes a condiciones adversas (Bryceson et al., 2023).

Durante las últimas décadas, el cambio climático ha contribuido a alterar los patrones de precipitación y temperatura, lo que ha modificado la dinámica epidemiológica de los patógenos. En consecuencia, se han registrado cambios en la distribución geográfica y en la frecuencia de brotes de enfermedades como la moniliasis y la mazorca negra (Vera et al., 2024). Estos procesos de adaptación han permitido que especies tradicionalmente confinadas a zonas tropicales húmedas se establezcan y prosperen en regiones subtropicales con climas más variables (Vale et al., 2024).

La evolución de estos hongos en ambientes subtropicales también está asociada a la intensificación de los sistemas productivos (Lim et al., 2023). El aumento de la densidad de siembra, la reducción de la diversidad genética y la introducción de variedades comerciales altamente productivas, pero menos resistentes, han generado condiciones favorables para la selección de variantes patogénicas con mayor virulencia (Asman et al., 2025). Este fenómeno ha sido particularmente evidente en *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora spp.*, cuyos aislamientos muestran variaciones morfológicas y fisiológicas entre regiones, lo que sugiere procesos evolutivos activos impulsados por la interacción planta-patógeno-ambiente (Rehman et al., 2025).

## **2.3. Marco Teórico**

### **2.3.1. El cultivo de cacao en Ecuador**

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es uno de los cultivos más importantes del Ecuador, tanto por su relevancia económica como por su valor cultural (Talero, 2024). El país se destaca por ser uno de los mayores exportadores de cacao fino de aroma a nivel mundial. Las condiciones edafoclimáticas de las zonas tropicales y subtropicales ecuatorianas, con temperaturas medias entre 24 y 28 °C, alta humedad relativa y precipitaciones constantes, favorecen un crecimiento vigoroso del cultivo (Salazar et al., 2023).

Ecuador posee dos principales tipos de cacao: el Nacional fino de aroma, caracterizado por su calidad organoléptica, y el CCN-51, híbrido de alta productividad y resistencia moderada a enfermedades (Delgadillo et al., 2024). Sin embargo, los sistemas de producción enfrentan graves problemas fitosanitarios que reducen el rendimiento y la rentabilidad. Entre estos, las enfermedades fúngicas son las más frecuentes y de mayor impacto en las zonas subtropicales del país, donde las condiciones de humedad y temperatura son óptimas para el desarrollo de los hongos fitopatógenos (Alvarez et al., 2025).

La expansión de la frontera agrícola, la limitada renovación genética de los cultivares y el uso de prácticas agrícolas inadecuadas han incrementado la vulnerabilidad del sistema cacaotero nacional frente a la incidencia de patógenos (Vera, 2024). Por ello, resulta indispensable fortalecer la investigación en sanidad vegetal y epidemiología fúngica aplicada al cacao (Santos et al., 2023).

### **2.3.2. Fundamentos de la fitopatología del cacao**

La fitopatología es la ciencia que estudia las enfermedades de las plantas, sus causas, mecanismos de desarrollo y formas de control. En el caso del cacao, los hongos son los principales agentes etiológicos que comprometen la productividad (Collinge et al., 2022). La teoría fitopatológica moderna explica que toda enfermedad vegetal resulta de la interacción entre tres factores: el hospedero susceptible, el patógeno virulento y el ambiente favorable, conocido como el triángulo de la enfermedad.

Cuando las condiciones climáticas (humedad, temperatura, radiación y ventilación) favorecen al patógeno y coinciden con la presencia de tejidos vulnerables en el hospedero, se desencadena el proceso infeccioso (El-Saadony et al., 2022). En los sistemas cacaoteros, la abundancia de restos vegetales, el exceso de sombra y la

limitada aireación aumentan la humedad relativa, creando microclimas propicios para la germinación de esporas y la diseminación de las enfermedades fúngicas (Bacelar et al., 2024).

El estudio teórico de la fitopatología del cacao se enfoca en comprender los ciclos de infección, la morfología de los hongos, los factores ambientales asociados y los mecanismos de defensa de la planta, permitiendo diseñar estrategias preventivas y de manejo sostenible (Santos et al., 2023).

### **2.3.3. Principales enfermedades fúngicas del cacao**

Las enfermedades de origen fúngico que afectan al cultivo de *Theobroma cacao* L. son numerosas y constituyen una de las principales limitantes de la producción en las regiones tropicales y subtropicales (Adeniyi et al., 2023). Entre las más importantes se encuentran la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri*, que provoca pudrición seca de los frutos y pérdidas que pueden superar el 70 %; la escoba de bruja producida por *Moniliophthora perniciosa*, que altera el crecimiento de los brotes y flores, generando deformaciones características y disminuyendo drásticamente la floración y fructificación (Chóez et al., 2023); la mazorca negra ocasionada por *Phytophthora* spp., reconocible por las lesiones oscuras y húmedas que se extienden rápidamente hasta cubrir la totalidad del fruto (Adeoyo et al., 2024); la podredumbre seca o dieback causada por *Lasiodiplodia theobromae*, que afecta ramas, frutos y troncos con necrosis y marchitez progresiva; y la marchitez vascular atribuida a especies del género *Fusarium*, las cuales comprometen las raíces y tallos, interrumpiendo la conducción de agua y nutrientes (Alvarado et al., 2025). Estas enfermedades presentan una distribución geográfica amplia en Ecuador, con especial incidencia en las zonas subtropicales donde las condiciones de temperatura y humedad favorecen la germinación de esporas, la infección de tejidos y la diseminación de los patógenos, generando una presión constante sobre el sistema productivo cacaotero (Alvarez et al., 2024).

### **2.3.4. Evolución de las enfermedades fúngicas del cacao en ambientes subtropicales**

En los ambientes subtropicales del Ecuador, las enfermedades fúngicas han evolucionado como resultado de la interacción entre los factores climáticos y el manejo agrícola (Tapia et al., 2025). Las fluctuaciones térmicas, las lluvias prolongadas y los

períodos de alta humedad generan un entorno favorable para la germinación de esporas y la colonización de tejidos vegetales (Brück, 2023).

Los hongos han desarrollado adaptaciones que les permiten sobrevivir en condiciones adversas, persistiendo en restos vegetales o en el suelo como estructuras resistentes (esporas, clamidosporas o micelios latentes). Esta capacidad asegura su continuidad entre ciclos de cultivo y su rápida reactivación cuando las condiciones ambientales mejoran (Coleine et al., 2022).

En la actualidad, se observa un incremento en la diversidad de cepas y variantes patogénicas, lo que sugiere procesos evolutivos acelerados impulsados por la presión de selección derivada del uso de fungicidas, la uniformidad genética de los cultivares y los cambios en las condiciones climáticas (Bazzicalupo, 2022). En consecuencia, los sistemas subtropicales del país enfrentan una dinámica fitopatológica compleja que requiere monitoreo constante y estrategias de manejo adaptativo (Jones et al., 2022).

### **2.3.5. Modelos conceptuales de incidencia y severidad**

La incidencia y la severidad son los principales indicadores epidemiológicos utilizados en la evaluación de enfermedades fúngicas. La incidencia expresa el porcentaje de unidades afectadas en una población (por ejemplo, mazorcas enfermas sobre el total evaluado), mientras que la severidad mide el grado de daño o porcentaje de tejido afectado por la enfermedad (Borjian et al., 2021).

El análisis de estas variables permite determinar el nivel de afectación y su distribución espacial y temporal. En ambientes subtropicales, los valores de incidencia y severidad presentan una alta variabilidad, determinada por las condiciones microclimáticas, el manejo agronómico y la presencia de inóculo en el campo (Olivares et al., 2022).

El estudio teórico de estas variables se sustenta en modelos epidemiológicos que relacionan la velocidad de propagación del patógeno con los factores ambientales y la susceptibilidad del hospedero. Su aplicación permite predecir brotes y diseñar programas de prevención más eficientes (Li et al., 2021).

### **2.3.6. Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos**

La caracterización morfológica es una técnica esencial en el diagnóstico fitopatológico, ya que permite identificar los patógenos a partir de sus características físicas y estructurales. El análisis incluye la observación de colonias cultivadas en medios como PDA, evaluando su color, textura, margen, tasa de crecimiento y producción de estructuras reproductivas (Bhunjun et al., 2021).

A nivel microscópico, se examinan las hifas, conidios, esporangios y basidios para determinar las diferencias morfológicas entre especies. Esta caracterización es la base para clasificar los patógenos y establecer comparaciones entre cepas provenientes de distintas regiones (Harish et al., 2023).

Aunque los métodos moleculares han cobrado relevancia en los últimos años, la morfología sigue siendo un componente fundamental de la investigación aplicada, especialmente en estudios de campo y en laboratorios donde se busca evaluar la variabilidad de los agentes fúngico (Furtado et al., 2020).

## CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

### 3.1. Tipo y diseño de investigación

La presente investigación se enmarca en un enfoque cuantitativo, complementado con elementos cualitativos de tipo descriptivo y explicativo, por lo que se considera de carácter mixto. Esto permitió integrar la obtención de datos numéricos de mediciones experimentales con la interpretación biológica y morfológica de los agentes fitopatógenos asociados al cultivo de *Theobroma cacao* L.

Desde el enfoque cuantitativo, se aplicaron métodos experimentales y estadísticos orientados a determinar la incidencia y severidad de las principales enfermedades fúngicas en diferentes provincias subtropicales del Ecuador. La recopilación de datos numéricos permitió realizar análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ), lo que garantizó la identificación de diferencias significativas entre localidades y patógenos. Estos resultados aportaron evidencia objetiva sobre la distribución espacial y el nivel de afectación del cultivo.

Por otro lado, el componente cualitativo se centró en la caracterización morfológica de los hongos fitopatógenos, mediante observaciones macroscópicas y microscópicas en cultivos puros y tejidos infectados. Este análisis permitió describir rasgos distintivos en la estructura y morfología de las colonias, hifas y microestructuras, generando información esencial para la identificación taxonómica y la comprensión del comportamiento biológico de los patógenos.

El diseño de investigación adoptado fue experimental, transversal y descriptivo, dado que los datos fueron recolectados en un solo momento y se describieron los fenómenos tal como se presentaron en las zonas de estudio. La integración de métodos teóricos (revisión bibliográfica, análisis taxonómico) y prácticos (aislamiento, cultivo y evaluación estadística) permitió establecer una visión integral del problema fitosanitario del cacao, aportando resultados aplicables al manejo y control de las enfermedades en campo.

### 3.2. La población y la muestra

La población de estudio estuvo constituida por las plantaciones de *Theobroma cacao* L. ubicadas en las principales zonas subtropicales productoras del Ecuador,

específicamente en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos y Bolívar. Estas regiones fueron seleccionadas por su relevancia en la producción nacional de cacao y por presentar condiciones agroecológicas favorables para el desarrollo de enfermedades fúngicas. La población incluyó tanto plantaciones comerciales como fincas familiares dedicadas al cultivo de cacao tipo Nacional y CCN-51, representativas del manejo agrícola característico de cada zona.

La muestra se determinó mediante un muestreo no probabilístico de tipo intencional, considerando la accesibilidad de los predios, el estado sanitario de las plantaciones y la disposición de los productores para participar en el estudio. En cada provincia se seleccionaron tres plantaciones representativas, y dentro de cada una de ellas se establecieron parcelas experimentales donde se realizó la recolección de frutos y tejidos vegetales con síntomas visibles de infección.

En cada plantación se evaluaron un total de 30 árboles, distribuidos aleatoriamente, tomando como unidades de observación las mazorcas de cacao. En cada árbol se seleccionaron frutos con diferentes grados de madurez y sintomatología, con el fin de estimar la incidencia y severidad de las enfermedades fúngicas. De manera complementaria, se recolectaron muestras de tejidos infectados para su análisis en laboratorio, donde se procedió al aislamiento y caracterización morfológica de los patógenos.

La delimitación geográfica y el tamaño de muestra permitieron obtener una representación equilibrada de las condiciones fitosanitarias del cacao en las principales provincias subtropicales del país. Este diseño garantizó la validez de los resultados al abarcar una variabilidad ambiental y productiva suficiente para comparar la distribución de los principales agentes fúngicos y su impacto sobre el cultivo.

### **3.3. Los métodos y las técnicas**

#### **3.3.1. Área de muestreo y recolección de material vegetal**

Las muestras se recolectaron en plantaciones de *Theobroma cacao* L. ubicadas en diversas zonas subtropicales del Ecuador, correspondientes a las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos y Bolívar. Los sitios de muestreo incluyeron los cantones San Miguel de los Bancos y Pedro Vicente Maldonado (Pichincha), La Maná y Pangua (Cotopaxi), La Concordia y Monterrey

(Santo Domingo de los Tsáchilas), Quevedo y Mocache (Los Ríos), así como Caluma y Echeandía (Bolívar).

Estas zonas se caracterizan por un clima cálido húmedo a templado lluvioso, con temperaturas promedio entre 23 y 27 °C, precipitaciones anuales de 2 000 a 3 500 mm y altitudes comprendidas entre 400 y 1 200 m s. n. m. En cada sitio, se seleccionaron frutos de cacao con síntomas visibles de pudrición, necrosis, manchas irregulares o deformación, los cuales fueron recolectados manualmente y colocados en bolsas de papel estériles. Las muestras fueron rotuladas con el código del sitio y transportadas en cajas térmicas al laboratorio de microbiología vegetal para su análisis.

### **3.3.2. Evaluación de incidencia de enfermedades fúngicas**

La incidencia de enfermedades fúngicas se determinó mediante inspección visual de las plantas en cada subparcela. Se examinó un número representativo de plantas, correspondiente al 10% del total presente en cada subparcela, seleccionadas mediante muestreo sistemático en forma de “zig-zag”. Se registró el número de plantas afectadas por cada tipo de enfermedad fúngica identificable. La incidencia se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número total de plantas evaluadas}} \times 100$$

### **3.3.3. Evaluación de severidad de enfermedades fúngicas**

La severidad de cada enfermedad se evaluó utilizando escalas de daño estandarizadas para cada patógeno, basadas en la proporción de tejido vegetal afectado. Para cada planta muestreada, se asignó un valor de severidad según la escala de 0 a 5, donde 0 corresponde a plantas sanas y 5 a infección total o muerte de la planta. La severidad promedio por parcela se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Severidad (\%)} = \frac{\sum(\text{Valor de severidad de cada planta} \times \text{Número de plantas con ese valor})}{\text{Número total de plantas evaluadas} \times \text{Valor máximo de severidad}} \times 100$$

### **3.3.4. Evaluación del porcentaje de mazorcas enfermas**

Para la evaluación del porcentaje de mazorcas enfermas, se empleó un diseño de muestreo sistemático-aleatorio dentro del área de estudio. Se trazaron cinco transectos paralelos separados 20 m entre sí, distribuidos uniformemente a lo largo de la hectárea. En cada transecto se seleccionaron ocho árboles de forma equidistante, totalizando 40 árboles evaluados. Cada árbol se consideró como una unidad experimental, y las mazorcas individuales representaron las unidades de observación. En cada árbol se contabilizó el número total de mazorcas presentes (tamaño comercial y en desarrollo, mayores de 10 cm) y el número de mazorcas que mostraron síntomas visibles de infección fúngica.

Se consideró como mazorca enferma aquella que presentó síntomas compatibles con la acción de patógenos fúngicos, tales como lesiones necróticas o pardas, pudrición acuosa o seca, crecimiento micelial blanquecino, deformaciones, momificación o presencia de estructuras de esporulación. Se excluyeron los daños de origen mecánico o aquellos causados exclusivamente por insectos sin evidencia de colonización micótica. Los datos obtenidos se registraron en planillas estandarizadas, indicando por cada árbol el número total de mazorcas (MT), el número de mazorcas enfermas (ME) y el tipo de síntoma predominante

### **3.3.5. Aislamiento y purificación de los patógenos**

Los fragmentos de tejido infectado (5 mm<sup>2</sup>) fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min y enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se sembraron en placas con Papa Dextrosa Agar (PDA, Merck®) suplementado con estreptomina (100 µg·mL<sup>-1</sup>) para evitar crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron a 25 ± 2 °C durante 7 días en oscuridad. Las colonias emergentes se purificaron mediante la técnica de punta de hifa hasta obtener cultivos monospóricos. Cada aislamiento fue rotulado y preservado en tubos con medio PDA inclinado a 4 °C para su conservación.

### **3.3.6. Caracterización morfológica macroscópica**

Las observaciones macroscópicas se realizaron en cultivos de 7 a 10 días de incubación. Se registraron las variables coloración, textura, margen, forma del

crecimiento micelial y presencia de estructuras de esporulación. Las observaciones se efectuaron bajo iluminación blanca con un estereomicroscopio Leica EZ4HD, y se documentaron fotográficamente con cámara Canon EOS 80D. Los datos fueron organizados en una tabla comparativa con las diferencias coloniales entre los géneros identificados.

### **3.3.7. Caracterización microscópica**

Las estructuras fúngicas fueron observadas mediante montajes húmedos teñidos con lactofenol azul de algodón. Se utilizaron aumentos de 40× y 100× en un microscopio óptico compuesto (Leica DM500). Se analizaron las características de las hifas (presencia de septos, grosor, ramificación) y las estructuras reproductivas (conidios, esporangios, basidios, clamidosporas, esporas).

### **3.3.8. Identificación taxonómica**

La identificación morfológica se efectuó mediante comparación con descripciones de referencia reportadas por Barnett & Hunter (1998), Leslie & Summerell (2006) y claves taxonómicas específicas para *Phytophthora*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* y *Moniliophthora*. Los aislamientos fueron clasificados a nivel de género según la coincidencia de características coloniales y microscópicas.

### **3.3.9. Registro fotográfico y documentación de resultados**

Las imágenes representativas de las colonias, estructuras fúngicas y síntomas observados en los frutos se procesaron con el software ImageJ v1.54 para el ajuste de contraste y escala, sin alteración morfológica. Los resultados se presentan en formato de figura, donde se ilustraron las diferencias en la morfología colonial y las estructuras reproductivas observadas entre los distintos patógenos asociados al cultivo de cacao.

### **3.3.10. Identificación molecular**

#### **3.3.10.1. Recolección y preservación del material biológico**

Las muestras analizadas correspondieron a tejidos de frutos de *Theobroma cacao* L. con síntomas de infección fúngica, recolectados en diferentes zonas subtropicales del Ecuador (Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo, Los Ríos y Bolívar). Los fragmentos de tejido infectado (3 cm<sup>2</sup>) fueron tomados de la zona de avance de la lesión, colocados en tubos de 2 mL con sílica gel estéril y almacenados a 4 °C hasta su procesamiento

### **3.3.10.2. Aislamiento y obtención de micelio puro**

Para cada muestra, se realizaron cultivos en medio Papa Dextrosa Agar (PDA, Merck®) suplementado con estreptomina ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Las placas se incubaron a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 días en oscuridad. Las colonias con morfología fúngica característica fueron subcultivadas por la técnica de punta de hifa hasta obtener cultivos monospóricos. El micelio fresco (3–5 días) se utilizó para la extracción de ADN genómico.

### **3.3.10.3. Extracción del ADN genómico**

La extracción de ADN se realizó siguiendo el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) modificado. Aproximadamente 100 mg de micelio fresco se maceraron en nitrógeno líquido con mortero estéril. El polvo obtenido se suspendió en 700  $\mu\text{L}$  de buffer CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB y 1%  $\beta$ -mercaptoetanol) y se incubó a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min. Posteriormente, se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), se mezcló por inversión y se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y el ADN se precipitó con un volumen igual de isopropanol frío, incubándose a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min.

El pellet de ADN se lavó con etanol al 70%, se dejó secar al aire y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura libre de nucleasas. La pureza y concentración del ADN se verificaron mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) midiendo la relación A260/A280, y la integridad se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio.

### **3.3.10.4. Amplificación por PCR del ADN fúngico**

La amplificación molecular se realizó utilizando los cebadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') dirigidos a la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , conteniendo: 12.5  $\mu\text{L}$  de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1  $\mu\text{L}$  de cada cebador (10  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de ADN genómico ( $\approx 50 \text{ ng}$ ) y 8.5  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura.

Las condiciones de termociclado fueron: desnaturalización inicial a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 min, seguida de 35 ciclos de  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 s y  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 min, con una extensión final a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 min. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con tampón TBE 1 $\times$ , corridos a 100

V durante 45 min y teñidos con GelRed™ (Biotium). El tamaño esperado del fragmento (~600 pb) se verificó comparando con un marcador de peso molecular de 100 pb.

#### **3.3.10.5. Purificación y secuenciación de los amplicones**

Los productos de PCR con bandas nítidas se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras purificadas se cuantificaron por fluorometría y se enviaron para secuenciación bidireccional (ITS1 e ITS4) a la plataforma Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

#### **3.3.10.6. Análisis bioinformático de secuencias**

Las secuencias obtenidas se visualizaron y editaron utilizando BioEdit v7.2.5 para eliminar regiones de baja calidad y ensamblar las secuencias consenso. Posteriormente, se compararon con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el algoritmo BLASTn, considerando únicamente coincidencias con identidad  $\geq 97\%$  y cobertura  $\geq 95\%$ .

Las secuencias representativas se alinearon utilizando ClustalW incorporado en MEGA v11.0, y se construyó un árbol filogenético empleando el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) con el modelo de sustitución Tamura-Nei, aplicando 1 000 réplicas de bootstrap para determinar la solidez de los clados.

#### **3.3.11. Crecimiento radial de especies fúngicas aisladas**

##### **3.3.11.1. Preparación de las placas para el ensayo de crecimiento**

Se prepararon placas Petri estériles de 90 mm de diámetro conteniendo 20 mL de medio PDA solidificado. De cada aislamiento se cortó un disco de 5 mm de diámetro de micelio activo (de la periferia de una colonia de 5 días de crecimiento) utilizando un sacabocados estéril. El disco se colocó en el centro de la placa con la superficie micelial en contacto directo con el medio. Cada tratamiento se realizó por triplicado, utilizando tres placas independientes por aislamiento fúngico.

##### **3.3.11.2. Condiciones de incubación y monitoreo del crecimiento**

Las placas inoculadas se incubaron en oscuridad a  $25 \pm 2$  °C por un período de 10 días. El crecimiento radial del micelio se midió cada 24 horas, utilizando un calibrador Vernier estéril. Se realizaron dos mediciones perpendiculares (diámetro X y Y) por placa, promediando los valores obtenidos para cada tiempo de evaluación.

Las mediciones se detuvieron cuando el micelio alcanzó el borde de la placa. En cada registro, se observó la coloración, textura y densidad del micelio con el fin de

documentar posibles variaciones morfológicas durante el crecimiento. Las observaciones se documentaron fotográficamente con una cámara digital Canon EOS 80D bajo iluminación blanca controlada.

### **3.3.11.3. Cada colonia fue Registro fotográfico y documentación de crecimiento**

fotografiada para registrar el avance del micelio y los cambios en la morfología colonial. Las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ v1.54 para determinar el área de cobertura del micelio y verificar la uniformidad del crecimiento. Los valores se tabularon en hojas de cálculo Microsoft Excel 2021 y se graficaron para representar la tendencia de crecimiento en función del tiempo.

### **3.3.11.4. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de las mediciones se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía, considerando la especie fúngica como factor principal. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) utilizando el programa R v4.3.1. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar (EE).

### **3.3.12. Preparación de inóculo**

Se trabajó con aislamientos monospóricos viables de *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri*, obtenidos previamente de mazorcas de *Theobroma cacao* L. Los aislamientos se reactivaron en PDA (Papa Dextrosa Agar) a  $25 \pm 2$  °C durante 7 días en oscuridad. Para los ensayos de sensibilidad se utilizaron discos de micelio activo de 5 mm tomados de la periferia de colonias de 4 días. Cuando correspondía, se obtuvo suspensión de conidios ajustada a  $1 \times 10^5$  esporas  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> mediante conteo en cámara de Neubauer

### **3.3.13. Fungicidas evaluados y soluciones madre**

Se seleccionaron ingredientes activos usados en cacao y con diferentes modos de acción (FRAC): mefenoxam 480 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (fenilamida, FRAC 4), azoxistrobin 250 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (QoI, FRAC 11), difenoconazol 250 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (DMI, FRAC 3). De forma complementaria se evaluaron tiabendazol/tiabendazol o tiabendazol (MBC, FRAC 1) y sulfato de cobre (M1, multisitio). Se prepararon soluciones madre (1 000 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> en agua destilada; azoxistrobin y difenoconazol en 1% v/v de solvente compatible) y se esterilizaron por filtración (0.22  $\mu$ m). Las placas sin fungicida y con solvente fueron controles negativos.

### 3.3.14. Ensayo de crecimiento micelial en medio envenenado (poisoned food technique)

El medio PDA fundido ( $\approx 50$  °C) se mezcló con fungicida para obtener series logarítmicas de concentración ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ): mefenoxam 0.01–10; azoxistrobin 0.03–30; difenoconazol 0.01–10; tiabendazol 0.1–100; sulfato de cobre 5–250. Se vertieron 20 mL por placa Petri (90 mm). Cada aislado  $\times$  concentración se sembró con un disco de 5 mm en el centro de la placa (cara micelial hacia el agar). Las placas se incubaron a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad. Se midió el diámetro de la colonia cada 24 h en dos ejes perpendiculares hasta que el control alcanzó el borde (72–120 h según especie). Para cada combinación se dispusieron tres repeticiones biológicas y el ensayo se repitió dos veces.

La inhibición del crecimiento radial (PIRG, %) se calculó como:

$$\text{PIRG} = 100 \times \frac{D_c - D_t}{D_c}$$

Donde  $D_c$  es el diámetro medio del control y  $D_t$  el del tratamiento a un tiempo común (cuando el control tocó el borde).

### 3.4. Procesamiento estadístico de la información

El procesamiento estadístico de la información se realizó con el propósito de analizar de manera objetiva las diferencias en la incidencia y severidad de las enfermedades fúngicas asociadas al cultivo de *Theobroma cacao* L. en las distintas provincias subtropicales del Ecuador. Los datos obtenidos en campo y laboratorio fueron organizados en hojas de cálculo y posteriormente procesados mediante software estadístico especializado (IBM SPSS Statistics v.26 y Microsoft Excel 2019).

En primera instancia, se efectuó una depuración y verificación de los datos, eliminando valores atípicos y asegurando la consistencia interna de las mediciones. A continuación, se calcularon los promedios, errores estándar y porcentajes correspondientes a cada variable (incidencia y severidad por especie fúngica y por provincia), con el fin de obtener una descripción preliminar del comportamiento de las enfermedades.

Posteriormente, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos (provincias). En los casos en que se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se realizó una prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar los grupos homogéneos. Este procedimiento permitió establecer relaciones estadísticas claras entre las variables geográficas y fitopatológicas.

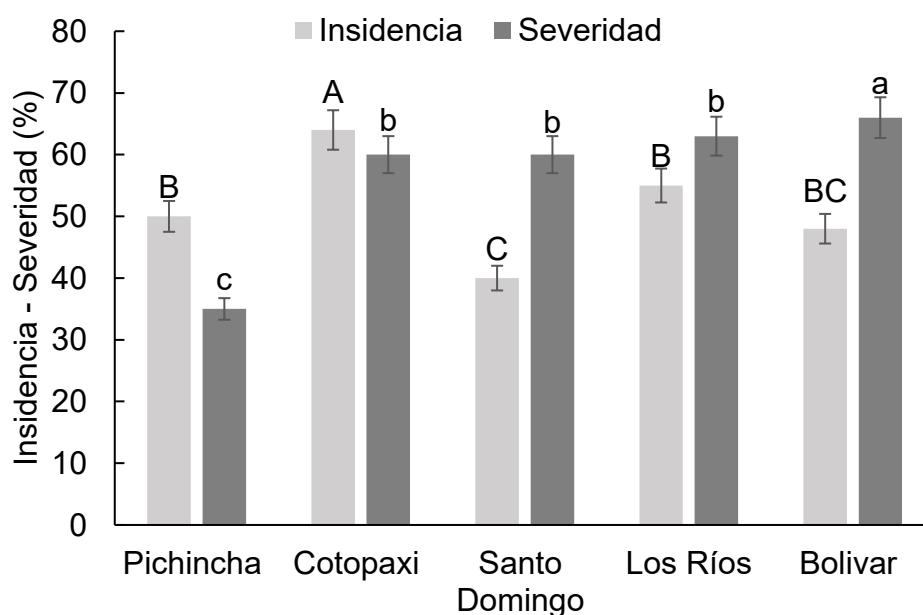
Los resultados fueron representados mediante gráficos de barras con sus respectivos errores estándar, elaborados en Microsoft Excel y complementados con análisis descriptivos y comparativos. De manera adicional, los datos cualitativos obtenidos del análisis morfológico de los hongos se sistematizaron en tablas e imágenes de referencia, integrando la información visual y cuantitativa en la interpretación final.

## CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados

### 4.1. Incidencia y severidad

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en los porcentajes de incidencia y severidad de las enfermedades fúngicas asociadas al cultivo de cacao entre las provincias evaluadas. La Figura 1 muestra que los valores más altos de incidencia se registraron en Cotopaxi (67.4 %) y Los Ríos (55.2 %), seguidos por Pichincha (50.1 %) y Bolívar (48.3 %), mientras que Santo Domingo presentó el valor más bajo (39.6 %). De acuerdo con las letras de comparación estadística, Cotopaxi difirió significativamente del resto de provincias ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a la severidad, se evidenció un patrón variable entre regiones. Los valores más elevados correspondieron a Bolívar (69.2 %) y Los Ríos (62.7 %), mientras que Cotopaxi presentó una severidad intermedia (60.3 %) y Pichincha el valor más bajo (34.5 %). Los análisis estadísticos indicaron diferencias significativas entre Bolívar y Pichincha, según las letras asignadas en la comparación múltiple. En general, las provincias con mayor incidencia no siempre coincidieron con los mayores niveles de severidad, reflejando una variación espacial en la expresión de la enfermedad. Los promedios de incidencia variaron entre 39 % y 67 %, mientras que la severidad osciló entre 34 % y 69 %.

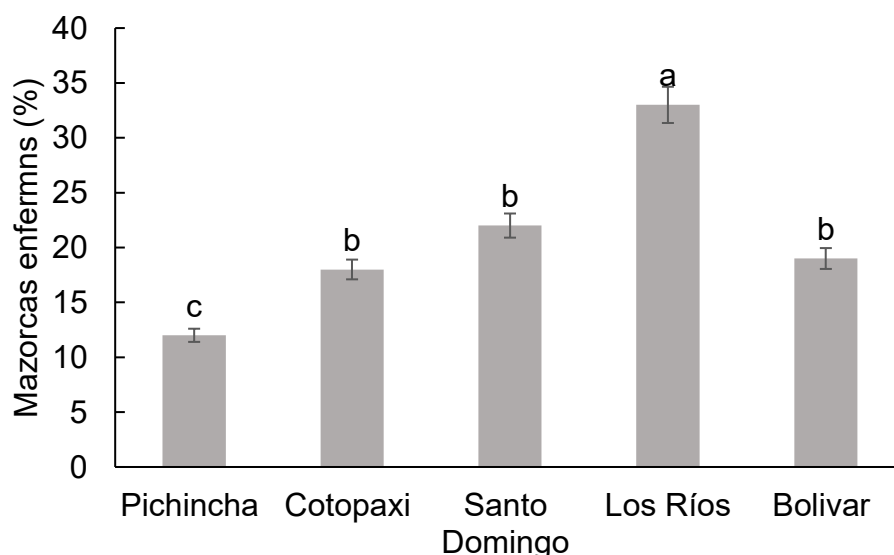


**Figura 1.** Porcentaje de incidencia y severidad de enfermedades fúngicas asociadas al cultivo de *Theobroma cacao* L. en cinco provincias subtropicales del: Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo, Los Ríos y Bolívar. Las barras representan los valores promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas entre provincias según la prueba de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2. Incidencia de mazorcas de cacao afectadas por *Phytophthora* sp.

Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias significativas en el porcentaje de mazorcas enfermas por *Phytophthora* sp. entre las provincias evaluadas (Figura 2). El porcentaje más alto de infección se registró en la provincia de Los Ríos, con un promedio de 33.8%, valor estadísticamente superior al resto de las localidades ( $p < 0.05$ ). En segundo orden se ubicaron Santo Domingo con 22.5% y Cotopaxi con 18.4%, sin diferencias significativas entre sí.

Por su parte, las provincias de Bolívar y Pichincha presentaron los valores más bajos de incidencia, con promedios de 18.9% y 12.3%, respectivamente, siendo esta última significativamente inferior al resto de las provincias. En todos los casos, los valores mostraron una variación estrecha dentro de cada grupo, reflejada en los errores estándar reducidos.



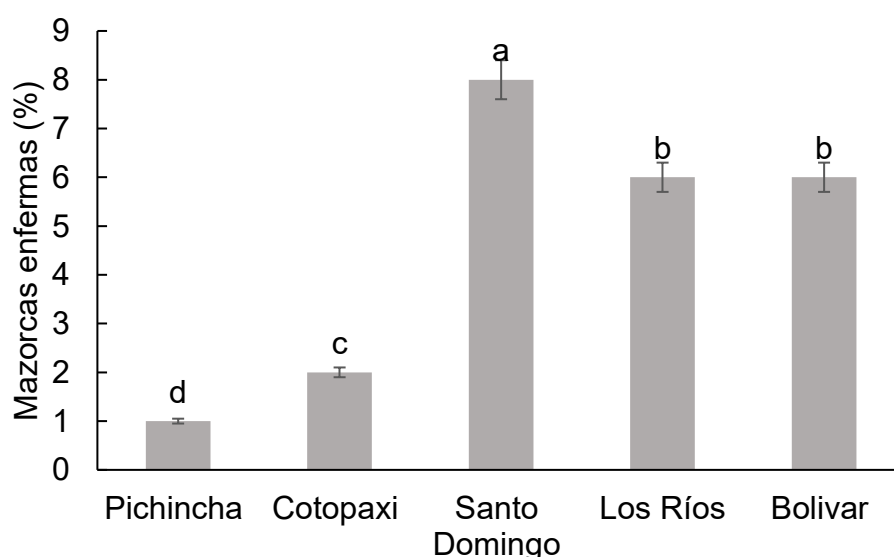
**Figura 2.** Porcentaje de mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.) enfermas por *Phytophthora* sp. en cinco provincias subtropicales del Ecuador: Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo, Los Ríos y Bolívar. Las barras representan los valores promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas entre provincias según la prueba de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### 4.3. Incidencia de mazorcas de cacao afectadas por *Fusarium* sp.

Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias significativas en la incidencia de mazorcas afectadas por *Fusarium* sp. entre las provincias subtropicales evaluadas (Figura 3). El porcentaje más alto de mazorcas enfermas se registró en Santo Domingo, con un promedio de 8.1%, valor significativamente superior al observado en el resto de las provincias ( $p < 0.05$ ).

En segundo lugar, se ubicaron las provincias de Los Ríos y Bolívar, con incidencias de 6.0% y 6.1%, respectivamente, sin diferencias estadísticas entre ellas. Por su parte, Cotopaxi presentó una incidencia intermedia (2.9%), mientras que Pichincha mostró el valor más bajo, con apenas 1.2% de mazorcas afectadas, siendo estadísticamente diferente del resto de las provincias analizadas.

Los valores de incidencia fluctuaron entre 1 y 8%, con errores estándar reducidos que reflejan una variabilidad mínima en las repeticiones. Los análisis estadísticos mediante la prueba de Tukey confirmaron la formación de cuatro grupos homogéneos de incidencia, destacando a Santo Domingo como la provincia con mayor afectación registrada.



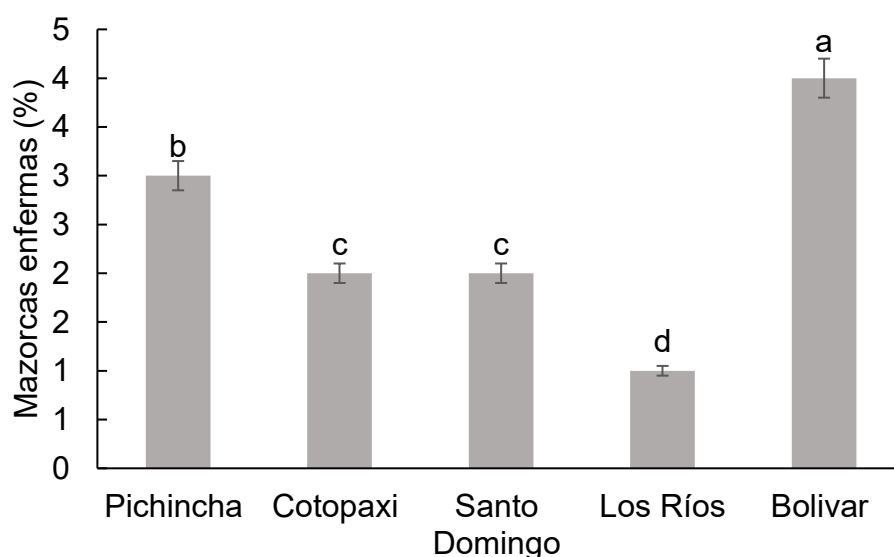
**Figura 3.** Porcentaje de mazorcas de *Theobroma cacao* L. afectadas por *Fusarium* sp. en cinco provincias subtropicales del Ecuador: Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo, Los Ríos y Bolívar. Las barras representan los valores promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas entre provincias según la prueba de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4. Incidencia de mazorcas de cacao afectadas por *Moniliophthora perniciosa*.

Los resultados mostraron diferencias significativas en la incidencia de mazorcas afectadas por *Moniliophthora perniciosa* entre las provincias subtropicales del Ecuador (Figura 4). La provincia de Bolívar presentó el mayor porcentaje de mazorcas enfermas (4.1%), valor significativamente superior al observado en el resto de las provincias ( $p < 0.05$ ). En segundo lugar, se ubicó Pichincha, con una incidencia promedio de 3.2%, sin diferencias estadísticas marcadas respecto a Bolívar.

Las provincias de Cotopaxi y Santo Domingo registraron valores intermedios, con incidencias de 2.3% y 2.2%, respectivamente, mientras que la provincia de Los Ríos presentó el porcentaje más bajo (1.1%), diferenciándose significativamente de las demás.

En conjunto, los valores de incidencia oscilaron entre 1 y 4%, con errores estándar bajos, lo que indica una variabilidad reducida dentro de cada grupo evaluado. El análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey permitió agrupar las provincias en cuatro categorías estadísticas distintas, confirmando la distribución desigual de la enfermedad en las zonas productoras de cacao.



**Figura 4.** Porcentaje de mazorcas de *Theobroma cacao* L. afectadas por *Moniliophthora perniciosa* en cinco provincias subtropicales del Ecuador: Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo, Los Ríos y Bolívar. Las barras representan

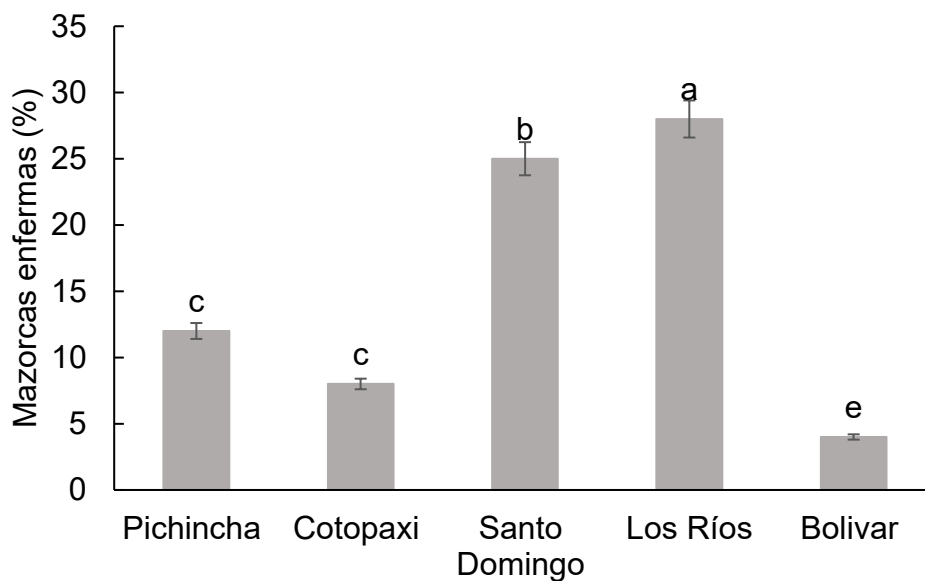
los valores promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas entre provincias de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### **4.5. Incidencia de mazorcas de cacao afectadas por *Lasiodiplodia theobromae*.**

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la incidencia de mazorcas afectadas por *Lasiodiplodia theobromae* entre las provincias subtropicales del Ecuador (Figura 5). La provincia de Los Ríos presentó el mayor porcentaje de mazorcas enfermas (28.4%), valor significativamente superior al registrado en el resto de las provincias ( $p < 0.05$ ). En segundo lugar, se ubicó Santo Domingo, con una incidencia promedio de 25.2%, sin diferencia estadística marcada respecto a Los Ríos.

Las provincias de Pichincha y Cotopaxi presentaron valores intermedios de 11.7% y 7.9%, respectivamente, ambos significativamente menores que los observados en las provincias de mayor afectación. Por su parte, Bolívar mostró la incidencia más baja, con un promedio de 3.8%, siendo estadísticamente diferente del resto de las provincias ( $p < 0.05$ ).

Los porcentajes de mazorcas afectadas por *L. theobromae* oscilaron entre 3 y 28%, con errores estándar reducidos, lo que indica una variación mínima en los datos obtenidos dentro de cada provincia. La prueba de comparación múltiple de Tukey permitió establecer cinco grupos estadísticamente distintos, evidenciando la distribución heterogénea de la enfermedad en las zonas subtropicales de cultivo.

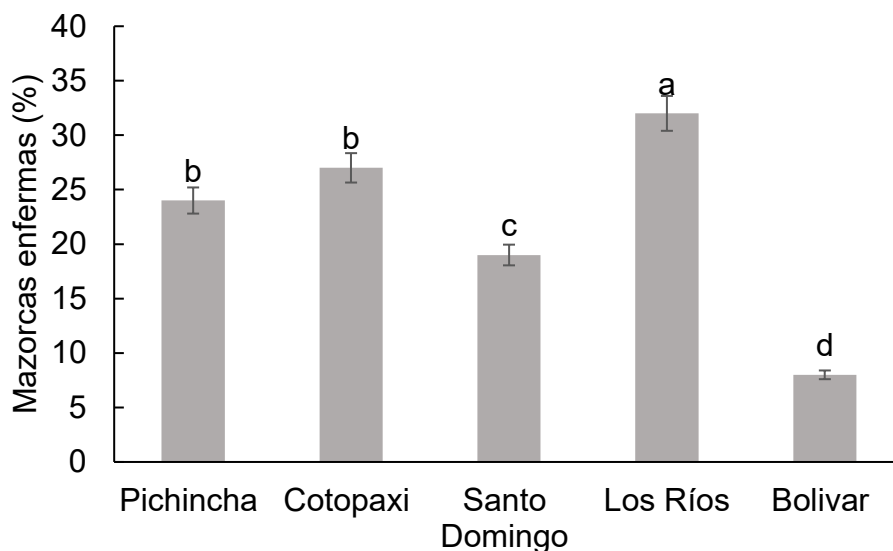


**Figura 5.** Porcentaje de mazorcas de *Theobroma cacao* L. afectadas por *Lasiodiplodia theobromae* en cinco provincias subtropicales del Ecuador: Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo, Los Ríos y Bolívar. Las barras representan los valores promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas entre provincias según la prueba de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### **4.6. Incidencia de mazorcas de cacao afectadas por *Moniliophthora roreri*.**

La provincia de Los Ríos presentó el mayor porcentaje de mazorcas enfermas (32.1%), valor significativamente superior ( $p < 0.05$ ) al registrado en las demás provincias. En segundo orden se ubicaron Cotopaxi y Pichincha, con incidencias promedio de 27.4% y 24.6%, respectivamente, sin diferencias estadísticas entre sí.

Por su parte, la provincia de Santo Domingo mostró un porcentaje intermedio de 18.7%, mientras que Bolívar presentó el valor más bajo (7.9%), siendo estadísticamente diferente de todas las demás provincias ( $p < 0.05$ ). Los promedios de incidencia variaron entre 7 y 32%, con errores estándar reducidos que reflejan una baja variabilidad entre repeticiones. El análisis estadístico mediante la prueba de Tukey permitió establecer cuatro grupos homogéneos de incidencia, con Los Ríos en el grupo de mayor afectación y Bolívar en el de menor.



**Figura 6.** Porcentaje de mazorcas de *Theobroma cacao* L. afectadas por *Moniliophthora roreri* en cinco provincias subtropicales del Ecuador: Pichincha, Cotopaxi, Santo Domingo, Los Ríos y Bolívar. Las barras representan los valores promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas entre provincias según la prueba de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7. Caracterización morfológica de patógenos asociados al cultivo de cacao

Se aislaron y caracterizaron diferentes géneros de hongos fitopatógenos asociados al cultivo de cacao. Las observaciones macroscópicas y microscópicas permitieron distinguir rasgos morfológicos particulares entre las especies analizadas (Figura 7).

Las colonias de *Phytophthora* sp. mostraron un crecimiento radial con márgenes definidos y coloración blanca cremosa, presentando una textura homogénea. Las hifas observadas fueron hialinas, cenocíticas y de diámetro uniforme, mientras que las microestructuras correspondieron a esporangios de forma elipsoidal con ápice papilado. En *Fusarium* sp., las colonias exhibieron una tonalidad blanquecina con centro rosado y textura algodonosa; las hifas fueron septadas y delgadas, y las microestructuras observadas correspondieron a conidios alargados de tipo macroconidio.

En *Lasiodiplodia theobromae*, las colonias presentaron un micelio denso de color gris oscuro con márgenes irregulares. Las hifas fueron tabicadas y las microestructuras correspondieron a conidios elipsoidales de pared gruesa. En el

caso de *Moniliophthora perniciosa*, las colonias mostraron un micelio blanco con crecimiento compacto y un margen definido; las hifas fueron delgadas y las microestructuras observadas incluyeron basidios con abundantes esporas esféricas. Por su parte, *Moniliophthora roreri* presentó colonias de coloración beige a amarillenta con un crecimiento uniforme, hifas tabicadas y microestructuras esféricas en disposición agrupada.

La sintomatología asociada a cada patógeno evidenció diferencias notorias en el daño causado sobre los frutos de cacao. *Phytophthora* sp. y *Lasiodiplodia* sp. ocasionaron lesiones necróticas extensas, mientras que *Moniliophthora* spp. provocaron deformaciones y necrosis parciales. En la Figura 7 se ilustran las características morfológicas de las colonias, la sintomatología observada en frutos infectados, así como las estructuras fúngicas observadas al microscopio, permitiendo una comparación visual entre los distintos agentes patogénicos asociados al cultivo.

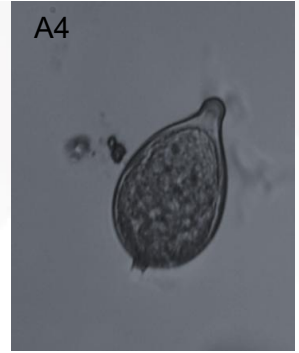
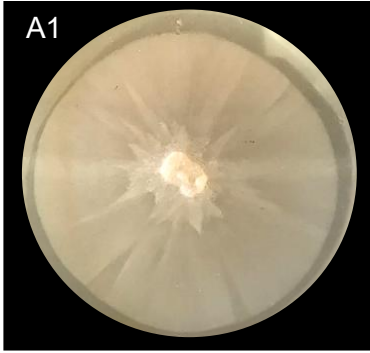
Morfología de la colonia

Sintomatología

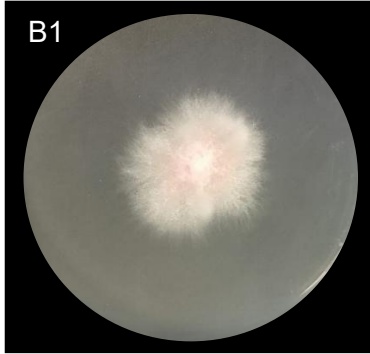
Hifas

Microestructuras

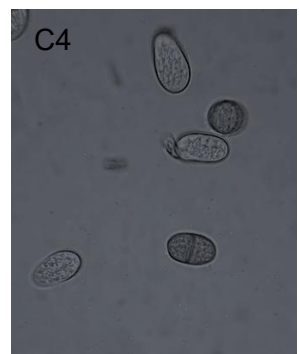
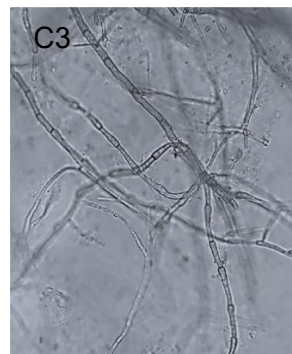
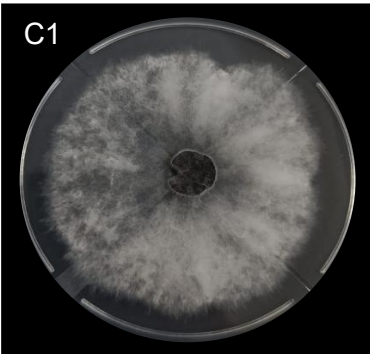
*Phytophthora* sp.



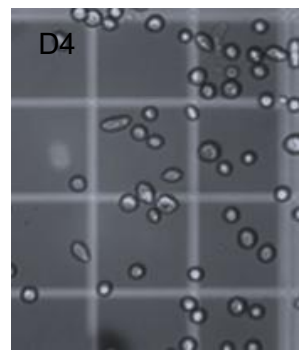
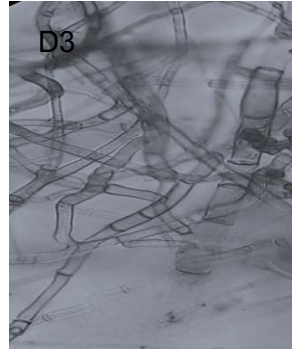
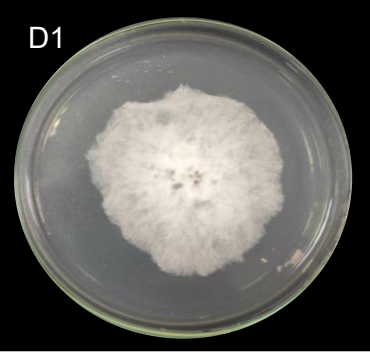
*Fusarium* sp.



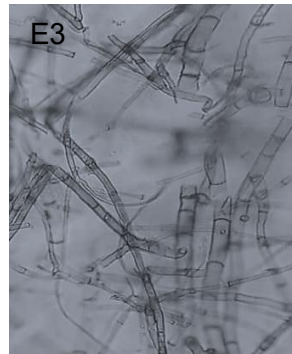
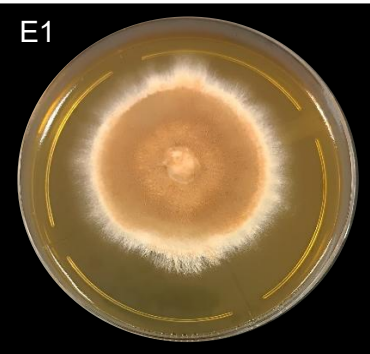
*Lasioidiplodia theobromae*



*Moniophthora pernicioso*



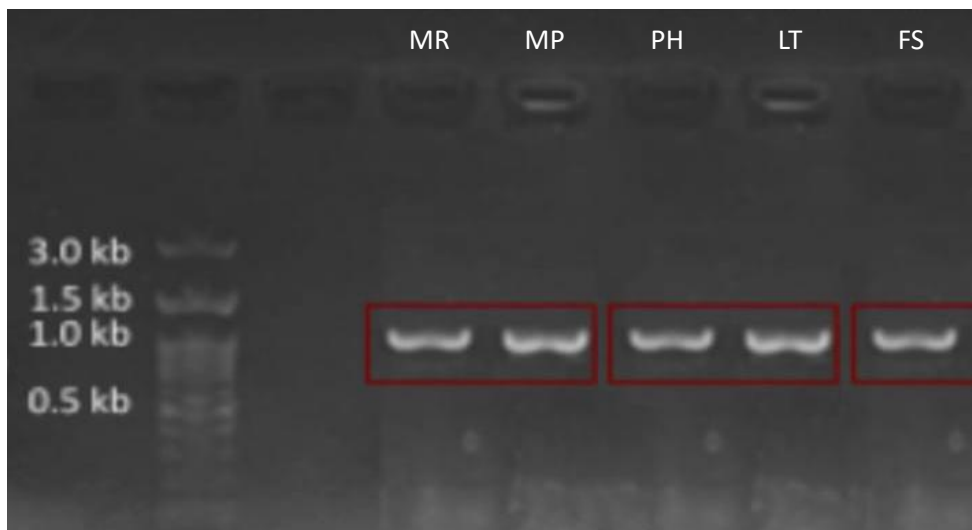
*Moniophthora roreri*



**Figura 7.** Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos asociados al cultivo de *Theobroma cacao* L. Se muestran las observaciones correspondientes a la morfología de la colonia (A1–E1), la sintomatología en frutos infectados (A2–E2), las hifas (A3–E3) y las microestructuras (A4–E4). De arriba hacia abajo: *Phytophthora* sp. (A1–A4), *Fusarium* sp. (B1–B4), *Lasiodiplodia theobromae* (C1–C4), *Moniliophthora perniciosa* (D1–D4) y *Moniliophthora roreri* (E1–E4). Las imágenes representan las características macroscópicas y microscópicas observadas en cultivos puros y tejidos infectados de cacao recolectados en zonas subtropicales del Ecuador.

#### 4.8. Amplificación del fragmento ITS

La amplificación del espacio transcrito interno (ITS-rADN) permitió visualizar un fragmento aproximado de 1.0 kb en la mayoría de los aislamientos evaluados. Como se observa en la Figura 8, los aislamientos MP (*Moniliophthora perniciosa*), PH (*Phytophthora* sp.), LT (*Lasiodiplodia* sp.) y FS (*Fusarium* sp.) mostraron una banda única y definida correspondiente al fragmento ITS. En contraste, MR (*Moniliophthora roreri*) no presentó producto amplificado bajo las condiciones del ensayo. El marcador molecular utilizado confirmó que el tamaño de los amplicones positivos se mantuvo dentro del rango esperado para la región ITS (~1.0 kb), sin evidenciar productos inespecíficos ni fragmentos adicionales.



**Figura 8.** Amplificación por PCR (~1.0 kb) en aislamientos de *Moniliophthora roreri* (MR), *Moniliophthora perniciosa* (MP), *Phytophthora* sp. (PH), *Lasiodiplodia* sp. (LT) y *Fusarium* sp. (FS). Incluye marcador molecular (MM).

#### 4.9. Identificación molecular mediante análisis BLAST

Los amplicones obtenidos fueron confirmados mediante comparación con secuencias depositadas en la base de datos GenBank. La Tabla 1 muestra que todos los aislamientos con amplificación exitosa alcanzaron 100% de identidad y 100% de cobertura de consulta con secuencias de referencia, validando la identificación molecular correspondiente.

MP presentó coincidencia con *Moniliophthora perniciosa* 948F (JX915631.1), mientras que PH se alineó con *Phytophthora palmivora* EGGP (OR917912.1), LT con *Lasiodiplodia theobromae* ARM50 (OR725683.1) y FS con *Fusarium graminearum* NJ4 (OP267545.1). Para MR, la ausencia de producto amplificado impidió su validación mediante BLAST.

**Tabla 1.** Identificación molecular de los aislamientos mediante análisis BLAST de la región ITS-rADN.

CEPA		Identidad (Base de datos NCBI / GenBank)			
Código	Nomenclatura	Cepa	Cobertura		
			de consulta (%)	Identidad (%)	Numero de acceso
MR	<i>Moniliophthora roreri</i>	PLN-16	100	100	<a href="#">AY194150.1</a>
MP	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	948F	100	100	<a href="#">JX915631.1</a>
PH	<i>Phytophthora palmivora</i>	EGGP	100	100	<a href="#">OR917912.1</a>
LT	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	ARM50	100	100	<a href="#">OR725683.1</a>
FS	<i>Fusarium graminearum</i>	NJ4	100	100	<a href="#">OP267545.1</a>

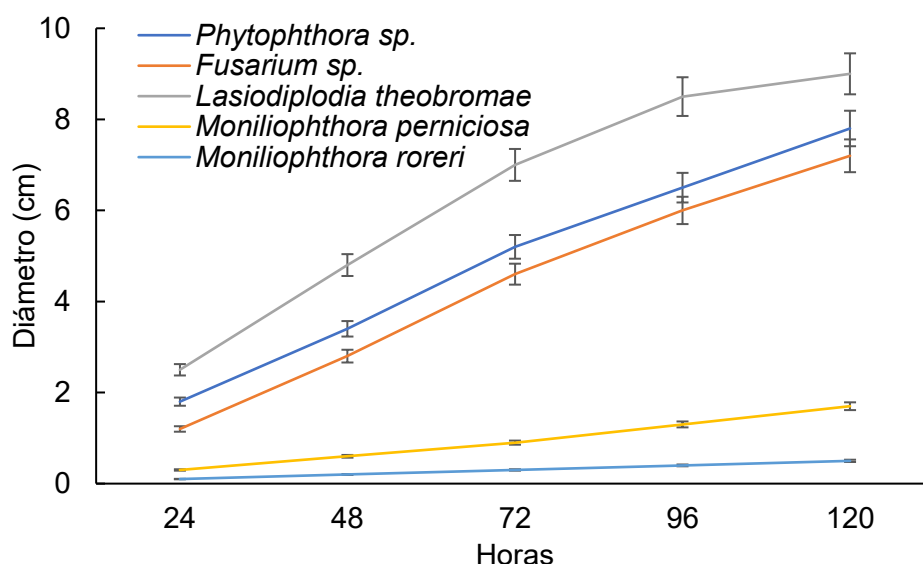
#### 4.10. Crecimiento radial

El crecimiento radial de los fitopatógenos evaluados mostró variaciones marcadas entre especies a lo largo del periodo de incubación. *Lasiodiplodia theobromae* presentó los mayores diámetros de colonia durante todo el ensayo, alcanzando valores de 2.5 cm, 4.8 cm, 7.0 cm, 8.5 cm y 9.0 cm en los días D1,

D2, D3, D4 y D5, respectivamente. En comparación con esta especie, *Phytophthora* sp. exhibió un crecimiento acelerado, con diámetros finales de 7.8 cm al quinto día.

*Fusarium* sp. mostró un crecimiento moderado-rápido, con un incremento progresivo desde 1.2 cm en D1 hasta 7.2 cm en D5. Por su parte, *Moniliophthora perniciosa* evidenció un desarrollo significativamente menor, con diámetros que oscilaron entre 0.3 cm y 1.7 cm a lo largo de los cinco días de incubación.

Finalmente, *Moniliophthora roreri* presentó el menor crecimiento entre los hongos evaluados, con diámetros que no superaron 0.5 cm en D5, manteniendo valores muy reducidos durante todo el periodo experimental (Tabla 2).

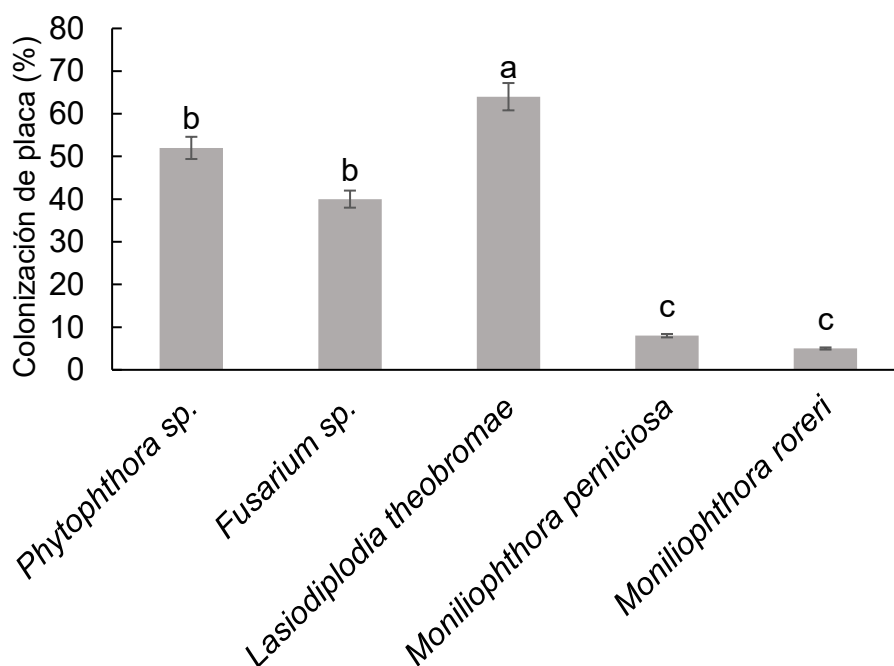


**Figura 9.** Crecimiento radial (diámetro de colonia, cm) de *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo PDA durante 120 horas de incubación. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar de tres repeticiones independientes.

#### 4.11. Porcentaje de colonización de la placa

El análisis del porcentaje de colonización de la placa a las 120 horas mostró diferencias marcadas entre los fitopatógenos evaluados (Figura 10). *Lasiodiplodia theobromae* presentó el mayor porcentaje de colonización, alcanzando valores cercanos al 65% de la superficie total de la placa, lo que representa el crecimiento más acelerado entre los aislamientos.

*Phytophthora* sp. y *Fusarium* sp. mostraron porcentajes intermedios de colonización, con valores aproximados de 50% y 40%, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. Por su parte, *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* exhibieron los valores más reducidos, inferiores al 15%, manteniéndose como los aislamientos con menor expansión micelial.

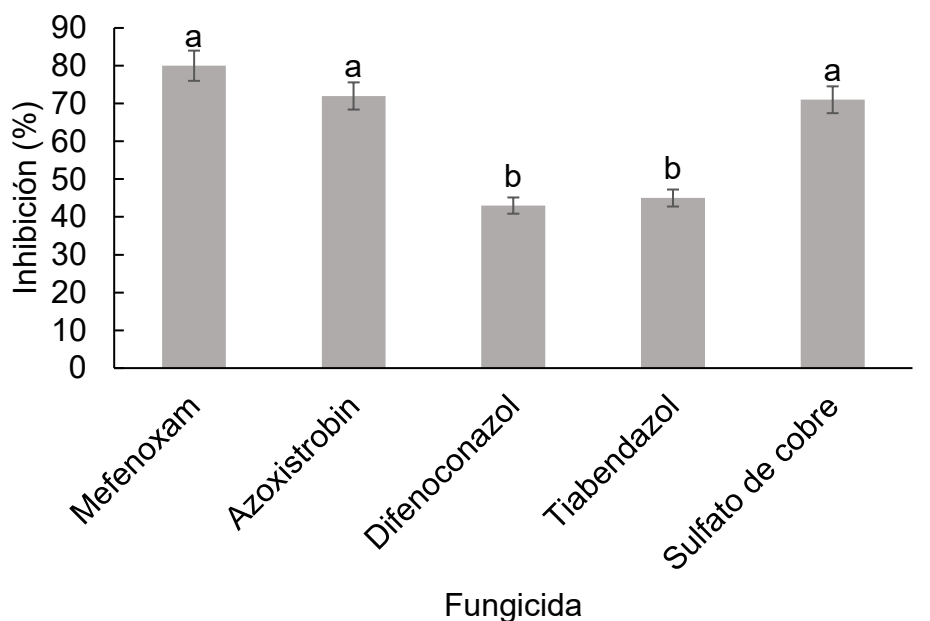


**Figura 10.** Porcentaje de colonización de la placa por *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* a las 120 h de incubación en PDA. Letras distintas indican diferencias significativas entre especies ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.12. Actividad antifúngica sobre *Phytophthora*

La evaluación de la actividad antifúngica mostró diferencias significativas en los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora* sp. en función del fungicida aplicado (Figura 11). Mefenoxam presentó el mayor porcentaje de inhibición, con valores cercanos al 80%, seguido de azoxistrobin y sulfato de cobre, los cuales alcanzaron niveles aproximados de 72–75%, sin diferencias estadísticas entre ellos.

Por otro lado, difenoconazol y tiabendazol mostraron los valores más bajos de inhibición, situándose alrededor del 40–45% y ubicándose en un grupo estadístico diferente. No se detectaron fungicidas con inhibición inferior al 40% en las condiciones evaluadas.

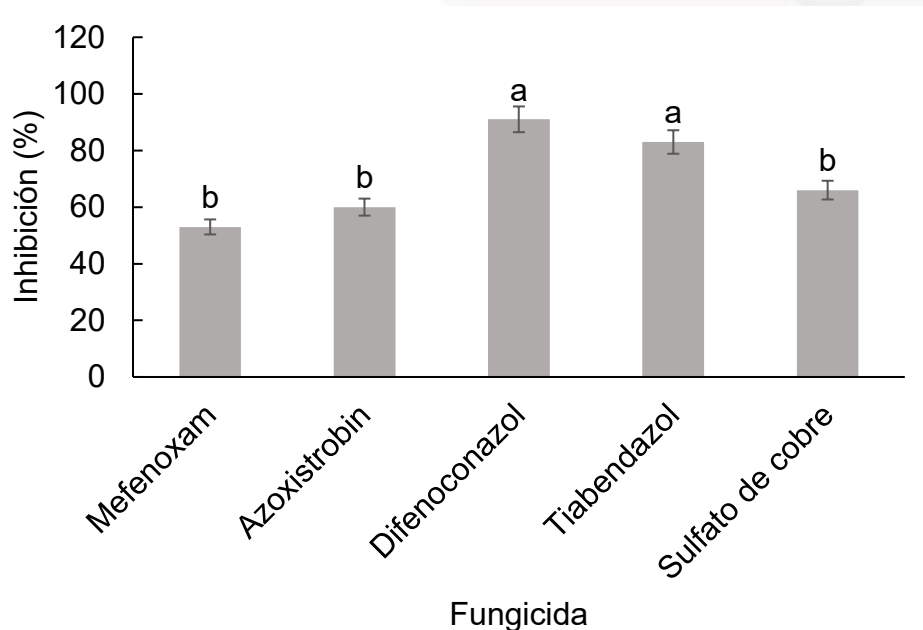


**Figura 11.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora* sp. en PDA en respuesta a la aplicación de mefenoxam, azoxistrobin, difenoconazol, tiabendazol y sulfato de cobre. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.13. Actividad antifúngica sobre *Lasiodiplodia theobromae*

El efecto de los fungicidas sobre la inhibición del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* se muestra en la Figura 12. Difenoconazol exhibió el mayor porcentaje de inhibición, alcanzando valores cercanos al 90%, siendo significativamente más efectivo que el resto de los tratamientos. De forma similar, tiabendazol registró una inhibición superior al 80%, ubicándose también en el grupo estadístico con mayor eficacia.

Sin embargo, sulfato de cobre, azoxistrobin y mefenoxam presentaron porcentajes inferiores, entre 50% y 70%, conformando un grupo estadístico diferente, lo cual evidenció una menor capacidad inhibitoria frente a este fitopatógeno.

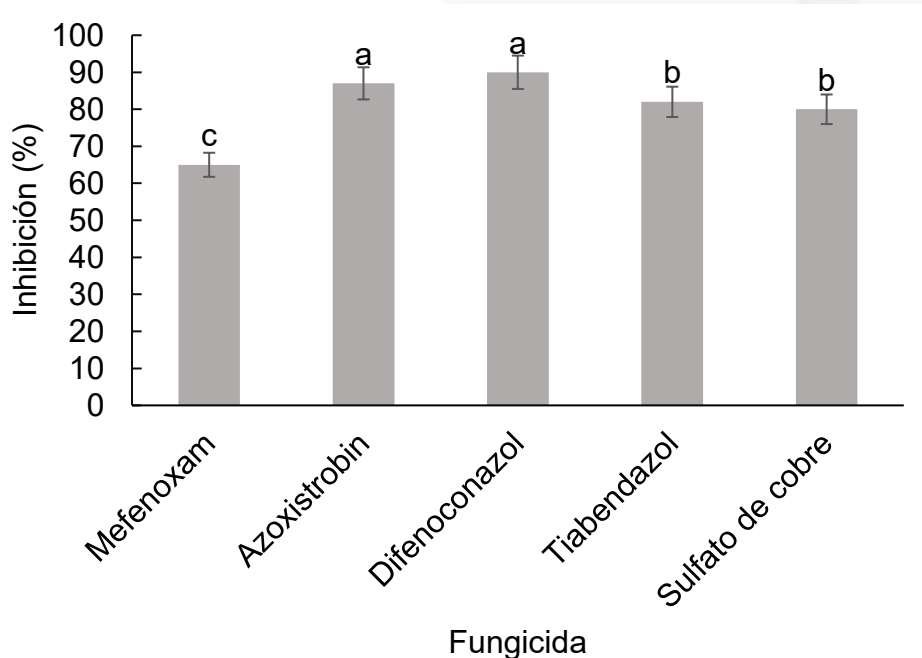


**Figura 12.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* en PDA bajo la acción de cinco fungicidas: mefenoxam, azoxistrobin, difenoconazol, tiabendazol y sulfato de cobre. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre fungicidas ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.14. Actividad antifúngica sobre *Fusarium*

Los resultados mostraron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp. dependiendo del fungicida aplicado (Figura 13). Difenoconazol presentó el mayor porcentaje de inhibición, con valores cercanos al 90%, seguido de azoxistrobin, cuya inhibición se mantuvo en torno al 88%, sin diferencias estadísticas entre ambos tratamientos.

En comparación con los anteriores, tiabendazol y sulfato de cobre alcanzaron porcentajes intermedios, entre 78% y 82%, agrupándose en un nivel estadístico diferente. Finalmente, mefenoxam evidenció la menor inhibición, con valores cercanos al 65%, conformando un grupo estadístico separado.

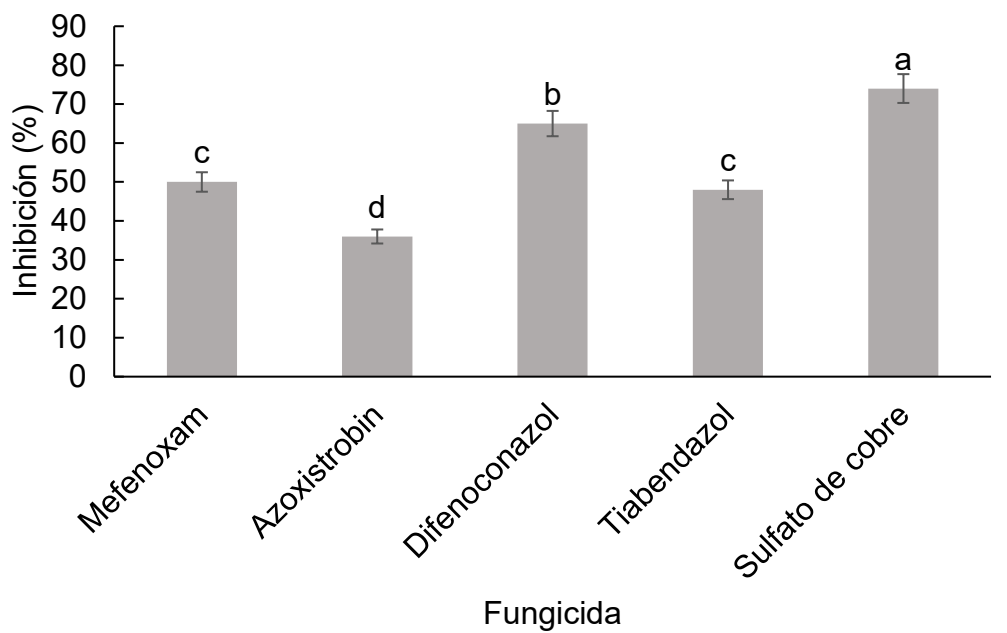


**Figura 13.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp. en PDA bajo la aplicación de diferentes fungicidas. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.15. Actividad antifúngica sobre *Moniliophthora perniciosa*

Los resultados mostraron diferencias significativas entre los fungicidas evaluados en la inhibición del crecimiento micelial de *Moniliophthora perniciosa* (Figura 14). Sulfato de cobre presentó el mayor porcentaje de inhibición, con valores cercanos al 75%. En comparación con este, difenoconazol alcanzó una inhibición aproximada del 65%, conformando un grupo estadístico diferente.

Por otro lado, mefenoxam y tiabendazol mostraron inhibiciones intermedias, alrededor del 50%, sin diferencias significativas entre ellos. Finalmente, azoxistrobin presentó la menor inhibición, con valores cercanos al 35%, ubicándose en el grupo estadístico inferior.

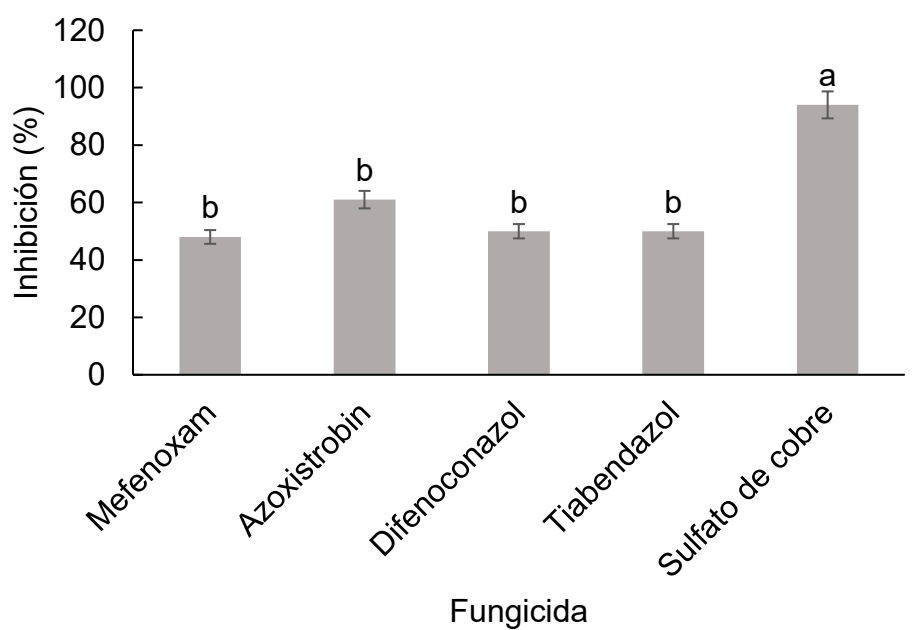


**Figura 14.** Inhibición del crecimiento micelial de *Moniliophthora perniciosa* en PDA bajo la aplicación de distintos fungicidas. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.16. Actividad antifúngica sobre *Moniliophthora roreri*

El análisis de la inhibición del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* mostró diferencias significativas entre los fungicidas evaluados (Figura 15). Sulfato de cobre presentó el mayor porcentaje de inhibición, alcanzando valores cercanos al 95%, conformando el grupo estadístico de máxima eficacia.

En contraste, mefenoxam, azoxistrobin, difenoconazol y tiabendazol exhibieron porcentajes de inhibición menores, situándose en un rango aproximado de 48% a 60%, sin diferencias significativas entre sí y ubicándose en el grupo estadístico inferior. No se registraron tratamientos con inhibiciones inferiores al 45% en las condiciones experimentales empleadas (Figura 15).



**Figura 15.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en PDA bajo la aplicación de diferentes fungicidas. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

## **CAPÍTULO V: Discusión, Conclusiones y Recomendaciones**

### **5.1. Discusión**

La incidencia y la severidad de las enfermedades fúngicas en cacao responden a procesos epidemiológicos distintos, aunque interrelacionados. La incidencia refleja la frecuencia de unidades vegetales afectadas tras la llegada del inóculo, mientras que la severidad expresa el grado de daño ocasionado una vez establecida la infección (Delgado et al., 2021). Esta distinción implica que los factores que facilitan la ocurrencia del primer contacto patógeno–hospedero no siempre son los mismos que determinan la progresión y expansión de las lesiones en el tejido vegetal (Ploetz, 2007). En consecuencia, diferentes regiones agrícolas pueden presentar patrones espaciales contrastantes entre ambas variables, aun cuando se encuentren expuestas a los mismos agentes fitopatógenos (Villamizar et al., 2019).

El clima constituye uno de los principales determinantes de la dinámica epidemiológica de hongos asociados al cacao. La humedad relativa elevada, las lluvias frecuentes y la duración del mojado foliar favorecen la germinación de esporas, el desarrollo de estructuras infectivas y la dispersión por salpicadura, incrementando la probabilidad de contagio y, por tanto, la incidencia (Parawansa et al., 2022). Sin embargo, la severidad depende más estrechamente de la temperatura, la disponibilidad continua de agua en la superficie vegetal y la duración del ciclo posinfección. Microclimas con temperaturas subóptimas para el crecimiento micelial pueden permitir múltiples eventos de infección, pero restringir la expansión tisular del hongo, resultando en severidad reducida a pesar de una elevada incidencia (Monteiro Galvão et al., 2022).

Las características fenológicas del cacao también regulan la respuesta diferencial entre incidencia y severidad. Tejidos jóvenes como flores y mazorcas en desarrollo son más susceptibles al establecimiento del patógeno, lo que aumenta la incidencia durante periodos de alta fructificación (Nieves et al., 2024). No obstante, la severidad puede mantenerse baja si, tras la infección, los tejidos entran rápidamente en etapas más lignificadas o fisiológicamente menos favorables al avance del hongo (Ravishankar et al., 2025). La asincronía entre los picos fenológicos y las condiciones ambientales óptimas para la colonización

es un aspecto crítico para explicar la falta de correspondencia entre ambas variables (Osorio et al., 2021).

La incidencia de *Phytophthora* spp. en mazorcas de cacao presenta una marcada variabilidad espacial, atribuida a la naturaleza hemibiótrofa del patógeno y a su estrecha dependencia con las condiciones ambientales locales (Ndoungué et al., 2021). Este oomiceto prospera en entornos con alta humedad y suelos saturados, donde se facilita la producción de esporangios y zoosporas móviles, lo que incrementa la probabilidad de infección en tejidos susceptibles (Santos et al., 2022). En regiones con estaciones lluviosas prolongadas o con drenaje deficiente, la dispersión acuática se intensifica, resultando en un incremento significativo del número de mazorcas afectadas. Este patrón se ve reforzado por la capacidad del patógeno de sobrevivir en el suelo y en restos vegetales, constituyendo reservorios permanentes de inóculo para nuevas infecciones (Moura et al., 2022).

La incidencia de mazorcas afectadas por *Fusarium* spp. en sistemas cacaoteros subtropicales suele variar significativamente entre regiones debido a la diversidad ecológica y a la plasticidad adaptativa de este género fúngico (Zakaria, 2023). *Fusarium* spp. comprende múltiples complejos de especies con capacidad para colonizar frutos a través de heridas, tejidos senescentes o estructuras florales remanentes, lo que le confiere una elevada eficiencia como patógeno oportunista (Olivares et al., 2021). Esta característica explica su predominio en agroecosistemas donde las condiciones predisponentes como daño mecánico por insectos, roedores o manipulación poscosecha incrementan la probabilidad de penetración y establecimiento en la mazorca (Thube et al., 2024).

El microclima es determinante en el establecimiento y la expansión de *M. pernicioso*. Ambientes con alta humedad relativa, nubosidad persistente y baja disponibilidad de luz favorecen la supervivencia de estructuras infectivas y prolongan el estado biotrófico del hongo, etapa crucial en la inducción de la sintomatología característica (Vizúete et al., 2025). Por el contrario, condiciones con mayor radiación solar y ventilación aceleran el tránsito a la fase necrotrófica, reduciendo la capacidad del patógeno para generar nuevas infecciones. Estas variaciones microambientales pueden explicar patrones regionales donde la

incidencia es mayor independientemente de la severidad final del daño (Novikova y Titova, 2023).

La incidencia de *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal de la pudrición basal o pudrición seca del cacao, varía de manera considerable entre regiones debido a su carácter oportunista y a su estrecha asociación con condiciones predisponentes del hospedero (Asman et al., 2024). Este hongo fitopatógeno suele colonizar tejidos a través de heridas mecánicas, grietas por deshidratación o daños provocados por insectos, lo que convierte a la integridad de la corteza del fruto y a la calidad del manejo agronómico en factores clave para la epidemiología de la enfermedad (Huda et al., 2024). La capacidad de *L. theobromae* para desarrollarse en frutos debilitados o en estrés fisiológico explica su mayor prevalencia en sistemas donde el cultivo se encuentra sometido a fluctuaciones hídricas, deficiencias nutricionales o daños causados durante cosecha y poscosecha (Coelho et al., 2022).

Los factores agroclimáticos emergen como reguladores principales de la infección inicial. Periodos de elevada humedad relativa y precipitación favorecen la germinación de estructuras infectivas y la dispersión por salpicadura, mientras que temperaturas cálidas aceleran el crecimiento micelial posinfección y acortan el periodo de latencia (Campbell et al., 2023). En zonas donde estos factores coinciden con picos fenológicos de fruto tierno, la probabilidad de incidencia elevada se incrementa de forma significativa (Łysiak y Szot, 2023).

Asimismo, el manejo del cultivo juega un papel determinante en la disponibilidad del inóculo. La persistencia de frutos infectados en campo, la insuficiente poda sanitaria y la alta densidad del dosel promueven la acumulación de fuentes de infección y prolongan el tiempo de mojado foliar, factores que facilitan la colonización del tejido (Maitra et al., 2023). En contraste, sistemas con ventilación adecuada y eliminación periódica de material enfermo limitan la progresión epidémica, incluso bajo condiciones climáticas favorables al patógeno (Somarriba et al., 2021).

Las diferencias en la inhibición del crecimiento micelial entre los patógenos del cacao están asociadas a sus características fisiológicas y bioquímicas (Alnefaie et al., 2023). Los oomicetos como *Phytophthora* presentan una pared celular

distinta y carecen de ergosterol, por lo que responden mejor a fungicidas dirigidos a procesos nucleares o síntesis de ácidos nucleicos, mostrando menor sensibilidad a compuestos que actúan sobre la biosíntesis de esteroides.

Los hongos verdaderos como *Lasiodiplodia* y *Fusarium* poseen mayor contenido de quitina y  $\beta$ -glucanos y un metabolismo más dependiente del ergosterol, lo que favorece la acción de moléculas sistémicas de amplio espectro (Philippini et al., 2021). Su rápida necrotización del tejido también facilita la acción de fungicidas que interfieren con la integridad celular o con la cadena respiratoria (Priyashantha et al., 2023).

Los basidiomicetos del género *Moniliophthora* muestran respuestas variables según su fase de desarrollo: en la etapa biotrófica son más difíciles de controlar, mientras que en fase necrotrófica algunos fungicidas protectantes muestran mayor eficacia (Vasconcelos et al., 2021). Además, mecanismos de tolerancia y diferencias genéticas entre cepas pueden modificar significativamente la respuesta a los tratamientos (Castillo et al., 2025).

La efectividad de un fungicida depende del tipo de patógeno, su modo de vida y el proceso metabólico que la molécula inhibe (Yin et al., 2023). Por ello, la selección racional y la rotación de modos de acción resultan esenciales para optimizar el manejo químico y retrasar el desarrollo de resistencia dentro de programas de Manejo Integrado del Cultivo (Corkley et al., 2022).

## 5.2. Conclusiones

- Los resultados obtenidos permitieron alcanzar de manera clara los objetivos planteados en el estudio. En primer lugar, el aislamiento de cinco géneros fitopatógenos *Phytophthora*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* y su descripción macroscópica y microscópica permitió cumplir con el objetivo de identificar y caracterizar morfológicamente los agentes causales asociados a las enfermedades del cacao. Las diferencias observadas en coloración, textura, arquitectura micelial y microestructuras reproductivas facilitaron la diferenciación taxonómica preliminar entre los hongos evaluados.
- Asimismo, la amplificación de fragmentos ITS y su corroboración mediante BLAST permitieron confirmar la identidad molecular de la mayoría de los aislamientos, demostrando su correspondencia con secuencias de referencia de patógenos ampliamente reportados en sistemas cacaoteros. Esta evidencia genética respalda la existencia de una comunidad fúngica diversa y reafirma la pertinencia del enfoque molecular para fortalecer la precisión diagnóstica en los programas de manejo sanitario del cultivo.
- El análisis comparativo entre provincias subtropicales reveló variaciones significativas en incidencia y severidad, lo que confirma que la expresión epidemiológica de los patógenos depende del contexto agroecológico local. Estos patrones sugieren una fuerte interacción entre los microorganismos y factores como humedad, temperatura, disponibilidad de tejido susceptible y manejo agronómico. Por lo tanto, el objetivo de evaluar diferencias ecológicas y fitopatológicas en campo también fue alcanzado de forma satisfactoria.

### 5.3. Recomendaciones

- Los hallazgos del presente estudio evidencian que la presencia y comportamiento de los principales fitopatógenos del cacao en el subtropical ecuatoriano es altamente variable según la especie y las condiciones de cada zona productiva. Por ello, se recomienda implementar sistemas de monitoreo fitosanitario permanentes que permitan la detección temprana de síntomas y la toma de decisiones oportuna. La integración de métodos de diagnóstico morfológico y molecular en laboratorios regionales fortalecerá la precisión en la identificación de los patógenos y evitará errores que conduzcan a un control ineficiente.
- El manejo debe orientarse a estrategias diferenciadas de acuerdo con el patógeno predominante. En el caso de *Phytophthora sp.*, resulta prioritario intervenir con fungicidas sistémicos de alta eficacia y corregir condiciones predisponentes como el exceso de humedad en el suelo. Para hongos necrotróficos como *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium sp.*, se recomienda combinar fungicidas de amplio espectro con prácticas que reduzcan heridas en mazorcas y daños mecánicos durante cosecha y manipulación. En cuanto a *Moniliophthora spp.*, se requiere reforzar la poda sanitaria, la eliminación de brotes afectados y el control del material infectado que actúa como reservorio de inóculo.
- El ajuste de la sombra y la ventilación dentro del cultivo es una medida esencial para disminuir la incidencia y severidad de enfermedades, ya que reduce significativamente el tiempo de mojado foliar y limita el desarrollo de los patógenos en el microclima del dosel. De igual manera, se recomienda fortalecer la sanidad cultural mediante la remoción continua de frutos enfermos, brotes necróticos y residuos vegetales, así como la desinfección frecuente de herramientas para minimizar la propagación del inóculo entre plantas y lotes.

## Referencias bibliográficas

- Abbas, A., Mubeen, M., Sohail, M. A., Solanki, M. K., Hussain, B., Nosheen, S., Kashyap, B. K., Zhou, L., & Fang, X. (2022). Root rot a silent alfalfa killer in China: Distribution, fungal, and oomycete pathogens, impact of climatic factors and its management. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 961794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.961794>
- Adeniyi, D. O., & Asogwa, E. U. (2022). Complexes and diversity of pathogens and insect pests of cocoa tree. En *Elsevier eBooks* (pp. 285-311). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-18694-3.00002-x>
- Adeniyi, D. O., & Asogwa, E. U. (2023). Complexes and diversity of pathogens and insect pests of cocoa tree. En *Forest Microbiology* (pp. 285–311). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18694-3.00002-X>
- Adeoyo, O. R., & Eweola, E. F. (2024). Control of fungal contaminants on cocoa pods obtained from akungba and ogbagi akoko. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*, *12*(2), 1–6. <https://doi.org/10.54987/jemat.v12i2.1002>
- Akoutou Mvondo, E., Dzokouo Dzoyem, C. U., Bissohon, M., Bidzanga Nomo, L., Bella Manga, F., Ambang, Z., Cilas, C., & Ndo, E. G. D. (2024). Microclimatic variations in cocoa-based agroforestry systems affect citrus Phytophthora foot rot disease intensity. *Agroforestry Systems*. <https://doi.org/10.1007/s10457-024-00954-3>
- Alcântara, G. D. M., Silva, G. B., Ocampo, I. Y. M., Kroger, A. A., de Oliveira, R. S., Gramacho, K. P., Pirovani, C. P., & Alvim, F. C. (2025). Proteomic analyzes of plants with BiP Overexpression reveal mechanisms related to defense against *Moniliophthora perniciosa*. En *Preprints*. <https://doi.org/10.20944/preprints202501.0003.v1>
- Alnefaie, R. M., El-Sayed, S. A., Ramadan, A. A., Elmezien, A. I., El-Taher, A. M., Randhir, T. O., & Bondok, A. (2023). Physiological and anatomical responses of Faba bean plants infected with chocolate spot disease to chemical inducers. *Life (Basel, Switzerland)*, *13*(2), 392. <https://doi.org/10.3390/life13020392>
- Alster, C. J., Allison, S. D., Johnson, N. G., Glassman, S. I., & Treseder, K. K.

- (2021). Phenotypic plasticity of fungal traits in response to moisture and temperature. *ISME Communications*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00045-9>
- Alvarado, J., Restrepo-Arias, J. F., Velásquez, D., & Maiza, M. (2025). Disease detection on cocoa crops based on computer-vision techniques: A Systematic Literature Review. *Agriculture*, 15(10), 1032. <https://doi.org/10.3390/agriculture15101032>
- Alvarez-Romero, P. I., Román Robalino, D. A., Salazar Castañeda, E., Suárez-Cedillo, S., Hinojosa, L., & Tiburcia Amorin Ferreira e Ferreira, A. F. (2024). Diversity and composition of fungal communities associated with cacao (*Theobroma cacao* L.) fruits in the northern Ecuadorian Amazon. En *Preprints*. <https://doi.org/10.20944/preprints202412.0400.v1>
- Alvarez-Romero, P. I., Román-Robalino, D. A., Salazar-Castañeda, E. P., Suárez-Cedillo, S. E., Hinojosa-Sánchez, L. A., Ferreira, A. F. T. A. F. e., & Gualpa-Calva, M. A. (2025). *Diversity and composition of endophytic fungal communities associated with cocoa (Theobroma cacao L.) fruits in the Northern Ecuadorian Amazon*. *International Journal of Plant Biology*, 16(1), 17. <https://doi.org/10.3390/ijpb16010017>
- Alvarez-Romero, P. I., Román-Robalino, D. A., Salazar-Castañeda, E. P., Suárez-Cedillo, S. E., Hinojosa-Sánchez, L. A., Ferreira, A. F. T. A. F. e., & Gualpa-Calva, M. A. (2025). Diversity and composition of endophytic fungal communities associated with cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits in the northern Ecuadorian Amazon. *International Journal of Plant Biology*, 16(1), 17. <https://doi.org/10.3390/ijpb16010017>
- Ameyaw, G. A., Domfeh, O., & Gyamera, E. (2023). Epidemiology and diagnostics of cacao swollen shoot disease in Ghana: Past research achievements and knowledge gaps to guide future research. *Viruses*, 16(1), 43. <https://doi.org/10.3390/v16010043>
- Anega, D., & Berihane, Z. (2024). Challenges, opprtunities and management of Faba bean chocolate spot (Botrytis.) disease in Ethiopia: Review. *American Journal of Chemical and Biochemical Engineering*, 8(2), 58–67. <https://doi.org/10.11648/j.ajcbe.20240802.13>
- Aquino, M. D. (2024). Identificación de hongos asociados a la madera de

- Nothofagus dombeyi y N. pumilio y su bioprospección como agentes útiles en la promoción del crecimiento vegetal y la generación de biocombustibles. <https://doi.org/10.35537/10915/177138>
- Arévalo-Gardini, E., Canto, M., Alegre, J., Arévalo-Hernández, C. O., Loli, O., Julca, A., & Baligar, V. (2020). Cacao agroforestry management systems effects on soil fungi diversity in the Peruvian Amazon. *Ecological Indicators*, 115(106404), 106404. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106404>
- Asman, A., Iwanami, T., Rosmana, A., Nasruddin, A., & Sjam, S. (2025). Pathogenicity of fungi associated with seedling wilting under *Xylosandrus compactus* infestation on *Theobroma cacao* in South Sulawesi, Indonesia. *Beverage plant research*, 5(1), 0–0. <https://doi.org/10.48130/bpr-0025-0014>
- Asman, A., Rosmana, A., Bailey, B. A., Ali, S. S., Iwanami, T., Sjam, S., Amin, N., & Kuswinanti, T. (2024). Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* isolated from cocoa dieback disease in South Sulawesi, Indonesia. *Journal of Phytopathology (1986)*, 172(4). <https://doi.org/10.1111/jph.13352>
- Bacelar, E., Pinto, T., Anjos, R., Morais, M. C., Oliveira, I., Vilela, A., & Cosme, F. (2024). Impacts of climate change and mitigation strategies for some abiotic and biotic constraints influencing fruit growth and quality. *Plants*, 13(14), 1942. <https://doi.org/10.3390/plants13141942>
- Bag, T. K., Dutta, P., Hubballi, M., Kaur, R., Mahanta, M., Chakraborty, A., Das, G., Katakya, M., & Waghunde, R. (2023). Destructive Phytophthora on orchids: current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1139811. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1139811>
- Bazzicalupo, A. (2022). Local adaptation in fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(6). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac026>
- Benjamin, J., Oyedokun, D. O., Oziegbe, E. V., Oni, J., Ogundare, E. B., Ujah, G. O., & Adebayo, A. (2024). Cereal production in Africa: the threat of current plant pathogens in changing climate-a review. *Discover Agriculture*, 2(1). <https://doi.org/10.1007/s44279-024-00040-3>

- Bhunjun, C. S., Phillips, A. J. L., Jayawardena, R. S., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). Importance of molecular data to identify fungal plant pathogens and guidelines for pathogenicity testing based on Koch's postulates. *Pathogens*, *10*(9), 1096. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091096>
- Bomdzele, E., Jr, y Molua, E. L. (2023). Assessment of the impact of climate and non-climatic parameters on cocoa production: a contextual analysis for Cameroon. *Frontiers in climate*, *5*(1069514). <https://doi.org/10.3389/fclim.2023.1069514>
- Bonilla, J. L. S., Lopes, U. V., Colmenero, A. Z., Valencia, B. B. M., Arrazate, C. H. A., & Gramacho, K. P. (2021). Estimation of genetic parameters associated with frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) and cacao production in Mexico. *Tree Genetics & Genomes*, *17*(3). <https://doi.org/10.1007/s11295-021-01498-8>
- Borjian Boroujeni, Z., Shamsaei, S., Yarahmadi, M., Getso, M. I., Salimi Khorashad, A., Haghighi, L., Raissi, V., Zareei, M., Saleh Mohammadzade, A., Moqarabzadeh, V., Soleimani, A., Raeisi, F., Mohseni, M., Mohseni, M. S., & Raiesi, O. (2021). Distribution of invasive fungal infections: Molecular epidemiology, etiology, clinical conditions, diagnosis and risk factors: A 3-year experience with 490 patients under intensive care. *Microbial Pathogenesis*, *152*(104616), 104616. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104616>
- Bradbury, R. S., Sapp, S. G. H., Potters, I., Mathison, B. A., Frean, J., Mewara, A., Sheorey, H., Tamarozzi, F., Couturier, M. R., Chiodini, P., & Pritt, B. (2022). Where Have All the Diagnostic Morphological Parasitologists Gone? *Journal Of Clinical Microbiology*, *60*(11). <https://doi.org/10.1128/jcm.00986-22>
- Brück, S. A. (2023). *Changes in microbiotic enzyme activity on soil organic matter decomposition, on an altitudinal gradient of the volcano Iliniza Ecuador, as a model for climate change impacts on carbon storage in Andean peatlands*. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA). <https://doi.org/10.11606/T.17.2023.tde-05062023-134940>

- Bryceson, S. R., Morgan, J. W., McMahon, P. J., & Keane, P. J. (2023). A sudden and widespread change in symptoms and incidence of vascular streak dieback of cocoa (*Theobroma cacao*) linked to environmental change in Sulawesi, Indonesia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 350(108466), 108466. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2023.108466>
- Buja, I., Sabella, E., Monteduro, A. G., Chiriaco, M. S., De Bellis, L., Luvisi, A., & Maruccio, G. (2021). Advances in plant disease detection and monitoring: From traditional assays to in-field diagnostics. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(6), 2129. <https://doi.org/10.3390/s21062129>
- Campbell, R. E., Wallis, D. R., & Walter, M. (2023). Methods for quantifying rain-splash dispersal of *Neonectria ditissima* conidia in apple canopies. *Frontiers in Horticulture*, 2(1242335). <https://doi.org/10.3389/fhort.2023.1242335>
- Carmona Rojas, L. M., Gutiérrez Rodríguez, E. A., Henao Ramirez, A. M., & Urrea Trujillo, A. I. (2022). Nutrition in cacao (*Theobroma cacao* L.) crops: What determining factors should be considered? *Revista de la Facultad de Agronomía*, 121(Especial 2), 101. <https://doi.org/10.24215/16699513e101>
- Carvajal-Rivera, A. S., Jaimes-Suárez, Y. Y., Guzmán-Plazola, R. A., Ortiz-García, C. F., & Sandoval-Islas, J. S. (2022). Temporal dynamics of witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*) in six cocoa clones with and without shading. *Journal of Plant Pathology: An International Journal of the Italian Phytopathological Society*, 104(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00963-6>
- Casals, C., Torres, R., Teixidó, N., De Cal, A., Segarra, J., & Usall, J. (2022). Brown rot on stone fruit: From epidemiology studies to the development of effective control strategies. *Scientia Horticulturae*, 301(111096), 111096. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111096>
- Castañeda-Ccori, J., Bilhaut, A., Mazé, A., & Fernández-Manjarrés, J. (2020). Unveiling Cacao Agroforestry Sustainability through the Socio-Ecological Systems Diagnostic Framework: The Case of Four Amazonian Rural Communities in Ecuador. *Sustainability*, 12(15),

5934. <https://doi.org/10.3390/su12155934>
- Castillo, H. E., Valdes, Y. D., Rodriguez, C., Rojas, E. I., Gutiérrez, M., & Mejia, L. C. (2025). The Interplay of *Theobroma cacao* Genetics and Its Pod-Mycobiome on Controlling Pathogenic Fungus *Moniliophthora roreri*. *Phytobiomes Journal*, *PBIOMES-02-25-0009-R*. <https://doi.org/10.1094/pbiomes-02-25-0009-r>
- Cedeño Moreira, Á. V., Romero Meza, R. F., Auhing Arcos, J. A., Mendoza León, A. F., Abasolo Pacheco, F., & Canchignia Martínez, H. F. (2020). Characterization of *Phytophthora* spp. and application of rhizobacteria with biocontrol potential in black pod disease in *Theobroma cacao* variety CCN-51. *Scientia agropecuaria*, *11*(4), 503–512. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.05>
- Cedeño-Moreira, A. V., Vásquez-Cortez, L. H., Espinoza-Guerra, Í. F., Mestanza-Uquillas, C. A., Plua-Montiel, J. A., Rodríguez-Cevallos, S. L., Godoy-Montiel, L. A., Carrillo-Freire, D. M., (2025). Actividad promotora del crecimiento vegetal de cepas de *Bacillus* spp. en frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *28*(2). <https://doi.org/10.31910/rudca.v28.n2.2025.2850>
- Chaithra, M., Shivakumar, K. V., Mahesha, H. S., & Nayak, A. M. (2025). *Phytophthora*. En *Compendium of Phytopathogenic Microbes in Agro-Ecology* (pp. 571–607). Springer Nature Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-81770-0\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-031-81770-0_25)
- Challenge of Climate Change. *Journal Of Fungi*, *7*(3), 202. <https://doi.org/10.3390/jof7030202>
- Chethana, K. W. T., Manawasinghe, I. S., Hurdeal, V. G., Bhunjun, C. S., Appadoo, M. A., Gentekaki, E., Raspé, O., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). What are fungal species and how to delineate them? *Fungal Diversity*, *109*(1), 1-25. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00483-9>
- Chóez-Guaranda, I., Espinoza-Lozano, F., Reyes-Araujo, D., Romero, C., Manzano, P., Galarza, L., & Sosa, D. (2023). Chemical characterization of *Trichoderma* spp. Extracts with antifungal activity against cocoa pathogens. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *28*(7), 3208. <https://doi.org/10.3390/molecules28073208>

- Çiftçi, O., Özer, G., Türkölmez, Ş., & Derviş, S. (2023). Lasiodiplodia theobromae and Neoscytalidium dimidiatum associated with grafted walnut (Juglans regia L.) decline in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection: Scientific Journal of the German Phytomedical Society (DPG)*, 130(5), 1117–1128. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00745-5>
- Cilas, C., y Bastide, P. (2020). Challenges to cocoa production in the face of climate change and the spread of pests and diseases. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1232. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091232>
- Coelho, I. L., de Assis, T. C., Ferraz, L. G. B., de Souza Freitas, M. T., de Queiroz Balbino, V., dos Santos Vieira, W. A., Neves, R. P., Doyle, V. P., Câmara, M. P. S., & Laranjeira, D. (2022). Lasiodiplodia species diversity associated with coconut leaf blight and stem-end rot in Northeastern Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 162(1), 45–61. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02383-9>
- Coleine, C., Stajich, J. E., & Selbmann, L. (2022). Fungi are key players in extreme ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution*, 37(6), 517–528. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.02.002>
- Collinge, D. B., Jensen, D. F., Rabiey, M., Sarrocco, S., Shaw, M. W., & Shaw, R. H. (2022). Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction? *Plant Pathology*, 71(5), 1024–1047. <https://doi.org/10.1111/ppa.13555>
- Corkley, I., Fraaije, B., & Hawkins, N. (2022). Fungicide resistance management: Maximizing the effective life of plant protection products. *Plant Pathology*, 71(1), 150–169. <https://doi.org/10.1111/ppa.13467>
- Da Silva Estrela Junior, A., Solís, K., Sobrinho, C. C. de M., Garzón, A. I., Peñaherrera, S., Vera, D. I., Solís Bonilla, J. L., Moraes, W. B., Laranjeira, D., & Gramacho, K. P. (2023). Viability of Moniliophthora roreri on cocoa beans under microfermentation and long-term survival on carrier materials. *Plant Disease*, 107(11), 3497–3505. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-22-2630-RE>
- De Novais, D. P. S., Batista, T. M., Costa, E. A., & Pirovani, C. P. (2023). Genomic and pathogenicity mechanisms of the main *Theobroma cacao* L.

- eukaryotic pathogens: A systematic review. *Microorganisms*, 11(6), 1567. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061567>
- De Oliveira Santos, T. L., Da Silva, F. L. A. T., Da Silva, D. A. D., & Efraim, P. (2025). Exploring the Research Evolution of Cacao Diseases Over the Past Two Decades: A Review. *Plant Pathology*, 74(6), 1470-1494. <https://doi.org/10.1111/ppa.14121>
- Delgadillo-Duran, P., Berdugo-Cely, J. A., Mejía-Salazar, J., Pérez-Zúñiga, J. I., & Yockteng, R. (2024). Exploring the diversity and ancestry of fine-aroma cacao from Tumaco, Colombia. *Diversity*, 16(12), 754. <https://doi.org/10.3390/d16120754>
- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernández, J. B., Chaves-López, C., Romanazzi, G., & Paparella, A. (2021). The role of fungi in the cocoa production chain and the challenge of climate change. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(3), 202. <https://doi.org/10.3390/jof7030202>
- Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Aime, M. C. (2020). The history of cacao and its diseases in the Americas. *Phytopathology*, 110(10), 1604–1619. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
- Díaz-Valderrama, J. R., Zambrano, R., Cedeño-Amador, S., Córdova-Bermejo, U., Casas, G. G., García-Zurita, N., Sánchez-Arévalo, J. A. J., Arévalo-Gardini, E., Dávila, D., Ruiz, J., Pinchi-Dávila, X., Quispe-Chacón, Z. R., Chia-Wong, J. A., Hurtado-Gonzales, O. P., Rodríguez-Callañaupa, C. A., Maldonado-Fuentes, C., Pérez-Callizaya, E., Leiva-Espinoza, S., Oliva-Cruz, M., ... Aime, M. C. (2022). Diversity in the invasive cacao pathogen *Moniliophthora roreri* is shaped by agriculture. *Plant Pathology*, 71(8), 1721–1734. <https://doi.org/10.1111/ppa.13603>
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Ahmed, A. I., Mahmood, M., El-Tahan, A. M., Ebrahim, A. A. M., Abd El-Mageed, T. A., Negm, S. H., Selim, S., Babalghith, A. O., Elrys, A. S., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2022). Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 13, 923880. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923880>

- Esan, V. I., Oke, G. O., Olaide, A., Ayoola, M. O., Obisesan, I. A., & Oluranti, O. O. (2025). Knowledge on potential, production, and achievements of cocoa ( *Theobroma cacao* ) in Nigeria: Past, current status, and perspective. *CABI Agriculture And Bioscience*. <https://doi.org/10.1079/ab.2025.0028>
- Escobar, S., Santander, M., Useche, P., Contreras, C., & Rodríguez, J. (2020). Aligning Strategic Objectives with Research and Development Activities in a Soft Commodity Sector: A Technological Plan for Colombian Cocoa Producers. *Agriculture*, 10(5), 141. <https://doi.org/10.3390/agriculture10050141>
- Espinoza-Lozano, F., Amaya-Márquez, D., Pinto, C. M., Villavicencio-Vásquez, M., Sosa del Castillo, D., & Pérez-Martínez, S. (2022). Multiple introductions of *Moniliophthora roreri* from the Amazon to the Pacific region in Ecuador and shared high azoxystrobin sensitivity. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 12(5), 1119. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051119>
- Ferreira de Souza, J. F., Romulo da Silva França, K., Machado de Medeiros Ferro, M., Figueredo de Oliveira Costa, J., Assunção, I. P., Silvestre de Andrade Lima, G., de Alcântara Neto, F., da Silva Matos, K., & Pereira de Melo, M. (2025). *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia brasiliensis* associated with dieback and canker in cupuaçu trees (*Theobroma grandiflorum*) in Brazil. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 139(102759), 102759. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102759>
- Fister, A. S., Leandro-Muñoz, M. E., Zhang, D., Marden, J. H., Tiffin, P., dePamphilis, C., Maximova, S., & Guiltinan, M. J. (2020). Widely distributed variation in tolerance to *Phytophthora palmivora* in four genetic groups of cacao. *Tree Genetics & Genomes*, 16(1). <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1396-8>
- Furtado, E. L., de Jesus Junior, W. C., & Moraes, W. B. (2020). Forest diseases in Brazil: Status and management. En *Forest Pest and Disease Management in Latin America* (pp. 211–230). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35143-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35143-4_14)
- Furtado, E. L., de Jesus Junior, W. C., & Moraes, W. B. (2020). Forest diseases in Brazil: Status and management. En *Forest Pest and Disease*

*Management in Latin America* (pp. 211–230). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1354042>

- Garcés-Fiallos, F. R., Moreira-Morrillo, A. A., Vera-Coello, D. I., Solís-Hidalgo, Z. K., Canchignia-Martínez, H. F., & Cedeño-Moreira, Á. V. (2024). Cacao diseases caused by fungi and fungi-like in Latin American agrosystems. En *Sustainable Cacao Cultivation in Latin America* (pp. 143–167).
- George, M. E., Gaitor, T. T., Cluck, D. B., Henao-Martínez, A. F., Sells, N. R., & Chastain, D. B. (2025). The impact of climate change on the epidemiology of fungal infections: implications for diagnosis, treatment, and public health strategies. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 12, 20499361251313841. <https://doi.org/10.1177/20499361251313841>
- Grabka, R., D'Entremont, T. W., Adams, S. J., Walker, A. K., Tanney, J. B., Abbasi, P. A., & Ali, S. (2022). Fungal Endophytes and Their Role in Agricultural Plant Protection against Pests and Pathogens. *Plants*, 11(3), 384. <https://doi.org/10.3390/plants11030384>
- Harish, J., Jambhulkar, P. P., Bajpai, R., Arya, M., Babele, P. K., Chaturvedi, S. K., Kumar, A., & Lakshman, D. K. (2023). Morphological characterization, pathogenicity screening, and molecular identification of *Fusarium* spp. isolates causing post-flowering stalk rot in maize. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1121781. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1121781>
- Hernández-Núñez, H. E., Gutiérrez-Montes, I., Bernal-Núñez, A. P., Gutiérrez-García, G. A., Suárez, J. C., Casanoves, F., & Flora, C. B. (2022). Cacao cultivation as a livelihood strategy: contributions to the well-being of Colombian rural households. *Agriculture and Human Values*, 39(1), 201–216. <https://doi.org/10.1007/s10460-021-10240-y>
- Huaman-Pilco, J., Huaman-Pilco, Á. F., Hernández-Díaz, E., Oliva-Cruz, S. M., & Díaz-Valderrama, J. R. (2024). Dieback and pod rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *L. iraniensis* in native accessions of cacao (*Theobroma cacao*) from Amazonas, Peru. *Indian Phytopathology*. <https://doi.org/10.1007/s42360-024-00771-9>
- Huda-Shakirah, A. R., Mohamed Nor, N. M. I., Zakaria, L., Leong, Y.-H., & Mohd, M. H. (2022). *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in

- Malaysia. *Scientific Reports*, 12(1), 8966. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13057-9>
- Huda-Shakirah, A. R., Zakaria, L., & Mohd, M. H. (2024). Morphology, phylogeny and pathogenicity of fungal species associated with leaf blight and stem canker of *Theobroma cacao* in Malaysia. *Plant Pathology*, 73(6), 1382–1399. <https://doi.org/10.1111/ppa.13900>
- Imran, H. M., Malik, M. T., Mustafa, G., Hakim, F., & Waheed, A. (2025). Dynamics of disease infestation under changing climate—impact and future perspectives. En *Climate Change and Mango Production* (pp. 803–818). Springer Nature Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-87035-4\\_31](https://doi.org/10.1007/978-3-031-87035-4_31)
- Islam, T., Danishuddin, N., Tamanna, N. T., Matin, M. N., Barai, H. R., & Haque, M. A. (2024). Resistance Mechanisms of Plant Pathogenic Fungi to Fungicide, Environmental Impacts of Fungicides, and Sustainable Solutions. *Plants*, 13(19), 2737. <https://doi.org/10.3390/plants13192737>
- Jaimes-Suárez, Y. Y., Carvajal-Rivera, A. S., Galvis-Neira, D. A., Carvalho, F. E. L., & Rojas-Molina, J. (2022). Cacao agroforestry systems beyond the stigmas: Biotic and abiotic stress incidence impact. *Frontiers in Plant Science*, 13, 921469. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.921469>
- Jaimez, R. E., Barragan, L., Fernández-Niño, M., Wessjohann, L. A., Cedeño-García, G., Sotomayor Cantos, I., & Arteaga, F. (2022). *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. *PeerJ*, 10(e12676), e12676. <https://doi.org/10.7717/peerj.12676>
- Jiang, S., Hu, L., Rui, Z., Wang, D., Zhang, L., Zhou, J.-J., & Chen, Z. (2025). *Lasiodiplodia theobromae*, a pathogen of plants and humans, spreading to new crop hosts globally. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(34), 21223–21234. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c04070>
- Jiménez, D. L., Alvarez, J. C., & Mosquera, S. (2022). Frosty pod rot: a major threat to cacao plantations on the move. *Tropical Plant Pathology*, 47(2), 187–200. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00472-y>
- Jones, E. B. G., Ramakrishna, S., Vikineswary, S., Das, D., Bahkali, A. H., Guo, S.-Y., & Pang, K.-L. (2022). How do fungi survive in the sea and respond to

climate change? *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(3), 291.  
<https://doi.org/10.3390/jof8030291>

Jones, E. B. G., Ramakrishna, S., Vikineswary, S., Das, D., Bahkali, A. H., Guo, S.-Y., & Pang, K.-L. (2022). How do fungi survive in the sea and respond to climate change? *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(3), 291.  
<https://doi.org/10.3390/jof8030291>

Kaur, L., & Sharma, S. G. (2021). Identification of plant diseases and distinct approaches for their management. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00627-6>

Khan, A. H., Hassan, M., & Khan, M. N. (2020). Conventional plant breeding program for disease resistance. In *Sustainability in Plant and Crop Protection* (pp. 27–51). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3_3)

Kongor, J. E., Owusu, M., & Oduro-Yeboah, C. (2024). Cocoa production in the 2020s: challenges and solutions. *CABI Agriculture and Bioscience*, 5(1).  
<https://doi.org/10.1186/s43170-024-00310-6>

Kumar, R., Das, S. P., Choudhury, B. U., Kumar, A., Prakash, N. R., Verma, R., Chakraborti, M., Devi, A. G., Bhattacharjee, B., Das, R., Das, B., Devi, H. L., Das, B., Rawat, S., & Mishra, V. K. (2024). Advances in genomic tools for plant breeding: harnessing DNA molecular markers, genomic selection, and genome editing. *Biological Research*, 57(1), 80.  
<https://doi.org/10.1186/s40659-024-00562-6>

Lendahl, U., Muhl, L., & Betsholtz, C. (2022). Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. *Nature Communications*, 13(1), 3409.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-30633-9>

Li, J., Xiang, T., & He, L. (2021). Modeling epidemic spread in transportation networks: A review. *Journal of Traffic and Transportation Engineering (English Edition)*, 8(2), 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.jtte.2020.10.003>

Lim, J. A., Yaacob, J. S., Mohd Rasli, S. R. A., Eyahmalay, J. E., El Enshasy, H. A., & Zakaria, M. R. S. (2023). Mitigating the repercussions of climate change on diseases affecting important crop commodities in Southeast

Asia, for food security and environmental sustainability—A review. *Frontiers in sustainable food systems*, 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.1030540>

Lin, P., Kook, M., Yi, T., & Yan, Z. (2023). Current Fungal Taxonomy and Developments in the Identification System. *Current Microbiology*, 80(12). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03514-7>

Lofgren, L. A., & Stajich, J. E. (2021). Fungal biodiversity and conservation mycology in light of new technology, big data, and changing attitudes. *Current Biology*, 31(19), R1312-R1325. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.083>

López-García, N. (2024). *Forest Phytophthora – ecology, diversity and management*. Swedish University of Agricultural Sciences. <https://doi.org/10.54612/a.4p1n97bp4k>

Łysiak, G. P., & Szot, I. (2023). The use of temperature based indices for estimation of fruit production conditions and risks in temperate climates. *Agriculture*, 13(5), 960. <https://doi.org/10.3390/agriculture13050960>

Maharachchikumbura, S. S. N., Chen, Y., Ariyawansa, H. A., Hyde, K. D., Haelewaters, D., Perera, R. H., Samarakoon, M. C., Wanasinghe, D. N., Bustamante, D. E., Liu, J., Lawrence, D. P., Cheewangkoon, R., & Stadler, M. (2021b). Integrative approaches for species delimitation in Ascomycota. *Fungal Diversity*, 109(1), 155-179. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00486-6>

Mahlein, A.-K., Arnal Barbedo, J. G., Chiang, K.-S., Del Ponte, E. M., & Bock, C. H. (2024). From detection to protection: The role of optical sensors, robots, and artificial intelligence in modern plant disease management. *Phytopathology*, 114(8), 1733–1741. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-24-0009-PER>

Maitra, S., Praharaj, S., Brestic, M., Sahoo, R. K., Sagar, L., Shankar, T., Palai, J. B., Sahoo, U., Sairam, M., Pramanick, B., Nath, S., Venugopalan, V. K., Skalický, M., & Hossain, A. (2023). Rhizobium as biotechnological tools for green solutions: An environment-friendly approach for sustainable crop production in the modern era of climate change. *Current Microbiology*, 80(7), 219. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03317-w>

- Menezes, F. D. S., Mucherino-Muñoz, J. J., Ferreira, C. A., Da Silva Chaves, S. F., Barbosa, C., Lemos, L. S. L., Jordana, N., Carvalho, M., Pires, J. L., Silva, R. J. S., Gramacho, K. P., Alves, R. M., Corrêa, R. X., & Micheli, F. (2022). Genomic Designing for Biotic Stress Resistant Cocoa Tree. En Springer eBooks (pp. 49-113). [https://doi.org/10.1007/978-3-031-09293-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-031-09293-0_2)
- Monteiro Galvão, Í., Silva Pereira, G., & Sentelhas, P. C. (2022). Climatic risk zoning for potential occurrence of cacao moniliasis disease in Northeastern Brazil under the influence of ENSO phases. *Theoretical and Applied Climatology*, 149(1–2), 557–567. <https://doi.org/10.1007/s00704-022-04060-1>
- Moura, A. B., Backhouse, D., de Souza Júnior, I. T., & Gomes, C. B. (2022). Soilborne Pathogens. En *Subsoil Constraints for Crop Production* (pp. 199–224). [https://doi.org/10.1007/978-3-031-00317-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-031-00317-2_9)
- Nair, K. P. (2021). Technological advancements in coconut, Arecanut and cocoa research: A century of service to the global farming community by the central plantation crops research institute, kasaragod, Kerala state, India. En *Tree Crops* (pp. 377–536). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-62140-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-62140-7_11)
- Nascimento, L. L., Pereira, M. S., de Almeida, L. S., da Silveira Ferreira, L., de Moura Pita, B. L., de Souza, C. O., Ribeiro, C. D. F., & Fricks, A. T. (2024). Innovation in cocoa fermentation: Evidence from patent documents and scientific articles. *Fermentation*, 10(5), 251. <https://doi.org/10.3390/fermentation10050251>
- Ndoungué Djeumekop, M. M., Ngo Bieng, M.-A., Ribeyre, F., Bonnot, F., Cilas, C., Neema, C., & Ten Hoopen, G. M. (2021). Spatial and temporal analysis of *Phytophthora megakarya* epidemic in newly established cacao plantations. *Plant Disease*, 105(5), 1448–1460. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-2024-RE>
- Nelson, J. T., Motamayor, J. C., & Cornejo, O. E. (2021). Environment and pathogens shape local and regional adaptations to climate change in the

chocolate tree, *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology*, 30(3), 656–669.  
<https://doi.org/10.1111/mec.15754>

Nieves, M. C., Protacio, C. M., Edaño, M. L. S., Ocampo, E. T. M., & Laurena, A. C. (2024). Effect of paclobutrazol application on the phenological patterns of flowering, fruit production and Cherelle wilt incidence in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Crop protection newsletter*, 49(3), 25–33.  
<https://doi.org/10.63568/vol49iss3pp25-33>

Nieves-Orduña, H. E., Krutovsky, K. V., & Gailing, O. (2023). Geographic distribution, conservation, and genomic resources of cacao *Theobroma cacao* L. *Crop Science*, 63(4), 1750–1778.  
<https://doi.org/10.1002/csc2.20959>

Nikitin, D. A., Ivanova, E. A., Semenov, M. V., Zhelezova, A. D., Ksenofontova, N. A., Tkhakakhova, A. K., & Kholodov, V. A. (2023). Diversity, ecological characteristics and identification of some problematic phytopathogenic *Fusarium* in soil: A review. *Diversity*, 15(1), 49.  
<https://doi.org/10.3390/d15010049>

Novikova, I., & Titova, J. (2023). Antifungal activity of industrial *Bacillus* strains against *Mycogone perniciosa*, the causative agent of wet bubble disease in white button mushrooms. *Microorganisms*, 11(8), 2056.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11082056>

Ofori, A., Padi, F. K., Ameyaw, G. A., Dadzie, A. M., Opoku-Agyeman, M., Domfeh, O., & Ansah, F. O. (2022). Field evaluation of the impact of cocoa swollen shoot virus disease infection on yield traits of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in Ghana. *PloS One*, 17(1), e0262461.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262461>

Ofori, A., Padi, F. K., Amoako-Attah, I., Asare, E. K., Dadzie, A., & Bukari, Y. (2023). Genetic variation among cocoa (*Theobroma cacao* L.) families for resistance to black pod disease under field and laboratory conditions. *Ecological Genetics and Genomics*, 28(100182), 100182.  
<https://doi.org/10.1016/j.egg.2023.100182>

- Olivares, B. O., Rey, J. C., Lobo, D., Navas-Cortés, J. A., Gómez, J. A., & Landa, B. B. (2021). Fusarium wilt of bananas: A review of Agro-environmental factors in the Venezuelan production system affecting its development. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, *11*(5), 986. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050986>
- Olivares, B. O., Vega, A., Rueda Calderón, M. A., Montenegro-Gracia, E., Araya-Almán, M., & Marys, E. (2022). Prediction of banana production using epidemiological parameters of Black Sigatoka: An application with random forest. *Sustainability*, *14*(21), 14123. <https://doi.org/10.3390/su142114123>
- Oliveira Santos, T. L., Araújo Tavares da Silva, F. L., Araújo Dionízio da Silva, D., & Efraim, P. (2025). Exploring the research evolution of cacao diseases over the past two decades: A review. *Plant Pathology*, *74*(6), 1470–1494. <https://doi.org/10.1111/ppa.14121>
- Osorio Zambrano, M. A., Castillo, D. A., Rodríguez Pérez, L., & Terán, W. (2021). Cacao (*Theobroma cacao* L.) response to water stress: Physiological characterization and antioxidant gene expression profiling in commercial clones. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 700855. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.700855>
- Parawansa, A. K., Bryceson, S., Vandermark, E., Firmansyah, A. P., Purwantara, A., McMahon, P. J., & Keane, P. J. (2022). Severity and changed symptoms of vascular streak dieback caused by *Ceratobasidium theobromae* in several cocoa (*Theobroma cacao*) clones in Sulawesi, Indonesia. *Tropical Plant Pathology*, *47*(6), 754–769. <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00526-9>
- Pérez-Corral, D. A., Ornelas-Paz, J. de J., Olivas-Orozco, G. I., Acosta-Muñiz, C. H., Salas-Marina, M. Á., Berlanga-Reyes, D. I., Ruiz-Cisneros, M. F., & Rios-Velasco, C. (2022). Molecular, morphological and biochemical characterization of Actinomycetes and their antagonistic activity against phytopathogenic fungi. *Revista fitotecnia mexicana*, *45*(1), 103. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.1.103>
- Philippini, R. R., Martiniano, S. E., Franco Marcelino, P. R., Chandel, A. K., Dos Santos, J. C., & Da Silva, S. S. (2021). Production of  $\beta$ -glucan

exopolysaccharide lasiodiplodan by *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 from corn bran acid hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(6), 2319–2332. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11173-6>

Ploetz, R. C. (2007). Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology*, 97(12), 1634–1639. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1634>

Priyashantha, A. K. H., Karunarathna, S. C., Lu, L., & Tibpromma, S. (2023). Fungal endophytes: An alternative biocontrol agent against phytopathogenic fungi. *Encyclopedia*, 3(2), 759–780. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia3020055>

Ravishankar, L. V., Puranik, N., Lekkala, V. V. V., Lomada, D., Reddy, M. C., & Maurya, A. K. (2025). ZnO nanoparticles: Advancing agricultural sustainability. *Plants*, 14(15), 2430. <https://doi.org/10.3390/plants14152430>

Rehman, A. U., Sajjad, P., & Malik, M. T. (2025). Polyembryonic mango germplasm's reaction to symptoms development and resistance dynamics against notorious soil-borne fungi. In *Climate Change and Mango Production* (pp. 415–445). Springer Nature Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-87035-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-031-87035-4_18)

Reyes, B. M. D., Fonseca, P. L. C., Heming, N. M., Conceição, L. B. de A., Nascimento, K. T. de S., Gramacho, K. P., Arevalo-Gardini, E., Pirovani, C. P., & Aguiar, E. R. G. R. (2022). Characterization of the microbiota dynamics associated with *Moniliophthora roreri*, causal agent of cocoa frosty pod rot disease, reveals new viral species. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1053562. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1053562>

Rosmana, A., Sjam, S., Dewi, V. S., Asman, A., & Fhiqrah, M. (2022). Root and collar rot disease: a new threat to young cacao (*Theobroma cacao* L.) plants in Sulawesi, Indonesia. *Australasian Plant Pathology: APP*. <https://doi.org/10.1007/s13313-022-00878-5>

Sadenova, M., Kulenova, N., Gert, S., Beisekenov, N., & Levin, E. (2023). Innovative approaches for improving the quality and resilience of spring

barley seeds: The role of nanotechnology and phytopathological analysis. *Plants*, 12(22), 3892. <https://doi.org/10.3390/plants12223892>

Salazar, O. V., Latorre, S., Godoy, M. Z., & Quelal-Vásquez, M. A. (2023). The challenges of a sustainable cocoa value chain: A study of traditional and “fine or flavour” cocoa produced by the kichwas in the ecuadorian Amazon region. *Journal of Rural Studies*, 98, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2023.01.015>

Salvatore, M. M., Andolfi, A., & Nicoletti, R. (2020). The thin line between pathogenicity and endophytism: The case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture*, 10(10), 488. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100488>

Sankar, S. M., Singh, S. P., Prakash, G., Satyavathi, C. T., Soumya, S. L., Yadav, Y., Sharma, L. D., Rao, A. R., Singh, N., & Srivastava, R. K. (2021). Deciphering genotype-by-environment interaction for target environmental delineation and identification of stable resistant sources against foliar blast disease of pearl millet. *Frontiers in Plant Science*, 12, 656158. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.656158>

Santos Menezes, F., Mucherino-Muñoz, J. J., Ferreira, C. A., da Silva Chaves, S. F., Barbosa, C., Lemos, L. S. L., Jordana, N., Carvalho, M., Pires, J. L., Silva, R. J. S., Gramacho, K. P., Alves, R. M., Corrêa, R. X., & Micheli, F. (2022). Genomic designing for biotic stress resistant cocoa tree. In *Genomic Designing for Biotic Stress Resistant Technical Crops* (pp. 49–113).

Santos, A. S., Mora-Ocampo, I. Y., De Novais, D. P. S., Aguiar, E. R. G. R., & Pirovani, C. P. (2023). State of the Art of the Molecular Biology of the Interaction between Cocoa and Witches' Broom Disease: A Systematic Review. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(6), 5684. <https://doi.org/10.3390/ijms24065684>

Santos, A. S., Mora-Ocampo, I. Y., de Novais, D. P. S., Aguiar, E. R. G. R., & Pirovani, C. P. (2023). *State of the art of the molecular biology of the interaction between cocoa and witches' broom disease: A systematic review*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5684.

<https://doi.org/10.3390/ijms24065684>

Santos, A. S., Mora-Ocampo, I. Y., de Novais, D. P. S., Aguiar, E. R. G. R., & Pirovani, C. P. (2023). State of the art of the molecular biology of the interaction between cocoa and witches' broom disease: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5684. <https://doi.org/10.3390/ijms24065684>

Saravia-Matus, S. L., Rodríguez, A. G., & Saravia, J. A. (2020). Determinants of certified organic cocoa production: evidence from the province of Guayas, Ecuador. *Organic Agriculture*, 10(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/s13165-019-00248-4>

Sari, N. M., Munif, A., Widodo, & Purwantara, A. (2024). Management of cocoa plant pests & diseases in East Luwu Regency. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 30(1), 177–186. <https://doi.org/10.18343/jipi.30.1.177>

Schmidt, J. E., DuVal, A., Isaac, M. E., & Hohmann, P. (2022). At the roots of chocolate: understanding and optimizing the cacao root-associated microbiome for ecosystem services. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 42(2). <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00748-2>

Somarriba, E., Peguero, F., Cerda, R., Orozco-Aguilar, L., López-Sampson, A., Leandro-Muñoz, M. E., Jagoret, P., & Sinclair, F. L. (2021). Rehabilitation and renovation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) agroforestry systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41(5). <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00717-9>

Sousa Filho, H. R., Jesus, R. M., Bezerra, M. A., Santana, G. M., & Santana, R. O. (2021). History, dissemination, and field control strategies of cocoa witches' broom. *Plant Pathology*, 70(9), 1971–1978. <https://doi.org/10.1111/ppa.13457>

Stratigaki, M., Armirotti, A., Ottonello, G., Manente, S., & Traviglia, A. (2024). Fungal and bacterial species richness in biodeteriorated seventeenth century Venetian manuscripts. *Scientific Reports*, 14(1), 7003. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57228-2>

Suh, N. N., & Molua, E. L. (2022). Cocoa production under climate variability and farm management challenges: Some farmers' perspective. *Journal of*

*Agriculture and Food Research*, 8(100282), 100282.  
<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100282>

Talero-Sarmiento, L., ... (2024). *A data-driven approach to improve cocoa crop environmental factors in Colombia*. MDPI, 7(1), 6.  
<https://doi.org/10.3390/agriculture7010006>

Tapia, L., Castillo-Navales, D., Riquelme, N., Valencia, A. L., Larach, A., Cautín, R., & Besoain, X. (2025). Rainfall and high humidity influence the seasonal dynamics of spores of Glomerellaceae and Botryosphaeriaceae genera in avocado orchards and their fruit rot association. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 15(6), 1453. <https://doi.org/10.3390/agronomy15061453>

Thube, S. H., Pandian, R. T. P., Rajkumar, M., Babu, M., Josephraj Kumar, A., Santhoshkumar, Nirmal Kumar, B. J., Hegde, V., Patil, B., Rajashekara, H., Prabhulinga, T., Fand, B. B., Gawande, S., Nagrale, D., Devindrappa, M., & Rajesh, M. K. (2024). *Euwallacea perbrevis* (Schedl, 1951) and associated novel fungal symbiont, *Fusarium* sp.: A potential cause of wilting in cocoa, *Theobroma cacao* in India. *Crop Protection (Guildford, Surrey)*, 184(106754), 106754.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106754>

Tripathi, A., Rai, A., Dubey, S. C., Akhtar, J., & Kumar, P. (2021). DNA barcode, multiplex PCR and qPCR assay for diagnosis of pathogens infecting pulse crops to facilitate safe exchange and healthy conservation of germplasm. *Archives Of Microbiology*, 203(5), 2575-2589.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02259-w>

Vale, A. da S., Pereira, C. M. T., De Dea Lindner, J., Rodrigues, L. R. S., Kadri, N. K. E., Pagnoncelli, M. G. B., Kaur Brar, S., Soccol, C. R., & Pereira, G. V. de M. (2024). Exploring microbial influence on flavor development during coffee processing in humid subtropical climate through metagenetic-metabolomics analysis. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(12), 1871.  
<https://doi.org/10.3390/foods13121871>

Vasconcelos, A. A., José, J., Tokimatu, P. M., Camargo, A. P., Teixeira, P. J. P. L., Thomazella, D. P. T., do Prado, P. F. V., Fiorin, G. L., Costa, J. L., Figueira, A., Carazzolle, M. F., Pereira, G. A. G., & Baroni, R. M. (2021). Adaptive

- evolution of Moniliophthora PR-1 proteins towards its pathogenic lifestyle. *BMC Ecology and Evolution*, 21(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01818-5>
- Vera-Velez, R., ... (2024). *Optimizing pathogen control through mixed cocoa–plantain systems*. MDPI, 14(6), 1107. <https://doi.org/10.3390/agronomy14061107>
- Vera-Velez, R., Ramos-Veintimilla, R., & Grijalva-Olmedo, J. (2024). Optimizing pathogen control through mixed cocoa–plantain agroecosystems in the Ecuadorian coastal region. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 14(6), 1107. <https://doi.org/10.3390/agronomy14061107>
- Villacis, A., Alwang, J., & Barrera, V. (2022). Cacao value chains and credence attributes: lessons from Ecuador. *Journal of Agribusiness in Developing and Emerging Economies*, 12(4), 549–566. <https://doi.org/10.1108/jadee-10-2021-0267>
- Villacis, A., IDB Invest, Barrera, V., Alwang, J., Caicedo Vargas, C., & Quiroz, J. (2022). *Strategies to strengthen Ecuador’s high-value cacao value chain*. Inter-American Development Bank. <http://dx.doi.org/10.18235/0003960>
- Villamizar-Gallardo, R., Osma, J. F., & Ortíz-Rodríguez, O. O. (2019). Regional evaluation of fungal pathogen incidence in Colombian cocoa crops. *Agriculture*, 9(3), 44. <https://doi.org/10.3390/agriculture9030044>
- Vizuite-Montero, M., Figueroa -Saavedra, H., Torres -Castillo, R., & Chaglla-Cango, M. (2025). Seasonal influence of shade on the disease incidence of *Moniliophthora perniciosa* in cocoa: longitudinal study. *Journal of Natural Pesticide Research*, 14(100162), 100162. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2025.100162>
- Wang, H. (2023). Epidemiology and control of Fungal Diseases in Crop Plants. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 13(9), 2327. <https://doi.org/10.3390/agronomy13092327>
- Wemheuer, F., Berkemann, D., Wemheuer, B., Daniel, R., Vidal, S., & Bisseleua Daghela, H. B. (2020). Agroforestry management systems drive the composition, diversity, and function of fungal and bacterial endophyte communities in *Theobroma cacao* leaves. *Microorganisms*, 8(3), 405.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8030405>

Yin, Y., Miao, J., Shao, W., Liu, X., Zhao, Y., & Ma, Z. (2023). Fungicide resistance: Progress in understanding mechanism, monitoring, and management. *Phytopathology*, 113(4), 707–718.

<https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-22-0370-KD>

Zakaria, L. (2022). Fungal and Oomycete diseases of minor tropical fruit crops. *Horticulturae*, 8(4), 323.

<https://doi.org/10.3390/horticulturae8040323>

Zakaria, L. (2023). Fusarium species associated with diseases of major tropical fruit crops. *Horticulturae*, 9(3), 322.

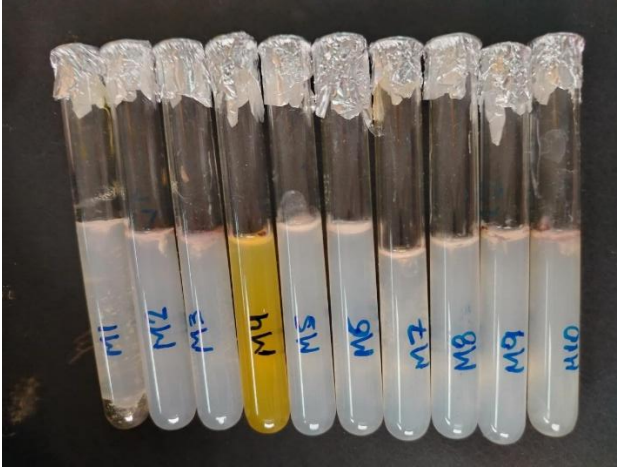
<https://doi.org/10.3390/horticulturae9030322>

Zhang, L., Lv, C., Guo, W., & Li, Z. (2024). Temperature and humidity as drivers for the transmission of zoonotic diseases. *Animal Research And One Health*, 2(3), 323-336. <https://doi.org/10.1002/aro2.75>

Zhou, C., Wang, S., Wang, C., Qiang, N., Xiu, L., Hu, Q., Wu, W., Zhang, X., Han, L., Feng, X., Zhu, Z., Shi, L., Zhang, P., & Yin, K. (2024). Integrated surveillance and early warning system of emerging infectious diseases in china at community level: current status, gaps and perspectives. *Science In One Health*, 4, 100102. <https://doi.org/10.1016/j.soh.2024.100102>

## Anexos

### Anexo 1. Conservación de muestras



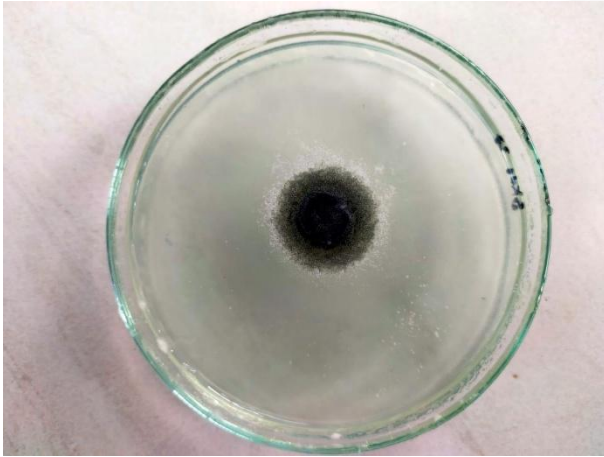
### Anexo 2. Preparación de medios de cultivo



### Anexo 3. Observación de estructuras microscópicas



**Anexo 4. Inhibición microbiana**



**Anexo 5. Crecimiento Fúngico**



**Anexo 6. Crecimiento *Lasiodiplodia***



**Anexo 7. Crecimiento *Fusarium***

