

ESTUDIOS SOBRE EL CONTROL DE LA  
"ANTRACNOSIS FOLIAR" (Colletotrichum  
gloeosporioides Penz.) EN  
SEMILLEROS DE CACAO

Por  
Luis <sup>✓</sup>Aguirre Villacís

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas  
Turrialba, Costa Rica  
Marzo de 1956

ESTUDIOS SOBRE EL CONTROL DE LA  
"ANTRACNOSIS FOLIAR" (Colletotrichum  
gloeosporioides Penz.) EN  
SEMILLEROS DE CACAO

Tesis

Sometida al Consejo de Estudios Graduados  
como requisito parcial para optar el grado  
de

Magister Agriculturae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

APROBADO:

Frederick Wellman Consejero

[Signature] Comité

Lucy Hastings de Gutiérrez Comité

Marzo de 1956

A mi madre

### AGRADECIMIENTOS

El autor deja constancia de su agradecimiento al Dr. Rodrigo G. Orellana, bajo cuya dirección se realizó el presente trabajo.

A los Drs. Frederick L. Wellman, Pierre Sylvain y Sra. Lucy Hasting de Gutiérrez, miembros de su comité, por la ayuda prestada.

A la International Cooperation Administration por haber patrocinado sus estudios y trabajo de tesis en el Instituto.

Al Centro Interamericano del Cacao, que permitió la finalización de este trabajo.

A las Srtas. Angelina Martínez y Noël C. James por su intervención en la revisión de literatura.

A sus colegas y miembros del personal del Instituto y de la Finca Experimental de Cacao "La Lola", por el estímulo y cooperación de ellos recibida.

### BIOGRAFIA DEL AUTOR

Luis Aguirre Villacís nació en Guayaquil, Ecuador. Sus estudios primarios y secundarios los hizo en su ciudad natal, habiéndose graduado de Bachiller en Ciencias Biológicas en 1946.

Sus estudios universitarios los realizó en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Guayaquil, donde obtuvo su título de Ingeniero Agrónomo en 1954.

En noviembre del mismo año ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas en calidad de estudiante posgraduado, en goce de una beca de la International Cooperation Administration, habiendo concluido sus estudios y trabajos de tesis en marzo de 1956.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
BIOGRAFIA DEL AUTOR .....	ii
TABLA DE CONTENIDO .....	iii
INTRODUCCION .....	1
REVISION DE LITERATURA .....	3
SINTOMAS DE LA ENFERMEDAD .....	6
MATERIALES Y METODOS .....	11
Métodos de aislamiento .....	11
Medios de cultivo usados .....	12
Método para determinar la patogenicidad del organismo aislado.....	15
Métodos de inoculación artificial .....	15
Ensayos de fungicidas .....	16
Ensayo de cubiertas .....	17
Registro de los factores climáticos .....	18
Prueba de selecciones clonales .....	20
Ensayo de condiciones nutritivas .....	20
Estimación de la incidencia de la "Antracnosis foliar" en los ensayos de control efectuados.....	24
Diseños experimentales .....	25
RESULTADOS EXPERIMENTALES .....	32
Identificación del organismo aislado.....	32
Patogenicidad del organismo aislado .....	37
Efecto de los fungicidas y de las cubiertas protectoras en el control de la "Antracnosis foliar"....	39

	Página
Variación de los factores climáticos registrados...	47
Efecto de la aplicación de Nitrógeno en las plantas y comportamiento de las selecciones clonales de cacao ante la incidencia de la "Antracnosis foliar" .....	49
DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	54
RESUMEN .....	61
SUMMARY .....	63
LITERATURA CITADA .....	64

## INTRODUCCION

Una de las molestias más generalizadas de los viveros de cacao es la defoliación y la muerte de las plantitas jóvenes, ya sean éstas propagadas por semillas o por estacas (13, 16, 21).

Entre las enfermedades que pueden provocar daños como los ya mencionados, existe la conocida con el nombre de "Antracnosis foliar", reportada en casi todos los países en donde se cultiva cacao (15, 26, 27, 33).

La importancia económica de esta enfermedad estriba principalmente en las pérdidas ocasionadas por la muerte de las plantitas y, además, las que han podido sobrevivir a la infección se debilitan afectando su desarrollo normal (13) y siendo portadores del patógeno que perjudicará posteriormente a los nuevos brotes (27), retardando el transplante.

El agente causal de la "Antracnosis foliar", un hongo del género Colletotrichum, cuando se asocia con otros organismos infecciosos bajo determinadas condiciones funcionales y ambientales, formando un complejo patogénico, causa en las plantitas de cacao la "muerte descendente" (die-back) que tiene síntomas muy parecidos a la observada en el café (11, 28).

El daño más severo que ocasiona este hongo, cuando actúa independientemente, se le denomina "punta desnuda" (bare-tip) (15, 32), por el aspecto que presentan las plantitas después de su defoliación .

La Antracnosis de las plantitas de cacao, no solamente afecta al sistema foliar, sino que también compromete tallos, ramas, brotes, estípulas y en árboles adultos se presenta, además, en los frutos

pudiendo destruir los cotiledones (15).

Este trabajo se limita a estudiar la infección en las hojas de las plantitas de semillero, teniendo como objetivo final encontrar el medio de control más adecuado, hasta donde sea posible.

Los puntos principales que se cumplen dentro de este estudio son los siguientes:

- a) Determinar la acción de algunos fungicidas para el combate de la enfermedad.
- b) Determinar la acción del medio ambiente modificado, en la incidencia de la enfermedad con el objeto de lograr su control.
- c) Determinar el efecto de varios niveles de nitrógeno sobre la incidencia de la enfermedad y
- d) Determinar el grado de susceptibilidad o resistencia al ataque de la enfermedad de algunas selecciones clonales de cacao.

## REVISION DE LITERATURA

Dentro de la escasa literatura que existe sobre el control de la "Antracnosis foliar" de los semilleros de cacao, se encuentra que en los trabajos publicados de 1938 a 1940, por Mejía (18), Garcés (9) y Obando (20), coinciden al recomendar las aspersiones con Caldo Bordelés como medida de control de esta enfermedad. Posteriormente, Sánchez (27) indicó que no existen experiencias que confirmen esta recomendación.

Newhall (19), en 1948, sugiere usar los mismos métodos para controlar la "pudrición negra" (Phytophthora) de las mazorcas de cacao: poda, aspersión y fertilización. Agrega, además, que pruebas efectuadas con fungicidas (compuestos a base de cobre y orgánicos) sobre germinación de esporas en portaobjetos, no han dado hasta esa fecha, datos que merezcan considerarse.

Los trabajos realizados por Vivero (31) en 1950, concluyeron que una especie de Colletotrichum era uno de los agentes principales de la marchitez y caída de las hojas en almacigales de cacao y deduce por experiencias realizadas que el uso del Caldo Bordelés (5-5-50) por lo menos cada mes, es el control más eficaz y económico. Cree además que el valor práctico de sus ensayos se encuentra en la posibilidad de usar este fungicida en el campo como método preventivo de muchas enfermedades que ocasionan la muerte de las plantitas en sus primeras edades. Este autor indica, también, que utilizando plantas de cacao bajo un 50% de sombra se consiguió mejor desarrollo con menos incidencia de enfermedades que con 25% de sombra, y sin sombra. Todos estos trabajos se hicieron considerando la infección causada por Colletotrichum y Phytophthora separadamente, indicándose que los datos estadísticos no

fueron significativos.

En 1951, Leibovit (15) en su trabajo sobre la Antracnosis de los semilleros de cacao, hizo estudios preliminares sobre el control de esta enfermedad y dice que el tratamiento de las semillas con Fermate (2 gramos por litro de agua) redujo notablemente la infección, haciendo posible que las atomizaciones de las plantitas con fungicidas sean solo necesarias cuando éstas han iniciado la primera emisión de hojas.

Burchardt (3), 1952, dice que tapizando con hojas de plátano el suelo sobre el cual se colocan los arbolitos (vivero) se disminuye el ataque de Colletotrichum, pues se evita las salpicaduras por el impacto de las gotas de lluvia, previniendo el transporte de las esporas del suelo a las hojas, ya que en períodos lluviosos el ataque es mayor. Este mismo autor considera que con aspersiones de Zerlate (340 gramos en 50 galones de agua) puede controlarse la infección.

Desrosiers y von Buchwald (5), en 1952, encontraron que el Colletotrichum disminuye la formación de callos y la iniciación del enraizamiento en la propagación vegetativa del cacao y ellos sugieren que se puede controlar esta molestia, sumergiendo las estacas, después de cortadas, en mezclas acuosas de fungicidas.

Sánchez (27), en 1953, da las siguientes medidas de control: a) Selección de estacas destinadas a la reproducción vegetativa, para evitar que originen clones enfermos. c) Regulación del sombrero, mediante podas, distancias de siembra y renovación. Además informa que el clon S.C.P. N° 2 se muestra resistente a la Antracnosis.

En los trabajos de Idrobo (13) realizados en 1954, se recomienda el uso del Dithane Z-78 en dosis de 163 gramos por cada 100 litros de

agua, como protección contra la "Antracnosis foliar" del cacao e insiste en la selección del material sano para la propagación.

En 1954, Wellman (32) al hablar de la Antracnosis del cacao, menciona que vigorizando los árboles con la adición de fertilizantes y mantillo a los suelos, que no contienen material orgánico abundante, se reduce la enfermedad. También refiere que pulverizaciones con fungicidas cúpricos pueden combatir la Antracnosis.

En los trabajos efectuados por Lellis (16) en 1954, se utilizaron varios tratamientos de coberturas en los semilleros de cacao para controlar la Antracnosis. El encontró que los tratamientos que consistieron en cubrir durante el día las parcelas fueron estadísticamente significativos, explicando que este efecto talvés se deba a la reducción de la infección por diversos factores climáticos que se alteraron con este sistema de control.

Nada se ha dicho específicamente sobre la posibilidad de considerar el estado nutritivo de la plantita de cacao de semilleros en la incidencia de la "Antracnosis foliar". Muchos son los experimentos que se han realizado sobre este punto, pero utilizando otros cultivos y en forma general se dice que el estado nutritivo de las plantas tiene una íntima relación con la incidencia de las enfermedades.

Con respecto a la resistencia de las variedades clonales de cacao a la "Antracnosis foliar", sólo se encontró el trabajo de Sánchez (27), ya mencionado.

### SINTOMAS DE LA ENFERMEDAD

Tanto Leibovit (15) como Lellis (16) al hacer estudios, independientemente, sobre una enfermedad de las plantitas de semilleros de cacao, en Costa Rica, constataron que se trataba de una Antracnosis y que el agente responsable de aquélla era una especie de Colletotrichum.

Los síntomas observados por el autor del presente estudio coinciden en su mayor parte con los descritos por Leibovit y Lellis, en los trabajos ya citados. La enfermedad se caracteriza por lesiones necróticas en las hojas que varían en tamaño, desde pequeñísimas manchas hasta lesiones de 2 a 5 mm de diámetro, las cuales se presentan generalmente en forma circular u oblongas que al unirse ~~entre~~ entre ellas abarcan superficies extensas de la lámina de la hoja adquiriendo, entonces, una forma irregular.

Por lo general la lesión se inicia como una puntuación clorótica, localizada en el haz de la hoja y en el tejido mesofílico intervenal, que luego al necrosarse toma una coloración café obscura o negra, pero siempre prevaleciendo una aureola amarillenta (Figura 1). En muchos casos la lesión se observa en el borde de la hoja provocando una distorsión de la lámina foliar (Figura 2). Con respecto a la situación de las lesiones cuando se inician hay una discrepancia con lo que señala Idrobo (13) y Sánchez (27) pues estos autores describen las manchas iniciándose en las nervaduras principales o secundarias tanto en el haz como en el envez, característica de las lesiones causadas por el Phytophthora palmivora Butl. en hojas de cacao de acuerdo a observaciones del autor del presente trabajo.

Cuando la infección se ha generalizado provocando la defoliación



**Fig. 1.** Lesiones causadas por *C. gloeosporioides*, en hojas de cacao.

**Fig. 2.** Distorsión de la lámina foliar provocada por lesiones localizadas en el borde de la hoja.



de la plantita se presenta finalmente el estado llamado "bare-tip" o "punta desnuda", porque al caer todas las hojas queda al descubierto el tallo presentando una proliferación de las yemas axilares que se atrofian agrupándose alrededor y a lo largo de la porción terminal del tallo, sin que se produzca una nueva emisión de hojas (Figura 3).

Este mismo organismo asociado con otros patógenos puede provocar el "die-back" que consiste en una muerte progresiva de la planta en sentido de arriba hacia abajo, conservando, por lo general, las hojas muertas pendientes de sus peciolas hasta que se haya necrosado totalmente la planta (Figura 4).

En cuanto a la posición sistemática del organismo causal de la "Antracnosis foliar" existe desacuerdo, pues algunos autores tales como Sánchez (27) e Idrobo (13), entre otros, lo identifican como Colletotrichum theobromicolum Delacroix, en cambio Leibovit (15) cree que se trata de una raza específica del cacao que él denomina Colletotrichum gloeosporioides Penz. cacao strain.

Tomando en cuenta la diversidad de criterios que existe con respecto a la sistemática del agente causal de la "Antracnosis foliar" de los semilleros de cacao, en este estudio se adoptará la actitud tomada por Small, citado por Roger (26), ante este problema y que dice lo siguiente:

"Las especies de Colletotrichum incarnatum Zimm., C. theobromicolum Delacr., C. camelliae Masee, C. nigrum Ell. et Halts., C. caricae Stev. et Hall., C. coffeanum Noack son muy difícil de distinguirse por medio de sus características culturales y es necesario incluir estas especies dentro de una sola a la cual se denominaría Colletotrichum gloeosporioides



Fig. 3. "Bare tip" causado por C. gloesporioides en plantitas de cacao.



Fig. 4. Plantita de cacao con "Die back" provocado por el C. gloesporioides asociado con otros factores.

Esta denominación sería preferible por la similitud existente con las fructificaciones de la forma perfecta Glomerella cingulata (Ston.) Spaul. et Schr. Por lo tanto algunas de estas especies sólo serían variedades de la especie tipo".

En consecuencia la denominación que se usa en este estudio es la de Colletotrichum gloeosporioides Penz.

## MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se llevó a efecto en el invernadero y laboratorios del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas en Turrialba y en la Finca Experimental de Cacao "La Lola", de esta misma Institución, en Madre de Dios, Costa Rica.

### Métodos de aislamiento

Siguiendo la técnica aconsejada por Raggi (24) se tomaron pequeños pedazos de 5 mm<sup>2</sup> de hojas de plantitas de cacao con síntomas de Antracnosis, los cuales se sumergieron en alcohol de 90° por 10 segundos aproximadamente y luego en HgCl<sub>2</sub> al 1/1000 por un tiempo más largo que el anterior, lavándose finalmente en agua destilada y esterilizada para después sembrarlos, inmediatamente, en cajas de Petri con el medio de cultivo elegido. Al mismo tiempo se tomaron trozos de estos tejidos enfermos y se hicieron siembras sin previa desinfección, siguiendo el método de Riker y Riker (25). Los cultivos que se hicieron con trozos de hojas enfermas y que se desinfectaron previamente, dieron lugar a crecimientos de un solo tipo de hongo, no sucediendo esto con aquellos que se realizaron con pedazos de hojas sin desinfección previa, los cuales permitieron el establecimiento de otros organismos.

Se seleccionó aquellas cajas de Petri que contenían, aparentemente, una sola clase de crecimiento y se efectuaron aislamientos de los mismos en tubos de ensayo. Posteriormente se hizo una observación al microscopio de los organismos que crecieron en los tubos y se desecharon aquellos que no presentaban las características del Colletotrichum descrito como patógeno de la "Antracnosis foliar" de las plantitas de cacao, según Leibovit (15).

Se procedió a realizar aislamientos monospóricos del hongo seleccionado para lo cual se usó la técnica descrita por Keitt (14) que consistió en hacer una suspensión de esporas con agua destilada y esterilizada en el tubo con el cultivo elegido. Se efectuaron de éste, diluciones sucesivas y se tomó de la más débil una gota que se transfirió a una caja de Petri de 60 mm de diámetro conteniendo un medio transparente. Se localizaron l-s esporas con el lente de bajo poder del microscopio, manteniendo la caja de Petri invertida y se señaló con un punto de tinta el lugar exacto en que se encontraba cada espora. Después se transfirió a tubos de ensayo, con una aguja estéril la pequeña porción de medio que rodeaba la espora señalada, la que fué cortada con un sacabocado esterilizado.

Con estos aislamientos monospóricos se cumplieron los postulados de Koch comprobándose que el organismo en estudio era el agente causal de la "Antracnosis foliar" de los semilleros de cacao. A partir de estos cultivos monospóricos se realizaron posteriormente numerosas re-  
siembras, obteniéndose material para las infecciones artificiales requeridas en los experimentos subsiguientes.

#### Medios de cultivo usados

El medio de cultivo que se usó para aislar el Colletotrichum gloeosporioides Penz. de hojas infectadas y para los reaislamientos sucesivos fué Papa Dextrosa Agar con la adición de 3 gotas de ácido láctico diluido al 25% en agua destilada y esterilizada. La fórmula y técnica es muy similar a la indicada por Verna & Herrero (30):

Papas cortadas	200 grs.
Dextrosa	10 "
Agar	17 "
Agua	1000 cc

Los cultivos monospóricos se efectuaron en un medio sólido transparente para lo cual se usó Bacto-Agar purificado (Difco): 15 gramos en 1000 cc de agua bidestilada. El medio aún caliente se filtró en algodón y papel filtro sucesivamente, esterilizándolo después de entubado.

En las pruebas que se hicieron para determinar cuál era el medio de cultivo líquido más útil para obtener un abundante crecimiento del hongo, en el menor tiempo posible, se usaron los que a continuación se describen:

a. Medio de Vainicas (Phaseolus sp.)

Vainicas	100 grs.
Agua	1000 cc

Lavadas las vainicas tiernas, se picaron y se cocinaron por 2 horas en la cantidad de agua señalada. Se decantó y se filtró por algodón y papel filtro sucesivamente. Finalmente se entubó y esterilizó a 15 libras de presión por 20 minutos.

b. Medio de Crotalaria (Crotalaria anagyroides)

Crotalaria	100 grs.
Agua	1000 cc

Se procedió como en el caso anterior.

c. Medio de naranja (1:4)

Jugo de naranjas	200 cc
Agua destilada	800 cc

Se filtró en algodón y se colocó en los recipientes elegidos, ajustando el pH hasta 5-6, con ácido láctico al 25%. Se esterilizó a 15 libras de presión por 20 minutos.

d. Medio corteza de naranja.

Corteza de naranja	300 grs.
Agua	1000 cc

Se dejó hervir hasta que se consumió la mitad del agua empleada. Se decantó y se filtró en algodón. Se usó 100 cc de este extracto por cada 900 cc de agua destilada. Luego se repartió el medio en tubos de ensayo y se esterilizó en el autoclave a 15 libras de presión por 20 minutos, teniendo finalmente un pH 6.2-6.6.

Se efectuaron pruebas de desarrollo del organismo aislado para lo cual se midió el crecimiento radial y se determinó el peso seco del micelio en diferentes medios. Para determinar el crecimiento radial se utilizaron los siguientes medios sólidos:

Papa Agar, en una proporción de 200 y 17 gramos respectivamente.

Agar agua, preparado según la fórmula descrita anteriormente usada para los cultivos monospóricos.

Se probó el efecto de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento del C. gloeosporioides. Se utilizaron medios a base de Agar Papa en la proporción usada en los ensayos anteriores con la adición de 10 gramos de Maltosa, Sorbitol, Sucrosa, Lactosa y Dextrosa para cada litro de medio.

Usando un medio básico de Papa Dextrosa Agar y utilizando HCl N/1 y NaOH N/1 se consiguieron pH de 3, 4, 5, 6, 7 y 8 para probar el efecto de la concentración de iones hidrógeno en el desarrollo del Colletotrichum en observación. El pH se corrigió con papel colorimétrico.

Se probó también el efecto de diferentes vitaminas en el desarrollo del hongo, para lo cual se utilizó como medio basal la preparación siguiente, según la fórmula de Orellana (22):

Dextrosa	25	grs.
Caseina hidrolizada	2	"
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5	"
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	"
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.12	"
Fe+++ (Sulfato)	0.2	"
Zn++ "	0.2	"
Mn++ "	0.2	"
Agua destilada c.s.p.	1	litro

A cada 200 cc de este medio basal se agregaron 20 microgramos de las siguientes vitaminas: Tiamina, Inositol, Riboflavina y Acido Ascórbico. Una porción se dejó sin adicionarle vitaminas y se usó como testigo.

#### Método para determinar la patogenicidad del organismo aislado

Las pruebas se realizaron utilizando plantas de semilleros de cacao de mes y medio de edad.

Del organismo aislado de las lesiones necróticas de las hojas con síntomas de Antracnosis se efectuaron cultivos monospóricos que fueron usados en las inoculaciones, las que se llevaron a cabo con una bomba de atomización portátil de baja presión, rociando la suspensión de esporas sobre el haz de las hojas.

Para medir la intensidad patogénica del organismo en prueba se calculó un índice de infección según una modificación hecha a la fórmula que da MacKinney (17):

$$\text{Índice de infección} = \frac{\text{Número de hojas enfermas}}{\text{Número total de hojas}} \times 100$$

#### Métodos de inoculación artificial

Las inoculaciones artificiales se efectuaron siguiendo dos métodos diferentes. Para los dos casos se preparó inicialmente un caldo muy

fino del hongo cultivado en medio líquido. Con la ayuda de una mezcladora \*, se disgregó la masa de micelio la que se diluyó en una proporción de 2 partes de agua por 1 del caldo concentrado. La concentración por  $\text{cm}^3$  de esporas fluctuó entre 3 y 4 millones, contadas con un Hemacytómetro de Neubauer. Esta suspensión fué repartida ~~sobre~~ las plantas mediante una bomba de atomización de baja presión, tipo portátil, marca Signa (Firenze) de 3 galones de capacidad. Para cada planta, con un promedio de 4 hojas cada una, se usó más ó menos 7 cc de suspensión.

La otra técnica de inoculación fué la de impregnar con caldo concentrado, una torunda de algodón y repartir uniformemente el inóculo sobre las hojas. En este caso la concentración de esporas por  $\text{cm}^3$  aumentó considerablemente, comparada con la del caso anterior.

Las inoculaciones se realizaron en horas de buena luminosidad, prefiriendo estas condiciones por conocer el hábito del C. gloeosporioides que se caracteriza por un abundante y rápido desarrollo en buenas condiciones de luz.

#### Ensayos de fungicidas

Con el objeto de encontrar un posible control de la "Antracnosis foliar" de los semilleros de cacao se probó el efecto de tres fungicidas que según la literatura consultada ( 9, 13, 15, 18, 20, 31) indicaban haber dado resultados promisorios en el control de esta enfermedad.

Los fungicidas en estudio fueron : Caldo Bordelés, Fermate y Dithane Z-78, que se probaron con y sin adherente en dos ensayos distintos.

---

\* Osterizer

Se usaron las siguientes concentraciones:

- a. Caldo Bordelés (4-4-50). Se usó la misma concentración para los dos ensayos y las dosis para dos galones de preparado fueron las siguientes:

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	72.6	grs.
Ca(OH) <sub>2</sub>	72.6	"
Agua	2	galones

- b. Fermate<sup>\*</sup> (0.7 y 0.5 %)

Para cada dos galones de agua se usó 54 y 38.5 grs. de Fermate que corresponden a las concentraciones del 0.7 y 0.5 % respectivamente.

- c. Dithane Z-78<sup>\*\*</sup> (0.7 y 0.5 %)

Las mismas dosis del Fermate

- d. Este tratamiento correspondió al testigo, en el cual no se usó fungicidas.

Los fungicidas fueron aplicados calculando el tiempo necesario para que éstos se secaran (2 a 3 horas antes de realizar la inoculación artificial).

El adherente que se usó fué PEPS<sup>\*\*\*</sup>, elegido por su buen comportamiento bajo condiciones tropicales (4) (10). La dosis fué de una pinta de adherente por cada 100 galones de agua.

Los fungicidas se atomizaron con una bomba portátil de baja presión del mismo tipo usado en las inoculaciones artificiales.

#### Ensayo de cubiertas

Al iniciarse la siembra se cubrieron los semilleros con tela de

---

\* 70% Dimethyl dithiocarbamato férrico  
\*\* 65% Etileno-bisditiocarbamato de zinc  
\*\*\* 56% de Polisulfuro polietilénico

yute colocada a una altura de 30 ctms. Después de la emisión de las primeras hojas se alzó esta cubierta a 80 ctms. la que permaneció así hasta el momento de empezar los tratamientos que se realizaron 37 días después de la siembra.

Los tratamientos de este ensayo consistieron en cubiertas móviles e individuales para cada parcela. Cada una de ellas consistía de una armazón de madera liviana de 80 cms. de altura por 1.60 m de largo y 1.40 m. de ancho, con su parte superior completamente cubierta de tela de yute (Figura 5 y 6).

Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Parcelas cubiertas 24 horas sin interrupción, que en lo sucesivo se denominó : Tratamiento Día y Noche (DN).
2. Parcelas descubiertas 24 horas continuamente. A este tratamiento se le llamó: Descubierta (O).
3. Parcelas cubiertas desde las 6 a.m. hasta las 6 p.m., denominado : Tratamiento Día (D).
4. Parcelas cubiertas desde las 6 p.m. hasta las 6 a.m., llamado : Tratamiento Noche (N).

Estos tratamientos duraron 37 días hasta el momento de la inoculación artificial, luego se continuaron por 11 días más después de inoculadas las plantitas, fecha en que se realizaron las observaciones finales.

#### Registro de los factores climáticos

En el ensayo de control de la "Antracnosis foliar" de los semilleros de cacao por medio de cubiertas, se tomaron lecturas del medio ambiente y del microclima prevalente bajo las cubiertas.



**Fig. 5. Ensayo de cubiertas protectoras para el control de la "Antracnosis foliar".**



**Fig. 6. Detalle de una cubierta.**

Los datos climáticos del medio ambiente fueron tomados de los registros de la estación metereológica existente en la Finca Experimental "La Lola", lugar del ensayo.

Los factores climáticos de las parcelas bajo cubierta constante, se tomaron con la ayuda de un Higrotermógrafo, Modelo 596 de la Friez Instrument Division, U.S.A.; (Figura 7); la temperatura del suelo de los semilleros a 4 pulgadas de profundidad, se registró con un termómetro destinado para estos usos, de la casa Precision T & I.Co. Phila. (Figura 8). Las intensidades de luz se midieron en foot-candles con un Fotómetro Modelo 614 de la Weston Electrical Instrument Corp., U.S.A.

Durante 54 días que duró el experimento, se tomaron 3 lecturas diarias de todos los factores climáticos tanto del microclima como del macroclima. Estas lecturas se hicieron a las 7 a.m., a las 12 m y a las 6 p.m.

#### Pruebas de selecciones clonales

Con el objeto de conocer el comportamiento de varias selecciones clonales de cacao ante la incidencia del C. gloeosporioides se utilizaron plantitas de semillas de los siguientes clones:

1. Clon UFCo 650
2. Clon UFCo 667
3. Clon UFCo 221
4. Clon UFCo 613
5. Clon UFCo 667
6. Semillas de cacao corriente tipo Forastero Trinitario morado

Para este ensayo se utilizaron plantitas de 4 meses de edad, cultivadas en invernadero.

#### Ensayo de condiciones nutritivas

Se estudió la posible influencia del estado nutricional de la planta



**Fig. 7.** Higrotermógrafo bajo cubierta, para el registro del microclima.



**Fig. 8.** Termómetro usado para el registro de la temperatura del suelo de los semilleros.

sobre la patogenicidad del C. gloeosporioides, probando únicamente la acción del elemento Nitrógeno. Para el efecto, se prepararon soluciones nutritivas completas en las que se hizo variar la cantidad de Nitrógeno, aplicado en forma de Urea  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ . En la preparación de las soluciones se utilizó la fórmula de Hoagland (12), siguiendo las tablas preparadas expresamente por Alvim (2), con ligeras modificaciones.

Los productos químicos para la preparación de las soluciones madres fueron los que se indican en la tabla siguiente:

Tabla 1. Cantidades de compuestos químicos para la preparación de soluciones madres.

Número	Compuesto	Concentración	Grs. por litro
I	Urea $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	1 M	60.06
II	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 M	246.49
III	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 M	147.03
IV	$\text{K}_2\text{SO}_4$	0.5 M	87.12
V	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 M	136.09
VI	"Quelado" de Fe 10 %		100
VII	Microelementos:		
	$\text{MnCl}_2$		1.81
	$\text{H}_3\text{BO}_3$		2.86
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.22
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.08
	$\text{H}_2\text{MoO}_4$		0.09

Se calculó la cantidad de  $\text{cm}^3$  de cada una de las soluciones madres para preparar 3 litros de solución nutritiva en la que se hizo variar solamente el nivel de nitrógeno, los que se aplicaron a cada una de las cajas que contenían 6 kgs. de aserrín.

Los tratamientos de niveles de nitrógeno fueron 4 con las siguientes concentraciones: 0 (usado como testigo); 22.5; 45.0 y 67.5 cc de solución madre por cada 3 litros de agua, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidades en  $\text{cm}^3$  de cada una de las soluciones madres para preparar 3 litros de las diferentes soluciones nutrientes.

Exp. Nitrógeno	I	II	III	IV	V	VI	VII
Nivel 1.	0	6	12	15	3	3	3
Nivel 2.	22.5	6	12	15	3	3	3
Nivel 3.	45.0	6	12	15	3	3	3
Nivel 4.	67.5	6	12	15	3	3	3

Con la ayuda de un tubo largo de vidrio adaptado a los recipientes de las soluciones se las repartió uniformemente a razón de 1 litro por caja, una vez por semana. Durante el tiempo que duró el experimento se agregó además agua suficiente para mantener la humedad del medio enraizante, repartida proporcionalmente en los bloques y en períodos iguales.

A los 2 meses de sembradas las plantitas se suprimieron los cotiledones para privarlas de sus reservas alimenticias y 60 días después se dió comienzo a los tratamientos.

Se esperó un tiempo igual al anterior antes de efectuar la inoculación

artificial con C. gloeosporioides, haciendo la lectura final de la incidencia de este patógeno 22 días más tarde.

La razón por la que se esperó el tiempo señalado después de la última aplicación hasta la inoculación fué para dar lugar a que los elementos nutritivos, incorporados al suelo, hubiesen sido totalmente asimilados por la planta y que manifestasen su presencia en las hojas, órganos elegidos para las inoculaciones.

Se hicieron análisis químicos para determinar la cantidad de nitrógeno total en las hojas, antes y después de los tratamientos.

Todos estos análisis se hicieron por medio de un "Micro-Kjeldahl". Las muestras fueron sacadas a 40°C. en un horno con corriente de aire, por espacio de 72 horas y luego se pulverizaron. El error experimental aceptado para estos análisis fué del 2%.

Las muestras que se tomaron fueron de hojas de edad intermedia entre tiernas y maduras, por ser este estado el que promete dar una indicación más representativa del metabolismo del nitrógeno en la planta.

#### Estimación de la incidencia de la "Antracnosis foliar" en los ensayos de control efectuados

Al estimar la incidencia de la enfermedad en estudio, se calculó un Índice de Infección, expresado en porcentaje, utilizando la fórmula que da MacKinney (17):

$$\text{Índice de Infección} = \frac{\text{Suma de todos los grados numéricos} \times 100}{\text{Total de hojas contadas} \times 3}$$

Para esta fórmula se confeccionó una Escala de Infección que en algunos casos especiales sufrió ligeras modificaciones, en cuanto a amplitud se refiere:

- 0 = Hojas sanas (sin manchas)
- 0.75 = ligeramente afectadas (2 a 12 manchas)
- 1 = afectadas (13 a 22 manchas y pocas zonas necróticas)
- 2 = muy afectadas (numerosas manchas y 1/3 de la hoja necrosada)
- 3 = severamente afectadas o muertas (numerosas manchas y 2/3 ó más de la hoja necrosada)

En la Figura 9, se representa esquemáticamente las condiciones que se asumieron para preparar la escala.

#### Diseños Experimentales

Usando un diseño experimental de bloques completos al azar en parcelas subdivididas, se ensayó el control del C. gloeosporioides con fungicidas y coberturas simultáneamente.

Cada bloque estaba formado por 4 parcelas que a su vez se subdividieron en 4 subparcelas, correspondiendo a los tratamientos de cubiertas las primeras y a tratamientos de fungicidas las segundas. Se randomizaron los tratamientos para parcelas y subparcelas independientemente, en cada bloque. Se hizo 5 repeticiones de todos los tratamientos.

El ensayo se realizó en 2 eras de 17 metros de largo por 1.20 m. de ancho cada una y se distribuyeron los tratamientos de acuerdo al esquema que se presenta en la Figura 10.

Se usó un promedio de 16 plantas para cada subparcela, sembradas a una distancia de 15 x 20 cmts.

Las eras fueron construídas con una base de tierra removida de 15 cmts. de altura sobre la cual se puso una capa de aserrín de 5 cmts. de espesor. La separación entre eras fué de 1.90 m.

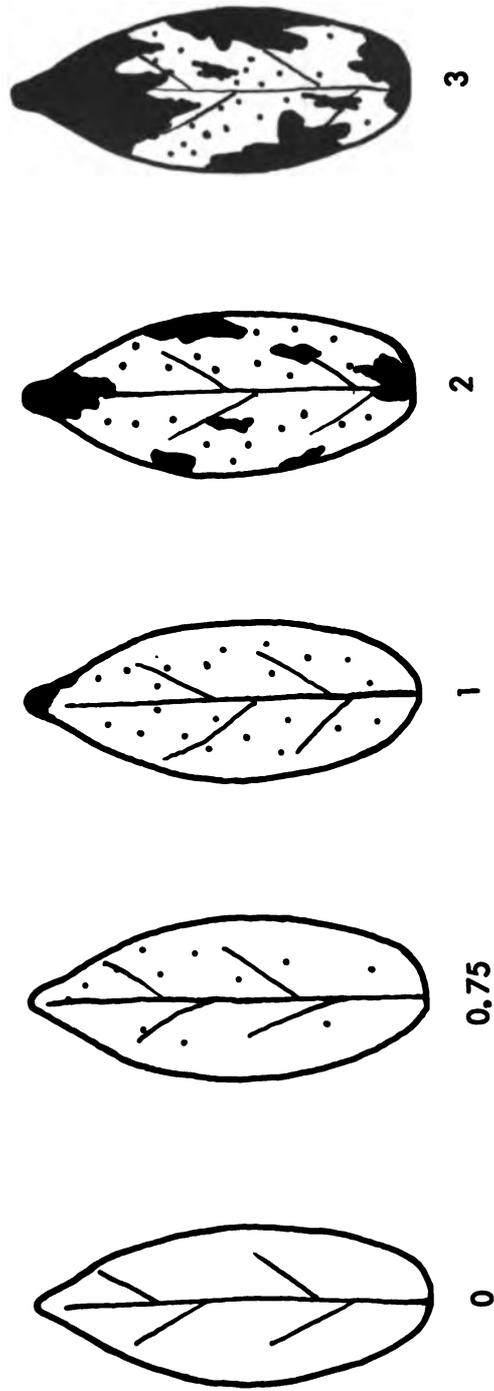


Fig. 9. Representación esquemática de los grados de infección en hojas de cacao, para estimar la incidencia de la "Antracnosis foliar".  
0 = sanas; 0.75 = ligeramente afectadas;  
1 = afectadas; 2 = muy afectadas; 3 = severamente afectadas o muertas.

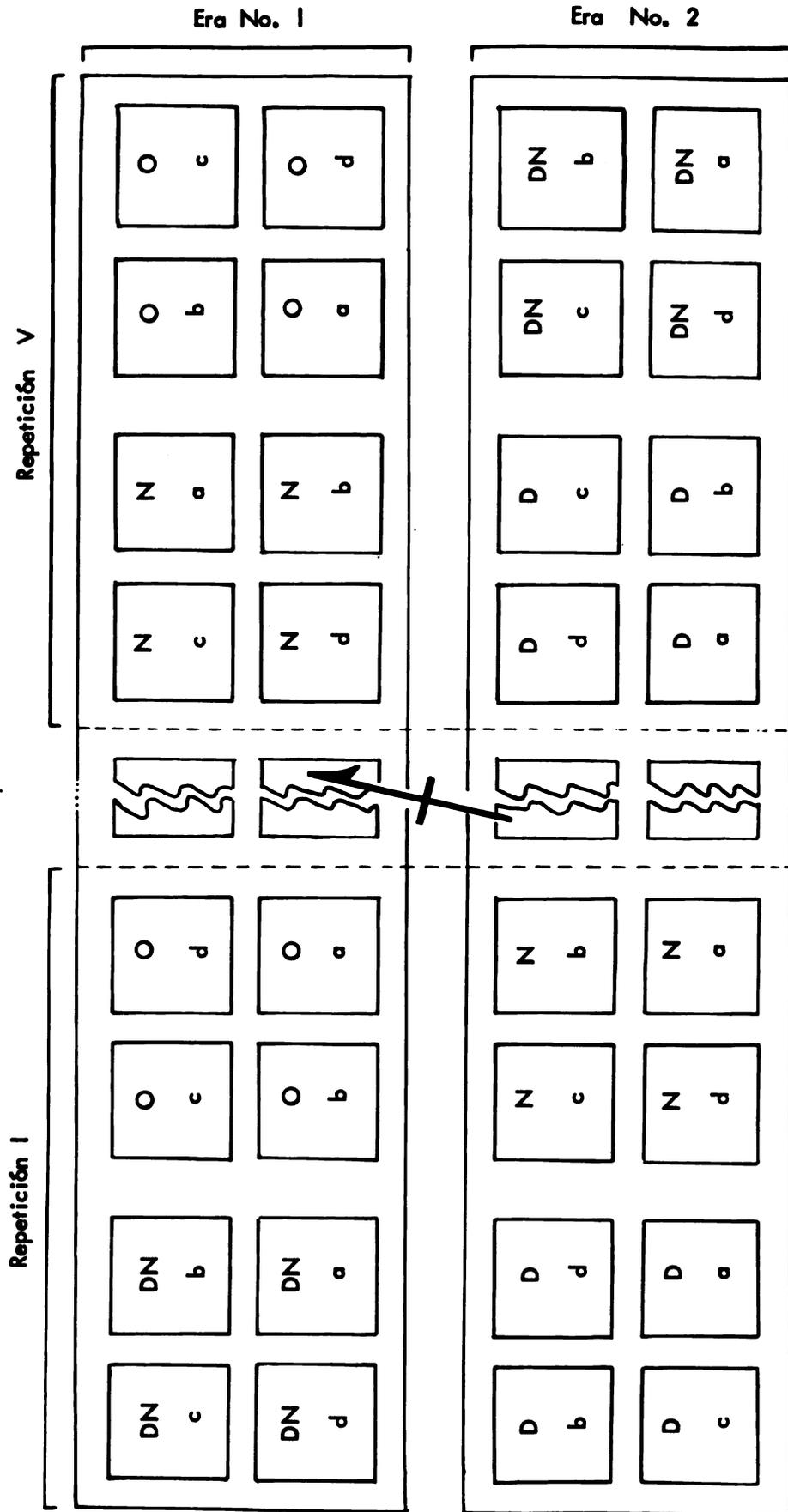


Fig. 10. Esquema de las repeticiones del experimento en que se usaron cubiertas y fungicidas para el control de la "Antracnosis foliar". DN, O, D y N = tratamientos cubiertas. a, b, c, y d = tratamientos fungicidas.

En el momento de aplicar los fungicidas se usaron dos láminas metálicas para aislar la subparcela en tratamiento y evitar así la salpicadura de las otras, con el fungicida.

Para tratar de dilucidar la acción de los fungicidas sobre la incidencia del C. gloeosporioides se hizo un nuevo experimento con fungicidas usando también un adherente (PEPS).

El diseño experimental fué el de bloques completos al azar con 6 repeticiones y el total de tratamientos fueron 8:

- B = Caldo Bordelés
- F = Fermate
- D = Dithane
- T = Testigo (sin fungicida ni adherente)
- BA = Caldo Bordelés + Adherente
- FA = Fermate + Adherente
- DA = Dithane + Adherente
- A = Adherente solo

En este ensayo se utilizaron las mismas eras y distancias de siembra de los experimentos anteriores (Figuras 11 y 12).

Se usó también planchas metálicas para separar las parcelas en el momento de aplicar los tratamientos.

Finalmente el ensayo de condiciones nutritivas y la prueba de selecciones clonales de cacao para estudiar la incidencia del C. gloeosporioides y su posible control se hizo en un sólo diseño experimental que consistió en un arreglo de bloques completos al azar en parcelas subdivididas. Cada bloque estaba compuesto de 4 parcelas que correspondían a tratamientos de nitrógeno y a la vez se subdividieron cada



**Fig. 11. Ensayo con fungicidas para el control del C. gloesporioides.**



**Fig. 12. Semilleros de ca-  
cao usados para  
los ensayos de  
control de la "An-  
tracnosis foliar".**

una de éstas, en 6 subparcelas correspondientes a selecciones clonales. Se hicieron 4 repeticiones del experimento y se usaron 96 plantitas de cacao por repetición, correspondiendo 4 para subparcelas, 6 para parcelas y 24 para bloques (Figura 13). Se distribuyeron al azar los tratamientos de nitrógeno para cada bloque y también se randomizó las selecciones clonales dentro de cada parcela. Este experimento se efectuó en parte bajo condiciones de invernadero, con techumbre de material plástico de color verde\* que permite pasar alrededor de un 35% de la intensidad de la luz solar. Once días después de la inoculación artificial se expusieron las plantitas a la intemperie, por un tiempo igual al anterior, para lograr una mayor incidencia de la enfermedad.

Se usaron, para cada parcela, cajas de hierro galvanizado de 0.67 m. de largo, 0.37 m. de ancho y 0.12 m. de altura, cuyo interior estaba impermeabilizado con pintura. A nivel de la base de las cajas se practicó un orificio para facilitar el drenaje.

La cantidad de material usado como medio enraizante fué de 6 kgs. para cada caja, siendo este material aserrín de madera descompuesto y usado anteriormente en semilleros de cacao.

---

\* Resolite

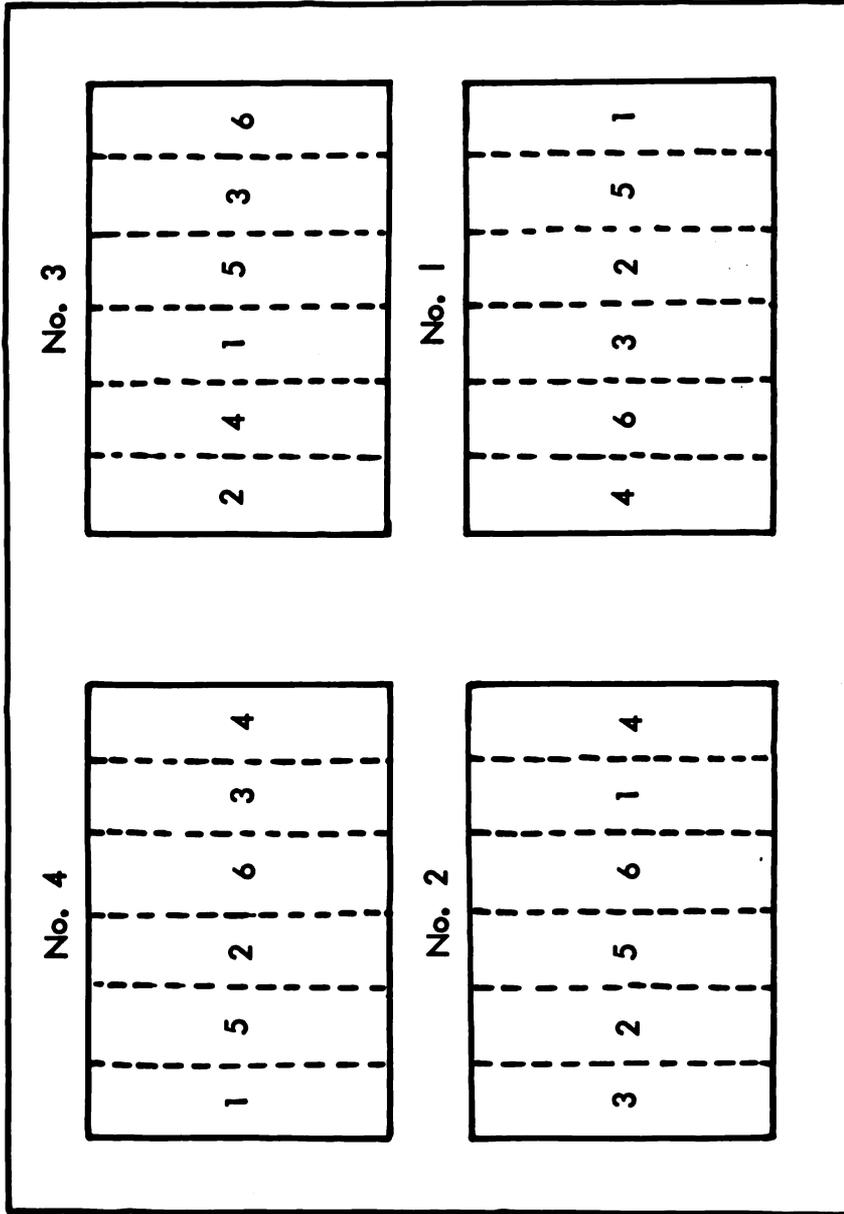


Fig. 13. Esquema de una repetición del experimento en el que se estudió el comportamiento de diferentes selecciones clonales de cacao (1, 2, 3, 4, 5, 6) y de varios niveles de nitrógeno en la planta (N1, N2, N3, N4) ante el ataque del C. gloeosporioides.

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

### Identificación del organismo aislado

Todas las características observadas durante los ensayos efectuados, condujeron a ratificar que el organismo aislado de lesiones de hojas con síntomas de Antracnosis era el Colletotrichum gloeosporioides Penz., especie ubicada entre los Hongos Imperfectos (Deuteromicetos), orden Melanconiales, familia Melanconiaceae, género Colletotrichum.

Cuando se hicieron los cultivos monospóricos del organismo aislado en Papa-Dextrosa-Agar, dió origen a dos tipos culturales diferentes que se los denominó "A" y "B". Las características del tipo "A" fueron las siguientes: Crecimiento miceliar aéreo, color gris, substrato ennegrecido y moderada esporulación. El tipo "B" presentó un crecimiento escaso, micelio hialino fino, con pequeñas masas conidiales en forma de gotas de color ocre, desarrollándose en áreas concéntricas sobre el substrato. Posteriormente al efectuar cultivos del tipo "A" dió origen a formas mutantes con lo que se demostró la gran variabilidad del C. gloeosporioides, que fué objeto de un estudio especial (23).

Todas las inoculaciones artificiales para las pruebas de patogenicidad y para los ensayos de control, fueron hechas con cultivos del aislamiento original tipo "A", por conocer su tendencia a dar origen a formas mutantes de alta patogenicidad (23).

Se hizo un pequeño ensayo de la influencia de la temperatura en la esporulación del C. gloeosporioides y para el efecto se incubaron cultivos de este hongo a tres temperaturas diferentes: 23-25°C (Temperatura ambiente), 28°C (Estufa) y 5°C (Refrigerador).

Los resultados de este ensayo se presentan en la Tabla que sigue:

Tabla 3. Efecto de la temperatura en la germinación de las esporas del C. gloeosporioides

Temperaturas	Horas	Total esporas con- tadas	Esporas germina- das	Porcentaje de germinación
23- 25°C	6	219	212	96.8
	10	296	293	98.9
28°C	6	300	240	80
	10	138	115	83.3
5°C	6	269	0	0
	10	320	0	0

Como se puede ver en la Tabla anterior, la temperatura ambiente (23-25°C) fué la mejor para la germinación de las esporas del hongo siendo la de 5°C un factor inhibitorio de la misma.

Continuando el estudio de las características culturales del C. gloeosporioides se observó que el mejor medio líquido de cultivo fué el jugo de naranjas (4:1) el cual permitió un abundante crecimiento micelial y apreciable esporulación en muy poco tiempo, siendo superior a todos los demás medios ensayados.

Para averiguar el comportamiento del hongo en estudio en medios sólidos se hizo un experimento preliminar para lo cual se probó el Agar-Agua y el Agar-Papa y se tomaron medidas del crecimiento radial del hongo. Se pudo apreciar que fué más útil para la nutrición del organismo del hongo la adición de papa al Agar. En la Figura 14, se presenta

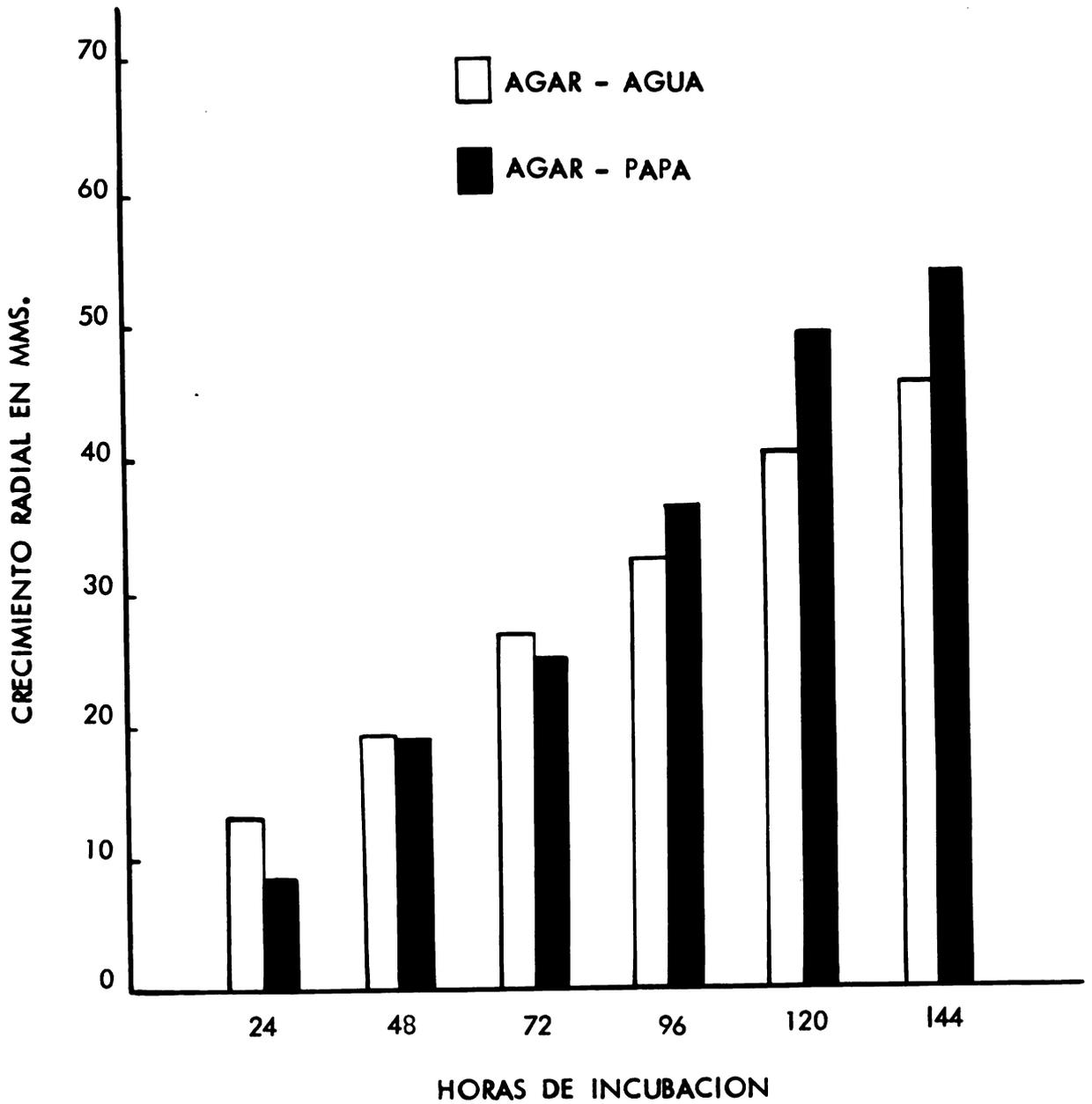


Fig. 14. Crecimiento radial del C. gloesporioides en medios sólidos.

gráficamente la rata de crecimiento expresada en mm. durante 144 horas de observación.

Se investigó al efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el desarrollo del C. gloeosporioides. Ensayando 5 hidratos de carbono en medios sólidos, se tomó medidas del crecimiento radial cada 24 horas. Los resultados obtenidos (Figura 15) indican que la Dextrosa fué la mejor fuente de carbono para el desarrollo del hongo, siguiéndole en orden decreciente la Maltosa, Sucrosa, Sorbitol y Lactosa advirtiéndose que no hubo mucha variabilidad entre los tratamientos. Comparando estos datos con los representados en la Figura 14 se observa que los hidratos de carbono son necesarios para el desarrollo óptimo del hongo.

Con el objeto de conocer el efecto de la reacción del medio sobre el C. gloeosporioides se ensayaron diferentes concentraciones de iones hidrógeno, usando como medio Papa-Dextrosa-Agar.

En la Figura 16, se representan los promedios de 3 cultivos medidos en milímetros, después de 120 horas de incubación a la temperatura del laboratorio.

Los pH iniciales 6 y 7 fueron los más favorables para su crecimiento. La máxima capacidad de crecimiento del C. gloeosporioides estuvo entre las 72 y 96 horas de incubación a la temperatura ambiente, según se observa en la Tabla 4.

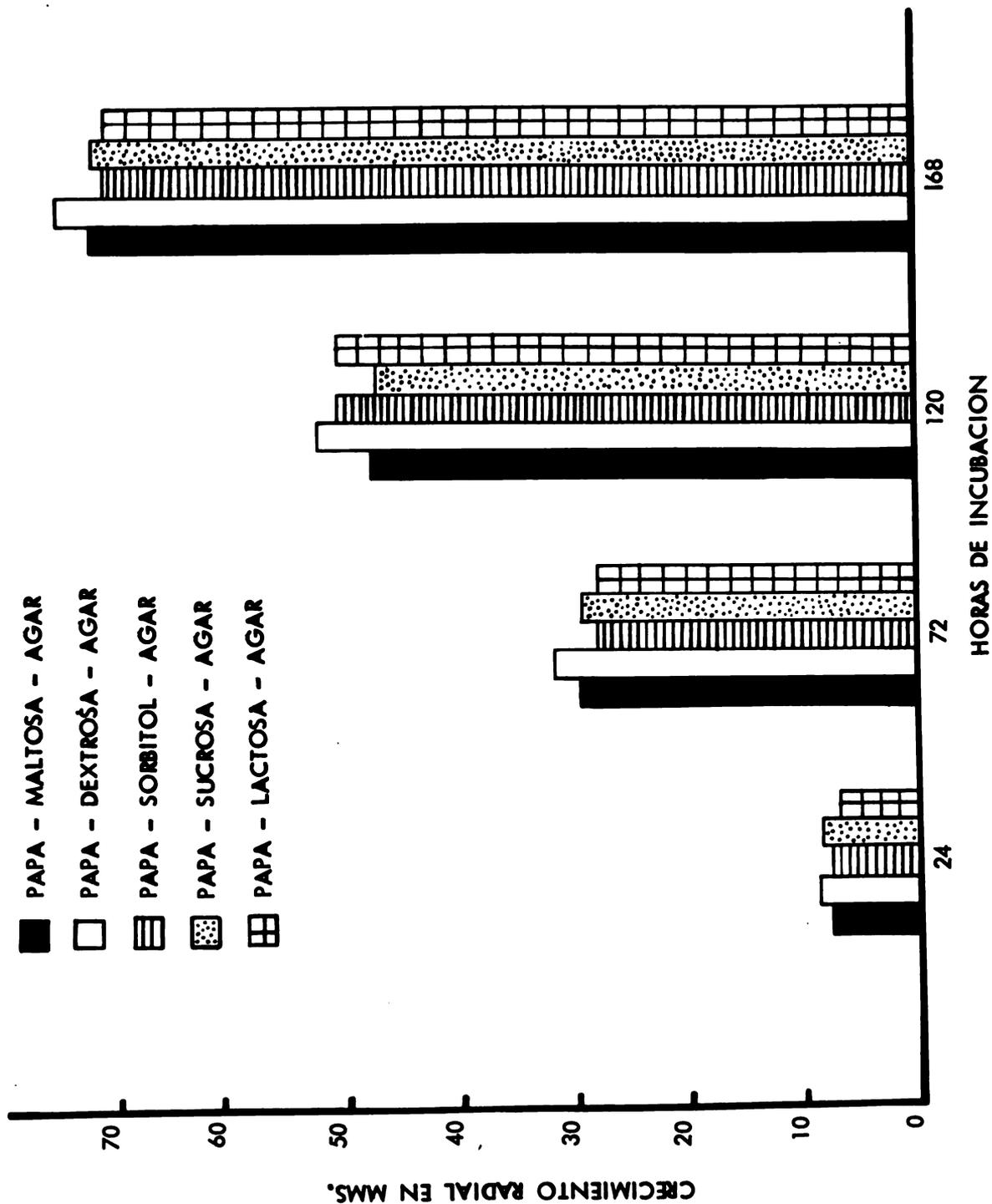


Fig. 15. Crecimiento radial del *C. gloeosporioides* en diferentes medios hidrocarbonados.

Tabla 4. Crecimiento radial expresado en mm. del Colletotrichum gloeosporioides en PDA con diferentes pH (Promedio de 3 repeticiones).

Horas	pH					
	3	4	5	6	7	8
24	7.00	10.00	9.33	9.66	11.66	7.00
48	19.33	21.66	21.33	21.00	18.33	16.00
72	28.66	34.00	33.00	33.33	30.66	26.33
96	47.00	51.33	53.66	53.66	52.66	50.66
120	53.33	54.00	56.33	58.66	57.66	52.66

Utilizando vitaminas en un medio basal de Dextrosa-Caseina hidrolizada se hizo un ensayo para determinar si el C. gloeosporioides era deficiente en alguna de ellas.

En la Figura 17 se representa el crecimiento del hongo después de 15 días de incubación a la temperatura ambiente del laboratorio, en los distintos tratamientos, representando cada valor el promedio de 4 repeticiones expresados en mg. de micelio seco.

El mayor crecimiento se obtuvo en el medio con Tiamina siguiéndole en orden descendente el Inositol, Acido Ascórbico, Testigo y Riboflavina.

Durante todo el estudio que se hizo del agente infeccioso no se pudo observar su estado perfecto (Glomerella cingulata (Ston.) Spaul. et Schr).

#### Patogenicidad del organismo aislado

Pocos días después de inoculadas las plantitas con C. gloeosporioides

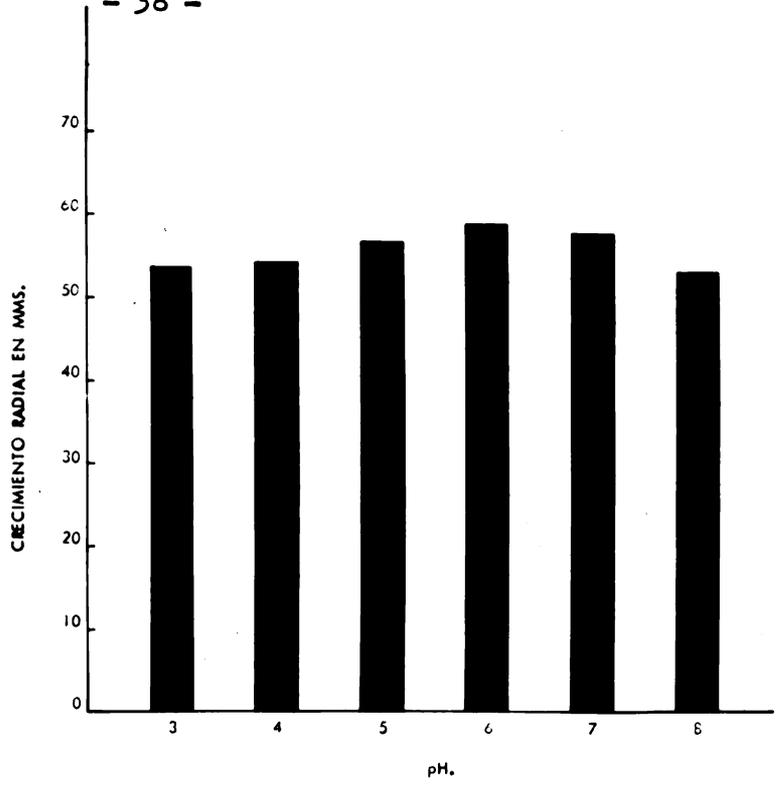


Fig. 16. Efecto de la concentración de iones hidrógeno en el desarrollo del *C. gloeosporioides* en medio sólido Papa-Dextrosa-Agar.

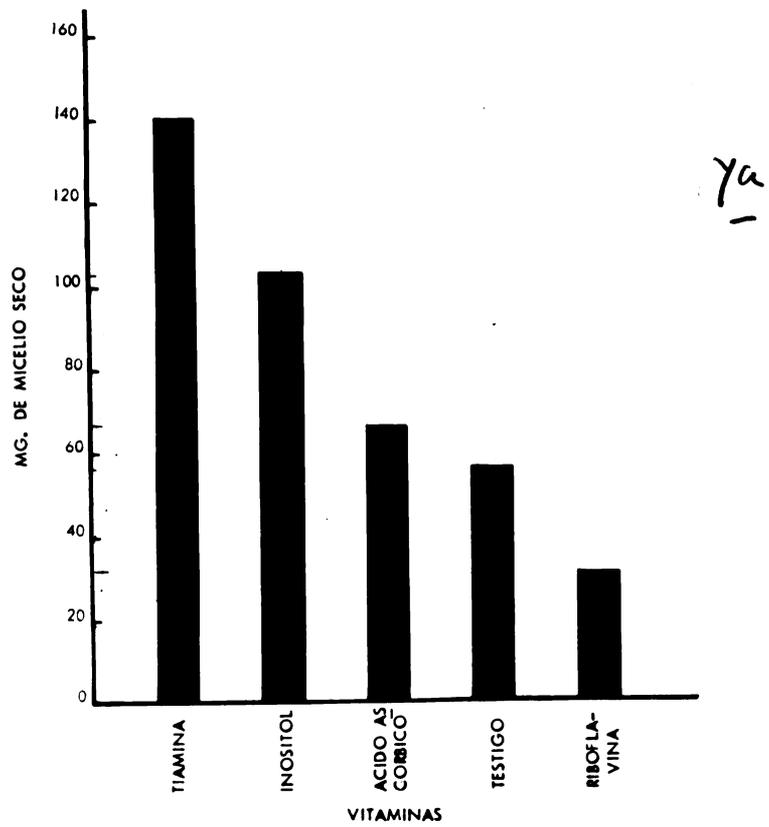


Fig. 17. Crecimiento de *C. gloeosporioides*

se hicieron visibles los síntomas de la Antracnosis en las hojas. Las características fueron las mismas anotadas en el capítulo "Síntomas de la Enfermedad". El estado "bare-tip" se presentó a los 4 meses de edad y se pudo observar a los 90 días, plantas con "die-back". Las lesiones en las hojas jóvenes fueron visibles en menos tiempo que en las hojas maduras y viejas.

Doce días después de la inoculación artificial se contaron 342 hojas de las cuales 216 presentaron lesiones del C. gloeosporioides que corresponde a un porcentaje de infección del 63.1 %.

También se tomó un índice de infección natural de la enfermedad después de 2 meses de sembrados los semilleros y de 357 plantas contadas 303 presentaron lesiones de "Antracnosis foliar", correspondiendo a un porcentaje de infección del 84.8 %.

Efecto de los fungicidas y de las cubiertas protectoras en el control de la "Antracnosis foliar"

Los resultados obtenidos del experimento en que se ensayaron fungicidas y cubiertas simultáneamente se presentan en las Tablas 5 y 6, en forma de promedios de los Índices de Infección calculados.

Tabla 5. Promedios de los Índices de Infección del experimento Cubiertas-fungicidas. (Observaciones tomadas en hojas jóvenes).

Tratamientos	Promedios
<u>Fungicidas:</u>	
Caldo Bordelés (4-4-50)	32.14
Fermate (0.7%)	17.09
Dithane (0.7%)	25.79
Testigo	23.08
<u>Cubiertas:</u>	
Día y Noche (DN)	8.42
Día (D)	23.64
Noche (N)	30.31
Descubierto (O)	35.72

Tabla 6. Promedios de los Indices de Infección del experimento Cubiertas-fungicidas. (Observaciones tomadas en hojas maduras).

Tratamientos	Promedios
<u>Fungicidas:</u>	
Caldo Bordelés (4-4-50)	9.43
Fermate (0.7%)	8.47
Dithane (0.7%)	11.48
Testigo	11.93
<u>Cubiertas:</u>	
Día y Noche (DN)	3.60
Día (D)	8.59
Noche (N)	11.47
Descubierto (O)	17.27

Según se observa en la Tabla 5, los promedios de infección en hojas jóvenes para el Caldo Bordelés y el Dithane fueron más altos que el testigo, poseyendo sólo el Fermate el promedio más bajo, dentro de los fungicidas. Estos resultados no son muy lógicos ya que la aplicación de algunos fungicidas aumentó la infección. Por este motivo se efectuó una lectura en hojas maduras obteniéndose los datos anotados en la Tabla 6, que colocan a los tratamientos en una posición más razonable. En este caso el Fermate fué siempre el más efectivo, siguiéndole en su orden el Caldo Bordelés, el Dithane y el testigo, que tuvo el promedio de infección más alto.

Se efectuaron los análisis de variación respectivos, tanto para las observaciones en hojas jóvenes (Tabla 7) como para las observaciones en hojas maduras (Tabla 8) y según ellos el conjunto de tratamientos de fungicidas fué estadísticamente significativo al 5%, en ambos casos.

Con respecto a los tratamientos de cubiertas, el promedio de infección más bajo lo obtuvieron las parcelas con cubierta durante el Día y la Noche constantemente (DN), siguiéndole en su orden, las parcelas con cubiertas durante el Día (D), parcelas cubiertas en la Noche (N) y el testigo (O) que consistió en dejar al descubierto día y noche las plantas.

En las Tablas 5 y 6 están anotados estos promedios, presentando los tratamientos de cubiertas resultados muy semejantes tanto en hojas jóvenes como en hojas maduras.

Los análisis de variación (Tabla 7 y 8) indican que los tratamientos de cubiertas fueron estadísticamente significativos al 1% para ambos casos.

Tabla 7. Análisis de variación para las observaciones tomadas en el experimento cubiertas fungicidas. (Hojas jóvenes)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
<u>Unidades</u>	<u>19</u>	<u>14024.63</u>		
Repeticiones	4	2291.86		
Trat. Cubiertas	3	8380.98	2793.66	10.00 **
Error (a)	12	3351.79	279.31	
<u>Subunidades</u>	<u>60</u>	<u>15303.04</u>		
Trat. Fungicidas	3	2339.01	779.67	3.33 *
Cubiertas x Fungicidas	9	1728.23	192.02	
Error (b)	48	11237.80	234.12	
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>29329.67</b>		

\* Significativo al 5%  
 \*\* Significativo al 1%

Tabla 8. Análisis de variación para las observaciones tomadas en el experimento cubiertas-fungicidas (Hojas maduras).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
<u>Unidades</u>	<u>19</u>	<u>2533.43</u>		
Repeticiones	4	111.46		
Tratamientos				
Cubiertas	3	1951.14	650.38	16.58 **
Error (a)	12	470.83	39.23	
<u>Subunidades</u>	<u>60</u>	<u>1071.14</u>		
Tratamientos				
Fungicidas	3	179.10	59.70	3.86 *
Cubiertas x Fungicidas	9	149.52	16.61	
Error (b)	48	742.52	15.47	
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>3604.57</b>		

\* Significativo al 5%

\*\* Significativo al 1%

En la Figura 18, se observa claramente el efecto de las cubiertas sobre las plantas y se nota que el tratamiento que consistió en cubrir las parcelas Día y Noche constantemente (DN) dió como resultado que las plantas crecieran vigorosas y libres de infección que contrasta notablemente con las parcelas que permanecieron descubiertas constantemente (0), en las cuales las plantas crecieron raquíticas, con muy pocas hojas y están severamente atacadas por el C. gloeosporioides.

Con los promedios de la Tabla 6, se calcularon los siguientes límites de confianza:



a



b



c



d

Fig. 18. Efecto de las cubiertas protectoras en el control de la "Antracnosis foliar" del cacao.  
a, parcela con cubierta durante el día y la noche (DN); b, parcela con cubierta durante el día (D); c, parcela con cubierta en la noche (N); d, parcela descubierta día y noche (0).

Tabla 9. Límites de confianza al 5% para los promedios de la Tabla 6.

Tratamientos	Límite inferior	Límite superior
<u>Fungicidas:</u>		
Caldo Bordelés (4-4-50)	7.68	11.18
Fermate (0.7%)	6.72	10.12
Dithane (0.7%)	9.73	13.23
Testigo	10.18	13.68
<u>Cubiertas:</u>		
Día y Noche (DN)	0.55	6.65
Día (D)	5.54	11.64
Noche (N)	8.42	14.52
Descubierto (0)	14.22	20.32

En las Figuras 19 y 20, están representados gráficamente estos límites.

Con el objeto de dilucidar la acción de los fungicidas en el control de la "Antracnosis foliar" se efectuó un nuevo ensayo en el que se probó la acción de los fungicidas antes mencionados haciendo intervenir, esta vez, un adherente (PEPS).

Los resultados de este experimento se dan a continuación:

Tabla 10. Promedios de los Índices de Infección del experimento fungicidas y adherentes. (Observaciones en hojas de edad intermedia).

Tratamientos	Promedios
Caldo Bordelés (4-4-50)	13.72
Fermate (0.5%)	11.85
Dithane (0.5%)	12.49
Testigo	22.45
C. Bordelés + Adherente	12.98
Fermate + Adherente	13.44
Dithane + Adherente	11.88
Testigo + Adherente	18.30

D.M.S. 5% = 4.47  
1% = 5.99

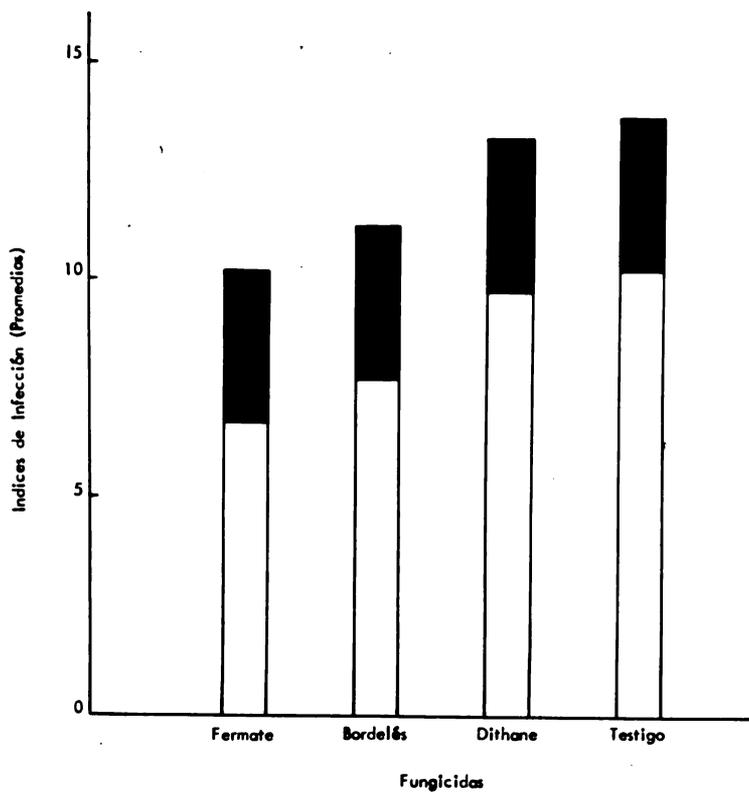


Fig. 19. Límites de confianza al 5% para los promedios de los tratamientos de la Tabla 6.

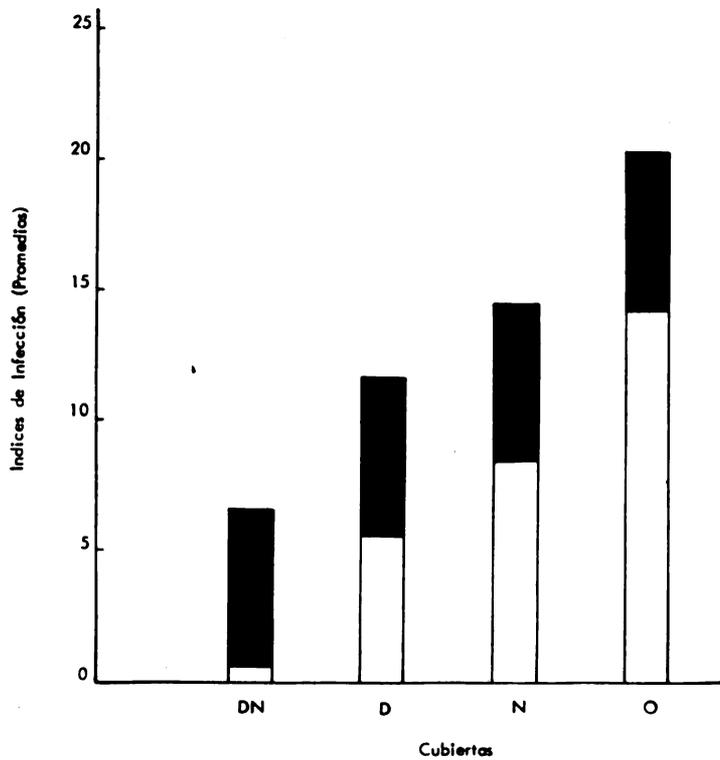


Fig. 20. Límites de confianza al 5% para los promedios de los tratamientos de la tabla 6. DN: cubierta durante el día y la noche; D: cubierta en el día; N: cubierta en la noche; O: cubierta en el día y la noche.

Según estos promedios en general, se observa que todos los fungicidas actuando solos o con adherente, disminuyeron significativamente la infección.

El Fermate, y el Dithane con adherente tuvieron diferencias mnmas significativas al 1%, ocupando el 1° y 2° lugar en efectividad, respectivamente.

Al efectuar el análisis de variación correspondiente (Tabla 11) los tratamientos de fungicidas fueron estadísticamente significativos al nivel del 1%.

Tabla 11. Análisis de variación para las observaciones tomadas en el experimento fungicidas-adherente. (Hojas de edad intermedia).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Repeticiones	5	119.13		
Tratamientos	7	596.41	85.20	5.83**
Error	35	511.55	14.61	
Total	47	1227.09		

\*\* Significativo al 1%

Con los promedios de la Tabla 10 se calcularon los siguientes límites de confianza:

Tabla 12. Límites de confianza al 5% para los promedios de la Tabla 10.

Tratamientos	Límite inferior	Límite superior
Caldo Bordelés (4-4-50)	10.57	16.87
Fermate (0.5%)	8.70	15.00
Dithane (0.5%)	9.34	15.64
Testigo	19.30	25.60
C. Bordelés + Adherente	9.83	16.13
Fermate + Adherente	10.29	16.59
Dithane + Adherente	8.73	15.03
Testigo + Adherente	15.15	21.45

En la Figura 21 se representan gráficamente estos límites.

#### Variación de los factores climáticos registrados

En el ensayo del control físico de la "Antracnosis foliar" por medio de cubiertas protectoras se registraron los factores climáticos bajo los dos tratamientos extremos es decir: Temperatura ambiente, humedad relativa, intensidad de luz solar y temperatura del suelo en las parcelas cubiertas constantemente Día y Noche (DN) y en las parcelas descubiertas durante el Día y la Noche (O), respectivamente.

En la Tabla 13, se resumen los valores promedios de 54 días de observación.

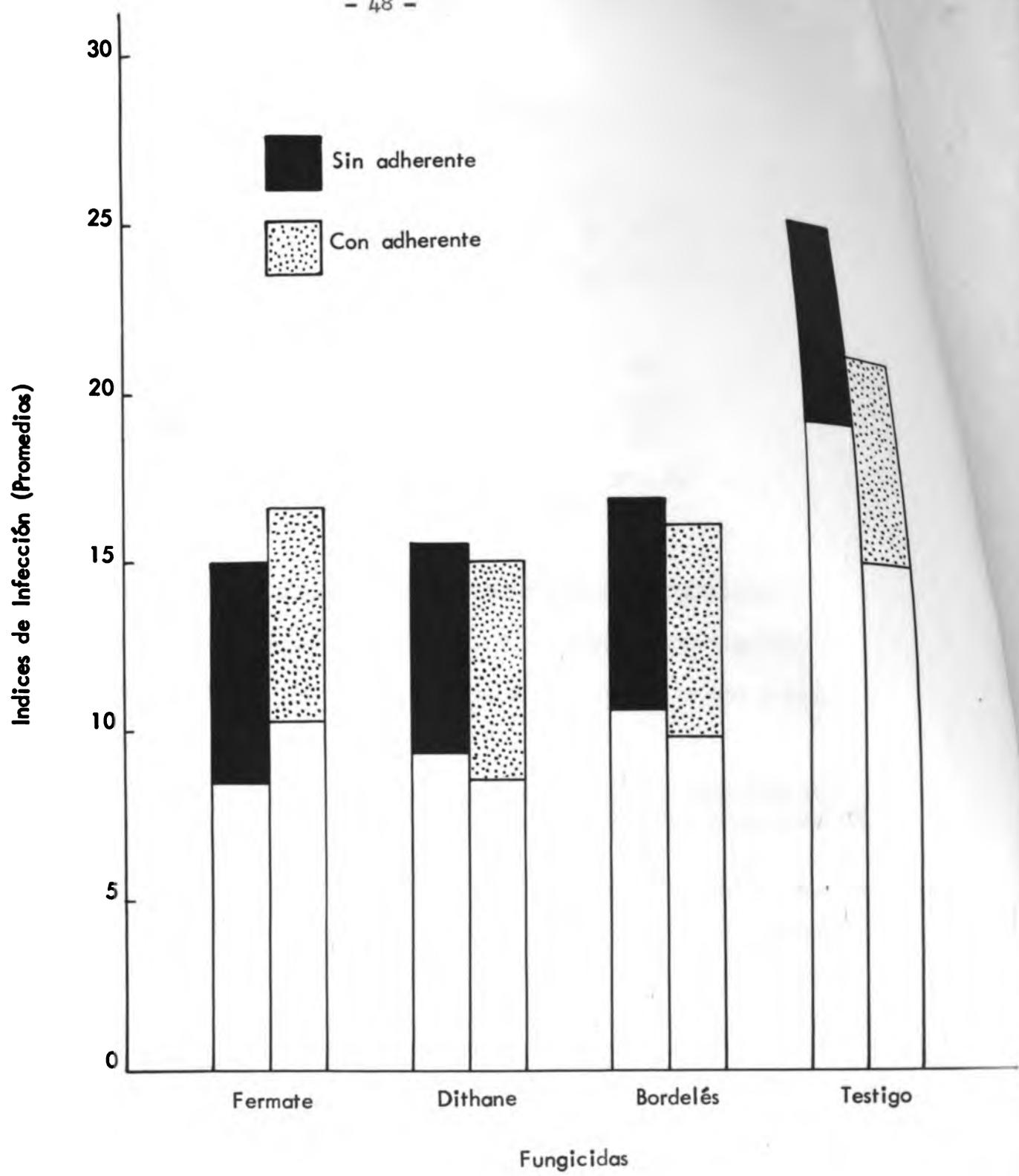


Fig. 21. Límites de confianza al 5% para los promedios de los tratamientos de la Tabla 10.

Tabla 13. Valores promedios de los factores climáticos de 54 días de observación.

Factores climáticos	Cubierto todo el Día (DN)	Descubierto todo el día (O)
Temperatura ambiente (Grados centígrados)	25.8	25.7
Humedad relativa (%)	80.2	80.5
Intensidad de luz solar (Foot candles)	703.70	2814.00
Temperatura del suelo (Grados centígrados)	25.3	27.2

Con excepción de la intensidad de luz solar, las variaciones de los demás factores climáticos fueron poco notables entre uno y otro tratamiento.

Efecto de la aplicación de nitrógeno en las plantas y comportamiento de las selecciones clonales de cacao ante la incidencia de la "Antracnosis foliar"

En el ensayo simultáneo que se hizo con niveles de nitrógeno y selecciones clonales de cacao para estudiar su efecto ante el ataque de la "Antracnosis foliar" se estimó la Incidencia de esta enfermedad en los distintos tratamientos cuyos promedios se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Promedios de los Indices de Infección del experimento niveles de nitrógeno y selecciones clonales. (observaciones en hojas de edad intermedia).

Tratamientos	Promedios
<u>Niveles de Nitrógeno:</u>	
N1 (0 /grs. N/lt.)	21.09
N2 (0.207/grs.N/lt.)	19.15
N3 (0.414/grs.N/lt.)	16.97
N4 (0.619/grs.N/lt.)	14.79
<u>Selecciones clonales:</u>	
UFCo. 677	12.16
UFCo. 221	16.62
UFCo. 667	18.06
UFCo. 613	18.69
UFCo. 650	19.90
Testigo (cacao corriente)	22.57

Según la Tabla anterior se nota una tendencia a disminuir la infección conforme se aumentó la cantidad de nitrógeno aplicado.

De todas las selecciones clonales de cacao, el clon UFCo. 677 se mostró más resistente a la infección seguido por el clon UFCo. 221.

En el análisis de variación efectuado, los tratamientos de niveles de nitrógeno no fueron estadísticamente significativos. En cambio las selecciones clonales sí tuvieron significancia estadística al 5% (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de variación para las observaciones tomadas en el experimento niveles de nitrógeno-selecciones clonales.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
<u>Unidades</u>	<u>15</u>	<u>1388.72</u>		
Repeticiones	3	393.30		
Niveles de nitrógeno	3	533.25	177.75	3.46
Error (a)	9	462.17	51.35	
<u>Subunidades</u>	<u>80</u>	<u>6415.46</u>		
Selecciones clonales	5	976.80	195.36	2.63 *
Clones x Nitrógeno	15	977.68	65.17	0.87
Error (b)	60	4460.98	74.35	
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>7804.18</b>		

\* Significativo al 5%

Con los promedios de la Tabla 14 se calcularon los límites de confianza que siguen:

Tabla 16. Límites de confianza al 5% para los promedios de la Tabla 14.

Tratamientos	Límite inferior	Límite superior
<u>Niveles de nitrógeno:</u>		
N1	17.79	24.39
N2	15.85	22.45
N3	13.67	20.27
N4	11.49	18.09
<u>Selecciones clonales:</u>		
UFCo. 677	7.86	16.46
UFCo. 221	12.32	20.92
UFCo. 667	13.76	22.36
UFCo. 613	14.39	22.99
UFCo. 650	15.60	24.22
Cacao corriente (Testigo)	18.27	26.87

En las Figuras 22 y 23 se representan gráficamente estos límites.

El resultado de los análisis químicos para determinar la cantidad de Nitrógeno total en las hojas de las plantas del ensayo de fertilización se presenta a continuación:

Tabla 17. Nitrógeno total en hojas de cacao, expresado en porcentaje de peso seco.

Tratamientos	% de N total
Hojas antes del experimento	1.350
Nivel N1 (0 grs. de N por lt.)	1.358
Nivel N2 (0.207 grs. de N por lt.)	1.434
Nivel N3 (0.414 grs. de N por lt.)	1.613
Nivel N4 (0.619 grs. de N por lt.)	1.704

Según se observa en la Tabla anterior la cantidad de nitrógeno total en las hojas no es elevado y sus porcentajes no pueden considerarse como representativos de los extremos deseados: cantidad de nitrógeno normal e insuficiencia del mismo elemento.

Sin embargo se observa una ligera diferencia entre los tratamientos que comparados con los resultados de la Tabla 14 presentan una relación inversa entre el contenido de nitrógeno total y la incidencia de la enfermedad.

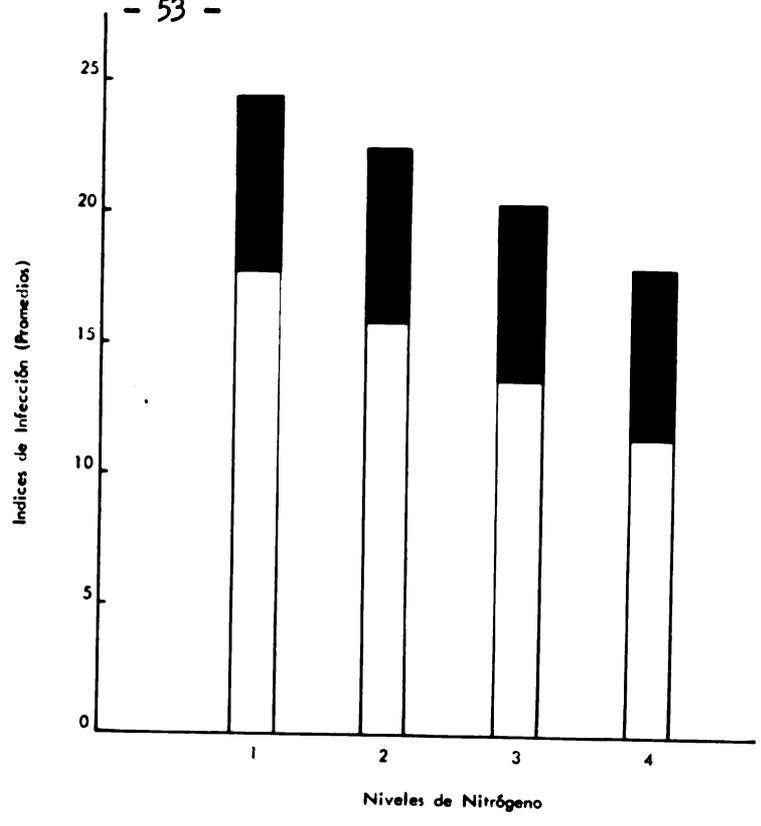


Fig. 22. Límites de confianza al 5% para los promedios de los tratamientos de la Tabla 14.

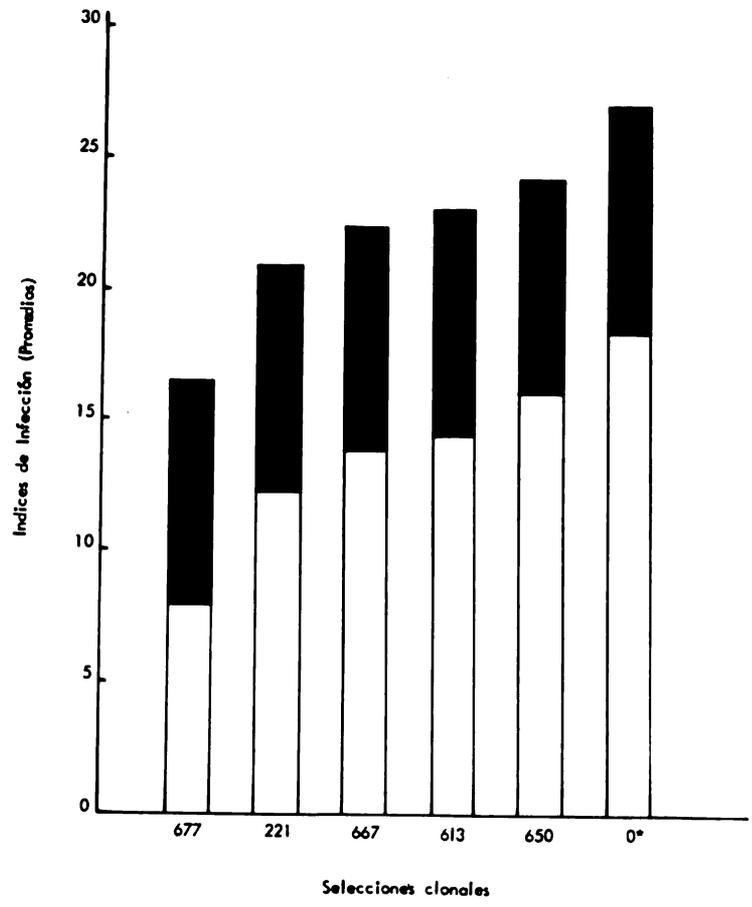


Fig. 23. Límites de confianza al 5% para los promedios de los tratamientos de la Tabla 14. 0\*: Cacao corriente usado como testigo.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

El hongo Colletotrichum gloeosporioides Penz., agente causal de la "Antracnosis foliar" en los semilleros de cacao, es una especie muy variable.

Bajo condiciones de laboratorio se obtuvieron dos tipos culturales diferentes. Uno de ellos, denominado tipo "A", dió origen a formas mutantes de alta patogenicidad (23). Se eligió el tipo "A", con sus variaciones, para usarse en todos los ensayos de este estudio, pues se dedujo que éste llevaría en sí la tendencia de dar origen a mutaciones y se tendría, de esta manera, la seguridad de trabajar con el conjunto de genes portadores de características de alta virulencia.

Sería interesante realizar más estudios sobre estas formas mutantes para señalar si ocurren en la naturaleza y si son responsables de síntomas diversos de la enfermedad.

Durante todo el estudio realizado con este organismo no se pudo obtener su forma perfecta (Glomerella cingulata (Ston.) Spaul. et Schr.). Cabe la posibilidad de que exista un huésped específico que sirva de intermediario entre la forma conidial y ascógena o que la imposibilidad de observar la forma perfecta se deba a ciertos factores de temperatura, humedad o cualidades especiales del medio de cultivo.

La temperatura óptima para la esporulación del C. gloeosporioides parece que se encuentra entre 23 y 25°C., indicándose que éstas fueron las temperaturas medias ambientales prevalentes en la época del ensayo. A temperaturas de 5°C. se detuvo la germinación de las esporas. Estos datos están dentro de los límites que indica Leibovitch (15) y Togashi (29) para el mismo organismo.

El jugo de naranjas (4:1) resultó excelente medio para el desarrollo y esporulación del hongo quedando por señalar qué factor o factores, presentes en él fueron responsables de este abundante crecimiento.

El C. gloeosporioides no mostró mucha especificidad por las diferentes fuentes de carbono usadas, pero sí se observó que creció mejor en medios con azúcares que en medios sin estas sustancias. La Dextrosa permitió el mejor desarrollo entre todos los 5 hidratos de carbono ensayados. Se puede decir que el hongo necesita entre otros elementos, la presencia de alguna fuente de carbono para su metabolismo y que para este fin, aprovecha mejor la Dextrosa.

El pH tuvo muy poca influencia en el crecimiento del patógeno. Sólo se registraron ligeras variaciones cuando el pH fluctuó entre 6 y 7.

Es posible que la importancia principal de la concentración de iones hidrógeno esté en íntima relación con la capacidad de utilización o de síntesis de las vitaminas, lo que podría constatarse en futuros estudios

Fue evidente que el C. gloeosporioides deficiente en Tiamina y que también tiene una pequeña capacidad para sintetizar las vitaminas en los medios de cultivo libre de ellas, pero no en suficientes cantidades para su normal desarrollo.

Se llegó a esta conclusión porque la Tiamina mostró ser la vitamina más útil en el desarrollo del hongo y porque en el medio basal libre de ellas también hubo un ligero desarrollo miceliar. Además hubo mayor crecimiento en medio Agar Papa, superior al observado en Agar Agua. Esto viene a ratificar la deficiencia del hongo en Tiamina, puesto que la papa usada tenía de 75 a 95 microgramos de Tiamina por cada 100 gramos de papa (7).

Por sus características de crecimiento en medios vitaminizados se puede ubicar al C. gloeosporioides dentro de la segunda categoría en la escala que existe para clasificar las necesidades vitamínicas de los hongos y sus habilidades para sintetizarlas. A esta categoría pertenecen aquellos hongos que pueden hacer cierto desarrollo sin la adición de vitaminas en el medio de cultivo (7).

Realizando estudios más completos sobre las necesidades nutritivas del C. gloeosporioides se llegaría a determinar cuáles son los requerimientos en cuanto a componentes de la molécula de Tiamina se refiere, sus capacidades de sintetizarlas y si la presencia de una de ellas es esencial para que el hongo sintetice la otra.

La patogenicidad del C. gloeosporioides fué bastante alta, observándose porcentajes del 84.8% en condiciones naturales de infección.

Las hojas jóvenes fueron las más susceptibles al ataque del hongo pero se consiguió también infectar artificialmente las hojas maduras y viejas.

La suspensión acuosa de esporas, con una concentración de 3 a 4 millones de esporas por  $\text{cm}^3$ , atomizadas en horas de buena luminosidad sobre el haz de las hojas, fué el método de inoculación artificial más efectivo.

Los métodos para combatir la "Antracnosis foliar" de los semilleros de cacao fueron en general efectivos, especialmente cuando se usaron cubiertas protectoras sobre las plantas.

Los experimentos llevados a cabo con fungicidas, indicaron que el Fermate al 0.5% y el Dithane a la misma concentración con la adición del adherente PEPS (1 pinta por 100 galones de agua) dieron los resultados

más satisfactorios.

En concentraciones más altas (0.7%) el Fermate siguió siendo efectivo no presentándose casos de toxicidad en las hojas. Cuando se usó con adherente no dió muy buenos resultados.

Con el Dithane ocurrió lo contrario, pues cuando se usó en concentración del 0.7% fué el menos efectivo, mejorando notablemente cuando se usó al 0.5% y mucho más aún cuando se le adicionó el adherente PEPS.

El Caldo Bordelés fué muy tóxico sobre hojas tiernas y el menos efectivo de todos los fungicidas.

Al usarlo con adherente aumentó un poco su poder de efectividad.

Como estos materiales fueron aplicados sobre las hojas en forma de soluciones acuosas parece que su efectividad residió en la destrucción del organismo infeccioso y como materiales protectivos de las partes aéreas de las plantas tratadas.

En los ensayos realizados con cubiertas protectoras de las plantas de semillero se obtuvieron resultados muy halagadores, particularmente cuando se usó la cubierta 24 horas al día sin interrupción. Este tratamiento fué estadísticamente significativo al nivel del 1%. Parece que el único factor ambiental que se modificó notablemente, fué la luz debido a que la cubierta la interceptó, permitiendo pasar solo un 25% de su intensidad. La humedad relativa, temperatura ambiente, precipitación y temperatura del suelo no sufrieron variaciones de consideración.

Cuando las plantas se dejaron a la acción directa de la luz, aún cuando se cubrieron por la noche hubo siempre un alto porcentaje de

infección.

Con un 25% de luz (cubierta todo el día) no sólo se consiguió controlar la enfermedad sino que se aumentó el vigor de las plantas y su aspecto general fué muy bueno.

Se piensa que la luz intensa permitió que los estomas estuvieran en su máxima apertura permitiendo de esta manera la penetración del C. gloeosporioides, ya que se conoce que este organismo ocupa esta vía para penetrar en los tejidos internos de las hojas (15). Además es posible que la acumulación de azúcares en las hojas expuestas al sol, por aceleración de la fotosíntesis (1), permitió que el organismo encontrara mejores condiciones nutritivas para establecerse, siendo este el motivo porque la infección fué más severa en las plantas expuestas a la interperie.

También se puede pensar que la mayor concentración de nitrógeno total en las hojas en las plantas cubiertas, tuvo cierta influencia al reducir el porcentaje de infección.

En los trabajos realizados por Fennah (6) se encontró que las hojas de las plantas cultivadas con un 25% de luz tenían un porcentaje más elevado de nitrógeno total por peso seco, que las cultivadas a plena luz.

Aunque estadísticamente no fueron significativos los tratamientos del ensayo que se hizo con diferentes niveles de nitrógeno, se pudo observar sin embargo que hubo cierta tendencia a disminuir la infección cuando se aumentó el contenido de nitrógeno total en las hojas. Es posible que exista una influencia de este elemento equilibrado con la presencia de otros (Potasio, fósforo y microelementos) para

provocar una condición de resistencia en la planta (8). Tal vez no fué estadísticamente significativo el tratamiento de fertilización por el reducido número de repeticiones hechas.

En el ensayo que se hizo con plantas de semillas de varias selecciones clonales de cacao para averiguar su resistencia al ataque de la "Antracnosis foliar", se encontró que el clon UFCo. 677 parece que tiene características de resistencia a la enfermedad.

Estadísticamente fueron **significativas**, al nivel del 5% las selecciones clonales en la reducción del porcentaje de infección, pero solo el Clon UFCo. 677 tuvo diferencias mínimas significativas con respecto al testigo que en este caso fueron plantas de semillas de cacao corriente tipo Forastero Trinitario morado, el cual se comportó como muy susceptible al ataque del C. gloeosporioides.

El clon UFCo. 221 ocupó el segundo lugar en resistencia a la "Antracnosis foliar", pero sus diferencias con el testigo no fueron estadísticamente significativas.

Es evidente que el método más efectivo de control de la Antracnosis fue el tratamiento de cubierta día y noche, superior a todos los métodos de control ensayados. El uso del clon UFCo. 677, para fines de resistencia al ataque de la enfermedad, sólo se justificaría haciendo una evaluación económica de este clon para saber si es aconsejable su elección.

Sería interesante también estudiar el poder residual del Fermate y del Dithane con adherente para señalar sus períodos de aplicación.

Con respecto a la fertilización de las plantas para elevar su resistencia al ataque de la "Antracnosis foliar" es conveniente realizar

experimentos mas minuciosos sobre este aspecto y averiguar si intervienen otros elementos en este fenómeno.

## R E S U M E N

1. El hongo Colletotrichum gloeosporioides Penz. fué el agente causal de la "Antracnosis foliar" de los semilleros de cacao. No se pudo observar su forma perfecta (Glomerella cingulata (Ston.) Spaul. et Schr.). Su estado conidial dió origen a varias formas mutantes que demostraron ser patógenas.
2. Se observó que el C. gloeosporioides necesita la Tiamina para su normal desarrollo. Los medios hidrocarbonados le son necesarios para su metabolismo y la Dextrosa fué la fuente de carbono elegida por el hongo. La concentración de iones hidrógeno en los medios de cultivo no hicieron variar notablemente el crecimiento del organismo. La temperatura óptima para la germinación de las esporas del C. gloeosporioides estuvo entre 23 y 25°C.
3. Los resultados experimentales sobre el control químico de la "Antracnosis foliar" indican que el Fermate (0.5%) y el Dithane (0.5%) con adherente (PEPS) fueron los fungicidas más efectivos.
4. El control de la enfermedad obtenido con cubiertas protectoras permanentes (día y noche) fué superior al de los fungicidas. Las cubiertas permitieron el paso del 25% de la irradiación de la luz solar.
5. La adición de nitrógeno parece que permitió aumentar la resistencia de las plantas al ataque de la Antracnosis, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos.

6. El clon UFCo. 677 mostró características de resistencia a la infección.

S U M M A R Y

1. The fungus Colletotrichum gloeosporioides Penz. was the causal agent of "Leaf anthracnose" in cacao seedlings. It was not possible to see its perfect stage (Glomerella cingulata (Ston.) Spaul. et Schr.). The conidial stage of the fungus gave origin to several mutant forms that showed to be pathogenic.
2. It was noticed that Thiamin is needed by C. gloeosporioides for its normal development. Media containing hydrocarbons are necessary for its metabolism and Dextrose was the carbon source choosed by the fungus. Hydrogen ion concentration in the media did not make the growth of the pathogen vary considerably. The optimum temperature for spore germination of C. gloeosporioides was between 23 and 25°C.
3. Experimental results on the chemical control of leaf anthracnose indicate that Fermate (0.5%) and Dithane (0.5%) with the sticker (PEPS) were the most effective fungicides.
4. The control of the disease obtained with permanent protective covers (night and day) was superior to that of the fungicides. The covers allowed 25% of the sunlight to go thru.
5. Nitrogen additions apparently increased the resistance of the plants to the disease, although the results were not statistically significant.
6. Clon UFCo. 677 showed characteristics of resistance to the infection of the disease.

LITERATURA CITADA

1. ALVIM, PAULO DE T. Apuntes de fisiología vegetal. Sin publicar. Turrialba, C. R., Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1952. 117 p. (mimeografiado)
2. \_\_\_\_\_ Curso de laboratorio de fisiología vegetal. Sin publicar. Turrialba, C. R., Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1953. 44 p. (mimeografiado)
3. BURCHARDT, AKE. Notes on cacao work at Hacienda "Clementina". Trabajo presentado a la Cuarta Conferencia del Comité Técnico Interamericano del Cacao celebrada en Guayaquil, Ecuador durante Junio 9-16 de 1952. 7 p. (mimeografiado)
4. CHAVES, GERALDO M. Estudios sobre el uso de adherentes en fungicidas orgánicos bajo condiciones tropicales. Tesis sin publicar. Turrialba, C. R., Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1953. 46 p. (mimeografiado)
5. DESROSIERS, RUSSELL & BUCHWALD, A. VON. El control de enfermedades en los propagadores de cacao. Trabajo presentado a la Cuarta Conferencia del Comité Técnico Interamericano del Cacao celebrada en Guayaquil, Ecuador durante Junio 9-16 de 1952. 4 p. (mimeografiado)
6. FENNAH, R. G. Nitrogen partition in the normal cacao leaf. In Imperial College of Tropical Agriculture. A report on cacao research, 1953. St. Augustine, Trinidad, 1954. pp. 45-52.
7. FERNANDEZ, OCTAVIO B. Estudios sobre la nutrición y desarrollo del Cercospora musae, causante de la "Sigatoka" del banano. Tesis sin publicar. Turrialba, C. R., Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1953. 69 p. (mecanografiado)
8. GARCÉS OREJUELA, C. Control de las enfermedades de las plantas. Medellín, Colombia, Universidad Nacional, Facultad de Agronomía, 1954. 381 p.
9. \_\_\_\_\_ Enfermedades del cacao en Colombia. Colombia, Ministerio de la Economía Nacional, 1940. pp. 15-55.
10. GRANGIER JR., ALEXANDRE. Posibilidades del fungicida orgánico "Captan" con adherentes para uso bajo condiciones tropicales. Tesis sin publicar. Turrialba, C. R., Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1954. 56 p. (mecanografiado)
11. HASTINGS DE GUTIERREZ, LUCY. Muerte descendente causada por Colletotrichum en las plantas de café en el almácigo y su combate por medio de aspersiones en Turrialba, Costa Rica. Turrialba 4(3-4):115-124. Jul.-Dic. 1954.

12. HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347, rev. 1950. 32 p.
13. IDROBO M., SILVIO. Represión del Colletotrichum theobromicolum Delacroix en Theobroma cacao L. Cacao en Colombia 3:141-156. 1954.
14. KEITT, G. W. Single technique for isolating single-spore strains of certain types of fungi. Phytopathology 5(5):266-269, 1915.
15. LEIBOVIT, ARTHUR B. Seedbed anthracnose (Colletotrichum gloeosporioides Penz. cacao strain) of cacao (Theobroma cacao L.) in Costa Rica. Unpublished thesis. Turrialba, C. R., Inter-American Institute of Agricultural Sciences, 1951. 112 p. (typewritten)
16. LELLIS, WALDEMAR T. Influencia da sombra e da luz sobre a incidencia natural do Colletotrichum em plantulas de cacauero. Informe sin publicar. Turrialba, C. R., Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1954. 7 p. (mecanografiado)
17. MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by Helminthosporium sativum. Journal of Agricultural Research 26(5):195-218. Nov. 1923.
18. MEJIA F., R. Enfermedades de la papa, algodón, arroz, cabuya, caña y cacao. Revista de Agricultura (Colombia) 10(12):356. 1938.
19. NEWHALL, ALLAN G. Investigaciones en enfermedades del cacao en Turrialba. Centro Interamericano del Cacao (Turrialba, C. R.) Boletín Informativo del Cacao 1(7):1-4. Mayo 1948.
20. OBANDO, NESTOR. Cultivo del cacao. Bogotá, Colombia, Ministerio de Agricultura y Comercio, 1935. 52 p.
21. ORELLANA, RODRIGO G. Cacao diseases in Venezuela, Colombia, Ecuador and Trinidad. FAO Plant Protection Bulletin 2(4):49-52. Jan. 1954.
22. \_\_\_\_\_ Principios de fitopatología. Sin publicar. Turrialba, C. R., Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1953. 192 p. (mimeografiado)
23. \_\_\_\_\_ & AGUIRRE, L. The pathogenicity of mutant forms of Colletotrichum of cacao. Paper presented at the III Latin American Conference of Plant Breeders, Plant Pathologists, Entomologists, and Soil Technicians. Bogotá, Colombia, 1955. 2 p. (typewritten)
24. RAGGI, CARLOS A. Nociones de técnica fitopatológica. Argentina, Ministerio de Agricultura, Publicación Miscelánea no. 271. 1948. 14 p.

25. RIKER, A. J. & RIKER, R. S. Introduction to research on plant diseases; guide to the principles and practices for studying various plant-disease problems. St. Louis, John S. Swift Co., 1936. 117 p.
26. ROGER, L. Phytopathologie des pays chauds. Paris, Paul Lechevalier, 1953. Tomo 2, p. 1129-2256.
27. SANCHEZ POTES, ALBERTO. La antracnosis foliar del cacao. Palmira, Colombia. Facultad de Agronomía. Acta Agronómica 3(1):41-64. 1953.
28. SYLVAIN, PIERRE G. Studies on die-back. Unpublished report. Turrialba, C. R., Inter-American Institute of Agricultural Sciences, 1952. 15 p. (mimeographed)
29. TOGASHI, KOGO. Biological characters of plant pathogens, temperature relations. Tokio, Meibundo, 1949. pp. 77-82.
30. VERNA, LUIS C. & HERRERO, F. J. Micología, biología, experimentación; sus aplicaciones a la medicina y a la industria. Buenos Aires, "El Ateneo", 1952. 740 p.
31. VIVERO N., JOSE E. Estudio sobre la marchitez y caída de las hojas en almacigales de cacao. Tesis (Especialista en Cacao) sin publicar. Turrialba, C. R., Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1950. 31 p. (mecnografiado)
32. WELLMAN, FREDERICK L. Some important diseases of cacao. FAO Plant Protection Bulletin 11(9):129-134. 1954.
33. \_\_\_\_\_ Trip to consult on cacao problems in Ecuador. Inter-American Cacao Center (Turrialba, C. R.) Cacao Information Bulletin 1(25):1-4. Nov. 1949.

PI-252-1956.  
Marzo 15, 1956.