



## Incidencia de *Lasiodiplodia theobromae* en la muerte regresiva del cacao ecuatoriano: Nacional, CCN-51 y Trinitario †

### [Incidence of *Lasiodiplodia theobromae* on the dieback of ecuadorian cocoa: Nacional, CCN-51 and Trinitario]

Angel Virgilio Cedeño-Moreira<sup>1</sup>, Juan Antonio Torres-Rodríguez<sup>1</sup>,  
Ketty Vanessa Arellano-Ibarra<sup>1</sup>, Mercedes Susana Carranza-Patiño<sup>1</sup>,  
Gerardo Zapata-Sifuentes<sup>2</sup> and Pablo Preciado-Rangel<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Av. Quito. km 1.5 vía a Santo Domingo. Quevedo. 120501 Los Ríos, Ecuador. Emails: [acedenom@uteq.edu.ec](mailto:acedenom@uteq.edu.ec); [jatorres@uteq.edu.ec](mailto:jatorres@uteq.edu.ec); [Ketty.arellano2017@uteq.edu.ec](mailto:Ketty.arellano2017@uteq.edu.ec); [mcarranza@uteq.edu.ec](mailto:mcarranza@uteq.edu.ec)

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Unidad Laguna. Carretera periférico s/n. Colonia Valle Verde Torreón, Coahuila, México. CP. 27054. Emails: [gerardo.zapata@uaaan.edu.mx](mailto:gerardo.zapata@uaaan.edu.mx), [ppreciador@yahoo.com.mx](mailto:ppreciador@yahoo.com.mx)\*

\*Corresponding author

#### SUMMARY

**Background:** Cocoa production in Ecuador, the world leader in fine flavour cocoa, faces losses due to dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae*. This phytopathogen affects the quality and yield of the crop. Currently, information on the susceptibility of the main Ecuadorian varieties to this disease remains limited. **Objective:** To evaluate the incidence of *L. theobromae* on dieback of Ecuadorian cocoa: Nacional, CCN-51, and Trinitario. **Methodology:** The study was carried out between April and August 2023 at the La María Experimental Campus located in the town of Mocache, Los Ríos province, Ecuador. The experiments were conducted using a completely randomised design with three treatments, five replicates and ten experimental units per treatment. Isolations of the fungus were made from infected ears of the CCN-51 variety, and were morphologically and molecularly characterised. In this study, mycelial growth rate, colony diameter (cm) and infection coverage on cocoa pods (cm) were evaluated. In addition, fungal growth was determined in three culture media (potato dextrose agar, corn meal agar, and malt extract agar) at 14, 28, and 40 °C. **Results:** It was observed that potato dextrose agar medium and temperature of 28 °C were optimal for fungal growth. Internal and external infection coverage on cobs showed that Nacional was the most susceptible variety, followed by CCN-51 and Trinitario. The highest spore density was found on the surface of the cobs of the CCN-51 variety. **Implications:** The results highlight the need to strengthen integrated disease management and consider varietal resistance in breeding programmes. **Conclusions:** The results of this study confirm the high incidence of *L. theobromae* in the evaluated cocoa varieties. The Nacional variety was the most susceptible, registering the highest internal and external infection coverage, as well as high seedling mortality.

**Key words:** morphological characterization; genetic variability; fungal growth; infection cover; susceptibility; pathogenicity.

#### RESUMEN

**Antecedentes:** La producción de cacao en Ecuador, líder mundial en cacao fino de aroma, enfrenta pérdidas por la muerte regresiva ocasionada por *Lasiodiplodia theobromae*. Este fitopatógeno afecta la calidad y el rendimiento del cultivo. En la actualidad la información sobre la susceptibilidad de las principales variedades ecuatorianas a esta enfermedad sigue siendo limitada. **Objetivo:** Evaluar la incidencia de *L. theobromae* en la muerte regresiva del cacao ecuatoriano: Nacional, CCN-51 y Trinitario. **Metodología:** El estudio se realizó entre los meses de abril y agosto de 2023 en el Campus Experimental La María ubicado en la ciudad de Mocache, provincia de Los Ríos, Ecuador. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un diseño completamente al azar con tres tratamientos, con cinco repeticiones y diez unidades experimentales por tratamiento. Se realizaron aislamientos del hongo a partir de mazorcas infectadas de la variedad CCN-51, y se caracterizaron morfológica y molecularmente. En este estudio, se evaluó la tasa de crecimiento micelial, el diámetro de la colonia (cm) y la cobertura de infección en mazorcas de cacao (cm). Además, se determinó el crecimiento fúngico en tres medios de cultivo (agar papa dextrosa, agar de maíz y agar extracto de malta) a 14, 28 y 40 °C. **Resultados:** Se observó que el medio papa dextrosa agar y la temperatura de 28 °C fueron óptimos para el crecimiento del hongo. La cobertura de infección

† Submitted July 11, 2025 – Accepted August 23, 2025. <http://doi.org/10.56369/tsaes.6453>



interna y externa en las mazorcas mostró que la variedad Nacional era la más susceptible, seguida por CCN-51 y Trinitario. Se encontró una mayor densidad de esporas en la superficie de las mazorcas de la variedad CCN-51. **Implicaciones:** Los resultados resaltan la necesidad de fortalecer el manejo integrado de la enfermedad y considerar la resistencia varietal en programas de mejoramiento. **Conclusiones:** Los resultados de este estudio confirman la alta incidencia de *L. theobromae* en las variedades de cacao evaluadas. La variedad Nacional fue la más susceptible, registró la mayor cobertura de infección interna y externa, así como una alta mortalidad en plántulas.

**Palabras clave:** caracterización morfológica; variabilidad genética; crecimiento fúngico; cobertura de infección; susceptibilidad; patogenicidad.

## INTRODUCCIÓN

El cacao ecuatoriano es reconocido a nivel mundial por su calidad y sabor, caracterizado por notas florales y frutales (Erazo Solorzano *et al.*, 2023). Ecuador es uno de los principales productores de cacao fino de aroma y representa aproximadamente el 63 % de la producción mundial de esta variedad (Saravia-Matus *et al.*, 2020; Torres-Rodríguez *et al.*, 2024). Este tipo de cacao, conocido como “arriba”, ha sido cultivado en el país durante siglos, y su origen se remonta a tiempos precolombinos (Díaz-Valderrama *et al.*, 2020).

El cultivo de cacao enfrenta diversas enfermedades que afectan su producción y calidad (Cilas y Bastide, 2020), entre ellas la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2018), la mazorca negra (*Phytophthora palmivora* y *Phytophthora megakarya*) (Polanco *et al.*, 2022), la mazorca parda (*Lasiodiplodia theobromae*) (Muñoz *et al.*, 2022) y el mal de machete (*Ceratocystis cacaofunesta*) (Espinal *et al.*, 2023).

La enfermedad de la muerte regresiva, causada por el hongo *Lasiodiplodia theobromae*, es una de las patologías más destructivas para el cultivo del cacao y afecta tanto sus frutos como las ramas (Delgado-Ospina *et al.*, 2021). Los primeros signos de infección en los frutos se manifiestan como manchas negras y acuosas que se expanden rápidamente, lo que resulta en una descomposición interna que torna los frutos blandos y provoca su caída prematura (Asman *et al.*, 2024a). Además, el hongo puede persistir en los tejidos vegetales infectados; esto facilita la propagación de la enfermedad en el campo y dificulta su control.

En las ramas, la enfermedad se evidencia con la aparición de canchales o heridas abiertas que exudan un líquido oscuro y avanzan hasta causar su muerte regresiva, la cual se caracteriza por la pérdida de hojas y la muerte de los brotes jóvenes (La Porta *et al.*, 2023). Las condiciones cálidas y húmedas favorecen el desarrollo de la enfermedad, lo que hace que las regiones tropicales donde se cultiva el cacao sean especialmente vulnerables (Ambele *et al.*, 2023). El hongo se disemina principalmente a través de esporas transportadas por el viento, el agua y las herramientas contaminadas, e ingresa a la planta a

través de heridas o aberturas naturales como las estomas (Oliver, 2024).

El manejo efectivo de *L. theobromae* en cacao requiere una combinación de estrategias (Ablormeti *et al.*, 2021). La poda y destrucción de frutos y ramas infectadas son esenciales para reducir la propagación del hongo, y es crucial desinfectar las herramientas de poda regularmente para evitar la transferencia de esporas de un árbol a otro (Burgess *et al.*, 2018). Mejorar el drenaje del suelo ayuda a reducir las condiciones favorables para el hongo, y un manejo adecuado del dosel del árbol favorece la circulación del aire y reduce la humedad (Boczoń *et al.*, 2021).

El uso de fungicidas específicos puede ser efectivo en el control de este fitopatógeno, pero su aplicación debe seguir recomendaciones técnicas para evitar resistencia (Yang *et al.*, 2021). El desarrollo de variedades de cacao resistentes es una estrategia a largo plazo para una solución sostenible (Boadi *et al.*, 2022). La infección por *L. theobromae* reduce la cantidad y calidad de la cosecha, lo cual impacta económicamente a los productores (Kumah *et al.*, 2020). Los frutos infectados no son aptos para la venta, y la pérdida de ramas productivas disminuye la capacidad de producción. Esto subraya la necesidad de un manejo efectivo para mantener la viabilidad económica de las plantaciones de cacao (Adebayo *et al.*, 2022).

Las variaciones morfológicas y patológicas en *L. theobromae* se deben a una combinación de factores genéticos, ambientales y adaptativos (Jaimez *et al.*, 2022). La alta variabilidad genética del hongo, influenciada por la reproducción sexual y asexual, da lugar a diferencias en la morfología y virulencia (Çelik Oğuz y Karakaya, 2021). Las condiciones climáticas, como temperatura y humedad, y la interacción con el huésped también afectan su expresión morfológica y la severidad de la enfermedad (Pokhrel, 2021). Además, la plasticidad fenotípica permite al hongo ajustarse rápidamente a cambios ambientales, lo que favorece su supervivencia y capacidad de infección (González *et al.*, 2020).

A pesar de que *Lasiodiplodia theobromae* está asociada con la muerte regresiva del cacao, la evidencia comparativa por variedad en Ecuador es limitada. En particular, no se dispone de

estimaciones consistentes de incidencia que contrasten Nacional, CCN-51 y Trinitario bajo condiciones experimentales, incorporando métricas como cobertura de infección interna/externa y densidad de esporas. La caracterización morfológica cuantitativa es importante para la determinación de descriptores reproducibles que permitan comparar aislamientos, la evaluación de su plasticidad ambiental y el establecimiento de criterios para discriminar variantes intraespecíficas con distinta virulencia. Este estudio tiene como objetivo evaluar la incidencia de *L. theobromae* en la muerte regresiva de del cacao ecuatoriano: Nacional, CCN-51 y Trinitario. Los resultados obtenidos buscan contribuir al desarrollo de estrategias de manejo más efectivas para mitigar el impacto de esta enfermedad en la producción de cacao en Ecuador.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación geográfica y área de estudio

El área de estudio comprende la región del cantón Mocache, en la provincia de Los Ríos, Ecuador, caracterizada por una temperatura promedio anual de 25 °C y una precipitación anual entre 1500 y 2000 mm. Los experimentos se realizaron en el primer semestre del año 2023 en el Laboratorio de Biología y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en el kilómetro 7.5 vía a El Empalme (01° 00' 43" latitud sur y 79° 28' 22" longitud oeste), a una altitud de 70 msnm.

### Aislamiento y purificación de *Lasiodiplodia theobromae*

El aislamiento se realizó a partir de mazorcas de cacao (var. CCN-51) con síntomas de infección, siguiendo el protocolo de Restrepo *et al.* (1976). Se seleccionaron mazorcas que mostraron síntomas visibles de infección, tales como manchas necróticas y podredumbre. Las mazorcas afectadas fueron recogidas y colocadas en bolsas de plástico estériles para evitar cualquier contaminación adicional. Una vez en el laboratorio, la superficie de las mazorcas fue limpiada con alcohol al 70 %. Posteriormente, se cortaron pequeñas porciones de tejido de las zonas afectadas. Estos fragmentos de tejido fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 min, para proporcionar una desinfección adicional. Después de la desinfección, los tejidos fueron enjuagados con agua destilada estéril y secados con papel de filtro estéril para el cultivo. Los fragmentos de tejido desinfectado fueron colocados en placas de Petri que contenían medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Se utilizó un asa de siembra estéril para distribuir los fragmentos en el medio de cultivo. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 28 °C, en condiciones de oscuridad durante 72 horas. Se seleccionaron las colonias con características

morfológicas compatibles con *L. theobromae*, como una coloración negra y un aspecto algodonoso.

### Identificación molecular

La identificación molecular se realizó mediante PCR, siguiendo el protocolo de Polanco Florián *et al.* (2019). El ADN se extrajo de colonias puras cultivadas en PDA usando el kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). Se emplearon los partidores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), para amplificar la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2). Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos (95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se purificaron (QIAquick Gel Extraction Kit) y se secuenciaron por Sanger. Las secuencias fueron analizadas mediante BLAST en GenBank para confirmar la identidad del aislado.

### Crecimiento de *L. theobromae* en diferentes medios de cultivo

Se determinó el crecimiento de *L. theobromae* en tres medios de cultivo: papa dextrosa agar (PDA), agar maíz (AM) y agar extracto de malta (AME). Las placas se incubaron a 28 °C en condiciones de oscuridad, y se observó y registró el crecimiento fúngico diariamente durante 4 días. Se midió el diámetro de las colonias en cada placa a intervalos de 24 horas, y se registró el tamaño de las colonias y patrón de crecimiento.

### Crecimiento a diferentes rangos de temperatura

Se inoculó un fragmento del cultivo puro en el centro de placas con PDA, AM y AME, utilizando un asa estéril. Se realizaron tres réplicas por medio. Las placas se incubaron a 14, 28 y 40 °C durante 72 horas. Posteriormente, se midió el diámetro de las colonias y se registró su morfología.

### Cobertura de infección en mazorcas de cacao

Se seleccionaron mazorcas sanas de tres materiales diferentes de cacao, en un estado de maduración intermedio. Luego, su superficie se desinfectó con alcohol al 70 % y se dejaron secar al aire en condiciones estériles. Paralelamente, se preparó el inóculo de *L. theobromae* en placas de PDA a 28 °C durante 6 días. Para la inoculación del fitopatógeno se siguió la metodología descrita Cedeño Moreira *et al.* (2020). Las mazorcas se cortaron superficialmente con un bisturí estéril en la zona de inoculación y se agregó un segmento del cultivo de 0,5 cm<sup>2</sup>, las heridas se cubrieron con cinta adhesiva estéril para evitar la contaminación. Las mazorcas inoculadas se colocaron en bolsas de plástico perforadas y se incubaron a 28 °C durante 7-14 días en una cámara de crecimiento.

Se revisaron diariamente para observar síntomas de infección como manchas necróticas, podredumbre y cambios de color. La documentación visual se realizó mediante fotografías y las lesiones se midieron con calibrador digital (Traceable® Digital Calipers).

### Recuento de esporas en la superficie de la mazorca

Para el recuento de esporas de *L. theobromae* en la superficie de mazorca de cacao, se seleccionaron las mazorcas del ensayo de infección. Para la recolección de esporas, las mazorcas se sumergieron y agitaron en una solución salina estéril al 0.85 % con 0.05 % de Tween 20, durante 5 minutos, y la solución filtrada se centrifugó a 3000 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 mL de agua destilada estéril. La suspensión de esporas se cuantificó en cámara de Neubauer para la obtención de la concentración de esporas por cm<sup>2</sup>.

### Inhibición de la germinación de semillas inoculadas con *L. theobromae*

Las semillas se dividieron en dos grupos: control (inmersión en agua estéril) y experimental (inoculación con una suspensión de *L. theobromae*,  $1 \times 10^6$  esporas/mL durante 30 min). Luego se incubaron en cámaras oscuras a 28 °C sobre papel filtro húmedo estéril. La germinación se evaluó a los 10 días, registrando el número de semillas germinadas. Los datos permitieron calcular la tasa de inhibición inducida por el fitopatógeno.

### Mortalidad en plántulas inoculadas con *L. theobromae*

Se evaluó la mortalidad de plántulas de cacao germinadas en sustrato estéril (tierra: arena, 1:1) bajo condiciones controladas (28 °C, 80 % HR, 12 h luz/12 h oscuridad), mediante el protocolo modificado de Auhing Arcos *et al.* (2021). A los 15 días, en etapa de dos hojas verdaderas, se inoculó el sistema radicular del grupo experimental con una suspensión de *L. theobromae* ( $1 \times 10^6$  esporas/mL, 5 mL por plántula), mientras que el grupo control recibió agua estéril. La mortalidad se evaluó durante 60 días, registrando plántulas con pérdida total de turgencia y desecación.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos y cinco repeticiones, con un total de diez unidades experimentales por tratamiento. Previo al análisis, se verificaron los supuestos de normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de

varianzas mediante la prueba de Bartlett. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), se empleó el test de Tukey para la comparación de rangos múltiples, con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ . El procesamiento estadístico se realizó con el *software* R.

## RESULTADOS

### Caracterización morfológica de *Lasiodiplodia theobromae*

La caracterización morfológica de los aislamientos de *L. theobromae* mostró diferencias entre las cepas LS-M1 (Figura 1 A1-A4) y LS-M2 (Figura 1 B1-B4). Las colonias en vista frontal de ambas cepas (Figura 1 A1, B1) presentaron un crecimiento micelial denso y de color oscuro, mientras que en el perfil posterior (Figura 1 A2, B2) se observó la producción de estructuras esféricas negras, las cuales fueron indicativas de picnidios abundantes. La observación microscópica reveló conidios maduros elipsoidales con un septo central y conidios inmaduros sin septo, homogéneos entre ambas cepas (Figura 1 A3, B3). Además, las hifas presentaron septos bien definidos y un patrón ramificado característico (Figura 1 A4, B4). Las características morfológicas observadas en ambas cepas fueron consistentes con la descripción taxonómica de *L. theobromae*.

### Identificación molecular de *L. theobromae*

Los resultados evidenciaron que la cepa LS-M1, identificada bajo el código de acceso MK696028.1, mostró una cobertura de consulta del 100 % en relación con la cepa MY-8, lo que indicó que la secuencia coincide en su totalidad con la secuencia de referencia utilizada. Asimismo, presentó una identidad del 100 %, lo que sugirió una correspondencia a *L. theobromae*. Por otro lado, la cepa LS-M2, con el código de acceso MG897496.1, fue relacionada con la cepa LD02. Al igual que la cepa LS-M1, la cepa LD02 mostró una cobertura de consulta del 100 %, lo que confirmó que toda la secuencia de la cepa aislada se alineó con la secuencia de *L. theobromae* (Tabla 1).

### Crecimiento en diferentes medios de cultivo

*L. theobromae* mostró un crecimiento significativamente superior en PDA en comparación con AM y AME. A las 96 horas, alcanzó un diámetro de 9.01 cm en PDA, mientras que en AM y AME fue de 6.91 y 7.33 cm, respectivamente. En todas las horas evaluadas, PDA promovió el mayor crecimiento micelial, destacándose como el medio más favorable para el desarrollo del fitopatógeno (Figura 2).

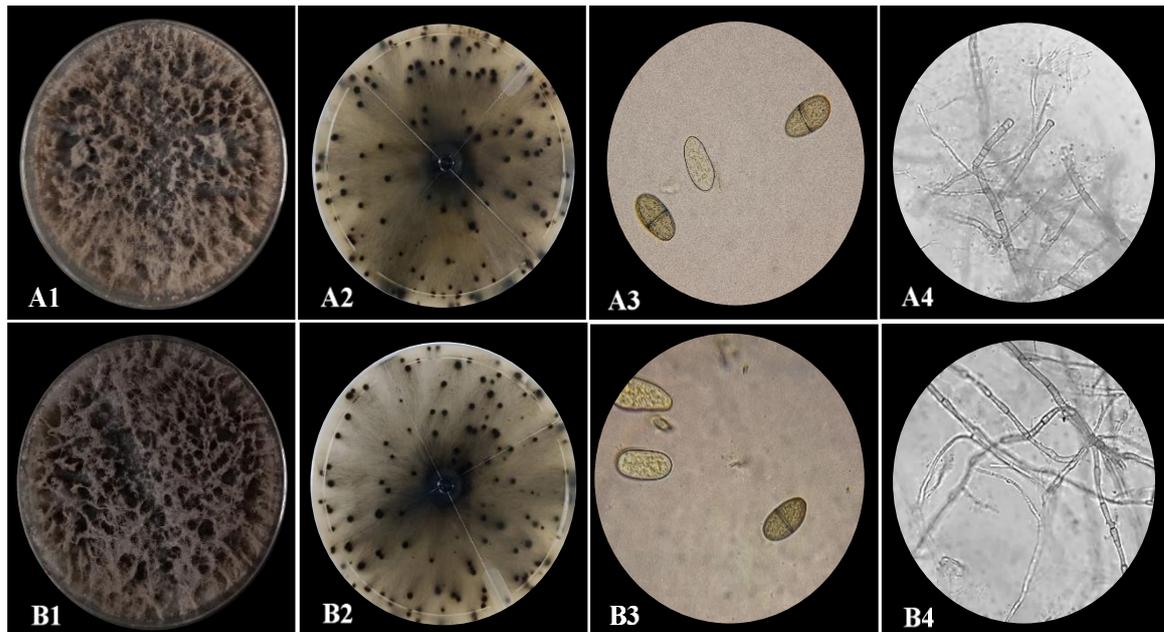


Figura 1. Caracterización morfológica de los aislados de *Lasiodiplodia theobromae*: A1-A4, cepa LS-M1; B1-B4, cepa LS-M2 (A1, B1: Colonia perfil frontal; A2, B2: Colonia perfil posterior; A3, B3: Conidios inmaduros; A4, B4: Hifas septadas).

Tabla 1. Identificación molecular de los aislados fúngicos.

Código	CEPA Nomenclatura	Cepa	Identidad (Base de datos NCBI / GenBank)		
			Cobertura de consulta (%)	Identidad (%)	Numero de acceso
LS-M1	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	HY-8	100	100	<a href="#">MK696028.1</a>
LS-M2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	LD02	100	100	<a href="#">MG897496.1</a>

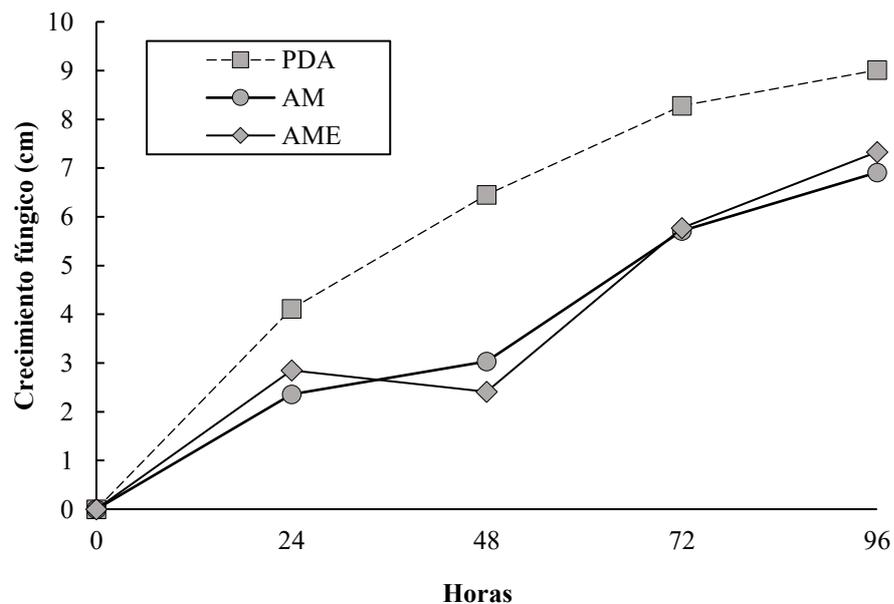


Figura 2. Capacidad de crecimiento *Lasiodiplodia theobromae* en tres medios de cultivo diferentes: papa dextrosa agar (PDA), agar maíz (AM) y agar extracto de malta (AME).

### Crecimiento a diferentes temperaturas

En el medio PDA, a 28 °C se observó el mayor crecimiento con un diámetro de 8.41 cm, estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) a los otros dos tratamientos de temperatura. El menor crecimiento micelial fue obtenido a 14 °C con 3.19 cm. En el medio AM, el crecimiento a 28 °C también fue el mayor, con un diámetro de 7.27 cm, mientras que a 14 y 40 °C los diámetros fueron menores con valores de 2.12 y 3.39 cm, respectivamente. En el medio AME el mayor crecimiento se obtuvo a 28 °C (7.01 cm), y el menor crecimiento a 14 °C (2.06). Estos resultados demostraron que la temperatura óptima para el crecimiento de *L. theobromae* en los tres medios de cultivo fue de 28 °C, mientras que temperaturas más bajas (14 °C) y más altas (40 °C) inhibieron su crecimiento de manera significativa (Figura 3).

### Cobertura de infección en mazorcas

La cobertura de la infección interna y externa ocasionada por *L. theobromae* evidenció diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La variedad Trinitario (Figura 4C) presentó la menor cobertura de infección, con valores de 1 cm para la infección interna y 2 cm para la infección externa, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el resto de las variedades. La variedad Nacional (Figura 4B) mostró la mayor cobertura de infección, con 5 cm tanto para la infección interna como externa, sin embargo, no presentó diferencias significativas ( $p > 0.005$ ) en la infección externa con la variedad CCN-51. La variedad CCN-51 (Figura 4A) presentó una cobertura intermedia, con 3 cm para la infección

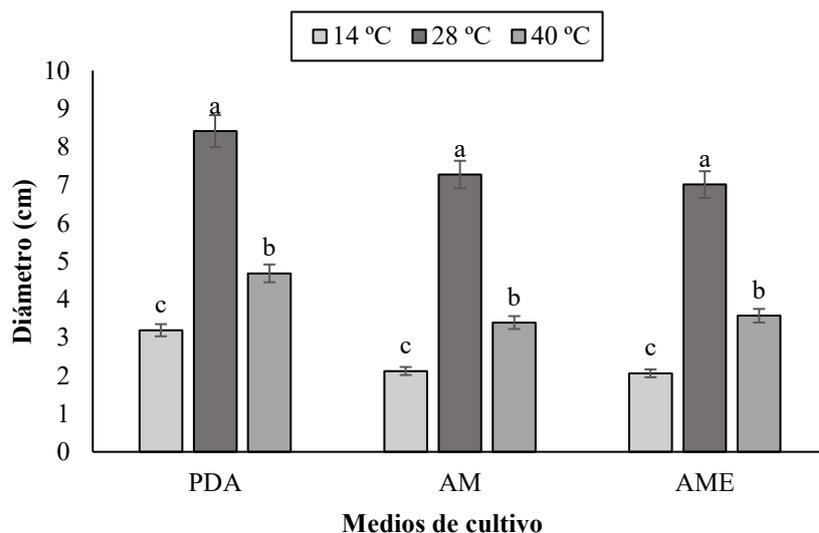
interna y 4 cm para la externa. Estas diferencias indican que la variedad Nacional es la más susceptible a la infección por *L. theobromae*, seguida por CCN-51, mientras que Trinitario demuestra una mayor resistencia.

### Recuento de esporas en la superficie de la mazorca

Los resultados del recuento de esporas en la superficie de la mazorca mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades. La variedad CCN-51 presentó la mayor densidad de esporas y alcanzó 118 esporas/cm<sup>2</sup>, significativamente superior ( $p < 0.05$ ) a las otras variedades. La variedad Trinitario mostró una densidad intermedia, con 71 esporas/cm<sup>2</sup>, diferenciándose estadísticamente de CCN-51. La variedad Nacional mostró la menor densidad de esporas, con 31 esporas/cm<sup>2</sup>. Estos resultados demostraron que la variedad CCN-51 fue la más susceptible a la colonización por esporas de *L. theobromae*, mientras que la Nacional presentó una menor susceptibilidad relativa (Figura 5).

### Inhibición de la germinación

Los resultados demostraron que la variedad CCN-51 presentó la mayor inhibición de germinación con un 45 %, con diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) de las otras dos variedades. En contraste, las variedades Nacional y Trinitario mostraron niveles de inhibición de germinación similares, con valores cercanos al 25 % y no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Figura 6).



**Figura 3.** Crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en tres medios de cultivo: papa dextrosa agar (PDA), agar maíz (AM) y agar extracto de malta (AME), y tres rangos de temperatura (14, 28 y 40 °C). Las líneas de error sobre las barras indican  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

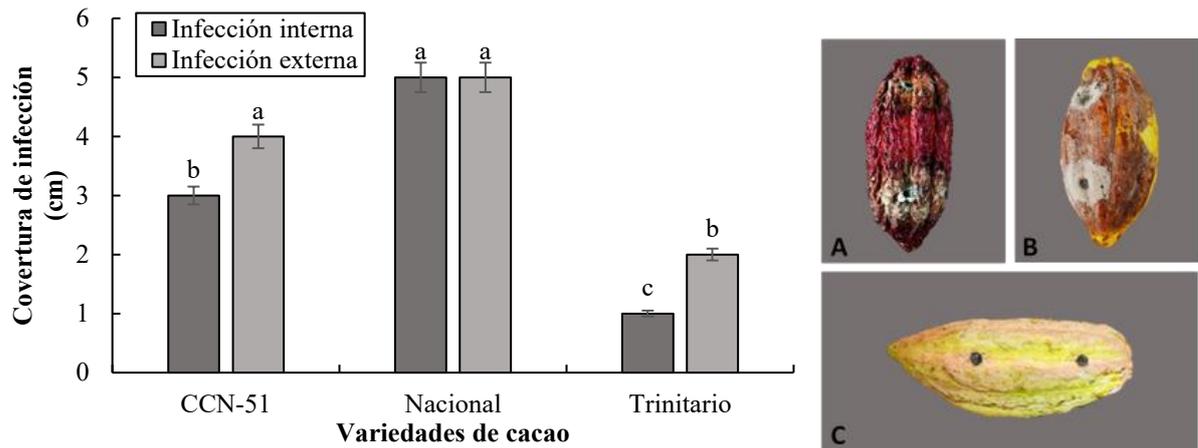


Figura 4. Cobertura de la infección causada por *Lasiodiplodia theobromae* en tres materiales genéticos de cacao: A) cacao CCN-51, B) cacao Nacional y C) cacao Trinitario, evaluando tanto el perfil externo como el interno de la mazorca. Las líneas de error sobre las barras indican  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

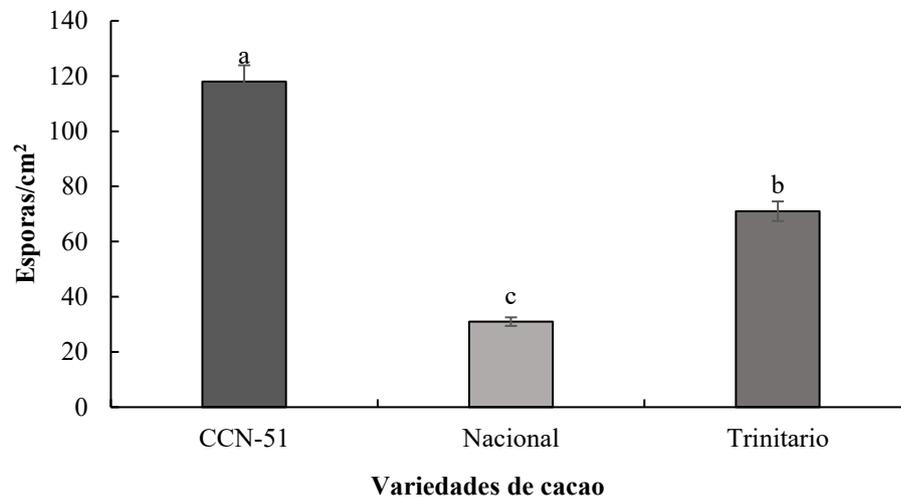


Figura 5. Concentración de esporas sobre la superficie infectada de diferentes materiales genéticos de cacao ecuatoriano. Las líneas de error sobre las barras indican  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

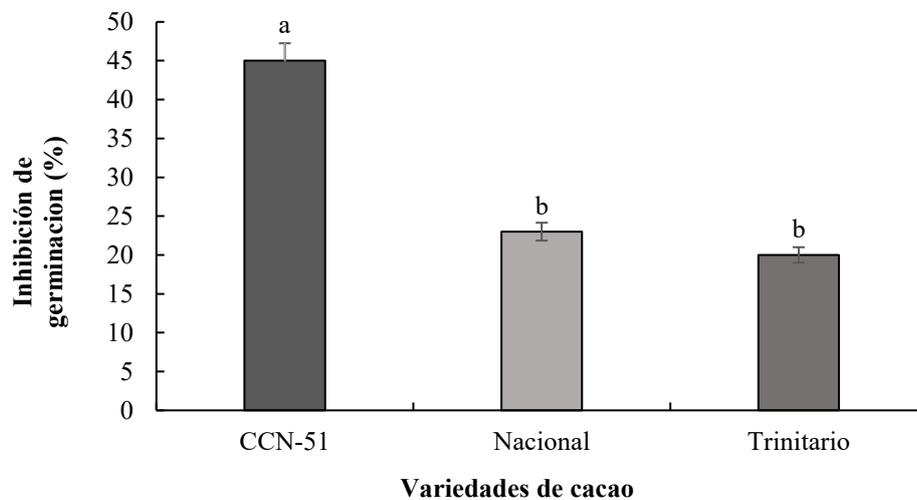


Figura 6. Inhibición de la germinación en semillas de tres materiales genéticos de cacao ecuatoriano mediante la inoculación de *Lasiodiplodia theobromae*. Las líneas de error sobre las barras indican  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

### Mortalidad e infectividad en plántulas de cacao

La progresión de mortalidad e infección por *L. theobromae* mostró diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades. La variedad Nacional fue la más susceptible (70 % de mortalidad, 85 % de infección), mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con las otras dos variedades. La variedad Trinitario presentó la menor mortalidad con 28 % y una infección del 48 % (Figura 7).

### DISCUSIÓN

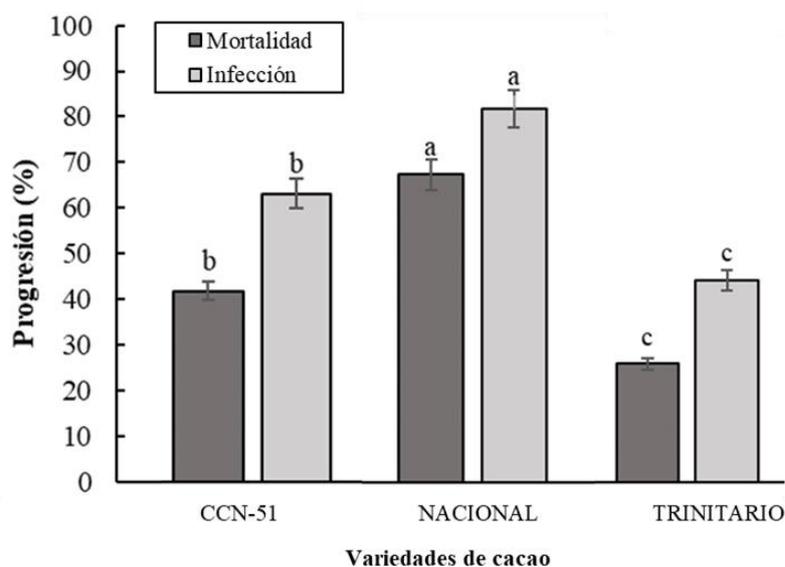
La caracterización morfológica de los aislamientos de *L. theobromae* LS-M1 y LS-M2 mostró un crecimiento micelial denso y de color oscuro en vista frontal; esto se asocia con la producción de melanina, un pigmento que confiere resistencia a condiciones ambientales adversas (Eisenman *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023). Este rasgo no solo es un indicador de robustez estructural, sino también un factor relacionado con la virulencia del fitopatógeno en los hospedadores (Eisenman *et al.*, 2020). Se ha señalado que la presencia de estructuras esféricas negras en el perfil posterior, identificadas como picnidios, es clave para la formación y dispersión de conidios, lo que asegura la capacidad de colonización y propagación del hongo en ambientes húmedos típicos de los cultivos de cacao (Atallah *et al.*, 2024).

La observación microscópica de conidios maduros con un septo central y conidios inmaduros sin septo confirma la capacidad de *L. theobromae* para producir esporas viables en diversas etapas de maduración, lo que facilita su dispersión en el ambiente (Huaman-Pilco *et al.*, 2024; Ocampo *et al.*, 2024). Esta característica es fundamental para su

identificación taxonómica y ha sido documentada como un rasgo distintivo dentro del género *Lasiodiplodia* (Thangarajah y Emmanuel, 2024). Estudios efectuados por Delmas *et al.* (2024) han demostrado que la transición entre conidios inmaduros y maduros asegura la viabilidad del fitopatógeno, incluso en condiciones desfavorables, lo que refleja su adaptabilidad ecológica y su potencial como amenaza fitosanitaria en cultivos estratégicos.

El crecimiento superior de *L. theobromae* en el medio PDA, se atribuye a la alta disponibilidad de carbohidratos simples y complejos en la composición del medio (Ascencio *et al.*, 2021). El medio de cultivo PDA contiene extracto de papa, rico en almidones fácilmente hidrolizables por las enzimas amilolíticas del hongo, y dextrosa, una fuente directa de glucosa que favorece un metabolismo energético eficiente (Constante *et al.*, 2024). Este acceso rápido a nutrientes esenciales potencia la síntesis de macromoléculas necesarias para la expansión del micelio, como las proteínas y los polisacáridos de la pared celular (Ikechi y Nwachukwu, 2023; García *et al.*, 2024).

El crecimiento de *L. theobromae* a 28 °C destaca como rango ideal para la actividad metabólica y enzimática del mismo (Quach *et al.*, 2023). A esta temperatura, las enzimas esenciales para la biosíntesis de la pared celular y el metabolismo energético, como la glucosiltransferasa y la isocitrato deshidrogenasa, operan cerca de su máxima eficiencia catalítica (Bhatia *et al.*, 2021; Dahmani *et al.*, 2023). Esto permite un balance óptimo entre el anabolismo y el catabolismo, lo que favorece un desarrollo micelial acelerado y una expansión homogénea de las colonias (Chang *et al.*, 2022).



**Figura 7.** Progresión de la mortalidad e infección mediante la inoculación de *Lasiodiplodia theobromae* en plántulas de tres materiales de cacao ecuatoriano. Las líneas de error sobre las barras indican  $\pm$  la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

Las temperaturas más bajas en rango de 14 °C limitan significativamente el crecimiento del hongo debido a una reducción en la actividad enzimática y en las tasas de difusión de los nutrientes a través de las membranas celulares (Jiang *et al.*, 2022; Ashtiani *et al.*, 2023). En estas condiciones, las rutas metabólicas dependientes de temperatura, como la glucólisis y la fosforilación oxidativa, se ven afectadas, lo que disminuye la disponibilidad de adenosín trifosfato (ATP) necesario para la expansión celular (Raymond-Bouchard *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2022).

El incremento de la temperatura por encima de los 40 °C reduce el crecimiento del hongo, lo que puede explicarse por la desnaturalización parcial de proteínas y enzimas críticas, así como por el estrés térmico sobre los componentes celulares (Luo *et al.*, 2021). Altas temperaturas también pueden generar acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que daña las membranas celulares y los organelos y compromete el metabolismo general del hongo (Carvajal, 2019). Aunque el crecimiento a 40 °C es mayor que a 14 °C, refleja una capacidad adaptativa limitada de *L. theobromae* para tolerar temperaturas elevadas, probablemente como mecanismo de supervivencia en entornos tropicales estacionales (Picos-Muñoz *et al.*, 2015; Polanco-Florián *et al.*, 2020).

La menor cobertura de infección observada en Trinitario sugiere la presencia de mecanismos de defensa, como una mayor acumulación de metabolitos secundarios antifúngicos, tales como taninos y compuestos fenólicos (Rojo-Poveda *et al.*, 2021; Chóez-Guaranda *et al.*, 2023). Estos compuestos alteran la integridad estructural de la membrana plasmática y la pared celular de los hongos (Hossain *et al.*, 2021). Como resultado, se produce una fuga de componentes esenciales, como iones, metabolitos y proteínas, lo que conduce a la desregulación osmótica y la muerte celular (Rashad *et al.*, 2020).

La variedad Nacional, con la mayor cobertura de infección podría tener una menor capacidad de inducir respuestas de defensa sistémica adquirida (SAR) o presentar tejidos más susceptibles a la colonización fúngica (Tulshiram *et al.*, 2022). Esto puede deberse a diferencias en la composición estructural de las paredes celulares, como una menor cantidad de lignina o pectinas modificadas que facilitan la invasión de *L. theobromae* (Colonges *et al.*, 2022). Además, la interacción con el hongo podría estar regulada por la expresión de genes específicos relacionados con la resistencia o susceptibilidad, lo que explica la uniformidad en la cobertura entre las infecciones internas y externas en esta variedad (Asman *et al.*, 2021; Etaware, 2021). En CCN-51 la cobertura de infección intermedia refleja un balance entre susceptibilidad y resistencia. La mayor infección externa respecto a la interna

sugiere que la cutícula y las primeras capas de tejido pueden ser más vulnerables, pero la colonización de tejidos más profundos se ve parcialmente limitada, posiblemente por la activación de respuestas defensivas tardías. Esto coincide con lo señalado por Ploetz (2007), quien menciona que las diferencias en la resistencia de las variedades de cacao están influenciadas por factores anatómicos y bioquímicos que modulan la interacción hospedero-patógeno.

La alta densidad de esporas en CCN-51 se relaciona con una superficie epidérmica más favorable para la adhesión y germinación de las esporas, con una mayor rugosidad y composición lipídica de la cutícula que facilita la interacción con el fitopatógeno (Meza-Sepúlveda *et al.*, 2021; Jaimez *et al.*, 2022; Atianashie, 2024). Es posible que CCN-51 presente una menor concentración de compuestos antifúngicos en su superficie, lo que permitiría un crecimiento más rápido de las estructuras reproductivas del hongo (Morales *et al.*, 2024).

La menor densidad de esporas en la variedad Nacional sugiere una mayor resistencia natural a la colonización inicial por *L. theobromae*, debido a la presencia de barreras físicas más efectivas, como una cutícula más gruesa o ceras cuticulares que dificultan la adhesión de esporas (Mucherino Muñoz *et al.*, 2021). Asimismo, los metabolitos secundarios de esta variedad, como los compuestos fenólicos, actúan directamente al inhibir la germinación de esporas o al interferir en el desarrollo del micelio (Subroto *et al.*, 2023).

La tolerancia ante la infección de *L. theobromae* del material Trinitario estaría asociada a su origen híbrido, que combina características genéticas de las variedades Forastero y Nacional, lo que confiere una mayor variabilidad genética y una mayor capacidad para desarrollar respuestas defensivas frente a infecciones fúngicas (Adu-Acheampong *et al.*, 2012; Somarriba *et al.*, 2021; Asman *et al.*, 2024b). Es plausible que esta variedad posea mecanismos de resistencia más robustos, como la activación de genes que regulan respuestas de defensa inducida, lo que incluye la síntesis de compuestos antimicrobianos y el fortalecimiento estructural de tejidos para limitar la colonización del fitopatógeno (Ofori *et al.*, 2022; Nieves-Orduña *et al.*, 2023).

La alta susceptibilidad de la variedad Nacional frente a *L. theobromae* se debe a una combinación de factores genéticos, anatómicos y fisiológicos, donde su homogeneidad genética, característica de un germoplasma tradicional, ha limitado su adaptación evolutiva y respuesta inmunológica ante fitopatógenos, a diferencia de variedades híbridas o comerciales. Esta baja variabilidad genética reduce la probabilidad de poseer alelos de resistencia que confieran tolerancia al hongo, lo que facilita la penetración inicial y la colonización sistémica a través de los tejidos vasculares, lo que resulta en una

progresión rápida de la enfermedad (Nieves-Orduña *et al.*, 2021). En conjunto, estos factores convierten a la variedad Nacional en una planta altamente vulnerable, incapaz de desarrollar defensas eficaces frente a la patogenicidad de *L. theobromae*, lo cual resalta la importancia de estrategias de mejoramiento genético (Gopaulchan *et al.*, 2020; Ofori *et al.*, 2023).

## CONCLUSIONES

El estudio permitió evaluar la incidencia de *L. theobromae* en tres variedades de cacao ecuatoriano (Nacional, CCN-51 y Trinitario). Se observó una variabilidad significativa en la susceptibilidad entre las variedades, siendo Nacional la más afectada, con una mayor cobertura de infección tanto interna como externa en las mazorcas y una alta mortalidad en plántulas. El medio de cultivo papa dextrosa agar y la temperatura de 28 °C resultaron ser las condiciones óptimas para el crecimiento de *L. theobromae*. Estas condiciones facilitaron una mayor proliferación del fitopatógeno, lo cual es crucial para comprender su comportamiento y mejorar las estrategias de manejo.

### Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) por el apoyo y los recursos proporcionados para la realización de este estudio. También expresan su gratitud al equipo del Laboratorio de Biología y Microbiología de la UTEQ, así como pasantes y tesis, por su dedicación, colaboración y esfuerzo continuo. Agradecen, además, al Fondo Competitivo de Investigación Científica y Tecnológica (FOCICYT) de la UTEQ por el financiamiento del trabajo de investigación.

**Funding:** Fondo Competitivo de Investigación Científica y Tecnológica (FOCICYT) – UTEQ, Ecuador

**Conflict of interest:** The authors declare there are no competing interests.

**Compliance with ethical standards.** Does not apply.

**Data availability.** Data available from the author upon reasonable request.

**Author contribution statement (CRediT).** A.V. Cedeño-Moreira—Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Writing-Review and editing., M.S. Carranza-Patiño—Visualization, Validation, Investigation., K.V. Arellano-Ibarra—Investigation, Methodology., J.A. Torres-Rodríguez—Supervision, Data Curation., G. Zapata-Sifuentes—Formal analysis, Software, Writing-Original Draft., P. Preciado-Rangel—Writing-Original Draft, Writing-Review and editing

## REFERENCES

- Ablormeti, F.K., Coleman, S.R., Honger, J.O., Owusu, E., Bedu, I., Aidoo, O.F., Cornelio, E.W. and Odamttten, G. T., 2021. Management of *Lasiodyplodia theobromae*, the causal agent of mango tree decline disease in Ghana. *African Crop Science Journal*, 29(2), pp. 193-207. <https://dx.doi.org/10.4314/acsj.v29i2.2>
- Adebayo, S.T., Oyawole, F.P., Sanusi, R.A. and Afolami, C.A., 2022. Technology adoption among cocoa farmers in Nigeria: what drives farmers' decisions. *Forests, Trees and Livelihoods*, 31(1), pp. 1-12. <https://doi.org/10.1080/14728028.2021.2011789>
- Adu-Acheampong, R., Archer, S. and Leather, S., 2012. Resistance to dieback disease caused by Fusarium and Lasiodyplodia species in cacao (*Theobroma cacao* L.) genotypes. *Experimental agricultura*, 48(1), pp. 85-98. <https://doi.org/10.1017/S0014479711000883>
- Ambele, C.F., Bisseleua, H.D., Djuideu, C.T. and Akutse, K.S., 2023. Managing insect services and disservices in cocoa agroforestry systems. *Agroforestry Systems*, 97, pp. 965-984. <https://doi.org/10.1007/s10457-023-00839-x>
- Ascencio, J.J., Philippini, R.R., Gomes, F.M., Pereira, F.M., da Silva, S.S., Kumar, V. and Chandel, A.K., 2021. Comparative Highly Efficient Production of  $\beta$ -glucan by *Lasiodyplodia theobromae* CCT 3966 and Its Multiscale Characterization. *Fermentation*, 7(3), Article 108. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030108>
- Ashtiani, SH.M., Aghkhani, M.H., Feizy, J. and Martynenko, A., 2023. Effect of cold plasma pretreatment coupled with osmotic dehydration on drying kinetics and quality of mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Bioprocess Technology*, 16(12), pp. 2854–2876. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03096-z>
- Asman, A., Iwanami, T. and Rosmana, A., 2024a. Effect of drought stress on dieback disease development under *Lasiodyplodia theobromae* infection in cocoa clone" MCC 02". *Beverage Plant Research*, 4, Article

- e034. <https://doi.org/10.48130/bpr-0024-0023>
- Asman, A., Iwanami, T., Rosmana, A. and Amin, N., 2024b. Assessing the response of local cocoa clones of south Sulawesi for resistance to dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of Phytopathology*, 172(6), Article e13424. <https://doi.org/10.1111/jph.13424>
- Asman, A., Purung, M.H.B., Lambert, S., Amiruddin, A. and Rosmana, A., 2021. Effect of rootstock and scion on resistance of cocoa clones to vascular streak dieback caused by *Ceratobasidium theobromae*. *Annals of Agricultural Science*, 66(1), pp. 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2021.02.005>
- Atallah, O.O., Hassanin, A.A., Yassin, S.M., Aloufi, A.S., Almanzalawi, E.A., Abdelkhalek, A., Atia, M.M., Behiry, S., Abdelrhim, A.S. and Nehela, Y., 2024. Pathological characterization and management of *Lasiodiplodia theobromae*, a hemibiotroph with an interkingdom host range. *Plant Disease*, 108(11), pp. 3243–3257. <https://doi.org/10.1094/pdis-03-24-0713-re>
- Atianashie, M., 2024. Disease detection in CCN-51 cocoa fruits through convolutional neural networks: A novel approach for the Ghana cocoa board. *Convergence Chronicles*, 5(3), pp. 51–72. <https://doi.org/10.53075/Ijmsirq/6554213434324>
- Auhing Arcos, J.A., Cedeño Moreira, Á.V., Saucedo Aguiar, S., Vera Benites, L.F., Macías Holguín, C.J. and Canchignia Martínez, H.F., 2021. Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de *Moniliophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L. nacional de la Costa Ecuatoriana. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), pp. 599–609. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.064>
- Avendaño-Arrazate, C.H., Guillén-Díaz, S. and Hernández-Gómez, E., 2018. “Regalo de Dios”: Clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) tolerante a *Moniliophthora roreri* Cif & Par, para la renovación de las zonas cacaoteras de México. *AgroProductividad*, 11(9), pp. 173–176. <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i9.1233>
- Bhatia, R.K., Ullah, S., Hoque, M.Z., Ahmad, I., Yang, Y.H., Bhatt, A.K. and Bhatia, S.K., 2021. Psychrophiles: A source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), Article 104607. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104607>
- Boadi, S.A., Olwig, M.F., Asare, R., Bosselmann, A.S., and Owusu, K., 2022. The role of innovation in sustainable cocoa cultivation: Moving beyond mitigation and adaptation. In: M. Coromaldi and S. Auci, eds. *Climate-Induced Innovation: Mitigation and Adaptation to Climate Change*. Cham: Palgrave Macmillan, pp. 47–80. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-01330-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-031-01330-0_3)
- Boczoń, A., Hilszczańska, D., Wrzosek, M., Szczepkowski, A. and Sierota, Z., 2021. Drought in the forest breaks plant–fungi interactions. *European Journal of Forest Research*, 140, pp. 1301–1321. <https://doi.org/10.1007/s10342-021-01409-5>
- Burgess, T.I., Howard, K., Steel, E. and Barbour, E.L., 2018. To prune or not to prune; pruning induced decay in tropical sandalwood. *Forest Ecology and Management*, 430, pp. 204–218. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.08.009>
- Carvajal-Carvajal, C. 2019. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina legal de Costa Rica*, 36(1), pp. 91–100. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152019000100091](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091)
- Cedeño Moreira, Á. V., Romero Meza, R. F., Auhing Arcos, J.A., Mendoza León, A.F., Abasolo Pacheco, F. and Canchignia Martínez, H.F., 2020. Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial de biocontrol en la enfermedad de la vaina negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51. *Scientia agropecuaria*, 11(4), pp. 503–512. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.05>
- Çelik Oğuz, A. and Karakaya, A., 2021. Genetic diversity of barley foliar fungal pathogens. *Agronomy*, 11(3), Article 434. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030434>
- Chang, L., Lu, H., Chen, H., Tang, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, Y. Q. and Chen, W., 2022. Lipid metabolism research in oleaginous fungus *Mortierella alpina*: Current progress

- and future prospects. *Biotechnology Advances*, 54, 107794. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107794>
- Chóez-Guaranda, I., Espinoza-Lozano, F., Reyes-Araujo, D., Romero, C., Manzano, P., Galarza, L. and Sosa, D., 2023. Chemical characterization of *Trichoderma* spp. Extracts with antifungal activity against cocoa pathogens. *Molecules*, 28(7), Article 3208. <https://doi.org/10.3390/molecules28073208>
- Cilas, C. and Bastide, P., 2020. Challenges to cocoa production in the face of climate change and the spread of pests and diseases. *Agronomy*, 10(9), Article 1232. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091232>
- Colonges, K., Loor Solorzano, R.G., Jimenez, J.C., Lahon, M.C., Seguine, E., Calderon, D., Subia, C., Sotomayor, I., Fernández, F., Lebrun, M., Fouet, O., Rhoné, B., Argout, X., Costet, P., Lanaud, C. and Boulanger, R., 2022. Variability and genetic determinants of cocoa aromas in trees native to South Ecuadorian Amazonia. *Plants People Planet*, 4(6), pp. 618–637. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10268>
- Constante, M. P., Tigrero-Vaca, J., Villavicencio-Vasquez, M., Montoya, D.C., Cevallos, J.M. and Coronel-León, J., 2024. Evaluation of stress tolerance and design of alternative culture media for the production of fermentation starter cultures in cacao. *Helicon*, 10(8), Article e29900. <https://doi.org/10.1016/j.helicon.2024.e29900>
- Dahmani, I., Qin, K., Zhang, Y. and Fernie, A.R., 2023. The formation and function of plant metabolons. *The Plant Journal*, 114(5), pp. 1080–1092. <https://doi.org/10.1111/tpj.16179>
- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernández, J.B., Chaves-López, C., Romanazzi, G. and Paparella, A., 2021. The role of fungi in the cocoa production chain and the challenge of climate change. *Journal of Fungi*, 7(3), Article 202. <https://doi.org/10.3390/jof7030202>
- Delmas, C.E.L., Bancal, M.O., Leyronas, C., Robin, M.H., Vidal, T. and Launay, M., 2024. Monitoring the phenology of plant pathogenic fungi: why and how? *Biological Reviews*, 99(3), pp. 1075–1084. <https://doi.org/10.1111/brv.13058>
- Díaz-Valderrama, J.R., Leiva-Espinoza, S.T. and Aime, M.C., 2020. The history of cacao and its diseases in the Americas. *Phytopathology*, 110(10), pp. 1604–1619. <https://doi.org/10.1094/PHTO-05-20-0178-RVW>
- Eisenman, H.C., Greer, E.M. and McGrail, C.W., 2020. The role of melanins in melanotic fungi for pathogenesis and environmental survival. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), pp. 4247–4257. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10532-z>
- Erazo Solorzano, C.Y., Tuárez García, D.A., Edison Zambrano, C., Moreno-Rojas, J.M. and Rodríguez Solana, R., 2023. Monitoring Changes in the Volatile Profile of Ecuadorian Cocoa during Different Steps in Traditional On-Farm Processing. *Plants*, 12(22), Article 3904. <https://doi.org/10.3390/plants12223904>
- Espinal, R.B.A., de Santana, S.F., Santos, V.C., Lizardo, G.N.R., Silva, R.J.S., Corrêa, R.X., Loguercio, L.L., Góes-Neto, A., Pirovani, C.P., Fonseca, C.P.L. and Aguiar, E.R.G.R., 2023. Uncovering a complex virome associated with the cacao pathogens *Ceratocystis cacaofunesta* and *Ceratocystis fimbriata*. *Pathogens*, 12(2), Article 287. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020287>
- Etaware, P.M., 2021. The effects of the phytochemistry of cocoa on the food chemistry of chocolate(s) and how disease resistance in cocoa can be improved using CRISPR/Cas9 technology. *Food Chemistry. Molecular Sciences*, 3, Article 100043. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100043>
- García, V.J., Sánchez-López, K.L., Esquivel Méndez, J.J., Sánchez-Hernández, D., Cervantes-Chávez, J.A., Landeros-Jaime, F., Mendoza-Mendoza, A., Vega-Arreguín, J.C. and Esquivel-Naranjo, E.U., 2024. Carbon and nitrogen sources influence parasitic responsiveness in *Trichoderma atroviride* NI-1. *Journal of Fungi*, 10(10), Article 671. <https://doi.org/10.3390/jof10100671>
- González, R., Butković, A. and Elena, S.F., 2020. From foes to friends: Viral infections expand the limits of host phenotypic plasticity. *Advances in Virus Research*, 106,

- pp. 85-121. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.01.003>
- Gopaulchan, D., Motilal, L. A., Kalloo, R. K., Mahabir, A., Moses, M., Joseph, F. and Umaharan, P. 2020. Genetic diversity and ancestry of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Dominica revealed by single nucleotide polymorphism markers. *Genome*, 63(12), pp. 583–595. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0214>
- Hossain, S.I., Saha, S.C. and Deplazes, E., 2021. Phenolic compounds alter the ion permeability of phospholipid bilayers via specific lipid interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 23(39), pp. 22352–22366. <https://doi.org/10.1039/d1cp03250j>
- Huaman-Pilco, J., Huaman-Pilco, Á. F., Hernández-Díaz, E., Oliva-Cruz, S. M. and Díaz-Valderrama, J.R., 2024. Dieback and pod rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *L. iraniensis* in native accessions of cacao (*Theobroma cacao*) from Amazonas, Peru. *Indian Phytopathology*, 77(3), pp. 693–703. <https://doi.org/10.1007/s42360-024-00771-9>
- Ikechi, C.G. and Nwachukwu, E.O., 2023. Screening of selected plant products as alternatives to agar in mycological studies. *Mycopath*, 20(1), pp. 39–50. <https://journals.pu.edu.pk/journals/index.php/mycopath/article/view/5892>
- Jaimez, R.E., Barragan, L., Fernández-Niño, M., Wessjohann, L.A., Cedeño-García, G., Sotomayor Cantos, I. and Arteaga, F., 2022. *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. *PeerJ*, 10, Article e12676. <https://doi.org/10.7717/peerj.12676>
- Jiang, L., Pettitt, T.R., Buenfeld, N. and Smith, S.R., 2022. A critical review of the physiological, ecological, physical and chemical factors influencing the microbial degradation of concrete by fungi. *Building and Environment*, 214, Article 108925. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.108925>
- Kumah, P., Lartey, E.N. and Bismark, O., 2020. Antimicrobial Effect of Cocoa Leaf Extracts on *Botryodiplodia theobromae*; Leading Causative Organism of Crown Rot Disease of Banana (*Musa acuminata*). *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*, 7(3), pp. 40–50. <https://ssrn.com/abstract=4461131>
- La Porta, N., Hietala, A.M. and Baldi, P., 2023. Bacterial diseases in forest trees. In: A. Schenck, ed. *Forest Microbiology: Tree Diseases and Pests*. Volume 3. Cambridge, MA: Academic Press, pp. 139–166. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18694-3.00001-8>
- Liu, Y., Chen, Y., Yu, Z. and Zhang, Y., 2023. Biological control of melanin biosynthesis pathway on prolific and pleochromatic induction of *Lasiodiplodia theobromae*. *Archives of Microbiology*, 205(1), Article 46. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03396-6>
- Luo, L., Zhang, S., Wu, J., Sun, X. and Ma, A., 2021. Heat stress in macrofungi: effects and response mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(20), pp. 7567–7576. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11574-7>
- Meza-Sepúlveda, D.C., Castro, A.M., Zamora, A., Arboleda, J.W., Gallego, A.M. and Camargo-Rodríguez, A.V., 2021. Bio-based value chains potential in the management of cacao pod waste in Colombia, a case study. *Agronomy*, 11(4), Article 693. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040693>
- Morales, M., Morocho, J., López, X. and Navas, P., 2024. Application of convolutional neural networks for the detection of diseases in the CCN-51 cocoa fruit by means of a mobile application. In: L. Meng, ed. *International Conference on Cloud Computing and Computer Networks (CCCN 2023)*. Cham: Springer, pp. 3–10. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-47100-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-47100-1_1)
- Mucherino Muñoz, J.J., de Melo, C.A.F., Santana Silva, R.J., Luz, E.D.M.N. and Corrêa, R.X., 2021. Structural and Functional Genomics of the Resistance of Cacao to *Phytophthora palmivora*. *Pathogens*, 10(8), Article 961. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080961>
- Muñoz, R.M., Lerma, M.L., Castillo, P., Tolosa, V.M., Olmo, D., Trapero, A. and Agustí-Brisach, C., 2022. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing crown canker of almond in Spain. *Journal of Plant*

- Pathology*, 104, pp. 411-412  
<https://doi.org/10.1007/s42161-021-00977-0>
- Nieves-Orduña, H.E., Krutovsky, K.V. and Gailing, O., 2023. Geographic distribution, conservation, and genomic resources of cacao *Theobroma cacao* L. *Crop Science*, 63(4), pp. 1750–1778.  
<https://doi.org/10.1002/csc2.20959>
- Nieves-Orduña, H.E., Müller, M., Krutovsky, K.V. and Gailing, O., 2021. Geographic patterns of genetic variation among cacao (*Theobroma cacao* L.) populations based on chloroplast markers. *Diversity*, 13(6), Article 249.  
<https://doi.org/10.3390/d13060249>
- Ocampo, C., Malonzo, M.A.C., Grospe, R.A.F., Bagic, J.T.A., Nozawa, S., Tsurumi, Y. and Watanabe, K., 2024. *Lasiodiplodia* species isolated from *Theobroma cacao* in the Philippines and their pathogenicity. *Journal of General Plant Pathology*, 90(5), pp. 254–266. <https://doi.org/10.1007/s10327-024-01187-z>
- Ofori, A., Padi, F.K., Ameyaw, G.A., Dadzie, A.M., Opoku-Agyeman, M., Domfeh, O. and Ansah, F.O., 2022. Field evaluation of the impact of cocoa swollen shoot virus disease infection on yield traits of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in Ghana. *PloS One*, 17(1), Article e0262461.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262461>
- Ofori, A., Padi, F.K., Amoako-Attah, I., Asare, E.K., Dadzie, A. and Bukari, Y., 2023. Genetic variation among cocoa (*Theobroma cacao* L.) families for resistance to black pod disease under field and laboratory conditions. *Ecological Genetics and Genomics*, 28, Article 100182.  
<https://doi.org/10.1016/j.egg.2023.100182>
- Oliver, R.P., 2024. Diseases caused by fungi. In: R.P. Oliver, ed. *Agrios' Plant Pathology* (Sixth Edition). Cambridge, MA: Academic Press, pp. 339–427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822429-8.00013-3>
- Picos-Muñoz, P.A., García-Estrada, R.S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A. and Allende-Molar, R., 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(1), pp. 54-74.  
<https://www.scielo.org.mx/scielo.php?scrip>
- [t=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100054](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_9)
- Ploetz, R.C., 2007. Cacao Diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide. *Phytopathology*®, 97(12), pp. 1634-1639.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1634>
- Pokhrel, B., 2021. Effects of environmental factors on crop diseases. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 12, Article 553. 10.35248/2157-7471.21.12.553
- Polanco Florián, L.G., Alvarado Gómez, O.G., Pérez González, O., González Garza, R. and Olivares Sáenz, E., 2019. Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4), pp. 757–764.  
<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>
- Polanco, L.R., Gutiérrez, M.L.C., Parra, E.B. and Amaya, J.D.S., 2022. Reacción a la inoculación artificial con *Phytophthora palmivora* de frutos desprendidos de clones de cacao seleccionados. *Acta Agronómica*, 71(2), pp. 40-51.
- Polanco-Florián, L.G., Alvarado-Gómez, O.G., Olivares-Sáenz, E., González-Garza, R. and Pérez-González, O., 2020. Control biológico de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(5), pp. 1069–1081.  
<https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2272>
- Quach, N.T., Vu, T.H.N., Nguyen, T.T.A., Le, P.C., Do, H.G., Nguyen, T.D., Thao, P.T.H., Nguyen, T.T.L., Chu, H.H. and Phi, Q.-T., 2023. Metabolic and genomic analysis deciphering biocontrol potential of endophytic *Streptomyces albus* RC2 against crop pathogenic fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(4), pp. 2617–2626. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01134-8>
- Rashad, Y., Aseel, D. and Hammad, S., 2020. Phenolic compounds against fungal and viral plant diseases. In: R. Lone, R. Shuab and A.N. Kamili, eds. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*, Volume 1. Cham: Springer, pp. 201–219.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_9)

- Raymond-Bouchard, I., Tremblay, J., Altshuler, I., Greer, C. W. and Whyte, L.G., 2018. Comparative transcriptomics of cold growth and adaptive features of a eury- and steno-psychrophile. *Frontiers in microbiology*, 9, Article 1565. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01565>
- Restrepo, A., Arango, M., Velez, H. and Uribe, L., 1976. The isolation of *Botryodiplodia theobromae* from a nail lesion. *Sabouraudia*, 14(1), pp. 1-4. <https://doi.org/10.1080/00362177685190021>
- Rojo-Poveda, O., Ribeiro, S.O., Anton-Sales, C., Keymeulen, F., Barbosa-Pereira, L., Delporte, C., Zeppa, G. and Stévigny, C., 2021. Evaluation of cocoa bean shell antimicrobial activity: A tentative assay using a metabolomic approach for active compound identification. *Planta Medica*, 87(10/11), pp. 841-849. <https://doi.org/10.1055/a-1499-7829>
- Saravia-Matus, S.L., Rodríguez, A.G. and Saravia, J.A., 2020. Determinants of certified organic cocoa production: evidence from the province of Guayas, Ecuador. *Organic Agriculture*, 10, pp. 23-34. <https://doi.org/10.1007/s13165-019-00248-4>
- Somarriba, E., Peguero, F., Cerda, R., Orozco-Aguilar, L., López-Sampson, A., Leandro-Muñoz, M.E., Jagoret, P. and Sinclair, F.L., 2021. Rehabilitation and renovation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) agroforestry systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41(5), Article 64. <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00717-9>
- Subroto, E., Djali, M., Indiarso, R., Lembong, E. and Baiti, N., 2023. Microbiological activity affects post-harvest quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Horticulturae*, 9(7), Article 805. <https://doi.org/10.3390/horticulturae907805>
- Thangarajah, K. and Emmanuel, C.J., 2024. Identification of new phylogenetic lineage of *Lasiodiplodia* causing leaf spot and tip necrosis causing agent on Aloe vera in Sri Lanka and screening eco-friendly control measures. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 133, Article 102387. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102387>
- Torres-Rodriguez, J.A., Ramos-Remache, R.A., Reyes-Pérez, J.J., Quinatoa-Lozada, E.F. and Rivas-García, T., 2024. Silicon as a Biostimulant in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Cultivation and Biological Control Agent for *Moniliophthora roreri*. *Terra Latinoamericana*, 42, pp. 1-11. <https://doi.org/10.28940/terra.v42i0.1817>
- Tulshiram, W.S., Mathew, D., Chandrakant, E.S. and Minimol, J.S., 2022. Putative genes and pathways for Vascular Streak Dieback resistance in cocoa (*Theobroma cacao* L.) identified through the characterization of linked markers. *Ecological Genetics and Genomics*, 25, Article 100147. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2022.100147>
- Yang, Y., Dong, G., Wang, M., Xian, X., Wang, J. and Liang, X., 2021. Multifungicide resistance profiles and biocontrol in *Lasiodiplodia theobromae* from mango fields. *Crop Protection*, 145, Article 105611. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105611>