ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A *Ceratocystis fimbriata* ELLIS Y HALST., EN HIBRIDOS Y CLONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.), UTILIZANDO DOS METODOS DE EVALUACION

Tesis de grado

Magister Scientiae

HECTOR ANTONIO MONTES DE OCA GUERRERO

INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA
Centro Tropical de Enseñanza e Investigación
Departamento de Cultivos y Suelos Tropicales
Turrialba, Costa Rica
Noviembre, 1975

BIBLIOTECA
30628
Centro Interamericano de Documentación
e Información Agrícola
IICA - CIDIA

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A *Ceratocystis fimbriata* ELLIS Y HALST., EN HIBRIDOS Y CLONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.), UTILIZANDO DOS METODOS DE EVALUACION

Tesis

Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados
como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA: _____ Consejero
Jeremy S. Lawrence, Ph.D.

_____ Comité
Jorge Soria, Ph.D.

_____ Comité
Raúl A. Moreno, Ph.D.

_____ Comité
Pablo Rosero, Mag. Agr.

Noviembre, 1975

DEDICATORIA

A la memoria de mis padres: Rogelio y Zoraida

A mi esposa Teresa, con cariño

A mis queridos hijos: Zoraida Julia
Héctor Luis
Rosa Elena

AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar su sincero agradecimiento:

A los profesores: Dr. Jeremy S. Lawrence, Consejero Principal, Dr. Jorge Soria, Dr. Raúl A. Moreno e Ing. Pablo Rosero, miembros del Comité Consejero, por su invalorable asesoramiento y orientación en el desarrollo de este trabajo.

Al personal de la finca "La Lola", al de la colección de cacao de Turrialba, al del laboratorio de Patología Vegetal y al del Centro de Estadística y Computación del IICA, por su colaboración.

Al Dr. Heraclio A. Lombardo, Representante del IICA en la República Dominicana, por su constante estímulo.

Al Consejo Estudiantil, por su interés y cooperación.

Al Gobierno de Holanda, al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA y a la Secretaría de Agricultura de su país, que hicieron posibles sus estudios en esta Escuela para Graduados.

A su esposa Teresa, por su constante estímulo y apoyo moral.

A sus compañeros de estudios y a todas aquellas personas que en una u otra forma le prestaron su gentil ayuda durante su permanencia en el Centro.

BIOGRAFIA

El autor nació en La Romana, República Dominicana.

Realizó sus estudios secundarios en la Escuela Normal "Aristides García Mella" de La Romana y los de Perito Agrónomo en el Instituto Politécnico Loyola de San Cristóbal.

Trabajó en su país en la Central Romana Corporation, como asistente de laboratorio y campo alrededor de tres años; en el Instituto Agrario Dominicano, como asistente en el Departamento de Estudios Agrícolas por espacio de un año y en la Secretaría de Agricultura como agrónomo en el Departamento de Sanidad Vegetal por espacio de año y medio.

Se graduó de Ingeniero Agrónomo (B.S.) en la Universidad Agrícola y Mecánica de Texas en College Station. Al regresar a su país, prestó servicios en el Instituto Politécnico Loyola y en la Universidad Nacional "Pedro Henríquez Ureña" como profesor en los Departamentos de Agronomía de ambas instituciones.

Ingresó a la Escuela para Graduados del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, en Turrialba, Costa Rica, realizando sus estudios de postgrado en el Departamento de Cultivos y Suelos Tropicales, mediante una beca del Gobierno de Holanda, obteniendo el grado de Magister Scientiae en noviembre de 1975.

CONTENIDO

[illegible]

Página

[illegible]

[illegible]

LISTA DE CUADROS

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

1. INTRODUCCION

La producción de cac o en la América tropical se encuentra afectada por la enfermedad denominada "mal de machete" causada por el hongo Ceratocystis fimbriata Ellis y Halst. Este mal se ha reportado en varios países (16, 18, 20, 25, 28, 32), como responsable de la destrucción de árboles, principalmente de los tipos "Criollos" y "Trinitarios", considerados como más susceptibles a la enfermedad.

No existen productos químicos adecuados para el control de la enfermedad y las únicas medidas para este control han sido prácticas culturales y el uso de algunos cultivares que han mostrado resistencia. En este sentido, existe necesidad de investigar el desarrollo de material resistente y métodos adecuados de evaluación.

Delgado y Echandi (8), desarrollaron un método rápido de evaluación de laboratorio y de campo que permitió determinar la reacción de resistencia o susceptibilidad a C. fimbriata de cultivares y especies del género Theobroma. Ruíz (29), encontró que este método puede dar resultados variables y desarrolló un nuevo método con un criterio estrictamente cuantitativo.

Este trabajo tiene como objetivos:

1. La evaluación comparativa de los métodos desarrollados por Ruíz y por Delgado y Echandi, con el propósito de seleccionar cuál de los dos es más confiable.

2. Usando el método seleccionado, evaluar la reacción de clones e híbridos en un ensayo de campo en la finca experimental "La Lola", situada en la vertiente Atlántica de Costa Rica.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Distribución geográfica e importancia de la enfermedad

La enfermedad se conoce en la literatura con diversos nombres (20, 23, 24, 32). En la actualidad el más conocido en Latinoamérica es "mal de machete", por encontrarse la enfermedad asociada a heridas (10). El mal fue reportado por primera vez en Ecuador en 1918, careciendo de importancia en aquella época. En 1951, reapareció destruyendo árboles de cacao "Criollo" de una colección de introducciones proveniente de semillas de la Estación Experimental Tropical de Pichilingue (10). También ha sido reportada de otros países latinoamericanos, pero no así en Brasil ni en el continente africano (16, 18, 20, 25, 28, 32, 33).

En Colombia (20), atacó a más del 50 por ciento de las plantaciones de cacao del municipio de Sofía y en el valle del Cauca no hay plantaciones sanas. Malaguti (24), informa que en el estado de Aragua (Venezuela), el 20 por ciento de las plantaciones fueron destruídas entre 1951 y 1956. En Trinidad (16), la enfermedad era conocida desde 1932, y en 1959 se registraron pérdidas de 2,5 por ciento en las plantaciones. En Costa Rica (18), se estima que anualmente la enfermedad destruye el 5 por ciento de la población total de árboles de cacao.

2.2 Generalidades del patógeno

El hongo pertenece al género Ceratocystis, pero se le conoce también por los sinónimos Sphaeronema, Ophiostoma, Ceratostomella y otros (19). Además de cacao, el hongo ataca café, ñame, hule, frijol de palo, papaya, almendra, ciruela y otros cultivos. Este patógeno tiene una fase imperfecta, con esporas asexuales o endoconidias que se forman en endoconidióforos y una fase perfecta con ascosporas formadas en peritecios (19). El mejor crecimiento se obtiene en medio artificial con abundantes carbohidratos y la esporulación es máxima en agar-papa-glucosa (24). Normalmente las conidias se producen a las 48-72 horas y los peritecios maduros en término de una semana (19). La temperatura óptima para el desarrollo del hongo in vitro es de 24-27 C. La luz no constituye un factor limitante en la formación de peritecios (42).

El material más adecuado para el cultivo del hongo son las ramas maduras en "abanico", descartando las yemas y brotes jóvenes. Este material es recomendable para evaluaciones de laboratorio por desarrollarse mejor en ellos los micelios y peritecios (14, 34),

2.3 Síntomas de la enfermedad y diseminación del patógeno

Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen en la parte aérea del árbol. La corteza de la zona infectada aparece de un color más oscuro que el normal, hasta tornarse rojo

púrpura. El área situada por encima de la parte afectada muere con el tiempo, pero las hojas marchitas y abarquilladas permanecen adheridas a las ramas después de que éstas han muerto (17, 24). En el xilema y floema se notan manchitas lineales de color azul o violáceo, que corresponden generalmente a los radios medulares (23, 31).

El patógeno produce una enfermedad vascular y penetra solamente a través de heridas, las que ocurren más generalizadamente por medio de machetes contaminados durante los trabajos de poda y cosecha (11, 24). Iton (21), en su trabajo realizado en Trinidad, reporta que las clamidosporas del hongo pueden encontrarse en el aserrín de la madera de las galerías que producen los insectos taladradores del género Xyleborus y ser diseminado el hongo en esta forma a grandes distancias por la acción del viento. Por otra parte, Saunders (30), no pudo detectar ni aislar C. fimbriata de estos insectos, ni tampoco producir la infección en árboles sanos de cacao inoculados con especies de Xyleborus. Sin embargo, las infecciones naturales de Ceratocystis en el campo se asociaban con los ataques de estos insectos, y los tratamientos con insecticidas para combatirlos redujo la incidencia de la enfermedad.

Además de las especies del género Xyleborus y otros insectos como posibles agentes diseminadores de la enfermedad, ésta puede transmitirse también por el hombre (uso de herramientas infectadas), y posiblemente por la salpicaudra de agua de

lluvia (23, 26).

2.4 Control de la enfermedad

Hasta la fecha los métodos de control no han sido eficaces y el uso de fungicidas ha resultado ser antieconómico. Como la penetración de la enfermedad ocurre por las heridas, lo que es casi inevitable en un cacaotal, las aspersiones regulares son costosas y difíciles (24). Se aconseja evitar al máximo las heridas innecesarias en las operaciones de cosecha, poda y limpieza, quemando ramas infectadas, así como restos de cosechas a fin de destruir conjuntamente los insectos taladradores. La esterilización de las herramientas de trabajo debe realizarse durante las operaciones de poda y cosecha, recomendando si es posible la aplicación de pasta fungicida de alta concentración a los cortes producidos (17, 24).

Naundorf, Idrobo y Sanclemente (27), señalan como medida preventiva contra C. fimbriata, la tumba y quema de los árboles afectados, respetando aquéllos que no estén del todo enfermos, los que se pueden salvar recortando la zona lesionada por el hongo y untando las heridas con pasta desinfectante.

Malaguti (24), usó distintas dosis del insecticida Phygon X.L. (dichlone), con el objeto de inhibir el crecimiento del hongo, observando como resultado que había un crecimiento menor del inóculo a mayor concentración del producto.

Al tener conocimiento del éxito alcanzado con el uso

de fungicidas de acción sistémica en el control de C. ulmi, se pensó en la posibilidad de que estos productos químicos puedan actuar también contra C. fimbriata en cacao. Considerando esto, se probó el comportamiento de cinco fungicidas; de ellos, Cercobín aplicado al suelo en forma de riego redujo la mortalidad en un 100 por ciento (39).

Otras recomendaciones dadas por Malaguti (24), son la de tener limpios los terrenos y podar los árboles de sombra para dar mayor aireación a la plantación.

El método más práctico es el uso de tipos de cacao resistentes a la enfermedad, teniendo en cuenta que "los menos finos" son los más resistentes, siendo necesario mejorar su calidad con posibles cruces.

Algunos autores han sugerido el estudio de los mecanismos de la herencia y el uso de las variedades resistentes en todos los programas que se inicien, tendientes al mejor control de la enfermedad (7, 12, 14, 17, 22, 31, 36, 39).

2.5 Fuentes de resistencia a C. fimbriata

La técnica de laboratorio, desarrollada por Delgado y Echandi (8), es un método rápido que evalúa la reacción de cultivares de cacao al "mal de machete". El procedimiento consiste en cortar ramas laterales de 1,5 cm de diámetro y de aproximadamente un año y medio de edad, divididas en seis trocitos de 4 x 1,5 cm. Estos trocitos se cortan a su vez longitudinalmente

separando la corteza de la madera y se colocan en platos de Petri, que sirven de cámara húmeda. Sobre el área central e interna de los trocitos de madera y corteza se coloca una gota de una suspensión acuosa de micelio y esporas (15,000 esporas/ml), cultivadas artificialmente en Papa-Dextrosa-Agar (PDA) + dos por ciento de tallo y hojas de cacao de primer crecimiento, dejando las muestras a incubar a temperatura normal.

Después de tres o cuatro días se observan las muestras al microscopio y se califican visualmente la proporción de crecimiento y producción de micelio y peritecios. El grado de desarrollo del micelio se mide por medio de la siguiente escala: 0 = no crecimiento; 1 = muy poco; 2 = poco; 3 = bastante y 4 = totalmente cubierto. El grado de producción de peritecios se mide de la siguiente manera: 0 = nada; 1 = muy pocos (1 a 5); 2 = pocos (6 a 15); 3 = muchos (más de 16) y 4 = tejido totalmente cubierto.

Los clones de cacao estudiados por Delgado mostraron un grado elevado de infección, únicamente los clones SPA-9, IMC-67 y Pound-12 presentaron grados de infección menores de 1,00 que fue, en este caso, el límite fijado para efectuar la selección.

Se estima que la prueba usada para la evaluación del material estudiado, es válida para seleccionar individuos resistentes dentro de una población de árboles adultos, que permiten

la rápida evaluación de un crecido número de árboles de cacao, acelerando en esta forma los trabajos de selección clonal para resistencia a C. fimbriata.

Ruíz (29), evaluó la resistencia y susceptibilidad de clones de cacao por medio de la determinación colorimétrica de la intensidad de la clorosis que aparece en material inoculado en el laboratorio. Este método ofrece una determinación cuantitativa de la destrucción de la clorofila y no un juicio cualitativo. Puede permitir establecer categorías en valores porcentuales de susceptibilidad, lo que facilitaría la selección de árboles resistentes.

El método consistió en lo siguiente: se tomaron dos ramillas con madera dura del último crecimiento, haciendo una incisión profunda en la base de cada ramilla con una navaja estéril. El proceso de inoculación consiste en colocar en la herida un pedazo de colonia del hongo previamente cultivado en PDA + cáscara de fruto susceptible. Después de la inoculación de una ramilla (la otra sirve de testigo), se colocan en cajas de madera forradas interiormente con polietileno y en el fondo unas toallas de papel húmedo. Las cajas se cubren con tela plástica transparente para obtener una cámara húmeda. Después de un período de incubación de cinco o seis días, se pesa 0,5 g de material foliar, incluyendo la parte enferma o clorótica en los cultivos afectados y se procede a la extracción completa de la clorofila, utilizando alcohol etílico caliente

(75 C) (41). Se macera el material en un mortero con arena, usando 25 ml de alcohol etílico de 95 por ciento. Luego se centrifuga la solución a 3500 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos y se diluye un ml de esa solución hasta 25 ml con etanol acuoso. El porcentaje de transmisión de luz a través de la solución obtenida, se mide en un colorímetro Beckman DU, a una longitud de onda de 665 mμ.

Por este método, Ruíz (29) encontró que el porcentaje de clorofila destruída por el hongo, en los cultivares de cacao y especies afines, fue más alta en los clones susceptibles y de un valor más bajo en los resistentes, lográndose una separación definida en ambos grupos.

Finalmente, se estima que la diferencia no significativa obtenida entre repeticiones aumenta la aplicabilidad de este procedimiento y en pruebas de gran escala no será necesario incluir más de dos o tres repeticiones para obtener resultados provechosos.

La información sobre resistencia y susceptibilidad de tipos y cultivares de cacao al "mal de machete" hasta 1962, se basó principalmente en observaciones de campo. Existen en consecuencia, muchas opiniones contradictorias al respecto. Rorer (7), observó por primera vez la enfermedad en árboles de la variedad "Nacional" originaria de Ecuador, los que son más o menos resistentes al daño, debido a la rápida cicatrización de las lesiones; este es un fenómeno que no ocurre en los árboles

tipo "Venezuela", que son muy susceptibles a la enfermedad. Observaciones hechas en Ecuador, Colombia, Venezuela y México, coinciden en que los árboles de tipo "Forastero" y algunos segregantes de tipo "Trinitario" presentan evidencias de poseer cierta resistencia en comparación a los árboles generalmente relacionados a los tipos "Criollos" que denotan alta susceptibilidad (7).

Soria (35), observó en la colección de cacao en Turrialba, que los clones provenientes de Iquitos (Perú) tenían resistencia a C. fimbriata. El autor obtuvo material de esta región amazónica para nuevas introducciones.

Desrosiers (9), encontró diferenciación notable en la incidencia de la enfermedad en grupos de cacao "Criollos" y "no Criollos", con un porcentaje de infección de 45 y 2,5 por ciento, respectivamente.

Bartley (1), determinó en Trinidad que el cacao tipo "Criollo" era muy susceptible y fueron de los primeros en ser exterminados por C. fimbriata. El porcentaje de susceptibilidad de progenies híbridas en combinaciones de clones de "Criollo" y "Trinitario" fue muy elevada.

Capriles de Reyes (2), usando el método modificado de Delgado y Echandi, logró determinar clones e híbridos resistentes de tipo amazónico como IMC-67, Pound-12, ICS-6xP-12, ICS-89xP-12 y otros. Entre los clones e híbridos muy susceptibles pueden señalarse los siguientes: Cata 10, Altamira-2,

Cuira-32xSCA-12, y GS-36xP-12. Espinoza (14), usando la técnica de Delgado y Echandi, no encontró resistencia a C. fimbriata en 137 clones que probó en Pichilingue. Sin embargo, el clon EET 369, acusó una calificación que lo ubica como moderadamente resistente a la enfermedad.

Soria y Salazar (37), usando el método de Delgado y Echandi, realizaron pruebas preliminares de resistencia a C. fimbriata en clones e híbridos de cacao, en Turrialba, Costa Rica. Reportaron como resistentes los clones SPA-9, IMC-67, Pound-12 y PA-121. También estudiaron las segregaciones de los cruzamientos entre algunos clones resistentes por algunos susceptibles, y sugirieron que la resistencia parece ser de acción recesiva, siendo la susceptibilidad dominante y controlada posiblemente por uno o más pares de genes independientes de igual acción o por un par de genes mayores con modificadores. Indican que esta interpretación debe ser confirmada con un mayor número de progenies de cruzamientos dialeles y perfeccionando los métodos de calificar y separar grados de resistencia, pues si estos no son correctos, cualquier interpretación genética sería también defectuosa. Es probable que cada uno de los padres susceptibles sea heterozigoto en uno o más pares de genes.

Chong (6), inoculó grupos de clones y de híbridos interclonales, registrando en plantitas de seis meses de edad (provenientes de estacas), una mortalidad de 100 por ciento en los clones ICS-1, ICS-45 y EET-62; sólo el clon SCA-6 presentaba

alta resistencia. También encontró que plantitas de 16 meses de edad de los cruces ICS-1xSCA-6 y SCA-6xICS-1 fueron susceptibles.

Cevallos (5), encontró que plantas de 10 meses de edad, del cruce SCA-6xICS-1, fueron menos susceptibles, pero de manera general, todos los cruces con SCA-6 fueron más resistentes. Los resultados obtenidos con plantas de más de un año de edad difieren de los anteriores, puesto que las plantas del cruce SCA-6xICS-1 se mostraron susceptibles.

Soria y Salazar (37), indican que para mejorar las pruebas de resistencia sería conveniente realizar investigaciones para determinar la influencia de los cambios fisiológicos causados por la variación de los factores climáticos durante el año. Estos autores basaron su observación en los trabajos realizados en "La Lola", en donde no se repetían los mismos resultados en inoculaciones realizadas en cultivares de cacao en dos épocas diferentes, o sea, que la reacción a las pruebas de resistencia varía con las épocas del año. Sin embargo, la clasificación general de resistencia en los clones e híbridos se mantuvo paralela, pudiendo apreciar que las plantas más resistentes del año anterior fueron también las más resistentes al año siguiente.

Soria (36), presenta las tendencias de reacción a la enfermedad de varios cultivares según la edad. Hay evidencias de que el período de susceptibilidad en condiciones de campo,

parece iniciarse entre el sétimo al noveno año de edad. Se podría especular que esta predisposición a la susceptibilidad pudiera estar relacionada con la reducción de reservas en los tejidos de las plantas, debido a una alta producción.

Espinoza (14) y Espinoza y Delgado (15), no encontraron diferencias en los resultados de las inoculaciones practicadas desde 1 a 7 horas después del corte de ramas de árboles de cacao, lo que parece indicar que en este período no ocurren alteraciones significativas que pudieran inducir variación en el desarrollo de C. fimbriata. De ser correcta la teoría de que la resistencia está condicionada por alguna sustancia fenólica, se podría pensar que ésta permanecería inoxidable en las ramas durante algunas horas después del corte (14, 15).

Echandi y Fernández (13), proponen que el ácido clorogénico es el responsable de la resistencia en varias plantas. Estos investigadores obtuvieron pruebas de resistencia a C. fimbriata inoculando algunas ramas de distintas especies de café. Capriles de Reyes, Schulz y Muñoz (3), encontraron una correlación positiva y significativa entre el grado de resistencia a C. fimbriata de tres cultivares de cacao y el contenido de ácido clorogénico en los tallos de los mismos cultivares. El híbrido IMC-67xTSH-644 mostró doble concentración de sustancias polifenólicas en comparación con las variedades susceptibles, Porcelana y Ocumare-61.

Capriles de Reyes y Reyes (4), han encontrado grandes diferencias desde el punto de vista bioquímico entre plantas susceptibles y resistentes. Mediante análisis cromatográficos, pudieron determinar en plantas susceptibles e inoculadas con el hongo, una tendencia a la desaparición de ciertos compuestos fenólicos, los que suponen son oxidados o metabolizados por el hongo.

Debido a la escasez de información sobre la forma en que se hereda la resistencia a C. fimbriata, en 1969 se inició en Pichilingue (39), un estudio para inducir esta característica, cruzando clones amazónicos resistentes (IMC-67, EET 399 y EET 400) entre sí y con otros de diferente origen que hayan sido calificados como susceptibles. Para tal efecto, se obtuvieron plantas de diferentes combinaciones, que se inocularon a los ocho meses de edad, en varias épocas. Los resultados hasta el momento indican que existe la posibilidad de transferir la resistencia a C. fimbriata a través de cruzamientos en los que por lo menos uno de los progenitores sea resistente si actúa como madre (39).

Soria (36) indica que la muerte masal de plantas en las poblaciones jóvenes (8-10 años de edad) de híbridos, con padres susceptibles es un fenómeno que merece atención. Los híbridos, por lo menos, con un padre susceptible, muestran reducciones iguales o inferiores al 50 por ciento de la población. Pérdidas superiores al 20 por ciento de la población en una

plantación comercial ya deben considerarse perjudiciales económicamente, por tanto son casos dignos de estudiarse.

Finalmente, se hace necesario seguir realizando investigaciones tendientes a encontrar los medios o métodos más efectivos para el control y represión de la enfermedad, de los cuales el más recomendable de todos parece ser la resistencia genética (7, 31, 37).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del experimento

La primera parte del trabajo experimental se realizó en la colección de cacao del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y la prueba final en la finca experimental "La Lola", situada en la vertiente Atlántica de Costa Rica. Según el mapa ecológico de Tosi (40), basado en el sistema de clasificación ecológica por zonas de vida de Holdridge, se considera a la zona de Turrialba como bosque muy húmedo premontano con precipitación media anual de 2680 mm, temperatura media anual de 22,5 C y humedad relativa media de 87,9 por ciento. La zona de "La Lola" está ubicada en la transición del bosque muy húmedo premontano al bosque muy húmedo basal, con precipitación media anual de 3600 mm, temperatura media anual de 25,2 C y humedad relativa media de 92,3 por ciento.

3.2 Aislamiento de *C. fimbriata*

3.2.1 Procedencia e incubación del hongo

El hongo se aisló de la madera de un árbol enfermo (UF-676) que presentaba los síntomas típicos de la enfermedad. Se cortaron trocitos de madera afectada y se incubaron en platos de Petri; como medio de cultivo se usó Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Papa-Dextrosa-Agar + 1 por ciento de polvo de corteza de cacao del mismo clon (PDA+C), creciéndolo en ambiente de

laboratorio y haciendo transferencias contínuas (cada dos o tres días) con el objeto de tener material adecuado para las inoculaciones.

Se hicieron varios aislamientos monospóricos de las cepas, mediante la dilución de una suspensión de esporas la cual se depositó en un plato de Petri con agar-agua, observándose al microscopio a partir de 24-48 horas de incubación. Se extrajeron cuidadosamente endoconidias hialinas que se sembraron en PDA+C para su desarrollo y multiplicación. Se hicieron pruebas comparativas de patogenicidad con el hongo aislado inicialmente y el hongo monospórico por los métodos de Ruíz y de Delgado y Echandi.

3.2.2 Evaluación comparativa de métodos

Para evaluar comparativamente los métodos se seleccionaron clones de reacción ya conocida: resistentes (IMC-67 y SPA-9); tolerantes (UF-613 y Catongo) y susceptibles (ICS-1 y SCA-6). Se usaron árboles de la colección de clones de Turrialba con una edad aproximada de 15 años.

3.3 Método de Ruíz

Se aplicó el método de Ruíz (29), pero usando cajas de madera, forradas con polietileno, en cuyo fondo había una película de agua destilada. La extracción de la clorofila se hizo con 25 cc de acetona pura, filtrando al vacío y guardando a 10 C. Por último, las lecturas del porcentaje de transmisión

de luz se realizaron en un espectrofotómetro Coleman (Junior II), modelo 6/20. Se repitió este método seis veces con cada clon, bajo las mismas condiciones de laboratorio.

3.3.1 Modificaciones del método de Ruíz

Debido a variabilidad en los datos obtenidos con el método original, se efectuaron las siguientes modificaciones: a) hojas recortadas con el 50 por ciento del limbo para facilitar el manejo y poder aumentar el número de ramillas dentro de cada plato de Petri; b) puntas de ramillas sumergidas en algodón húmedo para asegurar disponibilidad de agua y evitar marchitamiento; c) condición ambiental de laboratorio y condiciones controladas (24 C - 27 C, 12 hr luz y 80 por ciento humedad relativa), para establecer diferencias en el desarrollo de la clorosis en ambas condiciones y d) uso de ramillas sumergidas en agua destilada y en agua de llave, en condiciones de laboratorio y de invernadero, por ofrecer este último mejor luminosidad, más aireación y mayor temperatura.

Para probar las modificaciones anteriores se usaron ramillas de la misma edad y se practicó la inoculación, la extracción de la clorofila y las lecturas de la misma forma que en el método original, excepto en la modificación d, en la que se hizo la inoculación encima de la base de la ramilla y tomando observaciones cada 24 horas, durante seis días consecutivos.

3.4 Método de Delgado y Echandi

Se usó el método de Delgado-Echandi modificado (37), utilizando cajas de madera, forradas de polietileno, con agua destilada en el fondo y se efectuó solamente la lectura de peritecios en la madera.

Se realizaron 10 repeticiones, tanto en árboles escogidos al azar, como en todos los árboles de cada clon, utilizando siempre cuatro trocitos de madera por árbol, con sus testigos correspondientes.

3.4.1 Modificaciones del método de Delgado y Echandi

Fue necesario realizar una serie de modificaciones en el método, debido a que las pruebas preliminares dieron resultados variables. Estas fueron: a) se aplicó 0,1 ml de suspensión acuosa del hongo a 5000, 10.000 y 15.000 esporas/ml, ajustando las concentraciones por medio de un hematocímetro. La incubación se realizó en platos de Petri y en cámara con ambiente controlado. El número de peritecios y el porcentaje de área afectada se determinó a 24, 48, 72 y 96 horas de incubación; b) se quitó parte de la corteza hasta una profundidad aproximada de 2 mm en 2/3 de la extensión de la cara externa del trocito de madera. Se inoculó con 0,1 ml de suspensión acuosa de 15,000 esporas/ml. La incubación se realizó en platos de Petri y en ambiente controlado, determinando el número de peritecios y el porcentaje de área afectada al cuarto día de

la inoculación; c) se levantó parte de la corteza hasta la mitad de la cara externa del trocito de madera y de unos 2 mm de profundidad, sin desprender la corteza. El resto se hizo igual que en el caso anterior; d) se hizo un orificio de 2-3 mm de profundidad en el centro de la cara externa del trocito de madera y en un área limpia de nudosidades. La inoculación se hizo en ese orificio con 0,1 ml de la suspensión acuosa del hongo de 15.000 esporas/ml. No se determinó el porcentaje de área afectada en esta prueba.

3.5 Pruebas de reacción realizadas en plantas adultas de un ensayo de campo en la finca "La Lola"

Para esto, se usó la modificación d, del método de Delgado y Echandi, que en la comparación resultó ser la más confiable.

Las muestras se tomaron en cada parcela y en todos los árboles en producción.

El experimento se sembró en 1966, usando un diseño de latice cuadrado simple 6x6, con cuatro repeticiones (2 repeticiones del latice simple). Se incluyeron 36 cultivares, distribuídos en 29 descendencias de cruzamientos, seis clones padres propagados por estacas y un testigo para producción y susceptibilidad a *C. fimbriata*, el híbrido ICS-1xSCA-6.

El propósito original del ensayo fue estudiar la herencia de reacción a *C. fimbriata* en cacao y el estudio de los

efectos de endocría y cruzamientos.

3.5.1 Modelo de análisis utilizado

Para análisis de los resultados de las inoculaciones, se usó una modificación del diseño original, adoptándose un diseño en bloque irrestrictamente al azar con cuatro repeticiones.

El modelo para el análisis de varianza fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = variable de respuesta

μ = media general

T_i = efecto de los tratamientos

B_j = efecto de los bloques

E_{ij} = error experimental

Además del análisis de varianza, se aplicó la prueba de Duncan para medir diferencias del número de peritecios entre cultivares. Finalmente, se hizo un análisis de varianza y la prueba de Duncan del porcentaje de infección natural por C. fimbriata en condiciones de campo.

3.5.2 Lista de cultivares probados en el ensayo de campo en la finca "La Lola"

Clones padres propagados por estacas; resistentes: SPA-9, IMC-67 y Pound-12; intermedio: UF-613; susceptibles: ICS-1 y ICS-45.

Híbridos interclonales: SPA-9 x UF-613, SPA-9 x ICS-1, IMC-67 x Pound-12, IMC-67 x UF-613, IMC-67 x ICS-1, IMC-67 x ICS-45, Pound-12 x ICS-1, Pound-12 x ICS-45, UF-613 x SPA-9, UF-613 x IMC-67, UF-613 x Pound-12, UF-613 x ICS-1, UF-613 x ICS-45, ICS-1 x SPA-9, ICS-1 x IMC-67, ICS-1 x Pound-12, ICS-1 x UF-613, ICS-1 x ICS-1, ICS-1 x ICS-45, ICS-45 x ICS-45.

Híbridos triples: SPA-9 x T_3 BA_6, ICS-1 x T_9 B_1 P_6A_6.

Retrocruzas: IMC-67 x T_3 BA_6, IMC-67 x T_3 BA-21, UF-613 x T_9 B_1 P_6 A_6, ICS-1 x T_3 BA_6.

Los híbridos de alta resistencia T_3 BA_6 y T_9 B_1 P_6 A_6 son plantas obtenidas de los cruces ICS-1 x IMC-67 y Pound-12 x UF-613 respectivamente. La planta híbrida de reacción intermedia T_3 BA-21 se obtuvo del cruce ICS-1 x IMC-67. Con los dos primeros se obtuvieron cruzamientos con otros padres resistentes y susceptibles, produciendose híbridos triples. También se obtuvieron retrocruzas con algunos de los clones padres resistentes o susceptibles.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de *C. fimbriata*

4.1.1 Procedencia e incubación del hongo

Hechos los aislamientos del hongo, a partir del tercer día se observaron las colonias, presentando mayor crecimiento de superficie, las cultivadas en medio PDA+C. Después de una semana, la producción de peritecios maduros fue abundante en todas las colonias y en los medios PDA y PDA+C.

4.1.2 Aislamientos monospóricos

Los cultivos monospóricos resultaron con características morfológicas similares al hongo original.

Con el objeto de hacer comparaciones de patogenicidad entre el hongo inicial y un aislamiento monospórico tomado al azar, se practicaron inoculaciones en cada uno de los seis clones estudiados, usando independientemente los métodos de Ruíz y de Delgado y Echandi.

El Cuadro 1 resume los resultados obtenidos en ambos métodos.

Los valores de t indican que no hay diferencias significativas al nivel de $\alpha = 0,05$ entre los promedios de los cultivos monospóricos y no monospóricos en los métodos de Ruíz y de Delgado y Echandi.

Cuadro 1. Valores de t en inoculaciones realizadas con cultivos monospóricos (C.M.) y no monospóricos (C.N.M.) en clones de cacao, usando los métodos de Ruíz y de Delgado y Echandi.

Clones	Método de Ruíz clorofila destruída (%)		Método de Delgado y Echandi Lectura de peritecios (No.)	
	C.M.	C.N.M.	C.M.	C.N.M.
IMC-67	3,9	3,4	15,8	15,0
SPA-9	3,6	3,5	17,0	14,0
UF-613	6,0	6,2	16,5	17,5
Catongo	6,7	6,3	18,4	19,3
SCA-6	7,9	7,0	19,8	20,4
ICS-1	7,0	7,2	21,3	23,0
$\bar{X}$	5,9	5,6	18,1	18,2
D.S.	1,74	1,70	2,21	3,38
C.V.	29,5	30,4	12,2	13,1
t	0,03		0,05	

4.2 Modificaciones de los métodos de Ruíz y de Delgado y Echandi

4.2.1 Método de Ruíz

En el Cuadro 2 se presentan los porcentajes de clorofila destruída, según lecturas efectuadas en el espectrofotómetro al quinto día de las inoculaciones, realizadas en seis clones y seis observaciones bajo condiciones de laboratorio.

Cuadro 2. Porcentaje de clorofila destruída en seis clones, inoculados durante cinco días en ambiente de laboratorio, utilizando el método desarrollado por Ruíz.

Clon	Porcentaje de clorofila destruída Observaciones						
	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$
IMC-67	0,2	2,4	5,9	6,7	3,6	3,0	3,6
SPA-9	0,3	3,6	1,8	12,6	1,0	0,1	3,2
Catongo	3,0	6,5	11,6	5,5	7,2	8,5	7,1
UF-613	1,8	5,2	6,0	0,7	2,6	13,5	5,0
SCA-6	6,4	9,8	6,0	1,0	4,8	25,3	8,9
ICS-1	6,3	10,2	12,3	5,0	9,6	8,7	8,7

Como puede observarse, hay mucha variabilidad en los resultados de las lecturas de cada observación. Los resultados del análisis estadístico se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Análisis de varianza del porcentaje de clorofila destruída en seis clones inoculados durante cinco días en ambiente de laboratorio.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_0	$F_{0,05}$
Tratamiento	5	185,44	37,09	1,61	2,53
Error	30	690,41	23,01		
Total	35	875,85			

Según el análisis de varianza se concluye que no hubo diferencia significativa en los resultados del porcentaje de clorofila destruída entre clones, ya que el valor de F calculado es menor que el de F tabulado al nivel de $\alpha = 0,05$.

4.2.2 Modificaciones del método de Ruíz

Todos los datos resultaron inconsistentes y variables, llegando en algunos casos a ser imposible la extracción clorofílica, debido a deshidratación del material durante las pruebas. Por esta razón, para las comparaciones de métodos, se tomó en consideración solamente la prueba del método original.

4.2.3 Método de Delgado y Echandi

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de las lecturas realizadas en seis clones y seis observaciones en condiciones de laboratorio.

Cuadro 4. Número de peritecios formados al quinto día de la inoculación en seis clones de cacao, siguiendo el método de Delgado y Echandi.

Clon	Número de Peritecios						
	Observaciones						
	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$
IMC-67	34,0	29,1	32,2	21,3	30,0	31,8	29,7
SPA-9	22,5	31,4	32,9	24,2	26,0	31,0	28,0
Catongo	26,1	32,6	35,5	32,8	22,0	30,8	30,0
UF-613	30,5	39,0	32,6	34,5	22,0	32,0	31,8
SCA-6	32,3	41,3	42,8	30,2	40,0	35,6	37,0
ICS-1	34,8	40,4	40,5	33,4	36,4	34,6	36,7

En estos datos se observa poca variabilidad en los resultados de las lecturas de cada observación. El Cuadro 5 contiene el análisis estadístico.

Cuadro 5. Análisis de varianza para el número de peritecios, hecho en seis clones al cuarto día de la inoculación en ambiente de laboratorio.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_0	$F_{0,05}$
Tratamiento	5	434,22	86,84	3,98	2,53
Error	30	654,16	21,81		
Total	35	1088,38			

De este análisis de varianza anterior se deduce que hubo diferencia significativa al nivel $\alpha = 0,05$ en el promedio de número de peritecios entre clones.

4.2.4 Modificaciones del método de Delgado y Echandi

Las lecturas de peritecios en los mismos seis clones se hicieron con suspensiones de 15.000, 10.000 y 5.000 esporas/ml, incubadas durante cuatro días en platos de Petri. El número de peritecios fue bastante uniforme para cada clon en las tres concentraciones de suspensiones. En las inoculaciones finales del ensayo se usó la suspensión de 15.000 esporas/ml, por ser ésta la concentración original del método. En el Cuadro 6 se presentan los resultados de las lecturas.

Cuadro 6. Número de peritecios en seis clones con distintas suspensiones de esporas incubadas durante cuatro días en platos de Petri.

Clon	Número de esporas/ml		
	15.000	10.000	5.000
IMC-67	15,5	14,3	14,6
SPA-9	17,3	18,3	17,3
UF-613	19,0	18,5	18,3
Catongo	16,0	18,7	17,5
SCA-6	14,8	13,9	16,8
ICS-1	19,3	17,8	18,3
$\bar{X}$	17,0	16,9	17,1

El Cuadro 7 presenta los resultados del análisis estadístico.

Cuadro 7. Análisis de varianza del número de peritecios en seis clones probados con distintas suspensiones de esporas.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_0	$F_{0,05}$
Tratamiento	2	0,15	0,07	0,02	3,68
Error	15	51,21	3,41		
Total	17	51,36			

No hubo diferencia significativa al nivel $\alpha = 0,05$ entre suspensiones de esporas, o sea, se puede seleccionar cualquier tipo de suspensión para realizar las inoculaciones.

En el Cuadro 8, se presenta (en una sola observación), el número de peritecios y el porcentaje de área afectada en tres clones de reacción conocida con suspensiones de 15.000 esporas/ml, incubadas durante cuatro días en platos de Petri. Estos datos revelan un aumento sin tendencias definidas tanto en número de peritecios como en por ciento de área afectada en las determinaciones realizadas a distintos intervalos de tiempo. En las lecturas hechas al cuarto día de la inoculación se observa bastante similitud entre el número de peritecios y el porcentaje de área afectada.

Cuadro 8. Número de peritecios (N.P.) y por ciento de área afectada (A.A.) realizado en tres clones a diferentes intervalos de tiempo, utilizando el método de Delgado y Echandi.

Clon	Horas después de la inoculación							
	24		48		72		96	
	N.P.	% A.A.	N.P.	% A.A.	N.P.	% A.A.	N.P.	% A.A.
SPA-9	0	0	10,6	30,4	17,6	48,9	19,7	78,0
Catongo	0	0	16,8	31,1	18,1	50,0	20,6	77,6
ICS-1	0	0	17,7	60,2	20,8	79,4	21,3	80,3

En el Cuadro 9 se presentan los valores correspondientes al número de peritecios y al porcentaje de área afectada en seis clones y 10 árboles por clon. Estas determinaciones se hicieron al cuarto día de la inoculación, utilizando la modificación a del método de Delgado y Echandi. Estos valores se obtuvieron de las muestras colocadas en cajas de madera.

Se observa todavía en esta modificación a alguna variabilidad en los resultados para el número de peritecios entre los árboles de cada clon y diferenciaciones no definidas entre las áreas afectadas de los distintos clones.

En los Cuadros 10 y 11 se presentan los análisis de varianza para el número de peritecios y porcentaje de área afectada de 10 árboles en los seis clones estudiados.

Cuadro 10. Análisis de varianza del número de peritecios en determinaciones hechas en seis clones al cuarto día de la inoculación, usando la modificación a del método de Delgado y Echandi.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_0	$F_{0,05}$
Tratamiento	5	741,06	148,21	7,31	2,40
Error	51	1034,52	20,28		
Total	56	1775,58			

Cuadro 9. Número de peritecios (N.P.) y porcentaje de área afectada (A.A.) en seis clones y 10 árboles por clon, en determinación realizada al cuarto día de la inoculación siguiendo la modificación a del método de Delgado y Echandi.

Arbol	CLONES											
	IMC-67		SPA-9		UF-613		Catongo		SCA-6		ICS-1	
	N.P.	%A.A.	N.P.	%A.A.	N.P.	%A.A.	N.P.	%A.A.	N.P.	%A.A.	N.P.	%A.A.
1	41,7	88,9	34,0	66,6	25,7	81,7	39,0	14,5	27,0	52,0	39,7	53,1
2	42,7	61,4	27,3	63,6	39,3	91,0	31,3	54,0	30,7	64,7	38,0	48,1
3	41,0	77,2	33,3	69,0	33,0	77,2	33,7	36,5	41,0	66,7	34,0	57,0
4	44,3	75,8	26,7	62,5	38,3	63,1	33,7	54,0	29,3	75,3	28,7	56,9
5	37,3	73,6	31,3	64,2	34,3	84,3	40,0	42,5	39,0	52,7	39,0	63,3
6	42,3	75,8	32,7	56,8	35,3	65,0	35,0	30,5	24,0	23,7	42,3	57,1
7	43,0	64,0	27,3	67,5	27,3	82,9	36,0	52,5	38,0	50,5	39,7	73,2
8	40,0	61,2	30,0	67,4	43,7	89,2	-	-	39,3	36,0	41,7	59,4
9	39,0	63,5	29,0	75,3	36,0	83,5	-	-	38,7	54,0	47,0	70,1
10	34,3	69,3	27,7	71,1	34,0	71,4	-	-	36,3	43,5	44,7	86,3
$\bar{X}$	40,6	71,1	29,9	66,6	34,7	78,9	35,5	40,6	34,3	51,9	39,5	62,5

Del análisis del Cuadro 10 se deduce que hubo diferencia significativa al nivel de $\alpha = 0,05$ en el número de peritecios entre árboles.

Cuadro 11. Análisis de varianza del porcentaje de área afectada en determinaciones hechas en seis clones al cuarto día de la inoculación, usando la modificación a del método de Delgado y Echandi.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_0	$F_{0,05}$
Tratamiento	5	8050,59	1610,12	13,10	2,40
Error	51	6270,31	122,95		
Total	56	14320,90			

El análisis del Cuadro 11 muestra que hubo diferencia significativa al nivel $\alpha = 0,05$, en el porcentaje de área afectada entre árboles. Este porcentaje de área afectada no se considera de utilidad práctica para medir grados de resistencia.

En el Cuadro 12 se presentan los resultados del número de peritecios en tres clones de reacción conocida, usando las modificaciones b, c y d del método de Delgado y Echandi.

Se observa una variabilidad menor entre las observaciones de la modificación d del método, así como también una mejor demarcación para los grados de resistencia.

Cuadro 12. Número de peritecios determinados en tres clones, usando las modificaciones b, c y d del método de Delgado y Echandi.

Modificación del método	CLONES IMC-67	Catongo	ICS-1
	Número de peritecios		
b	6,6	25,8	39,8
	12,2	24,7	29,5
	7,2	20,0	19,0
c	4,8	20,8	27,3
	5,0	25,0	23,2
	4,0	24,0	26,5
d	3,8	12,2	18,3
	4,5	13,5	16,2
	4,5	12,8	17,5

En el Cuadro 13 se presentan los resultados del análisis estadístico.

Cuadro 13. Análisis de varianza del número de peritecios en determinaciones hechas en tres clones al cuarto día de la inoculación, usando las modificaciones b, c y d del método de Delgado y Echandi.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_0	$F_{0,05}$
Tratamiento	2	1649,44	824,72	25,84	3,40
Error	24	766,00	31,92		
Total	26	2415,44			

El análisis del Cuadro 13, muestra que hubo diferencia significativa al nivel $\alpha = 0,05$ en los resultados del número de peritecios entre las modificaciones del método de Delgado y Echandi.

4.2.5 Comparación de eficiencia relativa y selección de métodos

En el Cuadro 14 se presentan los coeficientes de variabilidad en los seis clones en los métodos de Ruíz y de Delgado y Echandi con sus modificaciones.

Con base en la suma de los coeficientes de variación de cada uno de los seis clones, dentro de cada método, se eligió la modificación d del método de Delgado y Echandi, por tener la suma de los coeficientes de variabilidad más bajos; resultando ser en esta forma el método más confiable. Utilizando esa modificación se evaluaron los híbridos y clones en el ensayo de campo de la finca "La Lola".

4.3 Pruebas de reacción realizadas en "La Lola" en híbridos y clones, usando el método modificado d de Delgado y Echandi

El Cuadro 1 del Apéndice presenta las lecturas del número de peritecios en 32 híbridos y clones del ensayo de campo de la finca "La Lola". Se observan las grandes diferencias existentes en el número de peritecios entre algunos cultivares y la variabilidad entre lecturas en las repeticiones en un mismo cultivar.

Cuadro 14. Coeficientes de variabilidad para el porcentaje de clorofila destruída usando el método de Ruíz y para el número de peritecios usando el método de Delgado y Echandi, en pruebas preliminares realizadas con seis clones bajo condiciones de laboratorio en Turrialba.

Método	Media	Desv. Estánd.	Error Estánd.	Coef. Var.
Ruíz (original)				
IMC-67	4,01	5,63	1,05	140,35
SPA-9	3,88	5,73	1,48	147,79
Catongo	4,87	5,32	1,19	109,20
UF-613	5,54	5,50	1,12	99,24
SCA-6	4,49	4,77	1,02	106,27
ICS-1	6,74	8,50	2,27	126,02
Delgado y Echandi (original)				
IMC-67	26,67	7,79	3,18	29,21
SPA-9	27,38	6,78	3,03	24,76
Catongo	30,38	9,21	4,12	30,31
UF-613	32,58	2,78	1,14	8,56
SCA-6	36,17	5,68	2,32	15,71
ICS-1	28,52	12,97	5,80	45,49
a				
IMC-67	33,09	5,69	1,52	17,20
SPA-9	33,25	8,04	2,23	24,19
Catongo	33,15	6,17	1,65	18,61
UF-613	35,97	6,74	1,95	18,73
SCA-6	33,06	5,16	1,43	15,62
ICS-1	38,62	6,95	1,86	18,00
b				
IMC-67	10,05	2,43	0,86	24,18
SPA-9	29,55	4,03	1,65	13,64
Catongo	25,45	6,48	2,29	25,45
UF-613	31,42	5,24	2,14	16,67
SCA-6	27,82	7,00	2,86	25,17
ICS-1	37,74	4,77	1,69	12,65

continúa .....

Cuadro 14 (continuación)

Método	Media	Desv. Estánd.	Error Estánd.	Coef. Var.
c				
IMC-67	10,44	4,25	1,90	40,72
SPA-9	17,67	6,83	3,94	38,63
Catongo	20,64	4,33	1,94	20,99
UF-613	25,00	3,77	2,18	15,10
SCA-6	25,67	4,07	2,35	15,87
ICS-1	33,18	2,12	0,95	6,38
d				
IMC-67	5,82	1,34	0,51	23,03
SPA-9	7,12	1,89	0,94	26,49
Catongo	8,89	1,54	0,58	17,28
UF-613	8,23	1,00	0,50	12,17
SCA-6	22,50	2,27	1,13	10,10
ICS-1	25,47	2,90	1,09	11,36

En el Cuadro 15 se presenta el análisis de varianza y en el Cuadro 16 la prueba de Duncan para los promedios del número de peritecios, en determinaciones realizadas en los 32 híbridos y clones del citado experimento.

Cuadro 15. Análisis de varianza para el número de peritecios, en determinaciones hechas en 32 híbridos y clones de la finca "La Lola", usando la modificación d del método de Delgado y Echandi.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_0	$F_{0,05}$
Repeticiones	3	1019,33	339,78	19,42	2,71
Tratamientos	31	1427,90	46,06	2,63	1,58
Error	93	1626,94	17,49		
Total	127	4074,17			

Cuadro 16. Prueba de Duncan para los promedios de peritecios, realizada en 32 híbridos y clones de la finca "La Lola", usando la modificación d del método de Delgado y Echandi.

Híbridos y clones	Promedios de peritecios
ICS-1 x T_3BA_6	18,25
ICS-1	15,65
UF-613 x ICS-45	15,30
ICS-1 x ICS-45	14,80
Pound-12 x ICS-45	14,03
ICS-45	13,83
ICS-45 x self	13,45
ICS-1 x self	12,13
Pound-12 x ICS-1	11,85
UF-613 x ICS-1	11,73
ICS-1 x $T_9BP_6A_6$	10,13
UF-613 x $T_9BP_6A_6$	10,05
SPA-9 x T_3BA_6	9,60
UF-613 x SPA-9	9,28
SPA-9 x UF-613	9,27
ICS-1 x UF-613	9,20
IMC-67 x ICS-45	8,93
ICS-1 x Pound-12	8,58
IMC-67 x UF-613	8,38
UF-613 x IMC-67	8,25
UF-613 x Pound-12	8,15
ICS-1 x SPA-9	8,13
UF-613	8,00
SPA-9 x ICS-1	7,70
ICS-1 x IMC-67	6,98
SPA-9	6,93
IMC-67 x ICS-1	6,83
IMC-67 x T_3BA_{21}	6,62
IMC-67 x T_3BA_6	6,35
Pound-12	6,03
IMC-67 x Pound-12	5,53
IMC-67	3,90

El análisis de varianza del Cuadro 15, detecta diferencias significativas al nivel $\alpha = 0,05$ para promedio de peritecios por cultivar y por repetición.

La prueba de Duncan con los promedios de peritecios, muestra las diferencias significativas entre tratamientos y permite comparar grupos de cultivares resistentes y susceptibles.

El Cuadro 2 del Apéndice, muestra el porcentaje de árboles muertos por C. fimbriata en condiciones de campo, en 32 híbridos y clones del experimento de la finca "La Lola". Se puede observar que los clones e híbridos con padres "Trinitarios" (ICS-1, ICS-45, ICS-1xICS-45 y otros) presentan los mayores porcentajes de infección natural.

En el Cuadro 17 se presenta el análisis de varianza y en el Cuadro 18 la prueba de Duncan para el porcentaje de infección natural de los híbridos y clones evaluados en el ensayo de campo de la finca "La Lola".

Cuadro 17. Análisis de varianza para el porcentaje de infección natural, en determinaciones hechas en 32 híbridos y clones de la finca "La Lola".

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_0	$F_{0,05}$
Repeticiones	3	2209,43	736,48	3,14	2,71
Tratamientos	31	45586,58	1470,73	6,27	1,58
Error	93	21806,32	234,48		
Total	127	69602,33			

Cuadro 18. Prueba de Duncan para el porcentaje de infección natural, realizada en 32 híbridos y clones en un ensayo de campo de la finca "La Lola".

Híbridos y clones	Porcentaje de infección natural
ICS-1 x ICS-45	67,4
ICS-45	52,8
ICS-1 x self	50,0
UF-613 x ICS-45	48,7
Pound-12 x ICS-45	47,5
ICS-1	41,1
ICS-45 x self	33,3
UF-613 x ICS-1	31,0
ICS-1 x $T_9BP_6A_6$	17,5
SPA-9 x ICS-1	16,9
ICS-1 x Pound-12	16,8
ICS-1 x T_3BA_6	15,1
IMC-67 x Pound-12	15,0
ICS-1 x SPA-9	9,6
IMC-67 x ICS-45	8,6
IMC-67 x UF-613	8,3
Pound-12 x ICS-1	6,8
ICS-1 x UF-613	6,7
UF-613 x Pound-12	5,7
Pound-12	3,6
IMC-67 x ICS-1	3,5
UF-613 x $T_9BP_6A_6$	3,4
IMC-67 x T_3BA_6	3,4
SPA-9 x UF-613	3,3
IMC-67	2,8
UF-613 x IMC-67	1,8
ICS-1 x IMC-67	1,8
SPA-9 x T_3BA_6	1,7
UF-613 x SPA-9	0
IMC-67 x T_3BA_{21}	0
SPA-9	0
UF-613	0

El análisis del Cuadro 17 muestra que hubo diferencias significativas al nivel $\alpha = 0,05$ para el porcentaje de árboles destruídos por C. fimbriata por cultivar y repetición.

La prueba de Duncan muestra diferencias significativas entre tratamientos, mostrando los contrastes entre cultivares resistentes y susceptibles.

4.3.1 Relación entre el porcentaje de infección natural por C. fimbriata y los resultados de inoculaciones artificiales

En el Cuadro 19 se indica la relación entre los porcentajes de mortalidad en condiciones de campo y el número de peritecios en las inoculaciones artificiales hechas en "La Lola" en los mismos cultivares. El coeficiente $r = 0,73$ indica que existe una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de mortalidad y el número de peritecios.

También se incluyen las escalas arbitrarias para los grados de resistencia respecto a la inoculación artificial y al porcentaje de infección natural.

Cuadro 19. Porcentaje de infección natural por C. fimbriata y promedio de peritecios obtenidos de inoculaciones artificiales, en un ensayo de campo de la finca "La Lola".

Cultivar	Infección natural		Infección artificial	
	% de mortalidad	Grado de Resistencia*	Promedio de Peritecios	Grado de Resistencia*
ICS-1xICS-45	67,4	MS	14,8	MS
ICS-45	52,8	MS	13,8	MS
ICS-1xself	50,0	MS	12,1	MS
UF-613xICS-45	48,7	MS	15,3	MS
Pound-12xICS-45	47,5	MS	14,2	MS
ICS-1	41,1	MS	15,7	MS
ICS-45xself	33,3	MS	13,5	MS
UF-631xICS-1	31,0	MS	11,7	MS
ICS-1x$T_9BP_6A_6$	17,5	mS	10,1	S
SPA-9xICS-1	16,9	mS	7,7	R
ICS-1xPound-12	16,8	mS	8,6	S
ICS-1xT_3BA_6	15,1	mS	18,3	MS
IMC-67xPound-12	15,0	mS	5,5	R
ICS-1xSPA-9	9,6	S	8,1	S
IMC-67xICS-45	8,6	S	8,9	S
IMC-67xUF-613	8,3	S	8,4	S
Pound-12xICS-1	6,8	S	11,9	MS
ICS-1xUF-613	6,7	S	9,2	S
UF-613xPound-12	5,7	S	8,1	S
Pound-12	3,6	R	6,0	R
IMC-67xICS-1	3,5	R	6,8	R
UF-613x$T_9BP_6A_6$	3,4	R	10,0	S
IMC-67xT_3BA_6	3,4	R	6,3	R
SPA-9xUF-613	3,3	R	9,3	S
IMC-67	2,8	R	3,9	R
UF-613xIMC-67	1,8	R	8,2	S
ICS-1xIMC-67	1,8	R	7,0	R
SPA-9xT_3BA_6	1,7	R	9,6	S
UF-613xSPA-9	0	R	9,3	S
IMC-67xT_3BA_{21}	0	R	6,6	R
SPA-9	0	R	6,9	R
UF-613	0	R	8,0	R

Coeficiente de correlación r = 0,73

* MS = muy susceptible S = susceptible
mS = más susceptible R = resistente

Escala arbitraria del porcentaje de infección natural (condiciones de campo).

Porcentaje infección	Grados de resistencia
de 0 - 4	Resistente (R)
de 4,1 - 10	Susceptible (S)
de 10,1 - 30	Más susceptible (mS)
más de 30	Muy susceptible (MS)

Escala arbitraria de la inocualación artificial

No. de Peritecios	Grados de resistencia
De 0 - 8	Resistente (R)
de 8,1 - 11	Susceptible (S)
más de 11	Muy susceptible (MS)

5. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que los cultivos monospóricos realizados en una colonia con hongos procedente de un árbol de cacao enfermo, no presentaron variabilidad patogénica en las inoculaciones efectuadas en clones resistentes o susceptibles a la enfermedad. Sin embargo, esto no es concluyente, debido a que aún existen probabilidades de variabilidad genética en la población de C. fimbriata, que ataca las plantaciones de cacao en Turrialba. La existencia de un estado de reproducción sexual asegura la presencia de variabilidad y más aún cuando se han introducido al área clones de reacción diferente que naturalmente han de ejercer presión genética sobre la población del hongo. Los resultados obtenidos en número de peritecios formados después de la inoculación con cultivos monospóricos y multispóricos aseguran que la colonia original se mantuvo con un mínimo de variación genética durante el transcurso de este experimento.

Se observó que el crecimiento de las colonias fue mejor cuando el sustrato contenía cáscara de cacao susceptible; probablemente este componente aporta alguna sustancia de crecimiento, que favorece el mejor desarrollo del hongo.

La aplicación del método de Ruíz (29), primero por extracción con acetona y luego con alcohol etílico, suministra resultados muy similares. Debido a ello y al costo del alcohol etílico, se usó acetona como material extractante. No existe

un método universal de extracción clorofílica que pueda ser representativo para cada clase o grupo de plantas, como tampoco existe un producto ideal para realizar dicha extracción (41). Sin embargo, por medio de este método no fue posible encontrar diferencias entre los cultivares, caso de esto puede ser la desproporción en el porcentaje de clorofila destruída entre las repeticiones y el elevado coeficiente de variabilidad. En las distintas modificaciones que se hicieron a manera de observación, tampoco se detectaron grados de resistencia, lo que induce a catalogar el método de Ruíz como poco confiable, cuando se hacen evaluaciones aún con gran número de repeticiones. Además de elevar el costo de los análisis, el método no se ajusta a objetivos prácticos de tiempo y dinero.

Los resultados preliminares obtenidos en las pruebas efectuadas con el método original de Delgado y Echandi (8), no concuerdan con los de este trabajo. El coeficiente de variabilidad en clones fue menor que en el método de Ruíz y el número de peritecios por cultivar fue casi constante. Esto último no permitió que se detectaran grados de resistencia bien definidos y útiles para la adopción del método. Sin embargo, hubo una mayor uniformidad en cada grupo de análisis dentro de los clones, aún cuando los grados de resistencia no se ajustaran precisamente a los ya conocidos en otras evaluaciones (8, 37).

Fue necesario realizar una serie de modificaciones al método, variando por lo menos un factor en cada una de ellas,

hasta lograr una modificación con el menor coeficiente de variabilidad dentro de los clones y con grados de resistencia bien definidos.

Por ofrecer estas ventajas la modificación d del método de Delgado y Echandi se calificó como el más aceptable. Por considerar innecesario y poco práctico el porcentaje de área afectada, este parámetro no se usó en la modificación. Sin embargo, se especula un paralelismo entre este parámetro y los resultados de las modificaciones b y c del método. Por encajar mejor dentro de los límites de demarcación para los grados de resistencia y por ser el conteo de peritecios una de las variables escogidas en el método dentro de los objetivos del trabajo, se mantuvo el conteo de peritecios maduros al cuarto día, considerando que es el tiempo óptimo para una lectura más confiable (2, 8, 37). Por otra parte, como en la modificación d, la inoculación se hizo entre la corteza y la madera, es posible que el principio fungitóxico se mantenga activo en la corteza y no únicamente en la madera (3, 4).

Es de notarse que en este estudio no se hicieron evaluaciones desde el punto de vista económico entre los métodos en comparación; sin embargo, el costo estimado, la cantidad de materiales y el tiempo para probar ambos métodos son mayores en el usado por Ruíz, que en el utilizado por Delgado y Echandi (8, 29).

Los resultados de la inoculación artificial realizada

en "La Lola", siguiendo el método modificado de Delgado y Echandi, acusan diferencias significativas entre cultivares. El análisis estadístico para el número de peritecios revela que hay grados de reacción bien definidos, como se observa en la prueba de Duncan al separar grupos de cultivares resistentes y susceptibles. Hay que tomar en consideración que el número de árboles muestreados por cultivar no fue constante en todas las repeticiones del ensayo de campo, además de ser muy variables los resultados de árbol a árbol, lo que hace suponer esto sea un factor responsable de la variabilidad en la delimitación de los grados de resistencia.

En este trabajo se evaluaron los clones de acuerdo con inoculaciones artificiales realizadas en ambiente de laboratorio y a la vez se efectuaron evaluaciones de árboles destruídos por la enfermedad en condiciones de campo. Esto último confiere más confianza en el método por existir una correlación positiva y significativa ($r = 0,73$) entre este parámetro y el resultado de las inoculaciones artificiales. Las diferencias existentes en los distintos grados de evaluación, podrían deberse al trabajo rápido de inoculación artificial bajo ciertas condiciones y a la muerte progresiva de los árboles atacados por la enfermedad en condiciones de campo.

Las escalas arbitrarias se hicieron basadas principalmente en las demarcaciones aproximadas de los resultados de las pruebas de Duncan. El número de peritecios por cultivar

permite delimitar estos en resistentes, susceptibles y muy susceptibles.

Siguiendo la escala arbitraria y con un número de peritecios de 0 a 8,0 en las lecturas realizadas, se catalogan como resistentes los siguientes cultivares: IMC-67, IMC-67xPound-12, Pound-12, IMC-67xT_3BA_6, IMC-67 x T_3BA_{21}, IMC-67 x ICS-1, SPA-9, ICS-1 x IMC-67, SPA-9 x ICS-1 y UF-613.

Con un número de peritecios por cultivar de 8,1 a 11,0, pueden ubicarse como susceptibles los siguientes cultivares: ICS-1 x SPA-9, UF-613 x Pound-12, UF-613 x IMC-67, IMC-67 x UF-613, ICS-1 x Pound-12, IMC-67 x ICS-45, ICS-1 x UF-613, SPA-9 x UF-613, UF-613 x SPA-9, SPA-9 x T_3BA_6, UF-613 x $T_9BP_6A_6$, ICS-1 x $T_9BP_6A_6$.

Por último, con un número de peritecios mayor de 11,0 se pueden catalogar como muy susceptibles los siguientes cultivares: ICS-1 x T_3BA_6, ICS-1 Est., UF-613 x ICS-45, ICS-1 x ICS-45, Pound-12 x ICS-45, ICS-45 Est., ICS-45 x self, ICS-1 x self, Pound-12 x ICS-1 y UF-613 x ICS-1.

Algunos clones padres resultaron resistentes y/o susceptibles; los híbridos de cruces entre resistentes y susceptibles y entre susceptibles dieron progenies resistentes y susceptibles. Esto hace suponer que los grados de resistencia en las inoculaciones artificiales pueden ofrecer variación entre clones, dependiendo de la época del año y además por ser posiblemente la resistencia de tipo recesivo y de herencia compleja (37).

Los clones amazónicos y algunos trinitarios evaluados por otros autores (2, 8, 19, 37) siguiendo el método de Delgado y Echandi con algunas modificaciones, acusan una similitud estrecha con los resultados de este trabajo, lo que confiere mayor confiabilidad y estabilidad al método.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los dos métodos de laboratorio para evaluar grados de resistencia a C. fimbriata en cacao, utilizados en este trabajo, el método de Delgado y Echandi resultó ser más eficiente que el método de Ruíz. Se hicieron modificaciones al método de Delgado y Echandi, y una de ellas resultó ser la más confiable y apropiada para realizar la evaluación.

Se encontró una correlación positiva y significativa entre la resistencia a la infección natural y los resultados de inoculaciones artificiales, realizada en la finca "La Lola" con el método modificado de Delgado y Echandi, lo que demuestra que dicho método es apropiado para evaluar grados de resistencia.

Se hacen las recomendaciones siguientes:

1. Analizar los resultados de estas pruebas de reacción para determinar el mecanismo de la herencia de la resistencia a C. fimbriata en cacao.
2. Usar para futuros programas de fitomejoramiento y replantación los cultivares catalogados como resistentes en la prueba artificial realizada en la finca "La Lola".
3. Investigar la relación existente entre la formación de peritecios y la reacción a la infección por C. fimbriata en cacao.

7. RESUMEN

Se hizo una comparación entre dos métodos previamente publicados para evaluación de grados de resistencia del cacao a Ceratocystis fimbriata (causa del "mal de machete") con el propósito de seleccionar el método más confiable.

En uno de los métodos (Delgado y Echandi) se usan secciones de ramas laterales y se dividen longitudinalmente. La parte interna de los mismos se inoculan con 0,1 ml de una suspensión acuosa de esporas de C. fimbriata (15.000/ml), realizando las lecturas de peritecios al cuarto día de la inoculación. El otro método (Ruíz) utiliza ramillas de cacao que tengan un par de hojas aparentemente sanas, las cuales se inoculan con una porción de cultivo del hongo, en una pequeña incisión practicada cerca de la base de la ramilla. Después de cinco días, se evalúa el grado de clorosis desarrollada en las hojas infectadas, midiéndose la cantidad de clorofila destruída por medio de un espectrofotómetro.

Usando ambos métodos con seis clones de cacao de reacción conocida a C. fimbriata en el campo (2 resistentes, 2 intermedios y 2 susceptibles), se determinó que el método de Delgado y Echandi produjo significativamente menor variabilidad en los resultados que el método de Ruíz. Se examinaron modificaciones del método de Delgado y Echandi en un intento por reducir aún más la variabilidad en los resultados. La lectura del número de peritecios cuatro días después de la inoculación, produjo resultados más uniformes que los obtenidos después de una

incubación de 1, 2 y 3 días. El uso de diferentes concentraciones de suspensiones de 5.000, 10.000 y 15.000 esporas/ml, no produjo diferencias significativas entre suspensiones de esporas. Sin embargo, se obtuvieron resultados significativamente diferentes cuando se inocularon secciones de trocitos de madera en la parte externa (corteza) con 0,1 ml de suspensión de esporas (15.000/ml) sobre un orificio hecho en la corteza con una aguja estéril de disección a una profundidad aproximada de 2 mm.

Esta modificación del método de Delgado y Echandi se adoptó para evaluar la reacción a C. fimbriata de 32 híbridos y clones de la finca "La Lola". Los resultados obtenidos se compararon con los datos de infección en condiciones de campo dentro del mismo grupo de híbridos y clones. La alta correlación (r = 0,73) entre la infección natural y los resultados de la inoculación artificial muestra que el método rápido de evaluación es confiable y apropiado para medir grados de resistencia del cacao a C. fimbriata. Se desarrolló una escala arbitraria que permitió distinguir las reacciones entre cultivares resistentes y susceptibles.

Por medio de este método, se establecieron como resistentes los siguientes cultivares de cacao: IMC-67, Pound-12, SPA-9, UF-613, IMC-67 x Pound-12, IMC-67 x T_3BA_6, IMC-67 x T_3BA_{21}, IMC-67 x ICS-1, ICS-1 x IMC-67 y SPA-9 x ICS-1.

7a. SUMMARY

Comparison was made between two previously published preliminary test methods for screening cacao for resistance to *Ceratocystis fimbriata*, the cause of sudden death or *Ceratocystis* wilt of cacao with a view to selecting the most reliable.

In one method (Delgado and Echandi) short stem-sections are split open longitudinally and the exposed wood surface inoculated with 0.1 ml of *C. fimbriata* ascospore suspension (15,000/ml), resistance being assessed by recording the number of perithecia to develop after four days. The other method (Ruíz) utilizes detached cacao twigs bearing two leaves which are inoculated by placing a mycelium-agar disc from *C. fimbriata* cultures in a small incision near the base of the twig. After five days, the degree of chlorosis developing in the infected leaves is evaluated by measuring the amount of chlorophyll degradation by means of a spectrophotometer.

Using both methods with six cacao clones of known response to *C. fimbriata* in the field (2 resistant, 2 intermediate, 2 susceptible) it was determined that Delgado and Echandi's method produced significantly less variability in results than with Ruiz's method. Modifications of Delgado and Echandi's method were examined in an attempt to reduce variability still further. Recording number of perithecia four days after inoculation produced more uniform results than recording after 1, 2 or 3 days. The use of different ascospore suspension

concentrations of 5,000; 10,000; and 15,000/ml yielded no significant differences. Similarly, measuring the area of discolored, infected wood arising from inoculations provided no advantage over counting the number of perithecia that develop. However, significantly improved results were obtained when stem-sections were inoculated on the reserve (bark) side by depositing 0.1 ml of ascospore suspension (15,000/ml) in a minute hole made in the bark to a depth of 2 mm by means of a sterile dissecting needle.

This modification of Delgado and Echandi's method was adopted to screen 32 cacao clones and hybrids at the "La Lola" cacao farm for their response to C. fimbriata infection. Results so obtained were compared with data of natural infection by C. fimbriata within the same group of clones and hybrids. A high correlation between natural infection and results from artificial inoculations was shown (r = 0.73), indicating that the rapid screening method developed here was sufficiently reliable and suitable for testing cacao for resistance to C. fimbriata. An arbitrary scale was devised to help distinguish resistant and susceptible reactions.

By means of this method the following cacao material was established as resistant: IMC-67, Pound-12, SPA-9, UF-613, IMC-67 x Pound-12, IMC-67 x T_3BA_6, IMC-67 x T_3BA_{21}, IMC-67 x ICS-1, ICS-1 x IMC-67 and SPA-9 x ICS-1.

8. LITERATURA CITADA

1. BARTLEY, B. G. Disease resistant studies. Ceratocystis fimbriata. In Annual Report on Cacao Research. Imperial College of Tropical Agriculture, University of the West Indies, 1965. pp. 21-23.

2. CAPRILES DE REYES, L. Una prueba de evaluación de cultivares de cacao al hongo Ceratocystis fimbriata. Cacao (Venezuela). Boletín Informativo. Ministerio de Agricultura y Cría, 1966. pp. 2-7.

3. _____, SCHULZ, E. y MUÑOZ, A. El contenido del ácido clorogénico en diferentes variedades de cacao y su relación con la resistencia contra el hongo Ceratocystis fimbriata. Agronomía Tropical (Venezuela) 16(4):273-284. 1966.

4. _____. Contenido de polifenoles en dos variedades de Theobroma cacao L. y su relación con la resistencia a Ceratocystis fimbriata. Agronomía Tropical (Venezuela) 18(3):339-355.

5. CEVALLOS, A. Reacción de las progenies híbridas de cacao (Theobroma cacao L.) y de sus clones padres a Ceratostomella fimbriata Ellis y Halsted, por medio de inoculaciones artificiales. Tesis Ing. Agr. Quito, Ecuador, Facultad de Ingeniería Agronómica y Medicina Veterinaria, Universidad Central. 1962. 104 p. (mimeografiada).

6. CHONG GOMEZ, L. Desarrollo de la infección y naturaleza de la resistencia clonal a Ceratostomella fimbriata. Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Ecuador, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad de Guayaquil, 1961. 120 p.

7. DELGADO, J. C. Estudio de la resistencia del cacao al "mal de machete": producida por Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted. Tesis Mag.Agr. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1964. 42 p.

8. _____ y ECHANDI, E. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al "mal de machete" provocado por Ceratocystis fimbriata. Turrialba (Costa Rica) 15(4):286-289. 1965.

9. DESROSIERS, R. Diferenciación entre variedades de cacao con base a su susceptibilidad a la infección con Ceratostomella fimbriata (E. and H.) Elliot, en el Ecuador. Turrialba,(Costa Rica) 6(3):48-52. 1956.

10. _____. El problema de la Ceratostomella en el Ecuador. In Conferencia Interamericana de Cacao, 7, Palmira, Colombia, 1958. Bogotá, Colombia. Ministerio de Agricultura, División de Investigaciones Agropecuarias. pp. 67-70.

11. _____ y DIAZ, J. Enfermedades del cacao y su control. Ministerio de Economía. Servicio Cooperativo Interamericano de Agricultura. Boletín de Extensión no. 1. Quito, Ecuador, 1956. pp. 13-15.

12. DOMINGUEZ R., P. F. Avances del trabajo sobre selección de plantas de cacao (Theobroma cacao L.) por resistencia al hongo Ceratocystis fimbriata . Revista Facultad Agronomía VI(2):5-29. 1971.

13. ECHANDI, E. y FERNANDEZ, C. E. Relación entre el contenido de ácido clorogénico y la resistencia a la llaga macana o cáncer de los cafetos causado por Ceratocystis fimbriata. Turrialba (Costa Rica) 12(2):87-90. 1962.

14. ESPINOZA M., A. Nuevas contribuciones al estudio de la resistencia del cacao al "mal de machete" causado por Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted. Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Ecuador, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad de Guayaquil, 1968. 82 p.

15. _____. y DELGADO, J. C. Factores intrínsecos que influyen en la eficiencia de la prueba de laboratorio usada para evaluar la resistencia a Ceratocystis fimbriata en cacao. Turrialba (Costa Rica) 21(1):13-17. 1971.

16. GOBERDHAN, L. The present situation of Ceratostomella disease of cacao in Trinidad. Caribbean Comm. Publ. Exchange Service. Cocoa no. 89. 1959. 4 p.

17. HARDY, F., ed. Manual de Cacao. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica, 1961. pp. 265-269.

18. HAVORD, G. Problemas esenciales en las investigaciones en cultivos perennes. In Seminario sobre diseños estadísticos y técnicas experimentales con cultivos perennes. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1962. Doc. 4, Temma II. 6 p.

19. HUNT, J. Taxonomy of the genus Ceratocystis. Lloydia 19(1):1-58. 1956.

20. IDROBO M., S. El complejo Xyleborus-Ceratostomella en Colombia. In Conferencia Interamericana de Cacao, 7, Palmira, Colombia, 1958. Bogotá, Colombia, Ministerio de Agricultura, División de Investigaciones Agropecuarias. pp. 73-79.

21. ITON, E. F. Studies on a wilt disease of cacao at River Estate. II. Some aspects of wind transmission. A Report on Cacao Research, 1959-60, Trinidad. 1961. pp. 47-58.

22. KNOKE, J. K. Report on an entomological study trip to Venezuela in connection with the Xyleborus-Ceratocystis complex of cacao. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1966. 13 p.

23. MALAGUTI, G. Ceratostomella fimbriata en el cacao de Venezuela. Acta Científica Venezolana. Vol. 3(3): 94-97. 1952.

24. _____. La necrosis del tronco del cacao en Venezuela. Agronomía Tropical (Venezuela) 5(4):207-226. 1956.

25. _____ y DIAZ C., H. Observaciones sobre las enfermedades del cacao en Venezuela. In Conferencia Interamericana de Cacao, 7, Palmira, Colombia, 1958. Bogotá, Colombia, Ministerio de Agricultura, División de Investigaciones Agropecuarias. pp. 163-164.

26. NAUNDORF, G., IDROBO, S. y SANCLEMENTE, M. Transmisión y diseminación del Ophiostoma fimbriata causante de la pudrición azul en el cacao. Cacao en Colombia 5:29-33. 1956.

27. _____, IDROBO, S. y SANCLEMENTE, M. Contribución a la lucha contra Ophiostoma fimbriata. Cacao en Colombia 5:41-45. 1956.

28. ORELLANA, R. G. Cacao diseases in Mexico, Nicaragua, Costa Rica y Jamaica. FAO Plant Protection Bulletin 4(3):35-37. 1955.

29. RUIZ Z., M. Mecanismo y método de evaluación de la resistencia del cacao a Ceratocystis fimbriata. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1967. 35 p.

30. SAUNDERS, J. L. Scolytidae and platypodidae associated with Ceratocystis wilt of Theobroma cacao L. in Costa Rica. Ph.D. Thesis. Madison, University of Wisconsin, 1963. 67 p.

31. _____. El complejo Xyleborus-Ceratocystis de Cacao. Cacao (Costa Rica) 10(2):8-14. 1965.

32. SCHIEBER, E. y SOSA, O. N. Cacao canker in Guatemala incited by Ceratocystis fimbriata. Plant Disease Reporter 44(8):672. 1960.

33. SILLER, L. R. La Ceratostomella fimbriata en el cacao en Centroamérica. In Conferencia Interamericana de Cacao, 7, Palmira, Colombia, 1958. Bogotá, Colombia, Ministerio de Agricultura, División de Investigaciones Agropecuarias. pp. 95-96.

34. SMALL, L. W. A technique for Ceratocystis screening. In Annual Report on Cacao Research. Imperial College of Tropical Agriculture, University of the West Indies, 1965. pp. 51-54.

35. SORIA, J. Notas sobre los cacaos nativos en las inmediaciones de Iquitos (Perú) y en el alto Beni (Bolivia). Cacao (Costa Rica) 10(4):16-18. 1965.

36. _____. Influencia de la edad de las plantas en la aparición de los síntomas de susceptibilidad a Ceratocystis fimbriata en cacao. Turrialba (Costa Rica) 23(2):231-233. 1973.

37. _____ y SALAZAR, G. Pruebas preliminares de resistencia a Ceratocystis fimbriata en clones e híbridos de cacao. Turrialba (Costa Rica) 15(4):290-295. 1965.

38. STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics. New York, McGraw-Hill, 1960. 481 p.

39. SUAREZ, C. y RODRIGUEZ, M. Logros en la investigación sobre Ceratocystis fimbriata en cacao. In Reunión Internacional sobre Enfermedades de Cacao, Guayaquil, Ecuador, 1973. 8 p. (mimeografiado).

40. TOSI Jr., J. A. Mapa ecológico de Costa Rica, según la clasificación de Zonas de Vida de L. R. Holdridge. San José, Costa Rica, Centro Científico Tropical, 1969. Escala: 1:750.000. Color.

41. VERNON, L. D. y SEELY, G. R. The chlorophylls. New York and London, Academic Press, 1966. pp. 21-66.

42. WEBSTER, R. K. y BUTLER, E. E. A morphological and biological concept of the species Ceratocystis fimbriata. Canadian Journal of Botany 45(9): 1457-1468. 1967.

9. A P E N D I C E

Cuadro 1. Número de peritecios en lecturas realizadas con inoculaciones artificiales en 32 híbridos y clones en un ensayo de campo de la finca "La Lola", usando la modificación d del método de Delgado y Echandi.

Cultivares	Número de Peritecios Repeticiones I	II	III	IV	Σ	$\bar{X}$
1 SPA-9xICS-1	14,30	10,00	4,40	2,10	30,79	7,69
2 SPA-9xUF-613	1,30	14,20	17,20	4,40	37,09	9,27
3 IMC-67xPound-12	4,20	11,60	3,50	2,80	22,10	5,52
4 IMC-67xICS-45	8,10	9,00	13,50	5,10	35,70	8,92
5 IMC-67xICS-1	3,30	12,30	10,40	1,30	27,30	6,82
6 IMC-67xUF-613	10,00	11,30	4,50	7,70	33,50	8,37
7 Pound-12xICS-45	9,00	17,00	11,20	18,90	56,10	14,02
8 Pound-12xICS-1	9,20	13,00	9,90	15,30	47,40	11,85
9 ICS-45xself	6,70	19,40	10,60	17,10	53,80	13,45
10 ICS-1xSPA-9	8,90	15,70	5,30	2,60	32,50	8,12
11 ICS-1xIMC-67	4,90	11,90	2,60	8,50	27,90	6,97
12 ICS-1xPound-12	5,20	15,00	9,40	4,70	34,30	8,57
13 ICS-1xICS-45	15,30	24,50	12,10	7,30	59,20	14,80
14 ICS-1xself	10,70	23,00	5,30	9,50	48,50	12,12
15 ICS-1xUF-613	4,70	12,20	4,30	15,60	36,80	9,20
16 UF-613xSPA-9	3,50	14,30	13,70	5,60	37,10	9,27
17 UF-613xIMC-67	7,00	12,80	2,10	11,10	33,00	8,25
18 UF-613xPound-12	6,80	18,20	6,30	1,30	32,59	8,14
19 UF-613xICS-45	7,00	26,60	9,00	18,60	61,20	15,30
20 UF-613xICS-1	13,70	13,30	11,80	8,10	46,90	11,72
21 SPA-9xT_3BA_6	11,80	14,90	5,20	6,50	38,40	9,60
22 IMC-67xT_3BA_6	7,60	8,10	4,30	5,40	25,39	6,34
23 IMC-67xT_3BA_{21}	3,50	16,20	6,40	0,40	26,49	6,62
24 ICS-1xT_3BA_6	13,70	30,00	12,20	17,10	73,00	18,25
25 ICS-1x$T_9BP_6A_6$	5,50	19,20	11,70	4,10	40,50	10,12
26 UF-613x$T_9BP_6A_6$	8,70	7,80	12,50	11,20	40,20	10,05
27 SPA-9	5,90	10,00	5,40	6,40	27,70	6,92
28 IMC-67	2,00	3,90	5,80	3,90	15,60	3,90
29 Pound-12	4,30	6,40	7,40	6,00	24,10	6,02
30 UF-613	7,30	8,10	5,50	11,10	32,00	8,00
31 ICS-1	17,30	22,80	16,40	6,10	62,60	15,65
32 ICS-45	12,70	17,10	11,70	13,80	55,30	13,82
MEDIA DE REPET	7,94	14,68	8,48	8,11		

Cuadro 2. Porcentaje de árboles destruídos por el hongo C. fimbriata en 32 híbridos y clones en un ensayo de campo de la finca "La Lola".

Cultivares	Porcentaje de árboles muertos Repeticiones I	II	III	IV	Σ	$\bar{X}$
1 SPA-9xICS-1	13,30	20,00	7,70	26,70	67,69	16,92
2 SPA-9xUF-613	0,00	13,30	0,00	0,00	13,30	3,32
3 IMC-67xPound-12	20,00	25,00	0,00	15,30	60,30	15,07
4 IMC-67xICS-45	7,10	0,00	20,00	7,10	34,20	8,55
5 IMC-67xICS-1	7,10	6,70	0,00	0,00	13,80	3,45
6 IMC-67xUF-613	20,00	0,00	0,00	13,30	33,30	8,32
7 Pound-12xICS-45	11,10	73,30	45,50	60,00	189,89	47,47
8 Pound-12xICS-1	7,10	6,70	13,30	0,00	27,10	6,77
9 ICS-45xself	53,30	0,00	0,00	80,00	133,30	33,32
10 ICS-1xSPA-9	0,00	0,00	18,20	20,00	38,20	9,55
11 ICS-1xIMC-67	0,00	0,00	0,00	7,10	7,10	1,77
12 ICS-1xPound-12	7,10	26,70	13,30	20,00	67,10	16,77
13 ICS-1xICS-45	53,30	92,30	57,10	66,70	269,40	67,35
14 ICS-1xself	53,30	60,00	20,00	66,70	200,00	50,00
15 ICS-1xUF-613	0,00	13,30	0,00	13,30	26,60	6,65
16 UF-613xSPA-9	0.00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17 UF-613xIMC-67	0,00	0,00	0,00	7,10	7,10	1,77
18 UF-613xPound-12	14,30	8,30	0,00	0,00	22,60	5,65
19 UF-613xICS-45	57,10	73,30	0,00	64,30	194,70	48,67
20 UF-613xICS-1	21,40	33,30	42,90	26,70	124,30	31,07
21 SPA-9xT_3BA_6	0,00	0,00	0,00	6,70	6,70	1,67
22 IMC-67xT_3BA_6	6,70	0,00	0,00	6,70	13,40	3,35
23 IMC-67xT_3BA_{21}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24 ICS-1xT_3BA_6	6,70	33,30	13,30	7,10	60,40	15,10
25 ICS-1x$T_9BP_6A_6$	0,00	10,00	33,30	26,70	70,00	17,50
26 UF-613x$T_9BP_6A_6$	0,00	0,00	6,70	6,70	13,40	3,35
27 SPA-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28 IMC-67	11,10	0,00	0,00	0.00	11,10	2,77
29 Pound-12	14,30	0,00	0,00	0,00	14,30	3,57
30 UF-613	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31 ICS-1	20,00	37,50	26,70	80,00	164,20	41,05
32 ICS-45	66,70	0,00	44,40	100,00	211,10	52,77
MEDIA DE REPET	14,71	16,65	11,32	22,75		