



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS DE GRADO

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO

DE

INGENIERO AGRÓNOMO

EVALUACIÓN TEMPRANA DE RESISTENCIA A *Phytophthora spp.* EN
CLONES DE CACAO NACIONAL Y AMAZONICO.

AUTOR

Denny Diogenes Carriel Muñoz

DIRECTORA

PhD. Carmita Suárez Capello

QUEVEDO - LOS RÍOS - ECUADOR

2013

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Tesis presentada al Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agrarias como requisito previo para la obtención del Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TEMA: EVALUACIÓN TEMPRANA DE RESISTENCIA A *Phytophthora spp.*
EN CLONES DE CACAO NACIONAL Y AMAZONICO.

APROBADA:

Ing. MsC. Alfonso Vasco Medina
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. MsC. Freddy Amores Puyutaxi
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ing. MsC. Ignacio Sotomayor Herrera
MIEMBRO DE TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN

PhD. Carmen Suárez Capello, Docente de la Facultad de Ciencias Agrarias de la **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**, Certifico: Que el egresado: **CARRIEL MUÑOZ DENNY DIOGENES**, realizó las actividades necesarias para la elaboración de la tesis de grado titulada **EVALUACIÓN TEMPRANA DE RESISTENCIA A *Phytophthora* spp. EN CLONES DE CACAO NACIONAL Y AMAZONICO**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

PhD. Carmen Suárez Capello.
DIRECTORA DE TESIS

DEDICATORIA

Primero dedicada a Dios.

A mi padre y a mi madre que me educaron con sabiduría e hicieron todo lo posible apoyándome en todo momento de mi vida.

A mis hermanas que las quiero mucho.

A Carmen que estuvo apoyándome en todo.

Y dedicada en especial a toda mi familia y seres queridos.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

PhD. Carmen Suárez Capello, ex Líder del Departamento Nacional de Protección Vegetal, de la EET-Pichilingue del INIAP, a la vez directora de tesis, por haber compartido sus conocimientos y experiencias, de todo corazón muchas gracias.

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por prestarme sus instalaciones y darme la oportunidad de realizar mi tesis de grado.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, a través de sus directivos quienes incentivan a los estudiantes hacia el fortalecimiento y desarrollo de nuestras habilidades.

A los docentes de la escuela de Ingeniería Agronómica que me han brindado su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación durante mi paso por esta ilustre carrera como estudiante.

A mi compañero de trabajo el Ing. Bernardo Castro, el cual es un gran amigo y me apoyo en todo el trabajo.

A todos quienes forman parte del DNPV de la EET-Pichilingue Ing. M.Sc. Karina Solís, Tec. Sofía Peñaherreragracias por su amabilidad, disposición y buena voluntad.

A los compañeros Jorge Aguirre, Fabián Sánchez, Fanny Sambrano y Diana Sanchez, por su amistad y apoyo.

A los Ings. Freddy Amores, Ignacio Sotomayor y Alfonso Vasco que me brindaron su ayuda y por con sus consejos brindados.

La responsabilidad de la presente investigación es única y exclusiva del autor.

DENNY CARRIEL MUÑOZ.

ÍNDICE

CONTENIDO

	Páginas
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Justificación	3
B. Objetivos	4
1. General	4
2. Específico.....	4
C. Hipótesis	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
A. Pudrición de la mazorca o mazorca negra	5
1. Origen de <i>Phytophthora</i> spp.....	6
2. Sintomatología	6
3. Clasificación taxonómica	7
4. Distribución geográfica de hospederos	8
5. Morfología	10
6. Resistencia.....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14
A. Localización del Estudio	14
B. Características Climáticas de la EET-Pichilingue	14
C. Factor en Estudio	14
D. Materiales experimental	14
1. Materiales a utilizados para la recolección de mazorcas.....	14
2. Materiales a utilizados en el laboratorio.....	15
3. Equipos utilizados.....	15
4. Material genético	15
E. Metodología	15
1. Primera etapa	18
1.1 Método de aislamiento de las colonias.....	18
1.2 Variables para la caracterización	19
1.2.1 Crecimiento radial	19
1.2.2 Mediciones morfométricas	19
2. Segunda etapa	20
2.1 Recolección de material vegetal y desinfección	20

2.2	Desinfección.....	20
2.3	Preparación del inóculo.....	20
2.4	Inoculación.....	21
2.5	Escala para las observaciones.....	21
2.6	Escala para la descripción de resistencia de los genotipos....	22
2.7	Análisis estadístico del diseño de datos.....	22
IV.	RESULTADOS	23
A.	Caracterización Morfológica y patogénica.	23
1.	Colección de aislamientos de <i>Phytophthora</i>	23
2.	Desarrollo en medio genérico.....	23
3.	Características morfométricas.....	26
B.	Reacción de los genotipos a la inoculación con <i>Phytophthora</i> sp. (LRBF004)	30
V.	DISCUSIÓN	32
VI.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
A.	Conclusiones	35
B.	Recomendaciones	35
VII.	RESUMEN	37
	SUMMARY	38
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	39
	ANEXOS	45

ÍNDICE DE CUADROS

Paginas

Cuadro 1. Genotipos estudiados en la Colección Chalmers. E.E. Pichilingue, 2013.....	17
Cuadro 2. Clones de Cacao del Lote 2A seleccionados para evaluación de resistencia a <i>Phytophthora</i> sp. INIAP 2013.....	17
Cuadro 3. Clones de Cacao seleccionados para evaluación de resistencia a <i>Phytophthora</i> sp. INIAP 2013.....	18
Cuadro 4. Resultado de la prueba de Tukey para comparar el desarrollo de 13 aislamientos de <i>Phytophthora</i> spp.....	25
Cuadro 5. Forma del esporangio, tipo de papila y presencia o ausencia de clamidosporas de los 13 aislamientos en estudio. INIAP 2013.	28
Cuadro 6. Mediciones de estructura de 13 aislamientos. EET - Pichilingue 2013.....	29
Cuadro 7. Evaluación de resistencia de 37 materiales de cacao a <i>Phytophthora palmivora</i>	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Paginas

Figura 1. Aspecto de forma de estrella en medio Agar-V8 característico de <i>P. palmivora</i>	23
Figura 2. Formas de esporangio encontrados en los aislamientos de <i>Phytophthora</i> sp.	26
Figura 3. Tipos de papila No papilado, semipapilado y papilado.....	27
Figura 4. Clamidosporas terminales	27
Figura 5. Esporangio sin pedicelo (sésil) y con pedicelo	28
Figura 6. Dendograma de las variables de evaluación de los 13 aislamientos de <i>Phytophthora</i>	29
Figura 7. Posición de las variables con respecto a los componentes principales, de los 13 aislamientos de <i>Phytophthora</i>	30

I. INTRODUCCION.

La pudrición de la mazorca o mazorca negra del cacao es causada por el pseudohongo *Phytophthora* sp. A nivel mundial es una de las enfermedades más agresivas del cacao (*Theobroma cacao* L.), causando pérdidas entre el 30 y hasta el 80% de la producción mundial (**Enríquez, 2004**). En el Ecuador, hasta hace poco tiempo no se la ha considerado como una enfermedad económicamente importante comparada con Escoba de Bruja (*Moniliophthora perniciosa*) o la Monilia (*Moniliophthora roreri*). Estas pueden causar una pérdida del 40 al 60%, aunque en ocasiones puede ser total (**Suárez y Solís, 2003**). La *Phytophthora* es de presencia más bien ocasional sin alcanzar la gravedad de las enfermedades antes mencionadas, aunque la situación parece estar cambiando últimamente pues sus daños se observan en el campo con más frecuencia e intensidad¹, siendo el factor más importante para su desarrollo la lluvia con temperaturas de 18 a 20 °C (**Suárez, 1993**).

P. palmivora es un organismo Straminipelo que ataca a cultivos de familias y géneros muy diferentes, entre ellos; pimienta, papaya, zapote, limón y una gran variedad de palmeras (**Porrás y Sánchez, 1991; Erwin y Ribero, 1996**). En cacao existen varias especies de *Phytophthora*, aparentemente con cierta especialización geográfica. Según **Erwin y Ribero (1996)** *P. palmivora* se encuentra en Brasil, Colombia, Costa Rica, Venezuela, Perú y México; en México y en Brasil se ha reportado *P. capsici*, *P. citrophthora* y *P. heveae*; de Venezuela se menciona además la presencia de *P. parasítica*, *P. syringae*, *P. megasperma* y *P. capsici*. Se conoce también acerca de la presencia de *P. megakarya* en Nigeria, Camerún y parte de Ghana (**Pokou et al., 2008**). Esta última es una especie altamente agresiva, causando pérdidas del 80% de la producción de cacao y está calificada como plaga cuarentenaria. En el país solo se conoce presencia de *P. palmivora* pero, como se indica anteriormente, son pocos los estudios al respecto.²

¹ Freddy Amores, comunicación personal.

² Carmen Suarez y Karina Solís, comunicación personal.

Los síntomas de *P. palmivora* se presentan, además de la mazorca de cacao, en los cojinetes florales que se infectan a través de las mazorcas enfermas (**Dade, 1929**), en el tallo donde se forma un chancro; en las hojas causa zonas necróticas que empiezan en la nervadura, y en el ápice de hojas en chupones, plántulas y en las raíces (**Thorold, 1953 y Luz et al., 2001**). Cuando el daño es a nivel del cuello, frecuentemente se destruye la unidad productiva. Este daño es menos conspicuo y aunque no está reportado ni cuantificado en el país, es posible que esta enfermedad sea una causa del nivel de “fallas” en muchas huertas de cacao (**Suárez, 1993**). La mayor cobertura de áreas de monocultivo con variedades aparentemente más susceptibles está elevando estos estimados, especialmente considerando que se presenta también a nivel del tallo causando la muerte de unidades productivas. En los últimos años, como consecuencia de la expansión de cacao clonal y los cambios climáticos en el área cacaotera, la enfermedad es más frecuente haciéndose necesario su estudio para prevenir epidemias.

La resistencia genética del cacao a *Phytophthora* spp. está bien documentada a nivel mundial (**Thorold, 1953; Nyassé et al., 1995; Iwaro et al., 1997; Luz et al., 2001 y Santos et al., 2009**), contándose con metodología adecuada para la evaluación temprana de dicha resistencia en los Programas de Mejoramiento de Cacao. En el Ecuador el INIAP – EET/Pichilingue mantiene colecciones de cacao entre ellos la denominada Chalmers procedente de la Amazonía, que ha dado lugar a su extenso Programa de mejoramiento y en los cuales será conveniente incluir genes de resistencia a *Phytophthora*. Se considera por tanto importante conocer la reacción de dichos materiales frente a *Phytophthora* spp; razón por la que se planificó la presente investigación. La evaluación priorizó los materiales preseleccionados por el Programa.

A. Justificación

La identificación adecuada del agente causal de una enfermedad es el primer paso hacia la adopción de medidas de control. En el caso de una enfermedad de rápida diseminación como lo es la mazorca negra y el cáncer causado por *Phytophthora* sp, combinando esta capacidad de diseminación con la expansión de plantaciones monoclonales, las variaciones climáticas en las zonas del cultivo, y el creciente intercambio de material de siembra de una zona a otra, se tienen las condiciones favorables para una epidemia de la enfermedad. En estas circunstancias es necesario consolidar acciones que permitan al país prepararse para esta contingencia. Mejor aún, si con este conocimiento se pueden tomar medidas preventivas como sería la introducción de genes de resistencia a *Phytophthora* sp. en las nuevas poblaciones segregantes del Programa Nacional de Cacao del INIAP.

Otro aspecto, no menos importante a tener en cuenta, es la identificación de las especies de *Phytophthora* presentes en el país. Con esta información los organismos competentes puedan adoptar medidas cuarentenarias adecuadas con aquellas aún ajenas a la región como *P. megakarya*, una especie muy agresiva que azota algunos países cacaoteros en África.

B. Objetivos

1. General.

Determinar si entre el grupo de clones de cacao bajo estudio se pueden identificar genotipos con resistencia al patógeno conocido como *Phytophthora* sp.

2. Específico.

- Determinar la especie de *Phytophthora* predominantemente asociada a cacao en la zona del Litoral Central.
- Determinación de niveles de resistencia a *Phytophthora* spp. de *Theobroma cacao* L. en clones de cacao tipo Amazónico (Colección Chalmers) y Nacionales.

C. Hipótesis.

En el Banco de germoplasma del INIAP en la EET-Pichilingue pueden encontrarse genotipos con resistencia a *Phytophthora* spp (mazorca negra) que pueden aprovechar en esquemas futuros de mejoramiento genético.

II. REVISION DE LITERATURA

A. Pudrición de la mazorca o mazorca negra

La mazorca negra del cacao causada por el pseudohongo *Phytophthora* spp. es endémica de las áreas cacaoteras del mundo. Fue reportada desde 1727 en la isla de Trinidad y actualmente se encuentra distribuida en todas las regiones del mundo que cultivan cacao (**Porras y Sanchez, 1991**). A nivel mundial limita seriamente la producción, ocasionando pérdidas de hasta de un 30%, pudiendo llegar al 80 % en algunos países de América y África Central (**Enríquez, 2004, McMahon et al., 2006, Paulin et al., 2008**). **Pokou et al., (2008)** reportaron estudios donde las pérdidas en cacao llegaron hasta el 80 % en Nigeria, por *P. megakarya*.

La especie considerada más agresiva es la *P. megakarya*, que causa pérdidas cercanas a 80% de la producción de grano en Nigeria, Camerún y parte de Ghana (**Poku et al., 2008**). Según los patrones de avance del patógeno, se estima que en los próximos 10 a 15 años *P. megakarya* se habrá diseminado a todas las regiones productoras de Ghana y Costa de Marfil. Cuando esto ocurra, se pronostican pérdidas en la producción mundial del grano entre el 20 y 40%, lo que ocasionaría un gran impacto negativo sobre la economía global del cacao (**Tahiet al., 2006**). Organismos gubernamentales deben considerarla como plaga de alto riesgo para la producción de cacao.

La especie con mayor incidencia y más ampliamente diseminada en el mundo es *P. palmivora* responsable del 20 a 30% de pérdidas anuales de la producción mundial del grano y aproximadamente 10% de muerte de árboles (**Guest, 2007**). Otra especie del mismo género es *P. parasítica*, presente tanto en el continente Africano como en Latinoamérica. Además, en Latinoamérica existen otras especies de *Phytophthora* que causan la enfermedad de mazorca negra, tales como *P. citrophthora*, *P. capsici* y otras especies sin identificar (**Hebbar, 2007**).

Las pérdidas generadas por especies de *Phytophthora* han sido ampliamente reportadas desde 1921. Actualmente, la mazorca negra es considerada como la enfermedad más común e incidente en el mundo. Los países productores en África son los más afectados. De ahí su importancia, ya que estos países producen aproximadamente 72% de la oferta mundial de grano (**Ploetz, 2007**).

1. Origen de *Phytophthora* spp.

Estudios moleculares indican que el centro de origen de este microorganismo se encuentra en África. Además sugieren que la especialización de esta especie por el cacao se originó al momento de la introducción de las primeras plantas a este continente (**Brasier y Hansen, 1992**). **Zentmeyer, (sf)** indica que el primer aislamiento de *Phytophthora* sp. en cacao como la causa de mazorca negra se realizó por Masse en 1899.

2. Sintomatología

La enfermedad se presenta en la mazorca, con manchas de color marrón, casi circular, con borde bien definido, que rápidamente se desarrolla por toda la superficie de la mazorca la cual es cubierta totalmente en un período de 7 a 10 días después de la aparición del primer síntoma. Las mazorcas afectadas son blandas y menos pesadas que las normales o las atacadas por Moniliasis. El daño es de apariencia acuosa (**Arciniegas 2005, Pinzón y Rojas, 2008**) sobre mazorcas mayores a tres meses de edad. Las infecciones se inician principalmente en la punta o al final del pedúnculo que une a la mazorca. Los granos o almendras de las mazorcas enfermas permanecen sin daño por varios días, después de iniciada la infección en la cáscara (**McMahon y Purwantara, 2004**). Los signos del pseudohongo se pueden apreciar a las 2 o 3 semanas de la aparición del síntoma y se caracteriza por la presencia de un micelio blanco (pelusa blanquecina) poco compacto y superficial (**Gregory, 1972**).

Los síntomas se manifiestan en hojas como manchas necróticas, que se inician en el borde; en brotes ortotrópicos el daño empieza en la yema apical y se extiende rápidamente por los tejidos hasta la base del brote. En el tronco se

presentan chancros también denominados “cáncer”. Las raíces que presentan síntomas de *Phytophthora* se ven podridas con manchas marrones (**Porras, 1991**).

3. Clasificación taxonómica

El agente causal de la enfermedad es un organismo Straminipelo del género *Phytophthora* (del griego phytón, "planta" y phthorá, "destrucción", destructor de plantas), aunque cuando fue establecida por de Heinrich Anton de Bary 1876 fue denominada como hongo de la clase Oomycete perteneciente al reino Mycetae (fungi) (**Alexopoulos et al., 1996**).

El agente causal de la enfermedad fue identificado en 1876 (De Bary) como un “hongo inferior” de la clase Oomycete y ubicada como tal en el reino Mycetae. Sin embargo, con el advenimiento y uso de técnicas microscópicas y bioquímicas actuales, se estableció que estos difieren de los hongos en características especiales, tales como el contenido de celulosa en la pared celular; la fase vegetativa diploide, el flagelo heteroconte, y las cristas mitocondriales tubulares. Aún más, los Oomycetes poseen rutas metabólicas únicas que los diferencian de sus homólogos los hongos superiores (**Griffith et al., 1992**) y establece el reino “Straminipelo” para ubicar todo este grupo de organismos.

Actualmente la clasificación del patógeno según **Alexopoulos et al., (1996)** es la siguiente:

Reino: Stramenopila

Filo: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Pythiales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especies: *palmivora*, *capcisi*, *parasítica*, *syringae*, *megasperma*, *megakarya*, *citrophthora*, *heveae*, *katsurae*

Descripción del patógeno, durante la mayor parte de su ciclo de vida, las especies de *Phytophthora* tienen una fase haploide y la pared celular está compuesta por celulosa. Esta característica las diferencia de los hongos, que en vez de celulosa contienen quitina. Otra característica diferenciada entre *Phytophthora sp.* y los hongos es la motilidad, la cual juega un papel importante en los patrones de dispersión de la enfermedad.

(**Frezzi, 1950**), Indica que presenta abundante esporangio y clamidosporas en los medios sólidos comunes y en H₂O (gota suspendida). Zoosporangios papilados, vacuolados y fácilmente se desprenden, no pedicelados de 40 a 29 µm. Zoosporangiosforo poco ramificado, simple. Clamidosporas de 28.5 µm.

4. Distribución geográfica y hospederos.

Según **Erwin y Ribero (1996)** y **Stamps (1998)** las especies de *Phytophthora* están ampliamente distribuidas en función de sus principales hospederos, con excepción de *P. magakarya*, que hasta ahora solo ha sido descrita en el continente africano (Nigeria, Camerún y parte de Ghana) y *P. katsurae* que antes de ser encontrada en cacao tenía como único hospedero el Castaño (*Castanea crenata*), las otras especies que atacan al cacao son polífagas y cosmopolitas.

Según **Erwin y Ribero (1996)**, *P. palmivora* está distribuida especialmente en las regiones tropicales y templadas más calientes, caracterizadas por la alta pluviosidad. Entre casi una centena de hospederos conocidos se citan el coco y muchas otras palmeras cultivadas y ornamentales, caucho, papaya, pimienta, las especies cítricas, diversas frutas como zapote, marañón, piña, fruta de pan, sandía, papaya, aguacate, mango, guayaba, tamarindo y el maíz; plantas ornamentales como las orquídeas, la veranera, los cactus, varias especies del género *Hibiscus*, el geranio, la petunia, el lirio y muchas otras; algunas hortalizas como ajo, pimienta, tomate, berenjena y patata; algunas fibras como sisal y agave; árboles como neem, nogal, macadamia, sándalo y otras varias plantas cultivadas entre las cuales están la vainilla, el tabaco y el cacao.

P. capsici, ocurre en los Estados Unidos y Canadá (Sur y Centro); en América del Sur y Central, en Europa y en Asia. Sus hospederos más importantes son las cucurbitáceas y las solanáceas, mas causa también daños en el árbol de caucho, cacao, macadamia, nuez, tabaco, lino, algodón, manzana, aguacate, melocotón, vainilla, cebolla, cacao, coliflor, guisantes, rábanos, habas, alfalfa, claveles, anturios, avellanas, algunas plantas cítricas y otros hospederos de expresión económica localizada (**Erwin y Ribero, 1996**).

P. citrophthora, se encuentra distribuido en África (Argelia, Angola, Congo, Egipto, Mauricio, Marruecos, Mozambique, Rodesia del Norte y Sur , Sudáfrica, Túnez); Asia (China, India, Irak, Israel, Japón, Malasia, Filipinas, Tailandia, Turquía); Europa (Chipre, Francia, Italia, España); América Central (Cuba, El Salvador, Jamaica, Puerto Rico); América del Norte (México, Estados Unidos); Suramérica (Argentina, Brasil, Chile, Perú, Surinam, Uruguay). Esta especie tiene una amplia gama de hospederos que incluye, además todas las plantas cítricas, diversos frutales como: ciruela, durazno, pera, manzana, cereza, almendros, higueras, aguacate, carambola, cacao, papaya, fresa, kiwi y melón; algunas hortalizas como: pimiento, pimienta, calabaza y tomate; plantas ornamentales como la rosa, el clavel y las violetas; árboles de sombra como la eritrina, y grandes cultivos, como caucho, eucalipto, la piña brasileña, varias especies del genero *Juglans*, castaño y varios otros (**Erwin y Ribero, 1996**).

P. heveae, fue originalmente descrita en caucho, en Malasia, siendo después descrita en Australia, en Brasil, en Guatemala, en Nueva Zelanda y en los Estados Unidos. Entre sus otros hospederos están el castaño de Para, eucalipto, aguacate, coco, mango, cacao, guayaba y el pino mexicano (**Erwin y Ribero, 1996**).

La ***P. megasperma***, localizada en Venezuela, Islas Salomón y Malasia, tiene como hospederos a *Citrus* spp., cacao y *Malus domestica* (maca) (**Erwin y Ribero, 1996**).

P. syringae, en cítricos y cacao (**Erwin y Ribero, 1996**).

P. nicotianae var. parasítica se encuentra distribuida en África, Asia, Australia, Oceanía, Europa y en América (**Erwin y Ribero 1996 y Stamps, 1998**). De Ecuador no existen reportes específicos sobre la especie aunque se reporta presente en cacao.

5. Morfología

Las especies que afectan al cultivo comercial difieren en su morfología, lo cual es una característica que permite hacer su diferenciación. A continuación se describe brevemente la morfología de cada especie:

P. palmivora: las hifas de esta especie son completamente uniformes, pocas veces sobrepasan los 5 μm de diámetro. A menudo, produce clamidosporas con diámetro entre 30 - 35 μm en abundancia y en las primeras fases de desarrollo. Los esporangióforos son estrechos, simpoidales simples y con paredes muy bien definidas. Los esporangios se forman fácilmente sobre medio de cultivo, estos elipsoides u ovoides con un tamaño de 35 – 60 μm x 20 – 40 μm y puede llegar hasta 90 x 45 μm . No se encuentran normalmente oogonios en cultivos puros, pero abundan cuando son aislados de compatibilidad opuesta (A1 y A2) y se aparean. Presenta anteridios anfígenos, esféricas u ovoides con un tamaño de 14 x 15 μm . Las oosporas casi llenan el oogonio, tienen una pared de 2 μm . Los cultivos *in vitro* son uniformes, ligeramente radiados con escaso micelio aéreo. La temperatura de crecimiento mínima es de 11° C, la óptima está entre 27° y 32° C, y la máxima es de 35° C o menos (Stamps, 1998 Citado por Jaimes, S. y Aranzazu, H., 2010).

P. capsici: las hifas de esta especie son uniformemente gruesas con 5 – 7 μm de ancho. Tiene esporangios estrechos, algunas veces ligeramente anchos en la base del esporangio y ramificados irregularmente. Las clamidosporas son raras o ausentes. Los esporangios son a menudo irregulares, casi esféricos, ovoides o alargados, que pueden medir 30-100 x 25-35 μm , a menudo distorsionados y con más de un apéndice, papila, pedicelo de 10 μm o más de largo. El oogonio se puede encontrar en cultivos puros de algunos aislados con

30 μm de diámetro (máximo 39) y una pared de color pardo amarillento. Tiene anteridio anfígeno de 15 x 17 μm . Las oosporas casi llenan el oogonio, éstas son de pared delgada. Los cultivos *in vitro* son finamente radiados, con temperaturas de crecimiento: mínima de 10° C, óptima de 28° C y máxima de 37° C (Stamps, 1998 Citado por Jaimes, S. y Aranzazu, H., 2010).

P. citrophthora: las hifas de esta especie son de hasta 6 ó 7 μm de ancho. Tiene esporangioforos de 1 – 2 μm de ancho, con pequeña ampliación en la base, ramificaciones irregulares con una ligera hinchazón en las bifurcaciones. Los esporangios son más bien escasos en medios de cultivo, en agua son muy variables en su tamaño y forma, a menudo con dos vértices muy divergentes con medidas de 40 – 45 x 27 μm ó 50 – 55 x 30 μm , y pueden llegar a tener hasta 90 x 60 μm , las papilas son casi hemiesféricas. Esta especie puede no presentar clamidosporas o son escasas con 28 μm de diámetro y con un grosor de pared de 1,5 – 2 μm . No se le conoce oogonio ni anteridio. Los cultivos *in vitro* tienen una apariencia finamente radiada, en algunas ocasiones similar a una llama. Las temperaturas de crecimiento son: mínima de 5° C, óptima de 24° – 28° C y máxima de 32° C (Stamps, 1998 Citado por Jaimes, S. y Aranzazu, H. 2010).

P. nicotianavar. parasítica: las hifas de esta especie son gruesas, de hasta 9 μm de ancho, irregulares en anchura pero sin la hinchazón típica en la base de la hifa. Los esporangióforos son más delgados que las hifas, ramificados irregularmente y simpoidales. Tiene esporangios ampliamente ovoides a esféricos, sin reducción notable del apéndice con un tamaño de 30 x 38 μm (máximo 40 x 50 μm). La especie tiene clamidosporas de hasta 60 μm de ancho, de formación tardía (entre 1 y 2 semana) con un grosor de pared de 3 – 4 μm y con la edad se tornan de color pardo amarillento. El oogonio se produce en cultivo puro tras varias semanas de crecimiento con un tamaño de 24 – 31 μm ; con la edad la pared de estas estructuras se torna parda amarillenta. El anteridio es esférico u oval con 10 – 16 μm de diámetro. Tiene esporas apleróticas de 18 – 20 μm con una pared gruesa de 2 μm . Los cultivos *in vitro* son variables, pero normalmente son irregulares, suaves con un patrón irregular de roseta. Las temperaturas de crecimiento son: mínima de 10° C,

óptima de 30° – 32° C y máxima de 37° C o más (Stamps, 1998 Citado por Jaimes, S. y Aranzazu, H., 2010).

P. megasperma: las hifas de esta especie tienen 3 µm de ancho; raras veces las hifas presentan hinchazones en medio de cultivo, pero aparecen con gran frecuencia en soluciones acuosas como inflamaciones esferoidales o elipsoidales. Los esporangióforos son delgados entre 2 – 2,5 µm de ancho y pueden llegar a ser de hasta 5 µm en la base del esporangio. Los esporangios no se producen sobre medio de cultivo, pero son regularmente ovoides, usualmente de 35 – 50 µm x 2 – 35 µm; no presentan papila, pero sí, un engrosamiento apical ligero. Los órganos de reproducción sexual abundan en medio de cultivo. Los oogonios son esféricos con diámetro de 40 – 50 µm en promedio, con paredes hialinas o ligeramente amarillentas, lisas de hasta 1,5 µm de espesor. Las oosporas son apleróticas (Stamps, 1998 Citado por Jaimes, S. y Aranzazu, H., 2010).

P. megakarya: las hifas de esta especie son completamente uniformes con un diámetro de 2,5 – 5 µm. Los esporangióforos tienen desarrollo simpoidal y sólo se producen sobre medio de cultivo *in vitro*, ovoide (20 – 60 x 13 – 41 µm), pedicelado (10 – 30 µm), estrecho, no ocluido y con papila prominente. Los oogonios se forman en cultivos de tipos A1 y A2 compatibles y con tamaño de 19 – 37 µm de diámetro. Los cultivos *in vitro* se caracterizan por el micelio aéreo abundante y bordes de la colonia difusos. Las temperaturas de crecimiento son: mínima de 10° – 11° C, óptima de 24° – 26° C y máxima de 29° – 30° C (Stamps, 1998 Citado por Jaimes, S. y Aranzazu, H. 2010).

6. Resistencia.

Nyassé et al., (1995) indican que la resistencia genética es un factor que contribuye al control de enfermedades, al bajar los ciclos epidémicos y asegurar menos contaminación de fruta a fruta. Por tal motivo, se han realizado varios estudios para la evaluación de resistencia. Se han identificado como clones resistentes al SCA-6, SCA-12, Catongo, Pound-7, CC- 42, EET-59 y UF-613, entre otros. Sin embargo, la existencia de mutación en el patógeno, la

zona donde estén los cultivares establecidos y el método con el cual se evaluaron los materiales han hecho que se encuentren diferencias entre autores en relación con el nivel de resistencia de los materiales (**Firman y Vernon 1970; Enríquez 2004**).

La evaluación en discos de hojas es el método utilizado por **Nyassé et al., (1995)** en donde encuentra que las hojas de cacao jóvenes son más susceptibles a la infección por *Phytophthora megakarya* y *P. palmivora* que las hojas adultas. Además el efecto de 3 concentraciones de inóculo (3×10^4 , 3×10^5 y 3×10^6 zoosporas /ml) de la cual tomó la 3×10^5 para posteriores estudios, al mismo tiempo demuestra que el clon IMC47 es resistente a las dos especies, mientras que el OC77 es muy susceptible. De ahí se desprenden estudios tales como el de **Iwaro et al., (1997)** en donde demuestran que en los clones SCA 6 y ICS-95 demuestran que hay relación en la prueba de inoculación en discos de hojas y mazorca de cacao mostrando resistencia. Posteriormente **Iwaro et al., (1997 a y b, 1998); Tahí et al., (2006 a y b 2007); Maharaj et al., 2001; Djocgoue et al., 2006; Pokou et al., 2008; Akaza et al., 2009 y Nyadanuet al., 2011**. Los cuales han evaluado resistencia en cacao.

III. MATERIALES Y METODOS.

A. Localización

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV), de la ESTACIÓN EXPERIMENTAL TROPICAL PICHILINGUE (EETP), del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en la Provincia de los Ríos en el Km. 5 vía Quevedo – El Empalme, situada entre las coordenadas geográficas 1° 05´ Latitud Sur 79° 26 Longitud Occidental.

B. Características climáticas

La zona en estudio se encuentra a una altura promedio de 75 msnm, con una textura del suelo franco arcillosa, y el clima de la zona es tropical húmedo, con temperatura media anual es de 24,8 °C. La precipitación promedio anual es de 2148 mm, su humedad relativa media de 83% y la Heliofanía 880,32 horas promedio anual.

C. Factor de estudio

El primer factor en estudio fueron las colonias de *Phytophthora* spp. aisladas de cacao. A estas se les realizó mediciones morfométricas (esporangio, clamidospora) y crecimiento radial. El segundo estuvo representado por los genotipos de cacao de origen Forastero Amazónico (colección CHALMERS) y Nacional cuya resistencia a dicho patógeno se evaluó en la presente investigación.

D. Material experimental

1. Materiales utilizados para la recolección de mazorcas:

Tijeras de podar o machete, podón y una palanca, fundas de papel, marcador, gaveta y GPS.

2. Materiales utilizados en el laboratorio:

Cajas Petri, tubos de ensayo, Erlenmeyer, vasos de precipitación, probetas, gradillas, láminas porta y cubre objeto, saca bocado, pipetas Pasteur, micro pipetas y puntas, bisturí, vernier o pie de rey, papel toalla, papel aluminio, algodón, gaza, asa, fósforos, mecheros, alcohol, aspersores para alcohol, picetas, mandil, guantes, gorro y zapatones.

PDA (Potato Dextrose Agar), AA (Bacto Agar), PCA (Potato Carrot Agar), AC (Agar Centeno), V8 (Medio Jugo V8), AAQ (Agar Avena Quaker), carbonato de calcio (CaCO₃), tinciones, Tween 80, clorafenicol 500 mg (Acromaxfenicol de 500 mg).

3. Equipos utilizados:

Cámara de aislamiento, estéreo-microscopio, microscopio óptico, autoclave, estufa, agitador o vortex, cámara de Newbauer (hemocitómetro), potenciómetro, microonda.

4. Material genético:

Genotipos de cacao de tipo “Nacional y Forastero” (*Theobroma cacao* L.). Los forasteros pertenecen a la colección CHALMERS (Cuadro 1), 8 clones de cacao con sangre Nacional (Cuadro 2) y 14 clones seleccionados en la EET-Pichilingue, 2 testigos resistentes SCA 6 y SCA 12 y CCN-51 como susceptible.

A. Metodología

Para la identificación de las especies de *Phytophthora* se aplicó la metodología utilizada por **Nyassé et al. (1995)** y **Tahi et al. (2007)**, esta consistió en la evaluación de la resistencia utilizando discos de hojas de los genotipos estudiados. Se colectaron y trataron las hojas para luego proceder a la inoculación y observación de las lesiones provocadas en los discos.

Cuadro 1. Genotipos estudiados de la Colección Chalmers³ E.E.T. Pichilingue, 2013.

Hilera	Genotipos presentes en cada Hilera	Código
1	G-78	UNAP – 2
3	G-8 - G-10	AMAZ – 2
13	G-58	SM – 8
20	G-42	NAP – 3
21	G-46	NAP – 23
30	G-6	BOB – 8
32	G-70	TAP – 3
33	G-42 - G-20	TAP – 1
34	G-27	BOB - 3
35	G-43	TAP - 7
37	G-65-G-66-G-19	TAP – 2

Nomenclatura: G= Genotipo; UNAP (Universidad Nacional Autónoma Peruana); AMAZ (Amazonas); SM (San Miguel); NAP (Napo); BOB (Bobonaza).

Cuadro 2. Clones de Cacao del Lote 2A seleccionados para evaluación de resistencia a *Phytophthora* sp. INIAP 2013.

Denominación de origen	Ubicación
CCN-51 x EET-223	E5/T1/R2/A3
CCN-51 x EET-223	E1.2.2./T4/R1/A9
CCN-51 x EET-534	E5/T2/R3/A2
CCN-51 x EET-534	E5/T2/R3/A6
CCN-51 x EET-450	E5/T4/R3/A9
EET-426 x CCN-51	E2/T2/R1/A8
EET-451 x EET-387	E1/T8/R1/A3
EET-446 x CCN-51	E2/T9/R2/A8
CCN-51 x EET-462	E5/T5/R3/A1

1. Primera etapa: Identificación de las especies de *Phytophthora*

En esta etapa se usaron las colonias de *Phytophthora*, aisladas de cacao perteneciente a la colección del laboratorio de Fitopatología de la EET-Pichilingue y además se colectaron mazorcas con síntomas característicos que presentaron infecciones naturales, de varias fincas ubicadas en la zona de Mocache, Buena Fe, El Empalme y La Maná, las cuales se procesaron en dicho laboratorio. Además el muestreo se efectuó entre los meses de Mayo y Julio (época propicia para el desarrollo del organismo) en la zona cacaotera del país.

³ Caracterización molecular realizada en julio del 2006 y descrita por Mónica Angamarca Ichao 2008.

Cuadro 3. Clones de Cacao seleccionados para evaluación de resistencia a *Phytophthora* sp. INIAP 2013

Denominación original	Clon
CCAT-4998	EET-577
CCAT-4688	EET-576
CCAT-4675	EET-575
CCAT-1119	EET-544
CCAT-2564	EET-558
Tengel 25	EET-103
Tengel 33	EET-95
(ICS-95 x IMC-67) x Desconocido	CCN-51
SCA 12	EET-11
SCA 6	EET-110

Denominación de origen
Bertus Eskes 2
JHVH 10
Árbol 5
Árbol 9
EES 1
EES 6
EES 5

1.1. Método de aislamiento de las colonias

Una vez identificada el área con los síntomas, se lavó el material con abundante agua, se desinfectó con hipoclorito o con alcohol al 70 %. En el caso de mazorcas de cacao, se tomó de la parte interna removiendo el pericarpio y sembrando pequeños fragmentos del mesocarpio, Se sembraron cinco fragmentos por caja Petri (2 o 3 cajas para cada mazorca, dependiendo del estado en el que estuvo la muestra) que contenían medio de cultivo PDA, V8 o Centeno. Con las cepas puras se iniciaron los cultivos monospóricos. Con este fin se seleccionó un esporangio con el aza para sembrarlo en el medio V8. Se sembraron 5 esporangios por plato Petri, los cuales se mantuvieron en oscuridad por 3 días. Esto se hizo con cada cepa para garantizar la ausencia de otras especies en las colonias.

1.2. Variables para la caracterización

1.2.1. Crecimiento radial

Se partió de la cepa madre sembrada en cajas Petri (90 x 12 mm) con medio Agar V8, incubada por 10 días a una temperatura de 26 °C. Una vez que la colonia cumplía con las condiciones, se realizaron cortes de 0.53 mm, que luego se sembraron en medio Agar V8. Estos fueron incubados con temperatura de 26 °C. El crecimiento radial se determinó mediante mediciones de largo y ancho de las colonias diariamente. Las mediciones se realizaron a la misma hora durante diez días con la ayuda de un vernier digital. Hay que tener en cuenta que diez días es el tiempo estimado para que el organismo cubra toda la superficie de la caja. También se tomó en consideración la forma de la colonia y su forma de desarrollo.

Para la evaluar el crecimiento radial, se tomó en consideración el número de días que le tomó a cada aislamiento cubrir en su totalidad la caja, el desarrollo al día cinco, el promedio de crecimiento diario y el área de crecimiento diario. Para comparar las diferencias de crecimiento entre colonias se utilizó la prueba de Tukey al 0.05.

1.2.2. Mediciones morfométricas

Para las mediciones morfométricas se utilizaron las cajas Petri con los 13 aislamientos utilizados para el crecimiento radial. Se realizaron placas con tinción (Trypan blue) para con la ayuda del microscopio y con un aumento de 40x, medir el resto de variables.

Para la identificación de las cepas colectadas se siguieron los criterios establecidos por **Cerqueira et al., 1999**. Estos consisten en la definición del desarrollo y tipo de micelio, forma, largo y ancho del esporangio y la forma de la papila, tamaño de la clamidosporas.

2. Segunda etapa: Evaluación de clones a la inoculación con *Phytophthora* sp (LRBF004)

2.1. Recolección de material vegetal y desinfección

La recolección de hojas se realizó en horas de la mañana, alrededor de las 6:30 a 9:00 (**Nyassé et al., 1995; Tahi et al., 2007**), ubicando los 37 genotipos en sus respectivos Lotes, de cada genotipo se seleccionó 10 hojas de aproximadamente 2 meses de edad.

Para esto se tuvo cuidado de no maltratarlas y colectando hojas sanas, sin daños de insectos, ni alguna otra alteración. Además se consideró de que todas las hojas estén expuestas bajo a condiciones de luz similares. Se las traslado al laboratorio en fundas de papel previamente rotuladas y se la coloco en gavetas para que no se maltraten.

2.2. Desinfección

Se lavaron con desinfectante (sapolio) y luego con agua estéril. Después se cortaron bordes de las hojas y luego en pequeños fragmentos de aproximadamente 10 cm, los fueron llevaron a la cámara de aislamiento, para ser sumergidos en hipoclorito al 10 %, seguidamente se sometieron a un triple lavado con agua esterilizada. Después se secaron con papel toalla estéril. Posteriormente se cortarían cinco discos de 2 cm de diámetro utilizando un sacabocado. Una vez que recibieron el tratamiento anterior, se procedió a colocar los discos en cajas Petri que contengan con Agar Agua (10 ml por caja). En cada caja se colocaron 5 discos de hoja y utilizaron 4 cajas para cada genotipo.

2.3. Preparación del inóculo

Debido a la necesidad de producción de (Zoosporas), la siembra se la realizo en medio de cultivo V8 colocando un fragmento de 0,5 cm del aislamiento LRBF004 la cual se incubo por 10 días (4 días oscuridad y 6 días en luz),

transcurrido ese lapso de tiempo se procedió a la preparación de la suspensión de zoosporas agregando 10 ml de H₂O estéril, luego para provocar la liberación de zoospora se mantuvo a 4 °C por 4 minutos y luego se dejó reposar a temperatura ambiente por aproximadamente unos 10 minutos. Una vez liberadas las estructuras necesarias se procedió a realizar el conteo mediante la cámara de Neubauer y un contador manual. Luego se calibró el inóculo a una concentración de 3×10^5 zoosporangio/ml.

2.4. Inoculación

La inoculación se la realizó a todos los discos de hojas con una suspensión estándar de zoosporangios (3×10^5 zoosporangio/ml) del aislamiento LRBF004, preferentemente en la tarde del mismo día en que se prepararon los discos de hoja. Se dispersaron las zoosporas sobre los discos de hojas, se aplicaron 10 gotas de 1 µl en todo el disco de la hoja con una micropipeta. Se seleccionó la cepa que presente mayor agresividad estimada en función del crecimiento radial, de encontrarse especies, se seleccionara una representativa.

2.5. Escala para las observaciones:

Se utilizó una escala (**Nyassé et al, 1995. ; Nyassé, 1997 y Blaha et al., 1998**) de cinco-puntos, para cuantificar el área afectada, basados en la necrosis de la hoja:

0. Ningún síntoma
1. Puntos localizados muy pequeñas penetración
2. Fusión de las manchas marrones que forman lesiones talla intermedia
3. Lesiones grandes, unidas que contienen puntos coloreados marrones más ligeros o más oscuros
4. Lesiones marrones grandes, uniformemente que se amplían.

2.6. Escala para descripción de resistencia de los genotipos:

Nyassé et al, 1995

R = Resistente (0 a 1.0)

MR = Moderadamente resistente (1.1 a 2.0)

T = Tolerante (2.1 a 3.0)

MS = Moderadamente susceptible (3.1 a 4.0)

S = Susceptible (4.1 a 5.0)

2.7. Análisis estadístico del diseño y de datos

Diseño Completamente al Azar (DCA). Para el efecto, se utilizaron 3 cajas Petri (repeticiones) con 5 discos c/u (tratamientos) para cada genotipo. Para cada disco se realizaron 10 campos de observación. La separación de medias se realizó mediante la prueba de Tuckey ($P= 0.05$). También se condujeron análisis multivariados con las variables usadas para caracterizar la respuesta de los distintos genotipos a la inoculación con *Phytophthora* con el fin de explorar la manera como se estructura la variabilidad entre aislamientos y entre los genotipos sujetos a la inoculación.

IV. RESULTADOS

A. Caracterización Morfológica.

1. Colección de aislamientos de *Phytophthora*. Del procesamiento de las mazorcas de cacao con síntomas característicos de *Phytophthora*, se conformó una colección de 13 aislamientos monospóricos. Su procedencia y genotipo del hospedero se presentan en el Anexo 1.

2. Desarrollo en medio genérico. Aspecto (patrón cultural)-velocidad-producción de estructuras (características-formas).

El medio de cultivo Agar-V8 fue utilizado para observación del patrón cultural y la velocidad de crecimiento de los aislamientos en estudio. Los 13 aislamientos presentaron como patrón cultural la forma de estrella en el medio de cultivo utilizado (Figura 1), lo cual es característico de *P. palmivora*.

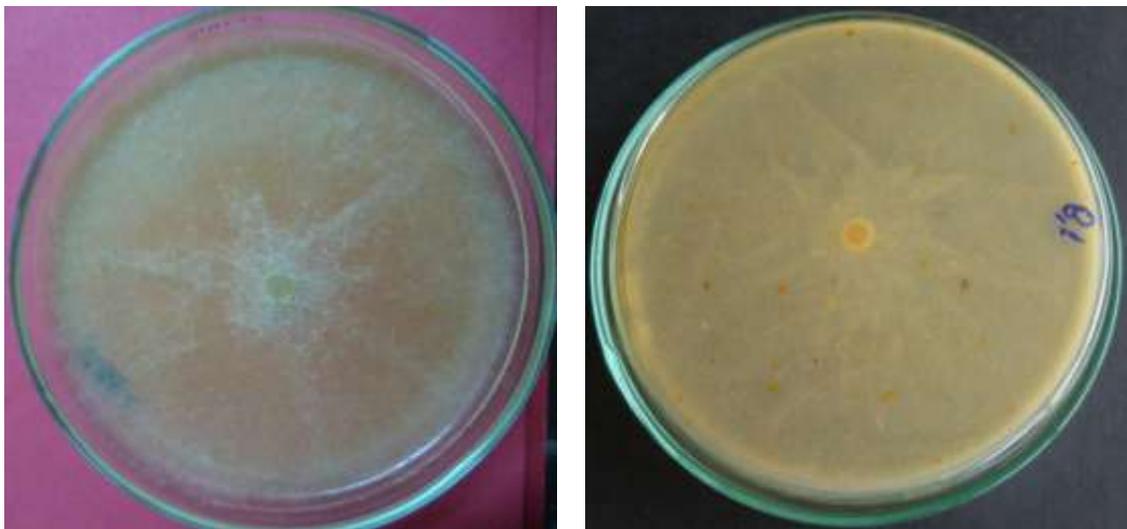


Figura 1. Aspecto de forma de estrella en medio Agar-V8 característico de *P. palmivora*.

En el cuadro 4, se pueden observar las variaciones de crecimiento entre los aislamientos. En la variable día cubierta de caja, que es el periodo en días que requirió el organismo para cubrir la caja de Petri, se puede observar que los aislamientos LRP7A2, CM0081 y LRM0081, cubrieron la caja en un promedio de 5 días, a diferencia de los aislamientos GE002, LRM0042, CM0071,

CM0082, LRP3124, N4 en 6 días LRBF006 y CM0093 en 7 días, LRBF004 en 7.33 días y el aislamiento SE001 con un crecimiento promedio de 8.33 días.

Referente al diámetro de crecimiento en milímetros al quinto día 5, se observa que los aislamientos LRP7A2, LRM0081 y CM0081 predominaron en el desarrollo con 90 mm, seguidos de GE002 con 85.67 mm, LRM0042 con 83.18 mm, CM0071 con 82.64 mm, CM0082 con 81.55, LRP3124 con 81.22, N4 con 80.43 mm, LRBF006 con 75.24 mm, CM0093 69,15 mm, LRBF004 con 63.80 mm y por último el aislamiento SE001 que presento 60.37 mm como promedio.

Para el promedio de crecimiento diario (Prom. Crec. Día), los aislamientos presentaron un crecimiento uniforme. LRP7A2, LRM0081 y CM0081, presentaron un crecimiento de 16.94 mm diario, seguidos de GE002, LRM0042, CM0071, CM0082, LRP3124, N4 con 14.12 mm, posteriormente se encuentra el aislamiento LRBF004 con 11.91 mm y por último el aislamiento SE001, que presento un crecimiento más lento que los demás con 10.39 mm/día.

Cuadro 4. Resultado de la prueba de Tukey para comparar el desarrollo de 13 aislamientos de *Phytophthora* spp.

Cepas	Día cubierta de caja (día)	Día 5 (mm)	Prom. Crec. Día (mm)
LRP7A2	5.00 a	90.00 a	16.94 a
CM0081	5.00 a	90.00 a	16.94 a
LRM0081	5.00 a	90.00 a	16.94 a
GE002	6.00 a b	85.67 a	14.12 b
LRM0042	6.00 a b	83.18 a b	14.12 b
CM0071	6.00 a b	82.64 a b	14.12 b
CM0082	6.00 a b	81.55 a b	14.12 b
LRP3124	6.00 a b	81.22 a b	14.12 b
N4	6.00 a b	80.43 a b	14.12 b
LRBF006	7.00 b c	75.24 b c	12.10 c
CM0093	7.00 b c	69.15 c d	12.10 c
LRBF004	7.33 b c	63.80 d	11.91 c d
SE001	8.33 c	60.37 d	10.39 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p \leq 0.05$)

3. Características morfométricas

El esporangio *P. palmivora* presenta principalmente forma elipsoide, ovoide y limoniforme. En *P. nicotianae* se encuentran varias formas como elipsoide, ovoide, piriforme, obpiriforme. Por otra parte *P.capsici* presenta forma ovoide, obovoide y elipsoide (Erwin y Ribero, 1996).

La papila de *P. palmivora* es claramente marcada y se lo considera como papilado, *P. nicotianae* con prominente papila es también considerado papilado, aunque *P.capsici* se presentan papilados y semipapilados, sin embargo algunas veces se encuentran con dos o tres ápices (Erwin y Ribero, 1996).

P. capsici produce abundante clamidosporas en aislamientos provenientes de cacao, pimienta negra y macadamia. De igual manera *P. nicotianae* produce abundantes clamidosporas las cuales pueden ser intercalares o terminales igual que *P. palmivora*, aunque esta especie las produce en menor cantidad.

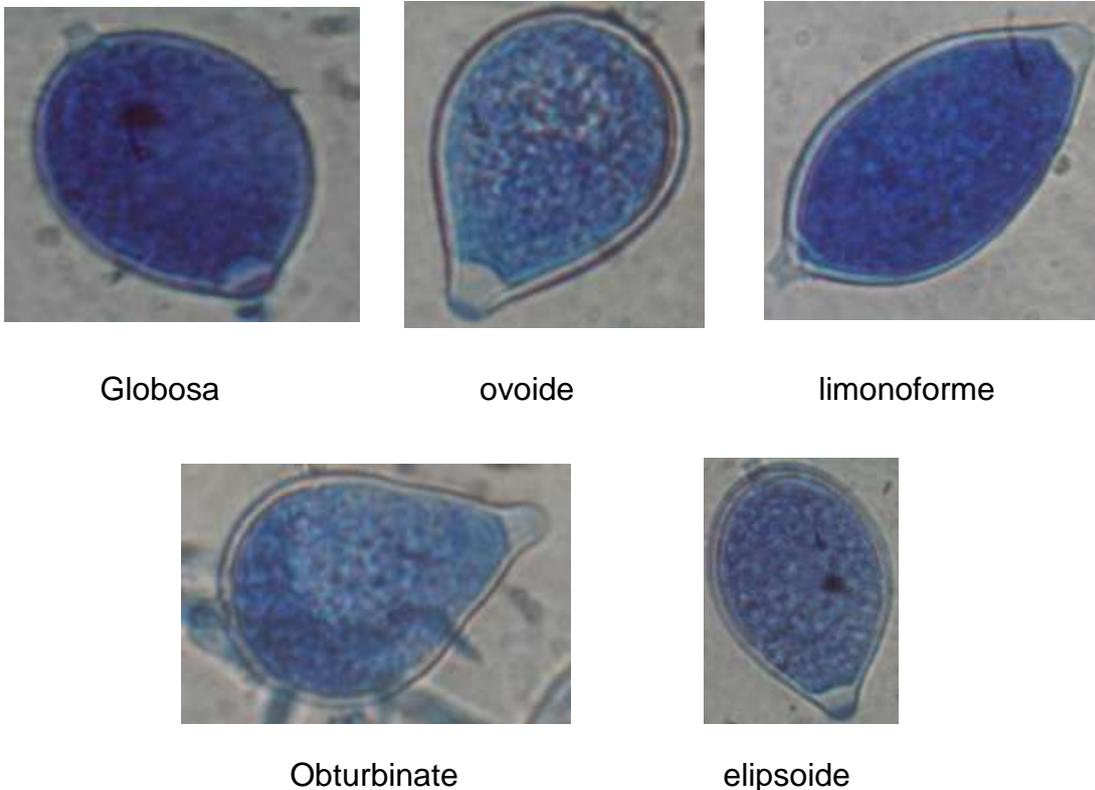


Figura 2. Formas de esporangio encontrados en los aislamientos de *Phytophthora* sp.

En el Cuadro 5 se indica que la forma dominante del esporangio en casi todos los aislamientos es limoniforme, a excepción de LRP3124 y LRM0081 en los que predominó la forma ovoide (Fig. 2). El tipo de papila (Fig. 3) de predominante fue el papilado lo cual es característico de *P. palmivora*. las clamidosporas de todos los aislamientos presentaron forma ovoide y ubicación terminal (Fig. 4). En el Cuadro 6, se observa el promedio de largo de los esporangios está entre 45,88 (LRP3124) y 58,17 μm (GE002) y ancho del entre 23,25 (SE001) y 36,83 μm (LRP7A2).

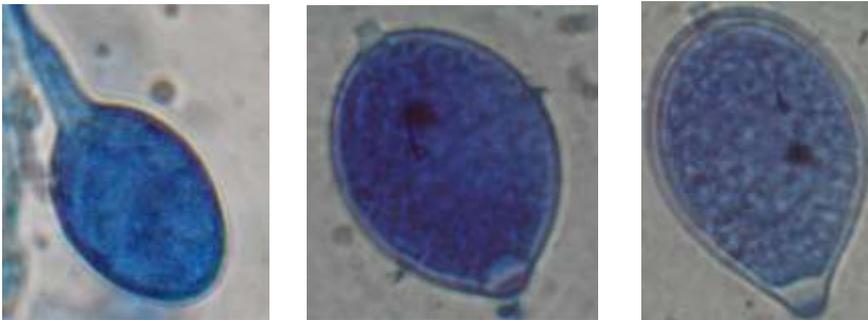


Figura 3. Tipos de papila No papilado, semipapilado y papilado.

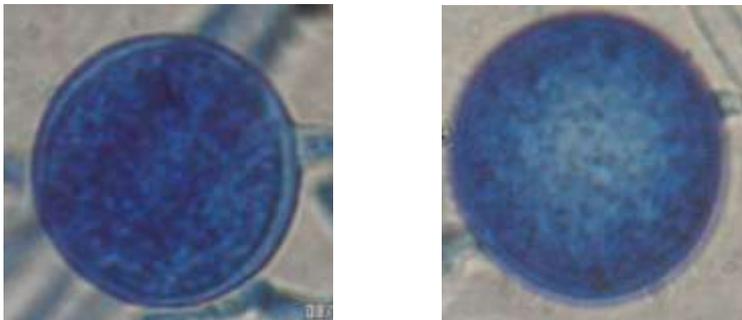


Figura 4. Clamidosporas terminales.

Zentmeyer, sf. indica que *P. palmivora* presenta pedicelo corto (1 – 5 μm), *P. megakarya* mediano (entre 10 y 30 μm), mientras que *P. capsici* presenta pedicelo entre 30 y 200 μm . En los diferentes aislamientos se observarán variaciones del pedicelo que van desde 0 hasta 3.58 μm , lo cual se encuentra en el rango *P. palmivora*.

El pedicelo de la mayoría de los aislamientos fue corto, no sobrepasaban las 5 μm , lo que es clasificado como corto, sin embargo en los aislamientos CM0071, LRM0081 y LRM0042 el esporangio era sésil (Fig. 5) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Forma del esporangio, tipo de papila y presencia o ausencia de clamidosporas de los 13 aislamientos en estudio. INIAP 2013.

Cepas	Forma del esporangio	Pres/ausen de papila	Clamidosporas	
			Forma	Ubicación
SE001	limoniforme	semipapilado	globosa	terminal
LRM0042	limoniforme	papilado	globosa	terminal
LRP7A2	limoniforme	papilado	globosa	terminal
LRBF004	limoniforme	papilado	globosa	terminal
LRBF006	limoniforme	papilado	globosa	terminal
GE002	limoniforme	papilado	globosa	terminal
CM0081	limoniforme	papilado	globosa	terminal
CM0093	limoniforme	papilado	globosa	terminal
CM0071	limoniforme	papilado	globosa	terminal
CM0082	limoniforme	semipapilado	globosa	terminal
N4	limoniforme	papilado	globosa	terminal
LRP3124	ovoide	papilado	globosa	terminal
LRM0081	ovoide	papilado	globosa	terminal



Figura 5. Esporangio sin pedicelo (sésil) y con pedicelo.

En la Figura 6, se observa claramente cómo se agrupan en el dendograma los aislamientos en relación a su desarrollo y medidas de su estructura, lo cual nos muestra tres grupos. En el primer grupo se encuentran los aislamientos SE001, N4, LRBF006, LRBF004 y CM0093. En el segundo grupo se derivan dos subgrupos; en el primer subgrupo los aislamientos LRP3124, LRM0081 y LRM0042; en el segundo subgrupo se ubican los aislamientos LRP7A2 y CM0081, en el tercer grupo están los aislamientos GE002, CM0082 y CM0071.

Cuadro 6. Mediciones de estructura de 13 aislamientos. EET - Pichilingue 2013.

Cepas	Esporangio			
	Largo 40X	Ancho 40X	Relación L/A	Pedicelo 40X
GE002	58,17 a	31,75 b c d	1,84 a b c	2,38 a
CM0071	57,83 a	30,67 b c d	1,89 a b	0,00 b
LRP7A2	57,67 a b	36,83 a	1,57 d e f	2,38 a
CM0082	57,08 a b	31,67 b c d	1,81 a b c d	0,25 b
CM0081	52,50 a b c	32,33 a b c	1,62 c d e f	2,63 a
N4	51,92 b c d	27,08 d e	1,92 a b	2,92 a
LRBF006	50,50 c d e	27,42 d e	1,84 a b c	2,71 a
LRBF004	49,83 c d e	28,25 c d	1,76 a b c d	3,13 a
CM0093	49,17 c d e	29,17 b c d	1,69 b c d e	3,21 a
SE001	46,92 c d e	23,25 e	2,02 a	3,92 a
LRM0081	46,50 d e	33,33 a b	1,39 f	0,00 b
LRM0042	46,42 d e	32,17 a b c	1,45 e f	0,00 b
LRP3124	45,88 e	32,88 a b c	1,40 f	3,58 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

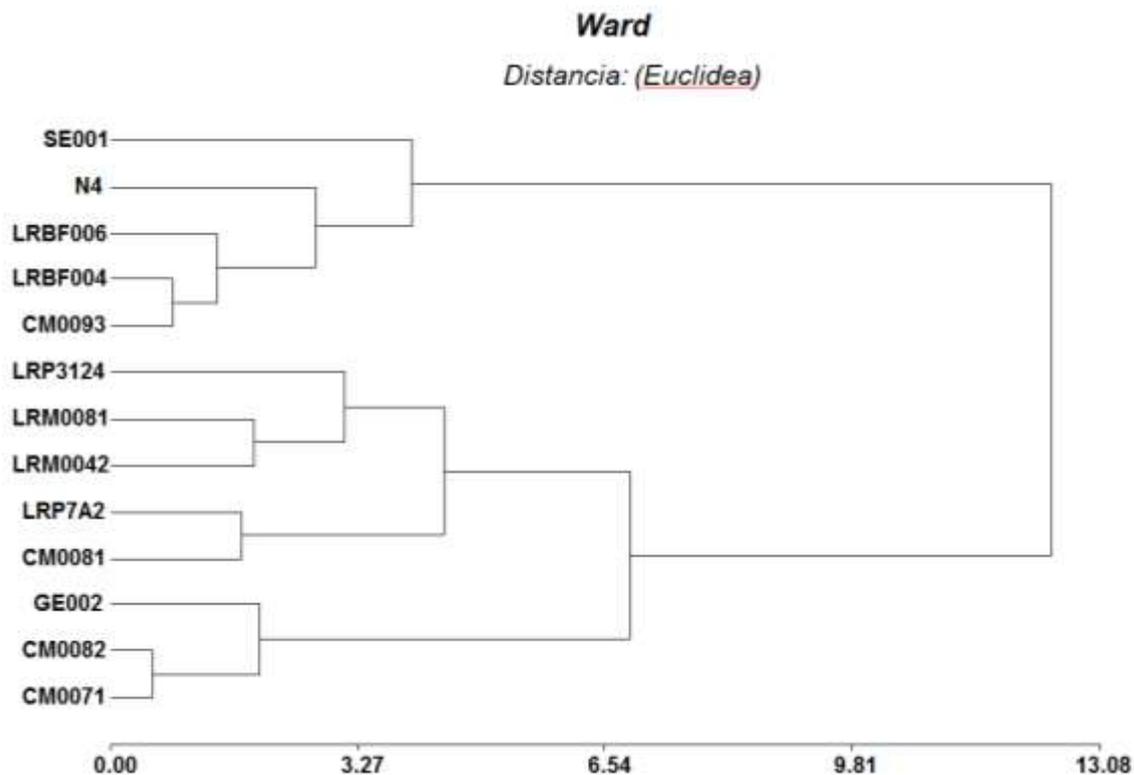


Figura 6. Dendrograma de las variables de evaluación de los 13 aislamientos de *Phytophthora*.

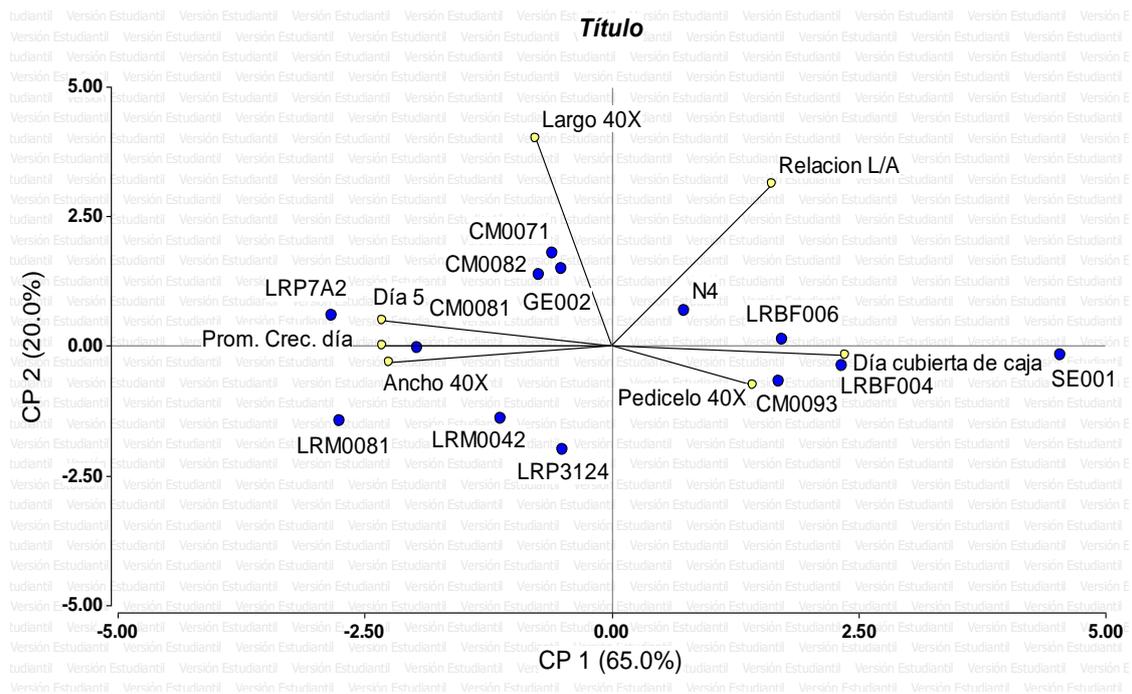


Figura 7. Posición de las variables con respecto a los componentes principales, de los 13 aislamientos de *Phytophthora*.

En la Figura 7, se puede observar que los aislamientos SE001, N4, LRBF006, LRBF004 y CM0093 se encuentran claramente ubicadas a la derecha, en relación al resto de aislamientos, lo cual explica el 65% de la varianza total de la matriz original de datos. La distancia de los cinco aislamientos parece estar controlada por el día cubierta de caja, relación L/A y pedicelo. La distribución de los aislamientos estudiados muestra alguna pauta estructural en relación con el eje del segundo componente principal que explica el 20% de la varianza total.

B. Reacción de los genotipos a la inoculación con *Phytophthora* sp. (LRBF004).

Para calificar la resistencia del material en función de la escala usada por **Blaha et al. (1998)** se aceptó como criterios de resistencia valores de 0-1 y de susceptibilidad 4-5.

La escala establece 5 niveles de resistencia y los clones y arboles evaluados se agrupan en 4 de ellos (Cuadro 7). No se presento ninguno como totalmente susceptible

El SCA 6 y SCA 12, mantienen los niveles de resistencia establecidos por **Enríquez (1980)** y **Luz et al. (1996)** y también conviene destacar en este grupo los materiales, ARBOL-5, AMAZ-2 G8 y AMAZ-2 G10, que alcanzaron valores inferiores al SCA 6 que se ubica como resistente. Como moderadamente resistente tenemos 13 materiales en los que se destacan al BOB-3 G27, ESS-1, CCAT-4688, como tolerantes el BOB-8 G6, EET- 95 y EES-6, mientras que como moderadamente susceptible está el CCN-51 (Cuadro 7 y Anexo 2).

Cuadro 7. Evaluación de resistencia de 37 materiales de cacao a *Phytophthora palmivora*.

Material	Evaluación	Calificación	Material	Evaluación	Calificación
SCA6	0,41	R	TAP-2 G66	0,95	R
Árbol-5	0,44	R	BOB-3 G27	1,01	MR
AMAZ-2 G8	0,50	R	ESS-1	1,02	MR
AMAZ-2 G10	0,51	R	CCN-51 x EET-450	1,07	MR
SCA12	0,52	R	CCAT-2564	1,09	MR
CCN-51 x EET-233	0,57	R	TAP-2 G65	1,13	MR
JHVH-10	0,58	R	EES-5	1,16	MR
Árbol-9	0,63	R	TEET-446 x CCN-51	1,18	MR
EET-451 x EET-387	0,65	R	TAP G70	1,21	MR
CCAT-4675	0,67	R	NAP- 23 G46	1,21	MR
CCN-51 x EET-462	0,67	R	TAP-1 G20	1,27	MR
EET-103	0,77	R	CCN-51 x EET-534	1,29	MR
CCN-51 x EET-233	0,82	R	CCN-51 x EET-534	1,46	MR
CCAT-1119	0,83	R	CCAT-4688	1,50	MR
TAP-G42	0,84	R	BOB-8 G6	2,01	T
EET-426 x CCN-51	0,87	R	EET- 95	2,02	T
TAP-7 G43	0,88	R	EES-6	2,03	T
UNAP-2 G78	0,91	R	CCN-51	3,03	MS
CCAT-4998	0,95	R			

R= resistente, MR= moderadamente resistente, T= tolerante, MS= moderadamente susceptible.

V. DISCUSIÓN

Se conoce que *P. palmivora* desarrolla colonias muy similares en 7 días en un medio de cultivo a base de Agar V-8 que fue el medio usado en este estudio. Los aislamientos obtenidos, indistintamente de su origen, crecieron a un rango de velocidad entre 10.39 a 16.94 mm/día, cubriendo el fondo de las cajas entre 5 y 8 días, lo que indica que aunque perteneciendo a la misma especie, las colonias presentan variabilidad en relación a su velocidad de crecimiento. Si bien las diferencias entre algunos aislamientos (cortos vs largos) podría considerarse interesante, no se puede ofrecer una explicación definitiva por cuanto bajo las condiciones controladas en que se mantuvieron, con ambiente estable y temperatura constante (26°C), las colonias presentaron las variaciones indicadas independientemente del sitio de colección.

En cuanto al aspecto de la colonia, todas presentaron el patrón estrellado típico de *P. palmivora* tal como lo describen **Waterhouse, (1970); Erwin y Ribero, (1996) y Machado et al. (2008)** en el tipo de micelio. Por otra parte, las medidas morfométricas tanto de los esporangios como de las clamidosporas presentaron las variaciones esperadas en los diferentes aislamientos estudiados. Sin embargo los rangos se mantuvieron dentro de lo que se considera característico de *P. palmivora* de acuerdo a **Waterhouse, (1970), Erwin y Ribero, (1996) Stamps, (1998)**. En el 50% de las placas observadas, se observaron clamidosporas de pared gruesa (2,5 μm): redondeadas, intercalares y terminales **Zentmeyer, sf** menciona que la presencia de este tipo de estructuras se asocia comúnmente a *P. palmivora*.

La forma y especialmente la relación largo/ancho de los esporangios así como la forma y tamaño de los pedicelos, se considera un carácter distintivo en las diferentes especies de *Phytophthora*. En el caso que nos ocupa, se observaron en su mayoría esporangios limoniformes y ovoides con papila marcada, aunque también hubo presencia de elipsoides, con una relación L/A entre LRM0081 1.39 y SE001 2.02 μm , con pedicelos cortos que van desde CM0071 con 0 hasta SE001 3.92 μm , medidas que corresponden a la especie *P. palmivora* (**Erwin y Ribero, 1996 y Stamps, 1998**).

Las características morfométricas enunciadas permiten asumir que en la zona central del Ecuador, la especie *P. palmivora* es la causa de la enfermedad conocida como mazorca negra y cáncer del cuello de cacao, aún en sitios mas alejados como Santa Elena (SE001). Los caracteres medidos también corresponden a esta especie aunque en algunos casos como la velocidad de crecimiento de la colonia y la relación L/A del esporangio dieron valores extremos (la velocidad más baja LRM0081 1.39 y la mayor SE001 2.02 μm). En este último caso, no podemos colegir categóricamente que es la misma especie debido a que solamente se obtuvo un aislamiento. Por otra parte, como el área es de reciente colonización con cacao el pseudohongo pudiera haber estado ya en la zona y atacar cacao aunque también pudiera haber sido introducido junto con el cultivo y las variaciones que se observan son producto de las condiciones ecológicas y agronómicas particulares de ese sector del país.

Aunque se mantienen los rangos de tamaño para las estructuras medidas, tanto el análisis de Tuckey como el de conglomerados, señalan variaciones entre cepas que parecen corresponderse con las condiciones ecológicas de los sitios de recolección sugiriendo la existencia de biotipos, situación que debería aclararse con análisis de un mayor número de aislamientos en las diferentes zonas.

Habiéndose establecido que la especie presente en la zona bajo estudio es *P. palmivora*, procedimos a analizar la resistencia de los cultivares previstos utilizando los criterios establecidos para esta especie por **Nyassé et al, (1995)** ; **Nyassé, (1997)** y **Blaha et al., (1998)**. En primer lugar se observó que los dos SCA se ubican en el rango de resistentes previsto **Enríquez (1980)** y **Luz et al. (1996)**, manteniéndose entre los valores más bajos (0.41 y 0.52) dentro del grupo de los resistentes, los clones comerciales evaluados ocupan posiciones distantes entre sí, destacando la resistencia manifestada por el EET-103 mientras el EET-95 se ubica como tolerante y el CCN-51 como medianamente susceptible. Este último hecho tiene implicaciones epidemiológicas que deberían tomarse en cuenta pues el aumento de área sembrada con un solo

clon con susceptibilidad a *Phytophthora* contribuiría al desarrollo de epidemias de la enfermedad.

Los demás materiales, en su mayoría mostraron buenos niveles de resistencia a la enfermedad lo que refuerza la direccionalidad positiva del Programa de mejoramiento de cacao.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de la presente investigación permiten formular las siguientes conclusiones y recomendaciones:

A. Conclusiones

1. Los parámetros morfológicos evaluados, sugieren fuertemente que la especie presente es *P. palmivora* aunque hubo suficiente evidencia de variabilidad entre los diferentes aislamientos, indicando presencia de “biotipos” diferentes.
2. Tanto la metodología usada inoculando discos de hoja, como la posición relativa de los cultivares usados como control (SCA 6 y SCA 12) indican la consistencia de la evaluación de resistencia a *Phytophthora*.
3. Los cultivares Amazónicos y Nacionales, se encontró buenos niveles de resistencia, independientemente de sus características genéticas. Se destaca el ARBOL-5 y los amazónicos AMAZ-2 G8 y AMAZ-2 G10, que ocuparon los lugares junto con los resistentes SCA 6 y SCA 12.

B. Recomendaciones

1. Conviene realizar conteo de cromosomas, pruebas bioquímicas y caracterización molecular de un mayor número de aislamientos, para confirmar la hipótesis de la presencia de *Phytophthora palmivora* como agente causal de la mazorca negra.
2. Realizar muestreos en otras áreas, para poder establecer la especie de *Phytophthora* predominante en el área cacaotera del país.

3. Es conocida la correlación entre resistencias en hojas y en frutos, se recomienda confirmar esta aseveración local mediante pruebas en mazorca y campo.

4. Continuar las investigaciones de resistencia.

VIII. RESUMEN

La pudrición de la mazorca o mazorca negra del cacao es causada por el pseudohongo *Phytophthora* sp. A nivel mundial es una de las enfermedades más agresivas del cacao (*Theobroma cacao* L.), pudiendo causar pérdidas entre el 30 y hasta el 80% de la producción a nivel mundial. En el Ecuador, hasta hace poco no se la ha considerado como una enfermedad económicamente importante comparada con Escoba de Bruja (*Moniliophthora perniciosa*) o la Monilia (*Moniliophthora roreri*), las cuales pueden causar una pérdida del 40 al 60%, aunque en ocasiones la pérdida puede ser total, mientras que *Phytophthora* es de presencia más bien ocasional y no alcanza la gravedad de las enfermedades antes mencionadas, siendo el factor más importante para su desarrollo la lluvia con temperaturas de 18 a 20 °C. Al parecer se cuenta solo con la especie *P. palmivora*. Mediante la evaluación de resistencia, en los cultivares Amazónicos y Nacionales, se encontró buenos niveles de resistencia, independientemente de sus características genéticas. Se destaca el ARBOL-5 y los amazónicos AMAZ-2 G8 y AMAZ-2 G10, que ocuparon los lugares junto con los resistentes SCA 6 y SCA 12, los materiales SCA 6 y SCA 12 presentaron resistencia, mientras que el tratamiento 8 y 24 resultaron moderadamente resistente, y como susceptible el CCN 51.

IX. SUMMARY

The ear rot or cocoa black pod is caused by *Phytophthora* sp pseudofungi. Worldwide is one of the most aggressive disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.) and can cause losses between 30 and up to 80% of global production. In Ecuador, until recently it has not been considered as an economically important disease compared with Witches' Broom (*Moniliophthora pernicious*) or Monilia (*Moniliophthora roreri*), which can cause a loss of 40 to 60%, but sometimes the loss may be total, while *Phytophthora* presence is rather casual and does not reach the severity of the disease in question, being the most important factor for development of rain with temperatures of 18-20 °C. Apparently it has only the species *P. palmivora*. By evaluating resistance in cultivars Amazon and Nationals, found good resistance levels, regardless of their genetic characteristics. It highlights the ARBOL-5 and the Amazon AMAZ-2 G8 and AMAZ-2 G10, who occupied the places along with SCA 6 and SCA 12 resistant a which is, materials SCA 6 and SCA 12 were resistant, while the treatment 8 and 24 were moderately resistant and susceptible as the CCN 51.

IV. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W. & Blackwell, M. 1996** Introductory mycology. New York, John Wiley & Sons, Inc 4a ed., 869p.
- Akaza, M. J.; N'Goran, J. A. K.; N'Guetta, S-P. A. N.; Kébé, B. I.; Tahi, G. M. and Sangaré, A. 2009.** Resistance to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler assessed on leaf disc of cacao (*Theobroma cacao* L.) hybrid trees. *Plant Pathology* 3 (4): 106-118.
- Arciniegas, L., AM. 2005.** Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) Seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 126 p.
- Blaah, C.; Eskes, A. B.; Kebe, B. I. and Nyassé, S. 1998.** Resistance to *Phytophthora*: Leaf Disc Inoculation. In Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI Project Workshop 1-6 February. Montpellier, France. Pp 103-108
- Brasier, C and Hansen, E. 1992.** Evolutionary biology of *Phytophthora* art II: phylogeny, speciation, and population structure. *Annual Review of Phytopathology*.30: 173- 200.
- Cerqueira, A. O.; Luz, E. D. M. N. & Rocha, C. S. S. 1999.** Caracterização morfológica e biométrica de alguns isolados de *Phytophthora spp.* Da micoteca Centro de Pesquisas do Cacau. *Fitopatologia Brasileira*, 24: 114 - 119.
- Dade, H. A. 1929.** Economic significance of cacao pod disease and factors determining their incidence and control. Gold Coast Department Printer, pp. 135-318 (Bulletin N° 16)

- Djocgoue, P.F.; Boudjeko, T.; Nankeu, D. J.; Efombagn, M. I. B.; Nyasse, S. and Omokolo, D. N. 2006**, Comparative assessment of the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) progenies from SNK10 x SNK413; ICS84 x ICS95 to *Phytophthora megakarya* in Cameroon by measuring size of necrotic lesion along the midrib. *Plant Pathology* 5(3): 329-335.
- Enríquez, G. 1980**, Mejoramiento en cacao (*Theobroma cacao* L.) In “seminario Internacional sobre el cultivo de cacao”. Pichilingue. Noviembre 26-28.
- Enríquez, G. A. 2004**, Cacao orgánico, Guía para productores ecuatorianos. INIAP. Manual N° 54, 360 p. Quito, Ecuador.
- Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. 1996** (ed) *Phytophthora* disease worldwide. St. Paul, APS Press. 562 p.
- Eskes, A. B.; Engles, J. M. M. and R. A. 1998**. Lass, Working procedure for cocoa germoplasm evaluation and selection. Montpellier, France. February, 176p.
- Frezzi, M. J.** Las especies de “*Phytophthora*” en la Argentina. *Revista Investigaciones Agrícola* v. 4:47-133. 1950.
- Guest, D. 2007**. Black pod: diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology* 97: 1650. 1653.
- Gonzales, A.; Ventura, M. 2007**. Autoincompatibilidad sexual de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.). In IDIAF (Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales). Santo Domingo, República Dominicana. p. 13-17.
- Gregory, P. 1972**. Cocoa: the importance of black pod disease. *Journal of the Agricultural Society of Trinidad y Tobago*. 72(2): 155-160.

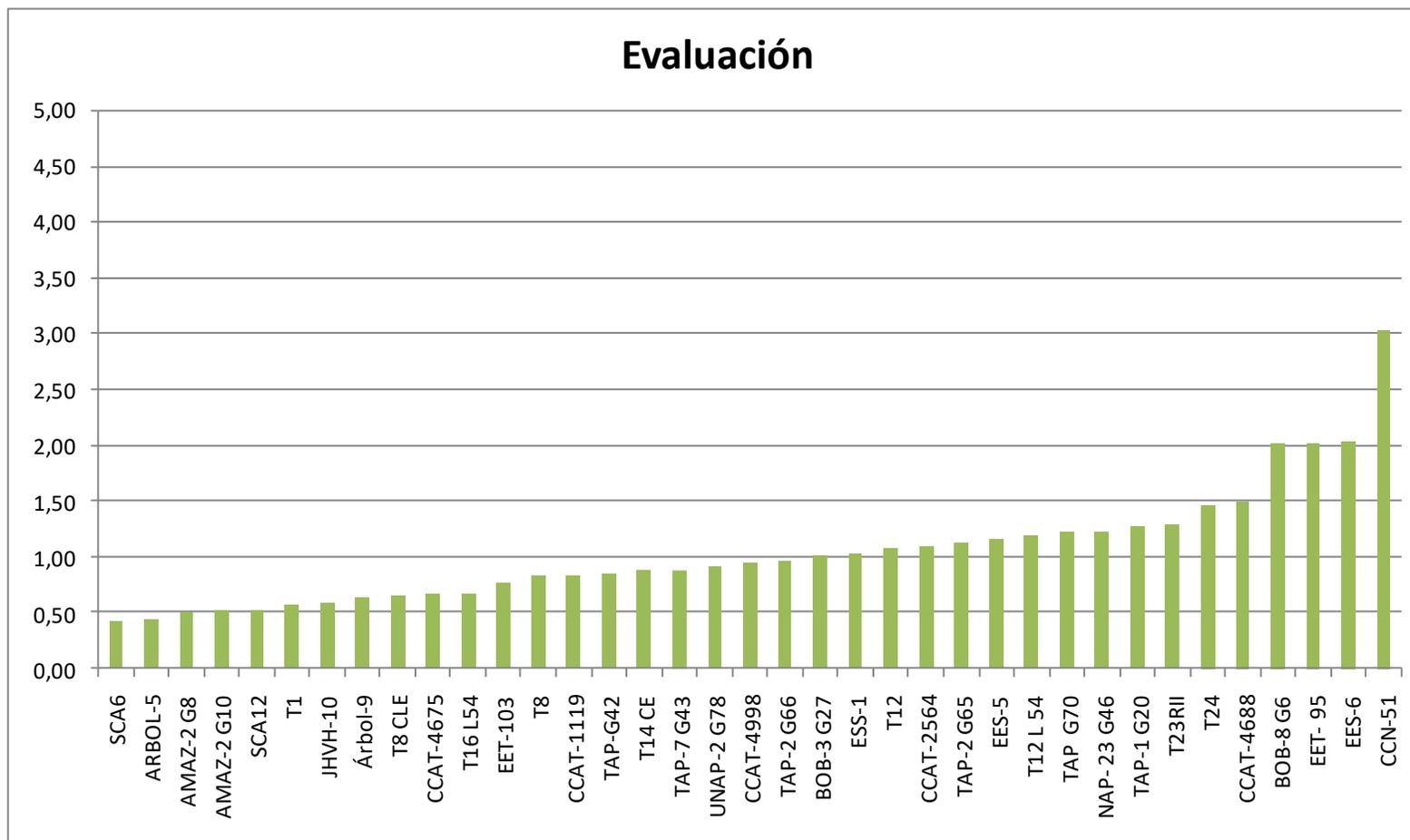
- Griffith J, Smillie R, Nieri J, Grant, B. 1992.** Target sites of fungicides to control oomycetes. In W. Koller (Eds.), Target sites of fungicides. CRC Press FL. Boca Ratón, pp. 69–99.
- Hebbar, P. 2007.** Cacao diseases: A global perspective from an industry point view. *Phytopathology* 97: 1658 – 1663.
- Iwaro, A.; Screenivasas, T. and Umaharan, P. 1997 (a).** Foliar Resistance to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in *Theobroma cacao*. *Plant Dis.* 81: 619-624.
- Iwaro, A.; Screenivasas, T. and Umaharan, P. 1997 (b).** *Phytophthora* resistance in Cacao (*Theobroma cacao*): Influence of pod morphological characteristics. *Plant Pathology* 46: 557 – 565
- Iwaro, A.; Screenivasas, T. and Umaharan, P. 1998.** Cacao resistance to *Phytophthora*: Effect of pathogen species, inoculation depths and pod maturity. *Plant Pathology.* 104: 11-15.
- Luz, E.D.M.N.; Silvia, S.D. V. M.; Yamada, M. M.; Lopes, U. V.; Braga, M. C. T. & Brugnerotto, M. I. B. 1996.** Selection of cacao genotypes resistant to *Phytophthora capsici*, *P. palmivora* and *P. citriophthora* in Bahia, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 21: 71-9.
- Luz, E.D.M.N.; Santos, F. A. dos.; Matsuoka, K. e Bezerra, L. J. 2001.** Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Livrariaeditora rural. 757 p.
- Maharaj, S. S.; Umaharan, P. and Iwaro, A. D. 2001.** A study of genotype-isolate interaction in cacao (*Theobroma cacao* L.): resistance of cacao genotypes to isolates of *Phytophthora palmivora*. *Euphytica* 118: 295-303.

- McMahon, P., Abdul, W., Agung, W. S., Arief, I., Agus, P., Endang, S., Yohannes, J., Sri, S., Suntoro, Endang, M., Muhammad, I., Muhammad, H., Darna, I., Lambert, S., Guest, D., and Keane, P. 2006.** Selection for Quality and Resistance to Phytophthora Pod Rot, Cocoa Pod Borer and Vascular-Streak Dieback in Cocoa in Sulawesi. 15th International Cocoa Research Conference, San Jose, Costa Rica.
- McMahon, P, Purwantara, A. 2004.** Major crops affected by *Phytophthora*. En André Drenth y David Guest. Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. ACIAR Monograph 114. 104-105 p.
- Nyadanu, D.; Assuah, M. K.; Adomako, B.; Asiana, Y. O. and Adu-Ampomah, Y. 2011.** Thickness of the cocoa pod husk and its moisture content as resistance factors to *Phytophthora* pod rot. J. Agric. Res. Pp 13.
- Nyassé, S.; Cilas, C.; Hérail, C. and Blaha, G. 1995.** Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. Crop Protection. Volumen 14 N° 8.
- Paulin, D., Dumcap, M. and Lachenaud, P. 2008.** New sources of resistance to *Phytophthora megakarya* identified in wild cocoa tree populations of French Guiana. CropProt, 27: 1143-1147.
- Pinzón, U., JO.; Rojas, A., J. 2008.** Guía técnica para el cultivo del cacao. 3 ed. Bogotá, Colombia. FEDECACAO. 189 p.
- Ploetz, R. 2007.** Cacao disease: Important threats to chocolate production worldwide. Phytopathology 97: 1634-1639.
- Pokou, N.; Goran, J.; Kébe, I.; Eskes, A, Tahi, M, Sangaré, A. 2008.** Levels of resistance to *Phytophthora* pod rot in cocoa accessions selected on-farm in Côte d'Ivoire. Crop Protection 27: 302-309.

- Porras, V. H., Sánchez, L., J. A. 1991.** Enfermedades del cacao. Fascículo N° 5. Serie: Tecnología, comunicación y desarrollo. Honduras, Lima. Cortés. Febrero. 32 p.
- Santos, E. S. L. dos; Cerqueira, C. B. M. S.; Louis, D. P. C. e Luz, E. D. M. N. 2009.** Identificação de resistência genética do cacaueiro à podridão-parda. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.44, n.4, abril. p.413-416,
- Stamps, J. 1998.** *Phytophthora palmivora*. CMI Description of pathogenic fungi and Bacteria N° 831. Set N° 84.
- Suárez, C. C. 1993.** Enfermedades del cacao y su control. In. Suárez C. ed. Manual del cultivo de Cacao. 2da. Ed. Quevedo, Ecuador, EET-Pichilingue. Manual Técnico N° 25 p. 96-106.
- Suárez, C.; Solís, K. 2003.** Tácticas del manejo integrado de enfermedades disponibles para la producción de cacao orgánico en el Ecuador. In 1er. Seminario Nacional de Investigación en Agricultura Orgánica. EETP-INIAP/PROCIANDINO/GTZ. Tema 11.
- Tahi, G. M.; Kébé, B. I.; Goran, J. A. K. N.; Sangaré, A.; Mondeil, F.; Cilas, and Eskes, A. B. 2006 (a).** Expected selection efficiency for resistance to Cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing leaf disc inoculations with field observations. *Euphytica* 149: 35-44.
- Tahi, G. M.; Kébé, B. I.; Goran, J. A. K. N.; Sangaré, A.; Mondeil, F.; Cilas, and Eskes, A. B. 2006 (b).** Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: interaction of cacao genotype, leaf age and duration of incubation. *Plant Pathology* 55: 776-782.
- Tahi, G. M.; Kébé, B. I.; Goran, J. A. K. N.; Sangaré, A.; Mondeil, F.; Cilas, and Eskes, A. B. 2007.** Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the

field; the effect of light intensity and time of day at leaf collection. *Plant Pathology* 56: 219-226.

Thorold, C. A. 1953. The control of black pod disease of cacao pods in the western region of Nigeria. Report of Cocoa, Conference, London.p 108-115.



Anexo 2. Evaluación de resistencia a *Phytophthora palmivora*.

