

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Estudio ultramicroscópico del proceso de infección de  
**Moniliophthora roreri** en frutos de cacao.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del  
Programa Conjunto de Estudios de Posgrado en Ciencias  
Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa  
Rica y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y  
Enseñanza, para optar al grado de:

Magister Scientiae

por

Dora María Flores Mora

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA  
Departamento de Producción Vegetal  
Turrialba, Costa Rica

1989

### DEDICATORIA:

Al recuerdo de mi padre, Antonio, maestro de corazón, persona con gran calidad humana que me enseñó a luchar en la vida.

A mi hermana Gina, a quién siempre recuerdo con mucho cariño, persona luchadora hasta el día de su muerte.

A mis hermanos Marco Antonio, Daniel Eduardo, Berta María y Cecilia, quienes siempre me han dado amor y apoyo.

A mi madre, Berta, mujer fuerte y emprendedora, a quién debo lo que actualmente soy.

## AGRADECIMIENTOS:

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta investigación.

Al Dr. José J. Galindo por su valiosa ayuda, consejo y apoyo económico a través de su proyecto.

Al Dr. Carlos Ramírez mis más infinitas gracias por haberme ayudado en los momentos más difíciles de la elaboración del manuscrito.

Al Dr. Marc Berthouly y al Ing. Franklin Herrera MSc. por la revisión del manuscrito.

Al Ing. Wilberth Phillips MSc. y a la Bio. Nelly Vásquez personas con gran calidad humana y siempre dispuestas a cooperar no sólo con el consejo técnico sino también en la revisión del manuscrito. A ellos dos mis más sinceros agradecimientos.

Al Dr. Y. Kozuka mi maestro y amigo.

Al Dr. Gustavo Enríquez por su amistad y ayuda financiera, a través de su proyecto, durante la realización de la investigación.

A los señores Fernando López y Guillermo Salazar por su cooperación en los trabajos de laboratorio y campo.

A mis amigos y compañeros Nidia, Marlen, Irma, Helga, Oscar, Ana Cecilia, Felipe y Pepe por sus muestras de amistad y cariño.

Al señor Eric Garro, quién me brindó todo su apoyo y comprensión en los momentos que más lo necesité.

A todo el personal de la finca La Lola, quienes siempre estuvieron anuentes a cooperar con el trabajo.

A todo el personal de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

A todo el personal de PROMECAFE por su valiosa colaboración.

Al programa de posgrado UCR-CATIE, Universidad de Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza por permitirme la realización de mis estudios de maestría.

## BIOGRAFIA

La autora nació en Cartago, el 7 de junio de 1958.

Realizó sus estudios secundarios en el Colegio de San Luis Gonzaga y sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica, de donde egresó en 1982.

A partir de setiembre de 1983, trabajó en el CATIE en el Departamento de Producción Vegetal, en el Proyecto Sistemas de Cultivo para Pequeñas Fincas.

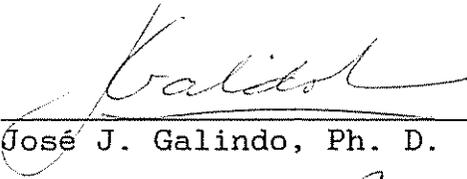
Ingresó en 1985 al Programa de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica y el CATIE.

A partir de Julio de 1988 labora en el Programa I del CATIE con el Proyecto PROMECAFE en Cultivo de Tejidos.

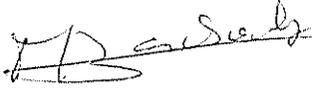
Esta tesis ha sido aceptada en su forma presente por la Comisión de Estudios de Posgrado del Programa Conjunto UCR-CATIE, como requisito parcial para optar el grado de

Magister Scientiae

Jurado:

  
\_\_\_\_\_  
José J. Galindo, Ph. D. Profesor Cosejero

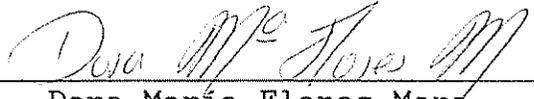
  
\_\_\_\_\_  
Carlos Ramírez, Ph. D. Miembro del Comité

  
\_\_\_\_\_  
Marc Berthouly, Ph. D. Miembro del Comité

  
\_\_\_\_\_  
Franklin Herrera, M. Sc. Miembro del Comité

  
\_\_\_\_\_  
Director del Programa de Estudios de Posgrado en  
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales UCR-CATIE  
o su Representante

  
\_\_\_\_\_  
Decano del Sistema de Estudios de Posgrado de la  
Universidad de Costa Rica

  
\_\_\_\_\_  
Dora María Flores Mora  
Candidata

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1 Sintomatología.....	3
2.2 Nomenclatura y taxonomía del patógeno.....	6
2.3 Conidiogénesis y estructura septal.....	7
2.4 Fisiología de la germinación de los conidios.....	8
2.5 Efecto de la temperatura sobre la germinación de los conidios .....	9
2.6 Proceso de germinación de los conidios, penetración e infección.....	10
2.7 Anatomía de la mazorca de cacao.....	13
2.8 Generalidades del combate por resistencia.....	15
2.9 Defensas bioquímicas y físicas que poseen las plantas contra el ataque de los patógenos.....	16
2.10 Los compuestos fenólicos en las enfermedades de las plantas.....	18
2.11 La lignificación como mecanismo de defensa.....	20
2.12 La importancia del grosor de la cutícula en la resistencia de las plantas a las enfermedades.....	21
2.13 Algunas metodologías aplicadas en el estudio del desarrollo de patógenos en los vegetales.....	21

3.	MATERIALES y METODOS.....	23
3.1	Localización del ensayo.....	23
3.2	Descripción del material experimental.....	23
3.3	Metodología.....	26
3.3.1	Polinizaciones manuales.....	26
3.3.2	Inoculaciones artificiales.....	26
a	Inoculaciones en el campo.....	26
b	Inoculaciones en el invernadero.....	27
3.3.3	Obtención de las muestras.....	28
3.3.4	Preparación de las muestras para cada una de las técnicas microscópicas empleadas...28	
a	Procesamiento de las mazorcas para Microscopía Electrónica de Rastreo.....	28
b.	Procesamiento de las mazorcas para Microscopía Optica de Alta Resolución.....	30
c.	Procesamiento de las muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión.....	31
3.3.5	Observaciones macroscópicas de mazorcas enfermas.....	33
4.	RESULTADOS.....	34
4.1	Observaciones realizadas con Microscopía Electrónica de Rastreo.....	34
4.1.1	Características anatómicas de frutos sanos.....	34
4.1.2	Disposición de los conidios de <b>Moniliophthora</b> <b>roreri</b> sobre la superficie de los frutos.....	37
4.1.3	Características anatómicas de <b>Moniliophthora</b> <b>roreri</b> .....	37
4.1.4	Germinación de los conidios de <b>Moniliophthora</b> <b>roreri</b> .....	44
4.1.5	Prepenetración de <b>Moniliophthora roreri</b> .....	47
4.2	Observaciones realizadas con Microscopía de Luz.....	50
4.2.1	Observaciones de tejido interno del exocarpo de la mazorca sana.....	50

4.2.2	Observaciones de frutos del cv 'Pound-7' infectados con <b>Moniliophthora roreri</b> .....	57
4.3	Observaciones realizadas con Microscopía Electrónica de Transmisión.....	58
4.3.1	Tejido sano del cv 'Pound-7'.....	58
4.3.2	Tejido enfermo del cv 'Pound-7'.....	58
5.	DISCUSION.....	61
5.1	Características superficiales del fruto de cacao sano.....	62
5.2	Características de <b>Moniliophthora roreri</b> .....	64
5.3	Interacciones hospedero-patógeno.....	67
5.4	Tejido enfermo.....	68
6.	CONCLUSIONES.....	71
7.	RECOMENDACIONES.....	73
8.	LITERATURA CITADA.....	74

## RESUMEN

### Estudio ultramicroscópico del proceso de infección de *Moniliophthora roreri* en frutos de cacao.

Una de las principales enfermedades que ataca las plantaciones cacaoteras es la moniliasis, producida por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et al. Con el fin de disminuir sus pérdidas se han empleado diferentes formas de combate; entre las que se destacan las podas sanitarias y otras prácticas culturales.

Para que los diferentes métodos de combate se apliquen eficientemente, es necesario, un conocimiento más profundo sobre la relación patógeno-hospedero. Este conocimiento permitiría mayores avances en el manejo integrado y efectivo del hongo. Desafortunadamente se ha hecho poca investigación en este sentido, lo que motivó la realización de este estudio.

Los objetivos de esta investigación fueron: estudiar la estructura externa de frutos de dos cultivares de cacao con diferente grado de susceptibilidad a *M. roreri*, conocer la morfología externa del hongo *M. roreri* tanto *in vitro* como sobre frutos de cacao, observar el proceso de germinación y prepenetración del hongo sobre frutos de cacao, comparar el tejido interno de frutos sanos de cultivares de cacao con diferente grado de susceptibilidad a *M. roreri* y observar los tejidos de frutos enfermos en un cultivar susceptible.

Se emplearon tres técnicas microscópicas: Microscopía Electrónica de Rastreo (MER), Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Para MER se utilizó frutos de 60 días de edad sanos e inoculados artificialmente, tanto en el campo como en el invernadero, de los cv 'Pound-7' (susceptible) y 'UF-296' (moderadamente resistente) procedentes de Turrialba y La Lola.

Para el ensayo en el invernadero se utilizó frutos desprendidos del árbol. También se observaron muestras de frutos sometidos a una alta presión de inóculo natural.

Se observó además la morfología del micelio y los conidios de *M. rozeri*, creciendo sobre frutos inoculados y se comparó con aquella mostrada en crecimientos *in vitro* del patógeno.

No existen aparentemente diferencias anatómicas externas en los frutos de los cv 'Pound-7' (susceptible) y 'UF-296' (moderadamente resistente). Los dos presentan una epidermis alveolada, en la que sobresalen numerosos estomas del tipo anomocítico y gran cantidad de tricomas glandulares. El cv 'UF-296' presenta además tricomas estrellados.

Por consiguiente, parece que las características anatómicas externas no explican las diferentes respuestas al patógeno en los cultivares.

Tampoco se observaron diferencias de períodos de germinación de los conidios entre los cv 'Pound-7' y 'UF-296', en ambos casos dicha germinación ocurre por el poro germinativo o a través de la pared, entre las 7 y las 8 horas después de la inoculación sobre frutos incubados en cámara húmeda a una temperatura de 27 °C.

La infección aparentemente no ocurre por los estomas sino directamente a través de la epidermis.

Para MOAR se utilizó frutos sanos de La Lola de los cv 'Pound-7' y 'UF-296' y del cv 'UF-273', el cual se seleccionó por su alta resistencia al patógeno. Además, se usó frutos inoculados del cv 'Pound-7' que mostraban el síntoma de abultamiento comúnmente llamado "giba". Al analizar los tejidos internos del fruto de cacao de estos tres cultivares, se encontró, que los cv 'UF-273' (resistente) y 'UF-269' (moderadamente resistente) poseen un arreglo celular del parénquima subepidérmico más compacto y también un mayor contenido de sustancias, posiblemente fenólicas, en las vacuolas, con respecto al cv 'Pound-7' (susceptible). Esto

podría explicar los diferentes grados de resistencia a *M. roreri* entre los cultivares de cacao.

Para MET se usó frutos del cv 'Pound-7' de La Lola sanos e inoculados que mostraban giba.

También se realizó, en el campo, cortes de mazorcas de aproximadamente 60 días de edad (con gibas) del cv 'Pound-7'.

En los tejidos del cv 'Pound-7' enfermo se observó que las sustancias, posiblemente de origen fenólico, no sólo se encontraban en las capas del parénquima subepidérmico sino que también en capas más profundas de tejido.

Deberían hacerse análisis químicos de las deposiciones de las sustancias que se observan en las células del parénquima subepidérmico de los cv 'Pound-7', 'UF-296' y 'UF-273', y estudiar su posible relación con mecanismos de resistencia.

Palabras claves: cacao, cultivar, moniliasis, *Moniliophthora roreri* resistencia genética, *Theobroma cacao*, MER, MOAR, MET.

## SUMMARY

### Ultramicroscopic Study of the Process of Infection in Cacao Fruits by *Moniliophthora roreri*

One of the main diseases that affect cacao plantations is moniliasis, produced by the *Moniliophthora roreri* fungus (Cif & Par) Evans et al. In order to reduce the losses, different methods of control have been applied; among these, sanitary pruning and other cultural practices are the most common.

For the different control methods to be applied efficiently, it is necessary to have a better knowledge of the pathogen-host relationship. This knowledge would allow greater progress for an integrated and effective handling of the fungus. Unfortunately, little research has been done in this field. This is the main motivation for this study.

The objectives of this research were: to study the external structure of fruits from two cacao cultivars with different degrees of susceptibility to *M. roreri*, to find out the external morphology of the *M. roreri* fungus both *in vitro* and on cacao fruits themselves, to observe the germination process and prepenetration of the fungus on cacao fruits, to compare the internal tissue of healthy fruits from cacao cultivars with different degrees of susceptibility to *M. roreri*, and to observe the tissues of sick fruits in a susceptible cultivar.

Three microscopic techniques were used: Scanning Electron Microscopy (SEM), High Resolution Optical Microscopy (HROM) and Transmission Electron Microscopy (TEM).

For SEM, healthy fruits of 60 days of age that had been artificially inoculated were used, both in the field and in the greenhouse, of the 'Pound-7' (susceptible) and 'UF-296' (moderately resistant) cultivars from Turrialba and La Lola.

For the test in the greenhouse, fruits taken directly from the trees were used. Besides, samples of fruits under high pressure of natural inoculation were studied.

The morphology of the mycelium and the conidia of *M. rozeri* growing on inoculated fruits was observed; and it was compared to the one shown by the pathogen growing *in vitro*.

Apparently, there are no external anatomic differences between the fruits of the 'Pound-7' (susceptible) cultivar and the 'UF-296' (moderately resistant) cultivar. Both show an alveolar skin, on which there are noticeable anomocytic-type stomata and a large number of glandular trichomes. The 'UF-296' cultivar also presents star-like trichomes.

It seems therefore, that the external anatomic differences are not an indication of the different reactions of the cultivars to the pathogen. No differences in the germination periods of the conidia of the 'Pound-7' and 'UF-296' cultivars were observed; in both cases, such germination takes place through the germination pore and through the surface. This happens between 7 and 8 hours after the inoculation of fruits incubated in a humid chamber at a temperature of 27 °C. Apparently, the infection does not take place through the stomata, but directly through the skin.

For HROM, healthy 'Pound-7' and 'UF-296' fruits from La Lola were used, as well as the 'UF-273' cultivar, which was selected for its high resistance to the pathogen. In addition, inoculated 'Pound-7' fruits which showed the protruding system commonly called "hump" were also used.

When the internal tissues of the cacao fruits from these three cultivars were analyzed, it was found that the 'UF-273' (resistant) and the 'UF-269' (moderately resistant) have a cellular arrangement of the subepidermic parenchyma which is more compact and also contains a larger amount of substances, probably phenolic ones, in the vacuoles, as compared to the 'Pound-7' (susceptible). This might explain the different degrees of resistance to *M. rozeri* among the cacao cultivars.

For TEM, healthy 'Pound-7' fruits from La Lola that had been inoculated and showed a hump were used.

Pod cuttings of the 'Pound-7' cultivar of approximately 60 days of age were also used.

In the tissues of the sick 'Pound-7' cultivar, it was observed that the substances, probably of phenolic origin, were present not only in the layers of the subepidermic parenchyma but also in the deeper layers of the tissue.

Chemical analyses of the depositions of the substances that are observed in the cells of the subepidermic parenchyma of the 'Pound-7', 'UF-296' and 'UF-273' cultivars should be made, and their relation with resistance mechanisms should also be studied.

Key words: cacao, moniliasis, *Moniliophthora roreri*, genetic resistance, *Theobroma cacao*, SEM, HRM, TEM.

## LISTA DE FIGURAS.

FIGURA No.	Página
1	Superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' que muestra los alveolos (MER 2550X).....36
2	Superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' que muestra la agrupación de los estomas (MER 864X).....36
3	Detalle del estoma en la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 4410X).....36
4	Tricomas glandulares en la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 504X).....36
5	Detalle de la nervadura en la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 132X).....39
6	Estomas localizados sobre la nervadura en la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 1056X).....39
7	Tricomas en la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 576X).....39
8	Acercamiento que muestra las bacterias epífitas sobre la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 828X).....39
9	Distribución de los conidios de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' después de la inoculación (MER 690X).....41
10	Acercamiento de un tricoma glandular en mazorcas de cacao del cv 'UF-296' con los conidios de <b>Moniliophthora roreri</b> en la base (MER 2244X).....41

11	Desarrollo del micelio de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la superficie de la mazorca del cv 'Pound-7' (MER 1716X).....	41
12	Detalle del micelio de <b>Moniliophthora roreri</b> creciendo <i>in vitro</i> (MER 1980X).....	41
13	Desarrollo del micelio de <b>Moniliophthora roreri</b> en medio de cultivo (MER 6600X).....	43
14	Bifurcación del micelio de <b>Moniliophthora roreri</b> en medio de cultivo (MER 4620X).....	43
15	Cadena de conidios de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 3600X).....	43
16	Detalle de la membrana conidial que envuelve la cadena de conidios de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 6600X).....	43
17	Conidio de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' que muestra la localización del poro germinativo y el corrugamiento de la pared (MER 9660X).....	46
18	Detalle de dos formas de conidios de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 7200X).....	46
19	Inicio de la germinación del conidio de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 6600X).....	46
20	Germinación del conidio de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' que muestra el desarrollo de dos tubos germinativos (MER 1794X).....	46

21	Desarrollo de una estructura aparentemente apresorial de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 5760X).....	49
22	Germinación del conidio de <b>Moniliophthora roreri</b> sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' a través de su pared (MER 5520X).....	49
23	Germinación de un conidio de <b>Moniliophthora roreri</b> cerca de un poro estomático de la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 3450X).....	49
24	Posible penetración del tubo germinativo de <b>Moniliophthora roreri</b> a través de la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 4320X).....	49
25	Sección transversal de tejido sano de la mazorca de cacao del cv 'UF-273'. Obsérvese la acumulación de sustancias posiblemente fenólicas en las capas de parénquima subepidérmico (ML 240X).....	52
26	Sección transversal del tejido sano de la mazorca de cacao del cv 'UF-296'. Obsérvese la distribución de las sustancias posiblemente fenólicas en las capas de parénquima subepidérmico (ML 540X).....	52
27	Sección transversal del tejido sano de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7'. Obsérvese la distribución de sustancias posiblemente fenólicas en las capas de parénquima subepidérmico (MER 440X).....	54
28	Estoma de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' en sección transversal (ML 900X).....	54
29	Sección transversal de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' enfermo. Obsérvese los canales gomíferos (ML 235X).....	56

30	Sección transversal del tejido enfermo de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7'. Nótese la distribución de sustancias posiblemente fenólicas en capas más profundas del parénquima subepidérmico (ML 240X).....	56
31	Sección transversal de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' sano que muestra un espacio intercelular (MET 4440X).....	60
32	Sección transversal de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' enfermo que muestra un espacio intercelular (MET 15400X).....	60
33	Acercamiento de los depósitos osmiofílicos en la vacuola celular de tejido enfermo del cv 'Pound-7' (MET 22000X).....	60
34	Invaginaciones citoplasmáticas en el tejido enfermo de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MET 44000X).....	60

## 1. INTRODUCCION

La exportación del cacao en Costa Rica constituye una fuente importante de divisas para el país y trabajo para los agricultores de las zonas cacaoteras. No obstante, la presencia de enfermedades en dichas zonas, ha sido uno de los principales factores limitantes de su producción.

Una de las enfermedades que ha causado más daño en las plantaciones cacaoteras es la moniliasis producida por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par) Evans et al., la cual, entre los años 1978-1983 causó en Costa Rica una disminución del 80 por ciento en la producción nacional de cacao seco que condujo a una reducción de un 92 por ciento en el volumen de exportación (Costa Rica 1984).

Con el fin de disminuir las pérdidas ocasionadas por éste patógeno se han empleado diferentes formas de combate, entre las que se destacan las podas sanitarias y las prácticas culturales (Barros 1966, Barros 1977, Delgado y Brenes 1982), que tienen por objeto disminuir las fuentes de inóculo y producir un cambio en el microclima de la plantación que desfavorezca el desarrollo de la enfermedad. En otras ocasiones, además de dichas prácticas se ha recomendado el uso de fungicidas (Merchán 1981) y recientemente se ha trabajado en el combate biológico del patógeno (Jiménez 1985).

Por otra parte, la resistencia genética es un método bastante efectivo y el más económico para el agricultor. En este sentido, el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) inició un programa de búsqueda de resistencia genética en el cual se ha logrado resultados satisfactorios con algunos cultivares (Phillips 1986).

Un conocimiento más profundo entre la relación hospedero-patógeno permitiría mayores avances en el manejo integrado y efectivo del hongo; desafortunadamente pocos estudios se han hecho en este sentido, lo cual motivó la

realización de este estudio ultraestructural sobre el proceso de penetración e infección del hongo en cultivares con diferente grado de susceptibilidad.

Los objetivos de esta investigación fueron:

-Estudiar la estructura externa de frutos de dos cultivares de cacao con diferente grado de susceptibilidad a *M. royeri*.

-Conocer la morfología externa del hongo *M. royeri* tanto *in vitro* como sobre frutos de cacao.

-Observar el proceso de germinación y prepenetración del hongo sobre frutos de cacao

-Comparar el tejido interno de frutos sanos de cultivares de cacao con diferente grado de susceptibilidad a *M. royeri*.

Observar los tejidos de frutos enfermos en un cultivar susceptible.

## 2. REVISION DE LITERATURA

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo tradicional en Costa Rica. Constituye una de las principales actividades agrícolas y una importante fuente de divisas para el país (Enríquez 1983).

La enfermedad conocida como moniliasis del cacao es causada por el hongo *Moniliophthora roreri*. Se observó por primera vez en Ecuador en 1914, pero su identificación fue hecha por Rorer en 1918 (Díaz 1956, Ampuero 1967).

Esta enfermedad se encuentra actualmente distribuida en Ecuador, Colombia, Perú, Venezuela, Panamá, Costa Rica y Nicaragua (Enríquez 1983). La presencia del hongo *M. roreri* en las plantaciones cacaoteras de Costa Rica se informó en el año 1978 (Enríquez et al. 1981).

La severidad del ataque de la moniliasis y el nivel de pérdidas que puede ocasionar es muy variable y depende fundamentalmente de las condiciones ambientales imperantes en cada zona y del manejo que se realice en cada finca (Díaz 1956, Barros 1966, Ampuero 1967, Jorgensen 1975, Campuzano 1981).

En Ecuador las pérdidas se estiman entre 15 y 80 por ciento, sin embargo, la importancia de la enfermedad en este país no es reciente, ya que Rorer (1926) mencionó pérdidas de hasta un 95 por ciento.

En Costa Rica, la producción de cacao se redujo de 9.551 Ton en 1978 a 2.302,6 Ton en 1983 debido principalmente a los efectos de la moniliasis (Costa Rica 1984).

### 2.1 Sintomatología

La moniliasis ataca los frutos del cacao en cualquier estado de desarrollo, siendo los estados iniciales los más susceptibles (Bejarano 1961, Suárez 1971, Campuzano 1981).

Los primeros síntomas que se manifiestan sobre la superficie de los frutos enfermos pueden ser de dos tipos: la hidrósis, que comprende los "puntos aceitosos", y que consiste en la aparición de manchas translúcidas que corresponden a tejidos infectados, o hiperplasias, que son el resultado del aumento en el número de células que se manifiesta por medio de tumefacciones. Este síntoma es comúnmente llamado "abultamiento o giba" (Phillips 1986).

Los "puntos aceitosos" son redondos, de 1-2 mm de diámetro y de bordes definidos. Estos puntos coalescen hasta formar una mancha parda que se denomina usualmente "mancha chocolate", de borde irregular la cual se extiende sobre la superficie del fruto. En algunos casos, en la periferia de esta "mancha chocolate" se produce una coloración amarilla (Merchán 1981, Galindo 1987).

Otro síntoma que se ha observado es la amarillez, que corresponde a la "madurez prematura" o irregular, la cual resulta de la desintegración de la clorofila (Ampuero 1967, Merchán 1981, Schmitz 1985, Phillips 1986).

Sobre las "manchas chocolate" se desarrollan los signos del patógeno, los cuales se caracterizan por un micelio denso y compacto de color blanco denominado estroma. Sobre el estroma aparece posteriormente una gran cantidad de conidios debido a la esporulación del hongo, que ocurre 3 a 4 días después de que aparece la lesión, estos conidios le confieren a la masa conidial una tonalidad crema o café claro (Phillips 1986, Galindo 1987). Luego las mazorcas pierden agua, se secan y se arrugan produciendo los síntomas de momificación, pero pueden continuar la producción de conidios por períodos mayores de un año (Campuzano 1981, Merchán 1981).

Una vez que ocurre la infección, el hongo invade rápidamente los tejidos de la mazorca intercelular e intracelularmente (Bejarano 1961, Suárez 1971, Campuzano 1981). La mazorca enferma presenta el interior de la cáscara, el tejido central, la pulpa y las almendras rodeadas por una sustancia acuosa descompuesta (Díaz 1956, Ampuero

1967, Jorgensen 1975, Evans et al. 1978, Campuzano 1981). En algunos casos, éstas pueden carecer de síntomas externos y ser cosechadas, sin embargo, están en avanzado estado de deterioro (Ampuero 1967, Jorgensen 1975).

Los períodos en que se manifiestan los primeros síntomas son muy variables, aún en mazorcas de un mismo cultivar inoculadas artificialmente en forma simultánea. Esta variación depende principalmente de la edad de los frutos, del cultivar, del inóculo y de las condiciones ambientales imperantes (Sánchez 1982).

Estudios realizados mostraron que en frutos inoculados de los cv 'ICS-6' e 'ICS-95' de 80 días de edad, los primeros síntomas aparecen en promedio a los 34 días, el micelio entre los 3 y los 9 días después del primer síntoma de necrosis, y la esporulación entre los 3 y los 4 días después del micelio (Sotomayor 1965).

En observaciones posteriores se encontró que al inocular frutos de cacao de 30, 60, 90, y 120 días de edad, se encontró, que los síntomas correspondientes a la mancha café aparecieron entre los 54 y 78 días después de la inoculación, y que, entre el desarrollo de micelio y la esporulación transcurre aproximadamente una semana (Aranzazu y Cubillos 1977)

Merchán (1981) observó que al inocular frutos del cv 'EET-96' (susceptible) de 82-84 días de edad, los síntomas se presentaron como mínimo a los 15 días de efectuada la inoculación.

Sánchez (1982) consideró que cinco semanas después de la inoculación de frutos de los cv 'R-2' y 'R-8' de dos meses de edad, se podía iniciar la lectura de los síntomas.

Phillips (1986) encontró puntos aceitosos a los 21 días después de la inoculación en el 49 % de las mazorcas.

Se ha estudiado la posible relación que existe entre el color de la mazorca y la resistencia de la misma, y se ha informado que las mazorcas de color rojo y morado son menos atacadas que las mazorcas de color amarillo (Naundorf 1954).

Sin embargo, estudios posteriores realizados por Brenes (1983), mostraron que las características de color, rugosidad y dureza del pericarpio del fruto no presentaron correlación positiva con respecto a la incidencia de la enfermedad.

Díaz (1956) y Campuzano (1981) mencionaron que las mazorcas afectadas generalmente son de mayor peso que las mazorcas sanas, debido a la acumulación de sustancias por la maceración de tejidos.

## 2.2 Nomenclatura y taxonomía del patógeno.

Ciferri y Parodi (1933) realizaron una descripción completa del hongo y lo clasificaron como **Monilia roreri**.

Más tarde, Evans et al. (1978) propusieron incluir el hongo en el nuevo género **Moniliophthora** debido a que observaron la presencia de un doliporo en las septas del micelio vegetativo, que los hace afín con los Basidiomicetes.

La clasificación taxonómica del hongo es la siguiente:

Clase: Deuteromicetes, orden: Moniliales, familia: Moniliaceae, género: **Moniliophthora**, especie: **roreri**.

El crecimiento del hongo en medio de cultivo se describió como colonias superficiales que crecen unidas entre sí y ocasionalmente se observan separadas, forman un tejido compacto cuyo espesor varía entre 1-2 mm (Ciferri y Parodi 1933).

El micelio del hongo en los tejidos del hospedero es sinuoso, ramificado, de color rosado y mide de 2 a 2,5  $\mu$ m de diámetro (Jorgensen 1975).

Evans et al. (1978) describieron el micelio como hifas hialinas, de pared delgada, algunas veces septadas, con abultamientos y un grosor de 1,5  $\mu$ m a 5  $\mu$ m.

Existen dos tipos de hifas aéreas: hifas hialinas, septadas, con paredes levemente engrosadas y con 1,5-5  $\mu$ m de grosor y b- hifas hialinas o café pálido, paredes delgadas, no septadas, con un crecimiento de 1-3  $\mu$ m, raramente ramificadas (Evans et al. 1978, Evans 1981).

Las hifas pueden ser simples, pero también se bifurcan en la base en forma de U o V y, algunas veces, son trifurcadas (Jorgensen 1975). Se presentan conidióforos ramificados que dan origen a una cadena de conidios que madura basípetamente, los conidios son fácilmente separables de pared delgada, amarillo pálido. En masa son de color café (Evans et al. 1978, Evans 1981). Presentan un pltoplasto claro y homogéneo cuando jóvenes (Jorgensen 1975).

El número de conidios en la cadena es variable, así, Jorgensen (1975) observó de 2 a 20 conidios, mientras que Evans (1981) encontró de 4 a 10 conidios. El diámetro del conidio varía entre 7,5 a 10  $\mu\text{m}$  (Jorgensen 1975) y 6,5 a 25  $\mu\text{m}$  (Evans 1981).

### 2.3 Conidiogénesis y estructura septal.

Observaciones realizadas con microscopía de luz y electrónica, sugieren que la célula conidiogénica se diferencia de una hifa vegetativa por un hinchamiento del ápice y el desarrollo de un conidio holoblástico. Después de la diferenciación del conidio, un segmento de la hifa fértil, debajo de esta septa basal, a menudo se hincha y se diferencia en el próximo propágulo. Todos los conidios se forman de la misma manera por lo que la maduración es basípeta. Con el tiempo, los conidios tienden a redondearse y formar una pared delgada y de color café a la luz (Evans et al. 1978, Evans 1981). En algunas investigaciones realizadas con luz transmitida se observó una área refractiva opaca en la pared del conidio que sugiere la presencia de quitina (Evans et al. 1978, Evans 1981).

### 2.4 Fisiología de la germinación de los conidios

La germinación de las esporas, en general, implica un cambio de una condición inactiva a un crecimiento activo (Lilly y Barnett 1951).

La condición esencial para la germinación podría ser un grado de madurez apropiado y una pared permeable al agua y a los gases (Hawker 1950). Entre los requerimientos externos están una temperatura y humedad adecuadas, suplemento del oxígeno necesario, una concentración determinada del ión Hidrógeno. Es conveniente realizar pruebas de germinación, que aseguren que se trabaja con esporas viables (Lilly y Barnett 1951).

Clayton (1942), mencionó que se ha observado en varias especies, diferencias entre esporas en requerimientos nutricionales para llevar a cabo la germinación. Esto puede deberse a diferencias en su pared y en la composición y cantidad de alimentos de reserva (Hawker 1950, Lewis y Smith 1967, Yoder y Gillian 1985).

Otro factor que influye en la germinación de las esporas es la edad, López (1954) observó que la edad de las esporas de *M. roreri* tiene influencia sobre el porcentaje de germinación, el tiempo de germinación y el alargamiento del tubo germinativo. En esporas de 1-2 días de formadas se observó, que la germinación se inicia a las 4 horas, mientras que en esporas de 3-8 días de formadas (esporas maduras) la germinación se inicia a las 8 horas.

También el pH del medio sobre el cual crece el patógeno es un factor importante en la germinación de las esporas. Para *M. roreri* se observó que la germinación se lleva a cabo a un pH de 6,0, el crecimiento del micelio a 5,5, y la esporulación a pH de 7,0 (López 1954, Naundorf 1954, Barros 1977, Schmitz 1985).

Las esporas de *M. roreri* conservan su viabilidad hasta que el micelio esporulante prácticamente desaparece (18 meses), ya que éste hongo no vive en tejido muerto y las esporas de 40-50 días empiezan a adquirir doble pared como si formaran estructuras de resistencia (Campuzano (1976). Naundorf (1954) menciona sin embargo que los conidios de *M. roreri* tienen pocos días de viabilidad, especialmente al encontrarse en un ambiente relativamente seco.

El período de germinación *in vitro* para *M. roreri* también depende del medio de cultivo empleado. Es posible que en el hongo se presenten razas fisiológicas, o que éste pierda su virulencia en los medios de cultivo sobre los cuales prosperó (Bastidas 1953, Ram et al. 1987).

Herrera (1988) en estudios realizados *in vitro* con diferentes medios de cultivo encontró variabilidad en la tasa de crecimiento de las colonias, área esporulada, morfología de las colonias, formación de anillos y en las características de crecimiento del micelio.

## 2.5 Efecto de la temperatura sobre la germinación de los conidios

La temperatura afecta tanto el porcentaje de germinación, como el tiempo requerido para que la misma ocurra, y en ciertos hongos, la temperatura determina el método de germinación y la tasa de crecimiento del tubo germinativo (Lilly y Barnet 1951). También tiene influencia sobre la tasa de absorción de agua y sobre los procesos químicos involucrados en la germinación (Hawker 1950).

López (1954) en investigaciones realizadas con *M. roreri*, obtuvo pocas esporas germinadas cuando las sometió a temperaturas elevadas, en las esporas que lograron germinar, el proceso fue muy lento (10 horas). También observó que las bajas temperaturas (22 °C a 24 °C) favorecieron la germinación de las esporas, y que ésta temperatura tiene un efecto notorio sobre la turgencia de las mismas, el tiempo de germinación y la longitud de los tubos germinativos.

Campuzano (1981) observó que la germinación de las esporas de *M. roreri* ocurrió entre las 8 y las 9 horas a 20 °C.

De acuerdo a otros autores, la temperatura óptima de crecimiento para *M. roreri* es de 24 °C (Merchán 1981), 25-26 °C (Evans 1981) y de 26,5 °C (Schmitz 1985).

## 2.6 Proceso de germinación de los conidios y penetración e infección.

La humedad es esencial para la germinación de las esporas. La capacidad de humedecimiento de la pared celular de la spora y su permeabilidad podrían ser factores determinantes de la humedad relativa para que la germinación ocurra (Clayton 1942, Gottlieb 1950, Hawker 1950, Lilly y Bernet 1951, Yoder y Gillian 1985).

Clayton (1942) menciona que el agua entra a la spora por imbibición o por ósmosis y activa la enzima glicogenasa, que hidroliza el glicógeno a azúcares.

En investigaciones realizadas se encontró que los conidios de *M. rozeri* se plasmolizan a humedades relativas inferiores al 100 % (Bastidas 1953). López (1954) observó germinación de esporas jóvenes de *M. rozeri* a humedades relativas de 80,5 % y 100 %, aunque sólo a partir de las 8 horas. En dichas esporas la turgencia se inicia a las dos horas, cuatro horas más tarde aparece el tubo del primordio germinativo, el cual comienza a desarrollarse y diferenciarse hasta hacerse visible (López 1954, Jorgensen 1975).

El desarrollo de las estructuras de penetración e infección en el tubo germinativo de un hongo, son una característica particular de cada patógeno, y también del hospedero en que se encuentre (Jarosz et al. 1982, Maheshwari et al. 1967). Algunos estudios sugieren que las células superficiales podrían proveer los estímulos para la iniciación de estas estructuras, y que la composición de dichas células juega un papel muy importante (Wynn 1976, Jarosz et al. 1982).

También el proceso de penetración puede ser estrictamente mecánico (Yoder y Gillian 1985).

Los hongos fitopatógenos invaden las células del hospedero con una variedad de estructuras de infección especializadas (apresorio, garfio de infección, vesícula, hifa infectiva). Sin embargo, en la mayoría de los hongos

el apresorio, que es una diferenciación morfológica de la hifa, es la estructura de infección más desarrollada e importante con la cual el patógeno coloniza los tejidos del hospedero (Hoch y Staples 1987, Maheshwari et al. 1967).

Cuando el apresorio está posicionado en un sitio apropiado y en una dirección correcta sobre el hospedero, puede ser resistente a condiciones ambientales adversas y así asegurarse la infección. Para muchas royas esta posición en el hospedero es la etapa más crítica, debido a que, la invasión del hospedero puede ocurrir solamente vía estoma. Otros hongos pueden desarrollar el apresorio predominantemente en las paredes anticlinales, mientras que en otros no interesa un sitio específico (Hoch y Staples 1987, Maheshwari et al. 1967).

El hospedero resistente no es un factor limitante en el desarrollo del apresorio. Las respuestas de dichos hospederos son usualmente activas después de que el apresorio se ha formado o cuando la pared celular del hospedero se comienza a romper (Hoch y Staples 1987, Maheshwari et al. 1967).

La estructura apresorial puede formarse como respuesta a diferentes señales, así por ejemplo, el apresorio en los tubos germinativos de las uredosporas se desarrolla dependiendo de la topografía sobre la cual está creciendo, por ejemplo, los labios de la célula guarda del estoma o depresiones sobre la superficie (Hoch y Staples 1987, Maheshwari et al. 1967).

Otra causa que puede influir en la formación del apresorio son las sustancias químicas presentes en las células de la superficie del hospedero, entre las cuales se mencionan, los iones de potasio y los azúcares simples. Se ha observado que éstas sustancias pueden inducir diferenciación en los tubos germinativos de *U. appendiculatus* (Hoch y Staples 1987, Maheshwari et al. 1967).

Otro ejemplo es el encontrado en *P. graminis* que no sólo responde a la formación de estructuras apresoriales debido a

características topográficas de la superficie sobre la cual crece el tubo germinativo, sino que, hay una fuerte evidencia de la participación de sustancias químicas alrededor del estoma, que puede ser muy efectiva (Hoch y Staples 1987, Maheshwari et al. 1967).

El incremento abrupto de la temperatura de incubación y la luz también pueden contribuir en la formación de estructuras de infección, esta respuesta, fue observada en tubos germinativos de *P. coronata* y *P. graminis tritici* (Hoch y Staples 1987, y Maheshwari et al. 1967).

Rorer (1918) informó que los frutos jóvenes tienen estomas y también poseen una epidermis muy fina que permite la penetración del micelio de *M. royeri* a través de ésta sin la participación de cualquier otro agente.

Suárez (1971) y Jorgensen (1975) mencionaron que la penetración de *M. royeri* a la mazorca, sucede cuando la espora germina sobre la mazorca y penetra directamente a través de la epidermis en forma intercelular, en especial, entre las células cercanas a la base de los pelos glandulares.

Para lograr la infección de un hospedero, los hongos utilizan diversos mecanismos que incluyen la elaboración de sustancias especializadas tales como, enzimas necesarias para la penetración de la epidermis de la planta, toxinas y algunas hormonas que actúan como mensajeros químicos para ayudar a determinar si la planta que ha sido atacada es un hospedero apropiado (Yoder y Gillian 1985).

En el caso de *M. royeri* Suárez (1971) observó que al inicio de la infección, el hongo penetra intercelularmente, emitiendo conidióforos ramificados para propagarse en el interior del tejido. Posteriormente mediante emisión de nuevas hifas infectivas avanza intracelularmente hasta llegar a la zona del endocarpo, o sea, que observó micelio inter e intra celular en todo el pericarpo y en las semillas, cuando el fruto presentaba las primeras protuberancias. Los tejidos infectados del endocarpo están constituidos por células

alargadas, de paredes delgadas y de apariencia desorganizada, aquí *M. roreri* continúa la colonización de los tejidos.

Amaya et al. (1976) observaron un patrón de desarrollo del hongo *M. roreri* en frutos de cacao diferente al descrito por Suárez (1971) ya que el hongo puede invadir intracelularmente los tejidos del exocarpo y mesocarpo únicamente después de la colonización del endocarpo, desde donde el patógeno se desplaza inter e intracelularmente en dos direcciones, hacia la epidermis del fruto y hacia el interior de la semilla.

Los síntomas necróticos se producen 5 o 6 semanas después de la infección cuando la colonización de los tejidos por el hongo progresa de adentro hacia afuera (Galindo 1987).

## 2.7 Anatomía de la mazorca de cacao.

Bailey citado por Orellana (1953) menciona que el fruto de cacao es una drupa leñosa o mazorca muy variable en tamaño, forma y color.

La Rue citado por Orellana (1953) considera que dicho fruto es una baya por su capacidad de hendirse. El fruto se divide en tres partes: la capa epidérmica externa o exocarpo, la media mesocarpo y la interna endocarpo. Estas tres capas forman un pericarpo histológicamente heterogéneo (Cuatrecasas 1969)

El exocarpo consta de una epidermis compuesta de una sola capa de células isodiamétricas y de paredes gruesas cubiertas por una capa cutinosa. Aparecen también en la epidermis de la mazorca unos pocos pelos glandulares multicelulares y numerosos estomas, las células guardas tienen forma arrifionadas y contienen numerosos cloroplastos. Bajo la epidermis hay muchas capas de células parenquimáticas y fibras, las que forman el mesocarpo (7 a 10 mm de espesor). Hay también numerosas cavidades de 0,25-0,33 mm de diámetro en sección transversal. Dichas cavidades se observan circulares o subcirculares y longitudinalmente son

ligeramente irregulares, dos o tres veces su diámetro. Se ubican verticalmente o un poco inclinadas en relación a la superficie de la mazorca y están llenas de mucílago. Generalmente se localizan a través del mesocarpo.

El endocarpo consta de esclereidas y fibras. En mazorcas completamente desarrolladas, esta capa es relativamente dura y de 1,5 mm de espesor. Las esclereidas son casi tan largas como anchas.

Las paredes carpelares del ovario que permanecen en los frutos de cacao son largas y carnosas y consisten en células parenquimatosas de paredes delgadas y haces vasculares. En esta capa también hay cavidades pero en menor cantidad y más pequeñas que las del mesocarpo. En mazorcas adultas esta pared es de 4 o 5 mm pero se contrae en mazorcas ya maduras. Hay cinco carpelos que usualmente tienen 30 o 40 semillas cubiertas con un material mucilaginoso azucarado derivado del integumento externo del ovario y placentas.

Roth y Lindor (1971) realizaron descripciones anatómicas utilizando frutos de 6-6,5 cm de largo por 2 cm de diámetro. Observaron divisiones anticlinales en la epidermis externa. Las células de la primera capa subepidérmica se dividen principalmente en dirección anticlinal y poco periclinalmente.

En el pericarpo exterior desaparecen las hileras radiales de células. El anillo central limitante continúa el alargamiento de las células. El anillo central de haces vasculares se encuentra completamente diferenciado y las haces muestran un xilema "exoscópico". El pericarpo interior aumentó todavía en anchura y sus hileras tangenciales provocadas por el crecimiento de dilatación desaparecen cada vez más. La epidermis interna del pericarpo y la epidermis externa del tegumento exterior están todavía separadas (Roth y Lindor 1971).

De acuerdo a Bastidas (1953) los estomas se presentan en el fruto cuando éste tiene menos de 15 días de desarrollo,

Franco (1958) menciona que la densidad disminuye conforme el fruto envejece.

Estudios sobre la estructura externa de la mazorca de cacao utilizando microscopía electrónica de rastreo, indicaron que la mazorca presenta una epidermis alveolada, interrumpida por seudonervaduras poco numerosas y por estomas con corona papilada, algunos de ellos muy abiertos y otros cerrados. Los alveólos, muy acentuados, se encuentran presentes prácticamente sobre toda la superficie (Blaha y París 1987).

La epidermis del fruto presenta pelos erectos, cortos y en masa, que también se hallan presentes en las hojas del cacaotero. Se observan además pelos estrellados que se encuentran sobre las seudonervaduras, así como depósitos de cera y escamaciones en placas extremadamente finas. Las fisuras entre placas permiten ver una superficie subyacente en perfecto estado (Blaha y París 1987) .

Debe señalarse que la cutícula propiamente dicha es notablemente delgada (Blaha y París 1987).

## 2.8 Generalidades del combate por resistencia.

La resistencia puede definirse como la capacidad de un hospedero para reducir la incidencia o desarrollo del patógeno (Parlevliet 1979). La tolerancia no es sinónimo de resistencia y puede definirse como la capacidad de un hospedero de soportar la presencia del patógeno con poca o reducida reacción, la cual puede ser expresada, por síntomas menos severos de la enfermedad (Parlevliet 1979).

El combate por resistencia resulta para el agricultor el método más barato, sencillo, duradero y eficaz (Agrios 1985). Su uso en cacao es factible debido a la gran diversidad genética del género *Theobroma*, que incrementa la posibilidad de encontrar material con diversos grados de resistencia (Ampuero 1967).

Robinson citado por Parlevliet (1979) menciona dos tipos de resistencia, resistencia horizontal que es una resistencia a razas no específicas, caracterizada por la ausencia de interacciones genéticas entre los genotipos del hospedero y los genotipos del patógeno y resistencia vertical o resistencia a razas específicas, la cual se caracteriza por la presencia de interacciones entre los genotipos del hospedero y del patógeno.

## 2.9 Defensas bioquímicas y físicas que poseen las plantas contra el ataque de los patógenos.

Aún cuando las características estructurales proporcionan a las plantas varios grados de defensa contra el ataque de patógenos, cada vez, resulta más evidente que la resistencia de una planta al ataque de un patógeno no estriba tanto en las barreras estructurales, sino, en las sustancias que producen sus células antes o después de haberse producido la infección (Kosuge 1969).

La primera barrera entre una planta hospedera y un patógeno es la cutícula, que consiste de un polímero estructural, la cutina, la que está impregnada con cera. La cutina es un poliéster compuesto de 16 a 18 átomos de carbono (Purdy y Kolattukudy 1975, Soliday y Kolattukudy 1976, Baker y Bateman 1978, Kolattukudy 1980, Koller et al. 1981, Yoder y Gillian 1985, Macnamara y Dickson 1981).

Hay gran controversia sobre si la penetración de ésta cutícula y la segunda barrera, la pared celular, ocurre por fuerza física o por degradación enzimática (Purdy y Kolattuky 1975, Baker y Batteman 1978, Kolattukudy 1980, Koller et al. 1981).

La cutinasa, que es una esterasa con un sitio activo que contiene serina, histidina y un residuo carboxilo, es producida por una gran variedad de hongos patogénicos de plantas y juega aparentemente un papel muy importante en la penetración (Yoder y Gillian 1985). Un mínimo de dos

izoenzimas de cutinasa específicas para cutina y una esterasa no específica intervienen en la degradación de la cutina (Yoder y Gillian 1985).

Se han realizado numerosos estudios sobre la respuesta del hospedero a la infección causada por *Fusarium solani* f. sp. pisi. En estudios ultraestructurales con anticuerpos conjugados con ferritín preparados contra la cutinasa, se observó que *F. solani* f sp pisi secretó una cutinasa durante la infección (Soliday y Kolattukudy 1976, Lin y Kolattukudy 1980, Koller et al. 1981, Yoder y Gillian 1985).

Rijkenberg et al. (1980) en estudios realizados con microscopía electrónica de rastreo (MER) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) obtuvieron buena evidencia de la disolución enzimática de la cutícula de frutos de tomate durante la penetración de *Botrytis cinerea*.

Las enzimas también están asociadas con maceración de tejidos. Bateman y Millar citados por Albersheim et al. (1969) han concluido que las endo-pectiglicosidasas y las liasas pueden ser consideradas como agentes importantes en maceración de tejidos, estas observaciones fueron realizadas en tejidos macerados por *Sclerotinia fructigena*.

Es importante mencionar que los patógenos frecuentemente producen enzimas degradativas cuando crecen bajo ciertas condiciones, pero fallan en un medio ambiente diferente (Albersheim et al. 1969).

## 2.10 Los compuestos fenólicos en las enfermedades de las plantas

Algunos mecanismos bioquímicos importantes son involucrados en el control de la biosíntesis y metabolismo de los compuestos fenólicos en las plantas superiores. Entre ellos se mencionan:

a- La regeneración, inhibición o activación enzimática por productos intermedios y finales del proceso metabólico.

b- La represión o inducción de la síntesis enzimática.

Existen evidencias de que dichos mecanismos funcionan durante la respuesta de las plantas a la presencia de los patógenos (Kosuge 1969).

Una de las mayores propiedades biológicas de los compuestos fenólicos es su actividad antimicrobiana y se asume con frecuencia que éste es su principal papel en las plantas. A menudo inhiben el proceso de germinación y penetración de las esporas de los hongos y, muy ocasionalmente lo aceleran (Friend 1979).

Es posible que en algunos casos, los factores ambientales pueden influir sobre el nivel de fenoles presente en los tejidos de las plantas, conduciendo a cambios en la resistencia o susceptibilidad de las plantas hospederas (Goodman et al. 1967).

Algunos de los fenoles relacionados con la resistencia a las enfermedades se encuentran profusamente en las plantas sanas, a los que se les denomina compuestos fenólicos comunes. Sin embargo, algunos otros fenoles no se producen en plantas sanas, excepto cuando son estimuladas por algún patógeno o por daño químico o mecánico, a estos compuestos se les conoce como fitoalexinas (Friend 1979).

De acuerdo a la teoría de la fitoalexina de resistencia a enfermedades, se asume que la resistencia al ataque por hongos patógenos es causada por una rápida acumulación de fitoalexinas para un nivel antifungoso. Los tratamientos que causan la acumulación de fitoalexinas hacen a las plantas más resistentes. Por otra parte, la susceptibilidad ha sido explicada en la suposición de que las fitoalexinas pueden ser rápidamente detoxificadas por patógenos virulentos (Friend 1979).

El establecimiento de la infección podría involucrar un crecimiento de los hongos intercelular o intracelular o ambos. Si el hongo establece una relación simbiótica, la cual marca una infección biotrófica en la penetración de la pared celular, el daño del hospedero es limitado. Sin embargo, en patógenos nectotróficos, los cuales matan las

células del hospedero en avance al desarrollo de las hifas, usualmente causan considerable disolución de la pared celular, la cual puede por sí mismo causar muerte de las células del hospedero o producir fitotoxinas (Friend 1979).

Se ha encontrado plantas hospederas que contienen inhibidores de la germinación y del crecimiento de los hongos. Por ejemplo, la cebolla contiene inhibidores fenólicos de la germinación de esporas antes de que se lleve a cabo la infección, así el catecol y el ácido protocatéico actúan como inhibidores de la germinación de *Colletotrichum circinans* sobre laminillas de cebolla coloreada (Friend 1979, Goodman et al.1967).

Otro ejemplo de compuestos fenólicos relacionados con la resistencia de plantas al ataque de hongos es el caso del ácido clorogénico, encontrado frecuentemente en tubérculos de papa, en donde se ha obtenido correlación entre el ácido clorogénico en varios tejidos de la papa y su resistencia a patógenos tales como *Streptomyces scabies*, *Verticillium alboatrum* y *Phytophthora infestans* (Friend 1979).

Sin embargo, Kuc citado por Friend (1979) menciona que la presencia de los ácidos caféico y clorogénico no siempre explican las actividades inhibitorias contra un rango amplio de hongos y depende de la concentración en que se encuentren. Estos ácidos también participan en la formación de capas de tejidos protectores como los callos y el corcho (Agris 1985).

Aunque muchos compuestos fenólicos presentes en las plantas pueden no tener actividad antimicrobiana, es importante mencionar que algunos productos de oxidación de estos compuestos, podrían tener actividad antimicrobiana indirecta, asociada por ejemplo a la inhibición de enzimas extracelulares encargadas de la degradación de la pared celular necesarias en el proceso de infección del hongo (Friend 1979).

## 2.11 La lignificación como mecanismo de defensa.

La lignina uno de los biopolímeros más abundantes, es un constituyente típico de la pared secundaria. Su formación se inicia hasta que cesa el crecimiento de la pared primaria, usualmente su deposición comienza cerca de la lámina media y prosigue hacia el interior (Hall et al. 1982, Flores 1989).

Burgess citado por Flores (1989) menciona que la lignina le confiere a la planta rigidez y resistencia a la degradación química, a nivel celular su deposición localizada protege a la planta de la hidrólisis enzimática. Es resistente a la degradación por la mayoría de microorganismos y puede formarse como una respuesta a la penetración microbial y al daño mecánico (Vance et al. 1980).

Ride mencionado por Vance et al. (1980) sugirió cinco razones por las que la lignificación puede impedir el crecimiento de hongos a través de los tejidos de las plantas:

1- La lignina confiere a las paredes mayor resistencia a la penetración mecánica.

2- La lignificación en el punto de ataque puede conferirle a la planta resistencia a la degradación enzimática.

3- La lignificación de las paredes podría restringir la difusión de enzimas y toxinas fungales al hospedero y de agua y de nutrimentos del hospedero al hongo.

4- El peso molecular de los precursores fenólicos de lignina y radicales libres producidos durante la polimerización podrían inactivar las membranas del hongo, enzimas, toxinas u otros factores de patogénesis.

Hijwegen citado por Friend (1979), realizó experimentos con pepinos y con el patógeno *Cladosporium cucumerinum*, encontrando lignificación después de la inoculación de una variedad resistente, pero no en una susceptible de la planta hospedera (Friend 1979).

## 2.12 La importancia del grosor de la cutícula en la resistencia de las plantas a las enfermedades.

Correlaciones inversas del grosor de la cutícula del hospedero con la virulencia del ataque de hongos ha sido observada. Así, es posible que la resistencia genética del hospedero podría también involucrar el grosor de la cutícula (Koller et al. 1981). Sin embargo, dicho grosor no siempre está relacionado con resistencia y muchas variedades vegetales que presentan una cutícula de grosor considerable son fácilmente invadidas por patógenos que penetran en forma directa (Jaroz et al. 1982). Esto podría deberse a que el grosor de la cutícula varía dependiendo de las condiciones ambientales, y que la importancia de la cutícula podría radicar más bien en su composición química (Martín y Juniper 1970)

## 2.13 Algunas metodologías aplicadas en el estudio del desarrollo de patógenos en los vegetales.

Se han realizado estudios histopatológicos, con el fin de conocer la interacción entre *T. cacao* y *M. royeri*, especialmente con respecto al proceso de avance del hongo en la mazorca. Se encontró que la técnica más adecuada para el tratamiento del material esclerosado o momificado es el uso de una solución ablandadora de alcohol etílico y glicerina seguido de una serie de alcohol butílico terciario. La mejor tinción para diferenciar tejidos de la mazorca de cacao fue Safranina-"Fast green", mientras que en estudios de penetración y localización del hongo, en especial la intercelular, se usó con excelentes resultados la tinción de hematoxilina-eosina (Amaya et al. 1976).

Morell et al. (1985) encontraron que la aglutinina del germen de trigo marcada con sustancias fluorescentes aumentaba grandemente la visibilidad de las hifas de todos los hongos, a diferencia de lo obtenido con el azul

convencional de safranina o picro-anilina. De esta manera las lectinas marcadas con sustancias fluorescentes proveen una técnica mejorada para observar hongos en secciones de madera.

También se ha investigado sobre el uso de MER en tejidos seccionados enbebidos en parafina. Combinan el seccionamiento seriado y la tinción diferencial usada en la microscopía de luz convencional, con la alta magnificación, con una mayor profundidad de foco y una mayor resolución obtenida por medio de MER. Con ésta técnica se hace posible la visualización de tres orientaciones dimensionales de las estructuras tanto externas como internas. Además, esta técnica permite la correlación directa de imágenes de microscopía de luz con aquellas obtenidas por medio de MER. De este modo se mejora la interpretación de las fotografías obtenidas en microscopía electrónica (Gaudet y Kokko 1984).

Getz et al. (1983) realizaron estudios del proceso de infección de *Pseudomonas syringae* p.v. tomato en frutos de tomate utilizando MER, la cual permitió observar detalladamente las estructuras del patógeno sobre la superficie del fruto.

### 3. MATERIALES y METODOS

#### 3.1 Localización del ensayo

La obtención del material vegetal y las inoculaciones artificiales de campo, se realizaron en las plantaciones de cacao que el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) posee en Turrialba y La Lola.

Turrialba está ubicada a una altitud de 602 msnm, con temperatura promedio anual de 21,5 °C, humedad relativa promedio de 87,7 % y una precipitación promedio anual de 2.631 mm. La finca La Lola se encuentra en 28 Millas en la provincia de Limón a una altitud de 40 msnm, con temperatura promedio anual de 24,7 °C, humedad relativa promedio de 85,9 %, y una precipitación promedio anual de 3.541 mm.

En el Invernadero del Laboratorio de Fitopatología del CATIE se realizó inoculaciones artificiales de frutos desprendidos del árbol provenientes de ambas localidades. Además en este laboratorio se inició el procesamiento de las muestras para cada una de las técnicas de microscopía usadas y se realizó las observaciones de microscopía de luz.

En la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) de la Universidad de Costa Rica (UCR) se completó el procesamiento de las muestras y se llevó a cabo las observaciones de microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

El ensayo se realizó de abril de 1986 a junio de 1988.

#### 3.2 Descripción del material experimental

Se utilizó frutos de 60 días de edad procedentes de Turrialba y La Lola, obtenidos mediante polinización artificial.

Como se detallará más adelante, se usó tres técnicas de procesamiento de muestras para las observaciones microscópicas: Microscopía Electrónica de Rastreo (MER),

Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

El material usado para cada una de estas técnicas varió en cuanto a su procedencia, cultivar (es) utilizado (s), estado de las mazorcas y tipo de inoculación tal como se resume en el Cuadro 1.

Para MER se usó frutos sanos e inoculados artificialmente de los cv 'UF-296' y 'Pound-7' obtenidos en Turrialba y La Lola. Se empleó frutos procedentes de ambas localidades con el objeto de determinar si existen diferencias anatómicas entre frutos de un mismo cultivar con diferente procedencia. El cv 'Pound-7' se seleccionó por ser un cultivar con alta susceptibilidad a la moniliasis (Phillips 1986) y el cv 'UF-296' se seleccionó por su moderada resistencia a la enfermedad (Brenes 1983).

También se usó frutos de 60 días de edad sometidos a una alta presión de inóculo natural de los cultivares anteriormente mencionados, con el fin de comparar la distribución y el desarrollo del hongo sobre la superficie del fruto con respecto a los frutos inoculados artificialmente.

Con la ayuda de MER, se observó además la morfología del micelio y los conidios de *M. roseri* creciendo sobre frutos inoculados y se le comparó con aquella mostrada en crecimientos *in vitro* del patógeno. Este estudio se realizó también con el objeto de tener un amplio conocimiento del hongo, y asegurar que las estructuras observadas sobre las mazorcas inoculadas eran efectivamente pertenecientes a *M. roseri*.

Para MOAR se utilizó frutos sanos de La Lola de los cv 'Pound-7' y 'UF-296' y del cv 'UF-273', el cual se seleccionó por su alta resistencia al patógeno (Phillips 1986). Además se usó frutos inoculados del cv 'Pound-7' susceptible que mostraban el síntoma de abultamiento comúnmente llamado "giba".

Cuadro 1: Procedencia, estado de los frutos y tipo de inoculación de los cultivares de cacao utilizados para cada una de las técnicas microscópicas. Turrialba y La Lola 1986-87

TECNICAS MICROSCOPICAS	CULTIVARES EMPLEADOS	PROCEDENCIA	ESTADO DE LOS FRUTOS	TIPO DE INOCULACION
MER	'Pound -7'	Turrialba y	Sano e	Campo,
	'UF-296'	La Lola	inoculado	invernadero e infección natural
MOAR	'Pound-7'	La Lola	Sano y con Giba	Campo
	'UF-296'	La Lola	Sano	---
	'UF-273'	La Lola	Sano	---
MET	'Pound-7'	La Lola	Sano y con Giba	Campo

MER: Microscopía Electrónica de Ratreo

MOAR: Microscopía Optica de Alta Resolución

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión

'Pound-7': Cultivar susceptible

'UF-296': Cultivar moderadamente resistente

'UF-273': Cultivar resistente

Turrialba:(602 msnm, 21,5 °C, 87,7 % H.R., 2.631 mm de lluvia)

La Lola :(40 msnm, 24,7 °C, 85,9 % H.R., 3.541 mm de lluvia)

Para MET se usó frutos del cv 'Pound-7' de La Lola, sanos e inoculados que mostraban giba, con el objeto de comparar el tejido sano con el enfermo. Para estas comparaciones no se utilizó los cv 'UF-296' ni 'UF-273' por cuanto en los mismos no se presentó este síntoma.

También se realizó en el campo cortes de mazorcas de aproximadamente 60 días (con gibas) del cv 'Pound-7' con el fin de observar a simple vista el avance del hongo en los tejidos internos del fruto.

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Polinizaciones manuales

Con el objeto de disponer de material experimental durante todo el ensayo, se realizó polinizaciones manuales, aproximadamente cada 3 meses durante un período de 18 meses (abril de 1986 a setiembre de 1987).

#### 3.3.2 Inoculaciones artificiales

Para MER se usó frutos sanos e inoculados artificialmente de los cv 'Pound-7' y 'UF-296' tanto en el campo como en el invernadero. Para las otras técnicas microscópicas además de frutos sanos se empleó frutos enfermos obtenidos mediante inoculaciones de campo.

Las inoculaciones artificiales de campo e invernadero se efectuaron siguiendo las siguientes metodologías:

##### a. Inoculaciones en el campo

Se inoculó mazorcas de 60 días de edad obtenidas mediante polinización manual. Se siguió la metodología descrita por Phillips (1986) que consiste en preparar una suspensión de conidios de *M. rozeri* en agua destilada, a la cual se le agregó Twin-80 al 0,01 % para favorecer la

dispersión de los conidios. Se usó una concentración de  $2 \times 10^5$  conidios/ml, la que se calculó con un hematocímetro. Los conidios se obtuvieron a partir del medio de cultivo V-8 (V-8 20 %,  $\text{CaCO}_3$  0.3 % y agar 1.8 %) incubado en condiciones de laboratorio (22-25 °C), en donde el hongo creció 16 días.

Con la suspensión preparada aproximadamente media hora antes de la aplicación, se inoculó frutos de 60 días de edad obtenidos mediante polinización manual. La aplicación se realizó con un atomizador DeVilbiss No 15, tratando de cubrir uniformemente las mazorcas.

Inmediatamente después de la inoculación, se cubrió las mazorcas con bolsas transparentes de polietileno y se introdujo dentro de las bolsas sin perforar, una toalla humedecida con 50 ml de agua destilada, con el objeto de proveer una cámara húmeda dentro de ellas. Al cabo de dos días se cortó los extremos inferiores de las bolsas y se eliminó las toallas.

#### b. Inoculaciones en el invernadero

Se inoculó mazorcas de 60 días de edad obtenidas por polinización manual con inóculo obtenido de la misma manera descrita en el punto anterior.

Las mazorcas antes de ser inoculadas fueron colocadas en cajas plásticas transparentes (38x23x16cm) a las cuales se les suministró 25 ml de agua libre con el objeto de alcanzar una atmósfera saturada de humedad dentro de las mismas.

Para evitar el contacto entre las mazorcas y el agua libre, éstas fueron apoyadas sobre bases metálicas.

La inoculación se realizó asperjando las mazorcas con una suspensión de  $2 \times 10^5$  conidios/ml con un atomizador DeVilbis No 15.

### 3.3.3 Obtención de las muestras

Tanto en campo como en invernadero se tomó muestras de las mazorcas sanas y/o enfermas mediante la obtención de segmentos del exocarpo de los surcos del fruto de tamaño variable según la técnica microscópica empleada. Los segmentos fueron tomados del "ecuador" de la mazorca así como de sus extremos, con el fin de observar si existía alguna diferencia anatómica en el fruto.

Para MER estos segmentos fueron de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> por 0,5 cm de profundidad. Para MOAR midieron aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> por 0,5 cm de profundidad, y para MET fueron de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> por 0,5 cm de profundidad.

Para las observaciones del hongo *in vitro*, se tomó un segmento de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de la periferia del micelio del hongo en el medio de cultivo.

### 3.3.4 Preparación de las muestras para cada una de las técnicas microscópicas empleadas.

A continuación se describe la metodología empleada en la preparación de las muestras para cada técnica microscópica.

#### a. Procesamiento de las mazorcas para Microscopía Electrónica de Rastreo

La MER permitió observar las superficies tanto del hospedero como del patógeno y además fue muy útil para determinar el período de germinación y las actividades de prepenetración de los conidios de *M. royeri*.

Se trabajó con frutos de 60 días de edad de los cv 'UF-296' y 'Pound-7' (sanos e inoculados).

Para el estudio de la superficie de los frutos sanos se tomó diez muestras de cada cultivar, y se dispuso de 5 mazorcas por cada uno.

Para las observaciones del período de germinación de las esporas se estableció un ensayo y se tomaron muestras seriadas cada hora por 8 horas. Luego en un segundo ensayo se muestreo cada 6 horas por 66 horas con el fin de observar el desarrollo del tubo germinativo. En el caso de los frutos inoculados se tomó cinco muestras de cada cultivar. Las muestras se tomaron del "ecuador" del fruto y de los extremos de las mazorcas. Para cada muestreo se dispuso de 3 mazorcas inoculadas.

Cada muestra se colocó en solución fijadora FAA (alcohol etílico:formalina:ácido acético glacial:agua destilada) en las siguientes proporciones volumétricas (47,5:3,5:5,0:44,0) a temperatura ambiente durante un período de 2-3 días. Seguidamente se lavó con agua destilada las muestras durante 3 períodos de 15 minutos cada uno con el fin de eliminar el exceso de solución fijadora.

Posteriormente se deshidrató las muestras siguiendo una serie ascendente de alcohol etílico (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 100 % y 100 %) durante períodos de 15 minutos cada uno.

Se secó las muestras utilizando un Secador de Punto Crítico Hitachi modelo HCP-I o HCP-II.

Se realizó 3 cambios de CO<sub>2</sub>.

Una vez secas las muestras, se colocaron sobre portamuestras de aluminio y se fijaron con papel adhesivo de doble cara, además se les colocó a las muestras en sus extremos pintura de plata.

Luego se colocó las muestras en el cobertor iónico Hitachi modelo IB-3 y se cubrió con una capa de oro de aproximadamente 200-400 nm.

Las observaciones se realizaron en el microscopio electrónico de rastreo Hitachi modelo S-570

Para el procesamiento del hongo *in vitro* se siguió la misma metodología anteriormente descrita.

b. Procesamiento de las mazorcas para Microscopía Óptica de Alta Resolución.

Por medio de MOAR se logró hacer un reconocimiento de los tejidos internos de frutos de cacao sanos y enfermos. Esta técnica permite hacer observaciones en microscopio de luz con una mayor resolución en comparación con técnicas como la parafina.

Se trabajó con frutos sanos de 60 días de edad de los cv 'UF-273', 'UF-296' y 'Pound-7'. También se utilizó el cv 'Pound-7' con giba.

Se tomó cinco muestras del "ecuador" de las mazorcas así como de los extremos de las mazorcas. Para cada muestreo se dispuso de 5 mazorcas sanas; para el cv 'Pound-7' con giba se muestreó 5 mazorcas, la muestra se tomó del área que presentó este síntoma.

Se colocó cada muestra en solución fijadora Karnovsky (glutaraldehído al 2.5 % y paraformaldehído al 2 %) (Karnovsky 1965) en amortiguador Sorensen de fosfatos al 0,1M, pH 7,4, y se mantuvo a una temperatura de 4 °C por un período de 20 horas

Seguidamente se procedió a realizar tres lavados con amortiguador Sorensen de fosfatos al 0,1 M, pH 7,4 cada dos horas.

Posteriormente se deshidrató las muestras con una serie ascendente de alcohol etílico (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % y 100 %) durante períodos de 20 minutos cada uno.

Las muestras tratadas en alcohol de 100 % fueron colocadas en una mezcla de alcohol:óxido de propileno en las proporciones 3:1, 2:2, 1:3 durante un período de 20 minutos cada uno, hasta finalmente llegar a óxido de propileno puro, donde se hicieron cambios de 20 minutos cada uno.

Luego se colocó dichas muestras en una mezcla de óxido de propileno : resina Spurr (Spurr 1969) en las proporciones 3:1, 2:2 durante una hora cada una. Posteriormente se dejó durante toda la noche en una proporción 1:3 de la mezcla

anterior. Transcurrido éste tiempo se realizó tres cambios de resina al 100 % de dos horas cada uno.

Finalmente se preparó los bloques de resina utilizando cápsulas planas para lograr dar orientación a la muestra y se colocó 0,5 ml por muestra.

Las cápsulas fueron colocadas en una estufa a 70 °C durante dos días.

Las pirámides de los bloques se hicieron manualmente y luego se obtuvieron cortes semi-finos de 1-2  $\mu$ m de grosor con navaja de vidrio, en un ultramicrotomo Sorvall modelo MT-2B.

Los cortes se recogieron de la cubeta de la cuchilla y se colocaron en porta-objetos previamente esterilizados sobre una gota de agua destilada. Posteriormente los mismos se colocaron sobre una plantilla a una temperatura de 30 °C por un periodo de 30 minutos.

Para la tinción de los cortes se utilizó azul de toluidina siguiendo la metodología de Shroeder (Shroeder 1980).

Para el montaje final se utilizó una gota de resina Spurr. Una vez listas las láminas se colocaron en una estufa a 40 °C por un período de 24 horas.

La observación de las láminas se realizó en un microscopio de luz marca Olympus, modelo BH-2.

#### c. Procesamiento de las mazorcas para Microscopía Electrónica de Transmisión.

La MET permitió hacer comparaciones de tejidos internos de frutos sanos y enfermos a muy altas magnificaciones.

Se trabajó con frutos sanos e inoculados de 60 días de edad del cv 'Pound-7'.

Se tomó cinco muestras tanto del "ecuador " de la mazorca como de los extremos. Para cada muestreo se contó con 5 mazorcas, para el cv 'Pound-7' con giba se muestreó 5 mazorcas, la muestra se tomó del área que presentó este síntoma.

Se colocó las muestras en solución fijadora Karnovsky y se mantuvo a una temperatura de 6 °C por un período de 3 días.

Se procedió a realizar cinco lavados con amortiguador Sorensen de fosfatos al 0.1 M, pH 7,4 cada 2 horas.

Se continuó con una segunda fijación en tetróxido de osmio al 2 % en amortiguador Sorensen de fosfatos al 0.1 M, pH 7.4, por un período de 3 horas a temperatura ambiente (22-25 °C).

De aquí en adelante se siguió con la misma metodología ya descrita para las muestras a observar en microscopía de luz.

Los primeros cortes o fases que se obtuvieron tenían un grosor de aproximadamente 190 nm. Las fases se recogieron con una aguja de la cubeta de la cuchilla y se colocaron en portaobjetos previamente esterilizados, sobre dos gotas de agua destilada que se colocaron luego sobre una plantilla a 30 °C hasta que el agua destilada se evaporara sin hervir.

Seguidamente se agregó azul de toluidina y se calentó durante 1-2 minutos. Se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de azul de toluidina. Una vez secos se procedió a observar la fase al microscopio de luz.

Después de la observación de la fase se procedió a reducir la cara de la pirámide al área de interés.

Se realizó cortes ultrafinos de aproximadamente 60 nm que se colocaron en rejillas No 300 previamente cubiertas con Bioden (Okenshoji, Tokyo, Japón).

Posteriormente se utilizó el método de la doble tinción. Se usó primero la tinción con acetato de uranilo (Watson 1958) y luego la tinción de Reynolds (Reynolds 1963, Berlin y Miksche 1976).

Una vez teñidos los cortes se procedió a cubrirlos con una capa de carbón utilizando un Evaporador de Alto Vacío Hitachi Modelo HUS-5. La observación de los cortes se realizó con el Microscopio Electrónico de Transmisión Hitachi H-300 a un voltaje de aceleración de 75 KV.

### 3.3.5 Observaciones macroscópicas de mazorcas enfermas

Se tomó 5 mazorcas de aproximadamente 60 días de edad que presentaron el síntoma de giba.

A estas mazorcas se les realizó un corte transversal sobre el área donde apareció la giba y se sumergió en fijador FAA.

Luego se procedió a observar a simple vista el "hilo de infección" que presentaban los frutos en sus tejidos debido a la presencia del patógeno.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Observaciones realizadas con Microscopía Electrónica de Rastreo

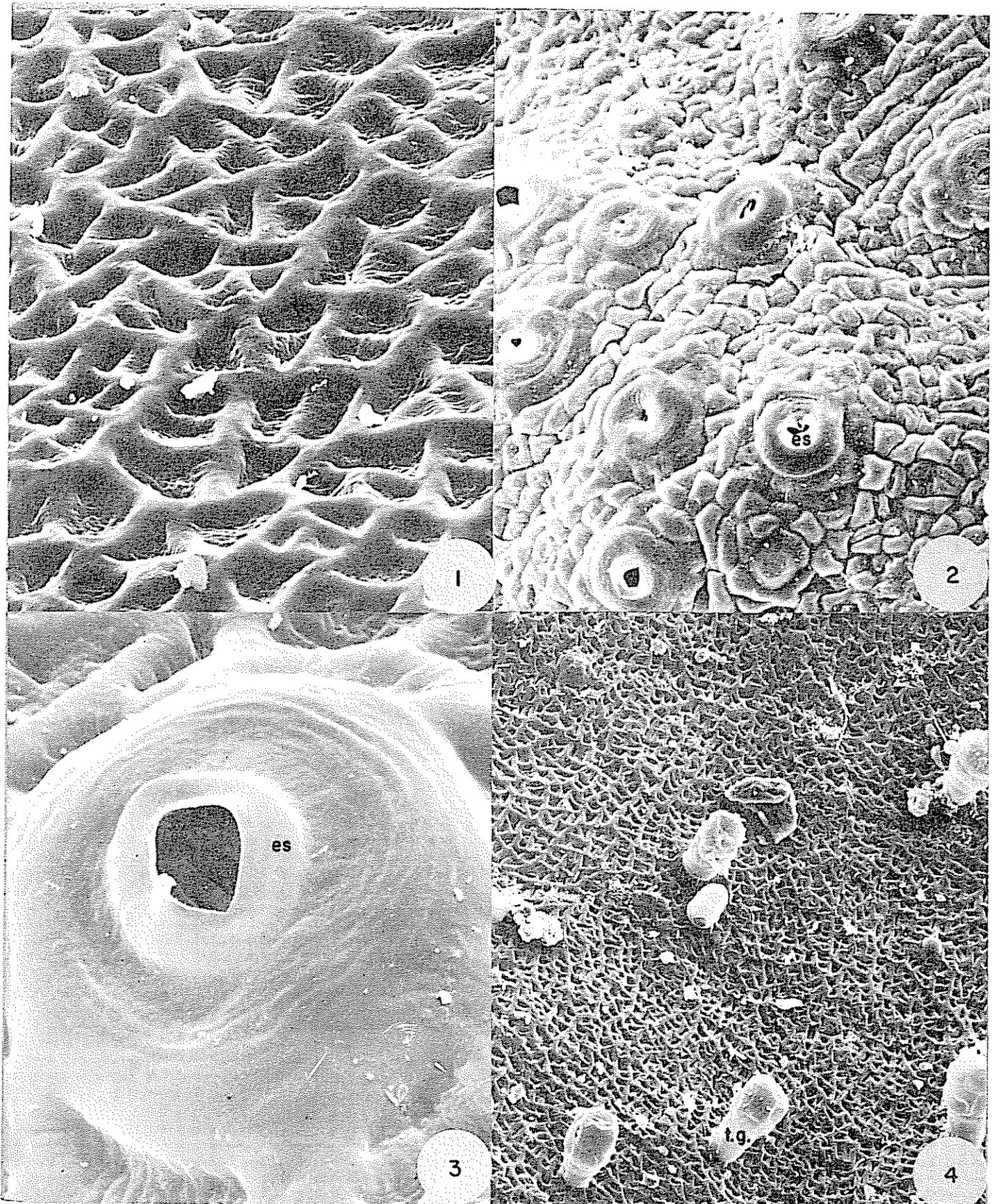
Las observaciones realizadas con MER revelaron que no existen diferencias anatómicas en la superficie de los frutos de 60 días entre los cv 'UF-296' y 'Pound-7' ni entre las procedencias de los mismos, ya que, se encontraron características anatómicas similares en los frutos procedentes de Turrialba y La Lola.

Tampoco se observó diferencias anatómicas externas entre las muestras tomadas del "ecuador" de los frutos y sus extremos. El proceso de germinación de los conidios del patógeno no mostró diferencias de acuerdo a su posición en el fruto ni a su procedencia, ya sea por inoculación o infección natural.

#### 4.1.1 Características anatómicas de frutos sanos

Los frutos de los cv 'Pound-7' y 'UF-296' de 60 días de edad presentan una epidermis alveolada en la que sobresalen numerosos estomas del tipo anomocítico (Fahan 1978), sin células subsidiarias únicamente células oclusivas arriñonadas. Estos estomas se distribuyen sobre protuberancias en grupos de 2 a 10 (Fig. 1, Fig. 2). La mayoría de los estomas se observan con el ostiolo abierto, el cual mide en promedio 9  $\mu\text{m}$  de largo (promedio de 10 mediciones) (Fig. 3).

Se observó además, gran cantidad de tricomas glandulares que presentan terminales en forma redondeada. Dichos tricomas se distribuyen sobre toda la superficie del fruto y tienen una longitud promedio de 9  $\mu\text{m}$  (promedio de 10 mediciones) (Fig. 4).



- Fig. 1. Superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' que muestra los alveolos (MER 2550X).
- Fig. 2. Superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' que muestra la agrupación de los estomas (MER 864X).  
es:estoma
- Fig. 3. Detalle del estoma en la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 4410X).  
es:estoma
- Fig. 4. Tricomas glandulares en la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 504X).  
tg.:tricoma glandular

También se observó en la superficie de los frutos venas menores que se proyectan longitudinalmente. En la epidermis que cubre dichas venas se encuentra gran cantidad de estomas también del tipo anomocítico (Fig. 5, Fig. 6).

Luego del exámen de 20 muestras fue evidente que la única diferencia anatómica superficial entre las mazorcas de los cv 'Pound-7' y 'UF-296' fue la presencia en éste último de tricomas estrellados (Fig. 7).

Se observó también altas poblaciones de bacterias epífitas que se desarrollan sobre la superficie de los frutos de cacao en estos dos cultivares (Fig. 8).

#### 4.1.2 Disposición de los conidios de *Moniliophthora roreri* sobre la superficie de los frutos

Al inocular frutos de 60 días de los cv 'Pound-7' y 'UF-296' no se observó diferencias entre ambos cultivares en cuanto a la disposición de los conidios de *M. roreri* sobre la superficie del fruto. Esto fue notado tanto en mazorcas inoculadas en el campo como en aquellas inoculadas en el invernadero. En ambas condiciones la mayoría de los conidios se distribuyeron en la base de los tricomas glandulares (Fig. 9, Fig. 10). El mismo comportamiento se observó al examinar frutos de cacao sometidos a alta presión de inóculo natural.

#### 4.1.3 Características anatómicas de *Moniliophthora roreri*

Para comparar la morfología del micelio de *M. roreri* crecido sobre el fruto, con aquella obtenida bajo crecimiento *in vitro*, se realizaron estudios estructurales del hongo crecido en ambas condiciones. Se observó que el hongo en los dos casos posee gran cantidad de hifas unidas entre sí, dando origen a un tejido compacto (Fig. 11, Fig. 12). Las hifas son septadas o no septadas y pueden ser simples o también bifurcarse en forma de V (Fig. 13, Fig. 14).

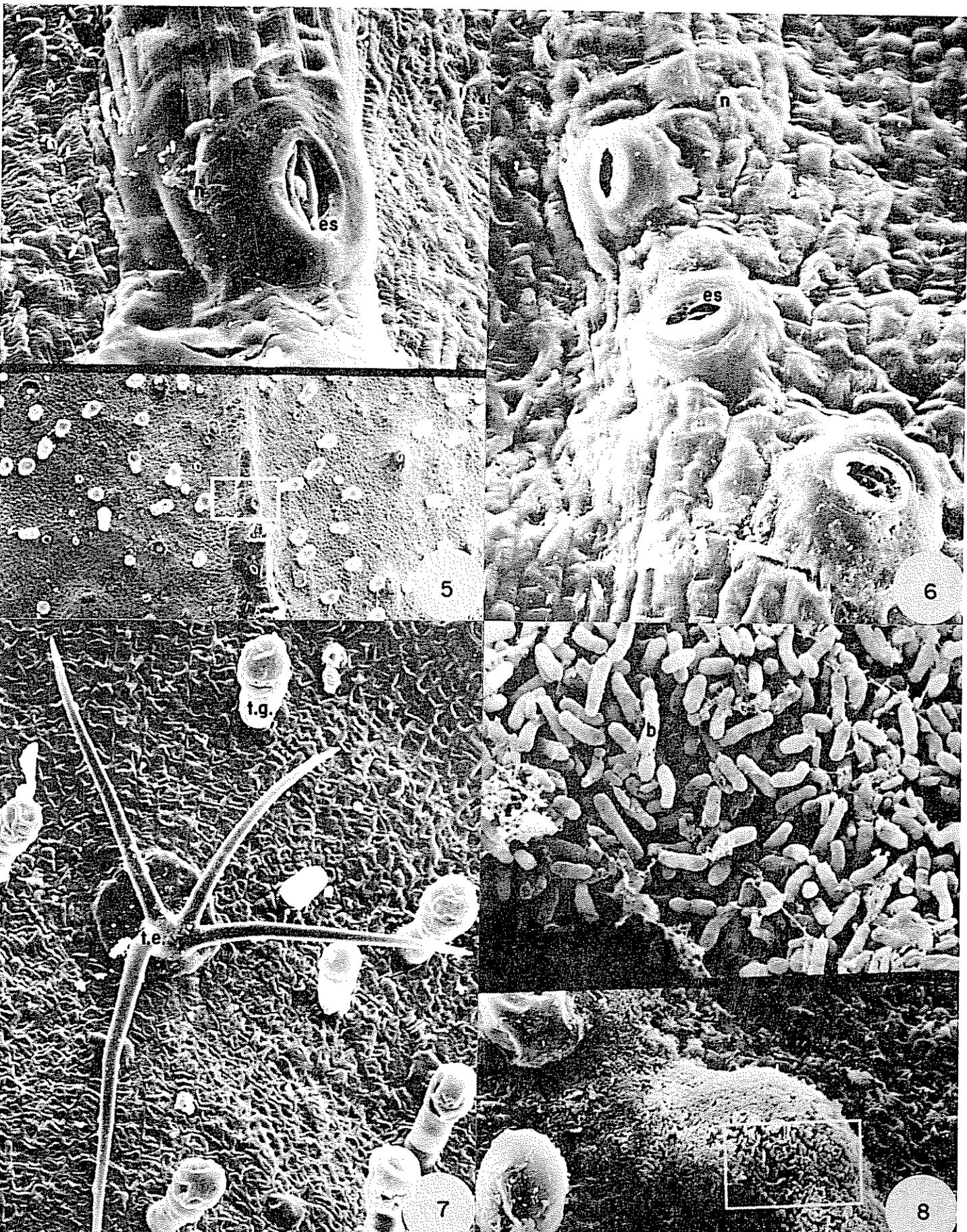
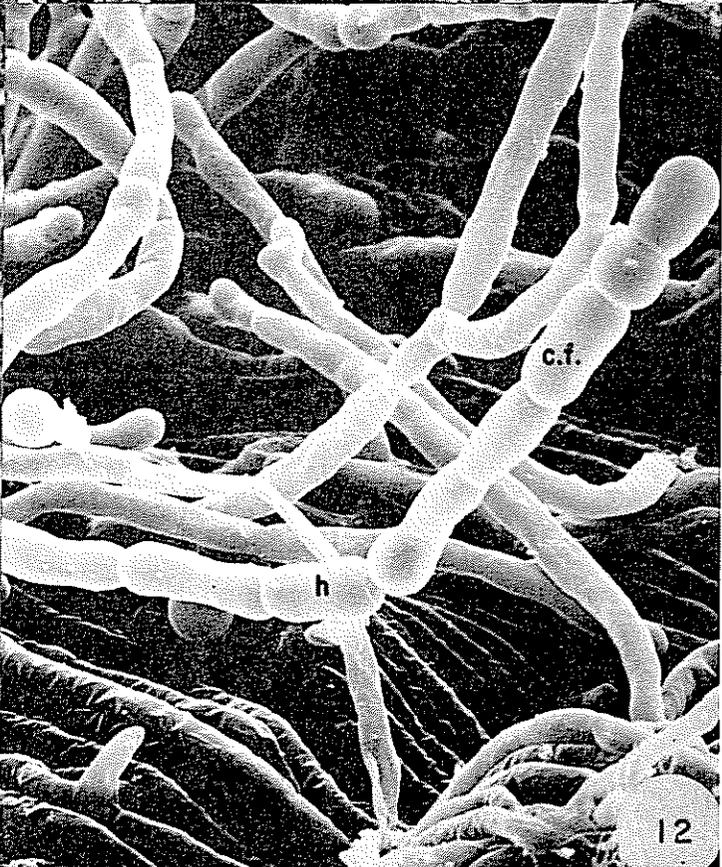
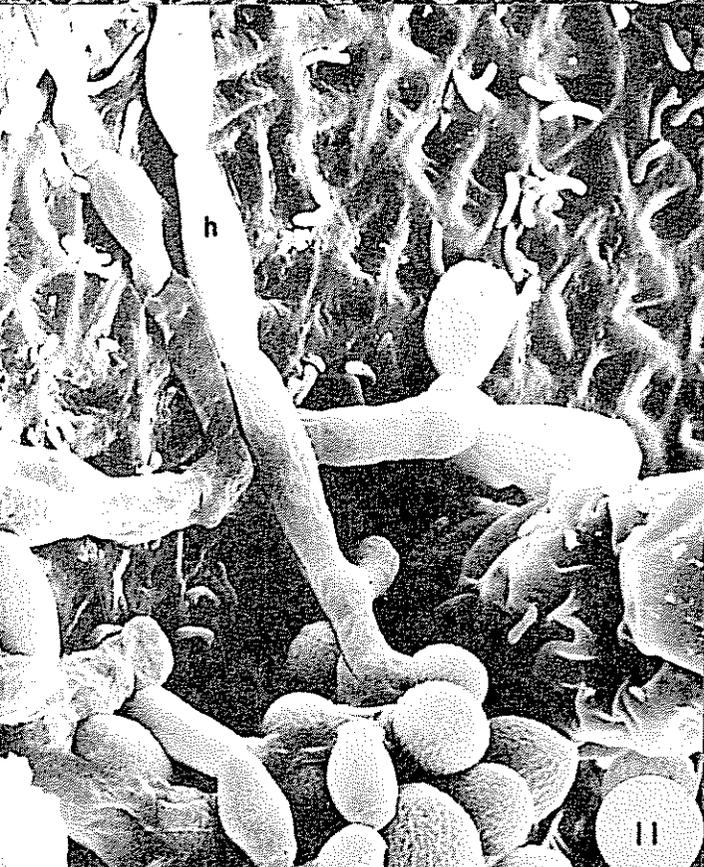
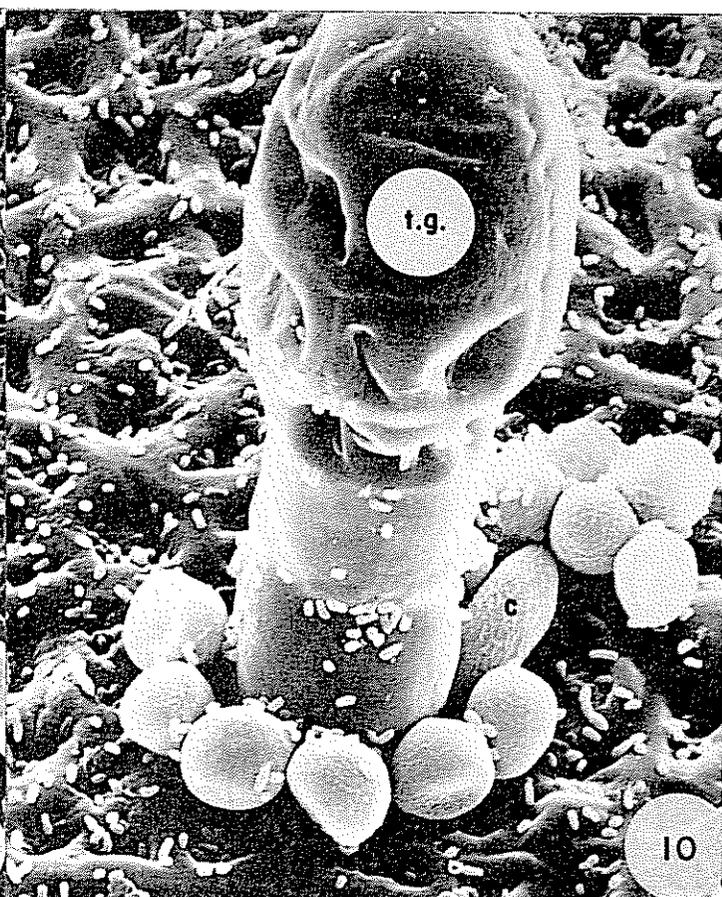
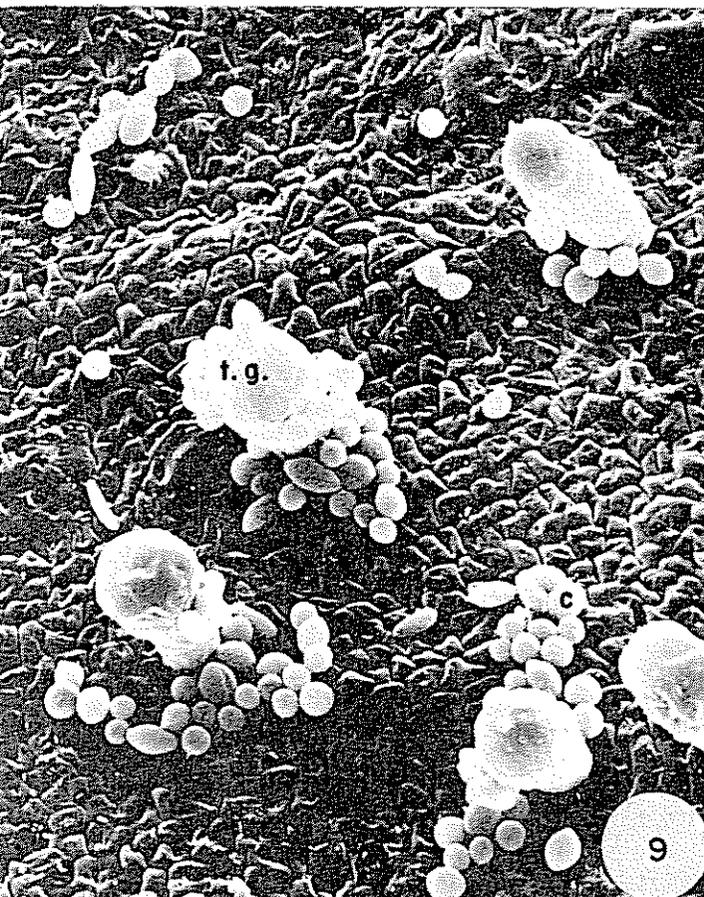


Fig. 5. Detalle de la nervadura en la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 132X).  
n:nervadura  
es:estoma

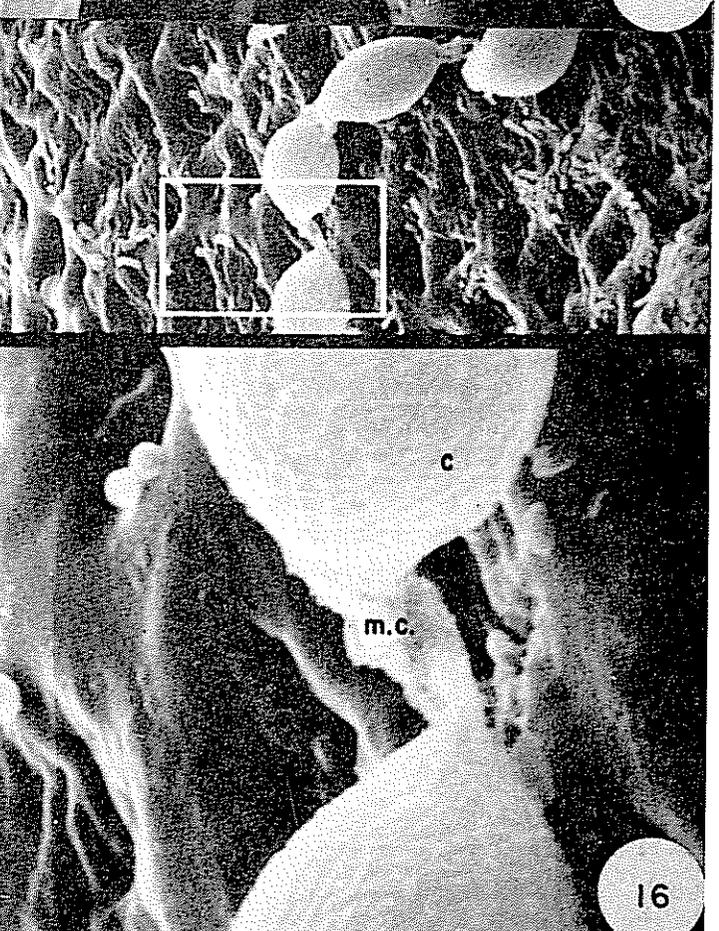
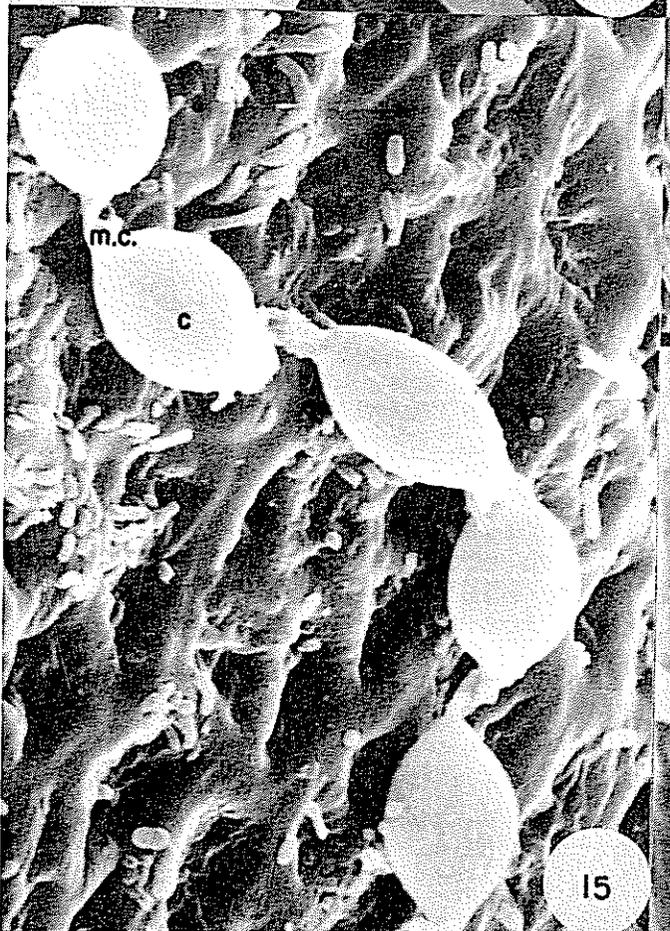
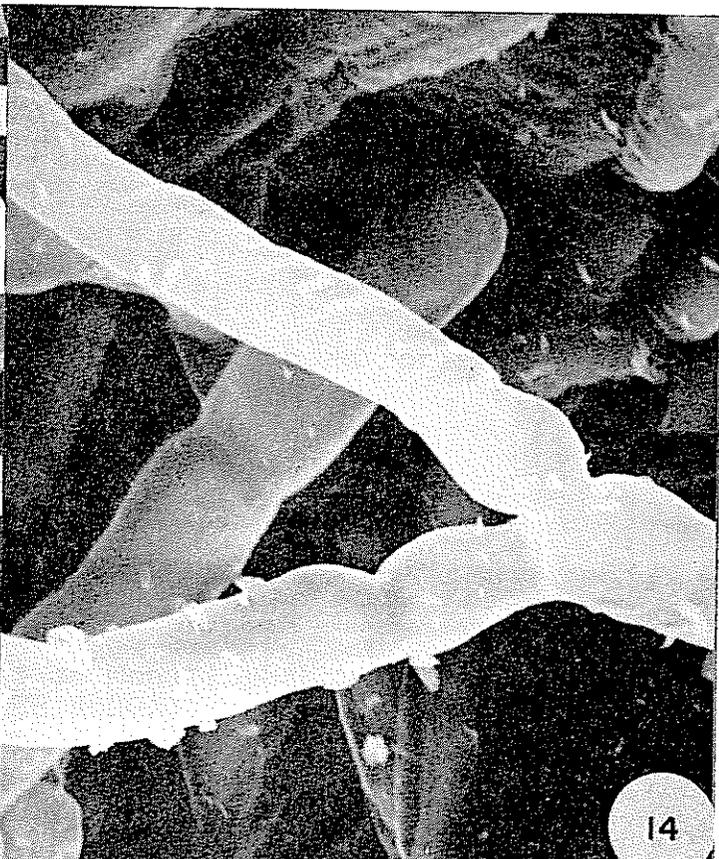
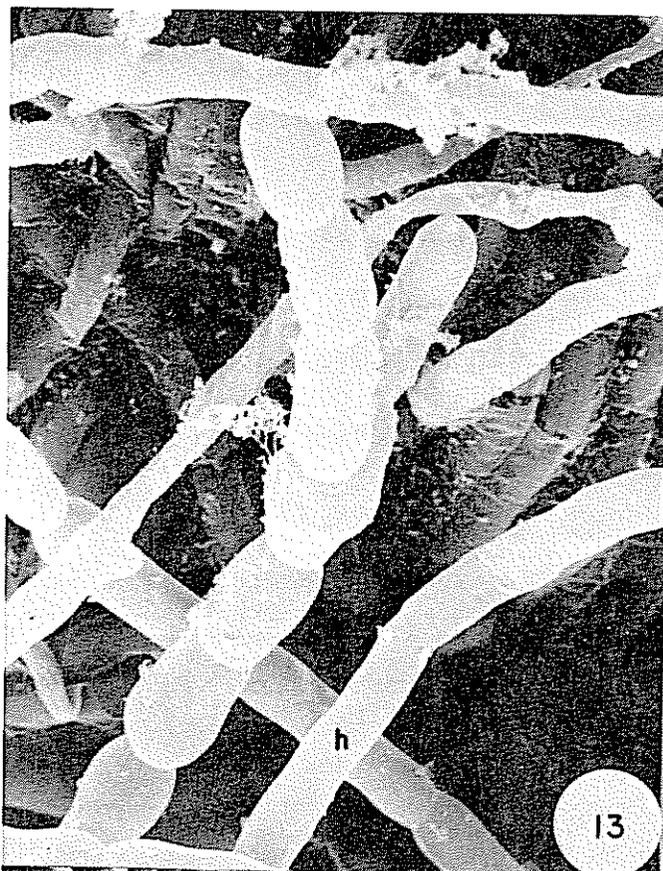
Fig. 6. Estomas localizados sobre la nervadura en la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 1056X).  
n:nervadura  
es:estoma

Fig. 7. Tricomas en la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 576X).  
tg.:tricoma glandular  
te.:tricoma estrellado

Fig. 8. Acercamiento que muestra las bacterias epífitas sobre la mazorca de cacao del cultivar 'UF-296' (MER 828X)  
b:bacterias.



- Fig. 9. Distribución de los conidios de **Moniliophthora roreri** sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' después de la inoculación (MER 690X).  
tg:tricoma glandular  
c:conidio
- Fig. 10. Acercamiento de un tricoma glandular en mazorcas de cacao del cv 'UF-296' con los conidios de **Moniliophthora roreri** en la base (MER 2244X).  
tg:tricoma glandular  
c:conidio
- Fig. 11. Desarrollo del micelio de **Moniliophthora roreri** sobre la superficie de la mazorca del cv 'Pound-7' (MER 1716X)  
h:hifas
- Fig. 12. Detalle del micelio de **Moniliophthora roreri** creciendo *in vitro* (MER 1980X).  
h:hifa  
cf:conidióforo



- Fig. 13. Desarrollo del micelio de *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo (MER 6600X)  
h:hifa
- Fig. 14. Bifurcación del micelio de *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo (MER 4620X).
- Fig. 15. Cadena de conidios de *Moniliophthora roreri* sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 3600X).  
c:conidio  
mc:membrana conidial
- Fig. 16. Detalle de la membrana conidial que envuelve la cadena de conidios de *Moniliophthora roreri* sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 6600X).  
mc:membrana conidial  
c:conidio

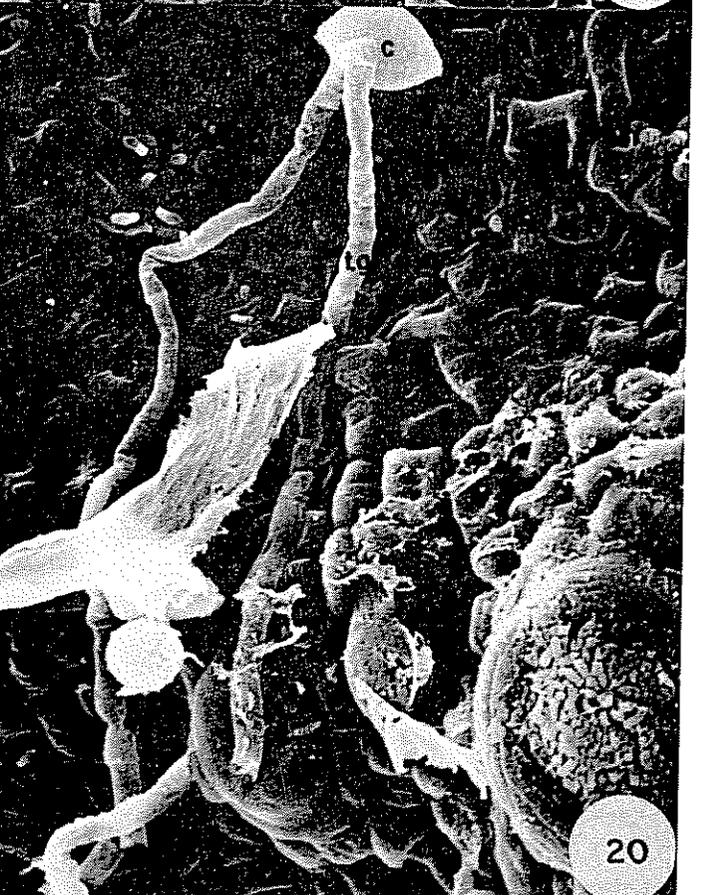
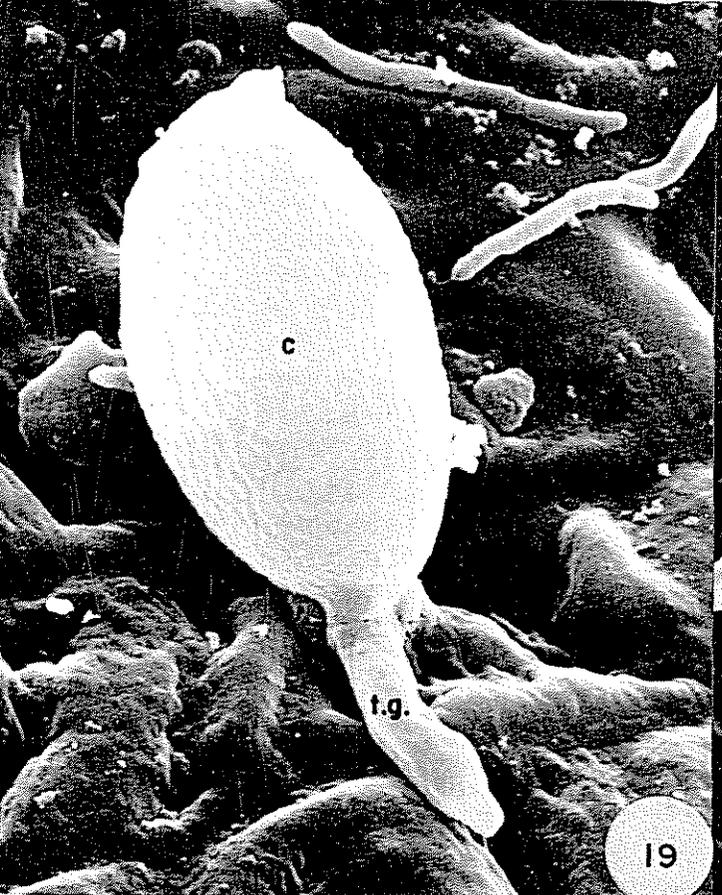
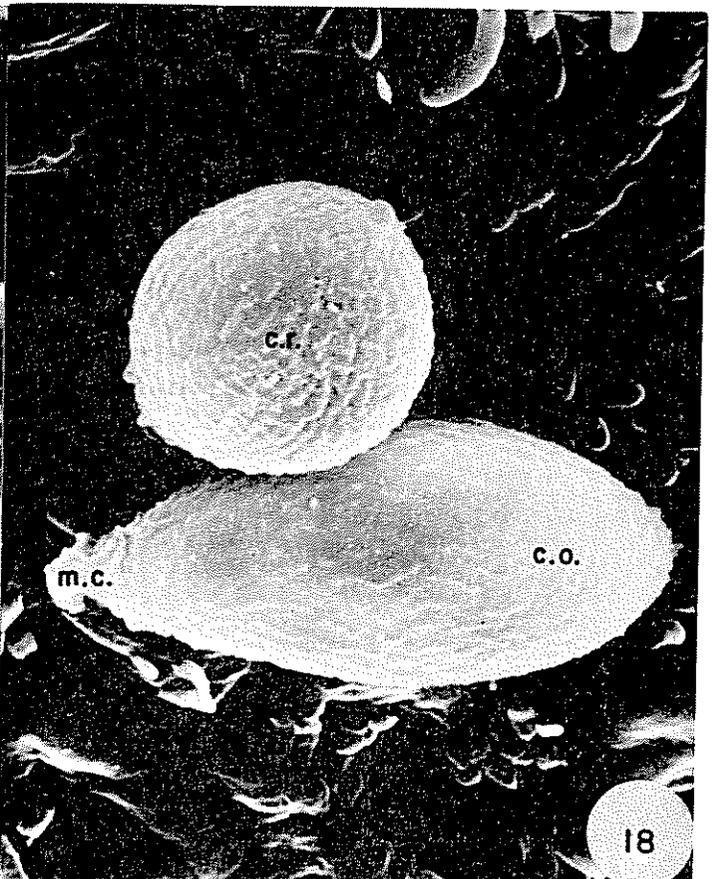
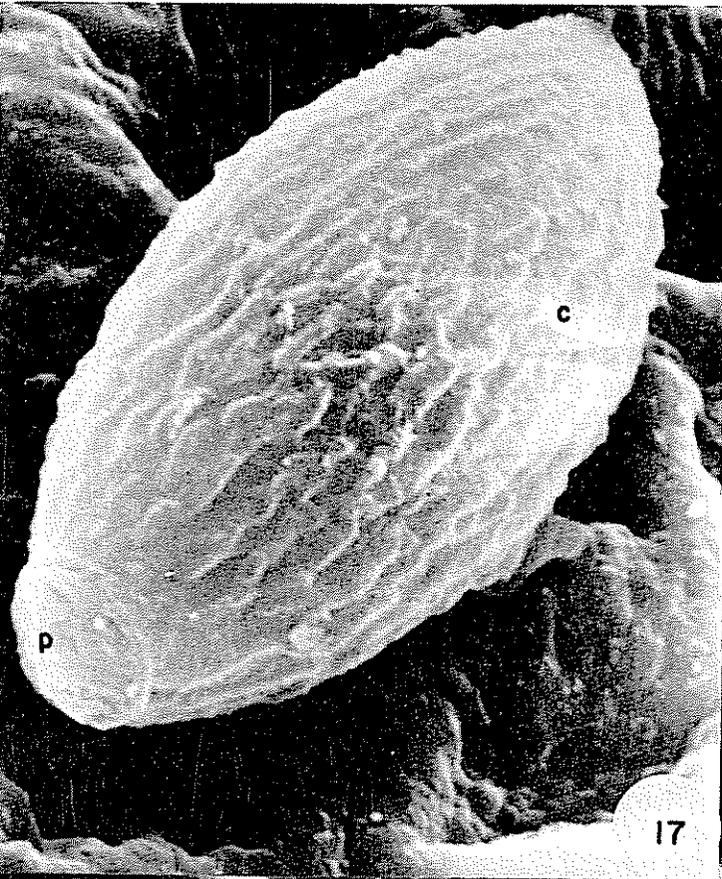
Se presentan conidióforos septados que dan origen a una cadena de conidios recubierta por la pared celular de la hifa madre (Fig. 15, Fig. 16). Al inicio de la diferenciación del conidióforo dichos septos no se observan con claridad, en etapas más tardías del proceso los septos se ven bien diferenciados. Los conidios maduros y separados del conidióforo presentan una pared ornamentada, son unicelulares, y de tamaño variable, con un poro germinativo en uno de sus extremos (Fig. 17). Se caracterizan además, por ser redondos (5,3  $\mu\text{m}$ ) y ovalados (7,9x4,7  $\mu\text{m}$ ) (promedio de 10 mediciones) (Fig. 18). En algunas ocasiones los conidios se observaron libres, pero conservando aún restos de dicha pared.

#### 4.1.4 Germinación de los conidios de *Moniliophthora roreri*.

Los conidios germinados de *M. roreri* se encontraron en su mayoría libres sobre la superficie de la mazorca. En pocos casos en donde se observó conidios germinados unidos entre sí se localizaron al centro de la cadena. En mazorcas de 60 días sometidas a una alta presión de inóculo natural, se observaron cadenas de conidios no germinados.

La germinación de los conidios sobre frutos inoculados de los cv 'UF-296' y 'Pound-7' no ocurrió sino hasta las 8 horas. Los conidios germinados mostraban tubos germinativos de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de largo (promedio de 10 mediciones) (Fig. 19). Al prolongar el período de observación hasta las 66 horas se pudo observar un porcentaje considerable de conidios no germinados.

En todos los casos se observó un tubo germinativo simple y grueso que creció sobre la superficie de los frutos, y en algunos casos sufrió una bifurcación, aproximadamente, 18 horas después de la inoculación, dando origen a un micelio de tipo septado.



- Fig. 17. Conidio de **Moniliophthora roreri** sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' que muestra la localización del poro germinativo y el corrugamiento de la pared (MER 9660X)  
p:poro germinativo
- Fig. 18. Detalle de dos formas de conidios de **Moniliophthora roreri** sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 7200X).  
cr:conidio redondo  
co:conidio ovalado  
mc:membrana conidial
- Fig. 19. Inicio de la germinación del conidio de **Moniliophthora roreri** sobre la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 6600X)  
c:conidio  
tg:tubo germinativo
- Fig. 20. Germinación del conidio de **Moniliophthora roreri** sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' que muestra el desarrollo de dos tubos germinativos (MER 1794X)  
c:conidio  
tg:tubo germinativo

Los tubos germinativos que no se ramificaron se alargaron y mostraron un diámetro mayor en el extremo distal, zona de crecimiento, con respecto al resto de la hifa. En el extremo opuesto, punto de unión con el conidio, el tubo germinativo mostró un diámetro menor.

Se observó una tendencia de los tubos germinativos de esporas cercanas a tricomas glandulares de dirigirse hacia la base de los mismos.

Los conidios de *M. roreri* emiten sólo un tubo germinativo (Fig. 19) y en raras ocasiones se observó la emisión de dos tubos germinativos (Fig. 20).

A su vez se observó que los conidios germinan directamente a través del poro germinativo o a través de la pared del conidio (Fig. 21, Fig. 22).

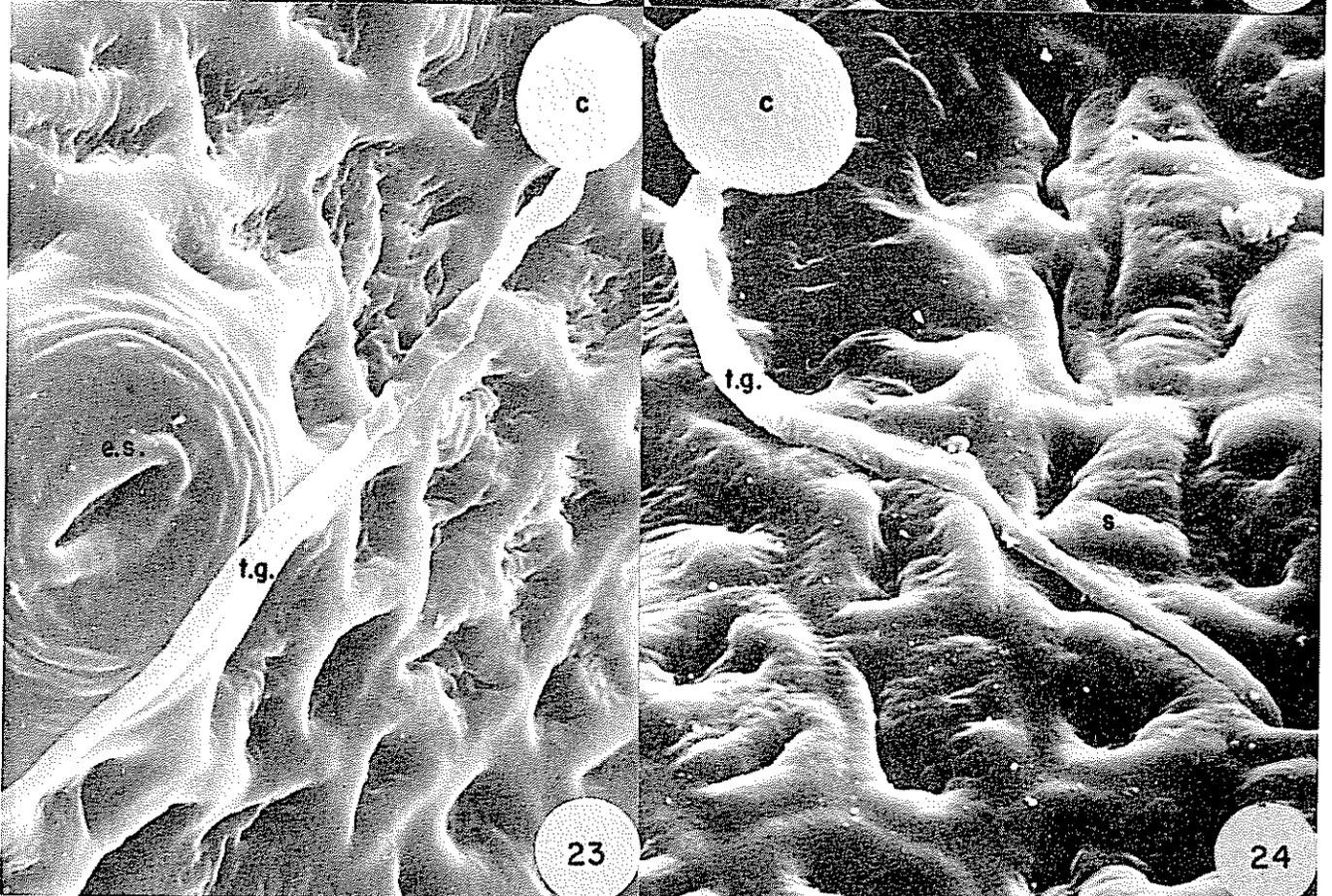
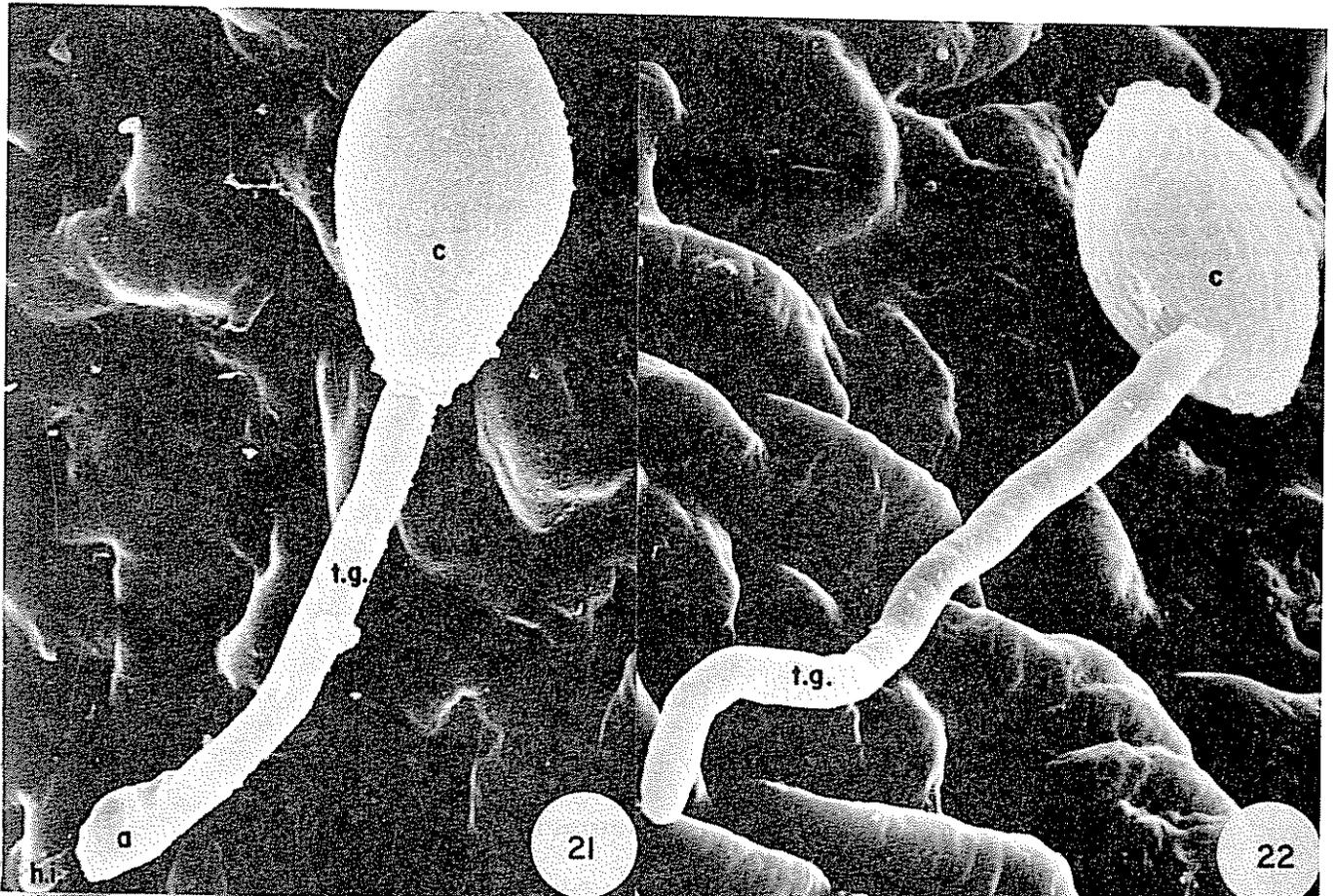
#### 4.1.5 Prepenetración de *Moniliophthora roreri*

Se observó en algunas ocasiones que el tubo germinativo se diferenciaba formando una estructura aparentemente apresorial (Fig. 21).

A pesar de la densidad estomática alta en frutos de cacao de 60 días de edad en ningún momento se observó penetración a través de dichas aberturas naturales. Aún más, en varias ocasiones se encontró conidios germinados cuyo tubo germinativo fue emitido cerca del ostiolo sin que ocurriera penetración (Fig. 23).

Alternativamente en la mayoría de los casos se observó el crecimiento de tubos germinativos sobre los alveolos de la superficie del fruto y aparentemente la penetración ocurrió directamente a través de la epidermis. Esta podría ser la forma principal de ingreso del patógeno (Fig. 24).

Las observaciones anteriormente descritas se aplican tanto al cv 'Pound-7' como al 'UF-296'.



- Fig. 21. Desarrollo de una estructura aparentemente apresorial de **Moniliophthora roreri** sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 5760X)  
c:conidio  
tg:tubo germinativo  
a:apresorio  
hi:hifa infectiva
- Fig. 22. Germinación del conidio de **Moniliophthora roreri** sobre la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' a través de su pared (MER 5520X)  
c:conidio  
tg:tubo germinativo
- Fig. 23. Germinación de un conidio de **Moniliophthora roreri** cerca de un poro estomático de la superficie de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MER 3450X)  
c:conidio  
tg:tubo germinativo  
es:estoma
- Fig. 24. Posible penetración del tubo germinativo de **Moniliophthora roreri** a través de la superficie de la mazorca de cacao del cv 'UF-296' (MER 4320X).  
c:conidio  
tg:tubo germinativo  
s:superficie de la mazorca

## 4.2 Observaciones realizadas con Microscopía de Luz.

### 4.2.1 Observaciones de tejido interno del exocarpo de la mazorca sana

Las observaciones de los cortes transversales del exocarpo de los frutos sanos de 60 días de los cv 'UF-273', 'UF-296' y 'Pound-7' al microscopio de luz mostraron una cutícula delgada y una epidermis uniseriada, con células rectangulares en sección transversal, muy bien definidas (Fig. 25, Fig. 26, Fig. 27).

Los estomas son protuberantes, abundantes y con cámaras subestomáticas pequeñas (Fig. 28). Con mucha frecuencia se observó tricomas glandulares, y multiseriados.

Hay presencia de gran cantidad de canales de mucílago que poseen un epitelio muy bien definido (Fig. 29). Los ductos corren solos o en grupos.

La red vascular se encuentra distribuida en todo el tejido; los haces vasculares son colaterales.

Se observó también divisiones celulares en gran cantidad de planos debido a que se trabajó con frutos en crecimiento.

En los tres cultivares se observó en las células epidermales y corticales, una acumulación masiva de sustancias oscuras en la vacuola las cuales son probablemente de origen fenólico. Tarjot (1972), realizó estudios bioquímicos de la mazorca de cacao y encontró gran cantidad de taninos en las células del parénquima subepidérmico.

El número de capas de células del parénquima subepidérmico con sustancias posiblemente de origen fenólico, varió en cada uno de los tres cultivares.

En el caso del cv 'UF-273' se observó aproximadamente siete capas continuas de parénquima subepidérmico y una mayor acumulación de estas sustancias en comparación con las de los cv 'UF-296' y 'Pound-7' (Fig. 25). En el cv 'UF-296' se observó aproximadamente cinco capas de parénquima

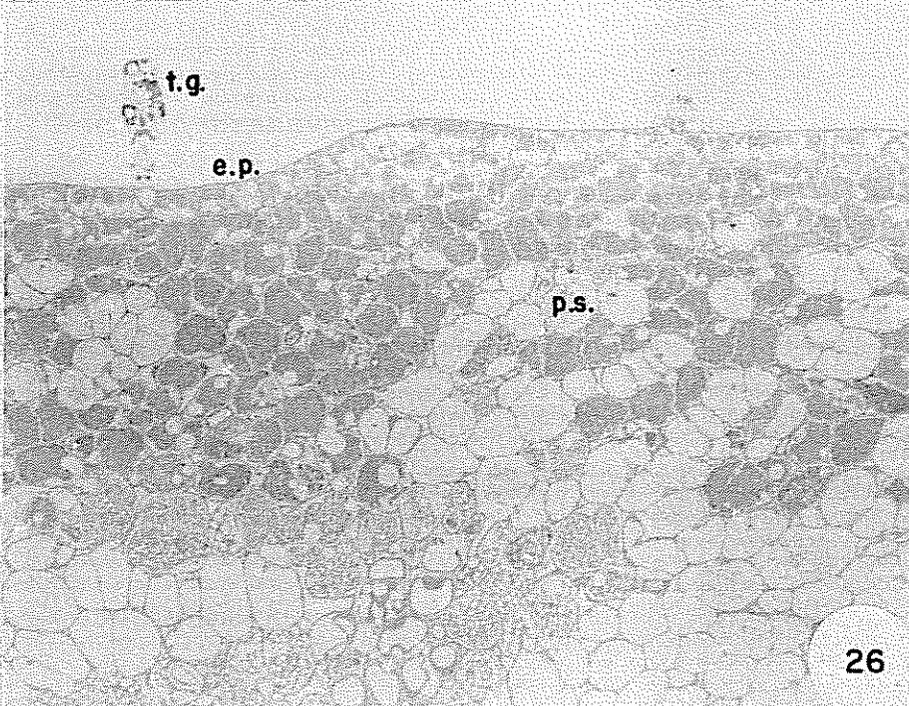
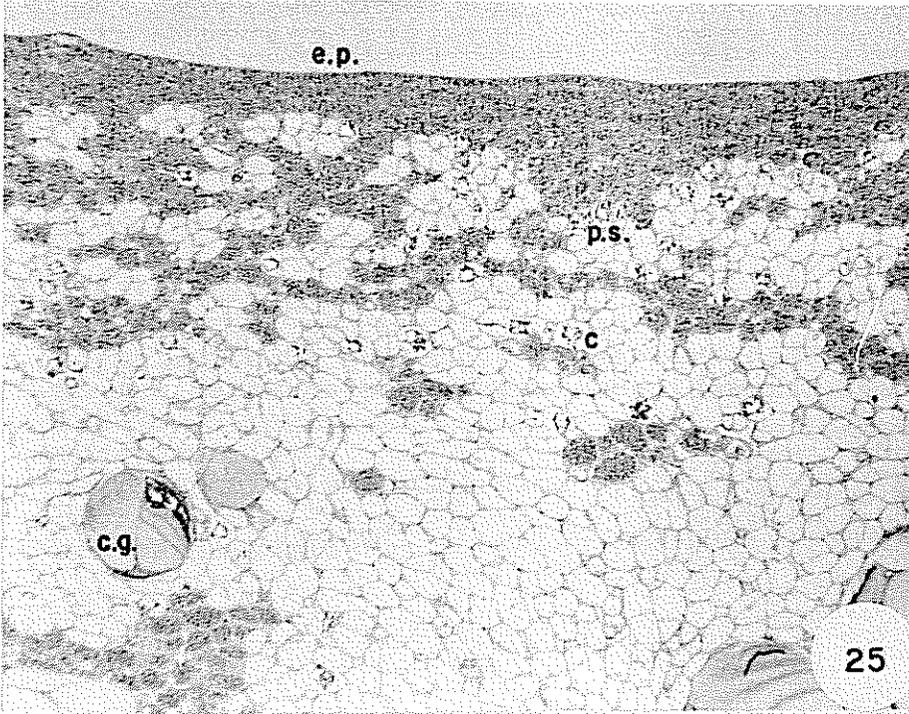


Fig. 25. Sección transversal de tejido sano de la mazorca de cacao del cv 'UF-273'. Obsérvese la acumulación de sustancias posiblemente fenólicas en las capas de parénquima subepidérmico (ML 240X).  
ep:epidermis  
ps:parénquima subepidérmico  
c:cristales  
c.g:canal gomífero

Fig. 26. Sección transversal del tejido sano de la mazorca de cacao del cv 'UF-296'. Obsérvese la distribución de las sustancias posiblemente fenólicas en las capas de parénquima subepidérmico (ML 540X).  
ep:epidermis  
t:tricoma  
ps:parénquima subepidérmico

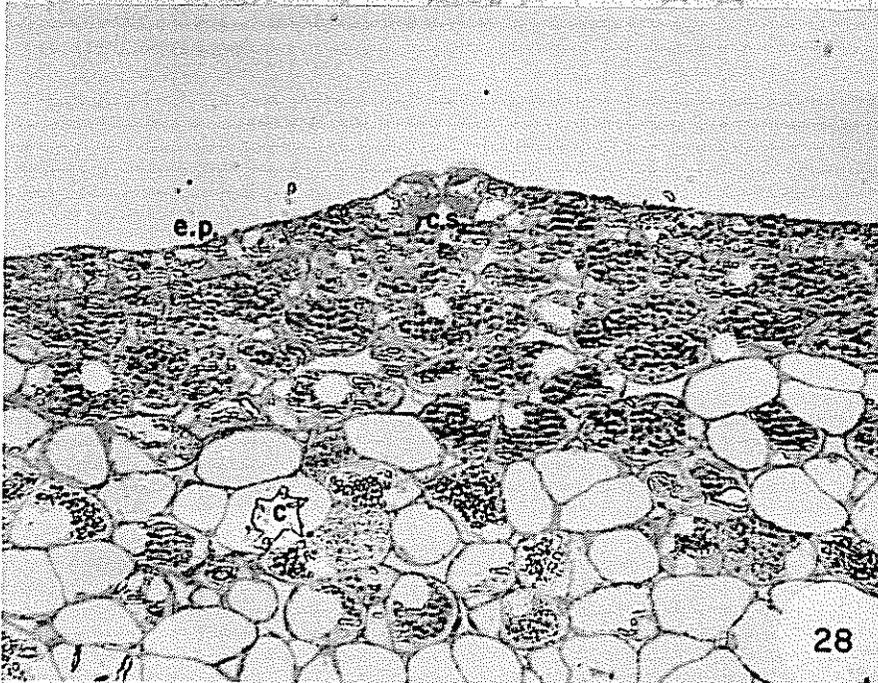
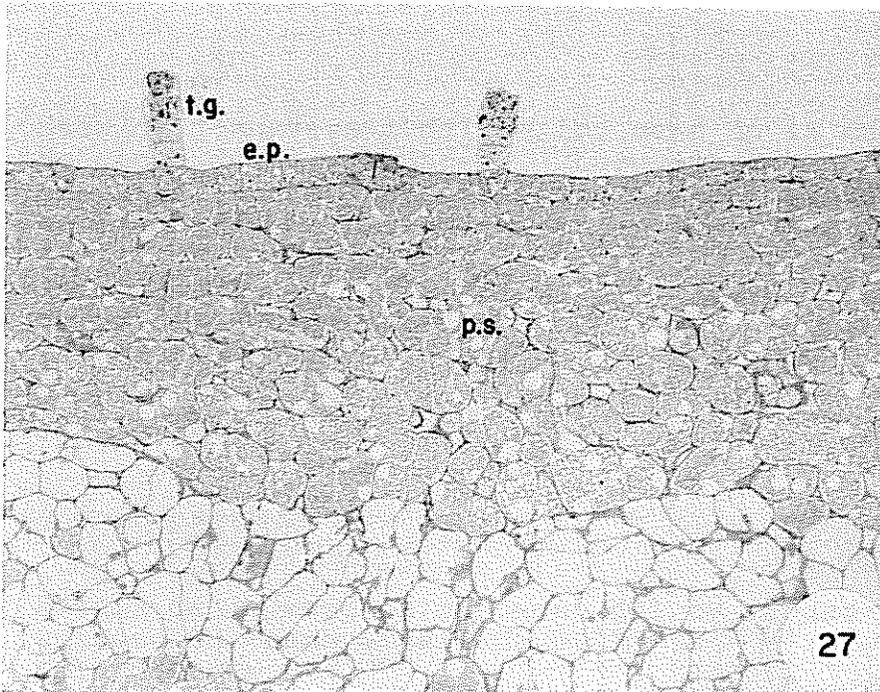
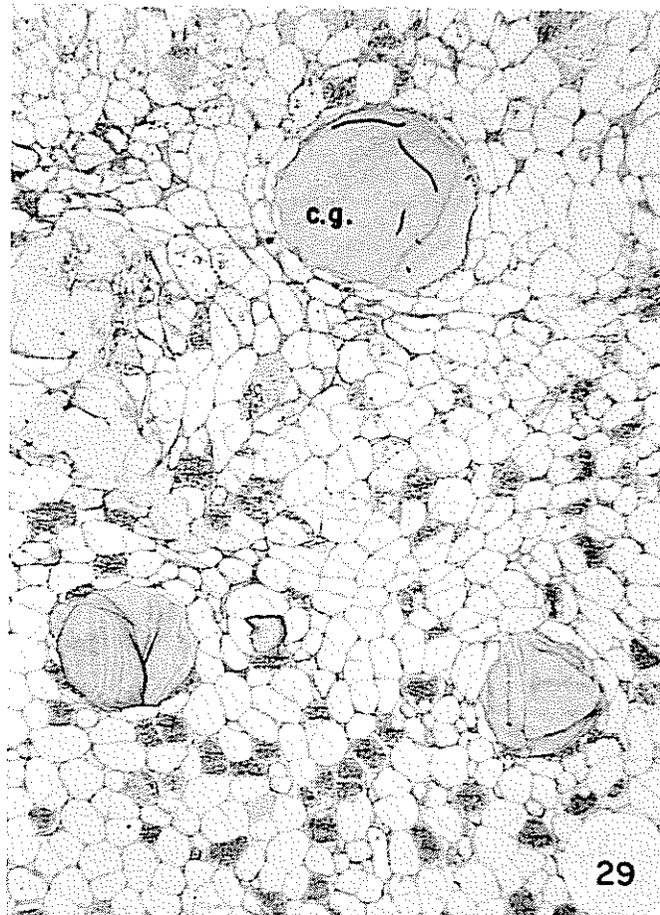
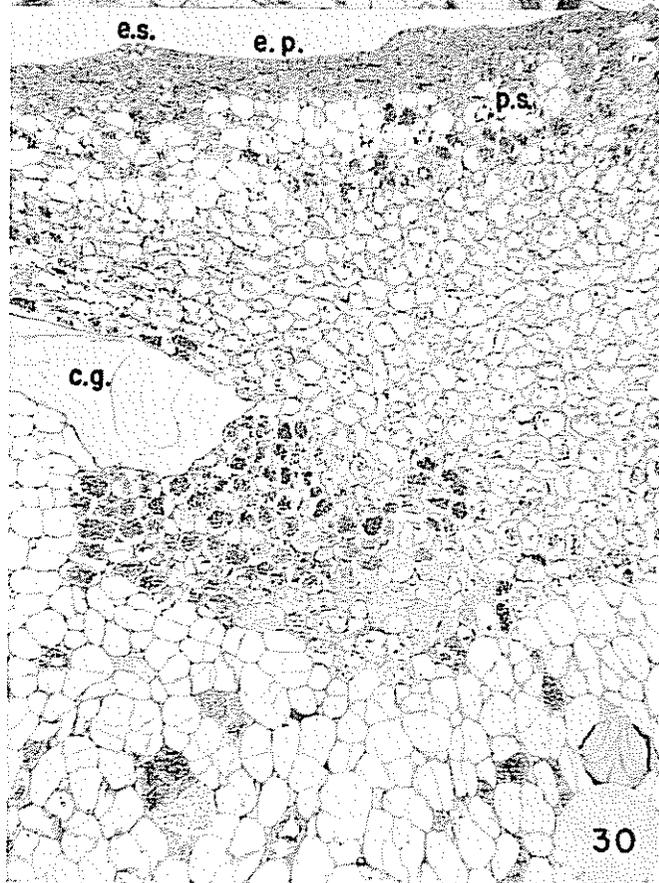


Fig. 27. Sección transversal del tejido sano de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7'. Obsérvese la distribución de sustancias posiblemente fenólicas en las capas de parénquima subepidérmico (MER 440X).  
ep:epidermis  
tg:tricoma glandular  
ps:parénquima subepidérmico

Fig. 28. Estoma de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' en sección transversal (ML 900X)  
ep:epidermis  
cs:cavidad subestomática  
c:cristales



29



30

Fig. 29. Sección transversal de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' enfermo. Obsérvese los canales gomíferos (ML 235X).  
cg:canal gomífero

Fig. 30. Sección transversal del tejido enfermo de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7'. Nótese la distribución de sustancias posiblemente fenólicas en capas más profundas del parénquima subepidérmico (ML 240X).  
ep:epidermis  
es:estoma  
ps:parénquima subepidérmico  
cg:canal gomífero

subepidérmico con gran acumulación de las sustancias antes mencionadas (Fig. 26). En el cv 'Pound-7' se encontró aproximadamente ocho capas de parénquima subepidérmico con menor acumulación de sustancias con respecto a los casos anteriores (Fig. 27).

La estructura celular del parénquima subepidérmico difirió en los tres cultivares. En el cv 'UF-273' se observó un arreglo celular muy compacto, también presentó engrosamientos de la pared primaria basal de las células epidérmicas y una cantidad mayor de cristales en las células del parénquima subepidérmico. En el cv 'UF-296' se observó un parénquima subepidérmico con una estructura celular medianamente compacta y en el cv 'Pound-7' se encontró que el parénquima subepidérmico era poco compacto, con espacios intercelulares grandes.

#### 4.2.2 Observaciones de frutos del cv 'Pound-7' infectados con *Moniliophthora roreri*.

Las observaciones con microscopía de luz de frutos de 60 días con el síntoma de giba del cv 'Pound-7', susceptible al hongo *M. roreri*, permitió determinar una mayor acumulación de sustancias posiblemente fenólicas, no sólo en el parénquima subepidérmico, sino en capas más profundas de tejido (Fig. 30).

En las observaciones realizadas a simple vista en el campo en cortes sobre frutos de 60 días de edad con giba del cv 'Pound-7' se determinó el desarrollo de un "hilo de infección" de coloración oscura que se inicia en la epidermis y avanza hacia capas más profundas de tejido. Posteriormente el hongo invade tejidos subyacentes causando un necrosamiento de los mismos, que se debe a la desintegración del protoplasto de las células (Roberts y Boothroyd 1972).

Es importante resaltar que la giba se presenta con mayor frecuencia en el cv 'Pound-7'. El cv 'UF-296' la forma algunas veces y en el cv 'UF-273' no se ha observado (Phillips 1986).

#### 4.3 Observaciones realizadas con Microscopía Electrónica de Transmisión.

##### 4.3.1 Tejido sano del cv 'Pound-7'

Las observaciones realizadas con MET utilizando frutos de 60 días de edad del cv 'Pound-7', revelaron que las células del exocarpo del cacao son típicas de un tejido parenquimatoso maduro, en donde se encuentra una vacuola central grande y un desplazamiento de las organelas celulares, principalmente mitocondrias y cloroplastos, hacia la periferia de la célula.

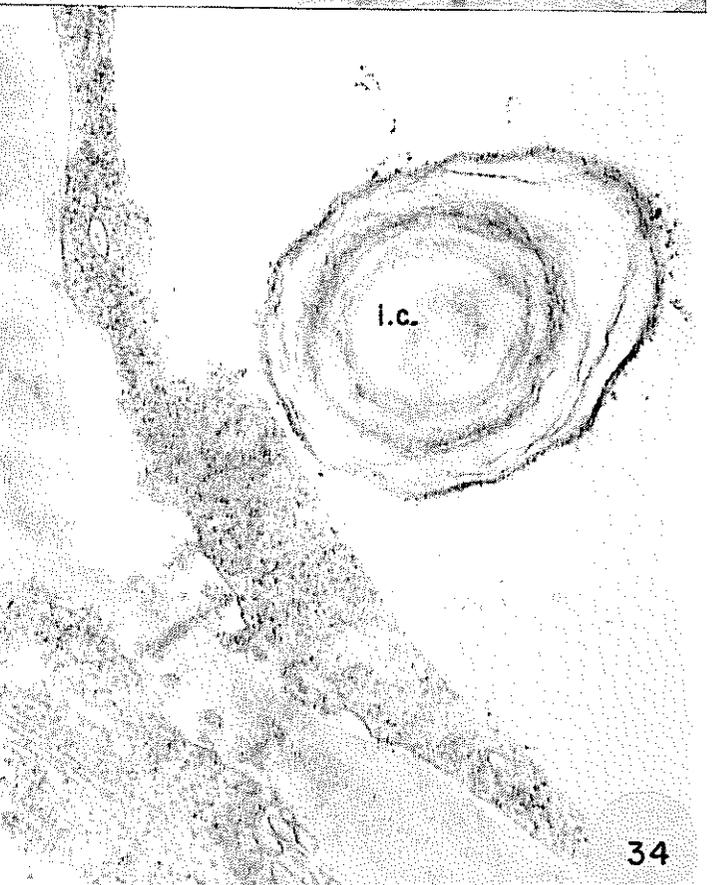
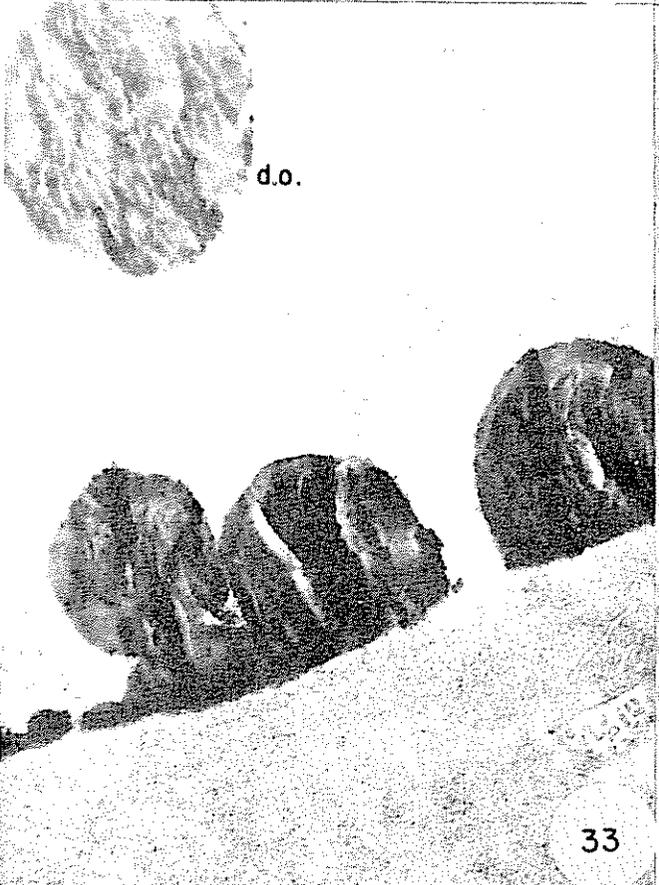
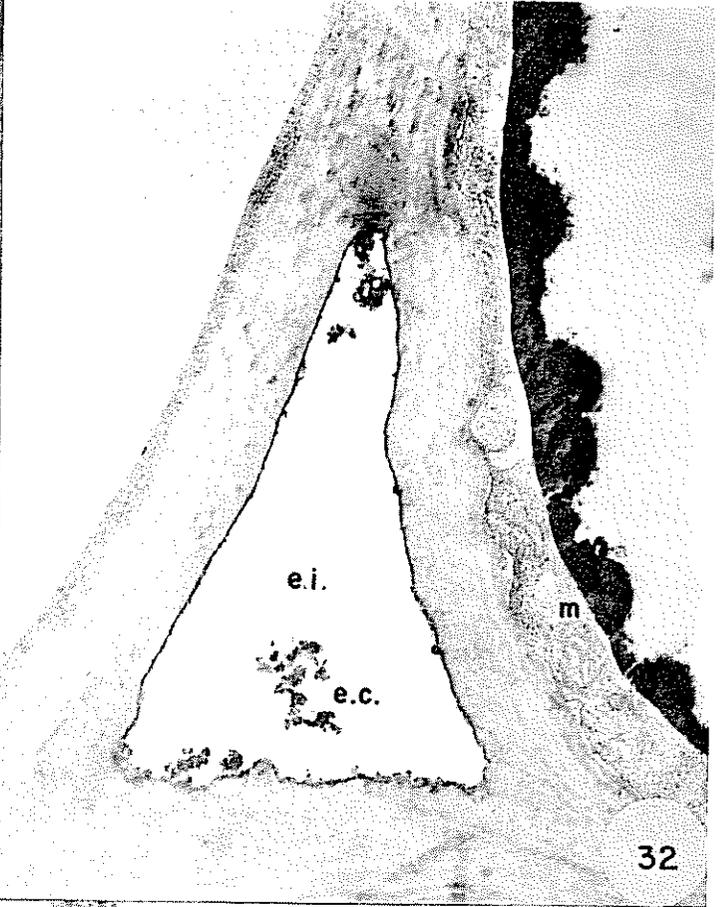
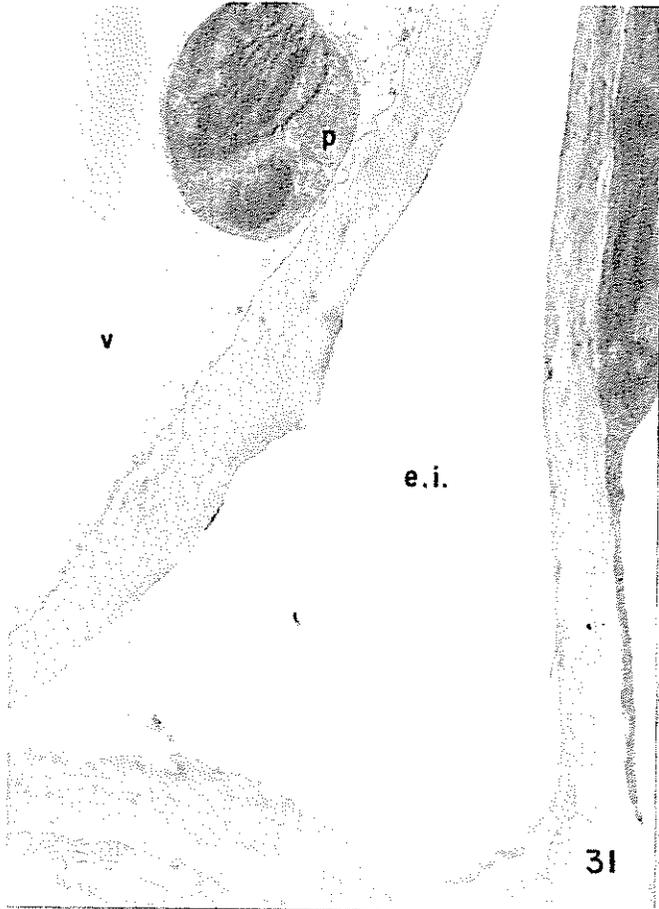
El tejido sano presentó espacios intercelulares en forma triangular, libres de posiblemente excreciones celulares (Fig. 31).

##### 4.3.2 Tejido enfermo del cv 'Pound-7'

En el tejido enfermo de frutos de 60 días de edad del cv 'Pound-7', se observó que los espacios intercelulares también son triangulares pero contenían gran cantidad aparentemente de excreciones celulares floculentas y una mayor deposición de materiales constituyentes de la pared celular (Fig. 32).

La vacuola en este tipo de tejido presentó depósitos de material osmiofílico, electrodensos con áreas floculentas y organizados en paquetes (Fig. 33).

También se observó invaginaciones citoplasmáticas o cuerpos membranosos muy cercanos a la pared celular (Fig. 34). No fue posible observar estructuras del hongo dentro de los tejidos del hospedero.



- Fig. 31. Sección transversal de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' sano que muestra un espacio intercelular (MET 4440X).  
ei:espacio intercelular  
v:vacuola  
p:plastidio
- Fig. 32. Sección transversal de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' enfermo que muestra un espacio intercelular (MET 15400X).  
ei:espacio intercelular  
ec:excreciones celulares  
m:mitocondrias
- Fig. 33. Acercamiento de los depósitos osmiofílicos en la vacuola celular de tejido enfermo del cv 'Pound-7' (MET 22000X).  
do:depósitos osmiofílicos
- Fig. 34. Invaginaciones citoplasmáticas en el tejido enfermo de la mazorca de cacao del cv 'Pound-7' (MET 44000X).  
ic:invaginaciones citoplasmáticas

## 5. DISCUSION

Se estudió la anatomía externa e interna del exocarpo de cultivares de cacao con diferente grado de susceptibilidad con el fin de establecer si a nivel anatómico se observan diferencias que pudieran explicar, al menos en parte, la diferencia en susceptibilidad. A su vez se estudió la morfología de los conidios y tubos germinativos sobre la superficie de frutos con la intención de establecer hechos relacionados con la preinfección.

Las observaciones realizadas sobre la anatomía externa de los cv 'Pound-7' y 'UF-296' (susceptible y moderadamente resistente, respectivamente) no reveló mayores diferencias. En ambos casos se observó numerosos estomas anomocíticos y en muchas ocasiones se encontró tubos germinativos cercanos a dichas aberturas naturales pero en ningún caso hubo penetración por esta vía. Alternativamente esta observación sugiere que la penetración ocurre directamente por la epidermis. La organización celular del parénquima subepidérmico de ambos cultivares sí difirió, en el cv 'UF-296' (moderadamente resistente) se observó más compacta con espacios intercelulares más pequeños. Además, este cultivar presentó una mayor concentración de sustancias posiblemente fenólicas en estas células. Estas diferencias anatómicas podrían estar relacionadas con una mayor resistencia de este cultivar, pues en el cv 'Pound-7' (susceptible) no se observaron. Sin embargo, habría que estudiar en mayor número de cultivares para poder afirmar que las características mencionadas anteriormente están siempre ligadas a una menor susceptibilidad. Además, se necesitan otros estudios bioquímicos, ultraestructurales, genéticos y fisiológicos para establecer con precisión el (los) mecanismo (s) que opera en los frutos con diverso grado de susceptibilidad.

### 5.1 Características superficiales del fruto de cacao sano

Dentro de las características anatómicas superficiales estudiadas en frutos de 60 días de edad de los cv 'UF-296' y 'Pound-7', sobresale la ornamentación alveolada de la epidermis, así como, la presencia de una gran cantidad de estomas y de tricomas. Dichas estructuras quedan definidas en los frutos de cacao desde el inicio de su desarrollo y al crecer el mismo varía su densidad (O'Brien 1970). Se trabajó con frutos de 60 días para seleccionar cultivares con diferente grado de resistencia ya que los frutos en esta edad son más susceptibles a *M. royeri* (Bejarano 1961).

En frutos adultos de los cv 'Pound-7' y 'UF-296' hay diferencias en cuanto a rugosidad de la superficie, mayor en el cv 'Pound-7', lo que permitiría mayor acumulación de agua en la superficie, favoreciendo de ésta manera la germinación y desarrollo del patógeno, pues los conidios de *M. royeri* necesitan agua libre para germinar (Bastidas 1953, Merchán 1982, Campuzano 1981).

Los frutos maduros de los diferentes cultivares de cacao presentan una resistencia natural (Díaz 1956), en esta forma aparentemente las características anatómicas externas no parecen explicar las diferencias en susceptibilidad al patógeno entre los cultivares, alternativamente otro factor de resistencia podría jugar un papel en los frutos maduros.

Por ejemplo, Koller et al. (1980), mencionó que el grosor de la cutícula del fruto puede influir en la resistencia de los diferentes cultivares. Engels (1981) midió el grosor de los lomos y de los surcos del pericarpo de frutos adultos producidos en Turrialba, y determinó que para los cv 'Pound-7' y 'UF-296' es muy similar. El cv 'Pound-7' presentó un grosor entre 11,5 y 7,3 mm y en el cv 'UF-296' entre 11 y 7,6 mm respectivamente.

Martín y Juniper (1970) mencionaron que el grosor de la cutícula también varía con las condiciones ambientales.

Las observaciones del tejido interno del exocarpo de los frutos indican que existen diferencias, pues en el cv 'UF-296' el arreglo celular de las capas subepidérmicas fue más compacto y además la acumulación en las mismas de sustancias aparentemente fenólicas fue mayor. En el cv 'Pound-7' el arreglo celular fue menos compacto y la cantidad de sustancias menor.

Aunque estos factores podrían jugar un papel importante en el grado de resistencia que presentan los cultivares a la enfermedad es necesario realizar como ya se mencionó estudios comparativos con un mayor número de cultivares para poder establecer la relación de estos factores con una menor susceptibilidad.

Rocha y Jiménez (1966) informaron que la concentración de polifenoles varía inversamente con el estado de desarrollo del fruto y con la profundidad del tejido con respecto a la cáscara, así, los frutos jóvenes poseen mayor cantidad de polifenoles (Manotas 1953), y éstos, se localizan en mayor cantidad en los tejidos del exocarpo. Rocha y Jiménez (1966) mencionaron que la variación en la resistencia entre los cultivares va a depender básicamente de la estructura química de las sustancias fenólicas que se encuentran en el exocarpo y su efecto fungistático, el cual podría variar con la edad.

Además de la posible diferencia en composición y actividad de las sustancias fenólicas del exocarpo, otros factores en la superficie del fruto podría estar involucrados en el proceso de infección. Por ejemplo se ha señalado que la variabilidad genética, la edad y algunos otros factores pueden afectar la combinación y concentración de compuestos orgánicos sobre la mazorca de cacao. Estos compuestos podrían estar involucrados en la nutrición del hongo en sus estadios previos a la infección. Así la concentración de azúcar disminuye con la edad (Manotas 1956, López 1980). Esto podría estar relacionado con la resistencia natural que

se ha observado en los frutos maduros de cacao, pues los conidios del hongo no dispondrían de una fuente de energía en la superficie del fruto (Díaz 1956). Sin embargo, está por demostrarse que la germinación y penetración tengan como requisito la presencia en la superficie de estos nutrientes.

Alternativamente, la resistencia natural también podría deberse a una microflora antagonista del hongo, pues sobre el fruto es esperable que ocurra una sucesión microbiana resultado de la disponibilidad de substratos excretados por el fruto, la deposición de detritos orgánicos sobre el mismo y la presencia misma de una microflora. Sería interesante explorar las relaciones de esta microflora y el patógeno. Esto no significa que los frutos próximos a la madurez puedan escapar a la infección por el patógeno, pues si existen condiciones favorables para la infección estos seguidamente se enferman (Bastidas 1953, Bejarano 1961, Barros 1966, 1981, Evans et al. 1978).

## 5.2 Características de *Moniliophthora roreri*

En esta investigación se observó, conidios redondos y ovalados. Sería interesante determinar si estas diferencias morfológicas tienen o no relación con una posible variabilidad genética.

El estudio *in vitro* de la morfología de *M. roreri* hecho paralelamente al estudio realizado sobre los frutos, permitió establecer sin lugar a dudas que el hongo observado sobre los mismos correspondían a *M. roreri*.

Los conidios germinados se encontraron en su mayoría aislados sobre la superficie de la mazorca pues al preparar el inóculo artificial, se agrega un agente dispersante antes de agitar la suspensión de conidios. Sin embargo, en las observaciones realizadas de frutos bajo una alta presión de inóculo natural se encontró cadenas de conidios posiblemente debido a que dichas cadenas provenían de frutos cercanos infectados.

Los estudios epidemiológicos han revelado que, cuando las esporas son transportadas por el viento, su desplazamiento desde la fuente de inóculo no es muy grande debido probablemente a su peso o a su asociación en cadenas (Barros 1981).

A pesar que se ha informado de una maduración basípeta de los conidios (Evans et al. 1978, Evans 1981), en éste estudio se observó algunos conidios centrales ya germinados en la cadena. Esto hace suponer que los mismos ya habían alcanzado un grado de madurez apropiado, pues presentaron aparentemente una buena permeabilidad al agua y a los gases (Hawker 1950), condiciones necesarias para que ocurra la germinación. Estos conidios no se desprendieron posiblemente por que requerían de algún factor mecánico.

El proceso de germinación de algunos conidios se inició entre las 7 y las 8 horas, estos resultados coinciden con los obtenidos por Campuzano (1981) quién observó que la germinación de las esporas de *M. roreri* ocurrió entre las 8 y las 9 horas a los 20 °C y también coinciden con las observaciones realizadas por López (1954), quién obtuvo germinación a las 8 horas en esporas maduras, lo cual indica que tanto *in vivo* como *in vitro* la germinación ocurrió en periodos similares.

La condición de alta humedad relativa (100 %), lograda con el uso de la cámara húmeda, y la temperatura (27 °C) que prevaleció durante el experimento favorecieron la normal germinación de los conidios. Suárez (1971) encontró, que las esporas de *M. roreri* germinaron aproximadamente 3 horas después de la inoculación, lo cual, puede deberse a diferencias en las técnicas de preparación del inóculo o también al tiempo que transcurrió entre la preparación del inóculo y la aplicación del mismo a los frutos de cacao. Suárez (1971) realizó la investigación con mazorcas de 20 a 160 días de edad pero no se especifica la edad de la mazorca sobre la que encontró dicho período de germinación.

En este estudio se observó que el conidio emite un sólo tubo germinativo y en pocas ocasiones dos. Este resultado no concuerda con lo informado por Suárez (1971), quién afirma que *M. roreri* emite de uno a cinco tubos germinativos.

La germinación de algunas esporas a través de su pared lateral y no únicamente a través del poro germinativo puede ocurrir por una lisis o degradación de la quitina de la pared del conidio (Evans et al. 1978, Evans 1981) en el lugar de salida del tubo germinativo.

Si bien la formación de una estructura apresorial no es siempre imprescindible para que ocurra la infección, en este trabajo se observó en algunos tubos germinativos un engrosamiento distal que sugiere la formación de una estructura apresorial. Sin embargo, no se pudo establecer una relación conclusiva entre esta estructura y la infección. Además, en algunos hongos la formación del apresorio parece responder a estímulos físicos, químicos, nutricionales, de humedad, luz o temperatura (Wynn 1976).

El mecanismo de penetración de los hongos a los tejidos del hospedero puede ser mecánico (Yoder y Gillian 1985) o también pueden existir alteraciones sobre la cutícula y paredes de las células del hospedero en los sitios de infección (Kunoh 1982), mediadas por secreciones enzimáticas que facilitan el ingreso del patógeno a los tejidos internos del hospedero.

En el caso de *M. roreri* no se han hecho todavía estudios sobre el mecanismo de penetración. Una vez que el patógeno se encuentra dentro de los tejidos de un hospedero susceptible, puede establecerse y crecer utilizando los substratos disponibles, así incrementan su biomasa para luego producir propágulos que perpetuen la infección en la naturaleza y aseguren la sobrevivencia del hongo (Sarasola y Rocca 1975, Baker y Bateman 1978).

Las observaciones realizadas sugieren que *M. roreri* aparentemente no penetra por vía estomática sino a través de las células epidermales sin necesidad de la presencia de

heridas. Este tipo de penetración también fue encontrado por Suárez (1971), sin embargo, no observó la formación de estructuras apresoriales. Otras investigaciones sugieren que la penetración de *M. royeri* a los tejidos de la mazorca se facilita con la producción de heridas causadas por los chinches de la familia Pentatomidae (Naundorf 1974).

Franco (1958) y Jorgensen (1975) mencionaron que la penetración se lleva a cabo a través de aberturas naturales presentes en los frutos, y que la resistencia a *M. royeri* es mayor en frutos adultos por presentar una menor densidad de estomas. La cantidad de estomas queda definida desde el inicio de la formación del fruto, así que, no es un factor que pueda influir en la resistencia que presentan dichos frutos.

### 5.3 Interacciones hospedero-patógeno

Las características estructurales externas semejantes de los frutos de los cultivares de cacao y de las estructuras de *M. royeri*, sugieren que la superficie no tiene en esta ocasión relación con la resistencia o susceptibilidad de los dos cultivares estudiados: cv 'UF-296' y 'Pound-7' (moderadamente resistente y susceptible, respectivamente). Además, en ambos cultivares el hongo germinó de manera similar. Aparentemente, esto indica que el mecanismo de resistencia que opera en el cv 'UF-296' ocurre a nivel de tejido interno.

Al comparar la anatomía interna del exocarpo de frutos de cacao sanos con diverso grado de susceptibilidad si fueron aparentes algunas diferencias. Por ejemplo, los cultivares resistentes 'UF-273' y 'UF-296' mostraron una anatomía interna similar con una organización celular más compacta y con una mayor acumulación de sustancias fenólicas en comparación con el cultivar verde 'Pound-7'. Si bien los cv 'UF-296' y 'UF-273' son de color rojo, esta característica

aparentemente no tiene ninguna relación con la resistencia Brenes (1983).

La distribución de los conidios en los frutos podría ser un factor de importancia a considerar. Tanto los frutos inoculados artificialmente como las muestras de campo, mostraron un agrupamiento de dichas esporas en la base de los tricomas glandulares. Esto puede deberse a que hay una mayor acumulación de agua en la base de estas estructuras favoreciendo la disposición y adherencia de los conidios. De ser constante este patrón de distribución de los conidios sobre la superficie del fruto habría que establecer cual es el efecto de las secreciones de los tricomas sobre el proceso de germinación e infección de los conidios. A su vez será interesante determinar la composición y concentración de dichas secreciones. Además habría que estudiar el efecto del cultivar y de la edad de los frutos (Blaha y París 1967). Adicionalmente, esto significa que en muchas ocasiones los conidios estarían más cerca de los tricomas que de los estomas.

#### 5.4 Tejido enfermo

Las observaciones realizadas con MER muestran que a las 8 horas después de la inoculación, los conidios de *M. royeri* apenas iniciaban su germinación sobre la superficie de la mazorca, lo cual contrasta con los hallazgos de Suárez (1971) que informó sobre penetración del tubo germinativo por la base de los pelos glandulares 8 horas después de la inoculación.

En el presente estudio se observó bifurcación del tubo germinativo a las 18 horas y no fue sino hasta las 42 horas que se observó una aparente penetración a través de las células epidermales.

Estas discrepancias pueden deberse a la metodología empleada en la preparación del inóculo, el tipo de mazorca y la edad de la mazorca inoculada.

Suárez (1971) encontró micelio inter e intracelular en todo el pericarpo y hasta en las semillas del fruto cuando externamente el mismo presentaba protuberancias. Por otra parte, Amaya et al. (1976) observaron en frutos con similares síntomas, un patrón de desarrollo del hongo *M. roreri* diferente al descrito por Suárez (1971), pues encontraron que el hongo puede invadir intracelularmente los tejidos del exocarpo y mesocarpo únicamente después de la colonización del endocarpo. Es probable que estos patrones de infección sufran variaciones dependiendo del tipo de hospedero y del hongo.

A diferencia de la moniliasis, en mazorcas de cacao infectadas con el hongo causante de la mazorca negra, *P. palmivora*, se han realizado estudios de caracterización de las sustancias presentes en los diferentes tejidos de la mazorca con el fin de relacionarlos con resistencia. Se ha encontrado que en los frutos infectados por *P. palmivora* se produce un aumento del contenido de polifenoles, sobre todo de flavonas y taninos que se localizan en las zonas sanas que rodean el tejido necrótico. Estudios *in vitro* con este patógeno demostraron que dichas sustancias fenólicas son fungistáticas (Meiffren y Tanguy 1967). Tarjot (1972) observó que *P. palmivora* penetra al interior de la mazorca en frutos con diverso grado de susceptibilidad, por lo que el mecanismo de resistencia posiblemente está en el parénquima subepidérmico constituido de células pequeñas con gran cantidad de taninos y pocos carbohidratos. Se ha encontrado además que con la maduración del fruto se registra un cambio significativo en la composición fenólica del exocarpo el cual repercute directamente en la resistencia del fruto a *P. palmivora* (Rocha y Jiménez 1966).

En el tejido enfermo del cv 'Pound-7' de 60 días de edad con síntomas externos de giba la acumulación de sustancias aparentemente fenólicas en capas más profundas del tejido posiblemente constituyen un intento del fruto para detener la infección por *M. roreri*, estas sustancias fenólicas se

emplearían en la síntesis de lignina en las paredes del hospedero para aislar el tejido sano del infectado.

En las células del cv 'Pound-7' enfermo de 60 días de edad, también se encontró invaginaciones citoplasmáticas, debidas posiblemente a la presencia del patógeno ya que en estudios anteriores las relacionan con material enfermo (Esau 1968).

Las observaciones al microscopio electrónico de rastreo revelan la presencia de bacterias sobre la superficie de los frutos de cacao. Anteriormente, fue posible aislar *Pseudomonas* sp. de la superficie de mazorcas de 60-90 días de edad, que luego demostraron tener un efecto antagónico a *M. royeri* (Jiménez 1985, Jiménez et al. 1986), lo cual subraya el potencial de control biológico con bacterias de la superficie del fruto. La flora bacteriana podría variar en los diferentes cultivares de cacao y las mismas podrían jugar un papel en la resistencia o susceptibilidad (Blaha y París 1987).

## 6. CONCLUSIONES

No existen aparentemente diferencias anatómicas externas en los frutos de los cultivares de cacao 'Pound-7' (susceptible) y 'UF-296' (moderadamente resistente). Los dos presentan epidermis alveolada, estomas anomocíticos y tricomas glandulares. El cv 'UF-296' presenta además tricomas estrellados.

La cutícula de los frutos de los cv 'Pound-7', 'UF-296' y 'UF-273' (resistente) no difieren drásticamente en grosor.

De acuerdo a las observaciones al microscopio de luz existen diferencias entre los cv 'Pound-7', 'UF-296' y 'UF-273' con respecto al arreglo celular del parénquima subepidérmico, y en cuanto al contenido de sustancias posiblemente fenólicas en las vacuolas.

En frutos infectados del cv 'Pound-7' se observó una mayor acumulación de sustancias posiblemente fenólicas no solamente en las células subepidérmicas sino en capas más internas de tejido.

La germinación de los conidios de *M. royeri* ocurre por el poro germinativo o a través de la pared. Dicha germinación sucede entre las 7 y las 8 horas después de la inoculación sobre frutos incubados en cámara húmeda a una temperatura de 27 °C.

Los conidios son de dos formas: redondos y ovalados y miden 5,3 um y 7,9x4,7 um respectivamente.

La infección aparentemente no ocurre por los estomas sino directamente a través de la epidermis aunque en este trabajo no hay evidencia conclusiva.

Algunos de los tubos germinativos presentaron un engrosamiento en su extremo distal que sugiere una estructura apresorial.

## 7. RECOMENDACIONES

Hacer análisis químicos de las deposiciones de las sustancias que se observan en las células del parénquima subepidérmico de los cv 'Pound-7', 'UF-296' y 'UF-273', y estudiar su posible relación con mecanismos de resistencia.

Estudiar los procesos, ya sean mecánicos o bioquímicos, que preceden a la penetración de *M. royeri*.

Repetir esta investigación utilizando material resistente y susceptible tanto de color verde como de color rojo con el fin de dilucidar la posible relación del color del fruto con resistencia a *M. royeri*.

Realizar más estudios histológicos de material enfermo que permitan observar claramente el desarrollo del patógeno en los tejidos de los frutos de cacao.

Continuar los estudios microscópicos de la microflora localizada sobre la superficie de frutos de cacao, y explorar las posibilidades de combate biológico.

## 8. LITERATURA CITADA

1. AGRIOS, G. N. 1985. Fitopatología. Trad. de la ed inglesa por Manuel Guzmán Ortiz. México, Limusa. pp 93-137.
2. ALBERSHEIM, P.; JONES, T.; ENGLISH, P. 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. Annual Review of Phytopathology (EE.UU.) 7:171-190.
3. AMAYA, L.; BUSTAMANTE, E.; NAVARRO, L.; HERNANDEZ, A. 1976. Estudio histopatológico de mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.) infectadas con el hongo *Monilia roreri* Cif & Par. Noticias Fitopatológicas (Col.) 5(2):97-98.
4. AMPUERO, E. 1967. *Monilia* pod rot. of cocoa. Cocoa Grower's Bulletin (G.B.) 9:15-18.
5. ARANZAZU, F.; CUBILLOS, G. 1977. Observaciones sobre control y sintomatología de *Monilia roreri* Cif. y Par. en la zona de Urabá, Colombia. Cacaotero Colombiano (Col.) no 2:24-25.
6. BAKER, J.; BATEMAN, D. 1978. Cutin degradation by plant pathogenic fungi. Phytopathology (EE.UU.) 68:1577-1584.
7. BARROS, O. 1966. Valor de las prácticas culturales como método para reducir la incidencia de monilia en plantaciones de cacao. Agricultura Tropical (Col.) 22(12):605-612.
8. \_\_\_\_\_. 1977. Investigaciones sobre el hongo *Monilia roreri* Cif. & Par. causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao: sus daños y su control. Cacaotero Colombiano (Col.) no. 3:42-51.

9. \_\_\_\_\_. 1981. Avances en la represión de la moniliasis del cacao. In Conferencia Internacional de Investigación en cacao, (8a, 1981, Cartagena, . Resúmenes. Bogotá, Colombia, Fedecacao,p.irr.
10. BASTIDAS, R. A. 1953. Patogenicidad de *Monilia* sp. en *Theobroma cacao* L. Cacao en Colombia (Col.) 2:139-152.
11. BEJARANO, G. 1961. Métodos de inoculación artificial y factores favorables para la infección de *Monilia rozeri* Cif & Par. Tesis Ing. Agr. Quito, Ecuador, Universidad Central, 69 p.
12. BERLIN, G. P.; MIKSCH, J. P. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames, Iowa, Iowa State University Press. 326 p.
13. BLAHA, G.; PARIS, N. 1987 Examen en microscopie électronique de l'aspect externe des cabosses du cacaoyer saines ou infectées par *Phytophthora megacarya*. Café, Cacao, Thé (Francia) 31(1):23-34.
14. BRENES, O. 1983. Evaluación de la resistencia a *Monilia rozeri* y su relación con algunas características morfológicas del fruto de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Mag. Sc., Turrialba Costa Rica, UCR-CATIE. 60 p.
15. CAMPUZANO, H. 1976. Fluctuación de poblaciones de esporas de *Monilia rozeri* Cif et Par., y viabilidad durante un ciclo completo de afección. Noticias Fitopatológicas (Col.) 5(2):107.
16. \_\_\_\_\_. 1981. Influencia de la temperatura y la humedad en la germinación de esporas de *Monilia rozeri*. In

Conferencia Internacional de Investigación en Cacao, (8a., 1981, Cartagena). Resúmenes. Bogotá, Colombia, Fedecacao. p. irr.

17. CIFERRI, R.; PARODI, E. 1933. Descrizione del fungo che causa la "moniliasis" del cacao. *Phytopathologische Zeitschrift* (Alemania) 6(5):539-542.
18. CLAYTON, C. N. 1942. The germination of fungus spores in relation to controlled humidity. *Phytopathology* (EE.UU.) 32:921-943.
19. COSTA RICA SECRETARIA EJECUTIVA DE PLANIFICACION SECTORIAL Y DE RECURSOS NATURALES. 1984. Programa de Fomento Cacaotero. San José, Costa Rica, 129 p (Doc. SEPSA No. 092).
20. CUATRECASAS, J. 1969. Cacao and its allies. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. United States National Herbarium Contribution (EE.UU.) 35(6):379-607.
21. DELGADO, J.; BRENES, O. 1982. Informe sobre la situación de la moniliasis del cacao en Costa Rica y recomendaciones para los grupos de discusión. In Enríquez, G. A., ed. La moniliasis del cacao: Compendio. CATIE. Serie Técnica. Informe no. 28. p. 18-36.
22. DIAZ, M. J. 1956. Algunas observaciones sobre la incidencia de *Monilia* del cacao en El Ecuador. In Conferencia Inter Americana del Cacao (6a, 1956, Bahía, Brasil). Memorias p. 322-329.
23. ENGELS, J. M. 1981. Genetic resources of cacao: a catalogue of the CATIE collection. CATIE. Technical Series. Technical Bulletin No. 7. 196p.

24. ENRIQUEZ, G. 1983. El cultivo del cacao. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 162 p.
25. \_\_\_\_\_, BRENES, O.; DELGADO, J. C. 1981. Desarrollo e impacto de la moniliasis del cacao en Costa Rica. In Conferencia Internacional de Investigación en Cacao (8a, 1981, Cartagena). Resúmenes. Bogotá, Colombia, FEDECACAO. p. irr.
26. ESAU, K. 1968. Viruses in plant host. Madison, University of Wisconsin Press. 225 p.
27. EVANS, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora roreri* (*Monilia*) *roreri*. Commonwealth Mycological Institute, London. Phytopathological Papers no. 24. 44p.
28. \_\_\_\_\_, STALPERS, J. A.; SAMSON, R.A.; BENNY, G. L. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany (Can.) 56:2528-2532.
29. FAHAN, A. 1978. Anatomía vegetal. Traducido por Fernando García Arenal, Javier Fernández Casas, Joaquín Fernández Pérez. Madrid, H. Blume Ediciones. 643 p.
30. FLORES, E. 1989. La planta: estructura y función. Editorial Instituto Tecnológico de Costa Rica. 501p.
31. FRANCO, T. 1958. Transmisión de la moniliasis del cacao por el *Mecistorhinus tripterus* f. In. Conferencia Interamericana del cacao (7a., 1958, Palmira). Resúmenes. Palmira, Colombia. p. 130 -138.
32. FRIEND, J. 1979. Phenolic substances and plant disease. In Recent Advances in phytochemistry. Vol 12. Biochemistry

of Plant Phenolics. Ed. por T. Swain, J. Harborne y C. Van S. p. 557-576.

33. GALINDO, J. 1987. La moniliasis del cacao en Centroamérica. In. Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región Centroamericana. Ed. por Jorge Pinochet. CATIE Informe Técnico No. 110. p. 7-16.
34. GAUDET, D. A.; KOKKO, E. G. 1984. Application of scanning electron microscopy to paraffin-embedded plant tissues to study invasive processes of plant-pathogenic fungi. *Phytopathology*. (EE.UU.) 74(9):1078-1080.
35. GETZ, S.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS C. T. 1983. Scanning Electron Microscopy of infection sites and lesion development on tomato fruit infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology* (EE.UU.) 73(1):39-43.
36. GLOTTIEB, D. 1950. The physiology of spore germination in fungi. *Botanical Review* (EE.UU.) 16(5):229-257.
37. GOODMAN, R.; KIRALY, Z.; ZAITLIN, M. 1967. The biochemistry and physiology of infections plant disease. D Van Nostrand. 354 p.
38. HALL, J. L.; FLOWERS, T. J.; ROBERTS R. M. 1982. Plant cell structure and metabolism. 2ed. London, Logman. 543 p.
39. HAWKER, L. E. 1950. *Physiology of fungi*. London, University of London Press. 360 p.
40. HERRERA, F. 1988 Efecto de factores nutricionales y físicos sobre el crecimiento y esporulación de *Moniliophthora roreri* in vitro. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR-CATIE. 159 p.

41. HOCH, H. C.; STAPLES, R.C. 1987. Structural and chemical changes among the rust fungi during appressorium development. Annual Review of Phytopathology (EE.UU.) 25:231-247.
42. JAROSZ, A. M.; SHEETS, M.; LEVY, M. 1982. Cuticle thickness in phlox and resistance to powdery mildew: an unreliable line of defense. American Journal of Botany (EE.UU.) 69(5):824-828.
43. JIMENEZ, J. M., 1985. Combate biológico de *Monilia rozeri* mediante bacterias antagonistas. Turrialba, Costa Rica, CATIE, Departamento de Producción Vegetal. 2 p.
44. \_\_\_\_\_; GALINDO, J. J.; RAMIREZ, C. 1986 Studies on biological control *Monilia rozeri* by epiphytic bacteria. Phytopathology (EE.UU.) 76(10):1118.
45. JORGENSEN, H. 1975. *Monilia* pod rot of cacao in Ecuador. Cacao (C.R.) 15(4):4-13.
46. KARNOVSKY, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology (EE.UU.) 27:137A.
47. KOLATTUKUDY, P. E. 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. Science (EE.UU.) 208:990-1000.
48. KOLLER, W.; ALLAN, C. R.; KOLATTUKUDY P. E. 1981. Role of cutinase and cell wall degrading enzymes in infection of *Pisum sativum* by *Fusarium solani* f. sp. *pisii*. Physiological Plant Pathology (G.B.) 20:47-60.
49. KOSUGE, T. 1969. The role of phenolics in host response to infection. Annual Review of Phytopathology (EE.UU.) 7:195-222.

50. KUNOH, H. 1982. Primary Germ Tubes of *Erisiphe graminis* conidia. In Plant Infection. Tokyo, Japan Scientific Societies. 361 p.
51. LEWIS, D. H.; SMITH, D. H. 1967. Sugar alcohols (Polyols) in fungi and green plants. *New Phytologist* (G.B.) 6:143-184.
52. LILLY, V. G.; BARNET, H. L. 1951. *Physiology of the fungi*. New York, Mc Graw Hill. p 355-371.
53. LIN, T. S.; KOLATTUKUDY, P. E. 1980. Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi. *Physiological Plant Pathology* (G.B.)17:1-15.
54. LOPEZ, A. S. 1980. Leachates from the pod wall of *Theobroma cacao*. *Revista Theobroma* (Bra.) 10(3):167-173.
55. LOPEZ, F. R. 1954. Fisiología de la germinación de esporas de *Monilia* sp. *Cacao en Colombia* (Col.) 3:183-207.
56. MACNAMARA, O. C.; DICKINSON, C. H. 1981. Microbial degradation of plant cuticle. In *Microbial ecology of the phylloplane*. Ed. by J. P. Blakeman. London, Academic Press. p 453-473.
57. MAHESHWARI, R.; ALLEN, P. J.; HILDEBRANT A. C. 1967. Physical and chemical controlling the development of infection structures from urediospore germ tubes of rust fungi. *Phytopathology* (EE.UU.) 57:855-862
58. MANOTAS, L. E. 1953. El contenido en azúcares y ácidos orgánicos de la mazorca de cacao y su probable relación con ataques de enfermedades. *Acta Agronómica* (Col.) 3:177-188.

59. MARTIN, J. T.; JUNIPER, B.E. 1970. The Cuticles of Plants. Arnold Publishers. p. 347.
60. MEIFFREN, M.; TANGUY, J. 1967. Sur le role des coomposés phénoliques au cours de l'infection des cabosses de *Theobroma cacao* l par *Phytophthora palmivora* Butl. *Café, Cacao, Thé (Francia)* 40(4):337-342.
61. MERCHAN, V. 1981. Avances de la investigación de la moniliasis en cacao en Colombia. *Cacaotero Colombiano (Col.)* no. 16:26-41.
62. MORELL, J.; GIBSON, D.; KRAMER, R. 1985. Effect of fluorescent-labeled lectins on visualization of decay fungi in wood sections. *Phytopathology (EE.UU.)* 73(3):329-332.
63. NAUNDORF, G. 1954. Contribuciones al problema de la moniliasis del cacao. *Cacao en Colombia (Col.)* 3:35-61.
64. O'BRIEN, T.; McCULLY, M. 1969. Plant structure and development. Macmillan Company. Toronto, Canadá. 114 p.
65. ORELLANA, R. G. 1953. Infection and tissue changes of *Theobroma cacao* L. by *Phytophthora palmivora* Butl. *Turrialba (C.R.)* 3(4):167-172.
66. PARLEVLIET, J. E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology (EE.UU.)* 17:203-222.
67. PHILLIPS, W. 1986. Evaluación de la resistencia de cultivares de cacao (*Theobroma cacao*) a *Monilia roreri* Cif. & Par. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR-CATIE. 100 p.

68. PURDY, R. E.; KOLATTUKUDY, P. E. 1975. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, molecular weight of two isozymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani* f. *psii*. *Biochemistry (EE.UU.)* 14(13):2824-2831.
69. RAM, A.; WHEELER, B.; GALINDO, J. 1987. Una técnica para estimular la germinación de conidios de *Moniliophthora roreri*. In Reunión Anual de Fitopatología (27) y Reunión de Fijación Biológica de Nitrógeno (1, 1987, Guatemala). Resúmenes. p 12.
70. REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron microscopy. *Journal of Cell Biology (EE.UU.)* 17:208-212.
71. RIJKENBERG, F. H.; DE LEEUW, G. T.; VERHOEFF, K. 1980. Light and electron microscopy studies on the infection of tomato fruits by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botanic (Can.)* 58:1394-1404.
72. ROBERTS, D. A.; BOOTHROYD, C. W. 1972. Fundamentos de la patología vegetal. Trad. de la ed. inglesa por Filomena Díaz Cilayeta. Zaragoza, España, Acribia. p 29-163.
73. ROCHA, H. M.; JIMENEZ, E. 1966. Importancia de las sustancias polifenólicas en el mecanismo fisiológico de la resistencia de cacao (*Theobroma cacao* L.) a *Phytophthora palmivora* (Butl) Butl. Turrialba (C.R.) 16(4):319-329.
74. RORER, J. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo del cacao. Trad. por A. Pacheco. Guayaquil, Ecuador, Asociación de Agricultores. p 17-40.

75. \_\_\_\_\_. 1926. Ecuador cacao. Tropical Agriculture (Trinidad) 3(4):68-69.
76. ROTH, I.; LINDORF, H. 1971. Desarrollo y anatomía del fruto y de la semilla de *Theobroma cacao* L. Acta Botánica Venezuéllica (Ven.) 6(1/4):261-295.
77. SANCHEZ, J. A. 1982. Reacción de cultivares de cacao a la inoculación artificial con *Monilia rozeri*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica UCR-CATIE, 55 p.
78. SARASOLA, R.; ROCCA, M. 1975. Fitopatología. Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio Sur. 364 p.
79. SCHMITZ, W. H. 1985. Investigaciones en la costa Atlántica de Costa Rica sobre la epidemiología del hongo *Monilophthora rozeri*. Evans et al. en cacao (*Theobroma cacao*). (En alemán). Ph. D. Thesis. Gottingen, Alemania Federal, Universidad Georg August, Facultad de Ciencias Agrícolas.
80. SHROEDER, H. E. 1980. An established routine method for differential staining of epoxy-embedded tissue section. Microscopia Acta, 83:111.
81. SOLIDAY, C. L.; KOLATTUKUDY P. E. 1976. Isolation and characterization of a cutinase from *Fusarium roseum culmorum* and its immunological comparison with cutinase from *F. solani pisi*. Archives of Biochemistry and Biophysics (EE.UU.) 176:334-343.
82. SOTOMAYOR, F. 1965 Estudios preliminares sobre la resistencia de algunos clones de cacao a la moniliasis provocada por la inoculación artificial. Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Ecuador. Universidad de Guayaquil, Facultad de Agronomía y Veterinaria, 59 p.

83. SPURR, A. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal Ultrastructure Research (EE.UU.)* 26:31-43.
84. SUAREZ, C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri* Cif. Par. en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Facultad de Agronomía y Veterinaria. 59 p.
85. TARJOT, M. 1972. Etude anatomique de la cabosse de cacaoyer en relation avec l'attaque du *Phytophthora palmivora*. *Café, Cacao, Thé (Francia)* 16(2):123-134.
86. VANCE, C. P. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology (EE.UU.)*:18:259-288.
87. WATSON, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemistry Cytology (EE.UU.)* 4:475-478.
88. WYNN, W. K. 1976. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus response to a surface contact stimulus. *Phytopathology (EE.UU.)* 66:136-146.
89. YODER, O.; GILLIAN, B. 1985. Molecular bases of fungal pathogenicity to plants. In *Gene manipulations in fungi*. Ed. by J. W. Bennet; L. Lasure. Orlando Florida, Academic Press. p 417-448.