



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Identificación y distribución de *Phytophthora* spp., agente causante de la Pudrición negra del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Amazonia Noroccidental

July Andrea Rojas Castillo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2024

Identificación y distribución de *Phytophthora* spp., agente causante de la Pudrición negra del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Amazonia Noroccidental

July Andrea Rojas Castillo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director:

Ph.D. Edwison Alberto Rojas Triviño

Codirectores:

Ph.D. Fausto Andrés Ortiz Morea

Ph.D. Nora Cristina Mesa Cobo

Línea de Investigación:

Protección de Cultivos

Grupo de Investigación:

Agroecosistemas y Conservación en Bosques Amazónicos - GAIA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

2024

Dedicatoria

A mis abuelos,

*María Gledys Vergaño Lamprea,
Elías Castillo Galindo,*

Doy gracias al Dios del cielo por hacerlos parte de mi vida y brindarme su apoyo incondicional. Los amo con todo mi corazón. Gracias por creer en mis capacidades y ayudarme a ser la profesional que siempre soñé.

*“Porque Jehová da la sabiduría,
Y de su boca viene el conocimiento y la
inteligencia”*

Proverbios 2: 6-7

Agradecimientos

A mi amado Dios, por brindarme esta oportunidad y los medios para lograrlo, es mi guía y fortaleza en todo tiempo.

A mi esposo Arnold Castillo, por contribuir su tiempo, experiencias en campo y conocimientos previos para el desarrollo de la investigación, ayudándome a cumplir con esta meta tan importante para mí.

A mi hijo Martín Elías Castillo, por su comprensión y paciencia en aquel tiempo limitado.

A mi familia Castillo Vergaño y a la familia Castillo Pérez, su ayuda llegó siempre en el momento indicado.

A mis directores, Alberto Rojas y Fausto Ortiz por el tiempo y conocimientos compartidos, han sido parte fundamental en mi formación.

A mi amiga Esther Quiceno, por su apoyo constante en lo académico y emocional.

A la Universidad de la Amazonia por brindarme el espacio en el centro de investigaciones científicas CIMAZ - Macagual y al laboratorio de Agrobiotecnología, para el desarrollo experimental de la investigación.

Resumen

Identificación y distribución de *Phytophthora* spp., agente causante de la Pudrición negra del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Amazonia Noroccidental

La caracterización de las especies de *Phytophthora* spp. que afectan cacao en función de los factores ambientales en la Amazonía es escasa. Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue comprender la distribución y diversidad morfológica y genética de *Phytophthora* spp. en temporada seca (Ts) y de lluvias (TII) en los municipios de Belén, La Montañita, El Paujil y El Doncello del departamento de Caquetá. En cada sitio de muestreo, fueron recolectadas las coordenadas geográficas, la incidencia de la enfermedad y muestras de frutos enfermos; a partir de los cuales, se obtuvieron aislados en agar CMA-PARPB y fueron purificados y, conservados en agar V8-RPBH. Los aislados fueron caracterizados morfológicamente siguiendo claves taxonómicas, y molecularmente con extracción de ADN total, amplificación, secuenciación y análisis filogenético de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y COX-I. La virulencia del patógeno fue caracterizada en frutos de los clones CCN51 y LUKER40. Se obtuvieron 114 aislados, distribuidos en siete morfotipos de esporangios y siete patrones coloniales, taxonómicamente identificados como *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* y *P. capsici*, sin embargo, filogenéticamente fue identificada *P. palmivora*, determinando incongruencias entre la variabilidad morfológica y molecular. La virulencia evidenció diferencias significativas entre temporadas y clones, observándose la mayor severidad en los aislados de Ts y menor susceptibilidad en el clon CCN 51. La incidencia de la enfermedad fue mayor en TII (10%), comparado con Ts (5,83%), adicionalmente, se observó el mayor tamaño de esporangios en Ts y mayor cantidad de esporangios en el gradiente entre 200 – 550 msnm en las dos temporadas. Este estudio reporta a *P. palmivora* como el agente causante de la Pudrición negra del fruto de cacao, así como, los hallazgos morfológicos, genéticos, patogénicos y ambientales que influyen sobre la identificación y el desarrollo de la enfermedad en cultivos de la Amazonía noroccidental.

Palabras clave: diversidad de especies, distribución de especies, incidencia, severidad, temporada climática.

Abstract

Identification and distribution of *Phytophthora* spp., the causative agent of black rot of cocoa fruit (*Theobroma cacao* L.) in the Northwestern Amazon

The characterization of the species of *Phytophthora* spp. that affect cocoa depending on environmental factors in the Amazon is scarce. Therefore, the objective of the research was to understand the distribution and morphological and genetic diversity of *Phytophthora* spp. in the dry season (Ts) and rainy season (TII) in the municipalities of Belén, La Montañita, El Paujil and El Doncello in the department of Caquetá. At each sampling site, geographical coordinates, disease incidence and samples of diseased fruits were collected; from which, isolates were obtained on CMA-PARPB agar and were purified and preserved on V8-RPBH agar. The isolates were characterized morphologically following taxonomic keys, and molecularly with total DNA extraction, amplification, sequencing and phylogenetic analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 and COX-I regions. The virulence of the pathogen was characterized in fruits of clones CCN51 and LUKER40. 114 isolates were obtained, distributed in seven sporangial morphotypes and seven colonial patterns, taxonomically identified as *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* and, *P. capsici*, however, phylogenetically *P. palmivora* was identified, determining inconsistencies between morphological and molecular variability. Virulence showed significant differences between seasons and clones, with the highest severity observed in the Ts isolates and the lowest susceptibility in the CCN 51 clone. The incidence of the disease was higher in TII (10%), compared to Ts (5.83%), additionally, the largest size of sporangia was observed in Ts and the greatest number of sporangia in the gradient between 200 – 550 meters above sea level in both seasons. This study reports *P. palmivora* as the causative agent of black rot of cocoa fruit, as well as the morphological, genetic, pathogenic, and environmental findings that influence the identification and development of the disease in crops in the northwestern Amazon.

Keywords: species diversity, species distribution, incidence, severity, climatic season.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas.....	XIII
Lista de abreviaturas.....	XIV
Introducción.....	1
1.1 Objetivo general.....	4
1.1.1 Objetivos específicos.....	4
1.2 Hipótesis.....	4
2. Preliminares de Investigación.....	5
2.1 Marco Teórico.....	5
2.1.1 El cultivo de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	5
▪ Origen.....	5
▪ Botánica.....	7
▪ Fenología.....	7
▪ Cacao a nivel mundial y nacional.....	8
▪ Situación del cacao en el departamento de Caquetá y municipios seleccionados como área de estudio.....	12
2.1.2 Patosistema <i>Theobroma cacao</i> - <i>Phytophthora</i> spp.....	13
▪ Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora</i> spp.....	14
▪ Ciclo patológico.....	15
▪ Sintomatología ocasionada por <i>Phytophthora</i> spp., en cacao.....	17
2.1.3 Identificación y diagnóstico de <i>Phytophthora</i> spp.....	19
▪ Identificación en campo.....	19
▪ Identificación morfológica.....	20
▪ Identificación molecular.....	23
3. Identificación molecular y morfológica de especies de <i>Phytophthora</i> asociadas a la Pudrición negra de frutos de cacao en municipios seleccionados del departamento de Caquetá.....	25
3.1 Materiales y métodos.....	25
3.1.1 Ubicación geográfica y colecta de material biológico.....	25
3.1.2 Aislamiento del Oomycete.....	27
▪ Técnicas de aislamiento de <i>Phytophthora</i>	27
▪ Purificación de cultivos y elaboración de monospóricos.....	28
▪ Conservación de aislados.....	29

3.1.3	Identificación molecular	29
▪	Extracción de ADN	29
▪	Amplificación de ADN extraído mediante PCR	30
▪	Preparación del cóctel de PCR.....	31
▪	Purificación de productos PCR y secuenciación.....	31
▪	Análisis de datos	32
3.1.4	Identificación morfológica	33
▪	Macroscópico:	33
▪	Microscópico:	33
▪	Análisis de datos	33
3.2	Resultados y discusión	34
3.2.1	Identificación molecular	34
3.2.2	Identificación morfológica	38
▪	Caracterización macroscópica.....	39
▪	Caracterización microscópica.....	42
▪	Dimensiones de las estructuras asexuales.....	46
4.	Caracterización de la patogenicidad y severidad <i>in vitro</i> de aislados de <i>Phytophthora</i> en frutos de cacao en el departamento de Caquetá	49
4.1	Materiales y métodos.....	49
4.1.1	Material vegetal de prueba	49
4.1.2	Inoculación.....	49
▪	Preparación de inóculo.....	49
▪	Preparación de material de prueba.....	50
▪	Análisis de datos	50
4.2	Resultados y discusión	51
5.	Determinar la distribución e incidencia de especies de <i>Phytophthora</i> en municipios seleccionados del departamento de Caquetá	55
5.1	Materiales y métodos.....	55
5.1.1	Georreferenciación y procesamiento de coordenadas.....	55
5.1.2	Determinación de la incidencia.....	55
▪	Incidencia.....	56
▪	Análisis de datos	56
5.2	Resultados y discusión	56
6.	Conclusiones y recomendaciones.....	63
6.1	Conclusiones	63
6.2	Recomendaciones	64
A.	Anexo: Etapas de crecimiento fenológico de las plantas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.): Codificación y descripción según la escala BBCH	65
B.	Anexo: Protocolo de extracción de ADN	71
C.	Anexo: Códigos de acceso a GenBank de secuencias utilizadas para la construcción de árboles filogenéticos	73
	Referencias.....	75

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Diferenciación geográfica y genética poblacional del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	6
Figura 2-2: Participación de producción de cacao en grano por continente	9
Figura 2-3: Top 10 de países productores de granos de cacao a nivel mundial.....	10
Figura 2-4: Departamentos de mayor producción de granos de cacao en Colombia	11
Figura 2-5: Producción de cacao en toneladas de los municipios seleccionados como área de estudio.....	13
Figura 2-6: Estructuras de reproducción y resistencia de <i>Phytophthora palmivora</i>	15
Figura 2-7: Ciclo patológico de <i>Phytophthora</i> spp., en cultivo de cacao.	16
Figura 2-8: Sintomatología ocasionada por <i>Phytophthora</i> spp., en frutos de cacao...	18
Figura 2-9: Síntomas y signos de la Pudrición negra del fruto de cacao, comparado al daño ocasionado por <i>Moniliophthora roreri</i> , agente causante de Moniliasis	20
Figura 2-10: Morfología característica de colonias de especies de <i>Phytophthora</i> en medio agar V8	22
Figura 2-11: Morfología característica de esporangios de especies de <i>Phytophthora</i> en medio agar V8.....	22
Figura 3-1: Ubicación geográfica de los municipios correspondientes al área de intervención	26
Figura 3-2: Primers y regiones a amplificadas de <i>Phytophthora</i> spp. aislada en la Amazonia Noroccidental – departamento de Caquetá.....	30
Figura 3-3: Árbol de Máxima verosimilitud con secuencias concatenadas.....	37
Figura 3-4: Aislados de <i>Phytophthora palmivora</i> ., provenientes de frutos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) en dos medios semiselectivos y montajes para microscopía.	39
Figura 3-5: Patrón morfológico de colonia de <i>P. palmivora</i> en medio V8-RPBH en Caquetá	40
Figura 3-6: Porcentajes de diferentes patrones morfológicos de <i>P. palmivora</i> identificados durante Temporada de Lluvias y Temporada Seca en Caquetá.....	41
Figura 3-7: Morfotipos de esporangios de <i>P. palmivora</i> identificados en Caquetá .	42
Figura 3-8: Distribución de los morfotipos de esporangios de <i>P. palmivora</i> en Caquetá	43
Figura 3-9: Morfología de esporangios con mayor distribución en temporada seca...	44

Figura 3-10:	Morfología de esporangios con mayor distribución en temporada de lluvias	45
Figura 3-11:	Dimensiones de los esporangios de <i>P. palmivora</i> en Caquetá.....	47
Figura 4-1:	Curva de progreso de la enfermedad en dos genotipos de cacao.....	52
Figura 4-2:	Diferencia de medias de pruebas de patogenicidad de <i>P. palmivora</i> en dos genotipos de cacao.	53
Figura 4-3:	Pruebas de patogenicidad en dos genotipos de cacao inoculados con aislados de dos temporadas climáticas de progreso de la enfermedad en dos genotipos de cacao.	54
Figura 5-1:	Distribución geográfica de <i>P. palmivora</i> en los sitios de muestreo en Caquetá en relación con la caracterización molecular.....	57
Figura 5-2	Distribución geográfica de <i>Phytophthora</i> spp. en los sitios de muestreo en Caquetá en relación con la caracterización morfológica.....	58
Figura 5-3:	Incidencia de <i>P. palmivora</i> en genotipos de cacao para dos temporadas climáticas en Caquetá.....	59
Figura 5-4:	Incidencia de <i>P. palmivora</i> con relación al gradiente altitudinal en las zonas de muestreo en el departamento de Caquetá.....	60
Figura 5-5:	Distribución de la cantidad de esporangios con relación a la temporada climática y los gradientes altitudinales.	61

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3-1: Consolidado de aislados totales por municipio y temporada	35
Tabla 3-2: Consolidado de información en los análisis filogenéticos para cada región...	36
Tabla 3-3: Porcentajes de participación por morfotipo en los municipios objeto de estudio	45
Tabla 3-4: Diferencia de medias entre las dimensiones de los esporangios de <i>P. palmivora</i>	46
Tabla 4-1: Severidad de <i>Phytophthora palmivora</i> en dos temporadas climáticas en tres gradientes altitudinales en Caquetá.....	51
Tabla 4-2: Diámetro de manchas necróticas ocasionadas por <i>Phytophthora palmivora</i> aislada en Caquetá en frutos desprendidos de dos clones de cacao a los cuatro, cinco, seis y siete días después de la inoculación.	53
Tabla 5-1: Incidencia de <i>Phytophthora palmivora</i> en dos temporadas climáticas en tres gradientes altitudinales en Caquetá.....	59

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>T_s</i>	Temporada seca
<i>T_{ll}</i>	Temporada de lluvias
<i>L</i>	Largo
<i>A</i>	Ancho
<i>TCD</i>	Tasa de crecimiento diario
<i>DM</i>	Diámetro máximo
<i>DDI</i>	Días después de inoculación

Introducción

El cacao es un árbol originario de la cuenca del río Amazonas, la cual comprende países como: Brasil, Ecuador, Perú y Colombia (Motamayor et al., 2008), esta planta es un cultivo de gran importancia económica, distribuido ampliamente a nivel mundial, con 11.535.884 hectáreas sembradas y una producción estimada de 5.580.432 ton/año (FAO, 2021), siendo el continente africano el mayor productor, aportando (4.174.163 ton/año), seguido por América (1.104.925 ton/año) y Asia - Oceanía (295.762 ton/año) (ICCO, 2023b; FAO, 2021). Los países con la mayor participación en producción de cacao son: Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Brasil, Ecuador, Camerún, Nigeria, Perú, República Dominicana y Colombia (FAO, 2021).

En Colombia, en el año 2021 se produjeron cerca de 70.205 toneladas de cacao, año en el que se registró la mayor producción de la historia en el país, aumentando 8,14% respecto al año 2020 (FEDECACAO, 2023), sin embargo, en el 2022 los cultivos se vieron afectados por intensas lluvias, disminuyendo 10,6% la producción, registrando un total de 62.158 toneladas (FEDECACAO, 2022). A pesar de este acontecimiento, el cacao continúa siendo una especie primordial del sistema agroforestal campesino, y un producto agrícola de gran relevancia económica, social y ambiental, ya que, 65.351 familias lo cultivan y se benefician económicamente de su producción (MADR, 2020), posicionándose como el quinto cultivo agroindustrial de mayor importancia para el país (DANE, 2020). Consolidándose como primer productor el departamento de Santander, seguido de Arauca, Antioquia, Tolima y, Huila, el departamento de Caquetá en la región Amazónica, aunque su producción no es significativa en la economía nacional, en los últimos 5 años ha aumentado cerca del 70%, pasando de 114 ton/año a 447 ton/año (FEDECACAO, 2023).

El cultivo de cacao se puede ver afectado por diversos factores, incluidos agentes bióticos causantes de enfermedades, los cuales se convierten en el principal factor

limitante (Delgado et al., 2021). Dentro de estas enfermedades, “la pudrición negra del fruto”, ocasionada por *Phytophthora* spp., es reportada como una de las más severas, ya que, afecta directamente el fruto, órgano de interés agronómico y comercial (Cárdenas et al., 2017), igualmente, provoca chancros en el tallo y, tizón en hojas, ocasionando pérdidas estimadas del 25% de la producción mundial de cacao (D. Adeniyi, 2019).

El fitopatógeno *Phytophthora* spp., ha sido categorizado como uno de los oomycetos más devastadores (Surujdeo et al., 2016). Hasta la fecha se describen cerca de 281 especies de *Phytophthora* (MYCOBANK, 2023), pero solo unas pocas son de gran preocupación económica para la industria del cacao (Francine, 2020). La historia, la biología y el control de este patógeno, son examinados realizando estudios de su diversidad genética, sintomatología, las medidas de control y la detección de resistencia de estos patógenos (B. A. Bailey & Meinhardt, 2016).

La identificación taxonómica de especies de *Phytophthora* spp. se ha realizado tradicionalmente con caracteres morfológicos (Yang et al., 2017), sin embargo, el género comparte notables similitudes entre especies en clados filogenéticamente divergentes, por lo tanto, para lograr identificar especies asertivamente es necesario aplicar técnicas de identificación molecular (Brasier et al., 2022). Los primeros estudios sobre filogenia de *Phytophthora* sp. iniciaron en el año 2000, utilizando un número limitado de especies y se basaron principalmente en regiones de DNA ribosomal (DNAr), en la región espaciadora transcrita interna ITS1-5.8S- ITS2 (Cooke & Duncan, 1997; Förster et al., 2000) y genes mitocondriales, citocromo oxida 1 (COXI), (Martin & Tooley, 2003; Robideau et al., 2011).

Las especies de *Phytophthora* que afectan el cacao se distribuyen en cinco de los diez clados reconocidos, identificando las siguientes especies: Clado 1: *P. nicotianae*, Clado 2: *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. tropicalis*, *P. theobromicola*, Clado 4: *P. palmivora*, *P. megakarya*, Clado 5: *P. heveae*, *P. katsurae*, Clado 6: *P. megasperma* (Yang et al., 2017; Decloquement et al., 2021; Francine, 2020), entre ellas, *P. palmivora* es cosmopolita en las regiones productoras de cacao en el mundo y causa las mayores pérdidas (S. S. Ali et al., 2017).

En Colombia, la especie *P. palmivora* fue identificada en los principales departamentos cacaoteros y *P. nicotianae* se ha reportado exclusivamente en Caldas, estas especies fueron identificadas mediante parámetros morfológicos y técnicas de biología molecular (C. Palacios, 2017; Ramírez et al., 2021). Por otra parte, en el departamento de Caquetá Ramírez et al., (2021) reportó una secuencia de *P. palmivora* aislada a partir del fruto, sin embargo, este reporte no contempló la distribución de este patógeno en el departamento en función de las temporadas climáticas.

Diferentes especies de *Phytophthora* patógenas en cacao presentan distintas capacidades de adaptación, por ejemplo, el cacao es el único huésped conocido de importancia económica para *P. megakarya* (Ali et al., 2017) y puede sobrevivir en suelo seco por más tiempo que otras especies, una característica que favorece su dispersión durante temporadas secas y se encuentra con mayor frecuencia en África Occidental (B. Bailey, 2016), mientras que *P. palmivora* tiene una amplia gama de huéspedes, capacidad de adaptabilidad a altas temperaturas, de crecimiento más rápido y es mayormente reportada en América Latina (S. S. Ali et al., 2017; B. Bailey, 2016; Puig et al., 2018).

Teniendo en cuenta la capacidad de adaptabilidad ante condiciones climáticas de algunas especies de *Phytophthora* spp. patógenas en cultivos de cacao y el desconocimiento de las especies causantes de la enfermedad en la Amazonia Noroccidental en función de los factores ambientales, es necesario conocer el comportamiento del patógeno en diferentes temporadas climáticas que brindan condiciones de variabilidad en los factores ambientales como la humedad relativa y la temperatura.

Por lo tanto, la presente investigación realizó muestreos en temporada seca y de lluvias, con el objetivo de identificar y caracterizar especies de *Phytophthora* spp. asociadas a la pudrición negra del fruto con técnicas de identificación morfológica y los marcadores moleculares ITS y COXI, así mismo, conocer su distribución, virulencia, incidencia y severidad en los municipios de Belén de los Andaquíes, La Montañita, El Paujil y, El Doncello en Caquetá, territorio que ha priorizado el cultivo de cacao como una alternativa para brindar mejores oportunidades a las familias y, sustitución de cultivos ilícitos.

1.1 Objetivo general

Caracterizar la(s) especie(s) de *Phytophthora* spp. causante de la Pudrición negra del fruto de cacao en la Amazonia Noroccidental.

1.1.1 Objetivos específicos

- Identificar molecular y morfológicamente especies de *Phytophthora* spp. asociadas a la Pudrición negra de frutos de cacao en municipios seleccionados del departamento de Caquetá.
- Caracterizar la patogenicidad y severidad *in vitro* de aislados de *Phytophthora* spp. en frutos de cacao en el departamento de Caquetá.
- Determinar la distribución e incidencia de especies de *Phytophthora* spp. en municipios seleccionados del departamento de Caquetá.

1.2 Hipótesis

- *Phytophthora palmivora* será identificada como la especie causante de la Pudrición negra del fruto de cacao en las zonas productoras de la Amazonia Noroccidental; encontrándose distribuida en toda la zona productora durante las épocas seca y de lluvias.

2. Preliminares de Investigación

2.1 Marco Teórico

2.1.1 El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.)

El cacao tiene gran importancia como cultivo en la fabricación de bebidas, ocupando el tercer lugar después del café y el té, su relevancia se basa en su amplio uso en la industria de confitería, particularmente como el componente principal en la producción de chocolate, así mismo, el cacao se cultiva en regiones tropicales, principalmente en países en vías de desarrollo, con una gran producción en el continente africano (Bhattacharjee, 2018).

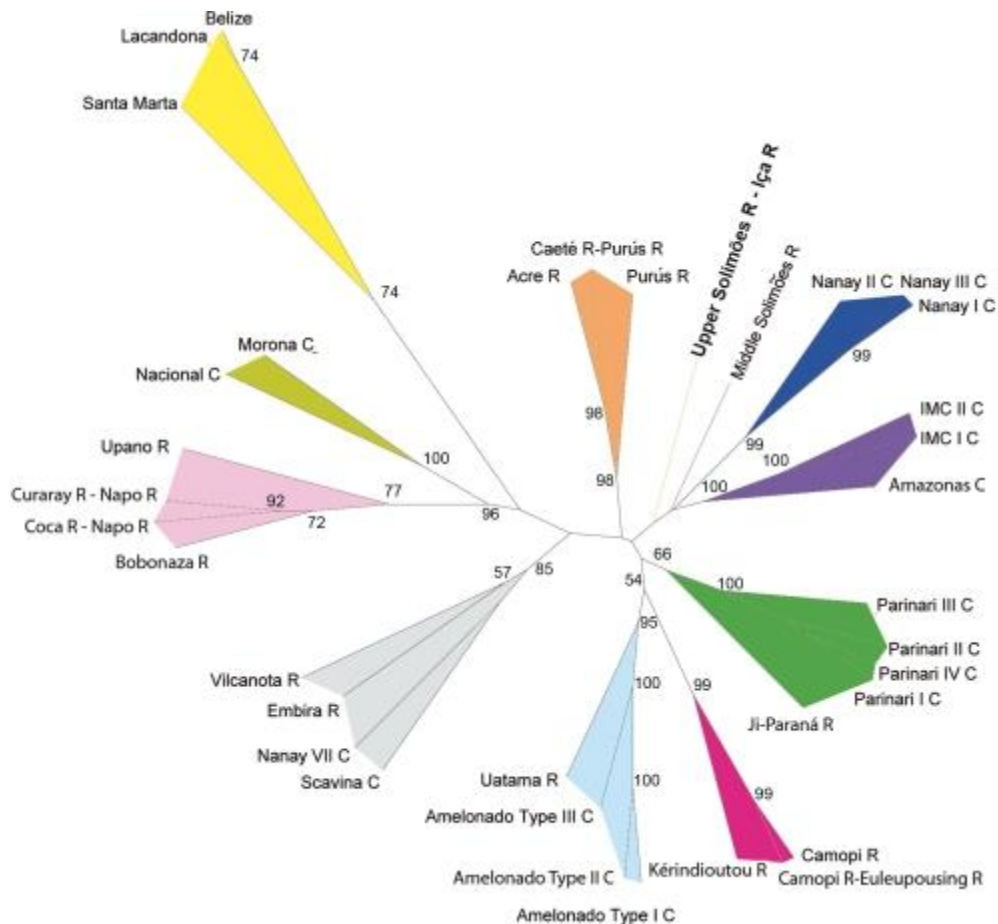
- **Origen**

El cacao es originario de las selvas tropicales húmedas de las laderas ecuatoriales bajas del este de los Andes en Sudamérica. Los pueblos nativos de América Central como los Mayas y Aztecas lo domesticaron y lo consideraban de origen divino, como se refleja en el significado literal del nombre genérico *Theobroma*, "Alimento de los Dioses" (Motamayor et al., 2008; Caparosa & Hartel, 2018). Complementariamente, Nair, (2010) expuso lo siguiente: "Los españoles, quienes invadieron y conquistaron el imperio azteca en el siglo XVI, aprendieron de los Aztecas la elaboración de xocoatl, una bebida hecha de granos de cacao tostados y molidos".

Las clasificaciones tradicionales del cacao han identificado dos grupos principales, conocidos como Criollo y Forastero, y un tercer grupo conformado por un híbrido derivado de Criollo y Forastero denominado Trinitario, sin embargo, investigaciones más detalladas a nivel genético utilizando marcadores microsatélites, han revelado una diversidad significativamente mayor en la especie (Cornejo et al., 2018), de tal manera, la

caracterización genética del germoplasma de los cultivares tradicionales del cacao ha sido clasificada en diez grupos genéticos principales: Amelonado, Contamana, Criollo, Curaray, Guianna, Iquitos, Marañón, Nacional, Nanay y Purús (Motamayor et al., 2008) (Figura 2 -1).

Figura 2-1: Diferenciación geográfica y genética poblacional del cacao (*Theobroma cacao* L.).



Nota: Matriz de distancia genética - Neighbor Joining de los diez principales grupos genéticos. Los números representan porcentajes de los valores de ajuste (Bootstrap) en 96 loci (Motamayor et al., 2008).

▪ **Botánica**

En condiciones de cultivo, generalmente alcanza una altura de 4 a 7 m de altura, mientras que en condiciones naturales el cacao silvestre puede crecer hasta 20 m o más. Es un árbol perenne, el cual, emite su primera horqueta a partir de los 8 a 12 meses de edad, cuando alcanza una altura aproximada de 80 a 120 cm, en ese punto nace un piso de tres a seis ramas principales, siendo más común que formen pisos de cinco ramas. Consecuentemente, García et al., (2018) define las hojas como: “alternas, elípticas u oblongas, con una prolongación en el ápice, margen liso, de color verde oscuro e intenso en el haz, y de tonalidad más clara en el envés”.

El fruto del cacao es una drupa, a menudo llamada "mazorca" pueden ser de color verde o rojo, cuando son inmaduras, los frutos verdes cambian a color amarillo cuando se maduran, y las rojas a color naranja o amarillo, y contiene de 30 a 50 semillas, las cuales están cubiertas con una capa mucilaginosa llamada "pulpa", y el pericarpio es carnoso y grueso, así mismo, forma una raíz pivotante, con función principal de anclaje y, puede crecer a una profundidad aproximada de 150 cm. (García et al., 2018); (Nair, 2010).

El suelo apto para su desarrollo son suelos profundos, ricos en materia orgánica, textura franco arcilloso, con poca erosión y un pH que oscile entre 4.0 y 7.0, bajo condiciones climáticas con humedad relativa entre el 70 y 80 %, rango de temperatura entre los 24 - 30°C (García et al., 2018).

▪ **Fenología**

El conjunto de etapas que ocurren desde la germinación de la semilla hasta la senescencia de la planta, son descritas según lo planteado por (Niemenak et al., 2010), y aportes de (CATIE, 2019).

La primera etapa inicia con la germinación de la semilla, esta etapa ocurre desde la imbibición hasta la emergencia de la plántula, con una durabilidad aproximada de 25 días, luego, se da inicio al desarrollo de hojas en el tallo, en un intervalo de aproximadamente 40 días, a lo largo de la expansión, son de color verde pálido, suaves, delicadas, y gradualmente más fuertes en el transcurso de 4 semanas y el crecimiento

del tallo se puede evidenciar fácilmente a medida que se observan porciones de color verde en la parte superior del tallo. Durante la maduración, el tallo adquiere una coloración marrón oscura, mientras que las hojas alcanzan su etapa de madurez y las estípulas que protegen el brote terminal se mantienen firmemente unidas. Después de 1 a 2 años de crecimiento, el brote alcanza la madurez fisiológica, luego se induce dimorfismo de ramas con crecimiento plagiótropo, la altura a la que se producen depende de las condiciones ambientales, como la luz, la fertilidad del suelo, y el genotipo.

Las flores son caulifloras de color verde a rojizo, crecen en el tronco y las ramas principales. Un cojín floral individual presenta flores en varias etapas de desarrollo, y la cantidad de flores producidas por cada árbol suele ser considerable cada año. La producción de frutos comienza a los 2 años y el rendimiento aumenta cada año, el desarrollo de frutos dura aproximadamente 150 días y, se divide en dos fases: La primera fase tiene una durabilidad de 75 días durante los cuales el pericarpio crece y el peso seco y fresco de la pulpa aumentan exponencialmente, la segunda fase, ocurre en los siguientes 75 días en los cuales los frutos son llenados.

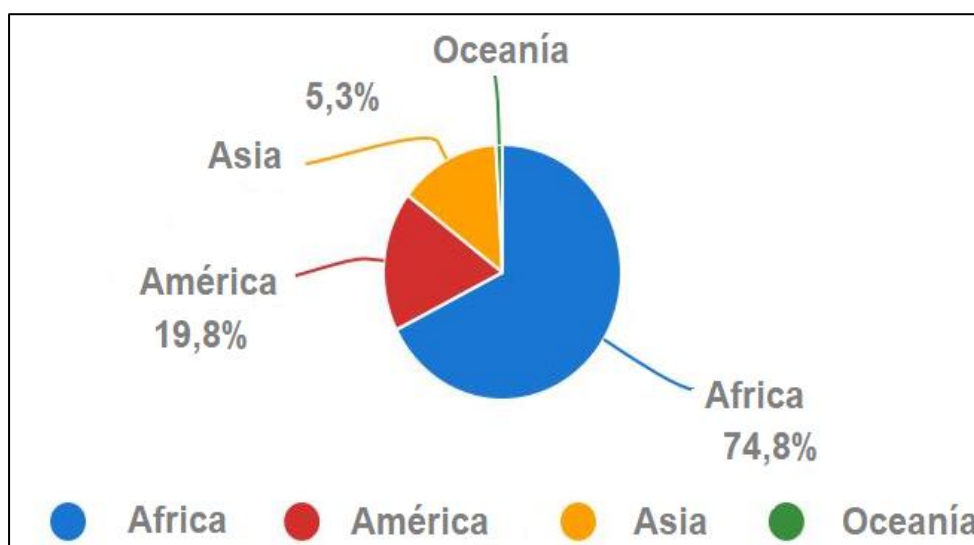
La maduración de frutos tarda entre 20 y 30 días en completarse, el color de la cáscara cambia externamente, los frutos verdes cambian a color amarillo y los de color rojo a anaranjadas o permanecen rojas. Internamente, la semilla está rodeada por mucílago de color blanco. El ciclo de vida dura más de cien años, pero su vida económica normalmente no supera los 40 años, después de 4 a 5 meses en el que finaliza su etapa productiva, inicia la fase de senescencia

▪ **Cacao a nivel mundial y nacional**

La demanda del cacao en grano proviene de la industria por sus propiedades organolépticas y terapéuticas, ya que, tiene un efecto benéfico en enfermedades crónicas, cardiovasculares, cuidado de la piel, hasta la producción de dulces y confites, impulsando su comercialización y valor agregado en cacao de calidad, fino y de aroma (Cubillos et al., 2019).

El cacao se cultiva principalmente en África occidental, América Central, América del Sur y Asia, siendo el continente africano el mayor productor con una participación del 74,8%, seguido por América con 19,8%, Asia y Oceanía con el 5,3% (Figura 2-2). En el año 2021 la producción mundial de cacao estuvo sobre cinco millones de toneladas al año, de las cuales, diez países aportan el 94% (FAO, 2021; ICCO, 2023)

Figura 2-2: Participación de producción de cacao en grano por continente

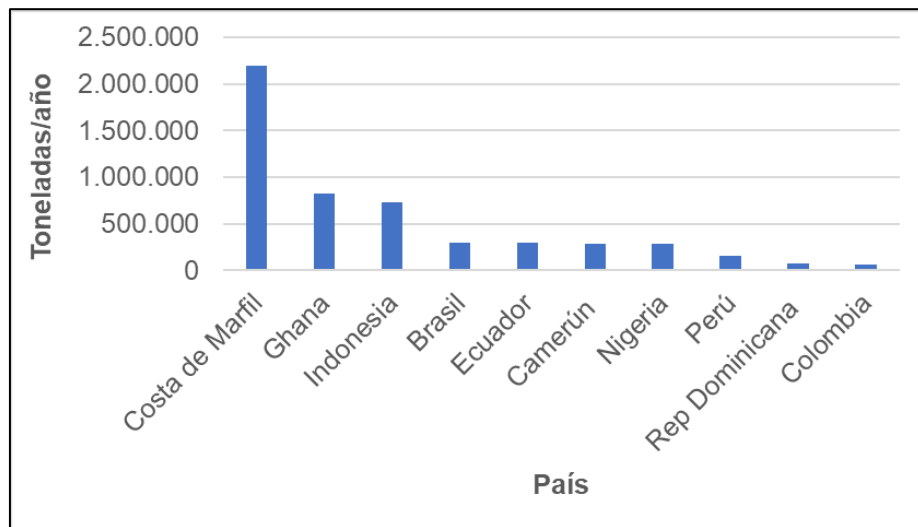


Nota: El gráfico representa la participación en producción de granos de cacao por continente. El continente africano representa el 74,8% (4.174.163 ton/año), seguido por América 19,8% (1.104.925 ton/año) y, Asia – Oceanía 5,3% (295.762 ton/año) (FAO, 2021; ICCO, 2023).

Los diez principales productores son: Costa de Marfil (2.200.000 ton/año), Ghana (822.000 ton/año), Indonesia (728.043 ton/año), Brasil (302.157 ton/año), Ecuador (302.093 ton/año), Camerún (290.000 ton/año), Nigeria (280.000 ton/año), Perú (160.221 ton/año), República Dominicana (70.630 ton/año) y Colombia (70.205 ton/año) (Figura 2-3) (FAO, 2021; FEDECACAO, 2023). Adicionalmente, Colombia se posiciona como el cuarto productor latinoamericano después de Brasil, Ecuador y Perú (Cocoa Barometer, 2022).

Colombia se encuentra entre los diez principales productores de cacao del mundo, en el 2021 los departamentos que se destacaron por su producción de cacao en grano son los siguientes: Santander (28.037 ton/año), seguido de Arauca (7.894 ton/año), Antioquia (6.661 ton/año), Tolima (4.027 ton/año) y, Huila (3.509 ton/año) (Figura 2-4) (FEDECACAO, 2023).

Figura 2-3: Top 10 de países productores de granos de cacao a nivel mundial.

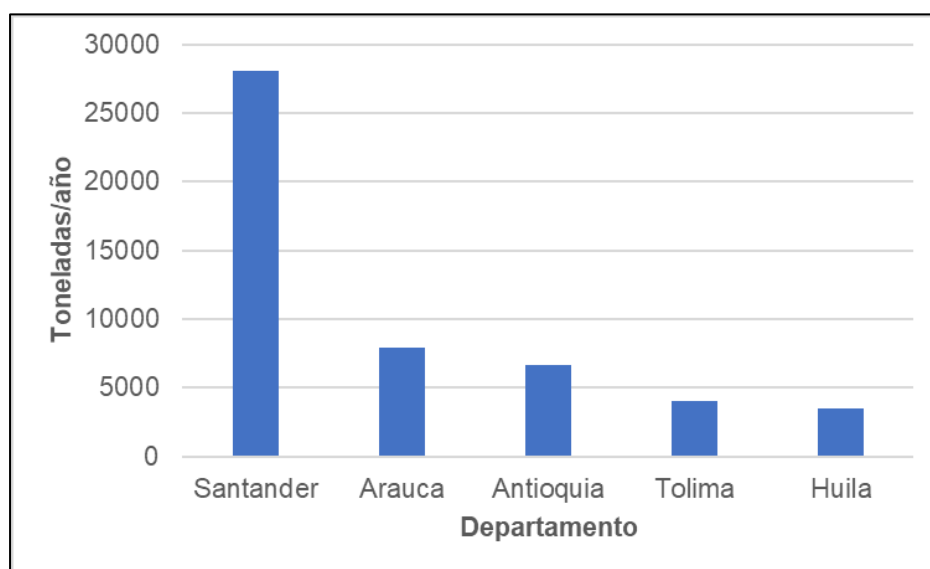


Nota: Gráfico de barras que representa la producción en toneladas/año de los 10 países líderes en el año 2021 que aportaron el 94% de la producción de granos de cacao a nivel mundial. Estos datos ofrecen una visión significativa que ayuda a comprender las dinámicas económicas globales y las fortalezas industriales de cada país (FAO, 2021; FEDECACAO, 2023).

El cultivo de cacao en Colombia se desarrolla en fincas de pequeña a mediana escala, generalmente en áreas menores a 3 hectáreas, por productores que principalmente dependen de la mano de obra familiar, estas fincas diversificadas albergan una amplia gama de cultivos, los cuales constituyen elementos esenciales en la dieta de los agricultores dedicados al cacao, del mismo modo, este cultivo se ha consolidado como una alternativa de producción en áreas caracterizadas por elevados índices de pobreza y conflictos sociales, a menudo desplazando a los cultivos ilícitos (Jaimes et al., 2022).

Según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2020), en el país se disponen de 188.000 hectáreas al cultivo de cacao, distribuidas a lo largo de 27 departamentos. Esta actividad agrícola genera un total de 96.295 empleos, y está directamente relacionada con el sustento de 65.351 familias. A pesar de que una parte significativa de esta producción proviene de variedades híbridas de cacao, se ha observado un aumento en las áreas de cultivo que utilizan materiales vegetales clonados procedentes de programas de mejora impulsados por instituciones como AGROSAVIA, La Compañía Nacional de Chocolates, Casa Luker y, Materiales Universales (Jaimes et al., 2022).

Figura 2-4: Departamentos de mayor producción de granos de cacao en Colombia



Nota: El gráfico ilustra la producción en toneladas/año de granos de cacao para el año 2021 de los cinco departamentos que representan las principales áreas de producción de cacao en Colombia, sin embargo, "es importante señalar que la producción de cacao en el país está en constante crecimiento, mejorando la calidad y la sostenibilidad de este importante cultivo agrícola" (FEDECACAO, 2023).

Finalmente, en Colombia mediante los programas "Cacao para la paz" y "Colombia más competitiva", "el cacao ha sido propuesto como uno de los sustitutos de cultivos ilícitos, por medio del Programa Nacional Integral de Sustitución de Cultivos de Uso Ilícito (PNIS); lo que ha impulsado su cosecha, producción y consumo, promoviendo la paz

rural y el desarrollo en las comunidades productoras de cacao a través del fortalecimiento al acceso a mercados internacionales” (USAID, 2023).

▪ **Situación del cacao en el departamento de Caquetá y municipios seleccionados como área de estudio**

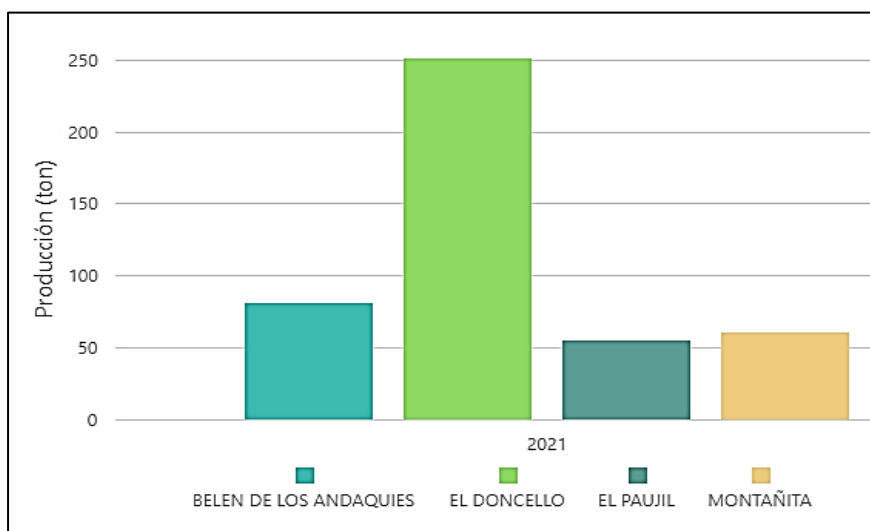
“El departamento del Caquetá posee potencial agroecológico y social para desarrollar sistemas productivos, donde los sistemas agroforestales cacaoteros son una alternativa para fortalecen su tejido social y ambiental tras los acuerdos de paz” (Charry et al., 2017). Desde el 2018, municipios del norte y sur del departamento, están participando en proyectos que fortalecen su competitividad con mercados internacionales, a través de la certificación orgánica (Madrivejos, 2018).

El proyecto Territorios Caqueteños Sostenibles para la Paz, fue una apuesta por la paz y el desarrollo agrícola del Caquetá, al contar con la financiación del Fondo Fiduciario para la Paz de la Unión Europea, el Instituto Camões, de Portugal, y contrapartidas locales, el proyecto apoyó la zona norte del departamento con el fortalecimiento de la producción de cacao, café, caña panelera y plátano en La Montañita, El Paujil, y El Doncello que en tiempos de guerra fueron dominados por grupos armados. (Periódico el Espectador, 2018) (Madrivejos, 2018).

Por otre parte, en la zona sur, el municipio de Belén de los Andaquíes recibió apoyo por parte de USAID, esta entidad ofreció respaldo al sector campesino de la asociación de productores agroforestales alternativos de Belén de los Andaquíes (ASPROABELEN) para fortalecer la producción de cacao orgánico, convencional y la gestión en comercio internacional.

En este contexto, para el año 2021 Caquetá aportó 2.265 toneladas a la producción nacional del país, con producciones destacadas en los municipios de La Montañita (136 ha; 60,20 ton/año), El Doncello (575 ha; 250,65 ton/año), El Paujil (80 ha; 55,20 ton/año) Belén de los Andaquíes (185 ha; 81 ton/año) (Agronet, 2023) (Figura 2- 5).

Figura 2-5: Producción de cacao en toneladas de los municipios seleccionados como área de estudio.



Nota: Gráfico de barras alusivo a la producción de granos de cacao (Ton/año) en el 2021 de los municipios seleccionados como área de estudio en la presente investigación (Agronet, 2023)

2.1.2 Patosistema *Theobroma cacao* - *Phytophthora* spp.

El cultivo de cacao se ve afectado por enfermedades bacterianas, fungosas, virales, afectación por nematodos, plantas superiores parásitas, y enfermedades ocasionadas por oomycetes, entre ellas *Phytophthora* spp., es una de las más severas, causando pudriciones en frutos, aftas de tallos, tizón de las hojas y pudrición de las raíces (D. O. Adeniyi & Asogwa, 2023; B. A. Bailey & Meinhardt, 2016). Las epidemias ocasionadas por *Phytophthora* pueden iniciarse a partir de propágulos en el suelo, cojines florales, cortezas, chancros de tronco y, frutos infectados (Akrofi et al., 2015), especialmente en ambientes húmedos con humedad relativa superior al 80%, condiciones características de las principales zonas productoras de cacao (Nyadanu et al., 2019)

- **Clasificación taxonómica de *Phytophthora* spp.**

El género *Phytophthora* fue descubierta por Heinrich Anton de Bary en 1876, y literalmente significa Phyto (planta) y phthora (destructor) en griego (Surujdeo et al., 2016). Las especies de *Phytophthora* que afectan plantas se consideran patógenos hemibiótrofos, que inicialmente obtienen nutrición de tejido vivo (etapa biótrofa), pero cambian a un estilo de vida necrótrofo, una vez que se establece la infección (etapa necrótrofa) (S. S. Ali et al., 2017).

Phytophthora spp. es un oomycete que se encuentra en una amplia gama de entornos y nichos ecológicos; pertenece al Reino Chromista o Stramenopila, un linaje que incluye también algas pardas y diatomeas que ha perdido plastidios y está filogenéticamente muy distante del Reino Fungi, donde se agrupan los hongos verdaderos (Fry & Grünwald, 2010).

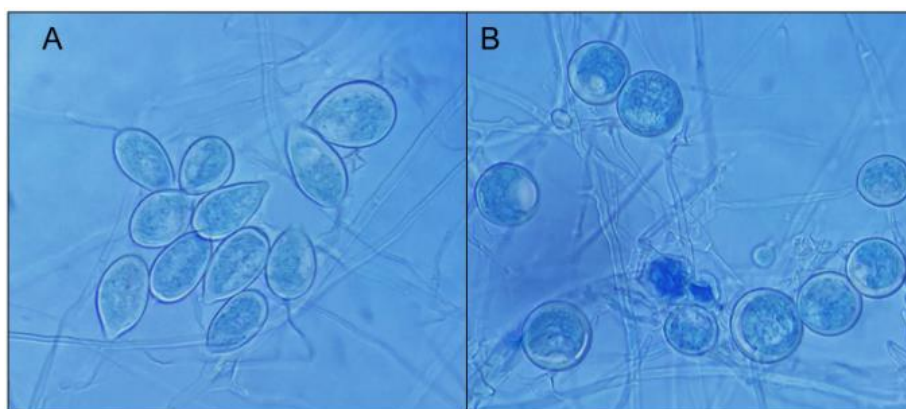
En la actualidad se han reportado 281 especies asociadas al género (MYCOBANK, 2023), dentro de las cuales se encuentran *P. nicotianae* (clado 1), *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. tropicalis*, *P. Theobromicola* (clado 2), *P. megakarya*, *P. palmivora* (clado 4), *P. katsurae*, *P. heveae* (clado 5), *P. megasperma* (clado 6) que han sido identificadas como agentes causantes de la Pudrición negra de los frutos de T. cacao (Surujdeo et al., 2016) (Appiah et al., 2004) (Fernández et al., 2018) (Yang et al., 2017), y que se encuentran clasificadas actualmente de la siguiente forma .

Dominio: Eukaryota
Reino: Chromista
Phylum: Oomycota
Clase: Peronosporae
Orden: Peronosporales
Familia: Peronosporaceae
Género: *Phytophthora* spp.

Estos microorganismos morfológicamente presentan hifas multinucleadas y de micelio cenocítico, el núcleo celular es típicamente diploide y mitocondrias tubulares, la pared

celular se compone principalmente de celulosa y glucanos β -1,3 y β -1,6 y no de quitina; como típicamente se encuentra en los hongos, reino en el que previamente se encontraban clasificados (Clavaud et al., 2009). “Muchas especies producen esporas acuáticas móviles (zoosporas) carentes de pared celular, biflageladas contenidas en estructuras llamadas esporangios y estructuras de resistencia llamadas clamidosporas” (Fry & Grünwald, 2010) (Figura 2-6).

Figura 2-6: Estructuras de reproducción y resistencia de *Phytophthora palmivora*



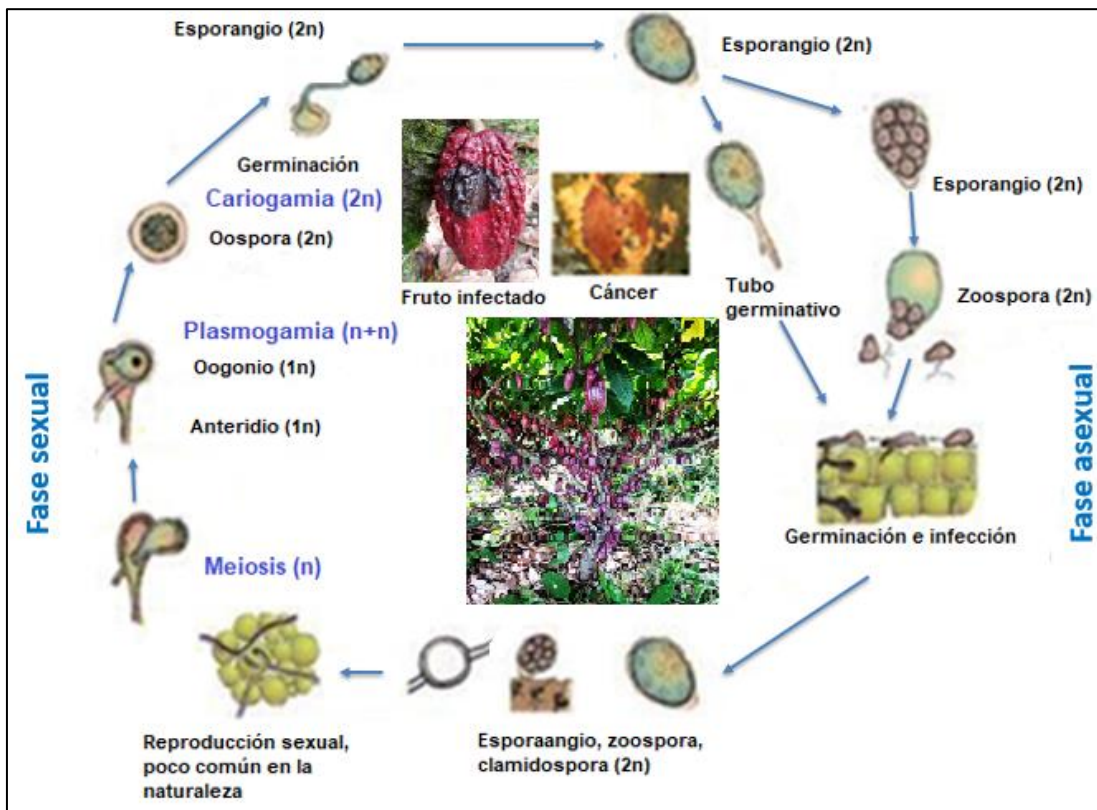
Nota: las imágenes corresponden a estructuras de reproducción asexual: A. Esporangio; y de resistencia: B. Clamidosporas.

▪ **Ciclo patológico**

Las especies de *Phytophthora* pueden ser homotáticas (autofértiles), o heterotáticas (autoestériles). El ciclo de vida de *Phytophthora* (Figura 2-7) puede involucrar hasta tres formas de esporas asexuales: esporangios, zoosporas y clamidosporas, además de las oosporas, la forma de esporas sexuales, el micelio vegetativo es diploide, cenocítico y, sin septos. *Phytophthora* en condiciones adecuadas se reproducirá asexualmente por medio de esporangios, que pueden germinar directamente o diferenciarse para producir entre 8 a 32 zoosporas, cada una de las cuales pasa a través de un ciclo de dispersión y enquistamiento antes de germinar (Randy, 2016).

La reproducción sexual genera la producción de oosporas, sin embargo, todos los tipos de esporas son potencialmente infecciosas, así mismo, las clamidosporas y oosporas también cumplen una función como estructuras de hibernación o de resistencia, algunas especies, también se dispersan por vía aérea, principalmente como esporangios caducos (caducifolios) que tienen la capacidad de diseminarse al interior del cultivo (D. Adeniyi, 2019).

Figura 2-7: Ciclo patológico de *Phytophthora* spp., en cultivo de cacao.



Nota: Formas de reproducción de *Phytophthora* spp. (sexual y asexual), estructuras involucradas en la infección y dispersión de la enfermedad (Rodríguez, 2015).

Los oomycetes se reproducen sexualmente mediante la producción de oosporas a partir de eventos de fusión que involucran estructuras como: oogonio (femenino) y anteridio (masculino) (Surujdeo et al., 2016). En las especies heterotálicas, la gametangia se producen solo en presencia de ambos tipos de apareamiento (A1 y A2) debido al hecho de que un regulador de crecimiento producido por un talo estimula al otro (plasmogamia),

finalmente, la meiosis ocurre en el anteridio y en el oogonio, un tubo de fertilización del anteridio rompe la pared oogonial y deposita el protoplasma anteridial, la única oospora que se forma dentro del oogonio es globosa y se caracteriza por desarrollar una pared interna gruesa (Surujdeo et al., 2016).

Por otra parte, el mismo autor Surujdeo et al., (2016) afirma que: “en la reproducción asexual, el esporangio germina directamente por la producción de un tubo germinal que generalmente, emerge de la punta del esporangio o indirectamente por la producción de zoosporas dentro del esporangio” (Figura 2-7). Las zoosporas se consideran los principales propágulos infecciosos y pueden nadar durante horas, pero eventualmente se detienen y desarrollan pared celular convirtiéndose en un quiste, luego, los flagelos se desprenden o se retraen (Rodríguez, 2015).

- **Sintomatología ocasionada por *Phytophthora* spp., en cacao**

En cuanto a la sintomatología característica de *Phytophthora* spp., el cual es un patógeno localizado que puede afectar los frutos desde que son querelles (Etapa fenológica 7, Anexo A) hasta frutos maduros (Etapa fenológica 8, Anexo A) (Niemenak et al., 2010). La infección puede iniciarse por esporangios, clamidosporas o zoosporas que germinan y penetran en la superficie del fruto (Etapa 0, Figura 2-8A) (Surujdeo et al., 2016). Los primeros síntomas de la enfermedad pueden aparecer dentro de tres a cuatro días posteriores a la infección (Etapa 1, Figura 2-8B), síntomas que se caracterizan como una lesión marrón empapada de agua, que se expande rápida y concéntricamente para cubrir toda la superficie del fruto a medida que progresa la infección (Etapa 2, Figura 2-8C), y la producción de esporangios podría comenzar la noche siguiente al segundo día de aparición de los síntomas visibles (Surujdeo et al., 2016).

La infección se acompaña de un cambio en el color del fruto de marrón oscuro a negro (Etapa 3, Figura 2-8D), a partir del día nueve al día diez se observa la formación de micelio como polvillo blanco en el epicarpio del fruto (Etapa 4, Figura 2-8E) y los frutos podrían quedar comercialmente inútiles entre 10 a 20 días (Etapa 5, Figura 2-8F). Sin embargo, los granos en un fruto maduro pueden no verse afectados parcial o totalmente

ya que el patógeno puede no atravesar la brecha entre la pared interna y la masa de granos (Figura 2-9) (Suárez & Aránzazu, 2010).

Los estudios sobre la epidemiología de la enfermedad revelaron que la sintomatología podría variar respecto a la susceptibilidad de las variedades de cacao, la aparición de diferentes cepas de *Phytophthora* spp, las prácticas culturales y las condiciones ambientales, incluida la temperatura, la humedad, distancias de siembra y la sombra (McMahon & Purwantara, 2004)

Figura 2-8: Sintomatología ocasionada por *Phytophthora* spp., en frutos de cacao.



Nota: Escala de severidad de la Pudrición negra del fruto de cacao A: Etapa 0; B: Etapa 1; C: Etapa 2; D: Etapa 3; E: Etapa 4; F: Etapa 5. Fotografías desde la A – E cortesía de Arnold Castillo. F: ID 1130612676.

Según Kasteel et al., (2023) la humedad es uno de los factores que contribuyen al desarrollo del oomycete, ya que, es el principal agente de diseminación, el inóculo llega de tejidos infectados o del suelo a los tejidos sanos a través de la lluvia o el salpique, y el ciclo de la enfermedad puede reducirse de cinco a siete días después de una fuerte lluvia, ya que la presencia de agua libre favorece la esporulación, liberación y, sobre todo, la diseminación del patógeno. Además de vectores como las hormigas, el hombre es un dispersor rápido, principalmente cuando se utilizan herramientas de poda y cosecha contaminadas que pasan de árboles enfermos a sanos (Rodríguez, 2015)

2.1.3 Identificación y diagnóstico de *Phytophthora* spp.

- **Identificación en campo**

La Pudrición negra del fruto en campo puede identificarse observando los síntomas en sus diferentes etapas de desarrollo.

Cuando se observa una mancha de color marrón, estos síntomas corresponden a la etapa inicial de la enfermedad (Figura 2-9A), *Phytophthora* spp. se manifiesta con bordes definidos, y la lesión se genera desde el exterior hacia el interior (patógeno localizado) ocasionando una pudrición acuosa, sin embargo, los granos del fruto pueden ser aprovechables en esta etapa (Figura 2-9C), diferente de *Moniliophthora roreri* que afecta los frutos desde su interior hacia el exterior (patógeno sistémico) afectando los granos directamente (Figura 2-9B), posteriormente, puede observarse micelio de color blanco sobre la superficie del fruto en cuanto la pudrición haya avanzado (Figura 2-9D), igualmente, hasta que el fruto ha sido momificado por completo (Alarcón et al., 2012).

Figura 2-9: Síntomas y signos de la Pudrición negra del fruto de cacao, comparado al daño ocasionado por *Moniliophthora roreri*, agente causante de Moniliasis



Nota: A: Síntomas en etapa inicial de la enfermedad; B: Síntomas y signos de *Moniliophthora roreri* en frutos; C: Síntoma de lesiones externas de *Phytophthora* spp. en frutos y, D: Signos de micelio blanco típicos de *Phytophthora*. Fotografías cortesía de Arnold Castillo (2019)

▪ Identificación morfológica

“Un primer paso en la identificación de especies de *Phytophthora* incluye la morfología de los esporangios, de estructuras sexuales tales como anteridio, oogonio y oosporas, presencia o ausencia de clamidosporas, morfología de hifas y tipo de colonias” (Brasier & Griffin, 1979).

Clasificadores morfológicos

A continuación, se definen los caracteres morfológicos macro y microscópicos, de especies de *Phytophthora* que han sido reportadas con mayor frecuencia como causantes de la Pudrición negra del fruto.

Phytophthora megakarya

Las colonias de *P. megakarya* tienen apariencia de lana o algodón, uniforme, con micelio aéreo, patrón lobulado de forma floral débil y borde difuso (Brasier & Griffin, 1979) (Figura 2-10A). Es una especie heterotálica con anteridios anfígenos y oogonio piriforme, esporangios papilados frecuentemente con una papila y esporádicamente dos o tres, con morfología obpiriforme, globosas, ovoides, o elipsoidales (20-60 x 13-41 μm), y esporangióforos simpodiales sueltos, hinchazón hifal ausente, las clamidosporas son identificadas con poca frecuencia, pero han sido observadas tanto en agar como en cultivos líquidos y son en su mayoría terminales (20-44 μm de diámetro) (Abad et al., 2023).

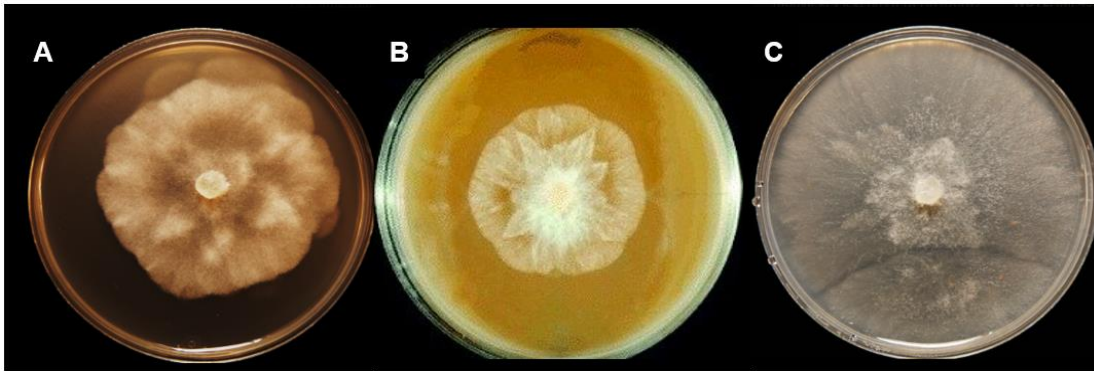
Phytophthora palmivora

La morfología de la colonia de *P. palmivora*, corresponde a micelio aéreo disperso a excepción de la zona central, patrón estriado o estrellado, y borde claramente definido (Brasier & Griffin, 1979) (Figura 2-10B). Microscópicamente, Zentmyer et al., (1977) dividió los aislamientos de *P. palmivora* en cuatro grupos de acuerdo con las características del esporangióforo, así: (a) Esporangios con una base redonda con esporangióforos cortos y gruesos menores de 5 μm de longitud; (b) Esporangios con una base redonda y con esporangióforos delgados de 10 μm de longitud; (c) Esporangios más alargados con esporangióforo largo y grueso mayores de 15 μm de longitud y (d) aislamientos con esporangios persistentes (Zentmyer et al., 1977).

Phytophthora capsici

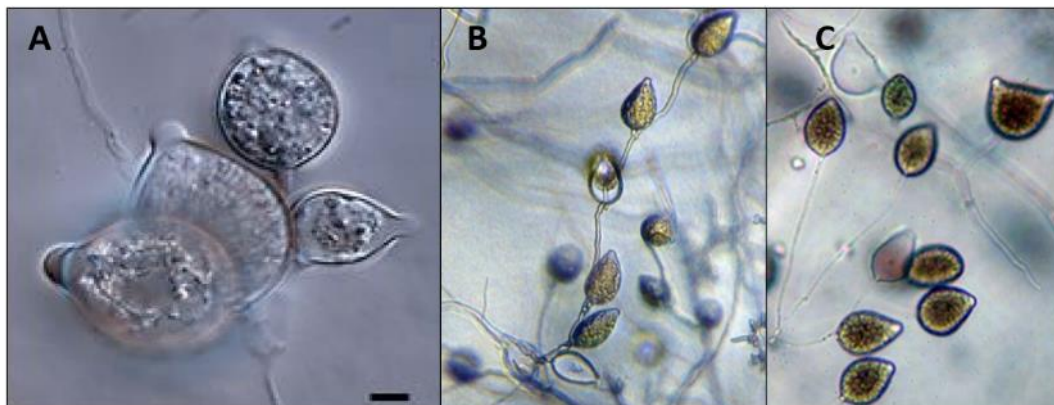
Los patrones de colonias de *P. capsici* incluyen variantes de roseta y algodónosas dando el aspecto de roseta densa (Appiah et al., 2003) (Figura 2-10C). Se caracteriza por su producción de esporangios pedicelos caducos, cortos, medianos y largos, subglobosos a elipsoides, y la ausencia de clamidosporas. La morfología de los esporangios es subgloboso, elipsoide, ovoide, fusiforme, obovoide, piriforme, hasta formas distorsionadas (9-41 x 12-47 μm), papilados o semipapilados, con dos o tres ápices; caducos con pedicelos de 3 a 138 μm , esporangióforos ramificados y ocasionalmente simpodiales simples (Figura 2-11C) (Abad et al., 2023).

Figura 2-10: Morfología característica de colonias de especies de *Phytophthora* en medio agar V8



Nota: donde: A: Colonia de *P. megakarya* con apariencia algodonosa; B: Colonia de *P. Palmivora* en forma de estrella y; C: Colonia de *P. capsici* en forma de roseta y apariencia algodonosa (Abad et al., 2023; Appiah et al., 2003).

Figura 2-11: Morfología característica de esporángios de especies de *Phytophthora* en medio agar V8



Nota: A: *P. megakarya*, B: *P. Palmivora* y, C: *P. capsici* (Abad et al., 2023).

- **Identificación molecular**

Las características morfológicas son muy útiles para identificar especies de *Phytophthora* que causan enfermedades en cacao y se han utilizado desde el principio para identificar nuevas especies como *P. megakarya* (Brasier & Griffin, 1979). A pesar de esto, pueden surgir dificultades al usar técnicas estrictamente morfológicas para caracterizar la diversidad entre especie, por lo tanto, la variación genética de *Phytophthora* a diferencia de la variación fenotípica brinda más precisión en la identificación interespecífica (B. A. Bailey & Meinhardt, 2016).

Es allí, donde la biología molecular puede proporcionar métodos confiables para la identificación de patógenos y el diagnóstico de enfermedades (Hariharan & PrasannaTII, 2021). Previamente, se han utilizado diversas técnicas basadas en la amplificación de regiones del ADN para evaluar la variación entre especies de *Phytophthora*, incluyendo el secuenciamiento de loci específicos de ADN mitocondrial y ribosomal (Yang et al., 2017)

El locus con mayor número de secuencias en las bases de datos que incluye especies de *Phytophthora*, es el ADN ribosomal de la región espaciadora transcrita interna (ITS1 – 5.8S – ITS2) (Schoch et al., 2012) y con el cual fue levantada la sistemática actual de este oomycete (Robideau et al., 2011) e incluyendo la región COXI (mitocondrial), para diferenciar especies relacionadas filogenéticamente y que no son discriminadas por la región ITS (Ramírez et al., 2021).

3. Identificación molecular y morfológica de especies de *Phytophthora* asociadas a la Pudrición negra de frutos de cacao en municipios seleccionados del departamento de Caquetá

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Ubicación geográfica y colecta de material biológico

El área de intervención correspondió a 16 fincas cacaoteras orgánicas de los municipios de La Montañita (cuatro fincas), El Paujil (cuatro fincas), El Doncello (cuatro fincas) y Belén de los Andaquíes (cuatro fincas) en el Departamento de Caquetá (Figura 3-1). Para obtener aislados de *Phytophthora* spp., se colectaron únicamente frutos afectados, ya que, en otros tejidos de la planta como hojas y tallos no se evidenciaron síntomas de la Pudrición negra.

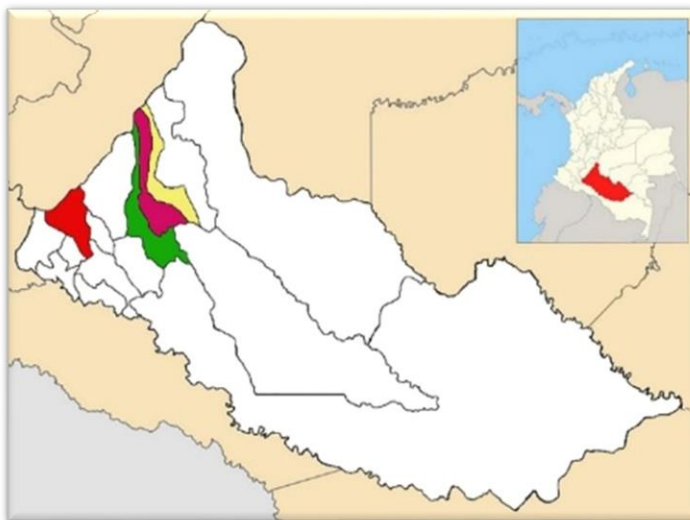
La adecuada colecta y selección de muestras determinaron el éxito en el desarrollo de la investigación, por lo cual, se llevaron a proceso de aislamiento tejidos que no se encontraban en estados avanzados de enfermedad. Las muestras colectadas en campo fueron mazorcas de cacao, las cuales fueron envueltas en papel de toalla seco y empacadas en bolsas de papel, con el fin de absorber la humedad, ayudando a mantener las muestras secas durante el transporte y el almacenamiento. El material después de colectarse fue procesado en un lapso máximo de 2 días, con el propósito de evitar el crecimiento de microorganismo saprófitos contaminantes.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Agrobiotecnología y, en Laboratorio de Ecofisiología Vegetal - Unidad de Apoyo a la Investigación Adaptación de

Cacao bajo condiciones de la Amazonia del Centro de Investigaciones Amazónicas CIMAZ-MACAGUAL “Cesar Augusto Estrada González” de la Universidad de la Amazonia, ubicado en Florencia Caquetá, Colombia, a una altura de 250 msnm, humedad relativa promedio anual de 76,3 %, temperatura promedio de 25,5 °C y precipitación anual de 3.793 mm.

En el año, el departamento de Caquetá presenta una temporada seca que se extiende de noviembre a febrero y una temporada de lluvias desde abril hasta octubre, el mes de marzo se considera como transitorio (IDEAM, 2022), Según las condiciones climáticas del Caquetá y lo planteado por Puig et al., (2018), se realizaron dos muestreos teniendo en cuenta las condiciones climáticas, ya que, puede presentarse diversidad de especies en diferentes condiciones de temperatura y humedad. El primer muestreo se llevó a cabo en la temporada seca (Ts) desde enero a febrero de 2022, y el segundo en temporada de lluvias (TII) desde julio a agosto de 2022 (FCDS, 2021).

Figura 3-1: Ubicación geográfica de los municipios correspondientes al área de intervención



Nota: Municipios seleccionados con fincas orgánicas certificadas. Los colores en el mapa representan los siguientes municipios: verde: La Montañita, rosado: El Paujil, amarillo: El Doncello, rojo: Belén de los Andaquíes en el departamento de Caquetá Colombia (PDD, 2020)

3.1.2 Aislamiento del Oomycete

- **Técnicas de aislamiento de *Phytophthora***

Los tejidos recolectados se lavaron con agua corriente y jabón neutro con el fin de eliminar suciedades y saprófitos; posteriormente, de las lesiones se seleccionaron “zonas de tejido sano frente al avance de la lesión, cortando secciones de tejido en la zona mencionada, ya que no es recomendable aislar *Phytophthora* de tejido necrosado debido a la presencia de hongos y bacterias saprófitas” (Plancarte et al., 2017).

A continuación, se desinfectó superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 15 segundos y, se lavaron con agua destilada estéril por cuatro veces para eliminar residuos de cloro en la muestra. Posteriormente, los tejidos se secaron bajo cámara de flujo laminar y una vez secos se sembraron en los medios de cultivo mencionados previamente (Plancarte et al., 2017) Las placas de agar fueron incubadas durante siete días a 25°C, verificando diariamente el desarrollo para determinar el crecimiento micelial y morfología compatible con el género (Rojas et al., 2017).

- **Medios de cultivos selectivos para el aislamiento de *Phytophthora***

Inicialmente, se realizaron pruebas utilizando dos medios de cultivo semiselectivos, previamente reportados: V8-RPBH y CMA-PARPB con el fin de determinar cuál de ellos favorece la recuperación con mayor frecuencia el oomycete (Fovo et al., 2018; Rojas et al., 2017).

V8-RPBH

Formulación: Pentacloronitrobenzeno (PCNB 50mg/L), ampicilina (250 mg/L), rifampicina (10 mg/L), benomyl (10 mg/L), Agar - Agar (20g/L) (Dorrance et al., 2008; Sans et al., 2017). Este medio utiliza como base nutricional jugo V8 diluido y clarificado y, estimula producción de zoosporas en la mayoría de las especies de *Phytophthora* spp.

CMA-PARPB

Para este medio se utiliza como base nutricional maíz casero en una solución preparada a 20/100 p/v en agua destilada estéril, Según Jeffers & Martin, (1986); Sans et al., (2017) su formulación es: “Carbonato de calcio (CaCO₃ 0,6 g/L), sacarosa (1 g/L), Extracto de levadura (0,2 g/L), rifampicina (10 mg/L), pentacloronitrobenzeno (20 mg/L), benomyl (10mg/L), hymexazol (20 mg/L) Agar - Agar (20g/L)”.

▪ Purificación de cultivos y elaboración de monospóricos

Una vez se observó crecimiento micelial, se procedió a subcultivar los morfotipos compatibles con *Phytophthora* spp., en agar CMA-PARPB y V8-RPBH, luego, se incubaron siete días a 25°C. Una vez desarrollados los aislados, se verificó la ausencia de contaminantes y se procedió a realizar los cultivos monospóricos, para lo cual se observó la morfología compatible bajo microscopio de estructuras reproductivas como esporangios y clamidosporas.

Una vez observadas estas estructuras, con asa micológica se tomó una alícuota que fue depositada en un tubo para microcentrifuga Eppendorf® de 1,5 mL con 1 mL de agua destilada estéril, se mezcló con vórtex y de la solución obtenida se sembró 0,1 mL y se estriaron con asa Digrafsky sobre los agares previamente mencionados (sin aditivos), e incubados de 24 a 48 horas a 25°C.

Finalmente, bajo estereoscopio a 60X y con la ayuda de agujas entomológicas, estas son útiles para manipular delicadamente los cultivos monospóricos, permitiendo seleccionaron cinco zoosporas germinadas por aislamiento, y se transfirió una sola punta de hifa independientemente a medios de cultivo sin aditivos, posteriormente, los monospóricos fueron incubados por siete días a 25°C. En todos los casos, los monospóricos obtenidos fueron visualizados bajo microscopio a 10X y 40X para confirmar la morfología típica del género *Phytophthora*.

De aquellas hifas cultivadas se seleccionaron tres morfotipos representativos que presentaron patrón morfológico y microscópico diferencial de entre las cinco esporas germinadas individualmente, estos monospóricos se conservaron, e identificaron morfológica y molecularmente.

- **Conservación de aislados**

Se conservaron tres replicas por cada monospórico, se subcultivó un disco de 5 mm de cada uno y se transfirió a medio V8-RPBH inclinado en tubos Falcon de 50 ml, luego, se incubaron a 25 ° C/ 5 días. Una vez colonizada la superficie del agar, se sellaron los tubos y almacenaron a una temperatura entre los 17 - 20 ° C.

3.1.3 Identificación molecular

- **Extracción de ADN**

Con el propósito de obtener micelio suficiente para este procedimiento, se aplicó la metodología propuesta por Palacios, (2017), por lo tanto, “Cada aislado creció durante seis días en un medio de Caldo Arveja (CA), con luz permanente y sin agitación”. Posteriormente, los micelios se cosecharon y secaron en Shaker Thermo Fisher Scientific sin orbital por 48h/35°C. Subsecuentemente, los micelios se maceraron haciendo uso de un Amalgamador SoHome digital DB-338 en tubos Eppendorf de 1,5 mL previamente refrigerados en nitrógeno líquido agitando por cinco segundos, las muestras fueron conservadas en Freezer a -80°C. Luego, se llevó a cabo el protocolo de extracción de ADN de hongos CTAB estandarizado por Cenicaña (Cenicaña, 2019) (Anexo B).

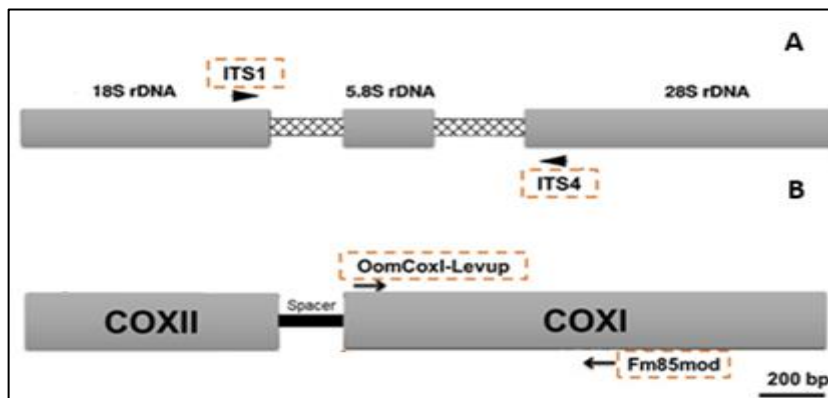
La integridad del DNA se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % (p/v) y la concentración y pureza del DNA genómico fue cuantificado en NanoDrop. Posteriormente, se prepararon las soluciones de trabajo de cada extracción de ADN a 25 ng/µl en agua ultrapura libre de nucleasas. Los ADN genómicos así obtenidos, fueron almacenados a -80 °C y los de trabajo a -20 °C.

▪ Amplificación de ADN extraído mediante PCR

Para la identificación de los aislados, se amplificó la región ribosomal ITS1-5.8S- ITS2 (Internal Transcribed Spacer) y la región mitocondrial COXI (citocromo oxidasa 1). Los primers y los ciclos de amplificación utilizados fueron los propuestos por Robideau et al., (2011) y Villa et al., (2006), planteando lo siguiente:

La región ITS1 - 5.8s – ITS2 ribosomal (Lee & Taylor, 1992; Schoch et al., 2012; Villa et al., 2006) se amplificó utilizando los primers ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (Figura 3-2A), los cuales producen un amplificado de aproximadamente 850 pb. La región COXI fue amplificada utilizando los primers OomCoxILevup (5'-TCA WCW MGA TGG CTT TTT TCA AC -3') y Fm85mod (5'- RRH WAC KTG ACT DAT RAT ACC AAA - 3') (Figura 3-2B), los cuales producen una banda de aproximadamente 727 pb

Figura 3-2: Primers y regiones a amplificadas de *Phytophthora* spp. aislada en la Amazonia Noroccidental – departamento de Caquetá



Nota: A: Región ITS completa y posición de los cebadores ITS1 e ITS4; B: Región mitocondrial COXI y posición de los cebadores OomCOXILevup y Fm85mod (Glass & Donaldson, 1995) modificado por: (Rojas Triviño, 2019).

- **Preparación del cóctel de PCR**

Cada reacción se realizó con un volumen final de 25 μL , constituidos por: 12,5 μL de Taq® ReadyMix™, 25 ng/ μL de ADN total extraído, 6 μL de agua tipo HPLC esterilizada, 0,75 μL por cada primer, siguiendo el protocolo de los ciclos de PCR propuestos por Robideau et al., (2011) en termociclador Labnet™ Termociclador MultiGene™ OptiMax:

Para la región ITS fue el siguiente: 95°C durante 3 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 68°C durante 45 segundos, 72°C durante 2 minutos, y una extensión final a 72°C durante 8 minutos; la amplificación de la región COXI tuvo el siguiente perfil: 95°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72 ° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa de 1,5 % (p/v), teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain 10.000X (Invitrogen™) (1,5 μL SYBR por cada 100 mL de agarosa) y Buffer TAE 10X. Se incluyó un marcador de peso molecular de 2.000 pb y un control negativo compuesto por cóctel PCR sin la adición de ADN total. La electroforesis se realizó a 100 V/1h y se visualizó en el equipo ENDURO UVP bajo luz ultravioleta.

- **Purificación de productos PCR y secuenciación**

Con el objetivo de eliminar impurezas de los productos PCR, estos fueron purificados aplicando el protocolo purificación estandarizado del Laboratorio de agrobiotecnología de la Universidad de la Amazonia (Ortiz, 2019) el cual consiste en: adicionar 1 μL de acetato de amonio por cada 10 μL de producto PCR, más 2 volúmenes de etanol al 100% a -20°C por 24horas, luego, las muestras fueron centrifugadas por 20 minutos a máxima revolución, finalmente, se realizaron 2 lavados con etanol al 70% a 13.000 rpm. Los productos PCR una vez limpios, se enviaron a secuenciar en el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular (SSiGMol) - Instituto de Genética - Universidad Nacional de Colombia, con el método SANGER.

▪ **Análisis de datos**

Las secuencias obtenidas se editaron en el software Geneious Prime, mediante el cual se limpiaron los cromatogramas, al igual que, el ensamble, alineamiento y, secuencias consenso. Por medio de las secuencias de nucleótidos de las regiones ITS y COXI de los aislados de *Phytophthora* spp. que afectan cacao en Caquetá se realizó una identificación inicial en la base de datos BLASTn – NCBI – GenBank. Posteriormente, con el fin de determinar la identidad taxonómica de los aislados a nivel de especie, se llevaron a cabo análisis filogenéticos (Inferencia Bayesiana: IB, Máxima Parsimonia: MP y Máxima Verosimilitud: ML) por separado para cada locus incluyendo secuencias previamente reportadas por (Decloquement et al., 2021; Ramírez et al., 2021; Robideau et al., 2011; Scanu et al., 2021), finalmente se efectuaron análisis de secuencias multilocus utilizando conjuntos de datos ITS y COXI.

Las secuencias de especies adicionales incluidas en árboles filogenéticos previamente descritos (Decloquement et al., 2021; Robideau et al., 2011) se descargaron de la plataforma de GenBank (Anexo C) y se incluyeron en la construcción de árboles filogenéticos. Las filogenéticas con ML, y MP se llevaron a cabo utilizando MEGA11 y CIPRESS Science para IB. Para los análisis de ML y MP, el soporte de filogenia para los nodos internos se evaluó mediante 1.000 pseudo réplicas de arranque. Los árboles obtenidos se editaron con FigTree v. 1.4.2.

Como primera medida previa a realizar el árbol multilocus se examinó la discrepancia entre los datos de genes individuales al verificar sus filogenias individuales en busca de inconsistencias entre grupos con respaldo significativo de análisis de ML, IB, MP. Una vez confirmada la coherencia de las topologías, se procedió a concatenar de los conjuntos de datos ITS y COXI.

3.1.4 Identificación morfológica

La evaluación de caracteres morfológicos se realizó siguiendo la clave taxonómica propuesta por Abad et al., (2023) como descrito a continuación:

- **Macroscópico:**

Se evaluó el patrón de crecimiento de la colonia con tres repeticiones por aislamiento incluyendo parámetros como: forma del patrón morfológico, desarrollo aéreo del micelio, color y, borde.

- **Microscópico:**

Se evaluaron 40 esporangios por aislamiento, obtenidos a partir de microcultivos crecidos en medio CMA-PARPB a 25°C durante siete días, se consideró la forma, el tamaño (largo y ancho) y, longitud de papila (esporangios papilados, semipapilados, no papilados). Todas las observaciones y medidas se llevaron a cabo con un aumento de 40X utilizando un microscopio BioBlue, al cual se le incorporó un micrómetro para la respectiva toma de fotografías que fueron procesadas en el programa ImageJ (smalldropsprays, 2019).

- **Análisis de datos**

Con la información obtenida de las medidas sobre las variables microscópicas categóricas: largo, ancho, longitud de papila se realizó análisis estadístico de diferencia de medias con la prueba Tukey ($p < 0,05$) en el programa The R Project for Statistical Computing, estos análisis ayudaron a determinar las medias significativamente diferentes.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Identificación molecular

Durante el muestreo y diagnóstico de los cultivos orgánicos se colectaron dos mazorcas con síntomas de pudrición negra en cada una de 16 fincas (cuatro fincas/municipio) en Temporada de Lluvias (TII). En Temporada seca (Ts) se estipuló colectar la misma cantidad de material vegetal enfermo, sin embargo, El Paujil fue el único municipio en el que se logró cumplir con este propósito. Aunque en La Montañita y Belén se logró colectar material en los cuatro cultivos seleccionados, en dos fincas La Montañita y una finca de Belén, se obtuvieron aislados de un solo fruto, en El Doncello se obtuvo material de dos fincas solamente. Estos acontecimientos pueden deberse a que en los meses de enero – febrero de 2022, en Caquetá se registraron solo 5 días de lluvias con precipitación promedio de 100 mm, temperatura máxima de 33°C y humedad relativa de 79% (IDEAM, 2022) condiciones que afectan directamente la dispersión del patógeno en los cultivos (Adeniyi, 2019).

Por cada mazorca se aislaron cinco zoosporas germinadas, de las cuales se seleccionaron dos para caracterización morfológica y molecular. Se obtuvo un total de 114 aislados, de los cuales, 50 corresponden a Ts y 64 a TII (Tabla 3-3-1). El municipio de El Paujil obtuvo el mayor número de aislados (32), seguido de Belén (30), La Montañita (28) y, El Doncello (24).

Con el fin de establecer las relaciones filogenéticas de los aislados reportados en este estudio (n=114), la secuencia consenso de la región ITS y COXI fueron usadas para construir árboles filogenéticos para cada región y un árbol filogenético concatenado combinando las secuencias de las regiones ITS y COXI, integrando secuencias de aislados asociados al género, incluyendo las reportadas como patógenas en cacao, secuencias reportadas en Colombia y una secuencia de Caquetá, la cual fue obtenida a partir de un fruto de cacao y es la única reportada hasta el momento para el departamento sin considerar factores ambientales en el muestreo (Decloquement et al., 2021; Ramírez et al., 2021; Robideau et al., 2011) con los modelos evolutivos ML, IB y MP.

Tabla 3-1: Consolidado de aislados totales por municipio y temporada

Municipio	Temporada		Total
	Seca	Lluvias	
Belén	14	16	30
Montañita	12	16	28
Paujil	16	16	32
Doncello	8	16	24
Total	50	64	114

*Nota: Los datos registrados representan el número total de aislados de *Phytophthora* spp., obtenidos en cada uno de los municipios (Belén, La Montañita, El Paujil, El Doncello) para dos temporadas climáticas.*

Los tres modelos evolutivos dieron como resultado topologías de árboles similares, sin embargo, el árbol filogenético concatenado con el modelo evolutivo ML con valores de ajuste de ML y MP mostraron valores representativos entre 60 y 100%, exhibiendo una estructura semejante a topologías previamente reportadas para el género (Abad et al., 2023; Robideau et al., 2011; Yang et al., 2017) con nueve clados que agruparon las especies asertivamente (Figura 3-3), respecto a los árboles elaborados con una región de manera individual, estos autores han identificado los árboles filogenéticos concatenados muestran clados bien estructurados dentro del género *Phytophthora*. Información como la longitud, sitios conservados, sitios variables, sitios informativos y modelo de sustitución para ML se encuentran consolidados en la Tabla 3-3-2.

Teniendo presente lo anterior, delimitando la identificación a las regiones ITS1-5.8S-ITS2 completa y COXI parcial, concatenadas; y con la información disponible en bases de datos en línea a la fecha, se identificó *P. palmivora*, ubicada en el clado 4 y con valores de ajuste ML / MP de 96,3% / 62,8%, respectivamente (Figura 3-3). No obstante, se deben tomar en consideración los reportes previos de literatura donde se han registrado especies encriptadas o no resueltas por algunas regiones genómicas, por lo que no se descarta la posibilidad de que a futuro puedan ser identificadas otras especies, utilizando otro tipo de marcadores o genomas completos en los 114 aislados estudiados (Robideau et al., 2011; Zambounis et al., 2016).

Adicionalmente, Ramírez et al. (2021) había identificado un aislado obtenido a partir de fruto como *P. palmivora* en Caquetá, este registro se complementa con la información adquirida en la presente investigación, fortaleciendo así la evidencia de la presencia de esta especie en la región Amazónica (Figura 3-3).

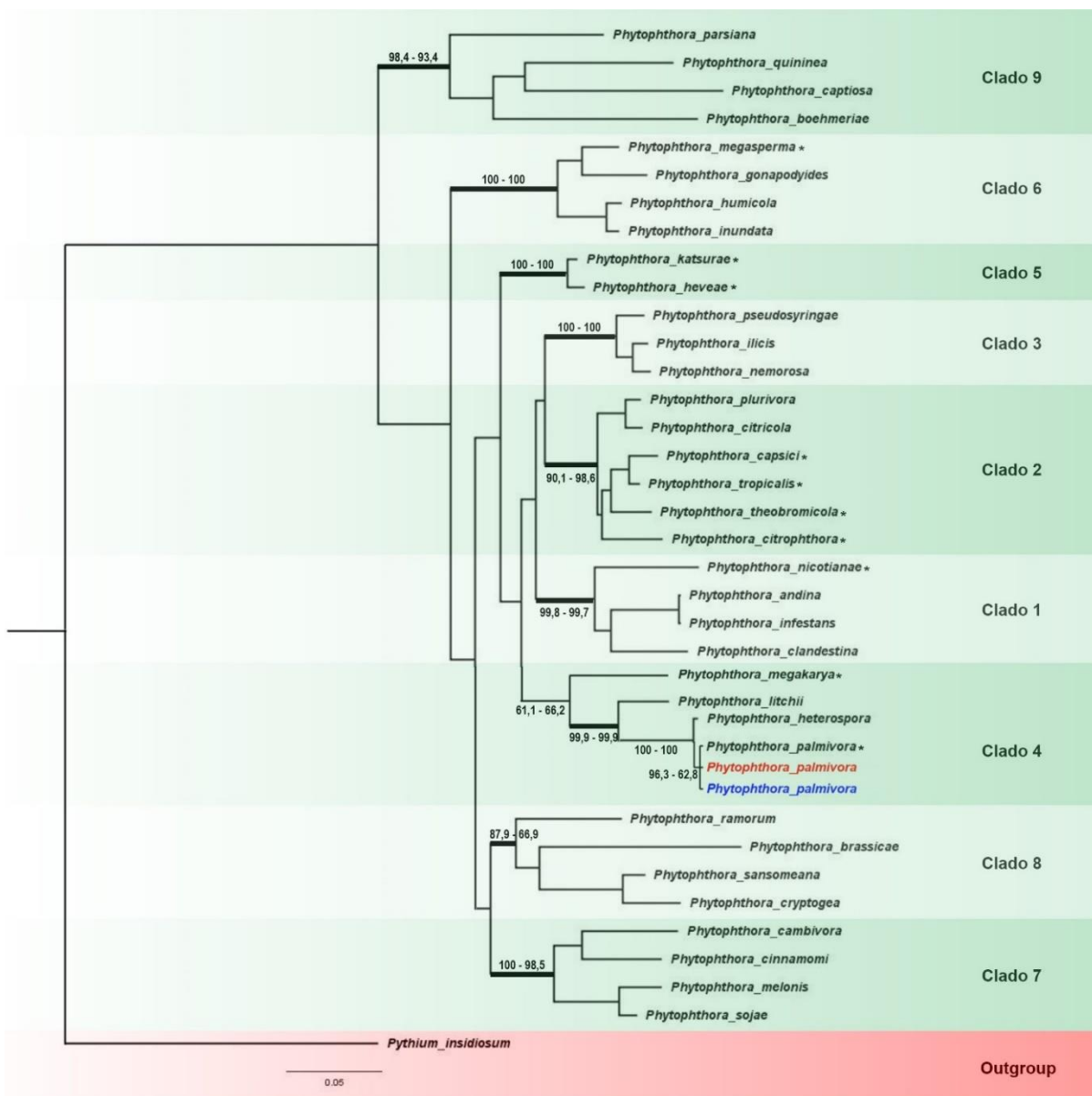
Tabla 3-2: Consolidado de información en los análisis filogenéticos para cada región

ITS	Longitud (pb)	813
	C	379
	V	414
	Pi	267
	Modelo	HKY+G
COX I	Longitud (pb)	590
	C	432
	V	158
	Pi	116
	Modelo	GTR+G+I
Concatenado	Longitud (pb)	1600
	C	865
	V	688
	Pi	446
	Modelo	GTR+G+I

Nota: ITS: espaciador interno transcrito ITS1-5.8S- ITS2; COXI: Subunidad I de Citocromo Oxidasa; C: sitios conservados; V: sitios variables; Pi: sitios informativos filogenéticos. Modelos de sustitución aplicados para Máxima Verosimilitud

P. palmivora se ha catalogado como la especie más ampliamente distribuida en áreas productoras de cacao alrededor del mundo (Ali et al., 2017; Surujdeo et al., 2016). En oomycetos que afectan cacao en Colombia *P. palmivora* y *P. nicotianae*, Ramírez et al. (2021) reportó estas especies con una participación de distribución del 54 – 1% respectivamente, en los departamentos con mayor participación de productividad de cacao en el país, también es importante destacar la posibilidad de reportar nuevas especies (5%) en los departamentos de Caldas, Meta y Arauca a partir de secuencias obtenidas de aislados en hojas y frutos (Ramírez et al., 2021).

Figura 3-3: Árbol de Máxima verosimilitud con secuencias concatenadas



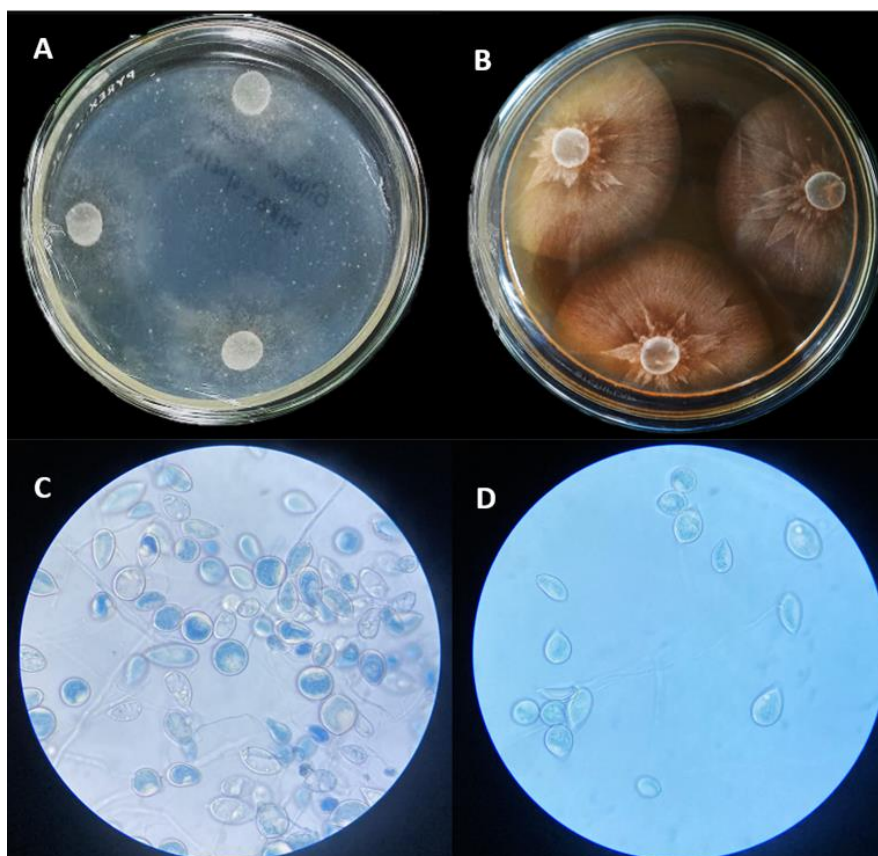
Nota: Árbol de máxima verosimilitud que muestra la distribución de la secuencia consenso de *Phytophthora* spp., de Caquetá en relación con especies de referencia, construido utilizando secuencias concatenadas de ITS y COXI. Las longitudes de las ramas son proporcionales a la distancia filogenética. Los valores de ajuste ML/MP se indican en los nodos. El árbol tiene sus raíces en *Pythium insidiosum*. (*): especies patógenas en Cacao; Rojo: Secuencia consenso Caquetá obtenida en este estudio; Azul: Secuencia Caquetá previamente reportada (Ramírez et al., 2021).

3.2.2 Identificación morfológica

Durante el proceso de aislamiento del oomicete a partir de tejido vegetal, el medio de cultivo con el que se obtuvieron los mejores resultados fue CMA-PARPB, ya que, demostró ser altamente selectivo al favorecer el crecimiento de *Phytophthora* spp., inhibiendo de manera efectiva el desarrollo de otros microorganismos como bacterias y hongos verdaderos en nueve de cada diez aislamientos. Este medio ha sido catalogado como una excelente opción para el aislamiento selectivo de varias especies de *Phytophthora* de tejidos vegetales y suelo (Tillery, 2013). Sin embargo, para este estudio en el medio CMA-PARPB no se identificaron colonias características del patógeno para su identificación morfológica, solo es observado micelio algodonoso disperso (Figura 3-4A) con abundancia de esporangios (Figura 3-4 C), por lo tanto, el medio CMA-PARPB fue utilizado para los montajes en microcultivos, con el propósito de obtener una cantidad considerable de esporangios en las observaciones bajo microscopio.

Por otra parte, el medio V8-RPBH fue un medio útil para la caracterización del patrón morfológico de las colonias de *Phytophthora* spp. (Figura 3-4B), el jugo V8 como ingrediente principal está compuesto por una mezcla de tomates, zanahorias, apio, remolacha, perejil, lechuga, berros, espinacas, sal, ácido ascórbico y ácido cítrico, por esta razón el medio V8 es el medio más utilizado para cultivar *Phytophthora* spp., e identificar el carácter morfológico del patógeno, el cual es exigente nutricionalmente (Hardina et al., 2020), sin embargo, durante la investigación se evidenció que la producción de esporangios es reducida respecto al medio CMA-PARPB (Figura 3-4D).

Figura 3-4: Aislados de *Phytophthora palmivora*., provenientes de frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en dos medios semiselectivos y montajes para microscopía.

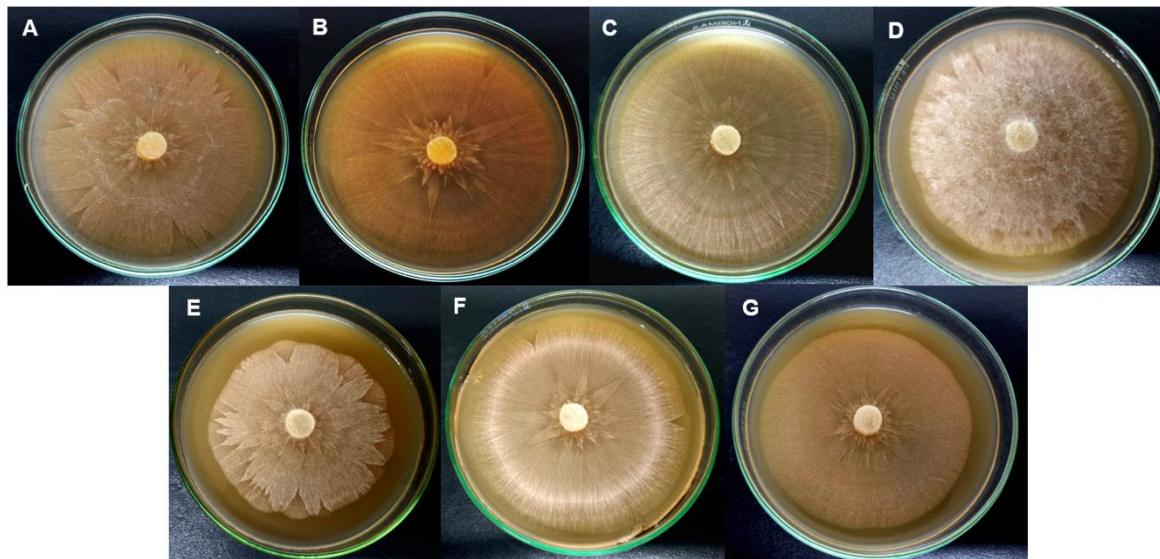


Nota: Colonias de *Phytophthora palmivora* en medios semiselectivos obtenidas en este estudio, A: CMA-PARPB y B: V8-RPBH; Visualización microscópica de, C: Esporangios de *Phytophthora palmivora* en medio CMA-PARPB (40X) y D: Esporangios de *Phytophthora palmivora* en medio V8-RPBH (40X).

▪ Caracterización macroscópica

La morfología de la colonia se caracterizó por micelios hialinos y blanquecinos con apariencia similar al algodón, presencia variable de micelio aéreo tanto en cantidades limitadas como abundantes en el área central o en los extremos de la colonia claramente definido y, patrón morfológico estrellado o sin patrón distintivo (SPD) (Figura 3-5).

Figura 3-5: Patrón morfológico de colonia de *P. palmivora* en medio V8-RPBH en Caquetá



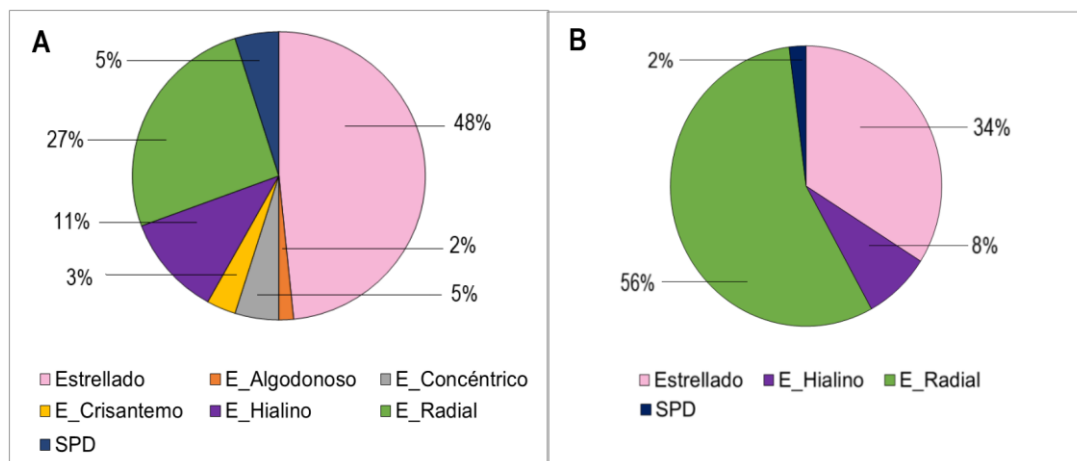
Nota: Morfología de colonia de *P. palmivora* identificada en dos temporadas climáticas en cuatro municipios de Caquetá según la clave lúcida propuesta por (Abad et al., 2023) y patrones morfológicos propuestos por (Patil et al., 2022), A: Estrellado; B: Estrellado hialino; C: Estrellado radial; D: Estrellado algodonoso; E: Estrellado crisantemo; F: Estrellado concéntrico, G: Sin patrón distintivo.

En la caracterización morfológica de colonias aisladas de *P. palmivora* (n = 114) en medio V8, se observó gran variabilidad en el patrón de colonias en función de la temporada, identificando siete grupos distintos (Figura 3-5). En Ts, *Phytophthora* spp. expresó cuatro tipos de colonias: estrellado, estrellado hialino, estrellado radial y sin patrón distintivo (SPD). En TII adicional a las morfologías encontradas en las colonias de Ts se evidenciaron otros tres patrones: estrellado concéntrico, estrellado crisantemo y estrellado algodonoso.

Aunque la diversidad de patrones morfológicos de colonia es mayor en TII respecto a Ts, Patil et al., (2022) indicó que no hay correlaciones claras entre la morfología y el origen geográfico de los aislados, por lo tanto, el comportamiento de estas morfologías puede relacionarse con la adaptación a factores ambientales, ya que, afirma que las colonias de

patrón estrellado y estrellado radial presentan tasas de crecimiento más rápidas (5.73 ± 0.03 y 5.66 ± 0.03 , respectivamente), a diferencia de aislados con patrón floral o crisantemo (5.03 ± 0.03) los cuales se caracterizan por presentar crecimiento lento.

Figura 3-6: Porcentajes de diferentes patrones morfológicos de *P. palmivora* identificados durante Temporada de Lluvias y Temporada Seca en Caquetá.



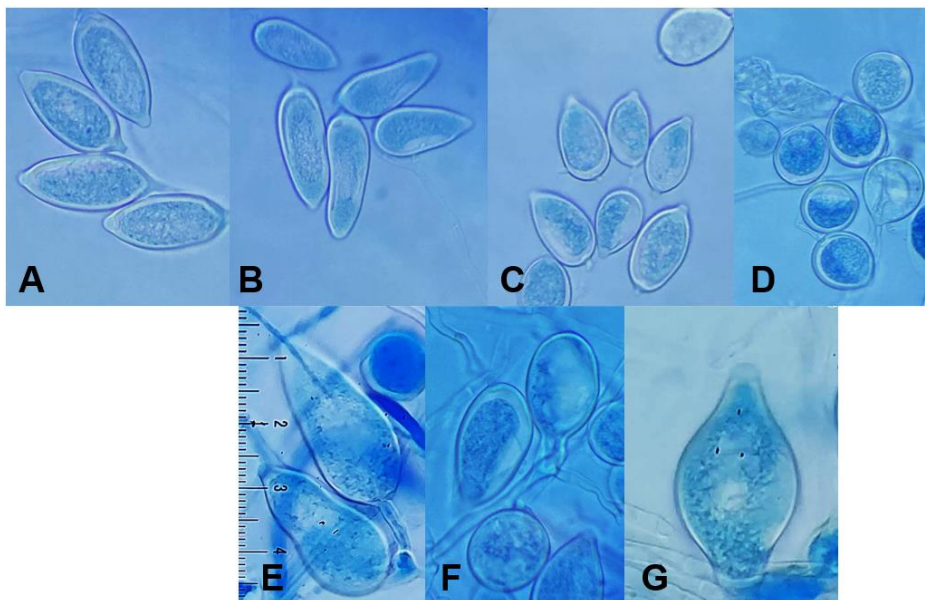
Nota: Los porcentajes representan la proporción de cada patrón morfológico con respecto al total de observaciones en: A: Temporada de Lluvias; B: Temporada Seca. La letra "E" como inicial: Estrellado; SPD: Sin patrón distintivo.

En relación con lo anteriormente expuesto, el patrón morfológico Estrellado y Estrellado Radial son los más comunes durante las dos temporadas, representando el 48 y 27% en Tll (Figura 3-6A), y 34 y 56% en Ts, respectivamente (Figura 3-6B). Esta tendencia morfológica en las colonias para las dos temporadas, especialmente con mayor distribución en Ts, la cual ha sido reportada como una estrategia adaptativa a las altas temperaturas, ya que, el oomycete fomenta su crecimiento para garantizar su supervivencia a través del tiempo, mediante la producción efectiva de propágulos latentes en los cultivos (Patil et al., 2022).

▪ Caracterización microscópica

En esta caracterización se observaron siete grupos morfológicos en el esporangio en función de la temporada climática, así: Limoniforme, Elongado, Ovoide, Globoso, Elipsoide, Obovoide y Piriforme (Figura 3-7), encontrando una mayor distribución de estructuras en la Ts, donde predominan morfotipos como el ovoide (40%), Limoniforme (30%) y elipsoide, elongado, globoso, obovoide (30%) (Figura 3-8B). En TII dicha variabilidad se redujo conformando dos grupos principales, donde predominaron los morfotipos Ovoide (49%) y elipsoide (37%), y elongado, globoso, obovoide, limoniforme, piriforme (14%) (Figura 3-8A).

Figura 3-7: Morfotipos de esporangios de *P. palmivora* identificados en Caquetá



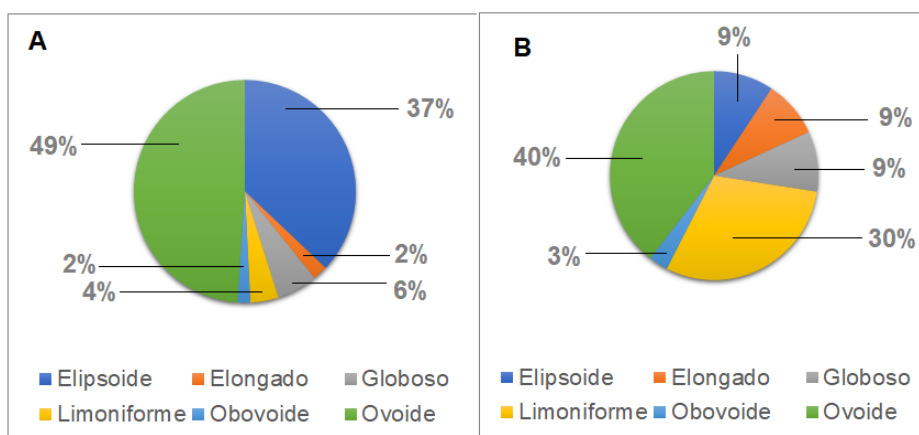
Nota: Morfología del esporangio según la clave lúcida propuesta por (Abad et al., 2023) en aislados de *P. palmivora* en dos temporadas climáticas en cuatro municipios de Caquetá, A: Limoniforme; B: Elongado; C: Ovoide; D: Globoso; E: Elipsoide; F: Obovoide; G: Piriforme.

La variación distintiva de los morfotipos en los esporangios de *Phytophthora* spp. puede estar relacionada a factores diferenciales como la altitud, temporadas climáticas y tolerancia a las altas temperaturas (Patil et al., 2022). La distribución de esporangios

limoniformes (63%) y ovoides (63%) en Ts se desarrollaron especialmente en el gradiente altitudinal entre 200 – 550 msnm (Figura 3-9), de la misma manera, la distribución del morfotipo ovoide (70%) y elipsoide (72%) en TII ocurrió en el mismo gradiente altitudinal (Figura 3-10).

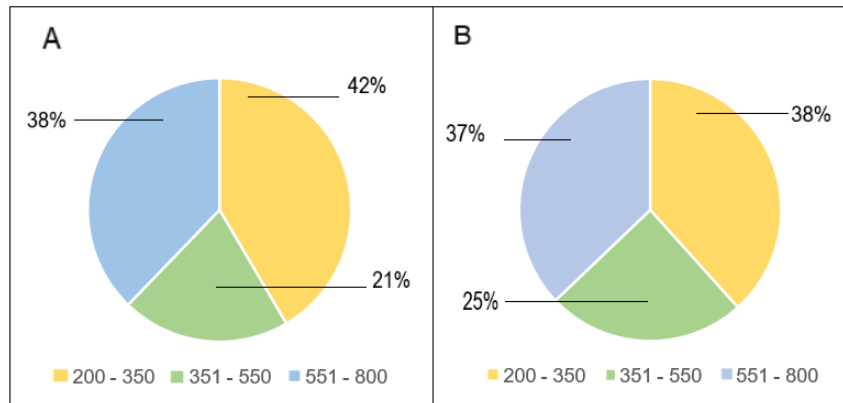
Según el IGAC, (2021) este gradiente se caracteriza por ser cálido, con temperatura máxima de 33°C (IDEAM, 2022). En consecuencia, posiblemente los morfotipos limoniforme, ovoide y elipsoide de los esporangios de *P. palmivora* en Caquetá son la respuesta adaptativa al estrés térmico, de esta manera, la temperatura y la altitud serían factores determinantes en la morfología de estas estructuras.

Figura 3-8: Distribución de los morfotipos de esporangios de *P. palmivora* en Caquetá



Nota: Distribución de los morfotipos en función de dos temporadas climáticas TII (A) y Ts (B) para cuatro municipios del departamento del Caquetá.

Por otra parte, estudios hechos en Colombia ratifican que los esporangios ovoides son los más abundantes junto con el morfotipo elipsoide (Palacios et al., 2021; Ramírez et al., 2021). Adicionalmente, otras investigaciones realizadas en Brasil, Indonesia y África han descrito este morfotipo como el más frecuente en *P. palmivora* (Akrofi et al., 2015; Ali et al., 2017; Decloquement et al., 2021; McMahon & Purwantara, 2004). Estos reportes coinciden con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que los esporangios ovoides se distribuyeron homogéneamente entre las temporadas (Figura 3-8) y gradientes altitudinales (Figura 3-9 y Figura 3-10).

Figura 3-9: Morfología de esporangios con mayor distribución en temporada seca

Nota: Distribución de los morfotipos Limoniforme (A); Ovoide (B) en función del gradiente altitudinal en temporada seca.

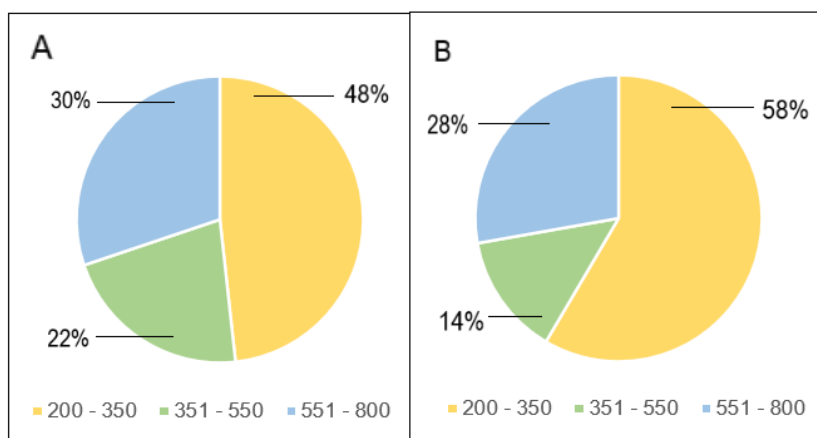
No obstante, la predominancia de esporangios globosos en el municipio de Belén con el 45% (Tabla 3-3) del total los esporangios catalogados en esta morfología, surgió la hipótesis de que posiblemente se tratara de *P. megakarya* (Abad et al., 2023). De igual manera, el morfotipo obovoide sobresalió en el municipio de La Montañita con 44% (Tabla 3-3), morfología característica de las especies *P. citrophthora* y *P. nicotianae* (Abad et al., 2023). Adicionalmente, los esporangios piriformes predominaron en el municipio de El Paujil con 45% (Tabla 3-3); morfotipo representativo de *P. capsici* (Abad et al., 2023).

De acuerdo con lo anterior y calculado para todos los municipios, el marcador morfológico “esporangios”, evidencia presuntivamente cuatro especies de *Phytophthora* (*Phytophthora citrophthora* y *P. nicotianae* 3%, *Phytophthora megakarya* 10% y *Phytophthora capsici* 3%), junto a *P. palmivora* quien morfológicamente tuvo una frecuencia de 84%.

Teniendo presente los hallazgos morfológicos, tradicionalmente la taxonomía del género se basaba en dichos caracteres, sin embargo, se han reportado incongruencias entre la filogenia molecular y la taxonomía basada en la morfología, ya que, la plasticidad en los caracteres morfológicos entre las especies es significativa y “la dificultad para obtener

datos morfológicos importantes puede perjudicar la identificación precisa de las especies, por consiguiente, para lograr identificar de manera concreta especies de *Phytophthora* spp., es necesario utilizar técnicas de identificación molecular” (Yang et al., 2017).

Figura 3-10: Morfología de esporangios con mayor distribución en temporada de lluvias



Nota: Distribución de los morfotipos Ovoide (A); Elipsoide (B) en función del gradiente altitudinal en temporada de lluvias.

Tabla 3-3: Porcentajes de participación por morfotipo en los municipios objeto de estudio

MORFOTIPO (%)	MUNICIPIO			
	BELÉN	DONCELLO	MONTAÑITA	PAUJIL
ELIPSOIDE	20	27	25	28
ELONGADO	14	19	25	42
GLOBOSO	45	17	22	16
LIMONIFORME	31	17	20	32
OBOVOIDE	18	19	44	19
OVOIDE	28	19	27	26
PIRIFORME	28	23	5	45

Nota: Cifras en porcentaje (%) de los morfotipos identificados en el área de estudio en dos temporadas climáticas.

Lo reportado por Yang et al., (2017) se articula con los resultados de esta investigación, debido a que la identificación morfológica expresó la posibilidad de identificar cinco especies asociadas a *Phytophthora* spp., pero los resultados obtenidos en filogenia molecular con las regiones ITS y COXI reveló que se trataba de *P. palmivora*.

▪ Dimensiones de las estructuras asexuales

Se determinaron el largo, ancho y longitud de papila (Figura 3-11), observándose de forma general que el tamaño de estas estructuras variaba significativamente dependiendo de la temporada. El tamaño de los esporangios en Ts osciló entre 42,56 - 50,57 μm (L) x 24,71 – 26,01 μm (A) (promedio 46,26 x 25,44 μm), con una relación L/A de 1,81 μm . En temporada de lluvias, las dimensiones disminuyeron significativamente, en un rango de 22,14 – 39,63 μm (L) x 12,88 – 24,05 μm (A), (promedio 26,93 x 15,82 μm) con relación L/A de 1,702 μm (Tabla 3-4).

Tabla 3-4: Diferencia de medias entre las dimensiones de los esporangios de *P. palmivora*.

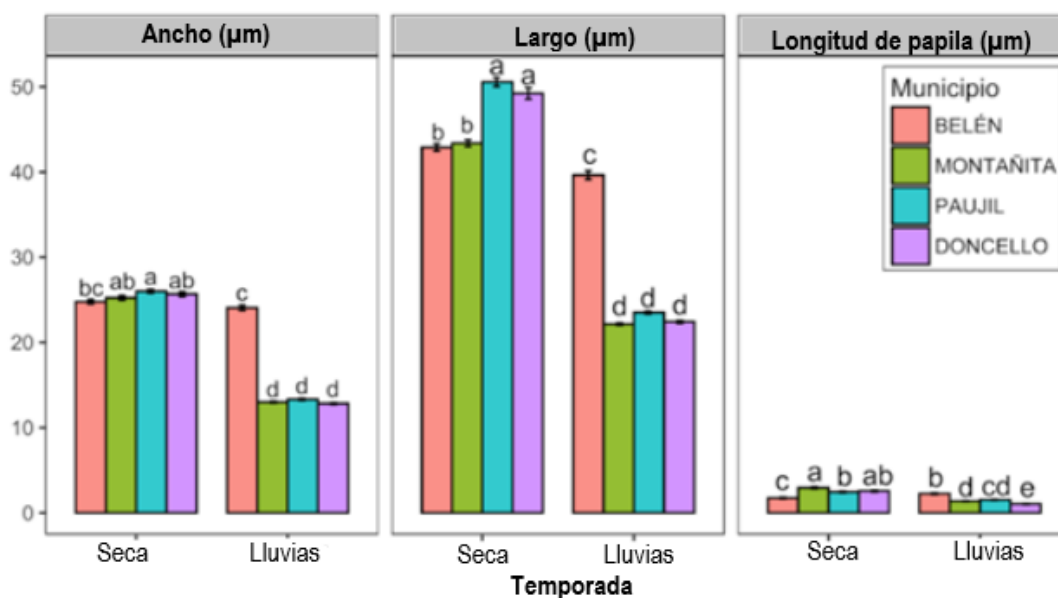
Temporada	Largo (L)	Ancho (A)	L/ A	Long de papila	Tukey (0,05)
Seca	46.26	25.44	1.818	2.44	A
Lluvias	26.93	15.82	1.702	1.57	B

Nota: Prueba Tukey de las variables largo, ancho y longitud de papila en relación con las temporadas climáticas (Seca y Lluvias) ($p < 0,05$), letras diferentes en diferencias significativas.

La longitud de papila presentó dimensiones entre 1,74 y 2,64 μm para Ts, donde predominó el esporangio semipapilado con 41.80%, seguido de no papilado (29.35 %) y papilado (28.85 %). En TII la longitud de papila disminuyó significativamente, a un rango de 1,07 – 2,26 μm , manteniendo la predominancia de la forma semipapilados (52,98 %), seguido de no papilados (37,54 %); en contraste, la forma papilada redujo considerablemente las observaciones (9,48%) aproximadamente en un 20%.

Como se mencionó anteriormente, Ts es la temporada climática donde se alcanzan los valores máximos para las variables evaluadas, siendo significativamente diferente en TII, sin embargo, aunque se presentaron diferencias significativas por temporada, no se puede discriminar estadísticamente entre el ancho largo de dichas estructuras en cada uno de los municipios ya que se comportan estadísticamente igual ($p > 0.05$) (Figura 3-11) a excepción de Belén, municipio en el que los esporangios mantuvieron su tamaño estable en las dos temporadas climáticas.

Figura 3-11: Dimensiones de los esporangios de *P. palmivora* en Caquetá.



Nota: Diferencia de medias del largo, ancho y longitud de papila (µm) del esporangio de *P. palmivora* aislada de cuatro municipios del departamento del Caquetá en temporada seca y de lluvias (Tukey; p valor $< 0,05$). Las letras repetidas indican ausencia de diferencias significativas (Tukey; p valor $> 0,05$).

Esto se relaciona con las condiciones climáticas que experimentó el departamento del Caquetá en Ts del año 2022, donde se alcanzó temperatura máxima de 33°C, un factor abiótico que contrasta con el rango de temperatura óptimo de crecimiento de *P. palmivora* (29 a 30 °C), si bien el patógeno sobrevive a estas temperaturas, se ve sometido a estrés térmico; autores como Puig et al. (2018) plantean que este patógeno cuando se somete a este tipo de estrés, aumenta la concentración de elementos básicos

para el metabolismo y el crecimiento, como la glucosa y la glutamina, los cuales, contribuyen a un crecimiento más vigoroso de las estructuras del patógeno. Estos hallazgos se relacionan al comportamiento en el aumento del tamaño de los esporangios de *P. palmivora* aislados en la Amazonia en temporada seca, posiblemente como una adaptación al estrés térmico experimentado durante esta época del año.

No obstante, en TII el largo y ancho se reducen en un 41 y 37% respectivamente, sin variar significativamente entre municipios a excepción de Belén el cual se comporta estadísticamente igual en las dos temporadas en cuanto al largo, ancho y longitud de papila, a diferencia La Montañita, El Paujil y El Doncello, en donde no varió significativamente (Figura 3-11). En el municipio de Belén, los cultivos estaban bajo condiciones de plena exposición solar, acompañado de árboles maderables dispersos y predominancia del genotipo ICS-95 sin asociación agroforestal, algo que contrastó con los municipios de La Montañita, El Paujil y El Doncello, donde los cultivos de cacao estaban bajo sistemas agroforestales (SAF) asociados con caucho, cedro y especies de palmas.

Esta situación de monocultivo donde predomina la alta radiación solar genera un aumento de temperatura entre 6 y 8 °C hasta alcanzar una temperatura a mediodía de 32°C (Siebert, 2002), induciendo a *P. palmivora* a estrés térmico en temporada de lluvias, ya que la temperatura y la humedad relativa se mantienen constantes durante ambas temporadas debido a la ausencia de cobertura forestal (SAF), ya que las copas de los árboles amortiguan condiciones ambientales como las mencionadas anteriormente, reduciendo la temperatura del aire y reteniendo humedad (Jaimes et al., 2022).

4. Caracterización de la patogenicidad y severidad *in vitro* de aislados de *Phytophthora* en frutos de cacao en el departamento de Caquetá

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Material vegetal de prueba

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en dos clones de cacao: 1) El clon universal CCN 51, el cual, es uno de los más sembrados en el área de estudio, catalogado como material altamente susceptible a *Phytophthora* spp. (Rodríguez, 2015) y, 2) El clon nacional de la compañía Casa Luker, LUKER 40 que es un cruce entre ICS1 X IMC6, clon que se caracteriza por ser parte de la producción del departamento de Santander, al igual que por sus atributos de cacao fino y aroma (Jaimes Agudelo, et al., 2022), sin embargo, no se encuentra información disponible sobre la resistencia enfermedades de este clon.

4.1.2 Inoculación

La patogenicidad y severidad de los aislados de *Phytophthora* spp., se determinaron por inoculación artificial con discos de agar en mazorca desprendida de cacao en un cuarto climatizado del Laboratorio de Ecofisiología Vegetal - Unidad de Apoyo a la Investigación Adaptación de Cacao, manteniendo una temperatura promedio de 26°C y 83% de Humedad Relativa, simulando las condiciones de la región.

- **Preparación de inóculo**

Se seleccionó un aislado por municipio (Belén, La Montañita, El Paujil, El Doncello) y por temporada (Seca, De lluvias), para un total de ocho aislados en medio V8 y se incubaron a 25°C/5 días (Decloquement et al., 2021).

▪ **Preparación de material de prueba**

Se cosecharon mazorcas maduras en etapa 8 según la escala fenológica BBCH propuesta por Niemenak et al., (2010), Posteriormente, las mazorcas se lavaron con agua de grifo y jabón líquido y desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% / 2 min, seguidamente se lavaron con abundante agua para eliminar residuos de hipoclorito y se secaron con toallas de papel (Decloquement et al., 2021) .

Las mazorcas de cacao fueron perforadas con un sacabocados de 5 mm de diámetro en el eje central del fruto y en esta herida se depositó un disco de micelio en medio V8 del mismo tamaño y se selló con cinta de papel, adicionalmente, como tratamiento testigo se utilizaron discos de V8 Agar sin crecimiento micelial. Posterior a la inoculación las mazorcas fueron mantenidas en cámara húmeda durante siete días post-inoculación.

Con el fin de verificar si el agente causante de los síntomas observados fue ocasionado por *Phytophthora* spp., se realizó el re-aislamiento del patógeno de frutos inoculados aplicando la misma metodología planteada para el aislamiento de frutos provenientes del área de estudio.

▪ **Análisis de datos**

La severidad de los aislados se evaluó con un diseño completamente al azar, a partir del día cuatro post-inoculación, tiempo en el que culmina el periodo de incubación e inicia la producción de esporangios (Surujdeo et al., 2016), tomando datos diariamente durante cuatro días hasta el día siete post-inoculación del diámetro horizontal y vertical de la lesión necrótica con calibrador pie de rey digital.

Con los datos recolectados de las medidas del diámetro horizontal y vertical se calculó un promedio de la lesión necrótica para análisis estadístico en el programa The R Project for Statistical Computing (R Project, 2023), en el cual se realizaron las curvas de progreso de la enfermedad para cada aislado inoculado respecto al material vegetal de prueba, con estos valores se aplicaron estadísticos para la comparación de medias que

permitieron determinar las medias significativamente diferentes y finalmente categorizar la virulencia de los aislados.

4.2 Resultados y discusión

Se evidenció que la severidad de la enfermedad varió de forma significativa en función de la temporada climática: Ts (9,11 cm), TII (8,58 cm) (Tabla 4-1) y el clon estudiado: LUKER40 (9,55 cm), CCN51 (8,14 cm) (Figura 4-2B), más no entre municipios. Donde el oomycete alcanzó un diámetro máximo (DM) sobre el genotipo LUKER 40 (14,6 cm) con una tasa de crecimiento diario (TCD) por temporada de entre 1,61 – 2,83 cm (Ts) y 1,68 – 2,52 cm (TII) (Figura 4-1). El genotipo CCN51 presentó un DM de (13,2 cm), el cual demostró ser menos susceptible, con una TCD por temporada entre 1,50 – 2,74 (Ts) 1,59 – 2,39 (TII) (Figura 4-1).

Tabla 4-1: Severidad de *Phytophthora palmivora* en dos temporadas climáticas y dos genotipos de cacao.

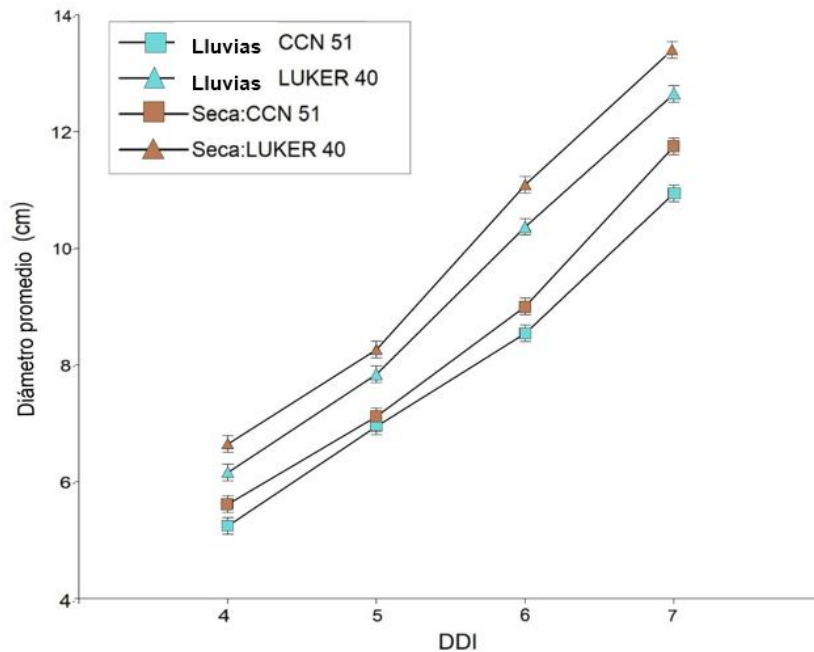
TEMPORADA	CLON	SEVERIDAD (cm)
Lluvias	LUKER 40	9,25 a
	CCN 51	7,91 b
	Promedio	8,58 b
Seca	LUKER 40	9,85 a
	CCN 51	8,37 b
	Promedio	9,11 a
Total, general		8,85

Nota: Diferencia de medias del diámetro en la Severidad (cm), los valores en fila asociados al promedio representan la media por temporada, los valores en columna a excepción de promedio representan las medias de severidad de los clones en relación con la temporada. Las letras diferentes representan diferencias significativas según la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Los aislados de Ts demostraron ser más severos respecto a TII sobre las mazorcas en los dos genotipos seleccionados (Figura 4-2A). Según Desaint et al., (2021) la temperatura es una variable climática crucial en la infección por fitopatógenos, ya que mejora los mecanismos de virulencia propio del oomycete, mediante su adaptación a condiciones de estrés térmico, de igual manera, esta condición propicia la colonización

de patógenos necrotróficos aumentando la necrosis tisular, además, los patógenos pueden reducir el período de incubación, lo cual, puede dar lugar al desarrollo de nuevas cepas que estén mejor adaptadas y más virulentas; sin embargo, se requieren estudios genéticos más robustos que permitan fundamentar dicha afirmación (Singh et al., 2023).

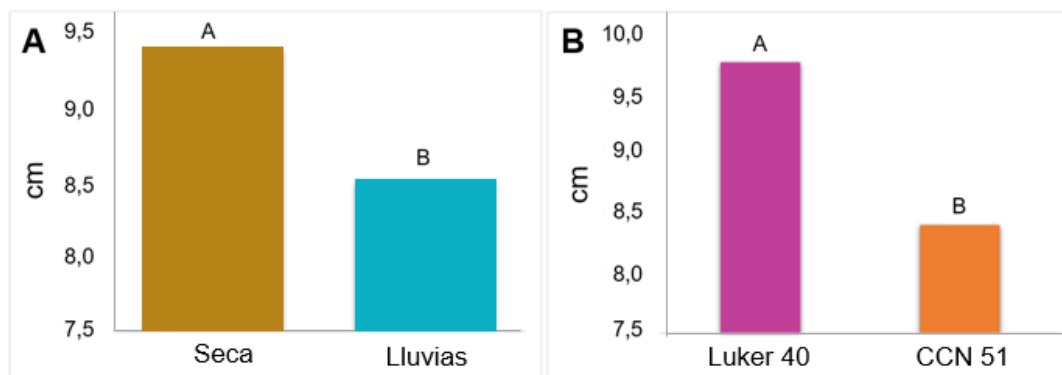
Figura 4-1: Curva de progreso de la enfermedad en dos genotipos de cacao.



Nota: Curva de progreso de la enfermedad pudrición negra del fruto ocasionada por *Phytophthora* spp., en dos genotipos de cacao desde el día 4DDI, hasta el día 7DDI. (DD): Días después de inoculación.

Estudios realizados en Colombia sobre la reacción de *Phytophthora palmivora* en frutos desprendidos de cacao, determinaron que el genotipo CCN51 exhibió el mayor diámetro promedio en lesión con 9,83 cm en el día 6 DDI, catalogándolo como el clon más susceptible (Polanco et al., 2022), sin embargo, la información obtenida en este estudio, en el 6 DDI en el clon CCN 51 el diámetro promedio de la lesión fue de 8,78 cm, y en el clon LUKER 40 para el mismo DDI se reportó 10,73 cm (Tabla 4-2), por lo tanto, el clon CCN 51 mostró ser menos susceptible a *P. palmivora*, respecto a LUKER 40.

Figura 4-2: Diferencia de medias de pruebas de patogenicidad de *P. palmivora* en dos genotipos de cacao.



Nota: Diferencia de medias en el diámetro (cm) de manchas necróticas ocasionadas por *P. palmivora* sobre dos genotipos (LUKER 40 y CCN 51) en función de la temporada climática (Ts y TII); Tukey ($p < 0,05$).

Aunque en Colombia no se ha registrado información sobre el comportamiento de la patogenicidad de *Phytophthora* spp. sobre LUKER 40, el centro de investigaciones CATIE de Costa Rica reportó los clones ICS1 e IMC6 como susceptibles a la enfermedad (Fister et al., 2020), los cuales son el material vegetal utilizado para el cruce de LUKER 40 (Jaimes, Agudelo, et al., 2022), este reporte podría soportar el comportamiento de lesiones necróticas de mayor tamaño en este clon a comparación de CCN 51.

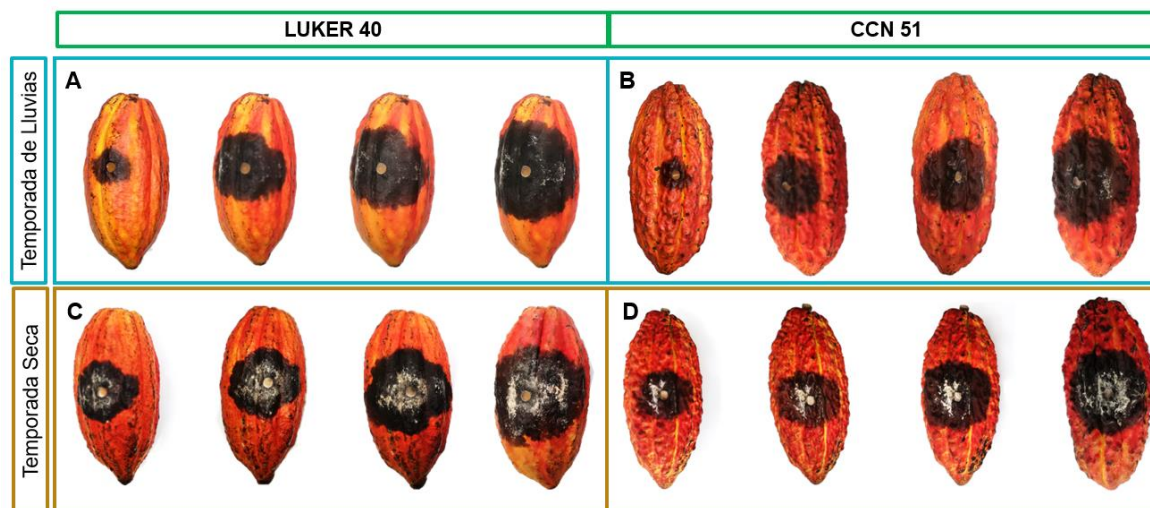
Tabla 4-2: Diámetro de manchas necróticas ocasionadas por *Phytophthora palmivora* aislada en Caquetá en frutos desprendidos de dos clones de cacao a los cuatro, cinco, seis y siete días después de la inoculación.

Clon	Días después de la inoculación			
	4	5	6	7
CCN 51	5,43 a	7,03 a	8,78 a	11,34 a
LUKER 40	6,4 a	8,05 a	10,73 b	13,03 b

Nota: letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas identificadas en la prueba de Tukey (p valor $< 0,05$).

En lo que se respecta a los síntomas y signos de la enfermedad, estos iniciaron como una mancha de color castaño oscuro, después, de observados los primeros síntomas en el día 4 después de la inoculación, la lesión avanzó progresivamente hasta el día 7 tomando una coloración negra para los dos clones y los aislados (Ts y TII). Sin embargo, los signos de los aislados de Ts se manifestaron en el día cuatro con mayor proporción de micelio pulverulento en la superficie del fruto (Figura 4-3 C - D). A diferencia de los aislados de TII (Figura 4-3 A - B), donde se identificaron signos a partir del día 5 con micelio disperso en menor proporción a comparación de Ts. De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos coinciden con lo planteado por Singh et al. (2023), quienes reportan que los aislados de Ts inician el periodo de latencia primero de que los aislados de TII.

Figura 4-3: Pruebas de patogenicidad en dos genotipos de cacao inoculados con aislados de dos temporadas climáticas de progreso de la enfermedad en dos genotipos de cacao.



Nota: Síntomas y signos observados en las pruebas de patogenicidad en los genotipos Luker 40 y CCN 51 desde el día 4 al día 7 (izquierda a derecha), con aislados de temporada seca (Ts) y temporada de lluvias (TII). A: Luker 40/TII; B: CCN 51/TII; C: Luker 40/Ts; D: CCN 51/Ts.

5. Determinar la distribución e incidencia de especies de *Phytophthora* en municipios seleccionados del departamento de Caquetá

5.1 Materiales y métodos

5.1.1 Georreferenciación y procesamiento de coordenadas

La georreferenciación de los puntos de muestreo se realizó con Gps GARMIN al mismo tiempo en el que se llevó a cabo la recolección de muestras en las 16 fincas orgánicas certificadas por los sellos NOP-USDA y EU-ORGANIC. Las coordenadas se procesaron en el programa de información geográfica QGis, permitiendo visualizar la ubicación y la distribución del patógeno en los municipios objeto de estudio en el departamento del Caquetá.

5.1.2 Determinación de la incidencia

En las fincas seleccionadas la recolección de muestras y toma de datos se realizó por medio de un muestreo probabilístico, el cual es un criterio de distribución de los sujetos a estudio (árboles) en diagonal en forma de (X) en el cultivo de cacao (Otzen & Manterola, 2017). Los cultivos en las fincas seleccionadas ocuparon un área de 1 ha, con distancias de siembra de 3m x 3m (ocasionalmente 4m x 4m) y con un promedio de 600 a 800 plantas/ha.

- **Incidencia**

Este concepto se aplicó para calcular la incidencia en frutos de cacao, estimando la proporción de frutos enfermos / árbol, en relación con el total de frutos / árbol en el momento de la evaluación, así mismo, Madden & Hughes, (1999) plantean esta variable como: “Binaria, es decir, una unidad de planta está visiblemente enferma o no. La incidencia de las enfermedades en plantas se puede definir como el número de unidades que están visiblemente enfermas, en relación con el número total evaluado” (Ecuación 1).

$$INCIDENCIA = \frac{ME}{MT} \times 100$$

Ecuación 1: Dónde, ME = número de frutos enfermos por árbol y MT = número total de frutos por árbol (Madden & Hughes, 1999).

- **Análisis de datos**

El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa The R Project for Statistical Computing (R Project, 2023), en el cual se aplicaron estadísticos para la comparación de medias que permitieron determinar las medias significativamente diferentes y finalmente categorizar la incidencia de la enfermedad en condiciones de campo con relación a la temporada y las variedades identificadas en los cultivos de cacao.

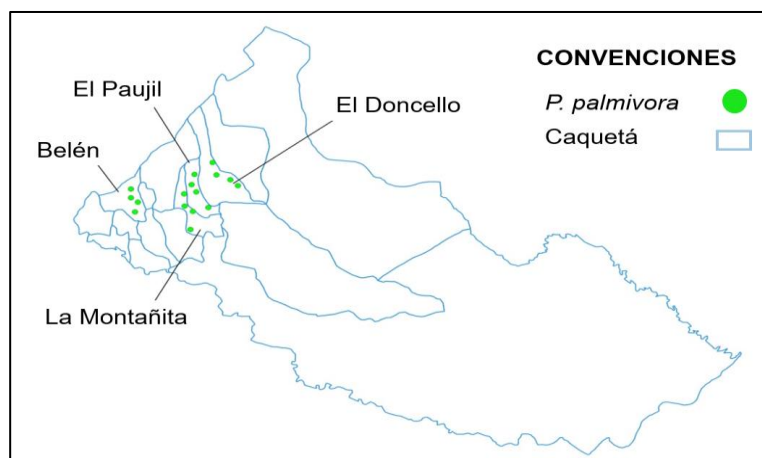
5.2 Resultados y discusión

Por medio de las coordenadas tomadas en campo durante el muestreo y recolección de datos, se elaboró un mapa que representa la distribución geográfica de *P. palmivora* mediante técnicas de identificación molecular (Figura 5-1), adicional a esta especie, con técnicas de identificación morfológica fueron identificadas las especies *P. megakarya* en Belén, *P. citrophthora* y *P. nicotianae* en La Montañita y, *P. capsici* en El Paujil (Figura 5-2) como causantes de Pudrición negra del fruto de cacao en el departamento de Caquetá. La identificación taxonómica ayuda a diseñar estrategias de control focalizadas

en contrarrestar la propagación y los efectos adversos que ocasiona el oomicete en la producción cacaotera local.

Al analizar la incidencia de la pudrición negra del fruto en Ts y TII seleccionando las variedades más sembradas en el área de estudio como: CCN 51, Híbridos, ICS 1, ICS 95, TSH 565, se observaron diferencias significativas entre temporadas (Figura 5-3) y el gradiente altitudinal (Figura 5-4) ($p < 0,05$), sin embargo, las cinco variedades estudiadas y los municipios se comportaron estadísticamente igual ($p > 0,05$).

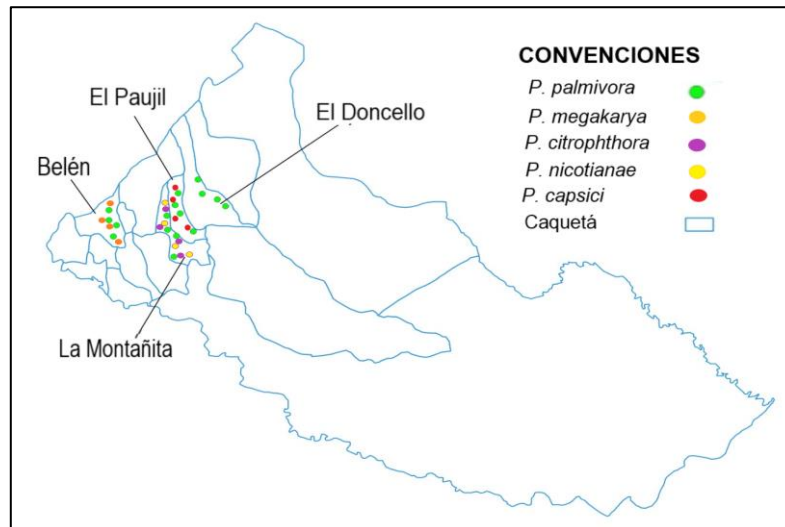
Figura 5-1: Distribución geográfica de *P. palmivora* en los sitios de muestreo en Caquetá en relación con la caracterización molecular.



Nota: Se muestran las divisiones administrativas (municipios) del departamento con sus respectivos nombres donde se recolectaron las muestras. Los puntos representan sitios de muestreo.

La TII mostró mayor tasa de incidencia (7,16%) respecto a Ts (4,33%) (Tabla 5-1), debido a que la tasa de incidencia de *Phytophthora* spp., en cultivos de cacao crece de forma proporcional con el aumento de las lluvias, la humedad relativa y baja temperatura (Ndoumbé et al., 2010). Durante esta temporada (TII) las condiciones ambientales en Caquetá se asemejan a la información reportada por el autor, la temperatura osciló entre 19 - 21°C, con humedad relativa del 80 – 87% y presencia de lluvias de 15 – 20 días en los meses de julio - agosto con precipitaciones de 450 y 350 mm respectivamente (IDEAM, 2022).

Figura 5-2 Distribución geográfica de *Phytophthora* spp. en los sitios de muestreo en Caquetá en relación con la caracterización morfológica.



Nota: Se muestran las divisiones administrativas (municipios) del departamento con sus respectivos nombres donde se recolectaron las muestras. Los puntos representan sitios de muestreo.

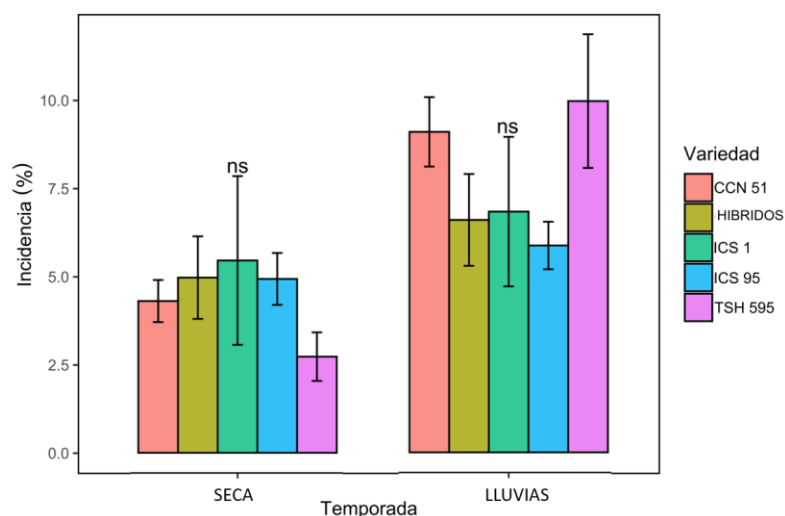
Según Jaimes et al., (2022), *Phytophthora palmivora* está influenciada positivamente por las condiciones de lluvias, especialmente cuando la temperatura es inferior a 20°C y la humedad relativa es superior al 85%. En este sentido, la humedad y las lluvias fueron los principales factores abióticos que actuaron como agentes de propagación, fomentando la incidencia del oomycete durante la TII en Caquetá (Rodríguez, 2015) (Figura 5-3), dado a que la infección se genera a través del inóculo que proviene de tejidos infectados, del suelo o el aire, llegando a tejidos sanos mediante la lluvia o las salpicaduras de agua, lo que beneficia especialmente la propagación, germinación, penetración y colonización de zoosporas móviles biflageladas en el cultivo que pueden nadar activamente mediante películas de agua, lo que permite al patógeno seleccionar su sitio de infección (frutos y tallo) (Kasteel et al., 2023; Surujdeo et al., 2016).

Tabla 5-1: Incidencia de *Phytophthora palmivora* en dos temporadas climáticas en tres gradientes altitudinales en Caquetá

TEMPORADA	ALTITUD (msnm)	INCIDENCIA (%)
Lluvias	551_800	10,56 a
	351_550	6,38 b
	200_350	5,31 bc
	Promedio	7,16 a
Seca	551_800	3,84 b
	351_550	5,16 a
	200_350	4,35 a
	Promedio	4,33 b
Promedio Total		5,87

Nota: Diferencia de medias de la Incidencia (%), los valores en fila asociados al promedio representan la media por temporada, los valores en columna a excepción de promedio representan las medias del gradiente altitudinal en relación con la temporada. Las letras diferentes representan diferencias significativas según la prueba Tukey ($p < 0.05$).

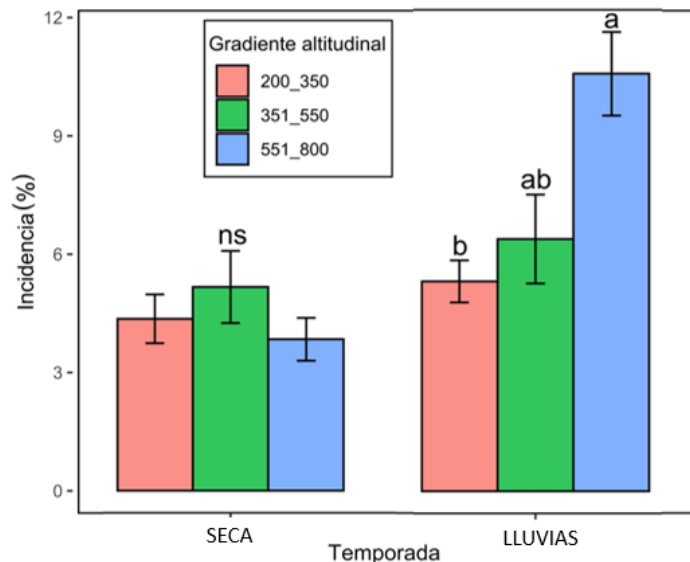
Figura 5-3: Incidencia de *P. palmivora* en genotipos de cacao para dos temporadas climáticas en Caquetá.



Nota: Comportamiento de la incidencia de *P. palmivora* en tres gradientes altitudinales en TII y Ts. ns: no significativo en temporada seca, prueba Tukey ($p > 0,05$). En temporada de lluvias si hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) según los gradientes altitudinales.

Adicionalmente, la altura en la cual se ubican los cuatro municipios estudiados influye significativamente sobre la incidencia de la enfermedad en función del menor gradiente (200-300 msnm) y el mayor gradiente altitudinal (551-800 msnm) en temporada de lluvias (p valor <0.05), siendo este último gradiente aquel que presenta la mayor incidencia (10%) (Figura 5-3) (Tabla 5-1), por lo tanto, la altitud podría ser un factor importante en la incidencia de la enfermedad, ya que, a mayor altura, la temperatura del aire suele disminuir y se registran mayores precipitaciones (IDEAM, 2022).

Figura 5-4: Incidencia de *P. palmivora* con relación al gradiente altitudinal en las zonas de muestreo en el departamento de Caquetá

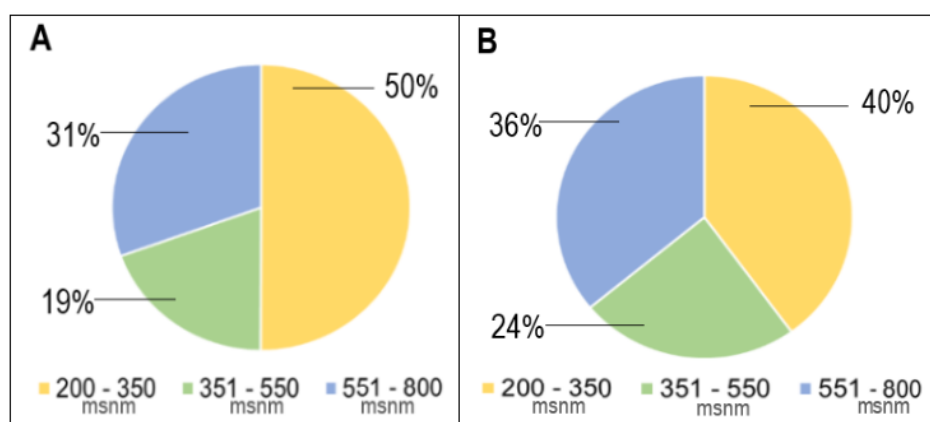


Nota: Comportamiento de la incidencia de *P. palmivora* en tres gradientes altitudinales en TII y Ts. ns: no significativo en temporada seca, prueba Tukey ($p > 0,05$). En temporada de lluvias si hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) según los gradientes altitudinales.

Además, la baja incidencia de la enfermedad en el gradiente altitudinal de 200-550 msnm pudo estar influenciada por la temperatura característica de esta zona, ya que, aunque se identificó mayor cantidad de esporangios a comparación del gradiente 551-800 msnm (Figura 5-5), la incidencia fue significativamente menor (Figura 5-4). Si bien este factor ambiental promueve la producción de inóculo (Figura 5-5) y estimula los mecanismos de virulencia de *Phytophthora palmivora* en la planta huésped (Desaint et al., 2021; Puig et

al., 2018), las fluctuaciones de temperatura entre 26°C y 33°C con una humedad relativa del 79% que se presentaron en este gradiente (IGAC, 2021), pueden tener un impacto negativo en la germinación de zoosporas y esporangios (Hunter & Kunimoto, 1974; Shelley et al., 2018), afectando la incidencia de la enfermedad en esta zona geográfica limitando la viabilidad del inóculo.

Figura 5-5: Distribución de la cantidad de esporangios con relación a la temporada climática y los gradientes altitudinales.



Nota: Distribución de la cantidad de esporangios en temporada de lluvias (A) y temporada seca (B) con relación al gradiente altitudinal en msnm.

La germinación de esporangios y la infección causada por *Phytophthora* spp. se correlaciona con baja temperatura (15-20 °C) y alta humedad relativa (85%), especialmente en horas de la noche (Kellam & Zentmayer, 1985), condiciones presentes en el gradiente altitudinal de 551-800 msnm. Estos factores ambientales pueden facilitar la formación de rocío en las hojas y frutos, lo que induce la liberación de zoosporas y la germinación de esporangios del patógeno (Boevink et al., 2020), aumentando la incidencia de la enfermedad. Esta adaptación del patógeno disminuye la exposición a la radiación UV y estimula la apertura estomática del hospedero, promoviendo la patogenicidad durante la infección (Boevink et al., 2020). Sin embargo, la capacidad del patógeno para infectar puede verse limitada si la temperatura nocturna se encuentra fuera del rango óptimo, restringiendo la propagación y supervivencia del patógeno (Kellam & Zentmayer, 1985; Puig et al., 2021).

Complementariamente, es crucial destacar que investigaciones previas llevadas a cabo en los departamentos de Antioquia y Tolima, abordando gradientes altitudinales de 1.050 y 1.250 msnm respectivamente, han informado incidencias significativamente superiores, registrando un 15% y un 23%, según los estudios de Ramírez, (2016); Rodríguez et al., (2021). Estos valores contrastan notoriamente con los resultados obtenidos en esta investigación, donde la incidencia de la enfermedad se sitúa en un 5,87% (Tabla 5-1) a altitudes no superiores a 800 msnm.

Por otra parte, la incidencia de la enfermedad entre los municipios y las variedades analizadas, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figura 5-3), posiblemente a que, en los sitios de muestreo seleccionados, se cumplía con la normatividad NOP-USDA y EU-ORGANIC, la cual exige la ejecución de prácticas de manejo agrícola, entre las que sobresalen: podas de mantenimiento y podas fitosanitarias para ser certificados como cultivos orgánicos con sellos de sostenibilidad. Autores como Armengot et al., (2020) relacionan estas prácticas agrícolas como factores predisponentes que afectan directamente la incidencia de la enfermedad independientemente si es un monocultivo o un SAF.

En este sentido, los factores predisponentes podrían ser la causa del bajo porcentaje de incidencia promedio de la enfermedad en los municipios objeto de estudio con el 5,87% (Tabla 5-1), en base a estos resultados Rodríguez et al., (2021) reportó que: “la remoción de mazorcas enfermas constituye la base del manejo de *Phytophthora palmivora* al permitir una disminución del 43,13% de la incidencia de la enfermedad”, consecuentemente, las labores culturales son cruciales para la mitigación efectiva de la enfermedad.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- ✓ Los marcadores ITS1-5.8S-ITS2 y COXI identificaron la especie *Phytophthora palmivora* como agente causante de la Pudrición negra del cacao; pero, no se descarta la presencia de especies encriptadas o no resueltas por estos marcadores moleculares.
- ✓ Morfológicamente fueron identificadas las especies *Phytophthora palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* y *P. capsici*.
- ✓ Los marcadores moleculares y los morfológicos fueron incongruentes en la identificación de las especies, no obstante, esta información es importante para enriquecer las bases de datos, que permitan el refinamiento de los resultados.
- ✓ El mayor tamaño de esporangios fue observado en Ts (46,26 x 25,44 μm), comparado a la TII (26,93 x 15,82 μm).
- ✓ En la Ts predominaron los esporangios con morfología limoniforme (30%) y ovoide (40%) y, en la TII los de morfología ovoide (49%) y elipsoide (37%).
- ✓ El genotipo CCN51 fue menos susceptible que Luker40 frente a *P. palmivora* procedente de las Ts y TII.
- ✓ Los aislados de *P. palmivora* procedentes de la Ts fueron más virulentos que los aislados de la TII.
- ✓ La incidencia de la enfermedad fue significativamente mayor durante la TII, respecto a la Ts.
- ✓ En la TII en el gradiente altitudinal entre 200 – 550 msnm se observó el mayor número de esporangios y la menor incidencia, en comparación con el gradiente entre 551 - 800 msnm donde se determinó el menor número de esporangios y la mayor incidencia.

6.2 Recomendaciones

Análisis moleculares adicionales.

Se sugiere realizar análisis de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST, por sus siglas en inglés), o la obtención de genomas completos que permitan una identificación con mayor exactitud. Así como, estudios de los genes de patogenicidad, con el fin de fortalecer la comprensión de la virulencia en relación con los factores ambientales (temperatura y humedad relativa). Este enfoque proporcionaría un respaldo más sólido en la identificación de especies y en la dinámica de la interacción *Phytophthora* - cacao.

Estudios morfológicos adicionales.

Se recomienda llevar a cabo estudios morfológicos más detallados que incorporen diversos medios de cultivo, como el agar zanahoria o el agar arveja. Estos estudios podrían incluir el monitoreo diario del crecimiento de la colonia, patrón morfológico, longitud de esporangióforos, caducidad de esporangios, temperaturas cardinales y la observación de estructuras sexuales. Esta aproximación refinada ofrecería una comprensión más completa de la biología y morfología de *Phytophthora*.

Impacto de prácticas culturales en la Pudrición del fruto.

Se recomienda realizar estudios que examinen las prácticas culturales como factor predisponente en la incidencia de la pudrición negra del fruto de cacao en altitudes superiores a 800 msnm. Estos estudios podrían ampliarse a municipios adicionales en Caquetá, como San Vicente del Caguán y Cartagena del Chairá, ambos con contribuciones significativas a la economía cacaotera del departamento.

Pruebas de patogenicidad con clones nacionales.

Se sugiere llevar a cabo pruebas de patogenicidad utilizando clones nacionales inoculados con aislados de departamentos cacaoteros y de la Amazonía. Esto permitiría obtener información detallada sobre la severidad de *Phytophthora* en diferentes regiones de Colombia, contribuyendo así a una comprensión más holística de la variabilidad del patógeno en el país.

A. Anexo: Etapas de crecimiento fenológico de las plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.): Codificación y descripción según la escala BBCH

Etapas de crecimiento fenológico de las plantas de cacao (*Theobroma cacao*.): Codificación y descripción según la escala BBCH propuesta por (Niemenak et al., 2010).

Etapa de crecimiento principal 0: germinación de semillas		
Código		Descripción
Dos dígitos	Tres dígitos	
00	000	Semillas frescas
01	001	Imbibición de semillas
02		La protuberancia de los radios a través de la capa de semillas
03		Hipocótilo visible; alargamiento de la radícula
05		Primeras raíces laterales visibles
07		El hipocótilo forma un gancho; emergencia de cotiledones desde el suelo
09	009	Alargamiento del hipocótilo completado; los cotiledones están erguidos, pero aún desplegados

Etapa de crecimiento principal 1: desarrollo de la hoja en el brote principal de la planta joven y en las ramas del abanico		
Código		Descripción
Dos dígitos	Tres dígitos	
10	100	Cotiledón completamente desplegado. Las estípulas que rodean el brote terminal en el brote principal o las ramas del abanico se separan y el brote se hincha
11	110	Hojas desplegándose (Primer flush). Las hojas son de color verde pálido o rojo.
	111	La expansión de la hoja es el 10% del tamaño final
	112	La expansión de la hoja es el 20% del tamaño final

	115	La expansión de la hoja es el 50% del tamaño final
	119	Primera etapa finalizada. Las hojas son de color verde oscuro con área máxima.
12	120	Hoja desplegándose (Segundo flush). Las hojas son de color verde pálido a rojo.
	121	La expansión de la hoja es el 10% del tamaño final
	122	La expansión de la hoja es el 20% del tamaño final
	125	La expansión de la hoja es el 50% del tamaño final
	129	Segundo flush de hojas terminado
19	190	Nueve o más flushes completamente maduros

Etapa de crecimiento principal 2: alargamiento del tallo principal, formación de jorquete de ramas de abanico y chupones

	Código		Descripción
	Dos dígitos	Tres dígitos	
20	200	200	Brotos derivados de plántulas muestran 10% de crecimiento
		202	Brotos con un 20% de crecimiento
		203	Brotos con un 30% de crecimiento
		205	Brotos con un 50% de crecimiento
		209	El brote alcanza su madurez fisiológica y se detiene el crecimiento de su meristemo apical
21	210	210	Formación de la primer jorquete y, posteriormente, el primer chupón.
		211	El primer chupon aparece debajo del primer jorquete con un 10% de crecimiento.
		212	Primer chupon con 20% de crecimiento
		215	Primer chupon con 50% de crecimiento
		219	El primer chupón alcanza su madurez fisiológica y se detiene el crecimiento de su meristemo apical
22	220	220	Formación del segundo jorquete y posteriormente del segundo chupón.
		221	El segundo chupón aparece debajo de la primera jorquette con un 10% de crecimiento.
		222	Segundo chupon con 20% de crecimiento
		223	Segundo chupon con 50% de crecimiento
		229	El segundo chupón alcanza su madurez fisiológica y se detiene el crecimiento de su meristemo apical
23	230	230	Formación del tercer jorquete y, posteriormente, del tercer chupón.
		231	El tercer chupón aparece debajo del tercer jorquete con un 10% de crecimiento.
		232	Tercer chupón con 20% de crecimiento
		233	Tercer chupon con 50% de crecimiento

29	239	Tercer chupón alcanza su madurez fisiológica y se detiene el crecimiento de su meristemo apical
	290	Formación del noveno o más jorquetes y posteriormente del noveno chupon
	291	El noveno chupon aparece debajo del noveno jorquete con un 10% de crecimiento
	292	Noveno chupon con 20% de crecimiento
	293	Noveno chupon con 30% de crecimiento
	295	Noveno chupon con 50% de crecimiento
	299	El último chupón alcanza su madurez fisiológica y se detiene el crecimiento de su meristemo apical

Etapa de crecimiento principal 3: Alargamiento de las ramas laterales

Código		Descripción
Dos dígitos	Tres dígitos	
31	301	Jorquete de ramas laterales primarias visibles
32	302	Ramas laterales primarias con 20 ramas laterales secundarias
35	305	Ramas laterales primarias con 50 ramas laterales secundarias
39	309	Ramas laterales primarias con 90 o más ramas laterales secundarias

Etapa de crecimiento principal 5: Aparición de inflorescencia

Código		Descripción
Dos dígitos	Tres dígitos	
51	501	Capullos visibles (capullos primordios de 150 µm de ancho)
52	502	Capullos de flores expandidos, aparición de sépalos primordiales (capullo <1 mm de largo)
55	505	Capullos de flores expandidos, sépalos encierran los capullos (capullo de 1–2 mm de largo)
56	506	Brote de flor expandido, aparición de pedunculo (brote de 2–3 mm de largo)
58	508	Brote de flor expandido, brote que cambia de verde a blanco (brote de 2–4 mm de largo)
59	509	Crecimiento de yemas florales completo (yemas de 6 mm de largo y 3 mm de largo; pedículo de 14 mm), yemas aún cerradas

Etapa de crecimiento principal 6: Floración

Código

Dos dígitos	Tres dígitos	Descripción
60	600	Primeras flores abriéndose
61	601	Comienzo de la floración
62	602	10% de flores abiertas
65	605	50% de flores abiertas
69	609	90% de flores abiertas

Etapas de crecimiento principal 7: Desarrollo del fruto.

Código		Descripción
Dos dígitos	Tres dígitos	
70	700	Frutas en el tallo principal o ramas visibles
71	701	Inicio del crecimiento del fruto. Celularización del endospermo, desarrollo de óvulos y pericarpio. Comienzo de la fase de marchitamiento de cherelles. Las frutas han alcanzado el 10% del tamaño final (cigoto latente)
72	702	División del cigoto y desarrollo preliminar del embrión. Las frutas se hinchan. Las frutas han alcanzado el 20% del tamaño final.
75	705	Fin de la fase de marchitez de los cherelles. Los frutos han alcanzado el 50% del tamaño final.
76	706	Comienzo de la fase de no marchitamiento. Las frutas han alcanzado el 60% del tamaño final.
77	707	Grasas, proteínas de almacenamiento y antocianinas acumuladas en los cotiledones. El endospermo es reabsorbido gradualmente por el embrión. Las frutas han alcanzado el 70% del tamaño final.
79	709	Los embriones son adultos, solo quedan restos de endospermo alrededor de los cotiledones carnosos. El aumento de la dimensión externa de la fruta cesa. Las frutas han alcanzado el 90% del tamaño final

Etapas de crecimiento principal 8: Maduración de frutos y semillas

Código		Descripción
Dos dígitos	Tres dígitos	
81	801	Cambio del color de la fruta de verde o rojo a amarillo o naranja
85	805	Aumento de la intensidad del color de la fruta
89	809	La fruta está completamente madura, unida al tallo o ramas principales y se puede cosechar.

Etapas de crecimiento principal 9: Senescencia

Código		Descripción
Dos dígitos	Tres dígitos	
90	900	Los Flush completaron su desarrollo, las hojas se tornan de color verde oscuro
92	902	Las hojas más viejas comienzan a decolorarse de verde oscuro a amarillo
95	905	Formación de la zona de abscisión en la vaina basal de las hojas viejas.
98	908	Abscisión de hojas viejas
99	909	Tratamientos posteriores a la cosecha o al almacenamiento

Etapa de crecimiento principal 1: desarrollo de la hoja en el brote principal de la planta joven y en las ramas del abanico

Código		Descripción
Dos dígitos	Tres dígitos	
10	100	Cotiledón completamente desplegado. Las estípulas que rodean el brote terminal en el brote principal o las ramas del abanico se separan y el brote se hincha
11	110	Hojas desplegándose (Primer flush). Las hojas son de color verde pálido o rojo.
	111	La expansión de la hoja es el 10% del tamaño final
	112	La expansión de la hoja es el 20% del tamaño final
	115	La expansión de la hoja es el 50% del tamaño final
	119	Primera etapa finalizada. Las hojas son de color verde oscuro con área máxima.
12	120	Hoja desplegándose (Segundo flush). Las hojas son de color verde pálido a rojo.
	121	La expansión de la hoja es el 10% del tamaño final
	122	La expansión de la hoja es el 20% del tamaño final
	125	La expansión de la hoja es el 50% del tamaño final
	129	Segundo flush de hojas terminado
19	190	Nueve o más flushes completamente maduros

B. Anexo: Protocolo de extracción de ADN

(Cenicaña, 2019)

- Macerar 1 mg de micelio conservado a -80°C usando nitrógeno líquido y transferir el tejido pulverizado a un tubo Eppendorf de 2 ml hasta la línea entre 0.5 y 1 ml.
- Agregar 800 µl de CTAB Buffer (previamente calentado a 65 °C) y agitar la mezcla hasta que el buffer cubra todo el tejido para obtener una mezcla homogénea.
- Colocar los tubos en baño maría a 65 °C durante 30 minutos y agitarlos por inversión cada 5 minutos.
- Remover los tubos del baño maría, pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 400 µl de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) y agitar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar los tubos a 12.000 rpm por 10 min. Recuperar 700-800 µl del sobrenadante en un tubo de 2 ml nuevo.
- Adicionar un volumen igual de isopropanol (700-800 µl) a -20 °C, mezclar por inversión y colocar los tubos con isopropanol a -20 °C durante 15 min.
- Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado con 500 µl de Etanol al 70 % centrifugar 7000 rpm por 5 minutos y dejar secar el precipitado.

- Diluir el precipitado obtenido en 100 μ l de agua HPLC o TE 1X (Tris 10 mM pH: 7.5, EDTA 1 mM).

- NOTA: Si con la adición de los 500 μ l de agua HPLC no se resuspende fácilmente el ADN, adicionar más agua y en su efecto calentar los tubos a 65 °C por 15 minutos para facilitar resuspender el ADN.

- Adicionar 1 μ l de RNasa (10 mg/ml) e incubar a 37 °C por 30 minutos.

- Evaluar la calidad y cantidad de ADN haciendo electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® de Invitrogen y compararlo contra diferentes concentraciones conocidas de ADN de λ : 100 ng, 200 ng etc.

- Visualizar el gel en el ENDURO UVP bajo luz ultravioleta y tomar fotografía.

- Almacenar el ADN genómico a -80°C y las Soluciones de trabajo (25 ng/ μ L) a -20 °C.

C. Anexo: Códigos de acceso a GenBank de secuencias utilizadas para la construcción de árboles filogenéticos

Clado 1	cox1	ITS
<i>Phytophthora andina</i>	HQ708614	HQ643350
<i>Phytophthora infestans</i>	HQ261238	HQ261491
<i>Phytophthora nicotianae</i>	HQ708354	HQ643303
<i>Phytophthora clandestina</i>	HQ261284	HQ261537
Clado 2		
<i>Phytophthora capsici</i>	HQ708249	HQ643180
<i>Phytophthora citrophthora</i>	HQ708275	HQ643208
<i>Phytophthora citricola</i>	HQ708271	HQ643204
<i>Phytophthora tropicalis</i>	HQ708417	HQ643369
<i>Phytophthora plurivola</i>	HQ708361	HQ643311
<i>Phytophthora theobromicola</i>	MW597342	MW597332
Clado 3		
<i>Phytophthora nemorosa</i>	HQ708345	HQ643294
<i>Phytophthora ilicis</i>	HQ261329	HQ261582
<i>Phytophthora pseudosyringae</i>	HQ708378	HQ643329
Clado 4		
<i>Phytophthora palmivora</i>	MT780663	MT754482
<i>Phytophthora palmivora</i>	MW597353	MT074270
<i>Phytophthora heterospora</i>	MZ782831	MT232395
<i>Phytophthora litchii</i>	HQ708322	HQ643265
Clado 5		
<i>Phytophthora heveae</i>	HQ708301	HQ643238
<i>Phytophthora katsuriae</i>	HQ261346	HQ261599
Clado 6		
<i>Phytophthora megasperma</i>	HQ708329	HQ643275
<i>Phytophthora humicola</i>	HQ708305	HQ643243
<i>Phytophthora gonapodyides</i>	HQ708299	HQ643236
<i>Phytophthora inundata</i>	HQ708312	HQ643252
Clado 7		
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	HQ708257	HQ643189
<i>Phytophthora cambivora</i>	HQ708248	HQ643179
<i>Phytophthora melonis</i>	HQ708336	HQ643283
<i>Phytophthora sojae</i>	HQ708397	HQ643349
Clado 8		
<i>Phytophthora sansomeana</i>	HQ708391	HQ643343
<i>Phytophthora ramorum</i>	HQ708387	HQ643339
<i>Phytophthora cryptogea</i>	HQ708281	HQ643216
<i>Phytophthora brassicae</i>	HQ708228	HQ643158
Outgroup		
<i>Pythium insidiosum</i>	HQ708614	HQ643570

Referencias

- Abad, Z., Burgess, T., Redford, A., Bienapfl, J., Srivastava, S., Mathew, R., & Jennings, K. (2023). IDphy: An International Online Resource for Molecular and Morphological Identification of *Phytophthora*. *Plant Disease*, 107(4), 987-998. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-22-0448-FE>
- Adeniyi, D. (2019). Diversity of Cacao Pathogens and Impact on Yield and Global Production. En *Theobroma cacao - Deploying Science for Sustainability of Global Cocoa Economy*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81993>
- Adeniyi, D. O., & Asogwa, E. U. (2023). Complexes and diversity of pathogens and insect pests of cocoa tree. *Forest Microbiology: Tree Diseases and Pests: Volume 3*, 285-311. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18694-3.00002-X>
- Agronet. (2023). *Reporte:Área, Producción, Rendimiento y Participación Municipal en el Departamento por Cultivo*. Ministerio de Agricultura.
- Akrofi, A. Y., Amoako-Atta, I., Assuah, M., & Asare, E. K. (2015). Black pod disease on cacao (*Theobroma cacao*, L) in Ghana: Spread of *Phytophthora megakarya* and role of economic plants in the disease epidemiology. *Crop Protection*, 72, 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.015>
- Alarcón, J., Arevalo, E., Diaz, A., Galindo, J., & Rorero, A. (2012). Manejo Fitosanitario del cultivo del cacao. En Produmedios (Ed.), *Corpoica*. <https://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/->
- Ali, S., Shao, J., Lary, D., Kronmiller, B., Shen, D., Strem, M., Amoako-Attah, I., Akrofi, A. Y., Begoude, B. A. D., ten Hoopen, G. M., Coulibaly, K., Kebe, B. I., Melnick, R. L., Guiltinan, M. J., Tyler, B. M., Meinhardt, L. W., & Bailey, B. A. (2017). *Phytophthora megakarya* and *Phytophthora palmivora*, Closely Related Causal Agents of Cacao Black Pod Rot, Underwent Increases in Genome Sizes and Gene Numbers by Different Mechanisms. *Genome Biology and Evolution*, 9(3), 536-557. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx021>
- Appiah, A., Flood, J., Bridge, P., & Archer, S. (2003). Inter and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Pathology*, 52(2), 168-180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00820.x>

- Armengot, L., Ferrari, L., Milz, J., Velásquez, F., Hohmann, P., & Schneider, M. (2020). Cacao agroforestry systems do not increase pest and disease incidence compared with monocultures under good cultural management practices. *Crop Protection*, 130. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105047>
- Bailey, B. (2016). Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters - Google Libros. En B. Bailey (Ed.), *Springer*. Sustainable Perennial crops Laboratory. https://books.google.com.co/books?id=H2KhCwAAQBAJ&pg=PA303&lpg=PA303&dq=phenological+stages+susceptible+of+cocoa+to+Phytophthora&source=bl&ots=n3t1t0E7oz&sig=ACfU3U2zdD3zeWrcH2jV8AdOaXNHb_5SSQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwis-8237d3oAhUl98KHZ6SDOoQ6AEwEHoECAsQKw
- Bailey, B. A., & Meinhardt, L. W. (2016). *Cacao Diseases A History of Old Enemies and New Encounters*.
- Bhattacharjee, R. (2018). Taxonomy and classification of cacao. En P. P. Umaharan (Ed.), *Achieving sustainable cultivation of cocoa* (Número October, P. 2). burleigh dodds science publishing. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.19103/AS.2017.0021.01>
- Boevink, P., Birch, P., Turnbull, D., & Whisson, S. (2020). Devastating intimacy: the cell biology of plant–Phytophthora interactions. In *New Phytologist* (Vol. 228, Issue 2, pp. 445–458). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.16650>
- Brasier, C., & Griffin, M. (1979). *Taxonomy of «Phytophthora palmivora» on cocoa*. Mycological Society. <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=39473&Fields=All>
- Brasier, C., Scanu, B., Cooke, D., & Jung, T. (2022). *Phytophthora*: an ancient, historic, biologically and structurally cohesive and evolutionarily successful generic concept in need of preservation. *IMA Fungus*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s43008-022-00097-z>
- Caparosa, M. H., & Hartel, R. W. (2018). Structure and properties of chocolate. En *Encyclopedia of Food Chemistry* (pP. 61-65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22525-0>
- Cárdenas, N., Darghan, A., Sosa Rico, M. D., & Rodríguez, A. (2017). Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Yopal (Casanare), Colombia. *Acta Biologica Colombiana*, 22(2), 209-220. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n2.61161>
- CATIE. (2019). *Cuánto cacao produce un árbol en toda su vida*. <https://www.catie.ac.cr/nicaragua/es/76-cuanto-cacao-produce-un-arbol-en-toda-su-vida.html>

- Cenicaña (2019). Protocolo de extracción de ADN para Plantas y hongos.
- Charry, A., Jager, M., Hurtado, J., Rosas, G., Orjuela, J., Ramos, P., Giraldo, E., Romero, M., Sierra, L., & Quintero, M. (2017). *Estrategia Sectorial de la Cadena de Cacao en Caquetá, con Enfoque Agroambiental y Cero Deforestación*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. http://www.biopasos.com/biblioteca/104v_Vision_Amazonia_Cacao_Caqueta_web-definitivo.pdf
- Clavaud, C., Amanianda, V., & Latge, J. P. (2009). Organization of Fungal, Oomycete and Lichen (1,3)- β -Glucans. *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, 387-424. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373971-1.00011-X>
- Cocoa Barometer. (2022). *Latin American Baseline*. <https://cocoabarometer.org/en/>
- Cooke, E., & Duncan, J. (1997). Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research*, 101(6), 667-677. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0953756296003218>
- Cornejo, O., Yee, M., Dominguez, V., Andrews, M., Sockell, A., Strandberg, E., Livingstone, D., Stack, C., Romero, A., Umaharan, P., Royaert, S., Tawari, N. R., Ng, P., Gutierrez, O., Phillips, W., Mockaitis, K., Bustamante, C. D., & Motamayor, J. C. (2018). Population genomic analyses of the chocolate tree, *Theobroma cacao* L., provide insights into its domestication process. *Communications Biology*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0168-6>
- Cubillos, A., García, M., Calvo, A., Carvajal, G., & Tarazona, M. (2019). Study of the physical and chemical changes during the maturation of three cocoa clones, EET8, CCN51, and ICS60. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(13), 5910-5917. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9882>
- DANE. (2020). *Boletín Técnico*.
- Decloquement, J., Ramos-Sobrinho, R., Elias, S. G., Britto, D. S., Puig, A. S., Reis, A., da Silva, R. A. F., Honorato-Júnior, J., Luz, E. D. M. N., Pinho, D. B., & Marelli, J. P. (2021). *Phytophthora theobromicola* sP. nov.: A New Species Causing Black Pod Disease on Cacao in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399>
- 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. En *Journal of Fungi* (Vol. 7, Número 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof7030202>

- Desaint, H., Aoun, N., Deslandes, L., Vailleau, F., Roux, F., & Berthomé, R. (2021). Fight hard or die trying: when plants face pathogens under heat stress. En *New Phytologist* (Vol. 229, Número 2, pP. 712-734). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.16965>
- Dorrance, A., Berry, S. A., Anderson, T., & Meharg, C. (2008). Isolation, Storage, Pathotype Characterization, and Evaluation of Resistance for *Phytophthora sojae* in Soybean. *Plant Health Progress*, 9(1), 35. <https://doi.org/10.1094/php-2008-0118-01-dg>
- FAO. (2021). *Cultivos y productos de ganadería*. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- FCDS. (2021). *El calendario del clima de la selva amazónica*. <https://fcds.org.co/el-calendario-del-clima-de-la-selva-amazonica/>
- FEDECACAO. (2022, noviembre 1). *Año cacaotero 2021-2022 cierra con descenso en producción por intensas lluvias*. <https://www.fedecacao.com.co/post/a%C3%B1o-cacaotero-2021-2022-cierra-con-descenso-en-producci%C3%B3n-por-intensas-lluvias>
- FEDECACAO. (2023). *Economía Nacional*. Producción Nacional de Cacao.
- 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 and Genomes*, 16(1). <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1396-8>
- Förster, H., Cummings, M. P., & Coffey, M. D. (2000). Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS I DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI. *Mycological Research*, 104(9), 1055-1061. <https://doi.org/10.1017/S0953756200003087>
- Fovo, J., Mezok, V., Bertrand, E., Amougou, F., & Ntsombohntsefong, G. (2018). Pod resistance of cocoa clones to black pod disease and antifungal properties of phytoextracts against *Phytophthora megakarya*. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 13(03), 94-104. <https://doi.org/10.12692/ijb/13.3.94-104>
- Francine, W. (2020). *Phytophthora palmivora* – cocoa interaction. En *Journal of Fungi* (Vol. 6, Número 3, pP. 1-20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof6030167>
- Fry, W. E., & Grünwald, N. J. (2010). *Introducción a los Oomicetes*. The American Phytopathological Society; The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2012-0220-01>

- García, V., Masabel, M., Losada, A., Papamija, M., Reyes, J., Rosero, M., & Rentería, L. (2018). *Generalidades del cultivo de cacao*. Blog diario.com. <http://generalidades-cacao.blogspot.es/categoria/cacao/>
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- Hardina, N., Kuswinanti, T., & Baharuddin. (2020). Modified vegetables extract as substitution of v8-juice medium for cultivation of *Phytophthora* spp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 486(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/486/1/012149>
- Hariharan, G., & Prasannath, K. (2021). Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234>.
- Hunter, J., & Kunimoto, R. (1974). Dispersal of *Phytophthora palmivora* Sporangia by Wind - Blown Rain. *Journal Series Paper N° 1608 of the Hawaii Agricultural Experiment Station*, 202–206.
- ICCO. (2023). Production of cocoa beans. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics - Vol. XLIX, No.2, Cocoa year 2022/23*, 1-1.
- IDEAM. (2022). *Características climáticas de ciudades principales*. http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/climatologico-mensual/-/document_library_display/xYvIPc4uxk1Y/view/122201016
- IGAC. (2021). *Zonificación climática para levantamiento de suelos Código: IN-GAG-PC05-13*.
- Jaimes, Y., Agudelo, G., Baez, E., Rengifo, G., & Rojas, J. (2022). *Modelo productivo para el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.): en el departamento de Santander (2.ª ed.)*.
- Jaimes, Y., Carvajal, A., Galvis, D., Carvalho, F., & Rojas, J. (2022). Cacao agroforestry systems beyond the stigmas: Biotic and abiotic stress incidence impact. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.921469>
- Jeffers, S., & Martin, S. (1986). Comparison of Two Media Selective for *Phytophthora* and Pythium Species. *Plant Disease*, 70(11), 1038-1043. <https://doi.org/10.1094/pd-70-1038>

-
- Kasteel, M., Ketelaar, T., & Govers, F. (2023). Fatal attraction: How *Phytophthora* zoospores find their host. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2023.01.014>
- Kellam, M., & Zentmayer, G. (1985). Morphological, Physiological, Ecological, and Pathological Comparisons of *Phytophthora* Species Isolated from *Theobroma cacao*. *Ecology and Epidemiology*, 159–164.
- Lee, S., & Taylor, J. (1992). Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 636-653. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040750>
- Madden, L., & Hughes, G. (1999). Sampling for Plant Disease Incidence. *Phytopathology*, 89(11), 1088-1103. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1999.89.11.1080>
- MADR. (2020). *Cadena de Cacao*.
- Madridejos, C. (2018). *Boletín n° 4. Desarrollo productivo y comercial, un camino para la construcción de paz*. [https://www.fondoeuropeoparalapaz.eu/wp-content/uploads/2019/01/Boletin N°4 - Línea Productiva Territorios Caqueteños Sostenibles para la Paz.pdf](https://www.fondoeuropeoparalapaz.eu/wp-content/uploads/2019/01/Boletin_Nº4_-_Línea_Productiva_Territorios_Caqueteños_Sostenibles_para_la_Paz.pdf)
- Martin, F. N., & Tooley, P. W. (2003). Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*, 95(2), 269-284. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833112>
- Mcmahon, P., & Purwantara, A. (2004). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*.
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- MYCOBANK. (2023). *MYCOBANK Database Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. Phytophthora*. MYCOBANK Database Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks
- Nair, K. P. P. (2010). Cocoa (*Theobroma cacao* L.). En Elsevier (Ed.), *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World* (1.^a ed.). Science Direct. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384677-8.00005-9>

- Ndoubé, M., Efombagn, M., Nyassé, S., Nyemb, E., Sache, I., & Cilas, C. (2010). Relationships between cocoa *Phytophthora* pod rot disease and climatic variables in Cameroon. *Plant Pathology*.
- Niemenak, N., Cilas, C., Rohsius, C., Bleiholder, H., Meier, U., & Lieberei, R. (2010). Phenological growth stages of cacao plants (*Theobroma sP.*): Codification and description according to the BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 156(1), 13-24. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00356.x>
- Nyadanu, D., Lowor, S., Akrofi, A., Adomako, B., Dzahini, H., Akromah, R., Awuah, R., Kwoseh, C., Adu-Amoah, R., & Kwarteng, A. (2019). Mode of Inheritance and Combining ability studies on Epicuticular wax Production in Resistance to Black pod disease in Cacao (*Theobroma cacao* L.). *Scientia Horticulturae*, 243, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.002>
- Ortíz, F. (2019). Protocolo de purificación de productos de PCR. Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad de la Amazonia.
- Otzen, T., & Manterola, C. (2017). Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio. En *Int. J. Morphol* (Vol. 35, Número 1). https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000100037
- Palacios, A., Afanador, L., & Pardo, J. (2021). Identification of *Phytophthora* spp. isolates obtained from cocoa crops in Antioquia, Colombia. *Acta Agronomica*, 70(1). <https://doi.org/10.15446/acag.v70n1.70619>
- Palacios, C. (2017). *Identificación de especies de Phytophthora causantes de la mazorca negra y cáncer del tallo del cacao en Antioquia*. <https://semsem.catie.ac.cr/wp-content/uploads/Identificación-de-especies-de-Phytophthora-causantes-de-la-mazorca-negra.pdf>
- Patil, B., Hegde, V., Sridhara, S., Thava, R., Pandian, P., Thube, S. H., Karyath Palliath, G., Gangurde, S. S., & Kumar Jha, P. (2022). Multigene phylogeny and haplotype analysis reveals predominance of oomycetous fungus, *Phytophthora meadii* (McRae) associated with fruit rot disease of arecanut in India. *Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103341>
- PDD. (2020). *Plan de desarrollo departamental del Caquetá 2020 - 2023*. <https://www.caqueta.gov.co/noticias/p-lan-de-desarrollo-departamental-2020--2023>
- Periódico el Espectador. (2018). *Una oportunidad de exportación para el cacao de Caquetá*. Periódico el Espectador. <https://www.elespectador.com/colombia2020/territorio/una-oportunidad-de-exportacion-para-el-cacao-de-caqueta-articulo-856944>

- Plancarte, A., Rodríguez, G., Fernandez, Y., Pedraza, M., Lopez, L., Diaz, M., & Fernández, S. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8, 1867-1880.
- Polanco, L. R., Gutiérrez, M. L. C., Parra, E. B., & Amaya, J. D. S. (2022). Reaction of detached fruits from selected cocoa clones to artificial inoculation with *Phytophthora palmivora*. *Acta Agronomica*, 71(2), 186-194. <https://doi.org/10.15446/acag.v71n2.88841>
- Puig, A. S., Ali, S., Strem, M., Sicher, R., Gutierrez, O. A., & Bailey, B. A. (2018). The differential influence of temperature on *Phytophthora megakarya* and *Phytophthora palmivora* pod lesion expansion, mycelia growth, gene expression, and metabolite profiles. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102, 95-112. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2017.12.002>
- Puig, A. S., Quintanilla, W., Matsumoto, T., Keith, L., Gutierrez, O. A., & Marelli, J. P. (2021). *Phytophthora palmivora* causing disease on theobroma cacao in Hawaii. *Agriculture (Switzerland)*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/agriculture11050396>
- R Project. (2023). *R: The R Project for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org/>
- Ramírez, J. (2016). Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp., y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al., en la hacienda Theobroma, Colombia. *Rev. Protección Veg*, 31(1), 42-49.
- Ramírez, J., Cárdenas, M., Guevara, M., Duarte, D., Victorino, L., Argüello, B., Gutiérrez, E., & Restrepo, S. (2021). Oomycete species associated with *Theobroma cacao* crops in Colombia. *Plant Pathology*, 70(7), 1695-1707. <https://doi.org/10.1111/ppa.13410>
- Randy, P. (2016). The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview. En S. I. P. Switzerland (Ed.), *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters* (pP. 33-59). Department of Plant Pathology, University of Florida. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>
- Robideau, G., De Cock, A., Coffey, M., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C. H., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E., Zhang, Y., Bonants, P., Ristaino, J., & Lévesque, A. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1002-1011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Rodríguez, E. (2015). Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* sP.) en cacao. En L. G. García (Ed.), *Identificación y manejo de la*

- podrición parda de la mazorca (Phytophthora sP.) en cacao* (Primera ed). Corpoica. <https://doi.org/10.21930/978-958-740-197-4>
- Rodríguez, E., Parra, E. B., Bermeo, P. A., Segura, J. D., & Rodríguez, L. A. (2021). *Managing the black pod disease (Phytophthora palmivora) in cocoa by joint application of cultural and chemical practices* (Vol. 16).
- Rojas, A., Jacobs, J., Napieralski, S., Karaj, B., Bradley, C., Chase, T., Esker, P., Giesler, L., Jardine, D., Malvick, D., Markell, S. G., Nelson, B. D., Robertson, A. E., Rupe, J. C., Smith, D. L., Sweets, L. E., Tenuta, A. U., Wise, K. A., & Chilvers, M. I. (2017). Oomycete species associated with soybean seedlings in North America-part I: Identification and pathogenicity characterization. *Phytopathology*, *107*(3), 280-292. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-16-0177-R>
- Sans, A., Rodríguez, M., Silva, P., & Stewart, S. (2017). Primer reporte de *Phytophthora sojae* y sus patotipos afectando soja en Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, *21*(1), 89-94. <https://doi.org/10.2477/vol21iss1pp89-94>
- Scanu, B., Jung, T., Masigol, H., Linaldeddu, B. T., Jung, M. H., Brandano, A., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Janoušek, J., Riolo, M., & Cacciola, S. O. (2021). *Phytophthora heterospora* sP. Nov., a new pseudoconidia-producing sister species of *P. palmivora*. *Journal of Fungi*, *7*(10). <https://doi.org/10.3390/jof7100870>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., & Levesque, C. A. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, *109*(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Singh, B., Delgado, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J. E., Liu, H., & Trivedi, P. (2023). Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. En *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00900-7>
- smalldropsprays. (2019). *ImageJ* Software. <http://www.smalldropsprays.info/stepbystepmethods/ImageJ-software>
- Suárez, Y., & Aránzazu, F. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia, con énfasis en Monilia (*Moniliophthora roreri*). En Luz María Calle Hoyos (Ed.), *Corpoica, Federación Nacional de Cacaoteros, ministerio de agricultura y desarrollo rural*. (Produmedio). Corpoica. https://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_04A.pdf
- Surujdeo, S., Sreenivasan, T., Motilal, L., & Umaharan, P. (2016). Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters. En *Cacao Diseases: A History of Old*

Enemies and New Encounters (pP. 1-633). Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>

Tillery, K. (2013). *Phytophthora medium (P10VP+H)*. [https://wiki.bugwood.org/Phytophthora_medium_\(P10VP_H\)](https://wiki.bugwood.org/Phytophthora_medium_(P10VP_H)).

USAID. (2023). *Cacao para la Paz - Colombia*. <https://www.usaid.gov/es/colombia/fact-sheets/red-cacao-peace>

Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T., & Suga, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia*, 98(3), 410-422. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832676>

Yang, X., Tyler, B. M., & Hong, C. (2017). An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus*, 8(2), 355-384. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.09>.

Zambounis, A., Samaras, A., Xanthopoulou, A., Osathanunkul, M., Schena, L., Tsaftaris, A., & Madesis, P. (2016). Identification of *Phytophthora* species by a high resolution melting analysis: an innovative tool for rapid differentiation. *Plant Protection Science*, 52(3).

Zentmyer, G. A., Kaosiri, T., & Idosu, G. (1977). Taxonomic variants in the *Phytophthora palmivora* complex. *Transactions of the British Mycological Society*, 69(2), 329-332. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(77\)80060-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(77)80060-0)