

Método de Inoculación y Evaluación de la Resistencia a *Phytophthora palmivora* en Frutos de Cacao (*Theobroma cacao*)¹

W. Phillips-Mora*, J.J. Galindo*

ABSTRACT

Four methods of inoculation of *P. palmivora* were tested under field conditions in Turrialba, Costa Rica (602 masl 22°C, 2 600 mm). The best method was the inoculation of five-month-old cocoa fruits with a zoospore suspension absorbed in two filter paper discs of 1 cm in diameter and placed on opposite sites of the "equator" of each fruit. Fruits were incubated in a humid chamber for 48 hr. A zoospore concentration of 15×10^4 zoospores ml^{-1} was selected experimentally, as well as an inoculation period in the field not longer than 30 min. The infectious capacity of the zoospores sharply decreased thereafter. Two hundred and four cultivars of cocoa were inoculated. Severity varied from lesions with 0.9 cm (Pound-7 and Catie-1 000) to 8.6 cm (CC-48), whereas incidence was over 90% in most of the cultivars. There was no correlation between severity and incidence. Based on severity, 19 cultivars were classified as resistant, 93 moderately resistant, 61 moderately susceptible and 31 susceptible. The resistant cultivars were: Pound-7, CATIE-1000, CC-256, EET-59, EET-64, TSHN-812, SPA-5, UF-703, CC-214, EET-48, ICS-44, EET-250, SPA-11, SPA-17, CC-42, CC-83, CC-71, CC-232, and UF-602. A second evaluation of the resistant cultivars produced similar results.

INTRODUCCION

La mazorca negra del cacao (*Theobroma cacao* L.), causada por *Phytophthora* spp. es endémica en las áreas cacaoteras y responsable de hasta un 50% de pérdidas en la producción (3). En Centroamérica se ha informado de dos especies asociadas con la enfermedad: *P. palmivora*, que es la más importante y distribuida, y *P. capsici*, presente en Guatemala y El Salvador (8).

Phytophthora causa necrosis en varias partes de la planta, pero su efecto más importante ocurre en el fruto, donde produce lesiones pardas con bordes definidos y crecimiento rápido.

¹ Recibido para publicación el 26 de enero 1990.

Los autores agradecen a los señores Fernando López P., Luis Guillermo Salazar G., Carlos Ramírez, Edwin Castillo F. Y Francisco Dittel R., ya que sin su valiosa participación no hubiera sido posible la realización de esta investigación.

* Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, Apdo 7170, CAIIE, Turrialba, Costa Rica.

COMPENDIO

Se evaluaron cuatro métodos de inoculación de *P. palmivora* en frutos de cacao bajo condiciones de campo en Turrialba, Costa Rica (602 msnm, 22°C, 2 600 mm). El método más adecuado consistió en la inoculación de frutos de cinco meses de edad, con una suspensión de zoosporas aplicada mediante dos discos de papel de filtro de 1 cm de diámetro, colocados en lados opuestos del "ecuador" del fruto. Los frutos fueron incubados en una cámara húmeda durante 48 h. Para asegurar una alta infección, se seleccionó experimentalmente una concentración de 15×10^4 zoosporas ml^{-1} y una duración máxima de la inoculación en el campo de 30 min., debido a que se determinó que la capacidad infectiva del inóculo se reducía. Seis días después de la inoculación se evaluó la incidencia, y la severidad mediante el diámetro de la lesión de mayor tamaño en cada fruto. Con el método de discos de papel se evaluó 204 cultivares. Se encontró que la severidad varió de 0.9 cm ('Pound-7' y 'Catie-1000') a 8.6 cm ('CC-48'), en tanto que la incidencia fue en casi todos los cultivares superior al 90%. No se obtuvo correlación entre la incidencia y la severidad. Los cultivares fueron clasificados de acuerdo con su severidad obteniéndose 19 cultivares resistentes, 93 moderadamente resistentes, 61 moderadamente susceptibles y 31 susceptibles. Los cultivares resistentes fueron: 'Pound-7', 'Catie-1000', 'CC-256', 'EET-59', 'EET-64', 'TSHN-812', 'SPA-5', 'UF-703', 'CC-214', 'EET-48', 'ICS-44', 'EET-250', 'SPA-11', 'SPA-17', 'CC-42', 'CC-83', 'CC-71', 'CC-232' y 'UF-602'. Al reevaluar los cultivares resistentes se observó que conservaban consistentemente su reacción.

El combate de la enfermedad mediante resistencia genética es el más ventajoso para el agricultor. Se ha determinado amplias diferencias de susceptibilidad a *P. palmivora* en condiciones de infección natural (22, 26, 27), así como bajo diversos métodos de inoculación artificial, recopilados por Rocha (18), Blaha (2) y Lawrence (10).

En las inoculaciones artificiales de frutos se ha utilizado mazorcas unidas al árbol (10, 25) o desprendidas de este (6, 23). Asimismo, se ha usado frutos intactos (6, 10) o con heridas hechas artificialmente (13).

El inóculo más empleado ha sido las suspensiones de zoosporas, pero también se ha usado micelio, esporangios o fragmentos de mazorcas enfermas (2, 10, 14). Las suspensiones han sido aplicadas inyectando (15), atomizando o sumergiendo los frutos en ellas

(25), o bien, reteniéndolas en las estriás naturales de las mazorcas (14) o mediante pequeños recipientes de plasticina (3, 21). Menos frecuente ha sido la absorción del inóculo en papeles de filtro (25) o motas de algodón (15) que luego son colocados sobre el fruto.

Los principales parámetros usados para medir la resistencia han sido la incidencia y el diámetro de la lesión (10). Algunos autores han empleado además el momento de aparición de los síntomas y de las fructificaciones del hongo, la cantidad de lesiones por fruto y la profundidad, el área y la tasa de desarrollo de la lesión (3, 14, 21).

Lawrence (10), evaluó en Costa Rica varios métodos de inoculación descritos en la literatura y encontró que el más confiable era inocular frutos de cinco meses unidos al árbol con una suspensión de zoosporas. Retuvo el inóculo sobre el fruto con plasticina moldeada y seleccionó arbitrariamente una concentración de 2×10^5 zoosporas ml^{-1} (zp ml^{-1}). Concentraciones similares a ésta han sido usadas por otros autores, tales como Blaha y Lotodé (3) y Rodríguez (21).

Los objetivos de esta investigación fueron: i) probar un método de inoculación y evaluación de la resistencia de materiales de cacao a *P. palmivora*, que sea simple y consistente y que reproduzca lo mejor posible las condiciones naturales de infección; y ii) evaluar con este método los cultivares incluidos en la Colección de Germoplasma de Cacao del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos fueron realizados en la Colección de Germoplasma de Cacao y en el Laboratorio de Fitopatología del CATIE en Turrialba, Costa Rica (602) msnm, 22°C, 2 600 mm de precipitación).

En todos los experimentos se usó el aislamiento CATIE-964, el cual fue obtenido en Turrialba y cuya patogenicidad ha sido comprobada. El inóculo se preparó a partir de colonias del hongo que crecieron en platos Petri sobre el medio Agar-V8-CaCO₃ (1:8; 20 y 0.3%) durante 10 días en una cámara a 25°C y períodos alternos de 12 h luz/oscuridad. Para la preparación de las suspensiones se siguió la metodología de Lawrence (10) modificada por Phillips y Galindo (16), que consiste en adicionar a cada plato Petri 20 ml de agua destilada a 10°C y colocar los platos 30 min., primero en una cámara oscura a 5°C y luego en otra a 25°C. Las suspensiones no fueron filtradas como recomienda Lawrence (10) debido a la esporádica presencia en ellas de esporangios y de micelio.

Con excepción de los dos primeros experimentos, las suspensiones fueron calibradas con un hematocritómetro; para esto se tomó una alícuota de la suspensión y con el objeto de inmovilizar las zoosporas, se le adicionó azul de metileno con un aza.

En todos los experimentos se inoculó frutos de cinco meses de edad en dos puntos ubicados en lados opuestos del "ecuador" del fruto. Se suministró luego a cada mazorca una cámara húmeda, mediante la colocación de una bolsa transparente de polietileno que contenía una toalla de papel y 50 ml de agua destilada (17). A los dos días se cortó los extremos inferiores de las bolsas para eliminar el agua libre.

Seis días después de la inoculación se determinó la incidencia y la severidad. La severidad se midió utilizando el diámetro de la lesión de mayor tamaño en cada fruto. Se midió la lesión en los sentidos longitudinal y perpendicular al largo del fruto y se obtuvo un promedio entre ambos.

Comparación de métodos de inoculación

Con el fin de seleccionar el mejor método de inoculación de *P. palmivora* en frutos de cacao, se comparó el método propuesto de discos de papel con los métodos de plasticina y discos de micelio-agar, comúnmente mencionados en la literatura (2, 3, 10).

El método de discos de papel consistió en la inoculación de las mazorcas con una suspensión de zoosporas aplicada por medio de discos de papel de filtro. Se evaluó dos diámetros de disco: 0.5 y 1 cm. Aproximadamente media hora después de iniciada la preparación de la suspensión, se inoculó los frutos colocando en cada punto un disco de papel de filtro (Wathman 2) sumergido con una pinza en la suspensión previamente agitada. Cada disco quedó impregnado con aproximadamente 0.05 ml de suspensión.

El método de discos de micelio-agar consistió en la inoculación de los frutos colocando en cada punto de inoculación un disco de micelio-agar de 0.5 cm de diámetro.

Para el método de la plasticina, se moldeó en cada punto un pequeño recipiente de plasticina, dentro del cual se colocó 0.1 ml de la suspensión previamente agitada. Tres días después se eliminó la plasticina.

Con cada uno de los métodos descritos anteriormente, se inoculó 10 frutos de los cv. 'EET-62', 'UF-613' y 'UF-29'. En la siguiente fase del experimento y utilizando los métodos más eficientes de la prueba anterior (discos de micelio-agar y discos de papel de 1 cm), se inoculó 15 frutos de los cv. 'Pound-7', 'EET-62' y 'UF-667'. En ambos experi-

mentos no se calibró la concentración de la suspensión pues se asumió, tal como indica Lawrence (10), que cada plato Petri produce consistentemente una concentración cercana a las 2×10^5 zp ml⁻¹

Concentración del inóculo

Para las evaluaciones de resistencia se seleccionó finalmente el método de discos de papel de 1 cm de diámetro. Utilizando este método se evaluó el efecto de cinco concentraciones de inóculo (0, 5, 8, 11 y 14 $\times 10^4$ zp ml⁻¹). Para esto se inoculó 15 frutos/cv de tres cultivares con diferente reacción conocida al patógeno (10): 'Pound-7' (resistente), 'UF-613' (intermedio) y 'UF-296' (moderadamente susceptible).

Período de utilización del inóculo

Debido a que al realizar inoculaciones sucesivas de cultivares se observó que la efectividad del inóculo se reducía al transcurrir el tiempo, se evaluó el tiempo máximo de utilización del mismo. Para esto, se inoculó 10 frutos/cv de los cv 'Pound-7' y 'UF-613' en lapsos de 15 min. a partir del inicio de las inoculaciones. Se realizaron siete inoculaciones abarcando un período de 90 min.

Evaluación de cultivares

Con el método de discos de papel se procedió a evaluar la Colección de Germoplasma de Cacao del

CATIE. En el segundo semestre de 1988 se realizaron múltiples inoculaciones que permitieron evaluar 204 cultivares. En cada evaluación se incluyó de 12 a 24 cultivares dependiendo de la disponibilidad de frutos y de mano de obra. Se consideró que cada persona podría inocular un máximo de 60 frutos en media hora, que fue el tiempo previamente seleccionado para realizar esta labor.

Se inoculó 10 mazorcas/cv cantidad que ha sido considerada suficiente por otros autores (10). Todas las inoculaciones fueron realizadas durante la tarde, evitando hacerlas en días lluviosos o muy soleados.

Se consideró que bajo condiciones normales de inoculación, la incidencia debía ser superior para cada cultivar al 85%, en caso contrario la inoculación se repitió.

Los cultivares fueron clasificados de acuerdo con su diámetro promedio de lesión de la siguiente manera: de 0 a 2.0 resistentes; de 2.1 a 4.0 moderadamente resistentes; de 4.1 a 6 moderadamente susceptibles; y mayor de 6.1 susceptible. Durante 1989 los cultivares resistentes fueron reevaluados por lo menos en una oportunidad. Aquellos que disponían de una mayor cantidad de frutos se reevaluaron en más ocasiones.

Cuadro 1. Efecto de cuatro métodos de inoculación sobre la severidad e incidencia de *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao, Turrialba, 1988.

| Cultivar | Método de Inoculación ¹ | | | | | | | |
|----------|------------------------------------|-----------------------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| | A | | B | | C | | D | |
| | SEV ² (cm) | I ³ (%) | SEV (cm) | I (%) | SEV (cm) | I (%) | SEV (cm) | I (%) |
| 'EEI-62' | 6.8 ⁴ | 95 | 2.0 | 42 | 4.4 | 100 | 5.2 | 95 |
| 'UF-613' | 3.0 | 95 | 2.4 | 50 | 2.4 | 72 | 5.0 | 100 |
| 'UF-29' | 2.8 | 75 | 2.6 | 70 | 2.4 | 95 | 7.4 | 100 |
| PROM | 4.2b ⁵ | 88 | 2.3c | 54 | 3.1bc | 89 | 5.9a | 98 |

1 Métodos de inoculación:

- A. Discos de Papel de 1 cm de diámetro
- B. Discos de Papel de 0.5 cm de diámetro.
- C. Plástica
- D. Discos de Micelio-agar

2 SEV = Severidad de la enfermedad, determinada con base en el diámetro promedio de lesión

3 I = Incidencia de la enfermedad

4 Promedio de 10 frutos

5 Valores en esta hilera seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan (P = 0.05).

RESULTADOS

De los cuatro métodos de inoculación evaluados, los más eficientes fueron los discos de micelio-agar y los discos de papel de 1 cm de diámetro (Cuadro 1). Con los discos de micelio-agar se obtuvo una incidencia promedio para los tres cultivares, cercana al 100% y un diámetro promedio de lesión de 2.9 cm. Con los discos de 1 cm estos valores fueron 88% y 2.1 cm, respectivamente. El método para el cual se dio la menor incidencia y severidad (54% y 1.2 cm) fue el de discos de papel de 0.5 cm. Con el uso de la plásticina se obtuvo una incidencia de 89% y un diámetro de lesión de 1.5 cm.

En una segunda evaluación de los métodos de discos de papel de 1 cm y discos de micelio-agar, se encontró nuevamente, que con este último se producía los mayores diámetros de lesión, sin embargo, para ambos métodos la incidencia fue muy similar (Cuadro 2).

La evaluación de las concentraciones mostró en términos generales para los tres cultivares, que al incrementarse la concentración de inóculo se aumentaba tanto la incidencia como la severidad (Cuadro 3). Para el cultivar resistente 'Pound-7' no se obtuvo respuesta a concentraciones menores a 11×10^4 zp ml⁻¹. Para los cv. 'UF-613' y 'UF-296', aún a una concentración de 5×10^4 zp ml⁻¹ se producía infección. La concentración que produjo en promedio los mejores resultados fue 14×10^4 zp ml⁻¹, obteniéndose con ella incidencias superiores al 87%. Con el objeto de facilitar la calibración de las suspensiones se seleccionó finalmente una concentración de 15×10^4 zp ml⁻¹.

Se determinó que al avanzar el tiempo de inoculación se reducía la capacidad infectiva del inóculo. Tanto para la incidencia como para la severidad, los máximos valores fueron obtenidos en los primeros 30 min después de iniciada la inoculación (Cuadro 4). Después de este momento las severidades se redujeron pero no difirieron mucho entre sí.

En las evaluaciones de los cultivares se encontró que el diámetro promedio de lesión varió de 0.9 cm (Pound-7 y Catie-1000) a 8.6 cm (CC-48), en tanto que, la incidencia fue en casi todos los cultivares superior al 90%. No se encontró correlación entre estos dos parámetros.

De los 204 cultivares evaluados se obtuvo 19 resistentes (Cuadro 5), 93 moderadamente resistentes, 61 moderadamente susceptibles y 31 susceptibles (Cua-

dro 6). Al evaluar nuevamente los cultivares resistentes se observó que conservaban consistentemente su reacción.

DISCUSION

La necesidad de identificar materiales resistentes a *P. palmivora* para ser entregados a los agricultores, ha originado muy diversos métodos de inoculación y de evaluación de la resistencia. La gran diversidad de métodos y de tipos de cacao usados en las investigaciones, unido a la amplia variabilidad natural del patógeno y de las condiciones climáticas, ha conducido a considerables discrepancias entre autores (10).

Algunos de los métodos mencionados en la literatura no reproducen adecuadamente las condiciones naturales de infección, ya que alteran la fisiología normal de los frutos al usar mazorcas desprendidas del árbol o con heridas artificiales. Esto tiene un importante efecto al evaluar la resistencia, puesto que las mazorcas modifican su reacción al ser separadas del árbol (4, 20). Así por ejemplo, Madeiros y Rocha (12) mencionan que la resistencia del cv. 'Catongo' disminuye considerablemente cuando se inocula frutos separados de la planta, y Lawrence (10) indica que la respuesta obtenida con este tipo de frutos, generalmente no coincide con la reacción obtenida

Cuadro 2. Efecto de dos métodos de inoculación sobre la severidad e incidencia de *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao. Turrialba, 1988.

| Cultivar | Método de Inoculación | | | |
|-----------|--------------------------|-----------------------|------------------------|----------|
| | Disco de papel de 1 cm | | Discos de micelio-agar | |
| | SEV ¹ (cm) | I ² (%) | SEV (cm) | I (%) |
| 'POUND-7' | 0.9 ³ | 87 | 2.4 | 85 |
| 'EET-62' | 3.2 | 92 | 5.8 | 90 |
| 'UF-667' | 5.8 | 97 | 8.2 | 100 |
| PROM. | 3.3b ⁴ | 92 | 5.5a | 92 |

1 SEV = Severidad de la enfermedad, determinada con base en el diámetro promedio de lesión

2 I = Incidencia de la enfermedad

3 Promedio de 15 frutos

4 Valores en esta hilera seguidos por la misma letra no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan (P = 0.05)

bajo infección natural. Se ha demostrado además, que frutos con algún grado de resistencia se tornan más susceptibles al ser heridos y luego inoculados (2, 10).

En otros métodos, se ha alterado el potencial del inóculo al adicionar junto con éste sustratos nutritivos artificiales que favorecen el desarrollo del patógeno. Así por ejemplo, el método de discos de micelio-agar, a pesar de haber producido en la presente investigación la mayor incidencia y diámetro de lesión, no se considera adecuado por cuanto adiciona junto al inóculo, complementos nutritivos y no permite calibrar el tipo de inóculo usado ni la concentración del mismo. Por otra parte, el método de la plasticina además de ser tedioso, tiene el inconveniente de que algunos de estos materiales han resultado tóxicos a los frutos de cacao (21) y puede existir la posibilidad de que la plasticina interactúe con el inóculo.

Se considera que el método de discos de papel de 1 cm constituye una buena alternativa porque produce un adecuado nivel de infección y permite clasificar los materiales de cacao en forma eficiente. Además es sencillo, y debido a lo inerte del papel no aporta al hongo nutrimentos adicionales. La cobertura que da el papel en los sitios de penetración reduce la evaporación del agua y la radiación directa en los mismos. La absorción de agua que sufre el disco en el momento de la inoculación garantiza el suministro de agua libre, fundamental para los procesos fisiológicos previos y durante la penetración del hongo (8). La

penetración y aparición de los primeros síntomas ocurre en poco tiempo (10) y cuando el hongo está dentro de los tejidos del epicarpio, la humedad no ejerce influencia (11). El suministro de humedad por medio del disco de papel impregnado de suspensión y la adición de la cámara húmeda a cada mazorca durante 24 h, se consideran suficientes para llenar los requerimientos de agua del hongo. Las bolsas de polietileno además, proveen de un microclima más uniforme y protegen al inóculo de factores adversos tales como lluvia y vientos.

El empleo de zoosporas, que son el principal propagulo para la diseminación e infección de la enfermedad (2), junto a la inoculación de los frutos bajo condiciones de campo (mazorcas unidas al árbol) origina un procedimiento acorde con las condiciones naturales de infección. El uso de zoosporas tiene además la ventaja de que sus suspensiones se pueden calibrar fácilmente, permitiendo una mayor uniformidad entre inoculaciones.

Al utilizar discos de papel de 0.5 cm se observó una importante disminución de la incidencia y la severidad con respecto a los discos de 1 cm, debido probablemente a la mayor capacidad de absorción de inóculo que se da con el incremento del tamaño de los discos. Este efecto puede ser importante al utilizar una suspensión con una baja concentración de zoosporas, lo cual probablemente sucedió en este experimento. En el mismo, la concentración no fue calibrada debido a que se asumió, tal como indica Lawrence (10), que cada plato Petri consistentemente produce alre-

Cuadro 3. Efecto de cinco concentraciones de inóculo sobre la inoculación artificial de *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao, Turrialba, 1988.

| Concentración (zoosporas ml ⁻¹) | Cultivares | | | | | | | |
|--|--------------------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------------|----------|
| | 'POUND-7' | | 'UF-613' | | 'UF-296' | | PROMEDIO | |
| | SEV ¹ (cm) | I (%) | SEV (cm) | I (%) | SEV (cm) | I (%) | SEV (cm) | I (%) |
| 0 | 0 ² | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0a ³ | 0 |
| 5 x 10 ⁴ | 0 | 0 | 1.3 | 90 | 2.1 | 70 | 1.3b | 53 |
| 8 x 10 ⁴ | 0 | 0 | 1.9 | 97 | 3.3 | 93 | 1.8c | 63 |
| 11 x 10 ⁴ | 0.8 | 60 | 2.1 | 90 | 2.8 | 87 | 2.1cd | 79 |
| 14 x 10 ⁴ | 1.2 | 90 | 2.1 | 87 | 2.9 | 93 | 2.2d | 90 |

1 SEV = severidad determinada con base en el diámetro promedio de lesión.
I = incidencia

2 Promedio de 15 frutos

3 Valores en esta columna seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan (P = 0.05).

Cuadro 4. Efecto del tiempo transcurrido desde la preparación del inóculo sobre la eficiencia de la inoculación de *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao. Turrialba, 1988.

| Tiempo (min.) | Diámetro de Lesión (cm) | | | Incidencia (%) | | |
|----------------|-------------------------|-----------|--------------------|----------------|-----------|----------|
| | 'UF-613' | 'POUND-7' | PROMEDIO | 'UF-613' | 'POUND-7' | PROMEDIO |
| 0 ¹ | 2.9 ² | 0.9 | 1.9 a ³ | 100 | 100 | 100 |
| 15 | 2.4 | 0.7 | 1.6 ab | 96 | 100 | 98 |
| 30 | 2.4 | 0.5 | 1.4 abc | 88 | 100 | 94 |
| 45 | 1.5 | 0.5 | 1.0 bc | 96 | 90 | 93 |
| 60 | 1.9 | 0.6 | 1.2 abc | 96 | 80 | 88 |
| 75 | 1.8 | 0.4 | 1.1 bc | 100 | 60 | 80 |
| 90 | 1.7 | 0.5 | 1.1 c | 96 | 60 | 78 |

1 Tiempo a partir del inicio de la inoculación

2 Promedio de 10 frutos

3 Valores en esta columna seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan ($P = 0.05$).

dedor de 2×10^5 zp ml⁻¹, sin embargo, Phillips y Galindo (16) encontraron que hay mucha variabilidad en la producción de zoosporas entre platos, lo que hace indispensable la calibración de las suspensiones. La uniformidad de las condiciones de inoculación debe incluir necesariamente, la utilización de niveles iguales o muy similares de inóculo, así como inóculo de igual calidad y cultivado bajo condiciones definidas (1, 7). Para obtener una suspensión homogénea se previó como práctica indispensable en las inoculaciones, la agitación constante de la suspensión.

La concentración de inóculo juega un papel muy importante en las inoculaciones artificiales, debido a que las concentraciones excesivas pueden romper la resistencia de algunos materiales, en tanto que, las concentraciones bajas pueden permitir escapes al patógeno (7). En esta investigación, para el cultivar resistente 'Pound-7', no se obtuvo respuesta a concentraciones menores a 11×10^4 zp ml⁻¹, lo que puede indicar que la concentración de inóculo no fue suficiente y se dio un escape a la enfermedad que podría conducir a calificarlo como inmune.

La reducción en la capacidad infectiva del inóculo que se da al avanzar el tiempo de inoculación, puede deberse a que la manipulación de la suspensión en el campo produce un enquistamiento precoz de las zoosporas. Esta manipulación origina un incremento de la temperatura de la suspensión, que junto con la agitación constante de la misma, son factores que inducen la ocurrencia del enquistamiento (5, 9). Al inicio del enquistamiento las zoosporas son adhesivas, por lo que, si en ese momento entran en contacto con

una superficie sólida, se sujetan firmemente a ella (5). Las zoosporas que no se encuentren en esta situación, pueden reducir su capacidad de adherencia a la mazorca y con esto las posibilidades de causar infección. Además, las zoosporas enquistadas al carecer de flagelos, pierden la capacidad de moverse por sí mismas y consecuentemente la posibilidad de acumularse o evitar sitios específicos en el hospedero, lo cual incrementaría las posibilidades de infección (5).

La inoculación en el ecuador de la mazorca permitió un mejor desarrollo y mayor facilidad para la medición de la lesión, y representa la porción del fruto donde se produce naturalmente la mayor cantidad de lesiones (10, 25). La inoculación en dos puntos proveyó una repetición adicional. En las evaluaciones se consideró únicamente la lesión de mayor tamaño para hacer una selección más estricta de los materiales.

La evaluación de los cultivares en este estudio permitió determinar que existe una amplia variabilidad de respuesta a la inoculación con *P. palmivora*, sin embargo, no se observó la reacción de inmunidad como ha sido informado por Blaha y Lotodé (3).

La clasificación de los cultivares se hizo con base en la severidad. Algunos autores han utilizado la incidencia con este propósito, sin embargo, pudo constatar en todas las evaluaciones, tal como menciona Tarjot (24), que tanto en los cultivares resistentes como en los susceptibles se producían lesiones. En ambos tipos se obtuvo en la presente investigación, incidencias superiores al 85% y en la mayoría de los cultivares mayores al 90%, lo que indica, que aún en los

Cuadro 5. Procedencia, origen genético, número de evaluaciones, severidad e incidencia de cultivares de cacao resistentes a *Phytophthora palmivora* Turrialba, 1988.

| Cultivar | País ¹ | Origen genético | Número Evaluac. ² | SEV (cm) ³ | INC (%) ⁴ |
|------------|-------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|
| CATIE-1000 | CR | POUND 12 x CATONGO | 5 | 0.9 | 98 |
| POUND-7 | PE | | 11 | 0.9 | 98 |
| CC-256 | CR | | 7 | 1.1 | 96 |
| EET-59 | EC | | 5 | 1.1 | 99 |
| EET-64 | EC | | 3 | 1.1 | 100 |
| TSHN-812 | TR | | 3 | 1.1 | 94 |
| SPA-5 | CO | | 3 | 1.2 | 98 |
| UF-703 | CR | | 3 | 1.2 | 98 |
| CC-214 | CR | POL AB SCA6 | 5 | 1.4 | 99 |
| EET-48 | EC | | 6 | 1.4 | 99 |
| EET-250 | EC | | 3 | 1.4 | 92 |
| ICS-44 | TR | | 3 | 1.4 | 90 |
| SPA-11 | CO | | 3 | 1.5 | 92 |
| CC-42 | CR | POL AB UF 676 | 2 | 1.6 | 90 |
| CC-83 | CR | | 2 | 1.6 | 95 |
| SPA-17 | CO | | 2 | 1.6 | 95 |
| CC-71 | CR | | 3 | 1.7 | 95 |
| CC-232 | CR | SCA6 x ICS 39 | 5 | 1.7 | 100 |
| UF-602 | CR | | 2 | 1.9 | 85 |

1 País: CR = Costa Rica; CO = Colombia; EC = Ecuador; PE = Perú; TRN = Trinidad.

2 Número evaluac.: número de veces en que el cultivar fue evaluado.

3 Sev.: severidad promedio. Determinada por medio del diámetro promedio de lesión.

4 Inc.: incidencia promedio

cultivares resistentes se produce penetración del hongo. Esto está en desacuerdo con lo encontrado por varios investigadores (10, 20) quienes distinguen dos tipos de resistencia: resistencia a la penetración, determinada por medio de la incidencia y resistencia al desarrollo del hongo dentro de los tejidos del pericarpio, medida mediante el desarrollo de la lesión. Como menciona Lawrence (10), dado que siempre ocurre penetración, el término resistencia a la penetración no debe usarse. La incidencia en esta investigación se utilizó para constatar la efectividad de la inoculación. Se fijó para cada cultivar una incidencia mínima de 85%, por debajo de la cual se consideró que la inoculación no había sido efectiva y era necesario repetirla.

La alta proporción de cultivares resistentes encontrados en este estudio, se debe probablemente, a que la resistencia a *P. palmivora* ha sido uno de los principales parámetros de selección de materiales promisorios en la mayoría de las estaciones experimentales.

En casi todos los frutos de los cultivares resistentes, la lesión fue de un diámetro similar al del disco y no crecía o crecía muy poco al transcurrir el tiempo. Muchas veces se observó únicamente una o pocas lesiones muy pequeñas ubicadas dentro del perímetro del disco.

Cuadro 6. Reacción de cultivares de cacao inoculados con *Phytophthora palmivora* usando el método de discos de papel. Turrialba, 1988.

| | Mod. resistentes ¹ (DL ² = 2.1 a 4 cm) | | Mod. susceptibles (DL = 4.1 a 6 cm) | | Susceptibles (DL = 6.1-8 cm) |
|-----------|---|----------|--|-----------|---------------------------------|
| 2.1-3 cm | MT-1 | EET-62 | 4.1-5 cm | 5.1-6 cm | 6.1-7 cm |
| Catongo | NA-34 | EET-96 | CAAG | Amanaven | B-10 |
| Blanco | P-20 | EET-333 | Catongo | BE-4 | BE-5 |
| CC-79 | PA-121 | EET-397 | CC-17 | Catongo 0 | CC-33 |
| CC-102 | RB-29 | EET-400 | CC-18 | CC-10 | CC-38 |
| CC-106 | Santa | GS-17 | CC-35 | CC-41 | CC-46 |
| CC-138 | Clara 3 | ICS-6 | CC-40 | CC-47 | CC-144 |
| CC-222 | SCA-6 | PA-13 | CC-45 | CC-132 | CC-169 |
| CC-225 | SIAL-93 | Pará | CC-67 | CC-137 | GA-11 |
| CC-228 | SIAL-407 | Pound-12 | CC-74 | CC-152 | GS-78 |
| CC-231 | UF-36 | R-23 | CC-107 | CC-211 | IMC-67 |
| CC-234 | UF-704 | RB-47 | CC-173 | CC-213 | IMC-60 |
| CC-240 | UF-715 | SC-5 | CC-182 | CC-249 | Matina |
| CC-241 | | SC-6 | CC-212 | CC-251 | SCR-2 |
| CC-244 | 3.1-4 cm | SCA-9 | CC-223 | Diamantes | SCR-5 |
| CC-245 | BE-2 | SCR-4 | EET-41 | -800 | SIAL-325 |
| CC-246 | CC-27 | SGU-4 | EET-364 | EEG-27 | SIC-6 |
| CC-253 | CC-34 | SGU-82 | ICS-43 | EET-228 | SIC-7 |
| CC-254 | CC-49 | SGU-89 | P-10 | GS-7 | UF-12 |
| CC-265 | CC-100 | SIAL-8 | P-19 | GS-50 | UF-93 |
| EEG-29 | CC-121 | SIAL-339 | R-6 | P-43 | UF-122 |
| EEG-48 | CC-124 | SIC-329 | R-48 | SCA-12 | UF-210 |
| EEG-64 | CC-139 | SIC-433 | R-117 | SGU-3 | UF-242 |
| EET-94 | CC-210 | SIC-802 | SIAL-70 | SGU-63 | UF-667 |
| EET-95 | CC-215 | SIC-806 | SIC-813 | UF-11 | |
| EET-162 | CC-235 | SPA-9 | II-1 | UF-168 | 7.1-8 cm |
| EET-338 | CC-257 | SPA-10 | UF-668 | UF-221 | CC-9 |
| EET-399 | CC-264 | UF-4 | UF-672 | UF-296 | CC-43 |
| ICS-32 | Común | UF-29 | UF-677 | UF-601 | CC-44 |
| ICS-46 | Típico | UF-273 | UF-705 | UF-650 | CC-236 |
| Laranja | CUL-7 | UF-613 | UF-713 | UF-654 | PA-81 |
| MA-12 | EEG-25 | | | UF-676 | TSHN-792 |
| MA-13 | EEG-65 | | | UF-702 | UF-700 |
| Mocorongo | EET-45 | | | | 8.1-9 cm |
| | | | | | CC-48 |

1 Clasificación de los cultivares: Moderadamente resistentes, Moderadamente susceptibles, Susceptibles

2 DL = Diámetro promedio de lesión

LITERATURA CITADA

- BLAHA, G. 1967. *Phytophthora palmivora* (Butl) Butl : variation de la pathogénie en fonction de la source de l'inoculum. Café, Cacao, Thé 11(4):331-336.
- BLAHA, G. 1974. Methods of testing for resistance In *Phytophthora* disease of cocoa. Ed by Gregory, P.H. London, Longman. p. 179-195.
- BLAHA, G.; LOTODE, R. 1976. Un critère primordial de sélection du cacaoyer au Cameroun: la résistance à la pourriture brune des cabosses (*Phytophthora palmivora*). Café, Cacao, Thé 20(2):97-116.
- BLAHA, G.; LOTODE, R. 1977. Contribution à la connaissance des modalités de la transmission héréditaire de la résistance du cacaoyer à la pourriture brune des cabosses (*Phytophthora palmivora*) au Cameroun. Café, Cacao, Thé 21(3):179-196.

5. CARLILE, M.J. 1983. Motility, taxis, and tropism in *Phytophthora*. In *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Ed by Erwin, D.C.; Bartnicki-García, S.; Tsao, P.H. Minnesota, American Phytopathological Society p. 95-107.
6. ENRIQUEZ, G.; SALAZAR, G. 1987. Cacao varietal resistance to *Phytophthora palmivora* and its inheritance at Turrialba, Costa Rica. In Proceedings of the meeting of the American Regional Group on *Phytophthora palmivora* on cacao. Ed by Enriquez, G.; Zentmeyer, G. Turrialba, Costa Rica. CATIE. Technical series. Technical Report no. 126 p. 19-20.
7. FRENCH, E.R.; HEBERT, I.I. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica IICA: Serie de Libros y Materiales Educativos no. 43 p. 168-186
8. GREGORY, P.H.; MADDISON, A.C. 1981. Epidemiology of *Phytophthora palmivora* on cocoa in Nigeria; final report of the International Cocoa Black Pod Research Project. Kew, England, Commonwealth Mycological Institute. Phytopathological Papers no. 25. 188 p.
9. HEMMES, D.E. 1983. Cytology of *Phytophthora*. In *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Ed by Erwin, D.C.; Bartnicki-García, S.; Tsao, P.H. Minnesota, American Phytopathological Society. p. 9-40
10. LAWRENCE, J. S. 1978. Evaluation of methods for assessing resistance of cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivars and hybrids to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. Itabuna, Bahía, Brasil Centro de Pesquisas do Cacau. Boletín Técnico no. 62. 46 p.
11. MEDEIROS, A.G. 1974. Novos conceitos sobre a podridão parda do cacau. Cacau actualidades (Brasil) 11(4):21-26.
12. MEDEIROS, A.G.; ROCHA, H.M. 1964. Programação dos trabalhos de seleção de cacaueiros resistentes a podridão parda no Estado de Bahía, Brasil. Phytopathology 55:125-126.
13. MEDEIROS, A.G.; ROCHA, H.M. 1965. Estudo da resistência do cacau Catongo à podridão parda. relatório Anual CEPLAC, Centro de pesquisas do cacau, Itabuna, Brasil. 29 p.
14. ORELLANA, R.G. 1954. Estudios sobre podredumbre de los frutos de cacao causado por *Phytophthora palmivora* en Costa Rica. Turrialba 4(1):35-38
15. PARIOTI, M. 1975. La résistance horizontale du cacaoyer au *Phytophthora* sp. Méthodes d'évaluation précoce. Café, Cacao, Thé 19:123-136.
16. PHILLIPS M.,W.; GALINDO, J.J. 1988. Efecto de períodos de temperatura y edad del cultivo sobre la producción de inóculo de *Phytophthora palmivora* *in vitro*. In Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología, División Caribe, 28a, San Andrés, Colombia, 1988. Resúmenes. San José, Costa Rica s.p.
17. PORRAS, V.H.; GALINDO, J.J. 1984. Efecto de niveles de inóculo y uso de "cámara húmeda" para evaluar la resistencia de cacao a *Monilia roleri* Cif y Par. In Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología, División Caribe, 24a, San José, 1984. Resúmenes. San José, Costa Rica s.p.
18. ROCHA, H.M. 1965. Variedades de cacao resistentes a *Phytophthora palmivora*. una revisión de literatura. Cacau (Costa Rica) 10(1):1-10.
19. ROCHA, H.M. 1974. Breeding cacao for resistance to *Phytophthora palmivora*. In *Phytophthora disease of cocoa*. Ed. by Gregory, P.H. London, Longman. p. 211-218
20. ROCHA, H.M.; MARIANO, A.H. 1969. Seleção de cultivares de cacau resistentes a *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. In Conferencia Internacional de Pesquisas em cacau, 2a, Salvador e Itabuna, 1967. Memórias, Bahía, Ceplac. p. 150-155.
21. RODRIGUEZ, G. 1983. Herencia de la reacción del cacao (*Theobroma cacao* L.) a la pudrición de las mazorcas causada por *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. Tesis Mag. Sc. UCR-CATIE. Turrialba, Costa Rica. 79 p.
22. SORIA, J.; ESQUIVEL, O. 1966. Niveles de infección de *Phytophthora palmivora* sobre cultivares de cacao en condiciones de campo. Fitotecnica Latinoamericana (Ven.) 3:119-124.
23. SREENIVASAN, I.N. 1975. A new method for screening for resistance to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. In Conferencia Internacional de Investigaciones en Cacao, 5a, Ibadan, Nigeria. 12 p.
24. TARJOT, M. 1974. Physiology of the fungus. In *Phytophthora disease of cocoa*. Ed by Gregory, P.H. London, Longman p. 103-116.
25. WHARTON, A.L. 1959. Black pod disease. In West African Cocoa Research Institute. Annual Report 1957-58. p. 25-30
26. WHARTON, A.L. 1961. Black pod disease. Resistance and tolerance. In West African Cocoa Research Institute. Annual Report 1959-60. p. 24-25.
27. WHARTON, A.L. 1962. Black pod disease. Resistance and tolerance. Field investigations. In West African Cocoa Research Institute. Annual Report 1960-61. p. 28-29